

Amélioration génétique des Plantes

Chapitre IV

Techniques nouvelles de sélection

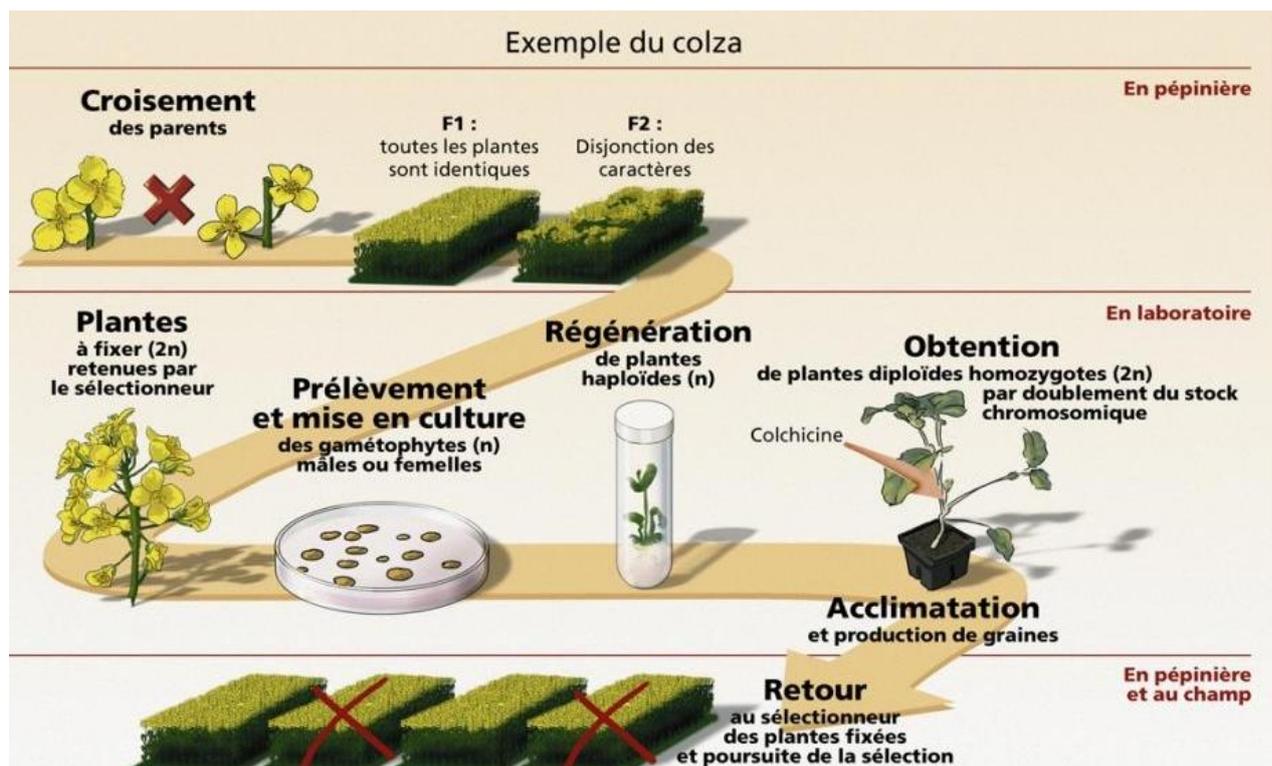
- 1- Sélection par haploïdie
- 2- Culture des cellules et des tissus
- 3- Hybridation somatique.

1- Sélection par haploïdie

1-1- Des méthodes facilitant ou accélérant la création variétale

A- Haplodiploïdisation

1- Principe : Le processus d'haplodiploïdisation comprend l'obtention de plantes haploïdes à partir des organes porteurs des cellules reproductrices, appelés gamétophyte mâle ou femelle, et le retour vers la phase diploïde



2- Production de plantes mères

- Le sélectionneur effectue un croisement entre deux lignées parentales présentant des caractéristiques intéressantes et complémentaires.
- Ce croisement produira la génération F1. Ce sont les plantes mères pour l'obtention de la phase haploïde.

- A ce stade, toutes les plantes sont identiques. En revanche, sur ces plantes, la méiose à l'origine de la formation des gamètes permet la ségrégation des caractères, selon les lois de Mendel et les recombinaisons entre les chromosomes parentaux.
- Les individus F2 seront alors tous différents les uns des autres, c'est la disjonction des caractères. Pour faciliter le travail de sélection, l'haplodiploïdisation va permettre d'obtenir des plantes homozygotes.

3- Obtention de la phase haploïde

- Il s'agit de récupérer les cellules ayant subi la méiose avant la fécondation. C'est là que commence le travail de laboratoire.
- L'obtention des plantes haploïdes peut se faire par culture in vitro de cellules destinées à fournir les cellules reproductrices ou gamètes.
- S'il s'agit de gamètes mâles, on parle d'androgenèse. S'il s'agit de gamètes femelles, c'est la gynogenèse.
- Une autre méthode d'obtention d'haploïdes est l'induction d'haploïdes in situ.
- On peut obtenir des haploïdes après croisements entre espèces ou entre genres. Il y a fécondation, mais les chromosomes incompatibles du parent pollinisateur sont rejetés naturellement.
- On peut également provoquer une fécondation anormale à l'aide de pollen dénaturé.
- Dans ces trois cas, on observe le développement d'un embryon haploïde.
- Une phase de sauvetage d'embryons in vitro est ensuite généralement nécessaire.
- Mis en culture sur des milieux particuliers, l'embryon haploïde va se développer, les tissus vont se différencier pour donner des plantes haploïdes.

4- Retour à l'état fertile diploïde

- Pour utiliser en sélection une plante régénérée par l'une de ces voies, il faut disposer de plantes fertiles et donc diploïdes.
- L'état haploïde étant instable, l'individu régénéré est parfois diploïde, on parle de doublement spontané du stock chromosomique. Pour le blé, on peut compter 20 à 25 % d'haploïdes doublés spontanément, 60 à 65 % chez l'orge. Sinon, on provoque artificiellement un doublement des chromosomes, le plus couramment par l'action d'un agent chimique, la colchicine.
- Les plantes obtenues sont des diploïdes homozygotes : elles possèdent deux copies identiques de chacun de leurs chromosomes et donc portent des paires de gènes ou allèles identiques, d'où leur grand intérêt.

5- Sélection des lignées

- Le matériel ainsi fixé est livré au sélectionneur. Le sélectionneur va alors trier les plantes en fonction des critères agronomiques et technologiques recherchés.
- La multiplication de ces plantes se fera par autofécondation : tous les descendants seront des copies identiques de leurs parents.

6- Traitement à la colchicine

- La colchicine bloque la mitose après la duplication des chromosomes et les cellules deviennent diploïdes.
- Le traitement à la colchicine peut se réaliser au stade plantule par trempage des racines ou injection dans les méristèmes.
- Les taux de doublement sont alors très variables.
- Actuellement, se développent des traitements in vitro au stade embryonnaire.

7- Déterminisme du niveau de ploïdie

- Une vérification de la ploïdie des plantes régénérées peut être effectuée précocement par cytométrie de flux.
 - Une substance fluorescente se liant à l'ADN permet la coloration des cellules.
 - La mesure de la densité de cette coloration permet de déterminer le niveau de ploïdie.
- Sinon, la constatation de la fertilité de la plante garantit qu'elle est effectivement diploïde.

B-Multiplication végétative in vitro

Les méthodes de multiplication végétative in vitro comprennent :

- le micro-bouturage qui consiste à prélever un fragment de tige comportant un bourgeon,
- la culture de méristèmes, perfectionnement de la méthode précédente, qui consiste à ne cultiver au départ que le méristème apical de la plante à multiplier, l'embryogenèse somatique qui consiste à obtenir à partir de certains tissus ou organes une prolifération de cellules qui reproduisent presque parfaitement les phases de l'embryogenèse zygotique.

C. Connaissance moléculaire des génomes : la «génomique»

Les progrès des techniques de biologie moléculaire, de robotique et d'informatique sont à l'origine du développement de la "génomique" qui aborde la connaissance des génomes sur une grande échelle. On peut définir la génomique comme l'étude exhaustive des gènes, c'est-à-dire :

- Leur localisation dans le génome, par le développement de cartes de plus en plus précises,
- Leur séquence (la succession des nucléotides sur le brin d'ADN) qui permet, dans près de la moitié des cas, d'entrevoir le type de fonction de la protéine correspondante,
- Les réseaux de régulation qui coordonnent leur niveau d'expression au cours du développement de l'organisme,
- leur fonction biologique exacte qui peut être déduite du comportement de mutants,
- enfin, la variabilité des caractéristiques précédentes au sein de l'espèce.

1- Les cartes génétiques :

Chez la plupart des espèces, on développe des cartes génétiques très denses, avec l'ambition d'associer, au même locus, un caractère phénotypique et un marqueur moléculaire. Ces marqueurs moléculaires s'appuient sur des variations de séquences d'ADN. Il existe de

nombreux marqueurs moléculaires qui sont très souvent désignés par des sigles : **RFLP** (polymorphisme de longueur de fragment de restriction), **RAPD** (l'amplification aléatoire d'ADN polymorphique). **AFLP** (polymorphisme de longueur de fragment amplifié), **SSR** (simple séquence répété de polymorphisme (microsatellites : répétition de motifs de 1 à 4 nucléotides. Le plus fréquent et le plus utilisé : di-nucléotide (CA)/(GT) : réparti sur tout le génome, très informatif), ou **microsatellites**, **SNP** (polymorphisme nucléotidique). **QTL**(quantitative trait loci (plu : locus). **PCR** (polymorphisme chaîne réaction...ect

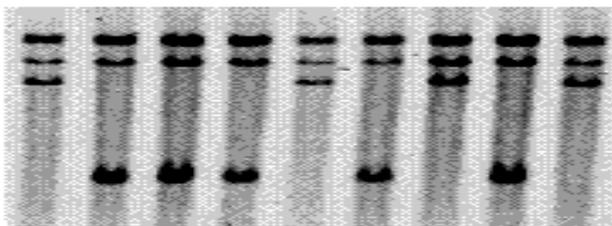
Les premiers séquençages ont porté sur des génomes de petite taille : celui d'*Arabidopsis thaliana* (espèce sauvage de la famille des Brassicacées ou Crucifères), celui du riz et celui du peuplier. Une des premières applications du séquençage est l'identification et la localisation sur les chromosomes des gènes qui interviennent sur les différents caractères de la plante.



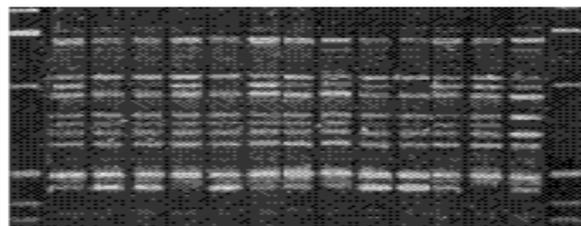
Les principaux marqueurs moléculaires

	RFLP	Microsatellites	RAPD	AFLP
Type de marqueurs	Enzyme / sonde	Amorces spécifiques bordant le microsatellite	Amorce de séquences arbitraires	Enzyme / amorce
Nombre de marqueurs	Illimité	Quelques milliers	Illimité	Illimité
Polymorphisme mis en évidence	Élevé	Élevé	Très élevé	Très élevé
Type de polymorphisme	Insertion, délétion, substitution	Insertion	Plutôt substitution, quelquefois insertion	Plutôt substitution
Caractérisation génétique	Locus codominants et révélés individuellement		Locus dominants et révélés en masse	
Principales utilisations	Cartographies, génétiques quantitatives (QTL)		Clonage positionnel, rétrocroisements	
Reproductibilité	Parfaite	Parfaite	Faible	Faible

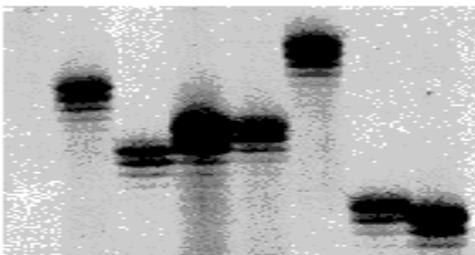
47



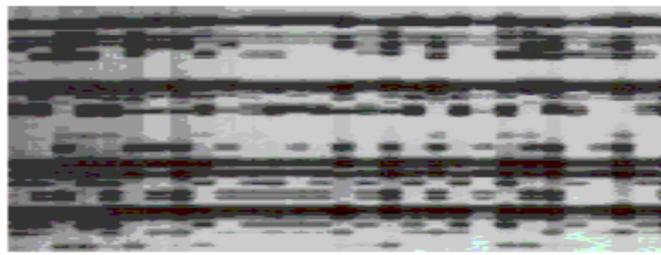
RFLP



RAPD



SSR



AFLP

Marqueurs moléculaires

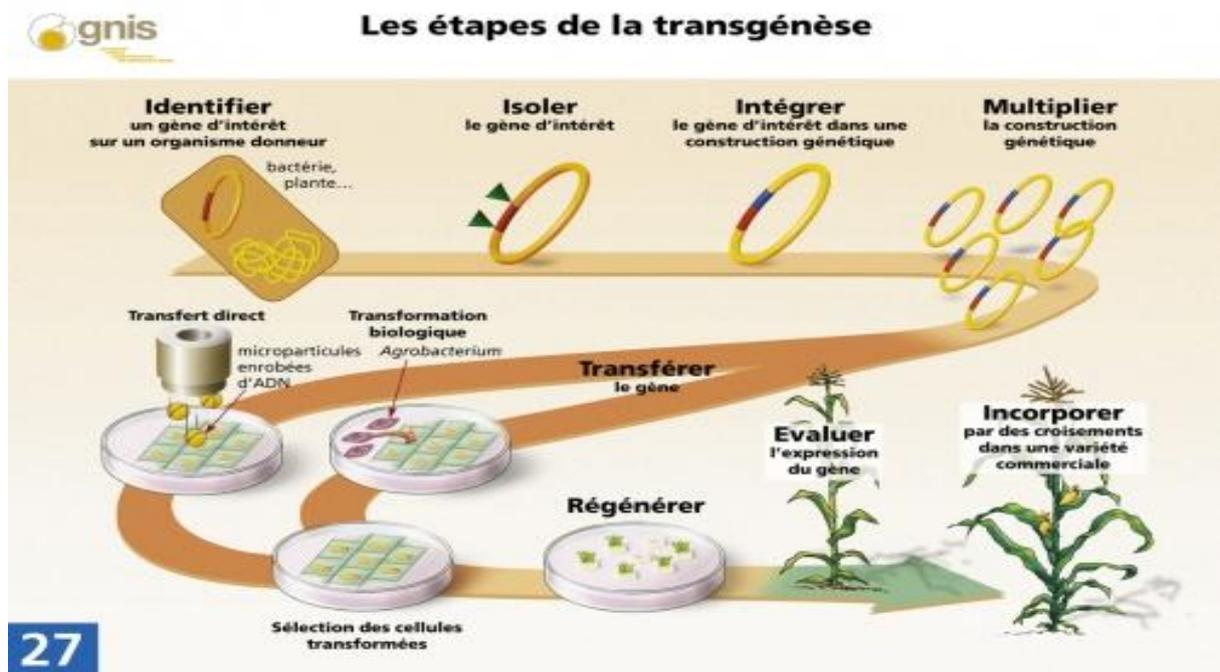
1-2- La biologie moléculaire

a- Transgénèse

Dès le milieu des années 1960, les chercheurs ont essayé de trouver des méthodes de transformation génétique des plantes par introduction directe d'ADN, pour élargir les possibilités d'échange de gènes à l'ensemble des espèces. Ces recherches ont abouti au début des années 1980, grâce aux progrès dans la connaissance des Agrobactéries et la mise en évidence de leur aptitude naturelle au transfert d'ADN dans les cellules de plantes.

Les quatre espèces principalement concernées sont le soja, le cotonnier, le maïs et le colza. Les caractères nouveaux introduits dans ces espèces sont des résistances à des herbicides ou à certains insectes.

Parmi les espèces **fruitières, la papaye (*Carica papaya*)** est pratiquement le seul exemple de plantes génétiquement modifiée qui soit cultivée actuellement. En Europe, des œillets issus de transformation génétique, modifiés pour la couleur de la fleur sont autorisés à la commercialisation, par contre, aucune autorisation n'est délivrée pour des fruits ou des légumes.



b- La cisgénèse

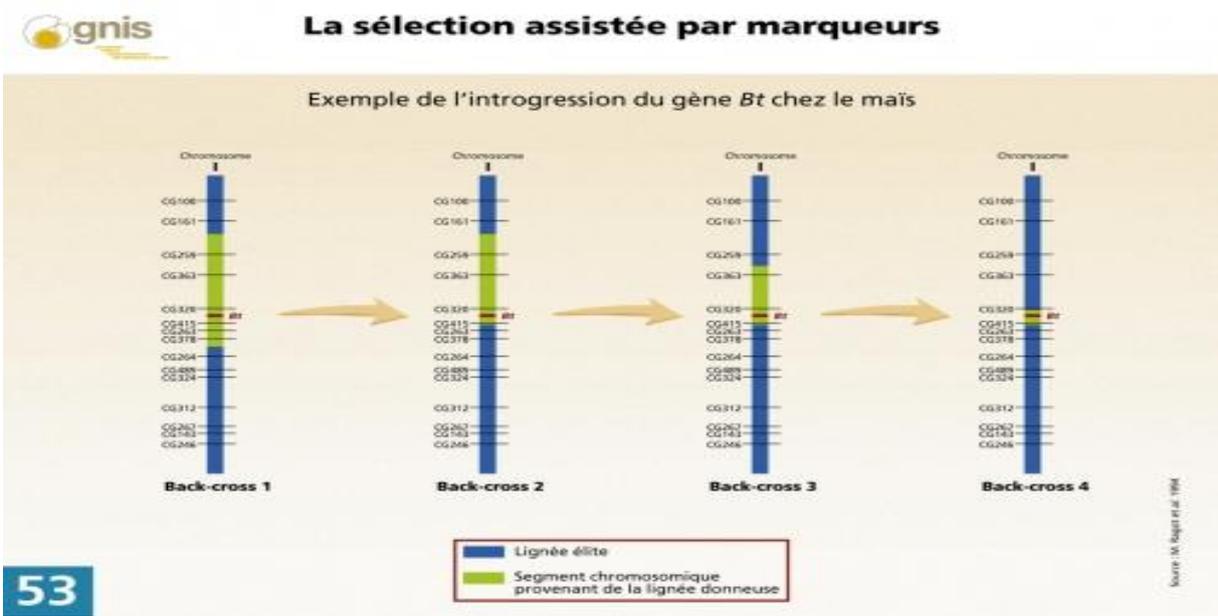
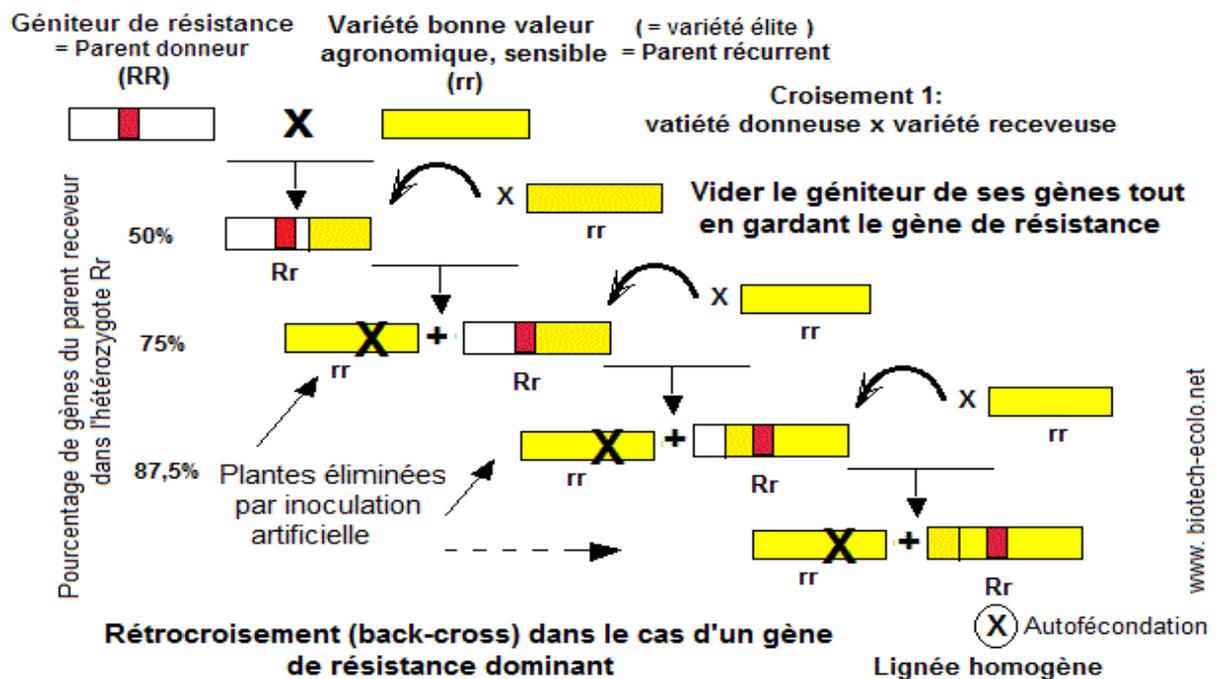
La cisgénèse se distingue de la transgénèse par le fait de transférer artificiellement des gènes entre des organismes qui peuvent être croisés selon les méthodes d'hybridation classiques, donc entre des organismes étroitement apparentés. Exemple : Pomme de terre résistante au mildiou

c- La sélection assistée par marqueurs

La connaissance simultanée de la variabilité moléculaire d'un allèle et de la variabilité de son effet sur un caractère phénotypique permet de concevoir la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM). Le cas le plus simple d'utilisation de la SAM concerne l'amélioration

d'une variété par le transfert d'un caractère présent dans un autre génotype et gouverné par un seul gène. Ce transfert peut être accéléré si l'on dispose d'un marqueur moléculaire du gène et de marqueurs moléculaires répartis sur le génome de la variété. Ces marqueurs moléculaires permettent de choisir, à chaque génération, les descendants se rapprochant le plus de la variété, tout en s'assurant de la présence du caractère introduit.

On accélère ainsi le processus et l'on évite le recours à des tests agronomiques ce qui représente aussi une économie très appréciable. La tomate est une espèce chez laquelle la SAM est utilisée.



53

d- Le tilling

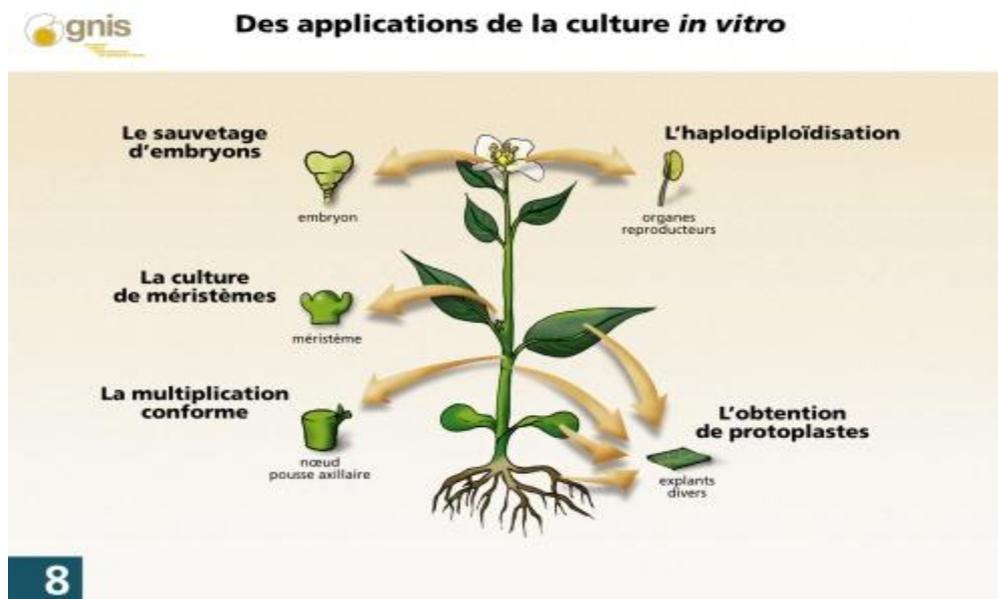
Le Principe du tilling (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) combine des méthodes de mutagénèse aléatoire avec des méthodes modernes d'analyse de l'ADN grâce à

l'identification à haut débit de mutations ponctuelles. Il s'agit de provoquer des mutations sur des génomes connus à l'aide de différents agents (chimiques ou physiques), de bien les localiser sur les séquences préalablement connues de l'ADN et d'observer les mutants correspondants. Un large éventail de variétés peut ainsi être étudié.

Initialement utilisé sur *Arabidopsis thaliana*, le tilling est utilisé sur la tomate, le melon, le pois, le colza, le blé, l'orge, la luzerne, etc. Son emploi vise principalement la recherche de résistances, de qualités gustatives ou nutritionnelles.

2- Culture des cellules et des tissus

2-1- La culture in vitro



2-2- Les applications de la culture in vitro

- Lorsque des cellules ou un groupe de cellules sont placées hors de leur environnement normal qu'est la plante, et sont maintenues en vie, on parle de mise en culture in vitro. Le terme in vitro rappelle le fait que ces cellules sont entourées par du matériel de laboratoire qui était originellement en verre.
- La culture in vitro d'explants ou de fragments prélevés sur la plante permet différentes applications.

2-3- La multiplication conforme

- On peut reproduire à l'identique un individu et le multiplier en très grand nombre, à partir de cellules ou d'un fragment d'organe.
- C'est la multiplication conforme. Elle se réalise par exemple à partir de nœuds, de pousses axillaires et s'apparente au bouturage des jardiniers. Mis en culture, ces tissus se développent et donnent une plante entière, identique à la plante de départ.

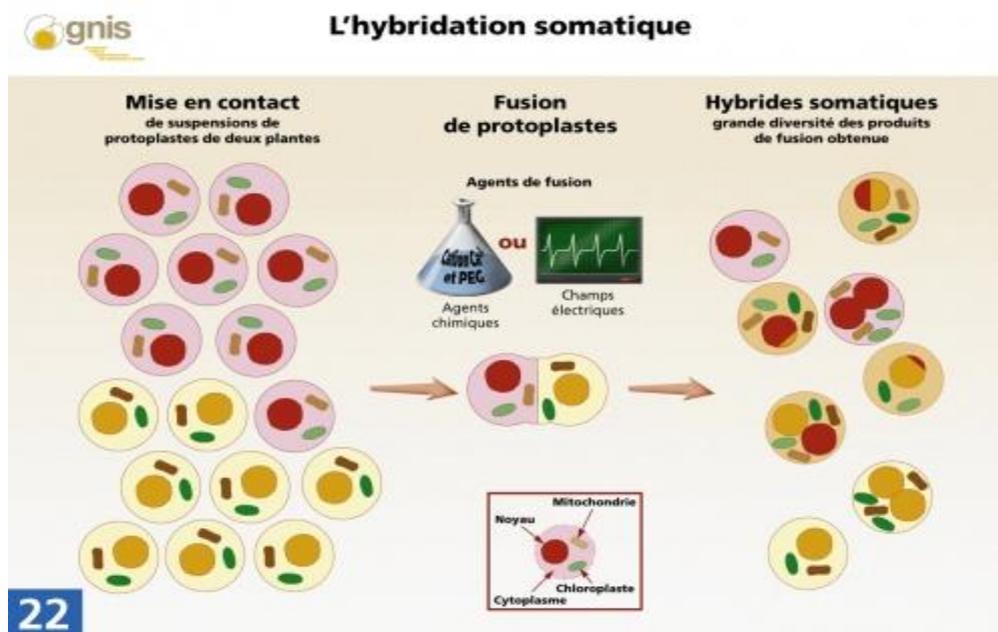
2-4- La culture de méristèmes

- Les méristèmes sont formés de cellules non différenciées, à l'origine de tous les tissus de la plante.
- Leur culture permet d'obtenir une plante identique à la plante initiale. L'intérêt des méristèmes réside dans le fait que ce sont des structures indemnes de virus. Leur culture donne des plantes saines.

2-5- Le sauvetage d'embryons

- Les embryons obtenus après la fécondation peuvent être prélevés, mis en culture in vitro et donner un nouvel individu.
- Le sauvetage d'embryons consiste à prélever un embryon précocement, pour le cultiver in vitro, soit pour accélérer les cycles végétatifs, soit parce qu'il ne pourrait pas se développer dans les tissus maternels, par exemple lorsqu'il résulte d'un croisement interspécifique.

3-L'hybridation somatique



3-1- L'hybridation somatique : au cours de la reproduction sexuée, les informations génétiques contenues dans le cytoplasme sont transmises par la mère.

- En revanche, la fusion de protoplastes conduit à une hybridation des noyaux, mais aussi à celle des cytoplasmes.
- Ceci est très intéressant pour le transfert et l'amélioration de caractères à **hérédité cytoplasmique**, comme la stérilité mâle.
- On parle d'hybridation somatique (car issue de cellules non reproductrices de la plante, Soma = corps).
- L'hybridation somatique est une méthode qui permet de réunir, dans une seule cellule, l'information génétique portée par deux cellules différentes.
- On la qualifie de somatique par opposition à l'hybridation sexuée. Elle nécessite plusieurs étapes réalisées en laboratoire :

* la digestion des parois pecto-cellulosiques des cellules de feuilles qui permet d'isoler ce qu'on appelle des «protoplastes», c'est-à-dire des cellules végétales délimitées seulement par leur membrane plasmique.

*la fusion des protoplastes grâce à des traitements chimiques (poly-éthylène-glycol) ou des décharges électriques.

*la culture in vitro des produits de fusion jusqu'à la régénération de plantes entières.

Les protoplastes :

Sont des cellules chargées négativement et la fusion spontanée n'est que très rarement observée. La fusion est obtenue sous l'action de divers agents chimiques ou d'un choc électrique. La dernière étape consiste à induire la division des cellules. Elle aboutit à la formation de cals. Ensuite, la différenciation des tissus est provoquée pour reformer une plante entière. Les travaux de sélection commencent sur la descendance de l'hybride somatique.

3-2- Applications pratiques

- La première démonstration de fusion entre des protoplastes différents remonte aux travaux de Melchers *et al.*, en 1978. Il recherchait des tomates cultivables à basse température et réalisa, à cette fin, des hybrides entre la tomate et la pomme de terre par fusion de protoplastes : la tomate. Cette nouvelle espèce est malheureusement un exemple théorique, car elle est stérile.

- La pomme de terre cultivée, *Solanum tuberosum*, est une espèce chez laquelle l'introduction de caractères par fusion de protoplastes est facilement réalisable. Ainsi, on a pu introduire des gènes de résistance au virus de l'enroulement, aux virus Y et X, au mildiou et à la pourriture bactérienne due à *Erwinia*, à partir des espèces sauvages d'Amérique du Sud, notamment *Solanum brevidens*.

- De nouvelles lignées mâles stériles de colza résistantes à l'atrazine ont pu également être obtenues par cette technique.

3-3- Les techniques de fusion de protoplaste

- La fusion par des méthodes chimiques. On peut neutraliser la charge électrique des protoplastes par des cations Ca^{2+} et un pH élevé. Ensuite, on utilise le polyéthylène glycol (PEG) qui provoque une forte agrégation des cellules et déstabilise la membrane plasmique. Après retour aux conditions initiales, les protoplastes fusionnent.

- La fusion par des méthodes électriques. Cette technique, l'électrofusion, plus récente, utilise des champs électriques intenses et de courte durée, qui en déstabilisant les membranes entraînent la fusion des protoplastes. Ce système semble être plus efficace.

Chargée du cours : Dr Messikh s