



INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY
UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION



INTERNATIONAL CENTRE FOR THEORETICAL PHYSICS
34100 TRIESTE (ITALY) - P.O. B. 586 - MIRAMARE - STRADA COSTIERA 11 - TELEPHONE: 224281/23456
CABLE: CENTRATOM - TELEX 460392-I

SMR/112 - 20

IV^o SEMINAIRE SUR L'ENERGIE SOLAIRE

(10 - 21 septembre 1984)

LES PLANTES CULTIVEES ET L'HOMME.
L'INGENIERIE GENETIQUE.

D. COMBES
Université de Pau
et des Pays de l'Adour
68 rue Montpensier
64000 Pau
France

LES PLANTES CULTIVEES ET L' HOMME . L'INGENIERIE GENETIQUE.

Daniel COMBES

Les " manipulations genetiques " & ingénierie génétique)
remontent sans doute à l'époque Néolithique (5000 à 10000 ans) -
Où l'Homme a commencé à intervenir dans la reproduction des plantes et
des animaux.

En effet, liée à la naissance de l'agriculture, la domestication
d'un certain nombre d'espèces peut être considérée comme une sélection
empirique des descendants des individus les mieux adaptés aux besoins
humains.

Cette sélection empirique s'est poursuivie pendant des siècles,
très souvent l'oeuvre de paysans particulièrement astucieux, que l'on
découvre encore de nos jours, si l'on veut bien se donner la peine de partir
à leur recherche.

Dans un certain nombre de pays, après la déception qui a
succédé à l'échec relatif de la " Révolution Verte " (1940 1970) les généticiens
spécialisés dans l'Amélioration des Plantes sont devenus conscients de
l'importance des variétés traditionnelles (et des formes "sauvages").
Celles-ci constituent un réservoir fantastique de gènes (ressources génétiques)
pour l'adaptation des plantes à leur environnement (résistances à des
maladies, aux aléas climatiques,...) et également de caractéristiques
organo-leptiques ou nutritionnelles disparues chez les variétés modernes
par surcroît dangereusement consanguines. La création de ces dernières
résulte de l'application un peu trop hâtive des lois de Mendel (lois
fondamentales de la génétique) qui s'est avérée d'une efficacité
extraordinaire mais qui allait jusqu'à menacer (et parfois même à éliminer)
les variétés traditionnelles.

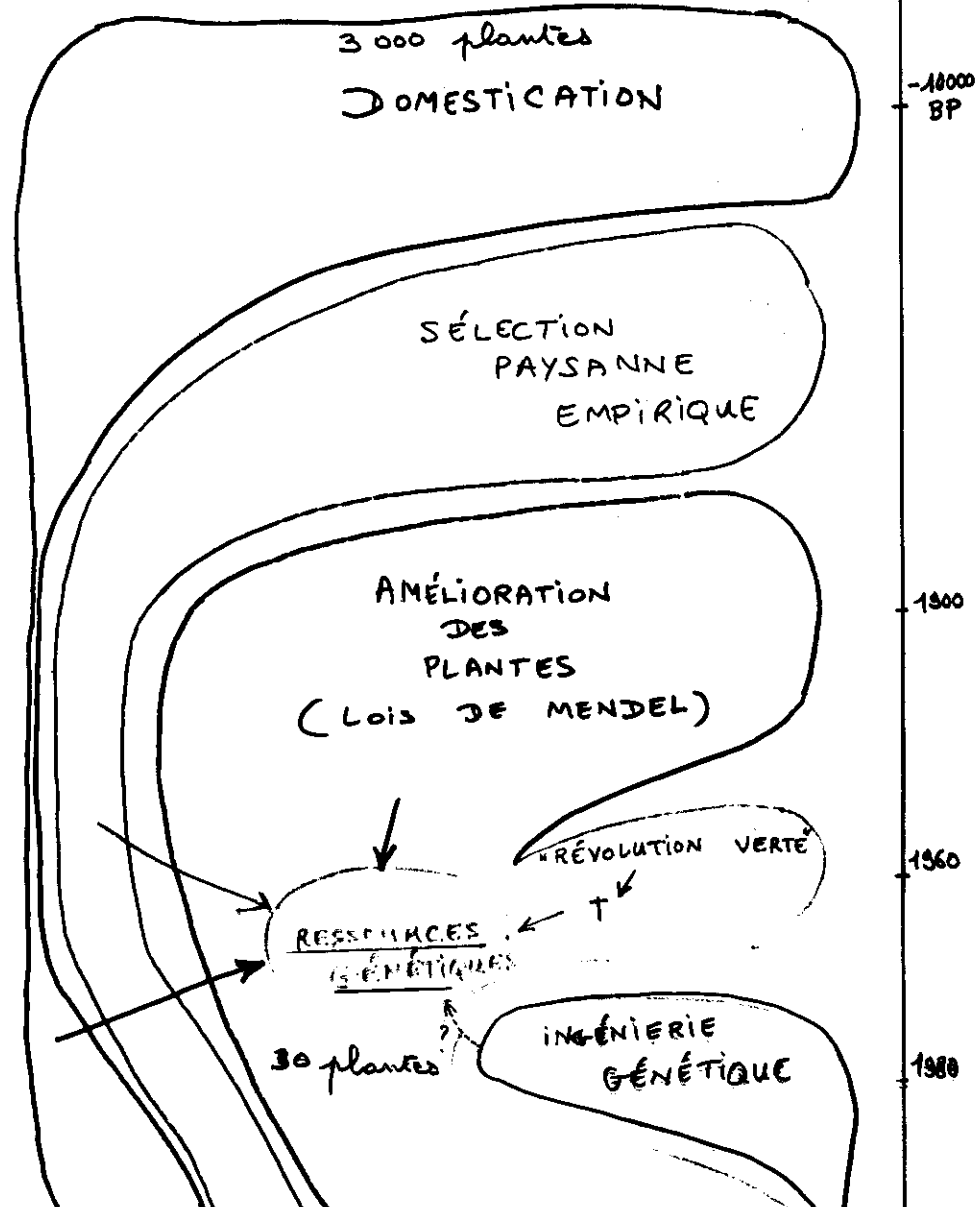
Dans une perspective vraisemblablement assez lointaine
l' ingénierie génétique (au sens strict) issue, elle, de la biologie
moléculaire, permet d'envisager d'aller encore plus loin dans l'amélioration
des plantes. Mais il faudra, quoi qu'on fasse, conserver (retrouver?)
la sagesse paysanne, qui a toujours été profondément consciente que la Vie
est synonyme de diversité.

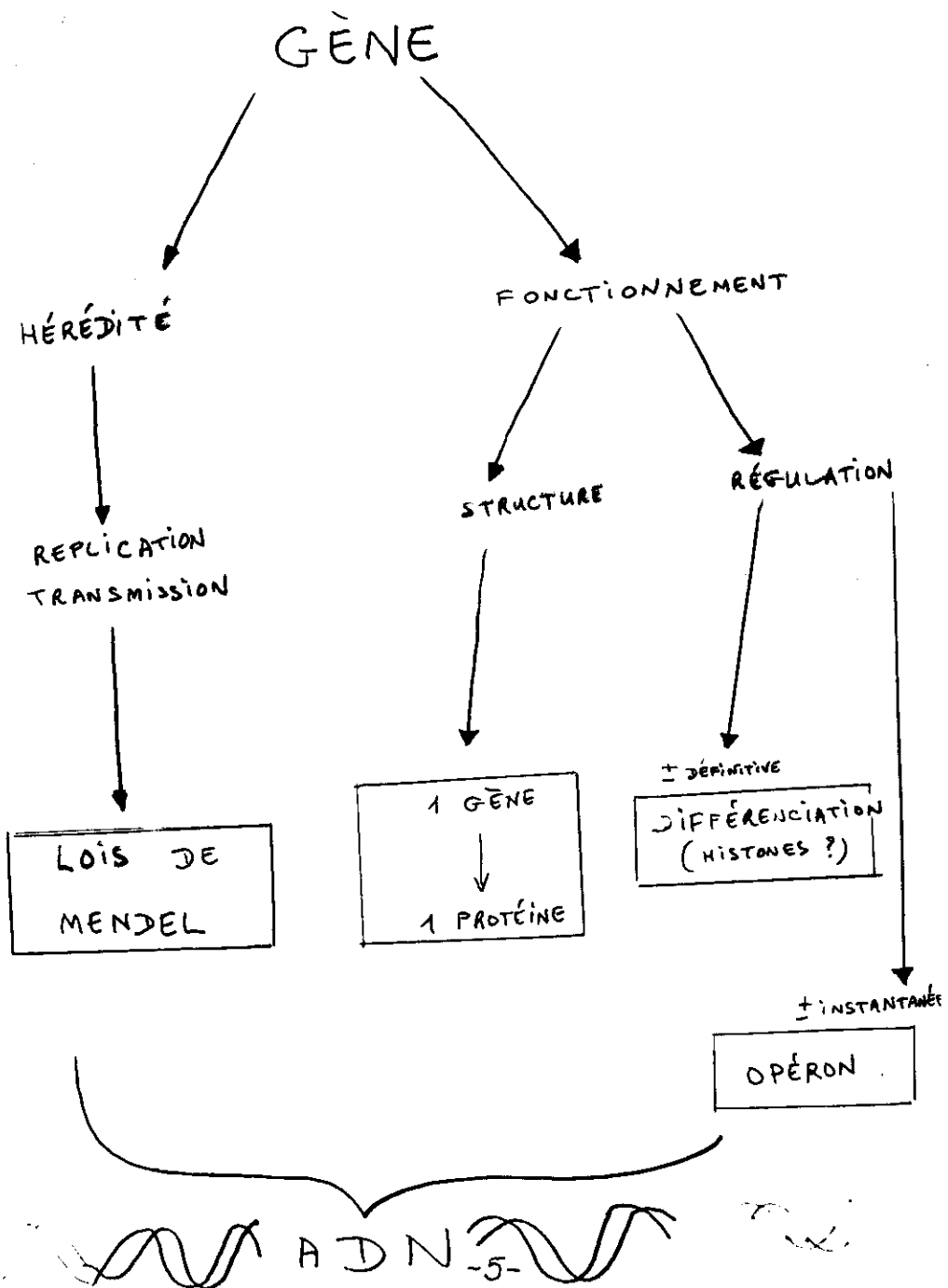
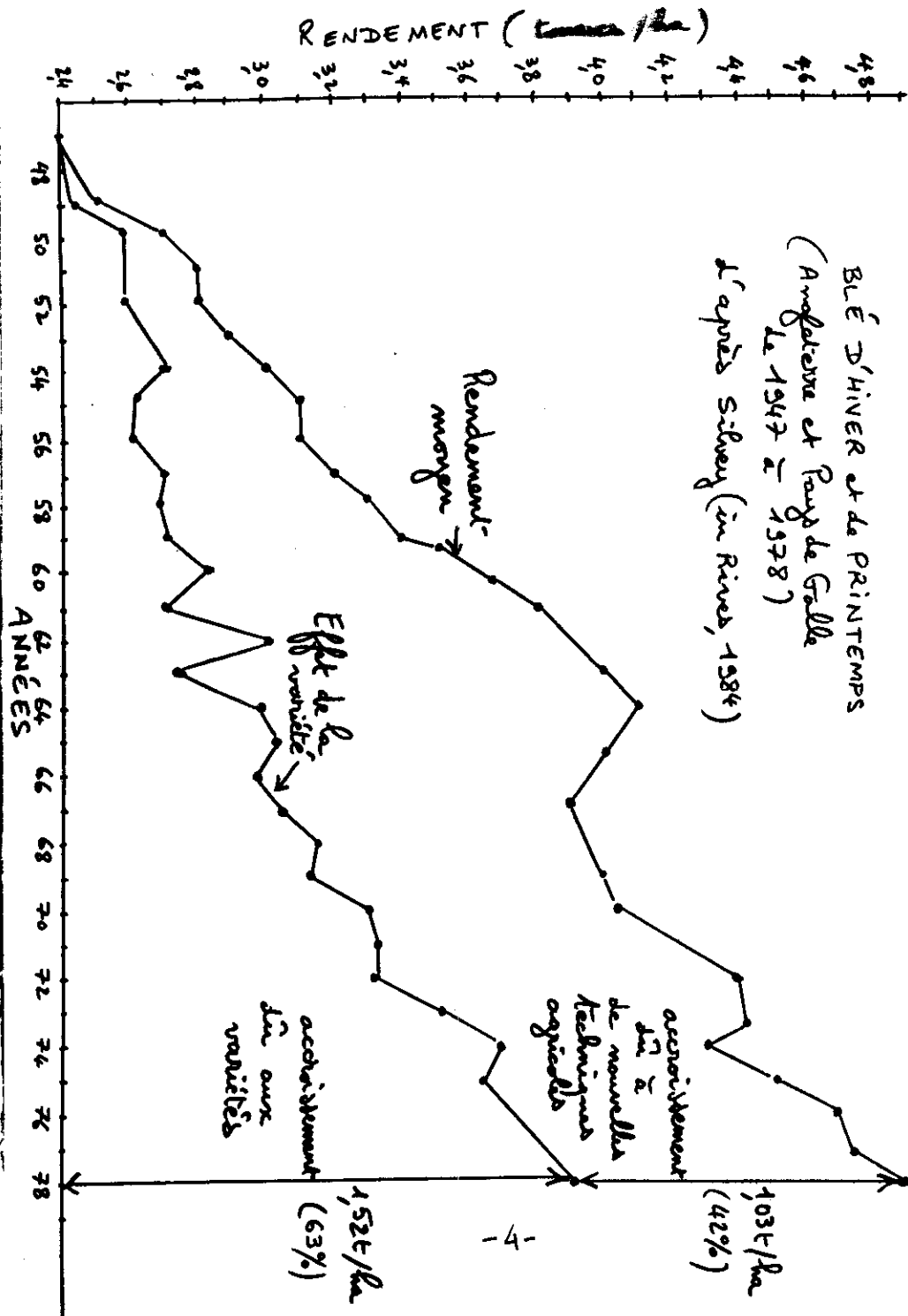
-1-

Bibliographie

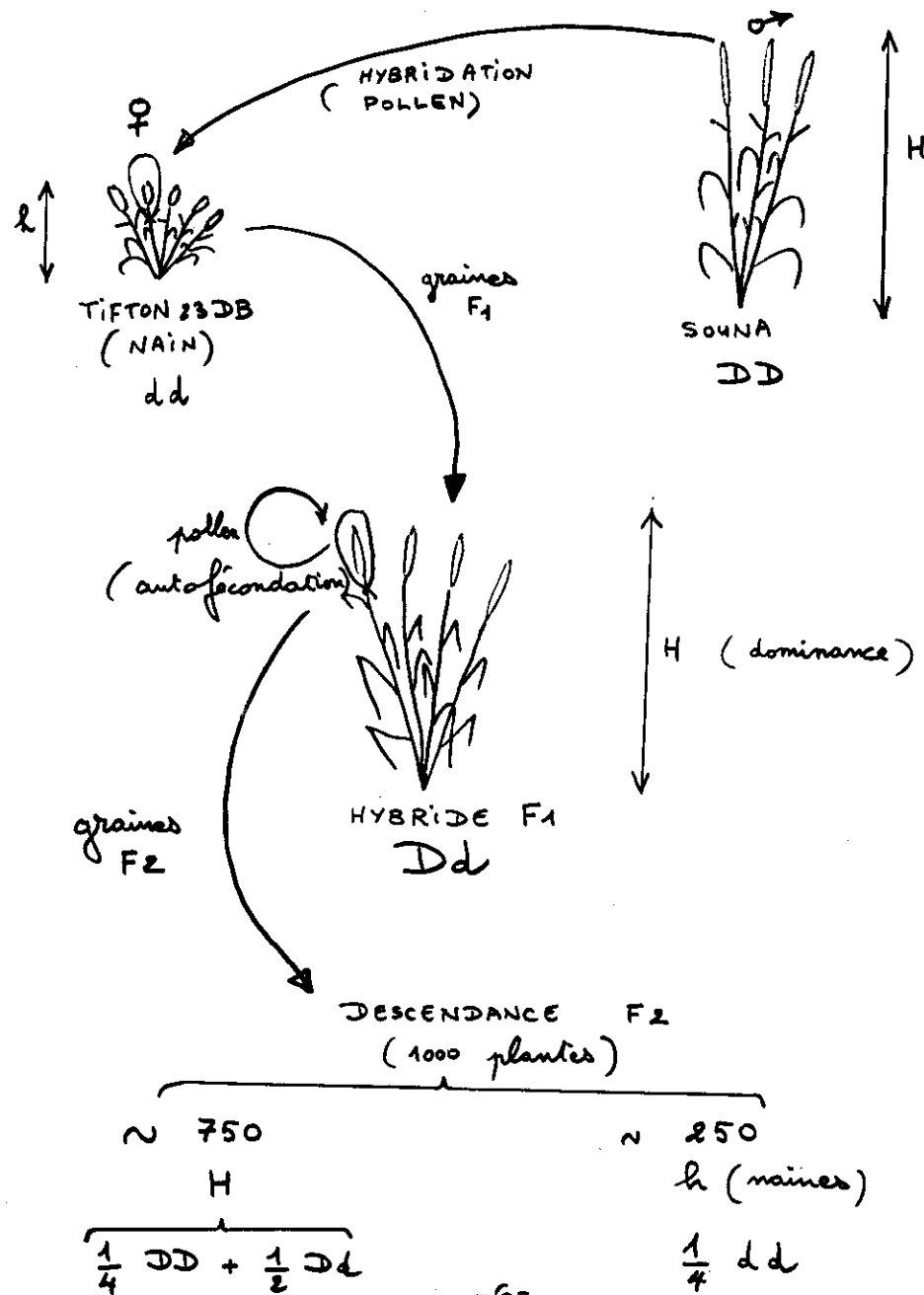
- CAPLAN, A.; HERRERA-ESTRELLA, L.; INZE, D.; VAN HAUTE, E.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.; ZAMERISKI, P. 1983. Introduction of genetic material into plant cells. *Science*, 222 : 815-821.
- CHILTON, M.-D. 1983. L'introduction de gènes étrangers dans les plantes. *Pour la Science*, 70 : 89-99.
- HARLAN, J. 1978. *Crops and man*. A.A.A.S., Madison U.S.A.
- RIVES, M. 1984. L'amélioration des plantes. *La Recherche*, 155 : 752
- TOLBERT, N.E. 1979. Approaches for increasing photosynthetic efficiency. in *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*. A. HOLLAENDER.
- VON NESTSTEIN, D. 1983. Genetic engineering in the adaptation of plants to evolving human needs. *Experientia*, 39 (7) : 587-804.

L'amélioration des Plantes au point de vue Génétique





LOIS DE MENDEL



-6-

APPROCHES NOUVELLES

DE L'INGÉNIERIE GÉNÉTIQUE CHEZ LES PLANTES

Tout a commencé il y a 10 000 ans
lorsque le chasseur-maître est devenu
agriculteur!

Grâce à des programmes de sélection
l'homme a domestiqué d'innombrables
espèces animales et végétales.

Un programme d'amélioration classique
comprend:

1. la CRÉATION de DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE
par CROISEMENTS d'INDIVIDUS VARIÉS
2. un effort constant de la part
du sélectionneur pour SÉLECTIONNER
les descendants présentant des
caractères utiles.

LIMITE MAJEURE :

cela dépend de la COMPATIBILITÉ SEXUELLE

-7-

Inconvénients évidents de se limiter
à une seule espèce.

Ex: nutrition humaine

- protéines de réserve du blé
toutes pauvres en lysine
- protéines du haricot suffisantes en lysine
mais très pauvres en acides aminés
soufrés: méthionine et cystéine

L'Homme a contourné le problème
en mélangeant protéines de sources variées
15g de protéine de blé + 15g de protéine de haricot
→ nutrition complète en protéines.

Mais nécessite effort constant de mélange

Approches nouvelles pour créer de la diversité
génétique

- Culture de cellules.
- Vecteurs d'ADN recombinant
 - ADN_{mt}
 - ADN_{op}
 - Transformation:
 - auxotrophie stable?
 - résistance aux antibiotiques
(pas exprimée car
origine bactérienne)
- Virus des plantes

ne peut supporter
augmentation de son ADN

Caulimovirus (CAMV = Cauliflower
mosaic virus)

INTRODUCTION DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE CHEZ DES CELLULES VÉGÉTALES (CAPLAN et coll., 1983)

Utilisation du vecteur naturel:

Agrobacterium tumefaciens

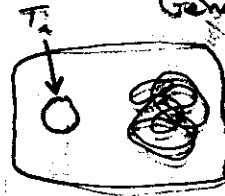
microorganisme du sol infecte grand nombre
de Dicot. après que blessés.

→ Tige blessée prolifère → tumeur: "crown gall"
→ cellules transformées, plus besoin de la bactérie
pour se diviser,

pas besoin de substances de croissance
nécessaires en culture in vitro,

synthétisent substances oploïques aux tumeurs
opines, synthétisées par bactéries
pour induire tumeur

Genes responsables de la croissance hormones = induction
= diversité
+ capacité biosynthèse opine
codés par plasmide induisant la tumeur
Ti d'Agrobacterium tumefaciens



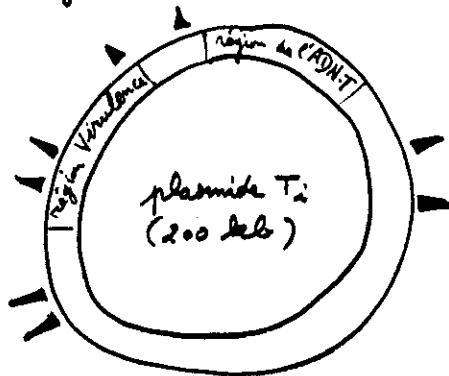
Région spécifique du plasmide Ti, la région T
ou ADN_T transférée aux chromosomes
de la plante. hôte susceptible.

Séquences de plasmide Ti essentielles

4

Agrobactéries débarrassées de leur plasmide Ti
n'induisent plus de tumeur
→ d'où la concentration des efforts pour
identifier les gènes responsables de la tumorigénèse
et localiser

2 régions distinctes:



- ADN-T qui contient toutes les séquences de plasmide trouvées dans les lignées tumorales
- pTi A6NC, pTi Ach5, pTi B6S3 → 2 régions adjacentes : 13,6 kb (ADN-T gauche) et 7 kb (droit)
 - 1 des gènes de l'ADN-T gauche → synthétise pour octopine (1 des opines)
- pTi T37, pTi C58 → 1 seul ADN-T 23 kb
 - gènes de synthèse de nopaline

5

ADN-T des 2 classes de plasmides Ti

- 6 transcriptions de gènes (avec poly A) de un segment d'ADN de 3 kb commun (5, 2, 1, 4, 6a, 6b)
- 3 gènes semblent directement responsables de la formation de tumeur:

- Tumeurs crown-gall normales, non-organisées alors que tumeurs issues de mutants avec insertion dans gène 4 (locus Ro1) permettent formation de racines sur plantes chez lesquelles têtes
- Tumeurs induites par mutants gènes 1 ou 2 (locus Shi) donnent sals verts qui produisent tiges normales et anormales

Par analogie avec substances de croissance

- gène 4 → ~ cytokinine
 - inactive → cytokinine/auxine faible → racines
- gènes 1 et 2 → ~ auxine
 - mutants → cytokinine/auxine élevés → tiges

- Deuxième région du plasmide T_i
contient séquences essentielles
pour la formation de tumeurs
= région de virulence ou vir

→ séquences pas brisées les lignes tumorales
établies → pas essentielles pour le maintien
de la tumeur.

Clonage des 2 régions sur répliques indépendantes
montre qu'aucune oncogène α elle seule,
mais que les 2 complètent pour stimuler
la formation d'une tumeur.

Les plasmides contenant la région T d'un
plasmide nopaline complètent la région vir
d'un plasmide octopine et réciproquement.
(→ aucun ensemble de gènes ne contient
de fonctions oncogènes spécifiques d'une classe
de plasmides)

Mise au point d'un vecteur pour le transfert
d'ADN étranger

Recherche en cours focalisée
sur la mise au point de dérivés de plasmides
 T_i modifiés qui seraient utiles pour les
manipulations génétiques des plantes.

2 caractéristiques majeures à incorporer
dans ces nouveaux vecteurs:

- 1° transférer efficacement ADN à des
cellules végétales sans perturber
croissance et développement normaux
de la plante;
- 2° permettre l'insertion aisée d'ADN étranger
entre séquences terminales (essentielles
pour l'insertion de l'ADN étranger dans
le chromosome de la plante)

Un tel vecteur a été récemment construit

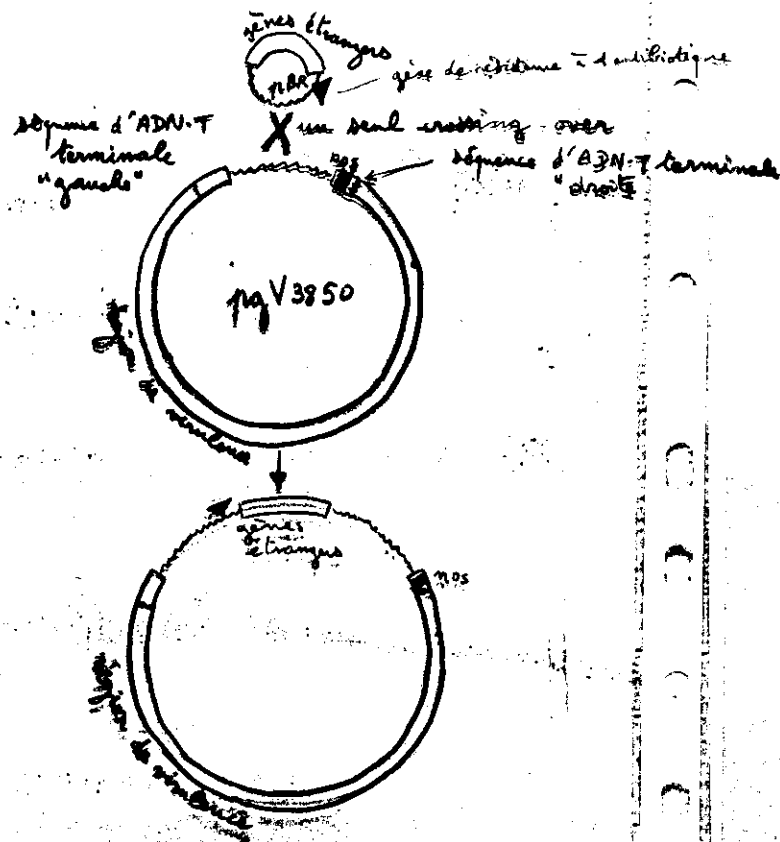
- pGV 3250, qui n'est pas oncogène.

Il possède:

- les régions terminales et toutes les séquences
du plasmide en dehors de l'ADN-T
- l'ADN près de l'extrémité "droite" qui code
pour la nopaline synthétase (nos qui
servira de marqueur pour cellules transformées)
- à la place des gènes internes à l'ADN-T
qui déterminent le phénotype callus indifférencié

le vecteur couramment utilisé pBR322

Un seul *crossing-over* entre la région pBR322 de pGV3850 et la région pBR du plasmide portant le gène intéressant produit un plasmide qui peut être utilisé pour transformer des plantes.



pGV3850 ainsi constitué a pu être transféré à plusieurs espèces: tabac, pétunia, carotte, et pomme de terre.

Après : marqueur not il est aisé de mesurer l'efficacité de la transformation.

Plantules tabac inoculées, tirées au site d'inoculation prélevées et cultivées *in vitro*

→ cals testés pour la présence de neopalline:

25% étaient not-positifs.

Transférés sur milieu permettant régénération

→ 3 à 78% de plantes régénérées not-positives.

Introduction de gènes nouveaux chez les plantes

Utilisation de transposons bactériens.

Tn 7 et Tn 5 insérés *in vivo* dans ADN-T de plasmides Ti

Mais gènes codés par ces transposons pas exprimés (= gènes procaryotes)

Même échec avec gènes eucaryotes : ADH de levure, gènes de cellules de Mammifères, tels β -globine et interféron.

Après de plantes isolés, peu nombreux :

- leghémoglobine : ne s'exprime que dans nodosités avec *R. rhizobium*

- zéine ou pharécine : que dans les graines.

Démontre que si vecteurs ont signaux promoteur et terminal pour transcription des gènes nos : suffisant pour que machinerie de traduction de la cellule produise protéine active du gène étranger.

Ex: gènes de bactéries pour résistance à antibiotiques
G 419, kanamycine ou methotrexate qui sont très toxiques pour la cellule végétale
→ cellules transformées résistantes.

→ Plasmides Ti peuvent être utilisés pour transférer et faire s'exprimer des gènes dans les plantes.

Par ex. gènes impliqués dans photosynthèse
- petite sous-unité (ss) de la m.d.P. carboxylase (ribulose diphosphate carboxylase)
- protéine liée à chlorophylle.
Expression de ces 2 gènes induite par la lumière dans tissus verts.

→ Gène chimère avec 300pb de région promoteur de "ss" chez pois transféré à cellules de tabac.

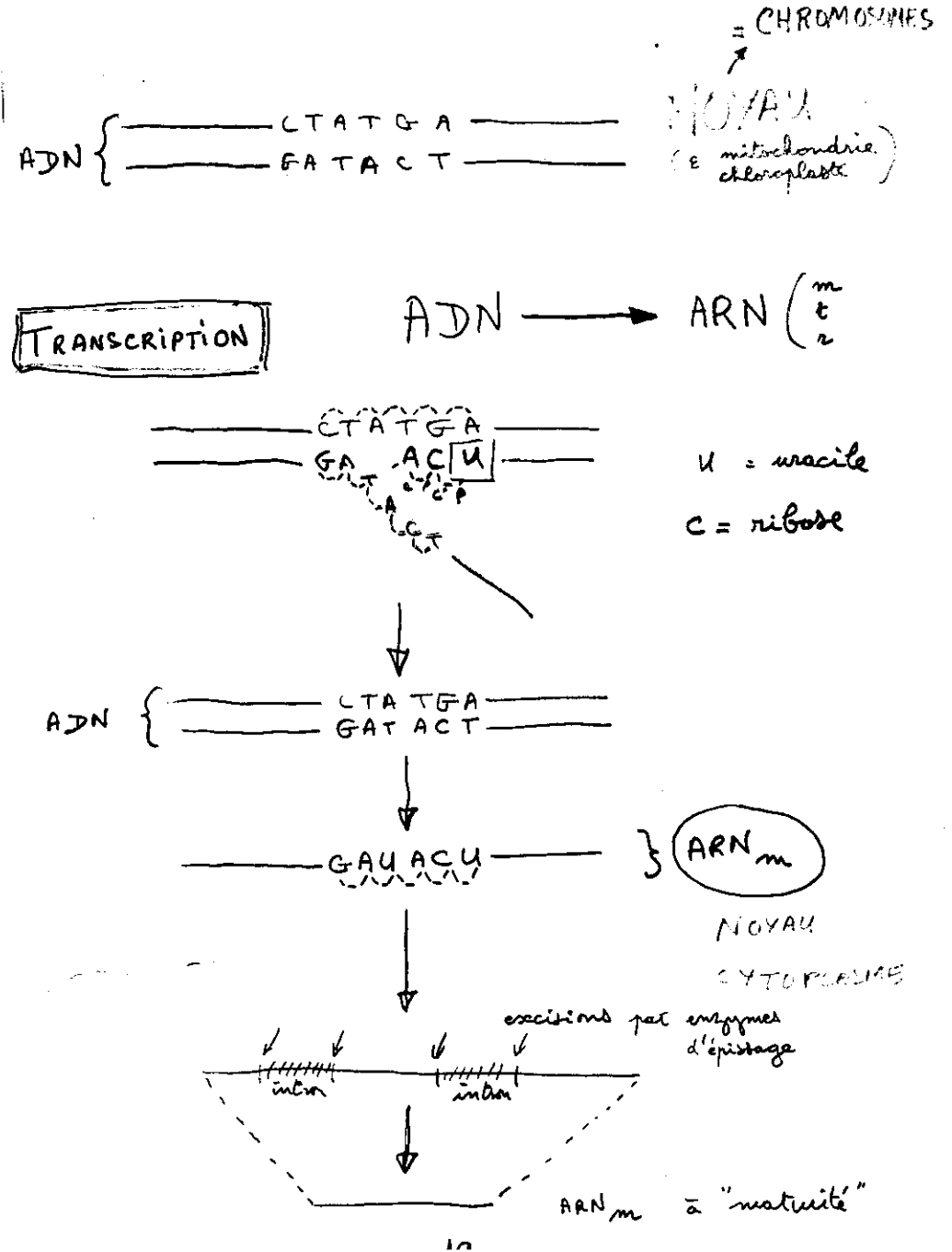
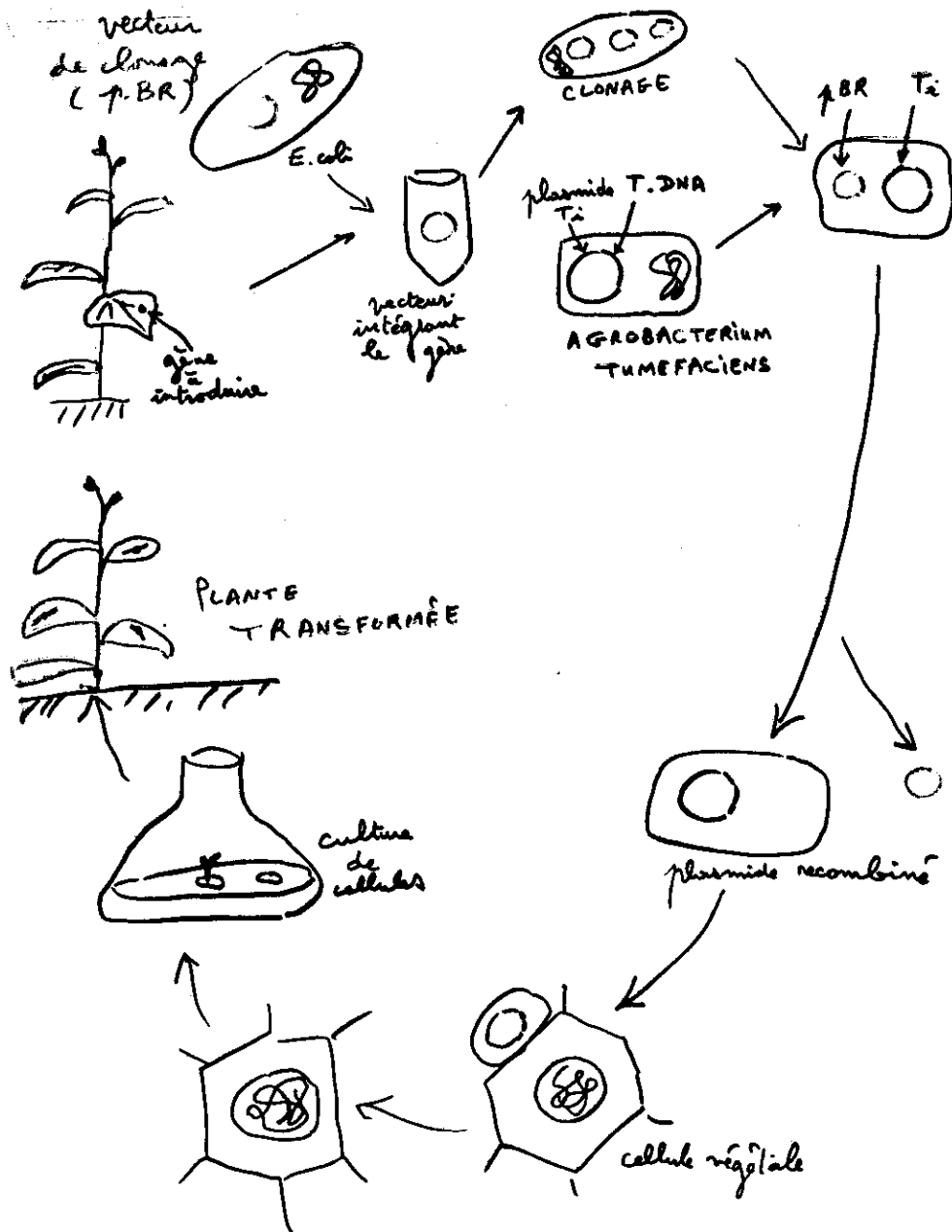
Problèmes actuels

→ Agrobacterium infecte espèces nombreuses et variées de Dicotylédones, mais peu utilisables à culture in vitro

Problèmes importants chez Brassica et Solanum

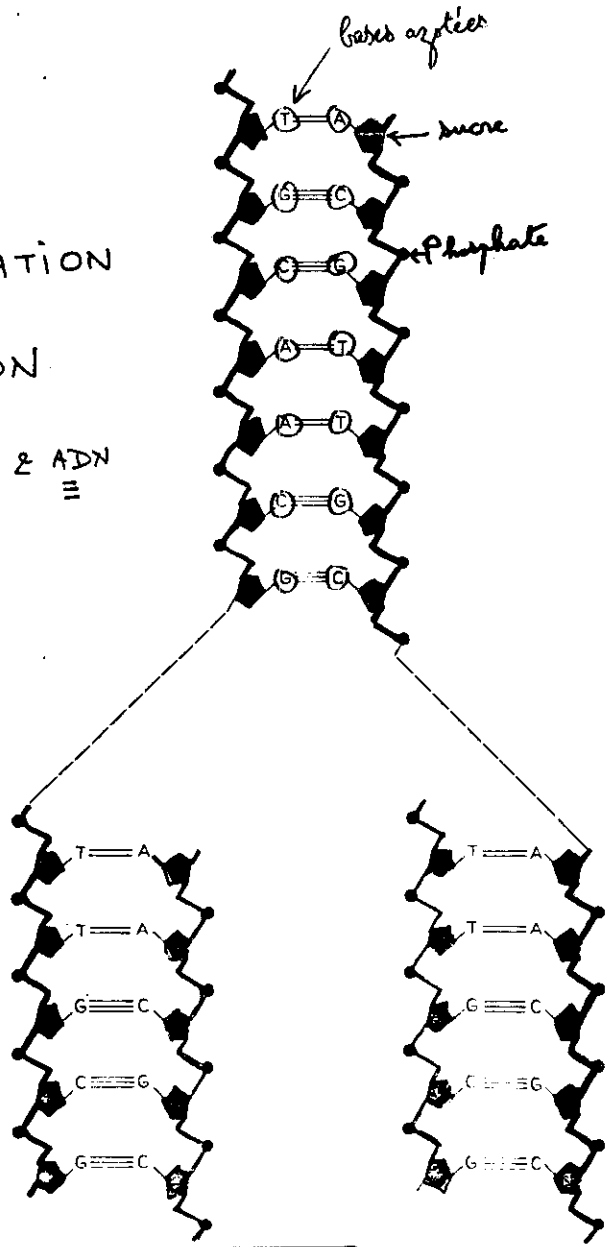
mais nombreuses plantes cultivées telles que légumineuses, luzerne et soja, p. ex.
→ ça ne marche pas.

- Pas de système de transfert pour Monocotylédones (donc les grandes céréales). Jusqu'à présent résistantes à infection par plasmide Ti d'Agrobacterium.



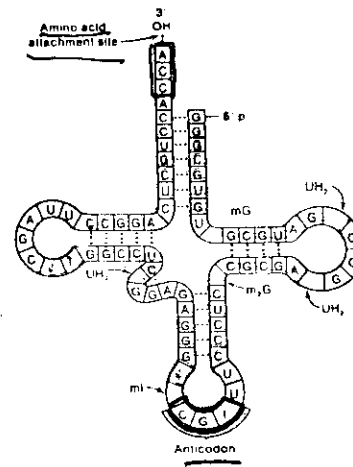
REPLICATION DE L'ADN

1 ADN → 2 ADN

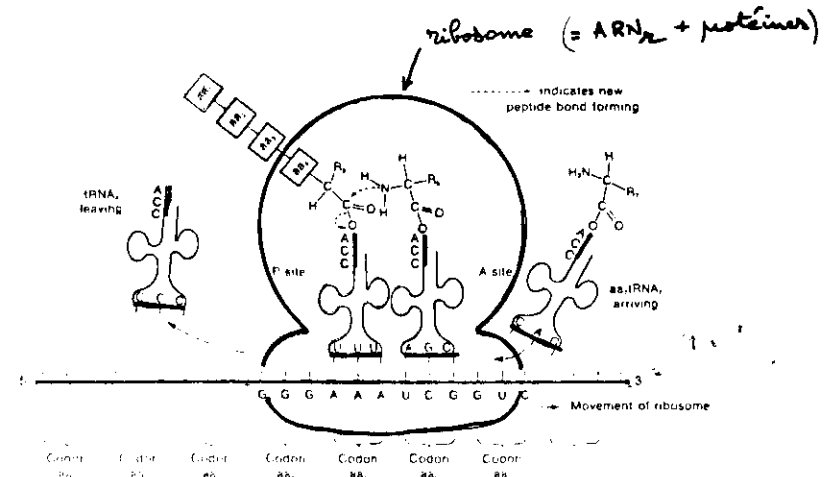
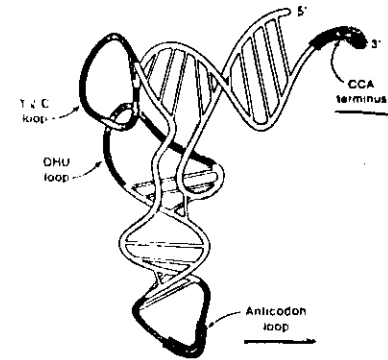


TRANSCRIPTION

1 ADN → 1 ARN à l'brin
(U au lieu de T)

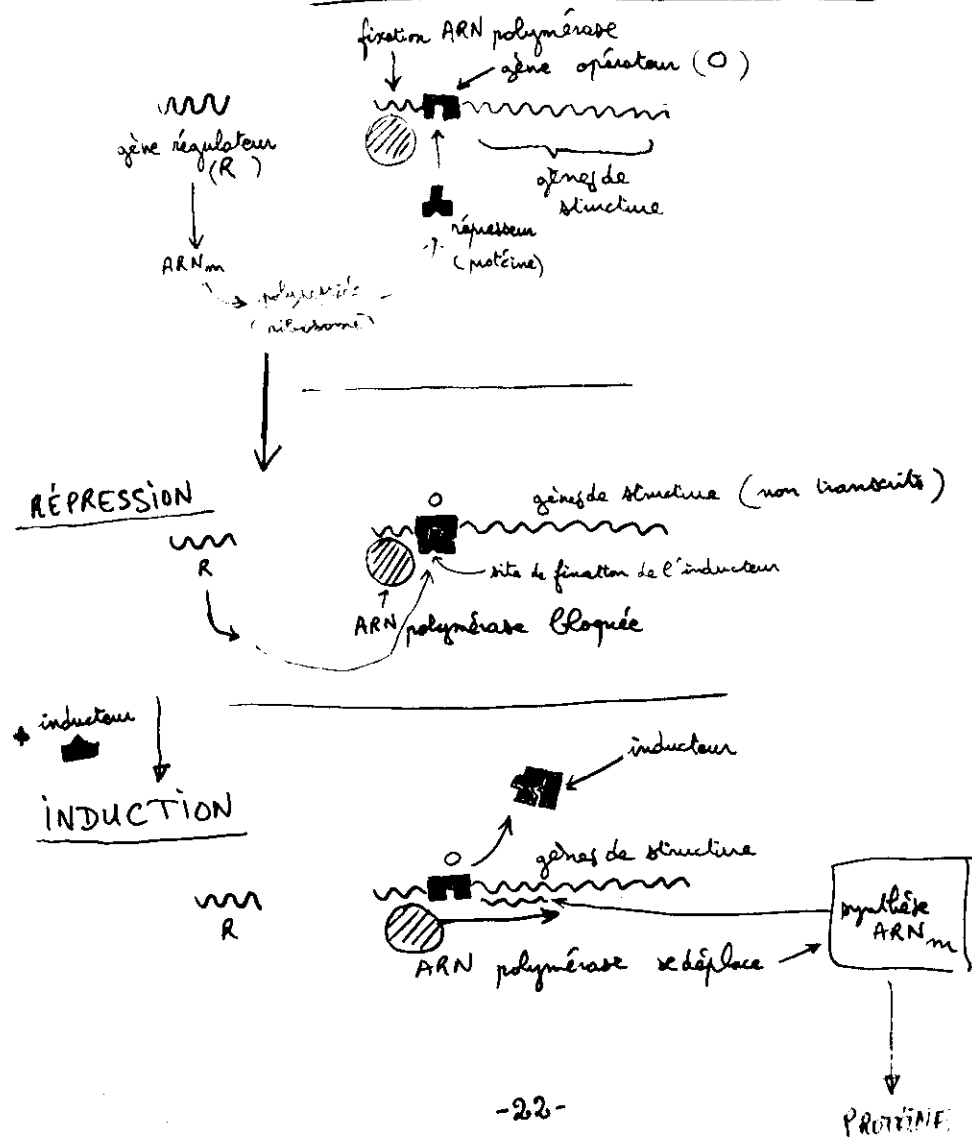


ARN_t



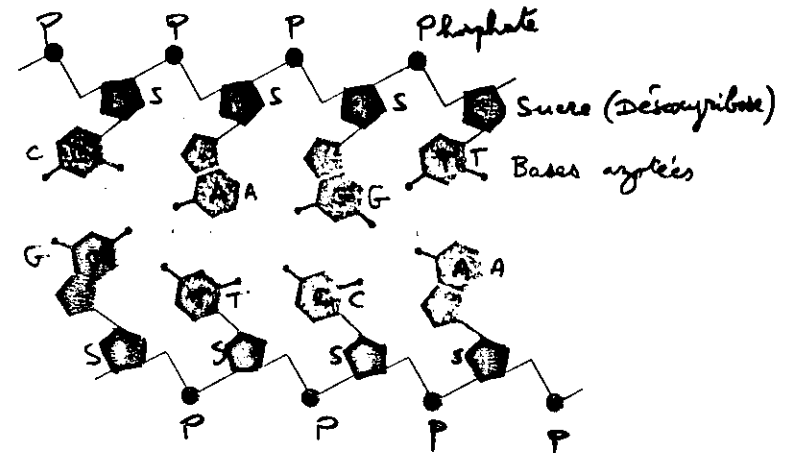
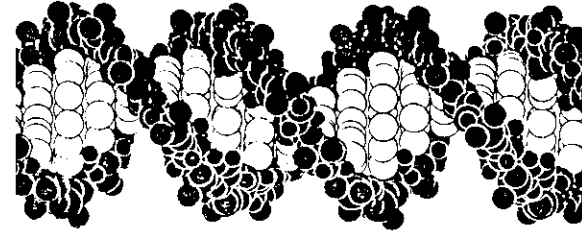
SYNTHÈSE PROTÉIQUE

RÉGULATION "INSTANTANÉE" OPÉRON



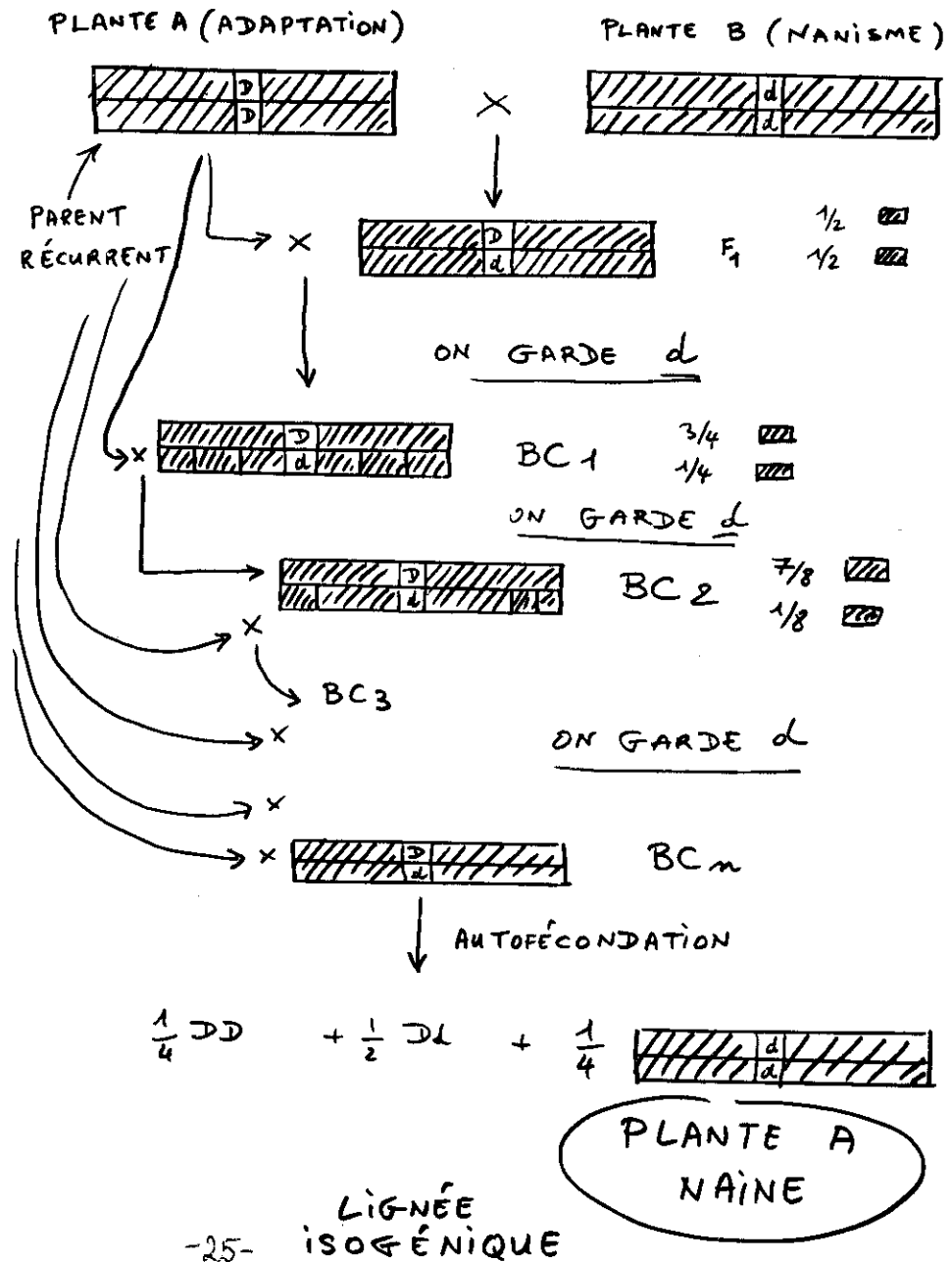
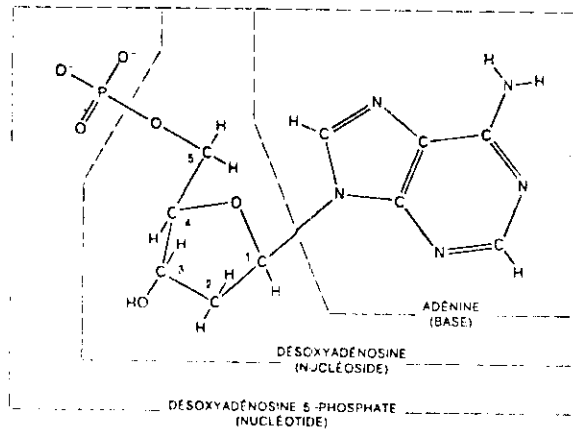
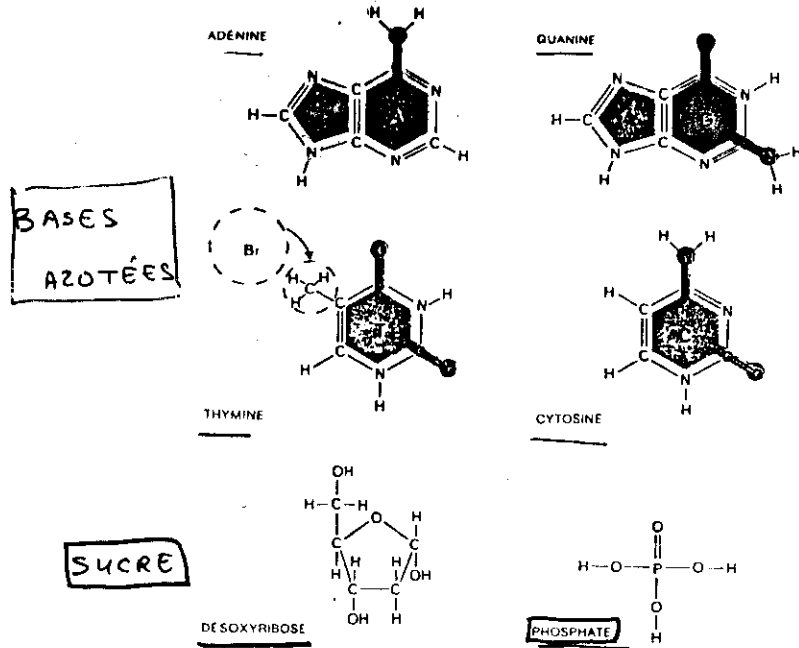
-22-

ACIDE DÉSOXYRIBO NUCLÉIQUE



-23-

SÉLECTION "BACK - CROSS"



SÉLECTION GÉNÉALOGIQUE

PLANTE A (ADAPTATION) PLANTE B (NANISME)



X



F₁

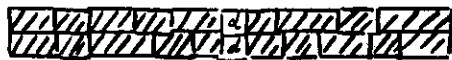
AUTOFÉCONDATION

$$F_2 \quad \frac{1}{4} \begin{array}{c} D D \\ D D \end{array} + \frac{1}{2} \begin{array}{c} D d \\ d D \end{array} + \frac{1}{4} \begin{array}{c} d d \\ d d \end{array}$$

$$\frac{d}{d} + \approx \frac{1}{2} \begin{array}{c} D \\ d \end{array} + \approx \frac{1}{2} \begin{array}{c} d \\ D \end{array}$$

AUTOFÉCONDATION

F₃



$$\frac{d}{d} + \approx \frac{1}{2} \begin{array}{c} D \\ d \end{array} + \approx \frac{1}{2} \begin{array}{c} d \\ D \end{array}$$

AUTOFÉCONDATIONS

F_n



VARIÉTÉ STABLE NAIN

N peut être ± 80

$$\lambda = \sqrt{n \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2}}$$

chez une plante on peut supposer 10 à 20 000 gènes

A ≠ B pour environ 20% de leurs gènes

$$n = 2000 \text{ à } 4000$$

$$\lambda = \sqrt{4000 \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2}} \approx 30$$

en F_n d d si 16000 gènes ≡ chez A et B

$$2000 \pm 60 \text{ gènes de A}$$

$$2000 \pm 60 \text{ gènes de B}$$

SÉLECTIONS RÉCURRENTES

- ①. TESTER ET CHOISIR → IDENTIFICATION DES DONNEURS DE "BONS GÈNES"
- ②. MAINTENANCE DU MATÉRIEL TESTÉ
- ③. RECOMBINER ET ACCUMULER LES "BONS GÈNES"
- ④. OBJECTIFS → • POPULATION PLUS RICHE EN "BONS GÈNES"
• FABRICATION DE LIGNÉES (ÉVENTUELLEMENT POUR DES HYBRIDES)

