THEME 2B – La plante domestiquée

TP1 – L'histoire de la domestication de la carotte

La carotte (*Daucus carotta*) aurait été découverte il y a 5 000 ans dans ce qui est aujourd'hui l'Afghanistan. Les colonies sauvages, à racine rouge ou marron, y abondent encore. Malgré tout, dans le monde, la plupart des carottes sauvages sont blanches et, la carotte orange est le produit d'une intervention humaine. Ce sont des Hollandais qui, désireux de montrer leur fidélité à la Maison d'Orange, une principauté protestante de France, croiseront au XVIe siècle des variétés à chair rouge et à chair blanche et finiront par obtenir une racine d'un bel orange lumineux. Étant donné son importance actuelle dans l'alimentation occidentale, on a du mal à s'imaginer que, jusqu'à récemment, la carotte n'était consommée que de façon marginale (utilisée pour le bétail). En effet, elle n'est consommée par l'Homme que depuis les années 1910-1920.

Problème posé : Comment l'Homme a-t-il produit la carotte cultivée que nous connaissons actuellement ?

Matériel :
- Votre livre (BORDAS) p262 à 273 – PC équipé du logiciel ANAGENE et connecté à internet (site : http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Marche/carotte.htm)
- Echantillons de carotte sauvage (congelés) et de carotte orange et blanche
- Matériel de laboratoire courant, matériel pour une chromatographie, Microscope optique, lames et lamelles, loupe binoculaire, colorant (Phloroglucine Chlorhydrique)

Propositions d'activités	Capacités & *Critères de réussite*
Activité 1 : Etude de la carotte et de son ancêtre supposé à l'échelle macroscopique ➢ **Comparez la carotte sauvage et la carotte cultivée** (parties aériennes, fleurs, racines) ➢ **Récapitulez vos observations** de la façon la plus pertinente. ➢ **Réalisez la mise en évidence de la lignine** (Voir fiche protocole : phloroglucine chlorhydrique). ➢ **Grâce à cette expérience, identifiez quel est l'organe végétal à l'origine de la formation du tubercule de carotte.** **Activité 2 : Etude de quelques variétés de carotte à l'échelle moléculaire et génétique** La couleur de la carotte cultivée est due à la synthèse d'un pigment appelé carotène. Sa synthèse nécessite plusieurs enzymes (protéines). A l'aide du document 2, proposer une démarche qui permettrait de comprendre les différences génétiques entre les 2 plantes. ➢ **Réalisez le protocole proposé** afin d'identifier l'équipement pigmentaire des échantillons proposés. ➢ **Schématisez les résultats** obtenus. Qu'en déduisez-vous ? ➢ Analysez le **document 3 afin** d'expliquer les différences de couleur des 2 carottes. ➢ **Utilisez les fonctionnalités du logiciel ANAGENE** pour identifier l'origine possible de ces différences. **Activité 3 : Les étapes d'une sélection** ➢ Identifiez les deux grandes étapes de la domestication d'un végétal (**documents 4 et 5** et **livre p 268-269)** ➢ Identifier les étapes de la production du « riz doré », ses avantages et les limites de son utilisation (**document 6** et **document 7**)	**Manipuler** *Observer les caractéristiques, identifier quel organe végétal constitue la carotte* **Utiliser un logiciel de données (ANAGENE)** **Récolter des informations / Adopter une démarche explicative** **Communiquer** *Qualité scientifique et clarté de votre article, texte compréhensible par le grand public* **Gérer et organiser le poste de travail**

Document 1 : Planches botanique des carottes sauvage et cultivées

Carotte sauvage	Carotte cultivée

Protocole de chromatographie et de coloration de la lignine

Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel

Matériel biologique

- Carottes de couleur autre qu'orange (jaune, blanche, violette, rouge)
- tranche de racine de carotte orange déjà colorée à la **phloroglucine chlorhydrique**

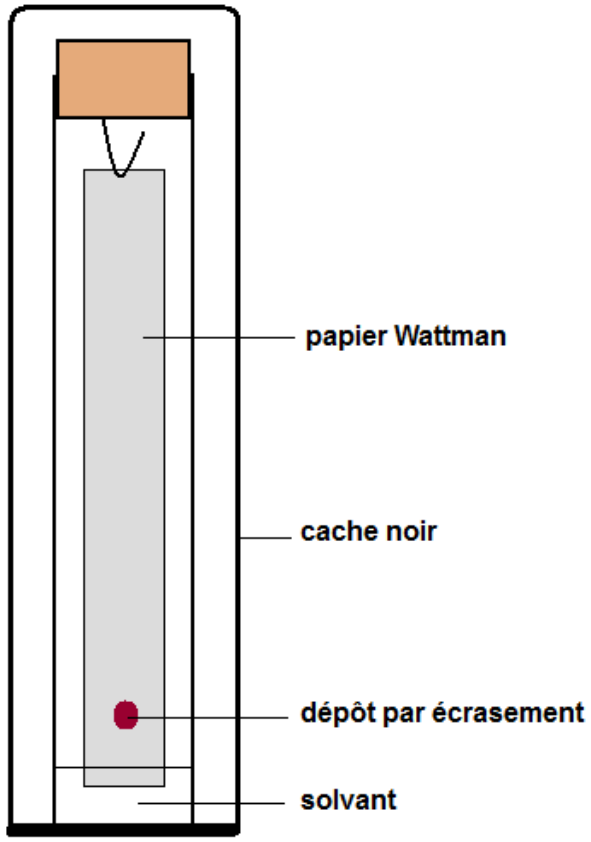
Matériel pour chromatographie :

- agitateur,
- 1 bande de papier Wattman,
- règle,
- crayon à papier,
- crayon à verre ou feutre effaçable,
- chronomètre,
- 1 éprouvette (ou équivalent),
- 1 bouchon avec crochets de suspension,
- 1 cache noir pouvant recouvrir l'éprouvette,
- solvant à chromatographie

Matériel pour coloration :

- lames de rasoir ou scalpel
- solution de phloroglucine à 2%
- Béchers de 50 ml ou coupelles profondes
- pinces longues
- lunettes, gants
- solution **d'acide chlorhydrique**

Dispositif de chromatographie :



Protocole de la chromatographie sur une variété différente de la carotte orange :

Avertissement :

Préparer l'éprouvette 5 minutes à l'avance pour saturer son atmosphère en solvant

Protocole de dépôt

- **Écraser** directement une coupe transversale assez fine de racine de carotte sur le papier Wattman avec un agitateur.
- **Répéter** plusieurs fois l'opération pour obtenir un dépôt bien concentré.

Durée de la migration ascensionnelle : 20 à 30 minutes.

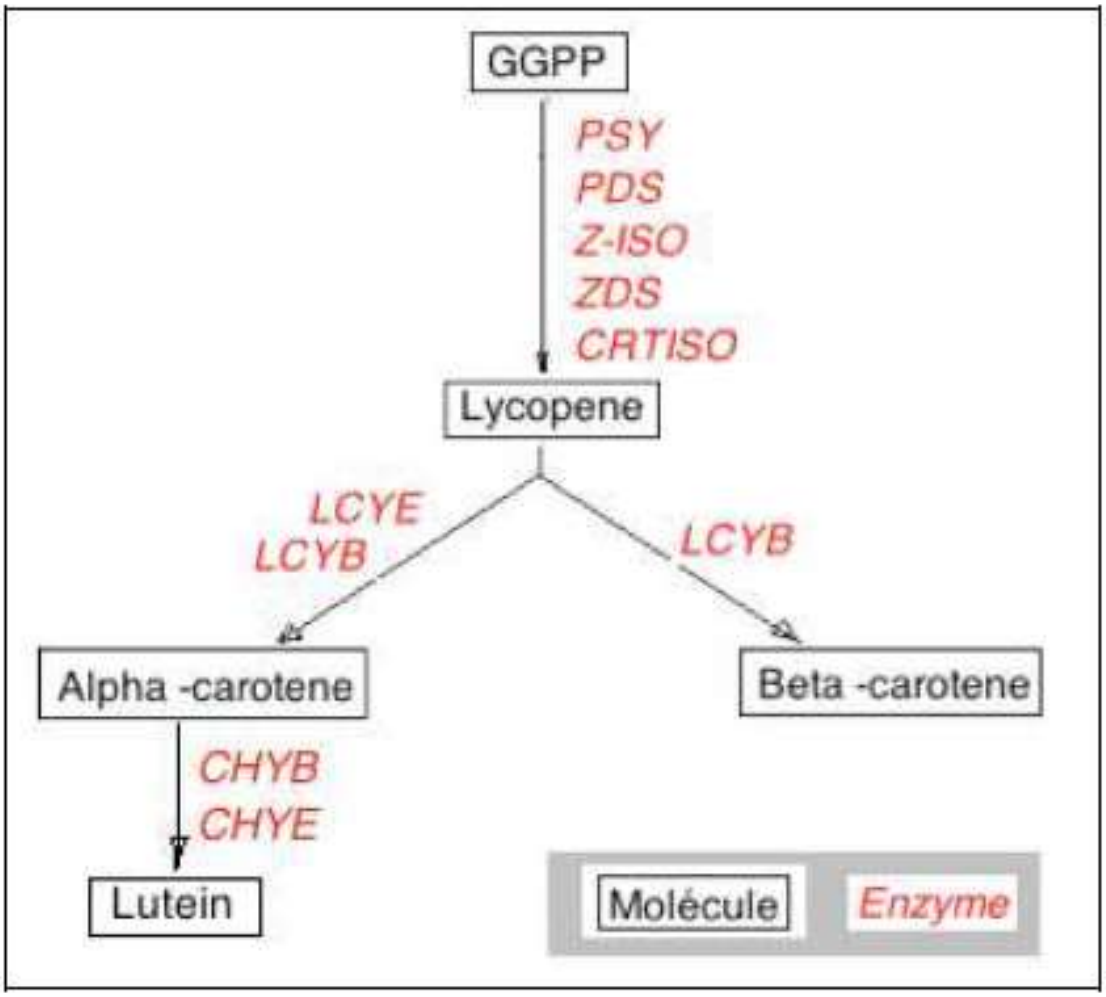
Étant donnée la durée de la migration
appeler l'examinateur pour obtenir un résultat permettant de traiter l'étape « présentation des résultats)
tout en terminant le protocole

Protocole de coloration de la lignine : (Phloroglucine Chlorhydrique)

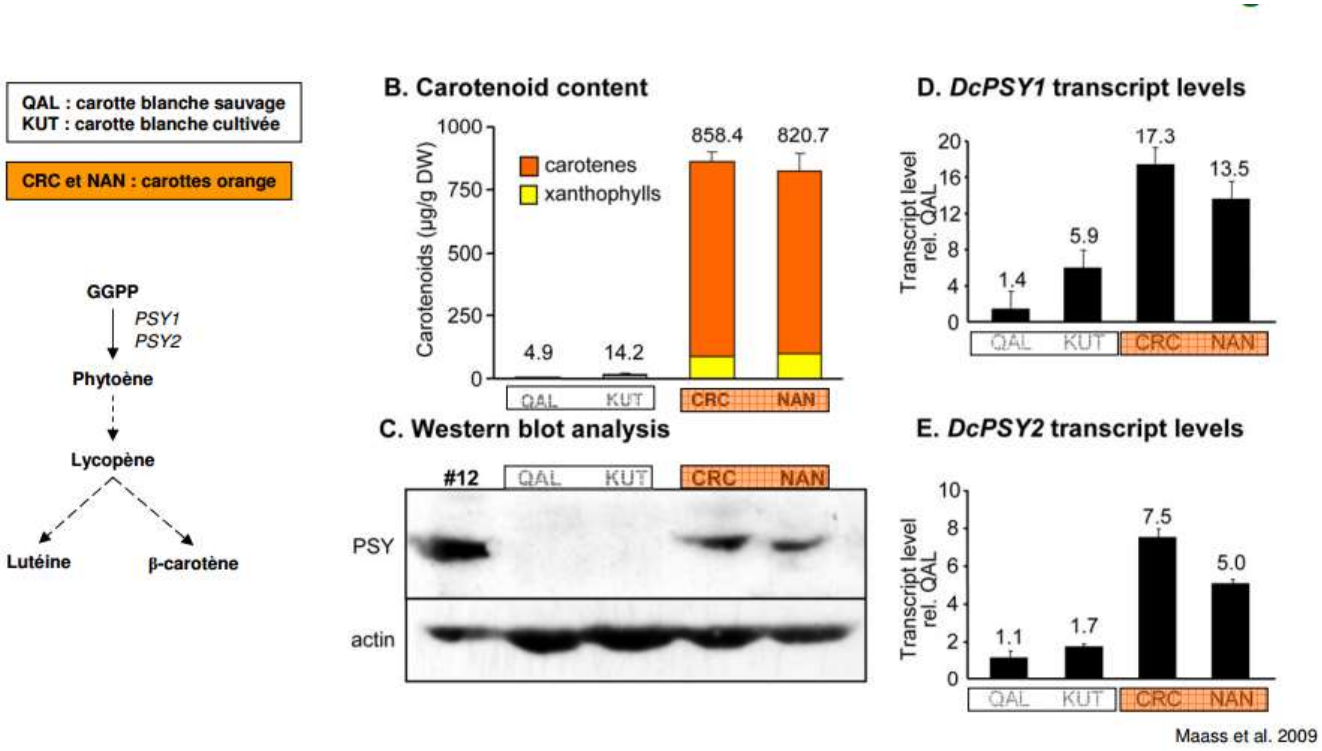
- **Réaliser** des coupes fines de carotte d'épaisseur d'environ 2 mm.
- **Immerger** ces coupes de racines de carotte **15 à 20 minutes** dans la solution de **phloroglucine**
- Les **immerger 5 minutes** dans **l'acide chlorhydrique** qui révèle la coloration rouge des tissus lignifiés.
  Appeler l'examinateur pour vérifier

- la coloration rouge des tissus lignifiés.
  Appeler l'examinateur pour vérifier.

Document 2 : La synthèse de carotène chez la carotte



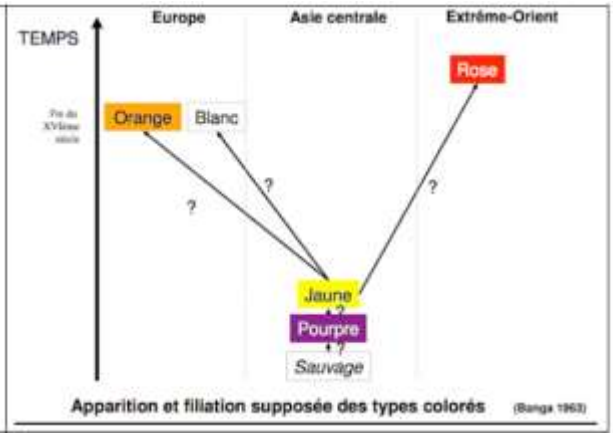
Document 3 : Expression des gènes PSY 1 et 2 chez plusieurs types de carotte.



Maass et al. 2009

Document 4 : L'apparition de la carotte orange

La carotte a une longue histoire puisque les romains la consommaient déjà. Un certain nombre de textes médiévaux permettent de constater qu'il existait déjà au Moyen-Age des carottes pourpres et blanches.
C'est à la fin du XVIème siècle que la carotte orange fait son apparition, créée par des horticulteurs hollandais.
Ces différentes variétés ont été obtenues par **hybridation classique**. L'horticulteur procède à des pollinisations croisées entre le pollen d'une carotte et l'ovule d'une autre présentant des caractéristiques intéressantes. C'est par croisements successifs (et tâtonnements !) qu'on arrive à la variété que l'on cherche à obtenir.



Document 5 : Des carottes OGM contre l'ostéoporose (et p 268-269 du livre)

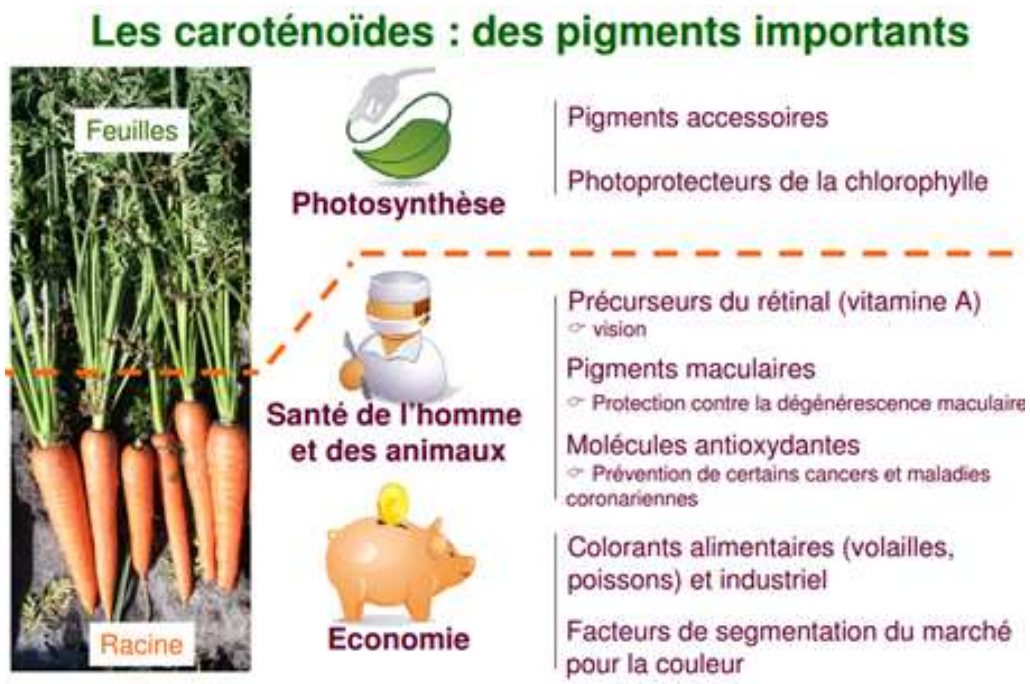
La nouvelle arme des scientifiques pour lutter contre l'ostéoporose : la carotte ! Et pas celle qui va souvent de pair avec le bâton, le légume, le vrai. Des chercheurs américains viennent en effet de mettre au point une carotte génétiquement modifiée qui améliore l'absorption du calcium.

Les chercheurs de l'université du Texas ont utilisé des carottes dont ils ont modifié le gène responsable du transport du calcium dans les membranes cellulaires. Ils ont ensuite donné a manger ces carottes à 30 volontaires. En parallèle les chercheurs ont suivi l'absorption du calcium chez ces derniers. Verdict : les mangeurs de carottes OGM ont vu leur absorption de calcium augmenter de plus de 40 %. Pour les chercheurs, cette voie pourrait être utilisée pour réduire les problèmes d'ostéoporose.

Mais la botte de carottes en pharmacie ou les carottes râpées sur ordonnance de votre médecin ce n'est pas pour tout de suite. Ces aliments génétiquement modifiés sont pour l'instant des objets de recherche et il n'est pour l'heure pas question de les commercialiser.

Jay Morris, K.M. Hawthorne, T. Hotze, S.A. Abrams, K.D. Hirschi"Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots" Proceedings of the National Academy of Sciences, Published online ahead of print, PNAS Early Edition, doi: 10.1073/pnas.0709005105

Document 6 : L'importance des carotènes



Document 7 : L'utilisation des carotènes, l'exemple du riz doré

Document 1 : Particularités du riz doré.

Le bêta-carotène qui, une fois assimilé dans le corps humain se transforme en vitamine A, existe naturellement dans l'enveloppe du riz mais pas dans sa partie comestible c'est-à-dire l'albumen. L'enveloppe du riz étant éliminée de manière à améliorer sa conservation, les grains consommés ne contiennent plus de bêta-carotène.

Par l'introduction de trois gènes dans du riz, des chercheurs allemands ont réussi à restaurer dans l'albumen une voie de biosynthèse du bêta-carotène à partir de son précurseur : le GPP. Le béta carotène alors synthétisé colore les grains en jaune, d'où le surnom de "riz doré". Cependant les teneurs obtenues jusqu'à présent ne fourniraient pas aux populations démunies en vitamine A, les quantités de béta carotène qui leur seraient nécessaires. Mais, les effets de carences plus ou moins prononcés pourraient être sensiblement allégés.

Le génome du riz doré contient trois gènes codant la synthèse d'enzymes impliquées dans la chaine de biosynthèse du béta carotène à partir du GPP à savoir :

- deux gènes de jonquille qui permettent la fabrication des enzymes 1 et 2 ;
- un gène de bactérie qui permet la fabrication de l'enzyme 3.

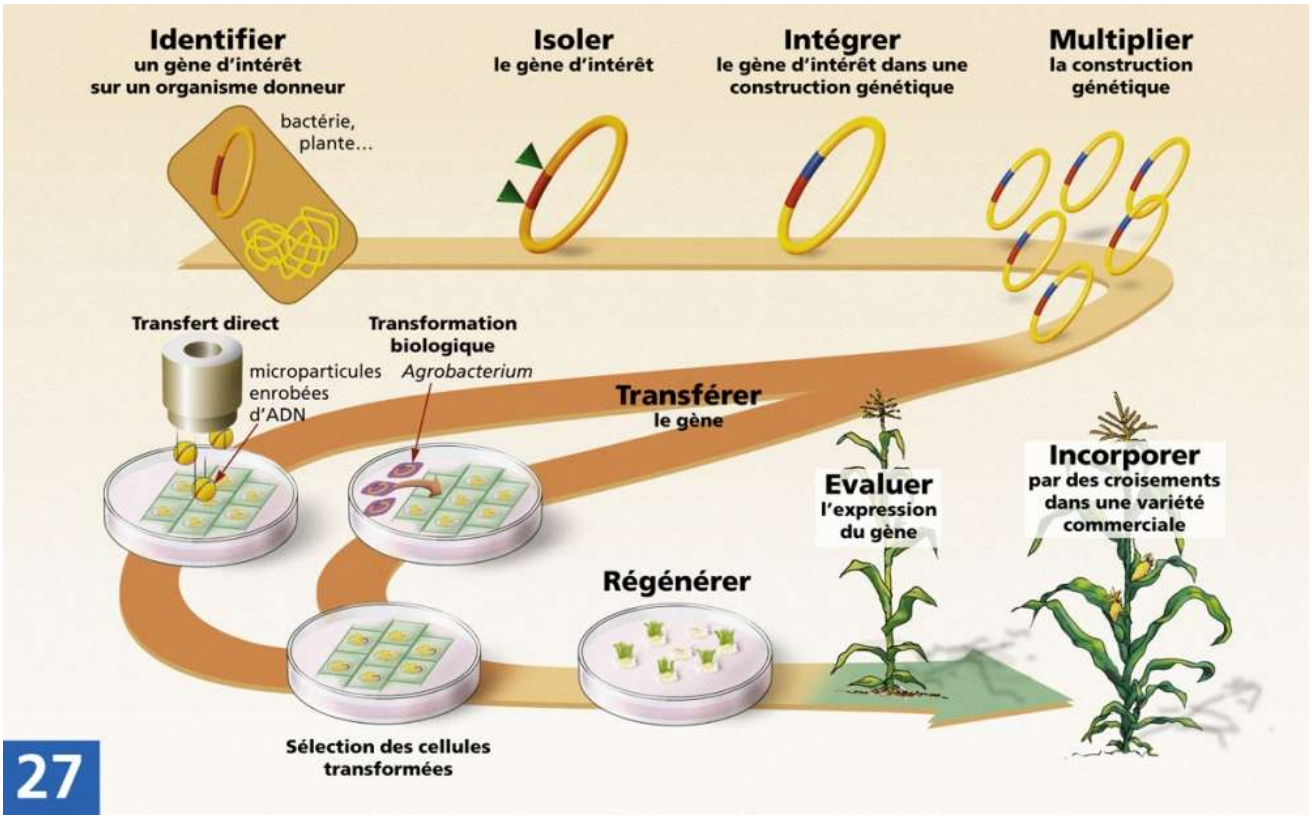
La chaîne de biosynthèse du béta carotène :

$$GPP \xrightarrow{\text{Enzyme 1}} \text{Produit intermédiaire A} \xrightarrow{\text{Enzyme 2}} \text{Produit intermédiaire B} \xrightarrow{\text{Enzyme 3}} \text{Bêta – carotène}$$

Document 2 : Incertitudes scientifiques autour du riz doré.

Le GPP, naturellement présent dans le riz, permet à la cellule de fabriquer un certain nombre de molécules dont la vitamine E, des chlorophylles, et de l'acide gibbérellique (substance favorisant la croissance végétale). La fraction du GPP, qui dans le riz doré sera utilisée pour fabriquer du béta carotène, ne sera plus disponible pour la synthèse des autres molécules dont il est également le précurseur. Autrement dit, il est probable que le riz doré, qui fabrique du bêta-carotène, fabrique moins de vitamine E, et que les rendements obtenus avec ce riz transgénique soient nettement diminués en raison d'une synthèse amoindrie de chlorophylles et d'acide gibbérellique.

Document 3 : Les étapes de la transgénèse et la réalisation d'un OGM



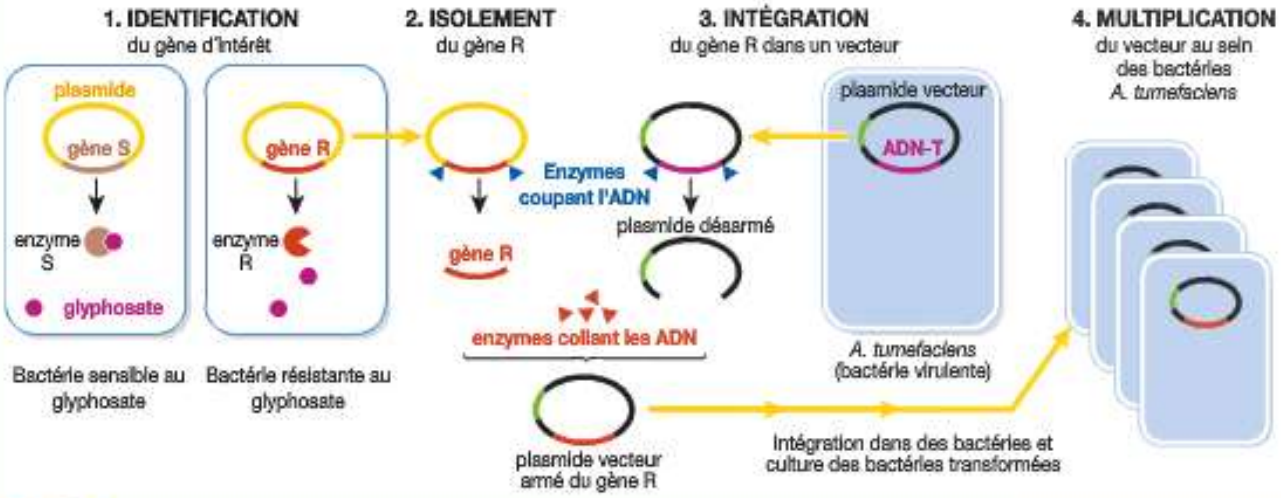
L'obtention de plantes transgéniques

Contrairement à la sélection classique, les techniques du génie génétique permettent, aujourd'hui, de s'affranchir complètement des limites naturelles de la reproduction sexuée et de ne transférer chez la plante que le gène intéressant. *L'étude d'un exemple nous permettra d'aborder ces techniques très complexes.*

A De la construction génétique au transfert de gène

ANIMATION

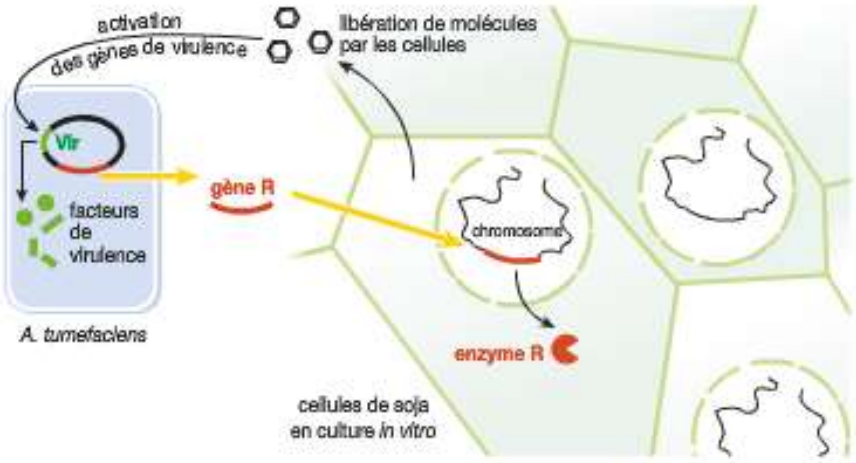
La technique de **transgénèse** la plus courante repose sur la capacité naturelle d'une bactérie du sol *(Agrobacterium tumefaciens)* à infecter les cellules végétales en transférant, dans leurs chromosomes, un segment de **plasmide** : l'ADN-T. On peut remplacer *in vitro* l'ADN-T par n'importe quelle autre séquence d'ADN. Le plasmide pourra ainsi servir de **vecteur** pour transférer un **gène d'intérêt** à des cellules végétales. C'est ce qui a été fait pour rendre une variété de soja tolérante au glyphosate. Cet herbicide agit en se fixant sur l'enzyme S, d'importance vitale pour toutes les plantes. On a découvert que certaines bactéries sont tolérantes au glyphosate, car elles possèdent une enzyme R, comparable à l'enzyme S, mais sur laquelle le glyphosate ne peut se fixer. On a donc « armé » des plasmides d'*A. tumefaciens* avec le gène de l'enzyme R. Les bactéries *A. tumefaciens* ainsi préparées sont cultivées pour disposer d'un grand nombre de plasmides vecteurs, avant de les mettre en présence des cellules du soja.



Doc. 1 **Étape 1 : Identifier un gène d'intérêt et préparer son transfert.**

On cultive ensuite sur un même milieu des fragments de feuilles de soja et les bactéries armées du gène R. Les cellules végétales libèrent des molécules qui activent un groupe de gènes bactériens (gènes Vir).

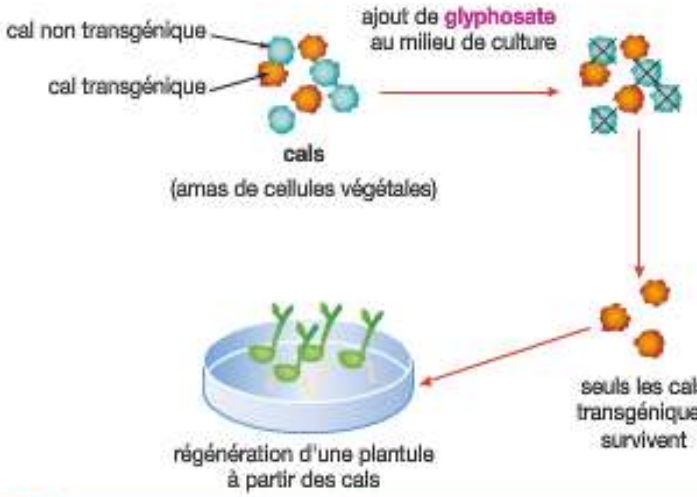
Les protéines ainsi fabriquées sont des facteurs de **virulence** : elles provoquent l'entrée du gène R dans certaines cellules du soja, et leur intégration dans les chromosomes.



Doc. 2 **Étape 2 : Transférer le gène d'intérêt vers les cellules de la plante cible.**

B Des cellules aux plantes transgéniques

Pour éliminer les bactéries, on lave les fragments de feuilles, puis on les cultive *in vitro*. Il se forme alors des cals (massifs de cellules indifférenciées). L'ajout de glyphosate au milieu de culture élimine, en principe, tous les cals non transgéniques, ou ceux dont le **transgène** ne s'exprime pas assez. On place alors les cals survivants sur des milieux de culture permettant leur transformation en plantules.

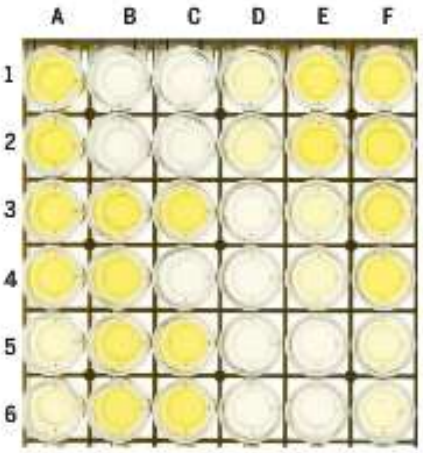


Les plants de soja obtenus sont cultivés *in vitro*, puis sous serre et reproduits par autofécondation.

Doc. 3 **Étape 3 : Sélectionner les cellules transformées et régénérer des plantes entières.**

Chacune des plantes ainsi obtenues est d'abord soumise à des tests génétiques visant à vérifier la présence et le nombre d'exemplaires du gène R.
Les plantes qui ont donné des résultats positifs à ces premiers tests sont ensuite soumises à un second test visant à vérifier la présence de la protéine R et son abondance. Pour cela, les protéines cellulaires sont extraites par broyage, puis déposées dans des puits au fond desquels sont fixés des **anticorps** spécifiques de la protéine R. Si celle-ci est présente, elle se fixe sur les anticorps. Une réaction colorée permet alors de révéler son abondance, proportionnelle à l'intensité de la coloration.

Remplissage des puits à l'aide d'une micropipette



Plaque de résultats (chaque puits correspond à une plante testée)

Doc. 4 **Étape 4 : Évaluer les plantes transformées.**

Pistes d'exploitation

PROBLÈME À RÉSOUDRE ► **Quelles techniques permettent de transférer un gène d'une bactérie vers une plante ?**

Doc. 1 et 2 Pour quelle raison cherche-t-on à intégrer le gène R dans le plasmide d'*A. tumefaciens* ?

Doc. 3 Justifiez l'ajout de glyphosate au milieu de culture sur lequel se développent les cals.

Doc. 4 Parmi les plantes transgéniques comparées par cette technique, repérez celles qui expriment le mieux la protéine R. Expliquez votre raisonnement.

Lexique, p. 406

Sources :

http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Marche/carotte.htm

http://www.lanutrition.fr/bien-dans-son-assiette/aliments/legumes/carotte/petite-histoire-de-la-carotte.html

http://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=carotte_nu#la-petite-histoire-de-la-carotte