

Les biotechnologies appliquées à la production végétale : situation actuelle et perspectives

Demarly Y.

in

Demarly Y. (ed.).
Place et rôle des biotechnologies dans les systèmes de recherche agronomique des pays méditerranéens

Zaragoza : CIHEAM

Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 14

1991

pages 23-30

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=92605109>

To cite this article / Pour citer cet article

Demarly Y. **Les biotechnologies appliquées à la production végétale : situation actuelle et perspectives.** In : Demarly Y. (ed.). *Place et rôle des biotechnologies dans les systèmes de recherche agronomique des pays méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, 1991. p. 23-30 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 14)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Les biotechnologies appliquées à la production végétale: situation actuelle et perspectives

Y. DEMARLY

VERSAILLES, FRANCE

RESUME - La structure et l'organisation de la génétique végétale ont permis un développement spectaculaire de la biotechnologie: la redondance génétique, l'assouplissement de la régulation génétique, la diversité cytoplasmique sont les faits majeurs qui sont intervenus dans ce succès. La biotechnologie végétale recouvre plusieurs aspects : clonage de végétaux, haploïdisation, hybridation somatique, biotechnologie des transferts de DNA, marquage génétique, ciblage de molécules, sur lesquels existe déjà une vaste documentation quoique certains problèmes restent encore à résoudre. Les résultats les plus importants sont présentés dans cette étude, et certaines perspectives d'application sont discutées. En guise de conclusion, nous soulevons plusieurs questions concernant l'amélioration végétale, l'agriculture, et les rapports avec les pays en voie de développement, la société et les aspects éthiques.

Mots-clés : Redondance génétique - Transposons - Régulation génétique - Cytoplasme - Clonage - Haploïdisation - Variants - Hybridation somatique - Transfert de gènes - RFLP.

SUMMARY - "Plant Biotechnology: state of the art and prospects". The structure and organization of plant genetics enable a very spectacular growth of biotechnology: genic redundancy, flexibility in gene regulation, cytoplasmic diversity are the major facts that insure such a success. Plant biotechnology presents various aspects: cloning of plants, haploidization, somatic hybridization, biotechnology of DNAs transfers, genetic tagging, targetting of molecules are already well documented though many problems still remain. The most outstanding results are presented here and some prospects for their application are discussed. As a conclusion are raised many questions in the field of plant breeding, agriculture, relations with developing countries, society and ethics.

Key words : Genic redundancy - Transposons - Gene regulation - Cytoplasm - Cloning - Haploidization - Variants - Somatic hybrid-ization - Gene transfer - RFLP.

Biotechnologies végétales et information génétique de la plante

Le succès des biotechnologies végétales est lié à certaines caractéristiques de l'information génétique particulièrement favorables.

- L'information génétique contenue dans les noyaux cellulaires d'une plante comprend sensiblement la même quantité d'ADN que chez un mammifère (1). Cette information est répartie sur des chromosomes où la molécule d'ADN est en double hélice, spiralée autour de molécules d'histones et enroulée sur elle-même : ce qui fait un triple niveau de torsion donnant un chromosome très compact. L'ordre de grandeur du nombre de gènes contenu sur un chromosome linéaire moyen est de 2.000 environ

(2.000 gènes dits "codants" c'est-à-dire dont on comprend le sens). L'une des particularités du végétal est que ces gènes sont redondants c'est-à-dire qu'il y a plusieurs codes semblables en série donnant les batteries de gènes ; par exemple pour coder une protéine comme la zéine chez le maïs (protéine de réserve du grain) il y a 7 gènes sur le chromosome 7, et une autre batterie de 10 gènes sur le chromosome 2 et une batterie de nombre indéterminé sur le chromosome 10, alors qu'apparemment un seul code suffirait pour fabriquer la protéine - Ce "luxe" d'information chez la plante est quelque chose d'assez particulier qu'on retrouve d'ailleurs au niveau global du génome avec la polyploïdie : alors que tous les mammifères héritent un stock chromosomique paternel et un maternel et sont donc diploïdes, une bonne moitié des végétaux cultivés sont tétra, hexa, octo polyplloïdes.

- Une autre chose étonnante est le fait qu'un nombre significatif de gènes se transportent (ceux qu'on appelle des transposons) (2). Ces gènes sont de véritables véhicules qui se déplacent d'un point à l'autre du chromosome, avec un moteur (le gène codant pour la transposase), un pilotage (le gène régulateur de la transposase) et les codes qui sont éventuellement transportés. Ce véhicule vient se piquer en des points variés du chromosome, modifiant l'expression ou réduisant au silence le gène où il s'est inséré - Il est aisé d'imaginer à quel point un tel véhicule peut intéresser les généticiens pour modifier la régulation ou pour détecter la localisation d'un gène.
- L'expression d'un gène codant aboutit à la biosynthèse de protéines. A la suite des travaux de JACOB et MONOD, on a parlé de régulation du gène, puis d'ARN messager et d'ARN de transfert. Le gène n'est donc pas autonome et l'on commence à mieux comprendre les événements complexes qui, chez le végétal, déterminent sa régulation. Dans la conception actuelle, le code possède une autorisation de sens de lecture et de début de lecture ainsi qu'un signal de fin de transcription. Une zone, en amont de chaque gène, dite non codante parce qu'elle correspond pour nous à un langage incompréhensible, représente environ des longueurs de 4 à 5 fois la longueur codante, ce qui est tout à fait caractéristique des végétaux supérieurs (chez l'homme la fraction non codante est plus courte que la partie codante). Si l'on analyse ce qui se passe en amont du gène proprement dit, on trouve des "box", c'est-à-dire des groupes de bases (TATA box à - 40 paires de bases, un box enhancer vers - 150, un site plus complexe vers - 1000 qui intervient avec des signaux épigénétiques (3)). Ces ensembles interfèrent avec un certain nombre de protéines-signaux pour former juste au début de la partie codante un complexe : le promoteur qui, après avoir accroché l'ARN polymérase lui ouvre la voie à la transcription du code. Pour mieux comprendre le rôle essentiel du "non-codant" il faut rappeler que, sur les quelque 50.000 gènes codants d'une plante, environ 1/10ème à 1/100ème sont exprimés à un instant donné : l'autorisation de s'exprimer ou de rester muets est donnée par cet ADN non codant. Il y a donc chez le végétal supérieur plus d'information régulante que d'information régulée (dans le rapport 4/5, 1/5).
- Il y a également, dans les cellules végétales, un développement tout à fait particulier de l'information cytoplasmique. Chez les mitochondries et chez les chloroplastes des chromosomes circulaires relativement longs ont été décodés. Les nombres de mitochondries et de chloroplastes par cellule varient beaucoup d'un organe à l'autre et en fonction des conditions d'environnement. Chaque mitochondrie contient un nombre faible, mais variable, de chromosomes circulaires. Si l'on ajoute que ces chromosomes ont une grande facilité de fragmentation en sous-ensembles circulaires et de recombinaison entre eux on est amené à la conception qu'un cytoplasme végétal héberge une population génétiquement polymorphe de mitochondries (et, dans une mesure plus limitée de chloroplastes). Cette population a ses lois démographiques propres (liées au programme morphogénétique et contrôlée pour partie par le noyau) mais aussi dépendante de l'environnement cellulaire, donc à la portée des manipulations biotechnologiques.
- On doit enfin retenir qu'une plante, entre ses racines, ses feuilles, sa tige et le bourgeon terminal (qui construit les organes de la plante d'une manière continue) est un véritable carrefour de signaux de régulation. On peut considérer la plante comme un système cérébral diffus, sensible à l'intégralité de la plante et à ses corrélations internes qui définissent : âge cellulaire, identité organique, stades d'avancement de la morphogénèse donc du programme génétique (3). Ceci explique pourquoi les biotechnologies chez les plantes ont un succès différent des biotechnologies chez les animaux. Toute l'information génétique des animaux supérieurs est utilisée pendant la phase embryonnaire pour construire des systèmes : système nerveux central, musculaire, sensoriel, circulatoire, vocal... qui gèrent les rapports avec l'environnement d'où une mobilité spatiale et une réactivité rapide. Chez la plante supérieure, les interactions entre signaux constituent de véritables synapses, qui, tout au long de la construction permanente de l'être, transmettent de cellule à cellule, jusqu'à l'épigénétique puis au complexe promoteur des gènes, les ordres de programmation génétique. Ainsi ce cerveau généralisé gère la morphogénèse, les gammes d'expression dans les batteries de gènes, la mobilité des transposons, la démographie des cytoplasmes, et donc toute la construction adaptée qu'est cet embryon prolongé indéfiniment. Ainsi la quantité d'information génétique de la plante est-elle silencieuse, en réserve, consommée goutte à goutte pendant le programme génétique de construction accommodée. Ce qui explique la possibilité d'immobilité spatiale, compensée par une souplesse temporelle. Les biotechnologies végétales ont tiré profit de cette autre stratégie du vivant et notamment de cette programmation génétique échelonnée et réversible (puisque soumise aux signaux épigénétiques). Grâce à cela, à partir d'une cellule quelconque de la plante remise en présence des signaux convenables, on peut reconstituer la plante entière.

Panorama des Biotechnologies

Un végétal très schématisé comprend une partie somatique (c'est-à-dire un ensemble de quelque 100 millions de cellules possédant un stock chromosomique paternel et un stock maternel), et une partie reproductrice comprenant des cellules sexuelles issues de la méiose au moment de la floraison. La plupart des fleurs sont hermaphrodites, c'est-à-dire qu'elles portent des gamètes mâles et des gamètes femelles. A partir d'une telle structure, de nombreuses biotechnologies sont développées (4) (5).

- Les biotechnologies de clonage:

On sait obtenir en nombre indéfini des copies végétatives à l'identique d'un individu : on prend, par exemple, des tissus sous-épidermiques et on les fait régénérer *in vitro*. L'intérêt évident est la multiplication en millions de copies d'une plante exceptionnelle. Les problèmes posés sont que, d'avoir une armée de prix Nobel ou de champions olympiques identiques pose des problèmes sociaux (phytosociologie de la parcelle cultivée) ainsi que des problèmes de pathologie (l'homogénéité de l'hôte étant une niche idéale pour l'adaptation d'une race pathogène particulièrement virulente). On diffuse actuellement ces vitroplants (les 4/5 des fraises consommées, la quasi-totalité des plantes vertes, des oeillets, une partie des rosiers..., multiplication des souches-mères et des collections de pomme de terre, plants de palmier à huile, de bananier, souches de départ de luzerne, de carotte, de betteraves...). Outre les vitroplants on peut aussi rendre certains tissus embryogènes c'est-à-dire produisant des embryons de plantes, copies cellulaires sans sexualité de la plante d'origine et l'on a mis au point des gelées nutritives et des enrobages de ces embryons de manière à pouvoir les semer comme de véritables graines : c'est la technologie des semences artificielles. Ces propagules s'établissent dans le sol comme des graines issues de la reproduction sexuée mais à ceci près qu'elles sont des clones d'individus tous identiques à la plante de départ. En effet, lorsqu'on récolte les graines naturelles d'une plante d'un certain génotype on observe dans la descendance une ségrégation des gènes (du type parents-enfants chez les humains). Donc, à partir d'une plante particulièrement performante, le sélectionneur doit, par les méthodes conventionnelles, consacrer une dizaine d'années et des opérations particulièrement contraignantes pour stabiliser une descendance proche de ce type. Dans les biotechnologies de clonage, vitroplants ou semences artificielles, après avoir repéré une plante remarquable et prélevé un explant de cette plante, on peut obtenir *in vitro*, soit un cal dit régénérant qui donnera des vitroplants, soit un cal dit embryogène qui donne des nodules embryonnaires (6). Ces cals placés en milieux liquides nutritifs avec agitation produisent des "soupes embryonnaires"

pouvant contenir de l'ordre du million d'embryons par litre. C'est-à-dire que dans le volume d'un hall technique on pourrait théoriquement reproduire toutes les semences nécessaires à la France, ce qui ne manquerait de poser, du point de vue technique et social, un grand nombre de problèmes. Mais nous n'en sommes pas encore là car jusqu'ici seules quelques espèces produisent de façon régulière de tels embryons et l'homogénéité ainsi que la stabilité de conservation de ces semences artificielles laissent encore à désirer : il faudra vraisemblablement encore une dizaine d'années de recherches pour voir les premières implantations en production - L'un des atouts majeurs des biotechnologies de clonage réside dans la plus-value génétique qu'elles peuvent propager : prenons pour exemple la laitue. Une laitue hybride nécessite environ les 2/3 du temps, par rapport à nos laitues classiques, pour donner une "pomme" commercialisable, d'où une économie de chauffage et d'occupation des serres... Elle est de plus résistante à certains pathogènes grâce à l'hétérozygotie des gènes. Il est impossible pour un sélectionneur de produire par dizaines de kilos des semences de laitue hybride : il devrait y consacrer toute une vie ; par contre, il sait faire quelques individus hybrides (en faisant le croisement manuellement). On peut, dès lors, multiplier un tel hybride en copies clonales sous forme de vitroplants ou de semences artificielles. De nombreuses espèces économiquement importantes relèvent de la même problématique : soja, pois, arachide, vigne, haricot... Ces biotechnologies permettent aussi de produire des graines chez des espèces qui généralement n'en produisent pas : propagules de pomme de terre, de canne à sucre, de bananier, d'igname, de fraisier, de pommier... C'est tout un secteur du plant greffé qui doit être remis en cause. Jusqu'ici la greffe permettait de maintenir la stabilité d'un cultivar de pommier, de cerisier, de citrus... Maintenant d'autres voies, où l'arbre se développera sur ses propres racines (avec de nouveaux problèmes impliqués) sont amenées à se développer.

On commence à identifier des conditions où le clonage n'est pas tout à fait conforme à la plante de départ (7) (8) (on obtient alors des variants, c'est-à-dire des plantes modifiées sur certains points (9)). Certaines de ces vitrovariations aboutissent à des formes plus performantes que les variétés d'origine, surtout lorsqu'on recombine des variants où ce sont les mécanismes de programmation génétique qui sont modifiés : vitrovariants épigénétiques (10), (11) (laitues, orge, riz, pomme de terre...).

- les Biotechnologies d'haploïdisation

Partant des cellules sexuelles, spermatozoïdes ou sac embryonnaire (à l'intérieur de l'ovule) on peut aussi faire régénérer la plante : on fait ce qui est appelé androgénèse ou gynogénèse. Les individus régénérés ne

possèdent que la moitié des chromosomes de la plante dont ils sont issus puisque leur cellule d'origine, spermatozoïde ou cellule du sac embryonnaire, est issue d'une réduction chromatique à la méiose (12). On obtient ainsi des plantes sans mères ou des plantes sans pères (13). Outre leur simplification génétique, de telles plantes ont un grand intérêt pour la production des lignées homozygotes : on sait redoubler le stock chromosomique de plantes haploïdes par autocopie. On retombe ainsi sur le nombre chromosomique normal de l'espèce sauf que les enfants d'une telle plante seront définitivement identiques à elle-même puisque le stock représentant du stock paternel et celui représentant du stock maternel sont issus d'autodoublement, donc identiques l'un à l'autre. Il n'y a plus de ségrégations dans les descendances : on obtient ainsi des lignées pures. Ces biotechnologies de l'haploïdisation en vue de la production de lignées pures sont actuellement utilisées chez un certain nombre d'espèces cultivées, soit pour développer directement des cultivars fixés : blé, orge, riz, colza, poivron... (14), (15), (16), (17), (18), soit pour créer les lignées parentales d'une variété hybride : tournesol, betterave, seigle, maïs... Les applications à des plantes florales sont, elles aussi, de plus en plus nombreuses, avec cet intérêt supplémentaire, ici, que la forme haploïde, non doublée, est stérile, donc fleurit plus longtemps, et se trouve généralement nanifiée (fleurs pour corbeilles et balcons).

- Les Biotechnologies de fusion

On peut, à partir de tissus somatiques, produire ce qu'on appelle des protoplastes, c'est-à-dire des cellules dont la paroi pecto-cellulosique a été lysée et qui sont donc réduites à leurs contenus plasmique et nucléaire. Ces protoplastes sont extrêmement accessibles et, d'après ce que nous avons vu, dénués d'âge et d'identité génétique (pas de signaux pseudo-cérébraux). On peut donc, par exemple, prenant des protoplastes de pomme de terre d'une part et de tomate d'autre part, réaliser une fusion en éliminant les charges électriques statiques qui repoussent les protoplastes.

Lors de ces fusions *in vitro* il se produit des échanges de matériel génétique et l'on obtient, sans sexualité aucune, des cellules recombinées tomate-pomme de terre. De nouvelles plantes, les pomates, ont pu être régénérées à partir de telles cellules : les premières expériences ne donnèrent que des individus chétifs, stériles, sans tubercule ni fruit, (19) mais depuis cette première expérience les analyses ont été plus précises. Lorsqu'on fait fusionner des protoplastes de deux types génétiques différents, ils deviennent coalescents et l'on obtient tous les types de combinaisons, d'additions partielles ou totales, de compétitions et d'interactions qui se puissent imaginer : donc toute une gamme de produits. Si l'on régénère sous forme d'individus-plantes ces divers types

d'additions et d'interactions, on peut récupérer des individus viables et vigoureux qui ont emporté, par exemple, les mitochondries ou les chloroplastes d'un pétunia et qui sont, nucléairement parlant, des tomates. En particulier chez le colza, des plantes de telles structures sont actuellement expérimentées en grande surface (9). On a introduit par hybridations sexuées suivies de fusions, des éléments cytoplasmiques de radis et de chou chez le colza. Ces recombinants cytoplasmiques en présence de l'information nucléaire du colza peuvent aboutir à des gains de rendement de 30% par rapport aux meilleures variétés de colza avec, évidemment, la composition en acides gras de l'huile de colza. Ces techniques de fusion sur le colza ont été initiées dans mon laboratoire et y ont été suivies d'autres expériences positives : fusions de tomates avec ses ancêtres plus rustiques, fusions de luzerne avec des formes spontanées qui devraient conférer des tolérances à l'aridité (5). C'est vraisemblablement dans l'accès à des recombinants cytoplasmiques qui pourront "survolter" l'expression des gènes nucléaires, que la voie des fusions de protoplastes est la plus originale et la plus prometteuse.

- Les Biotechnologies de manipulation d'ADN

Nous vivons actuellement une période assez excitante du point de vue conceptuel : en effet, toute l'évolution a oeuvré pour mettre des barrières entre les règnes, entre les familles, entre les genres et les espèces, de façon à ce que chat et chien ne puissent se croiser, interdisant ainsi les flux d'échanges génétiques au-delà de frontières très étroites. Mais subitement, depuis moins de 10 ans, la maîtrise des biotechnologies de transfert d'ADN permet de greffer sur les chromosomes d'une plante un gène d'insecte, de bactérie, de champignon, d'homme et de régénérer la plante porteuse.

Tout le continuum du vivant mondial, comme une soupe initiale, redevient disponible pour le sélectionneur, ce qui est tout à la fois merveilleux et inquiétant (4). Greffer une information génétique demande généralement les opérations suivantes : il faut d'abord détecter un donneur, c'est-à-dire un être vivant possédant le gène recherché, il faut localiser le gène, pouvoir le découper avec des enzymes de restriction et lui accrocher un accompagnement "amont" capable d'organiser un complexe promoteur efficace. Généralement on utilise ensuite une bactérie (*E. coli*) pour multiplier ce gène en millions de copies : c'est le clonage du gène. L'étape suivante consiste à intégrer ce gène sur un vecteur qui le transportera jusqu'aux chromosomes de la plante (on nomme cette opération : transformation). Il existe actuellement une gamme de vecteurs disponibles; ils sont pour la plupart construits à partir d'*agrobacterium* pathogène de la plante. Cette bactérie possède un chromosome circulaire ainsi qu'un plasmide, circulaire lui aussi, appelé Ti. Lors de

l'agression d'une cellule végétale, le plasmide Ti insère un segment T dans les chromosomes de la plante hôte, détournant à son profit la régulation génétique de la plante pour fabriquer des opines, des cytoquinines et des auxines qui entraînent une tumeur infectieuse chez la plante. Au lieu de faire insérer par le segment T des gènes nocifs, on a modifié le plasmide pour créer un "construit" T comportant : le gène à transférer et son accompagnement promoteur, un gène de résistance (à un antibiotique) donnant un avantage sélectif aux cellules transformées, un gène "reporteur" permettant un repérage visuel de la transformation (le gène "gus" permet une coloration bleue des tissus transformés) et des facteurs de bordure favorisant l'insertion sur les chromosomes de la plante. L'agrobacterium ainsi construit n'est plus pathogène mais il continue à parasiter la plante et à opérer l'insertion du segment "T" désarmé, sur les chromosomes de la plante, gardant par fonction naturelle, son rôle de vecteur très efficace. Le receveur du vecteur peut être la plante entière (20), ou un organe, ou un tissu ou une cellule ou un protoplaste ; on attaque même maintenant le noyau directement. Comme les transformations sont multiples et les insertions en des loci aléatoires du chromosome, chaque cellule transformée est un cas unique et l'on comprend que l'utilisation de cellules isolées ou de protoplastes évite les problèmes de "débobinage" de chimères. Une fois toutes ces étapes achevées, la dernière opération consiste à vérifier que le nouveau gène s'exprime et que la plante régénérée est viable, vigoureuse et transmet le gène. Dans de nombreux cas, en effet, la plante transformée est dérégulée, affaiblie, instable ou stérile. Il reste donc à faire une sérieuse sélection, au plan agronomique, en fin d'opérations. On peut citer quelques exemples des types de transferts génétiques. Dès maintenant sont commercialisées plusieurs résistances à des herbicides obtenues par greffe de gène. Une firme produisant un herbicide total a évidemment un intérêt commercial à obtenir quelques grandes espèces cultivées résistantes à cet herbicide surtout si le gène de résistance est placé sur les meilleures variétés. Une synergie exceptionnelle peut donc résulter de cette alliance. Ainsi on a pu découper chez une bactérie, la salmonelle, un gène de tolérance au glyphosate (herbicide total commercialisé sous le nom de Round Up par exemple). Ce gène a été introduit chez le maïs, le soja, le coton, le tabac, le peuplier, la tomate... qui sont résistantes à l'herbicide. Plusieurs expériences de ce type ont été réussies. Un autre herbicide, la pho-phinotrycine, a pu être toléré par des plantes transformées avec le gène d'un streptomyces qui est capable d'acétyler la molécule nocive et de la rendre ainsi inactive à l'intérieur de la plante : on a créé ainsi des pommes de terre, des tabacs, des tomates qui supportent 5 fois la dose mortelle de l'herbicide. D'autres réussites concernent des résistances aux insectes, aux bactéries, aux virus qui illustrent les énormes potentialités de ces biotechnologies (21). Mais

n'oublions pas que ces résistances sont monogéniques et donc, contournables par les pathogènes comme certaines résistances dites "verticales" (9). Sur d'autres caractéristiques comme les compositions biochimiques des végétaux, des modifications intéressantes sont en cours. On a fabriqué aux Etats-Unis un gène artificiel codant pour une protéine dont le contenu en acides aminés indispensables est trois fois plus riche que la viande de boeuf : ce gène, que la nature n'a jamais fait, a pu être greffé sur les chromosomes de la pomme de terre qui ont ainsi pu biosynthétiser cette protéine exceptionnelle. Malheureusement les conformations tertiaires de cette protéine ne sont pas intégrables dans le métabolisme cellulaire et la molécule est attaquée par des protéases. Il est donc nécessaire, grâce à l'ordinateur, de déterminer toutes les séquences entraînant des conformations compatibles avec la vie cellulaire. Dans le même ordre d'idées, des modifications de pigments floraux, de composition en acides gras, de variants d'alcaloïdes, des greffes enzymatiques sont actuellement en cours. Pour illustrer ces potentialités biochimiques on peut citer l'exemple de cette souche de pétunia sur laquelle a été greffé le gène de la gonadotrophine chorionique humaine. La plante régénérée peut effectivement produire l'hormone. On dispose également du gène d'hormone de croissance bovine ainsi que de l'hormone de croissance aviaire. Il est très tentant d'introduire ces gènes dans les fourrages pour faire un aliment du bétail ou des volailles ; cependant il ne faut pas minimiser les risques encourus par les produits de telles opérations (en dehors de productions très contrôlées en fermenteurs et destinées à des usages pharmaceutiques).

Les manipulations portant sur la zone régulatrice du gène, le complexe promoteur, n'en sont alors qu'à leur début mais elles ouvrent des perspectives très larges : par exemple, insérer en amont d'un gène qui ne s'exprime que dans la fleur un promoteur de feuille ou de racine ce qui entraînera son expression dans la feuille ou la racine ! On connaît aussi des promoteurs "conditions-dépendants" qui n'autorisent la transcription du gène que si certaines conditions (lumière, température...) sont réunies. Les premières réussites de ce type sont publiées (4).

- Les Biotechnologies d'étiquetage et de repérage

Chaque type d'enzyme de restriction sait reconnaître sa séquence propre d'ADN (quelque 6 à 12 paires de bases) et coupe la molécule à ces sites spécifiques. On connaît toute une panoplie d'enzymes de restriction, ce qui permet, par un jeu combinatoire de reconstituer l'organisation séquentielle du chromosome.

Chaque fragment d'ADN ainsi découpé migre selon sa taille sur un gel, ce qui donne un diagramme de restriction. Comme les coupures sont fonction des séquences de bases dans les acides nucléiques, chaque génotype possède donc sa propre empreinte d'identité génétique. Grâce à des sondes d'ADN qui viennent hybrider les fragments de restriction pour lesquels elles ont une affinité de complémentarité on peut repérer l'emplacement des gènes (sondes marquées radioactivement, ou sondes froides à réactions colorimétriques) : c'est l'étiquetage par sondes. De nombreuses sondes sont disponibles pour les végétaux car les sondes ne sont pas très exigeantes et il suffit d'une homologie partielle pour qu'elles s'hybrident, ainsi une sonde enzymatique bactérienne pourra-t-elle détecter une enzyme approchante chez la plante ; de même les sondes des gènes de tomate peuvent très bien permettre une cartographie de la pomme de terre. Le sélectionneur peut donc maintenant utiliser la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism = polymorphisme des fragments de découpe d'ADN) pour inventorier les contenus génétiques, identifier un génotype, analyser une population et sa structure reproductive, faire de la sélection assistée, rechercher les arbres généalogiques, calculer de vraies distances génétiques, etc... Technologie très puissante puisqu'elle s'applique à toute séquence d'ADN, fut-il, ou non, exprimé, soit-il codant ou non, nucléaire ou cytoplasmique. C'est en outre une technique non destructive puisqu'elle ne nécessite qu'un minimum de matière végétale. Sa seule limitation est la durée et le coût de chaque analyse. Aussi certains laboratoires cherchent-ils des voies plus rapides telles que le clonage direct du DNA in vitro : quelque 100 paires peuvent être en quelques heures clonées en milliards d'exemplaires (amplification spécifique d'un fragment de DNA). On obtient ainsi des fragments beaucoup plus courts que par la RFLP et l'on peut réaliser jusqu'à une centaine d'analyses par jour. Cette nouvelle technique est appelée PCR cloning (clonage par une Polymerase Cross-Reaction). Il existe encore une technique d'étiquetage par transposons, qui consiste à inhiber, par un transposon marqué, une fonction ou une caractéristique donnée de la plante. Le site où le transposon s'est placé "allume" l'emplacement du gène responsable de la fonction ou du trait que le transposon a neutralisé (2).

Cet ensemble d'outils nouveaux, très performants, relance donc entièrement les inventaires génétiques et des travaux sont entrepris par de nombreux laboratoires dans ce domaine. On peut encore, dans le même ordre d'idées, étiqueter le gène codant pour une molécule avec une "adresse", c'est-à-dire avec une séquence d'ADN qui permettra à la nouvelle protéine synthétisée d'être dirigée vers tel ou tel compartiment cellulaire. C'est ainsi qu'on a pu cibler vers la mitochondrie le produit du gène bactérien "CAT" inséré dans les chromosomes nucléaires de tabac (en ajoutant à ce gène le code de l'extrémité N-terminale

du gène de l'ATP syn-thase mitochondrie). Les biotechnologies d'adressage de molécules vers les organites cytoplasmiques devraient, au même titre que les fusions de protoplastes contribuer à valoriser les effets cytoplasmiques. L'absence de ségrégations, et l'hérédité maternelle quasi-exclusive des cytoplasmes, en font un objet d'intérêt majeur en amélioration des plantes.

Remarques en guise de conclusion

Les biotechnologies végétales sont des outils d'une puissance indiscutable. Dès maintenant elles doivent logiquement être associées aux méthodes et aux stratégies de la création variétale dans leurs 4 grandes phases (9) :

- 1/ Gestion des ressources génétiques et évaluation de ces ressources.
- 2/ Recombinaison et modification du matériel extrait des sources.
- 3/ Sélection dans les ségréants issus des recombinaisons et stabilisation de formules parentales.
- 4/ Multiplication en masse des génotypes retenus.

Il est important de noter que ces biotechnologies ne se substituent pas aux étapes classiques mais elles leur donnent plus de rapidité, plus d'envergure, plus de sécurité. Elles contribuent à une évolution accélérée de l'agriculture ce qui pose un certain nombre de questions :

- Les biotechnologies vont-elles élargir le fossé qui sépare les recherches des pays industrialisés et celles des pays en développement ou au contraire, créant des outils nouveaux vont-elles permettre à ces derniers de repartir sur un pied d'égalité? Quelles seraient les conditions d'une telle réussite ?
- Les biotechnologies sont développées par des firmes privées qui sont tributaires d'un profit. Va-t-on gagner beaucoup d'argent avec les produits des biotechnologies ? Et dans ce cas se tournera-t-on uniquement vers une clientèle riche ?
- Pour assurer un profit tiré des biotechnologies il faut une protection officielle de propriété des structures génétiques construites. Mais jusqu'à quel point peut-on s'appropriier le vivant ? Peut-on être propriétaire d'un gène ?
- Les biotechnologies permettent de créer des produits de substitution susceptibles d'entraîner une déstabilisation de l'économie agricole et de

modifier la société rurale. Concrètement, sur un exemple, comment préparer l'agriculture à l'émergence de semences artificielles ?

- Les nations propriétaires d'un patrimoine végétal qui, grâce aux progrès génétiques, sera exploité et valorisé dans d'autres régions de la planète auront-elles les moyens de recevoir une part des bénéfices ?
- Les biotechnologies posent-elles des problèmes radicalement nouveaux sur les plans de la protection de l'environnement, de l'éthique, de la santé ? Les méthodes conventionnelles ne comportaient-elles pas, de manière moins spectaculaire, les mêmes germes de risques ?

Comme on le voit, la matière est riche, les réponses sont nuancées et exigent une compétence scientifique de haut niveau.

Références

1. FLAVELL, R.B., et al. Repeated sequences relationships in four cereal genomes. *Chromosome*, 1977, 63, 205 - 222.
2. Mc CLINTOCK, B. Intranuclear system controlling gene action and mutation, 1956. *Brookhaven Symp. Biol.*, 8 - 58.
3. DEMARLY, Y. L'épigénique. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 1985, 132 (3,4), 79 - 94.
4. MAGNIEN, E., et al. Genetic engineering of plants and microorganisms important for agriculture, Martinus Nijhoff/Dr W. JUNK, Dordrecht, Boston, Lancaster, 1985.
5. TEOULE, E. Culture in vitro de tissus, fusions de protoplastes et perspectives dans l'amélioration des plantes, 683 - 702, in : *Biotechnologie*, SCHRIBAN R., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 1984, 906 p.
6. MARGARA, J. Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. INRA, Paris, 262 p.
7. SIBI, M. Création de variabilité par culture de tissus in vitro chez *Lactuca sativa*. DEA Amél. Pl. Université Paris-Sud, ORSAY, 1971.
8. BRY, A. La production de vitroplants pour l'horticulture ornementale en France. P.H.M. *Revue horticole*, 1987, 977.
9. DEMARLY, Y. Y. et SIBI, M. Amélioration des Plantes et Biotechnologies, 1989, John LIBBEY, Paris, 152 p.
10. SIBI, M. Non Mendelian heredity. Genetic analysis of variant plants regenerated from in vitro culture ; Epigenetics and Epigenics. In : C.E.C. Symposium Somaclonal Variation and Crop Improvement, Semal J. Ed. 1985, Gembloux, Belgique, pp. 53 - 93.
11. SIBI, M. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs : II, Aspects expérimentaux. *Ann. Amél. Plantes*, 1976, 26 (4), 523 - 547.
12. BOURGIN, J.P. et NITSCH, J.P. Obtention de *Nicotianas* haploïdes à partir d'étamines cultivées in vitro. *Ann. Physiol. Végét.* 1967, 9, 377 - 382.
13. SAN, L.H. Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. *Ann. Amél. Plantes*, 1976, 20 : 751 - 754.
14. KASHA, K.J., et al. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Nature* 1970, 225 : 874 - 876.
15. SIDI, M., et al. Obtention de plantes haploïdes par androgénèse in vitro chez le piment (*Capsicum annum* L.) *Ann. Amél. Plantes*, 1979, 29, 583 - 606.
16. TRUONG, André. I. Variabilité des plantes issues d'androgénèse in vitro et tentative d'application directe en sélection de cette variabilité in vitro et de la mutagénèse par voie haploïde chez le riz (*Oryza sativa* L.). Thèse de 3ème cycle. Université Paris-Sud, 1977, 127 p.
17. SAN NOEUM, L.H. et AHMADI, N. Variability of doubled haploids from in vitro androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare*. In : EARLE E.D. and DEMARLY Y. Eds. Variability in plants regenerated from tissue cultures. Proc. NSF-CNRS. Congr. 1980, Orsay. Praeger CBC Inc. New York, 273 - 283.
18. DEMARLY, Y. Anther and pollen culture for production of haploids. Their utilisation in plant breeding , 142 - 154. In : Report Eucarpia Meeting, 1975, Zurich, NUESCH B. ed. 183 p.
19. MELCHERS, G., et al. Somatic hybrid plant of potato and tomato regenerated from fused protoplasts, *Carlsberg Res. Commun.* 1978, 43, 203 - 218.
20. PICARD, E., et al. Genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum*) by plasmid DNA uptake during pollen tube germination, in : Proceeding of the 7th Intern. Wheat Genetics Symp. 1988, MILLER T.E. ed. Cambridge.
21. ABEL, P.P., et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene, 1986, *Science*, 232, 738 - 743.