

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université des Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie et Ecologie Végétale

Filière : Sciences Biologiques



Cours de Biotechnologies Végétales

Destiné aux étudiants Master 1

Spécialités : Biodiversité et Physiologie Végétale,

Biologie et Physiologie de la reproduction



Dr. CHAIB Ghania

Année universitaire 2020-2021

Les progrès de la Biotechnologie

Introduction:

1. Définition de la biotechnologie
2. La biotechnologie végétale
3. Outils de la biotechnologie végétale :
 3. 1. La culture « **in vitro** »
 - 3.2. Les plantes modèles
 - 3.3. Biologie moléculaire et génie génétique
4. la bioinformatique
5. Objectifs et intérêts de la biotechnologie végétale
 - 5.1. Participer à l'avancée des connaissances
 - 5.2. Augmenter la biodiversité
 - 5.3. Contribuer à un meilleur environnement, exemple : les programmes de résistance du maïs à la sécheresse
 - 5.4. Améliorer la qualité sanitaire des aliments, exemple : les blés et maïs résistants aux champignons parasites

Les progrès de la Biotechnologie

La biotechnologie au sens large du terme, est l'utilisation de microorganismes ainsi que des cellules végétales, animales ou humaines pour la production de certaines substances à l'échelle agroalimentaire et industrielle. La biotechnologie végétale étudie les plantes et les cultures de tissus végétaux, vu leur importance en production d'aliments, de matière première et de médicaments. D'autre part, la culture d'organismes végétaux unicellulaires pour la production de biomasse ou l'extraction de produits de haute valeur ajoutée est une pratique qui augmente de jour en jour, à mesure que se développe la biologie moléculaire. Enfin, les techniques de la culture « in vitro » et la reproduction de plantes modifiées, via les techniques de génie génétique, ont déjà été expérimentées avec succès. Ces technologies permettent de remédier aux carences, d'améliorer les espèces et de mettre en place une résistance aux fléaux et aux maladies de nombreuses espèces végétales.

1. Définition de Biotechnologies

« Biotechnologie » est un terme relativement récent, puisqu'il est apparu pour la première fois vers 1960. IL est composé de bios (« vie » en grec) et de technologie (entré dans la langue française en 1656, au sens d'« étude des outils, machines et matières premières »). Bien que son étymologie soit assez précise, sa définition est un peu plus vague, en effet, l'application de la science et de la technologie aux organismes vivants pour la production du savoir, biens et services, en est une définition large. Un sens plus restreint du terme « biotechnologie », l'associe aux réalisations des 60 dernières années comprenant toutes les techniques de culture « in vitro » ainsi que les différents aspects de la génétique moléculaire, tels que le clonage de gènes, le séquençage, et aussi la microbiologie, la biochimie, la biophysique, la bioinformatique...

Aujourd'hui, les champs de recherches de la génétique, de la génomique et des biotechnologies concernent aussi bien l'homme que l'animal, le végétal, les microorganismes ou les écosystèmes. Ainsi, les biotechnologies sont à l'origine d'avancées décisives dans différents secteurs comme celui de l'agriculture et l'environnement où on y trouve la biotechnologie végétale qui étudie les plantes, et les cultures de tissus végétaux vu leur importance dominante en production d'aliments, de matière première et de médicaments.

Les biotechnologies peuvent être subdivisées en 5 classes:

- 1/ Les **biotechnologies blanches** consistent en l'emploi de systèmes biologiques (bactéries) pour la fabrication, la transformation ou la dégradation de molécules grâce à des procédés enzymatiques ou de fermentation dans un but industriel
- 2/ Les **biotechnologies jaunes** concernent l'environnement (biodépollution, bioremédiation, phytoremédiation, ..)
- 3/ Les **Biotechnologies rouges** concernent la santé humaine (biomédecine) et animale, la production de médicaments issus d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires. C'est dans cette catégorie que les efforts les plus importants ont été entrepris. On estime qu'en 2010, 80% des nouveaux médicaments seront issus, directement ou indirectement, des biotechnologies modernes (exemple d'application: Biotechnologies et médicaments du futur).
- 4/ Les **biotechnologies bleues** concernent la vie marine dont la valorisation des matières premières (agarose, alginates, chitine, chitosane,..)
- 5/ Les **biotechnologies vertes** concernent la valorisation des productions agricoles, l'agroalimentaire. Elles comprennent les techniques de micropropagation et transgénèse végétale ou animale avec lesquelles on obtient des organismes génétiquement modifiés (OGM). Les biotechnologies vertes constituent les biotechnologies les plus anciennes. Les fermentations ont d'abord utilisé des micro-organismes non sélectionnés pour produire de l'alcool, de l'acide acétique, des fromages, etc.

2. Biotechnologies végétales (Les biotechnologies vertes)

La biotechnologie végétale est l'intervention humaine sur des végétaux au moyen d'instruments technologiques afin de produire des réactions permanentes transmissibles à la descendance et de mettre au point de nouvelles variétés de plantes en utilisant des cultures « in vitro » pour la multiplication conforme, ou des techniques moléculaires de génie génétique: séquençage, clonage, sélections assistée par des marqueurs moléculaires, transgénèse...

3. Outils de la biotechnologie végétale

Pour atteindre ses objectifs, la biotechnologie végétale a besoin d'outils adéquats pour étudier les végétaux au niveau cellulaire et moléculaire:

3.1. La culture « in vitro »

visant à régénérer une plante entière à partir de cellules ou de tissus végétaux en milieu nutritif, en s'appuyant sur les propriétés de la cellule végétale qui sont : la plasticité et la totipotences et en utilisant des techniques modernes de culture cellulaires à savoir : la multiplication conforme, culture de méristèmes, culture d'embryons, l'embryogenèse somatique, culture d'haploïdes, cultures d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ...

3.2. Les plantes modèles

Arabidopsis thaliana, le riz, le colza..., sont des plantes modèles dont le génome a été entièrement séquencé et étudié et qui ont contribué dans l'exploration de génomes plus complexes et plus vastes de plantes cultivées qui constituent des obstacles à leur analyse génétique et moléculaire.

3.3. Biologie moléculaire et génie génétique

L'ensemble des outils et des techniques de la biologie moléculaire permet de manière contrôlée l'étude de la modification des gènes et l'obtention d'organismes génétiquement modifiés (OGM) par transgénèse, et aussi de leur clonage, leur séquençage, leur découpage, en s'appuyant sur différents outils : enzymes de restriction, vecteurs, sondes...

Ainsi que, l'utilisation des marqueurs moléculaires pour identifier et sélectionner précocement les plantes qui possèdent des gènes induisant des caractères souhaités (résistance, qualité...).c'est la sélection assisté par marqueurs (PCR, microsatellites, ISSR, RADP...).

4. la bioinformatique

La bioinformatique propose d'organiser, de gérer et d'analyser la multitude de données produites par les méthodes de la génomique. Elle a pour mission de

* stocker les données de génomique structurale et fonctionnelle dans de larges bases de données informatiques.

* Permettre à tous les biologistes d'y accéder de façon simple et rapide. A partir des données de séquençage, la bioinformatique développe des programmes pour

* Annoter les gènes: comparer les séquences d'organismes différents entre elles et prédire la fonction des gènes.

* Prédire des éléments: de régulation de l'expression des gènes et de localisation dans la cellule des protéines codées par les gènes.

5. Objectifs et intérêts de la biotechnologie végétale

5.1. Participer à l'avancée des connaissances

Les progrès spectaculaires de la biologie moléculaire, de la bioinformatique et de diverses technologies comme le séquençage et l'analyse d'images, ont ouvert un nouveau champ d'investigation du vivant qu'on appelle la génomique qui permet désormais de dresser un catalogue de tous les gènes d'un organisme puis de comprendre leurs fonctions, leur régulations et leurs interactions. Ce programme porte sur le génome de plusieurs plantes : blé, maïs, colza,...ou il s'intéresse aux gènes impliqués dans la résistance aux maladies, des caractères agronomiques et les qualités de la récolte.

5.2. Augmenter la biodiversité

L'intégration de nouveaux caractères peut se faire, soit par des méthodes de sélection conventionnelle intégrant les nouvelles connaissances sur le génome, soit par transgénèse (OGM) lorsque la diversité génétique d'une espèce n'offre pas de possibilités d'amélioration. Quelle que soit la voie choisie, la génomique participe donc à l'enrichissement de la biodiversité

5.3. Contribuer à un meilleur environnement

Exemple : les programmes de résistance du maïs à la sécheresse. L'eau est une ressource limitée dont l'agriculture est la première utilisatrice, devant l'industrie et la consommation humaine. Pour la culture du maïs, qui exprime des besoins en eau importants, une façon de mieux gérer l'eau consiste donc à créer des variétés qui tolèrent une disponibilité réduite en eau, sans que leurs

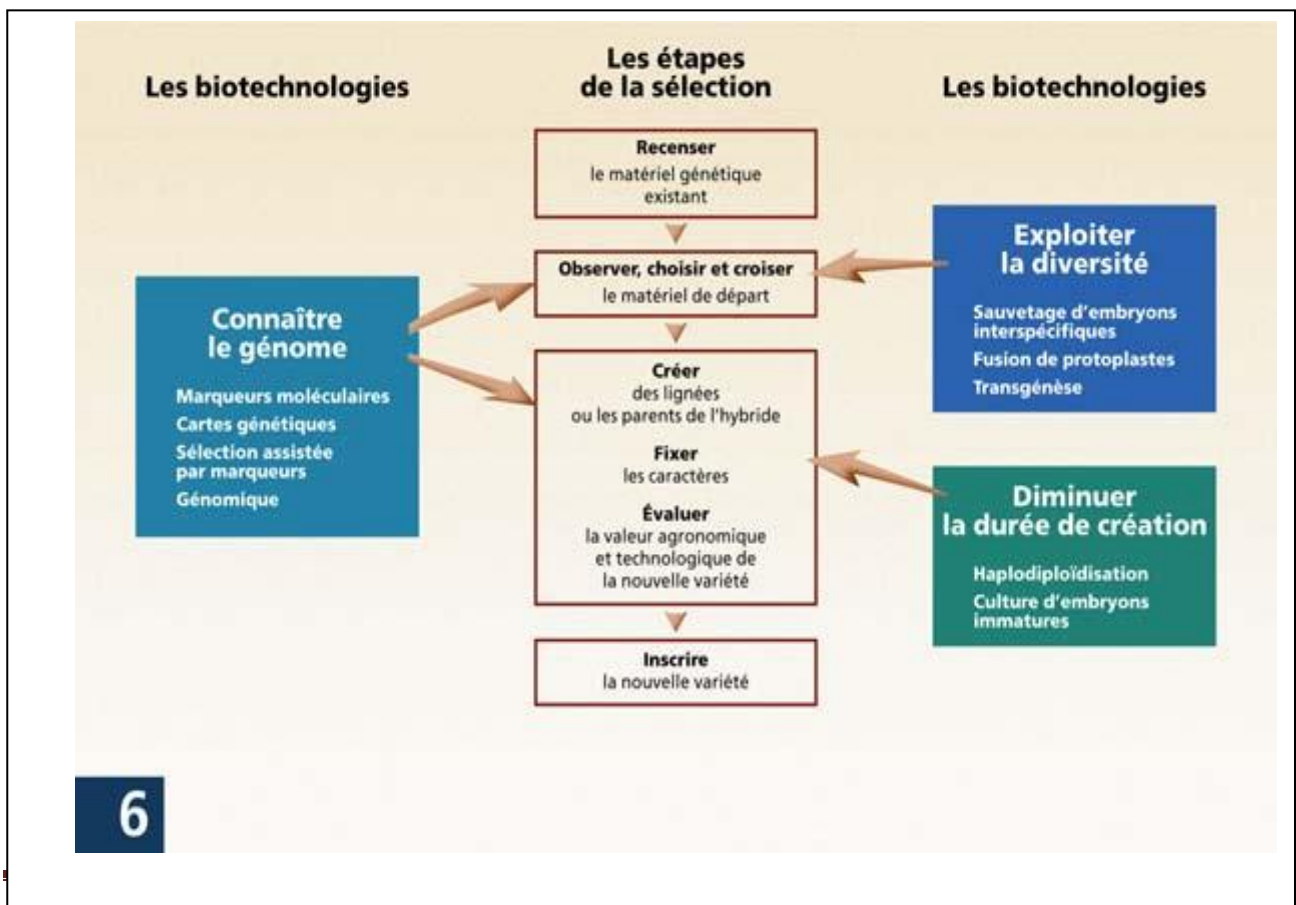
capacités de production n'en soient affectées, cela grâce à l'introduction par transgénèse d'un gène de sorgho, céréale.

5.4. Améliorer la qualité sanitaire des aliments

Exemple : les blés et maïs résistants aux champignons parasites : Toutes les plantes, sauvages ou cultivées, sont sensibles à des champignons parasites qui les attaquent aux différents stades de leur développement, mais aussi après la récolte. Les pertes induites par l'action de ces derniers sont considérables. Des recherches en biotechnologie végétale permettront d'améliorer la résistance du blé et du maïs à certains champignons parasites.

6. Les étapes de la sélection

La démarche suivie par le sélectionneur, même lorsqu'il utilise les biotechnologies, reste celle d'un schéma de sélection classique qui peut se décomposer en quatre grandes étapes :



- **Recenser** le matériel génétique existant en mettant en collection les écotypes et le matériel déjà sélectionné.

- **Observer, choisir et croiser** le matériel de départ. Il s'agit de réunir dans une seule plante les caractères intéressants et complémentaires des parents.
- **Créer, fixer et évaluer** les nouvelles plantes après le croisement des parents. Les grains récoltés sont semés pour donner la première génération, F1, où toutes les plantes sont identiques. A la deuxième génération, la F2, les plantes obtenues sont très différentes les unes des autres car il y a disjonction des caractères. A partir de cette génération, la sélection commence. Le sélectionneur choisit les plantes en fonction de critères définis correspondant le mieux aux objectifs de départ. Ces plantes, par autofécondations successives, aboutissent à la création de lignées, soumises à l'épuration. Pour la création de variétés hybrides, il faudra en outre choisir le parent se combinant le mieux avec les lignées obtenues.

A partir de la F5, les individus sont plus stables. Le sélectionneur met alors en place des parcelles d'essais pour étudier le comportement agronomique de la variété dans différentes régions. Pour les hybrides, il s'agira également d'étudier le comportement des lignées en fonction de leur aptitude à la combinaison. Des tests de valeur technologique sont également effectués en laboratoire.

Parallèlement, se poursuit la fixation des caractères par autofécondations successives (F5 à F8) et épuration.

- Inscrire au Catalogue officiel des variétés. La variété sélectionnée est déposée au Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS) pour subir deux ou trois années d'examen selon l'espèce, en vue de son inscription. La variété sera jugée sur sa valeur agronomique et technologique (VAT) et sur des critères de distinction, d'homogénéité et de stabilité (DHS). Elle pourra ensuite être multipliée et commercialisée sous forme de semences certifiées.

7. La place des biotechnologies

Les biotechnologies peuvent intervenir à différents niveaux dans un programme de sélection :

- **Exploiter la diversité.** Il s'agit, pour le sélectionneur, d'accroître les possibilités de choix des parents à l'origine du croisement de départ. Les techniques de biologie cellulaire, sauvetage d'embryons et fusion de protoplastes, parce qu'elles permettent de s'affranchir des contraintes de la reproduction sexuée, constituent une aide largement utilisée, tout comme la transgénèse.

- **Connaître le génome.** Les techniques de marquage moléculaire permettent de rendre plus précises et plus rapides les opérations classiques de sélection. Elles interviennent à chaque étape du cycle de sélection. Les outils mis en place sont les marqueurs moléculaires qui permettent l'analyse des individus, la construction de cartes génétiques pour localiser les gènes sur les chromosomes, la sélection assistée par marqueurs pour suivre les gènes au cours des générations. La recherche des gènes intervenants peut ainsi être facilitée et leur isolement est réalisé grâce à la génomique.

- **Diminuer la durée de création.** Les gains de temps peuvent être réalisés de deux façons : soit en fixant plus rapidement le matériel génétique, pour l'obtention de lignées, soit en augmentant le nombre de générations par an. Les techniques mises en jeu font alors appel à la culture in vitro de gamètes ou haplodiploïdisation et à la culture d'embryons immatures.

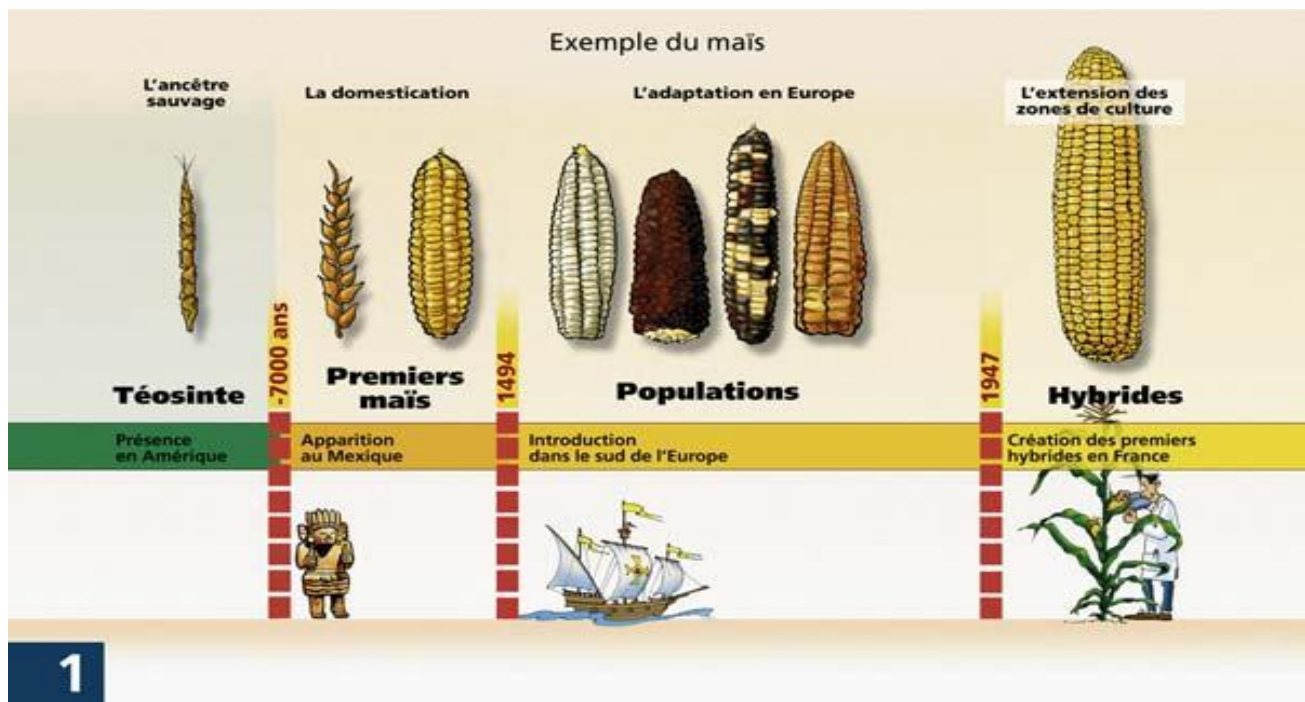
L'évolution des techniques de sélection

1 - La sélection apparaît avec l'agriculture

L'homme commence à améliorer les plantes lorsqu'il se sédentarise, il y a 10 000 ans. C'est le début de l'agriculture : il cultive les plantes pour son alimentation et pratique alors une sélection en choisissant, de manière empirique, de ressemer les plus beaux grains des plantes les plus intéressantes.

A la fin du 19e siècle, l'homme réalise les premiers croisements de parents choisis. L'avancée des connaissances et les progrès technologiques ont depuis permis l'évolution des techniques de sélection.

Ceci s'est traduit plus récemment par l'intégration des biotechnologies dans les programmes de sélection. C'est un outil supplémentaire à la disposition du sélectionneur pour repousser certaines limites rencontrées par les voies classiques de l'amélioration des plantes.



1.1. L'exemple du maïs

L'histoire du maïs est étroitement liée à celle de l'humanité. Grâce au travail de l'homme, cette plante a évolué et son aire de culture s'est développée. Le maïs résulterait de la domestication du

téosinte par l'homme.

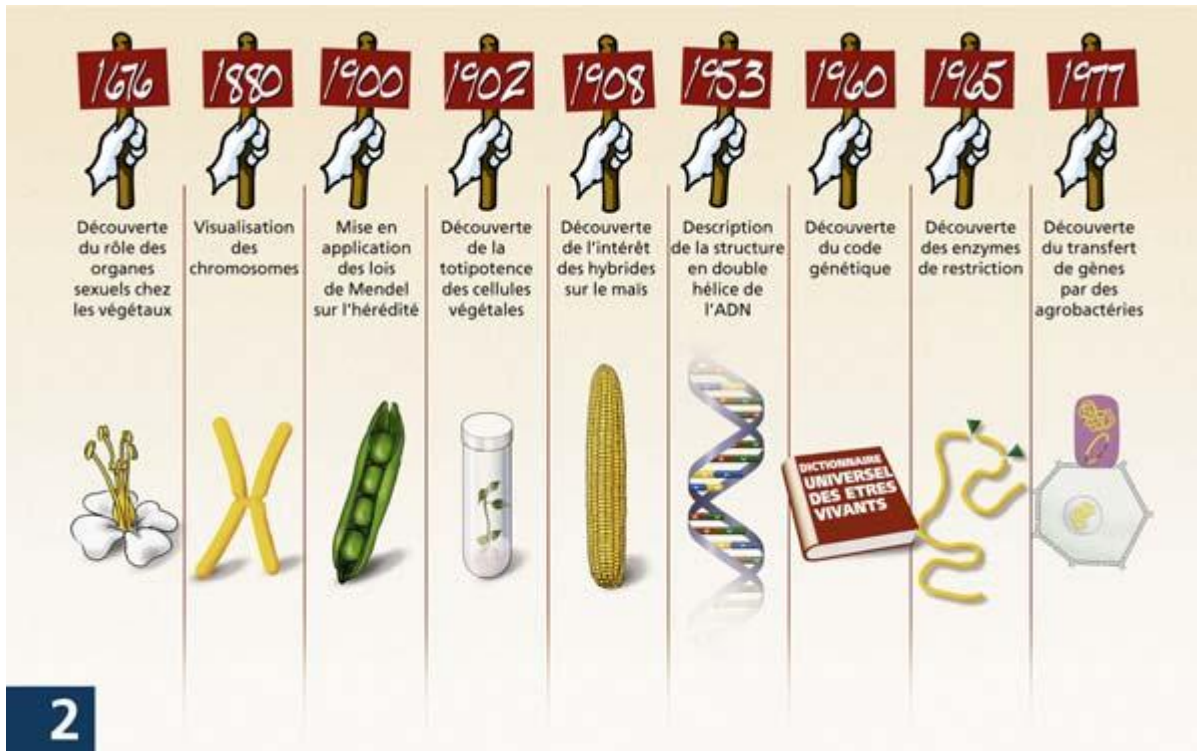
Le **téosinte**, proche génétiquement du maïs, est cependant différent sur le plan morphologique.

Le téosinte présente un tallage abondant, un épi de petite taille et une sensibilité à l'égrenage.

Les **premiers maïs**, datés de - 7 000 ans, ont été découverts au centre du Mexique. Les civilisations indiennes ont effectué sa domestication. Un épi de maïs mesurait alors environ 2,5 cm et les rendements supposés atteignaient 0,12 t/ha. Les caravelles des conquistadors apportent le maïs dans le sud de l'Europe, où il se développe en populations adaptées à chaque terroir. Avec la redécouverte des lois de Mendel à la fin du 19^e siècle et la mise en évidence du phénomène d'hybridation au début du 20^e siècle, naît la sélection des plantes, telle que nous la connaissons aujourd'hui.

Le maïs est l'espèce dans laquelle les premiers **hybrides** ont été créés. Ces variétés hybrides sont plus vigoureuses que les **populations**, c'est le résultat de l'hétérosis, appelé également vigueur hybride. Elles ont permis notamment l'extension des zones de culture du maïs grâce à une meilleure tolérance au froid et une plus grande précocité. Cultivées aux Etats-Unis, en 1936, elles se sont ensuite développées en France à partir de 1947, suite aux travaux de l'INRA. Ces hybrides résultent du croisement entre des lignées américaines de maïs à grains dentés et des lignées européennes à grains cornés. Les premières lignées cornées proviennent de populations locales telles que la population Lacaune, qui était cultivée dans le Sud-Ouest.

2- les repères historiques de la sélection



2.1. Progrès des connaissances

1676. Découverte du rôle des organes sexuels chez les végétaux par Millington-Grew.

1880. Visualisation des chromosomes par Strasburger-Boveri, et mise en évidence de leur implication dans la division cellulaire.

1900. Mise en application des lois de Mendel sur l'hérédité. Ses travaux sur le croisement de deux variétés de petits pois définissent les règles de base de la génétique. C'est la naissance de la sélection des plantes.

1902. Découverte de la totipotence des cellules végétales par Haberland. Un tissu végétal est capable de régénérer une plante.

1908. Découverte de l'intérêt des hybrides par Shull sur le maïs. Le croisement de deux lignées permet d'obtenir un hybride qui exploite l'hétérosis.

1953. Description de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick.

1960. Découverte du code génétique par Crick, Nirenberg, Mathaeri et Ochoa.

1965. Découverte des enzymes de restriction par Aber, Smith et Nathans. Ces protéines coupent l'ADN au niveau de sites particuliers.

1977. Découverte du transfert de gènes par des agrobactéries, bactéries du sol pathogènes de nombreuses espèces végétales, par Schell. Il a montré que la virulence de ces bactéries est due à un transfert de gènes de la bactérie vers les cellules végétales.

2.2.Progrès des techniques

Les progrès des connaissances ont permis ensuite de mettre au point les techniques. Voici quelques exemples d'application :

1911. Notion de liaison génétique par Morgan. Il démontre que les gènes sont disposés de façon linéaire sur les chromosomes et que de plus, lorsqu'ils sont situés sur le même chromosome, ils sont transmis à la descendance comme une seule unité. On dit qu'ils sont liés.

1935. Première carte génétique partielle du maïs par Emerson.

1950. Premières techniques de culture in vitro. Il s'agit de la technique de multiplication végétative, développée par Morel et Martin, sur la pomme de terre.

1961. Illustration des principes d'analyse des locus impliqués dans la variation des caractères quantitatifs, par Thoday.

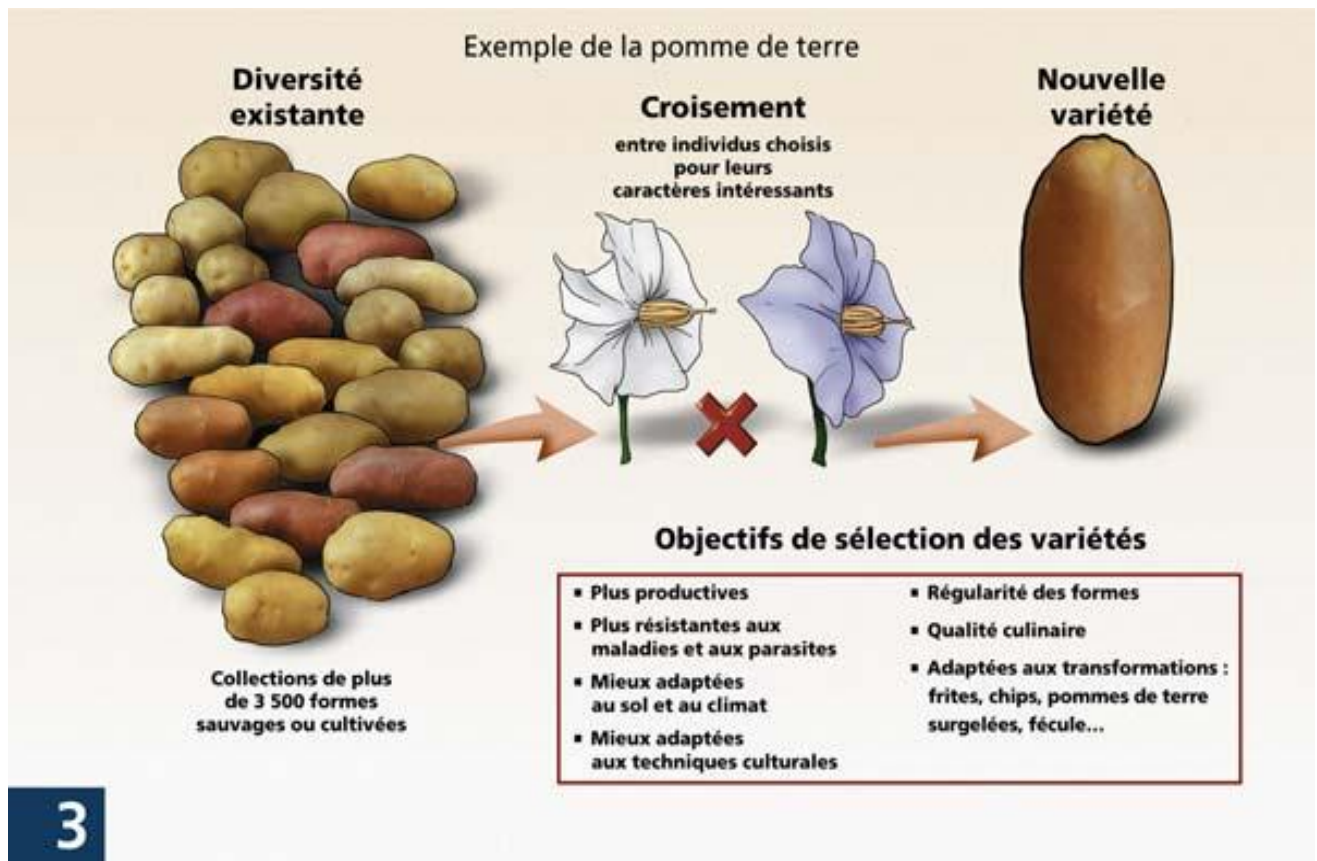
1964. Premières cultures de cellules sexuelles mâles chez le *Datura innoxia*, par Guha et Maheshwari. Elles ouvrent la voie à la production de plantes haploïdes.

1975. Description de la méthode de Southern, du nom de son inventeur. Le principe de la technique repose sur l'hybridation de l'ADN avec une sonde d'ADN marquée.

1978. Premières fusions de protoplastes, par Melchers. Elles permettent de s'affranchir partiellement de la barrière entre espèces.

1983. Premiers tabacs transgéniques obtenus en même temps par une une équipe belge et une équipe américaine.

3. Les principes de l'amélioration de plante



3.1. La sélection

L'amélioration des plantes a pour but de créer de nouvelles variétés à partir de la **diversité existante**. Elle consiste à croiser deux plantes choisies pour leurs caractères intéressants et complémentaires afin de les réunir dans une seule. Par le choix des meilleures plantes dans la descendance, les sélectionneurs aboutissent après un long travail d'épurations successives à la création d'une **nouvelle variété**.

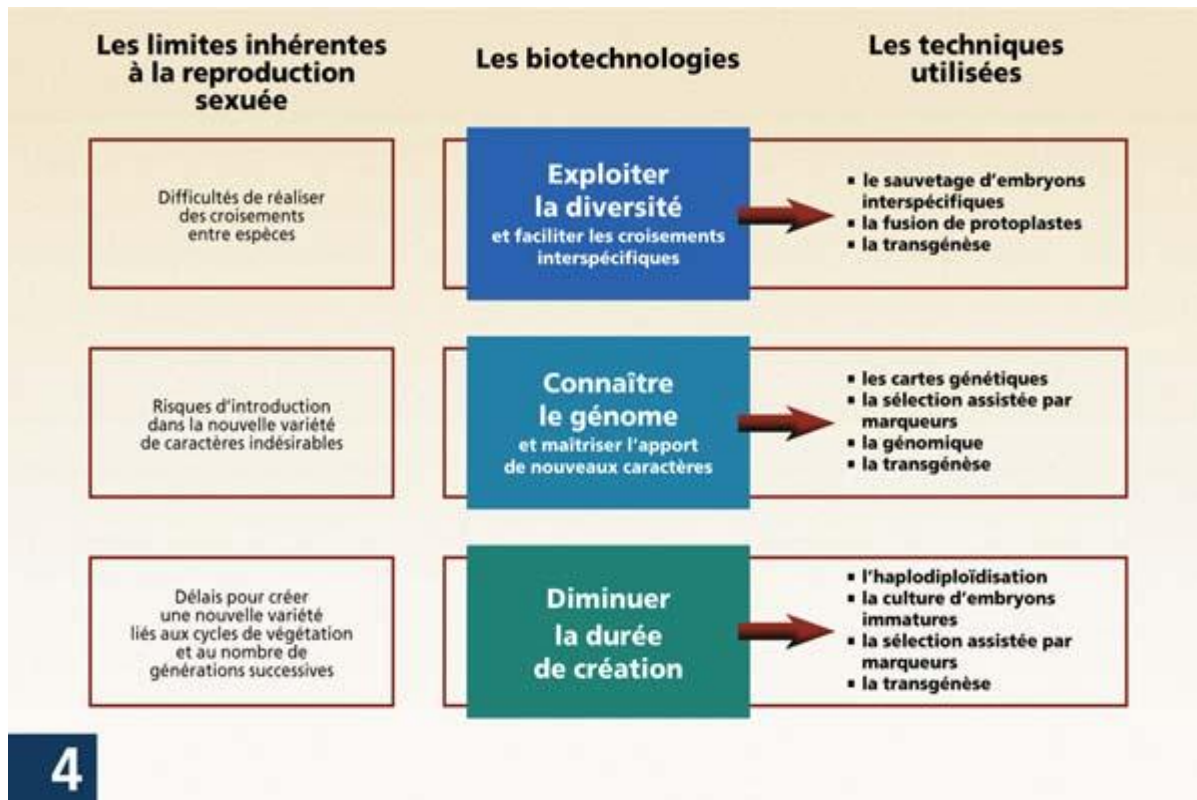
3.2. Les objectifs de la sélection

Les objectifs de la sélection sont nombreux. Généralement, le premier critère évoqué est la productivité. La productivité dépend de nombreux facteurs. Elle peut être le résultat de la réduction des facteurs limitants du rendement, mais le potentiel de productivité peut également être accru par une amélioration de la physiologie des plantes : augmentation de

l'activité photosynthétique, meilleure élaboration, migration et répartition des éléments constitutifs des réserves de la plante (grains, racines...). Les espèces végétales sont également plus ou moins plastiques. Certaines plantes comme le blé nécessitent une adaptation variétale importante aux conditions de sol et de climat. Pour les agriculteurs, l'un des facteurs les plus importants est la résistance aux maladies et aux parasites. Ceci joue non seulement sur le rendement, mais aussi sur le revenu de l'agriculteur. En effet, il peut exister d'autres solutions comme l'utilisation de produits de traitement qui, le cas échéant, peuvent augmenter les charges opérationnelles sur la culture. La sélection prend depuis longtemps en compte le **besoin qualitatif et les contraintes industrielles des transformateurs**. La qualité intrinsèque de la récolte, son état sanitaire, l'homogénéité des lots, l'aptitude des lots à la conservation, les qualités technologiques pour la transformation et les utilisations (boulangerie, biscuiterie, trituration...) sont des facteurs de sélection de plus en plus importants, diversifiés et codifiés dans des cahiers des charges.

D'autre part, on demande de plus en plus à l'agriculture de respecter l'environnement, de contribuer à des activités industrielles et de produire des molécules à usage pharmaceutique. La recherche prend déjà en compte ces nouveaux critères afin de permettre par exemple la production d'énergie, de substances transformées à usage non alimentaire, de vaccins ou de médicaments.

4. Les apports des biotechnologies à la sélection classique



4.1. Les limites inhérentes à la reproduction sexuée

L'amélioration des plantes donne d'excellents résultats. Des schémas de sélection adaptés à chaque espèce ont été élaborés et optimisés. Ainsi, pour l'ensemble des espèces cultivées, des progrès importants ont pu être réalisés (productivité, adaptation au milieu, qualité technologique...). Cependant, cette voie se heurte à trois limites inhérentes à la reproduction sexuée : l'incompatibilité, l'imprécision et le temps. Les biotechnologies apportent de nouvelles réponses à la sélection classique : pour faciliter les croisements interspécifiques, pour maîtriser les transferts de gènes, pour créer rapidement des lignées pures.

4.1.1. Faciliter les croisements interspécifiques

Lorsque le sélectionneur cherche à réaliser des croisements interspécifiques (entre plantes d'espèces différentes), afin d'augmenter les ressources en caractères favorables, il rencontre parfois une impossibilité : absence de fécondation, avortement de l'embryon, ou obtention d'un descendant stérile. Les techniques de sauvetage d'embryons, de fusion de protoplastes et de transgénèse permettent notamment de faire face à ces handicaps.

4.1.2 .Maîtriser l'apport de nouveaux caractères

Lorsque le sélectionneur fait un croisement, il brasse un très grand nombre de caractères, aussi bien ceux qu'il désire introduire dans la nouvelle variété, que des caractères indésirables. Ainsi, il doit ensuite procéder à de longues années de sélection pour éliminer ces derniers.

Face à ce problème, la connaissance du génome, grâce à la réalisation de cartes génétiques par l'utilisation de marqueurs moléculaires, et la transgénèse permettent de cibler et d'introduire un gène d'intérêt dans un fond génétique.

4.1.3. Diminuer la durée de création

Ce point est en partie lié aux deux aspects précédents. La sélection est un processus de longue haleine, il faut compter 5 à 15 ans, selon les espèces, pour créer une nouvelle variété et la mettre sur le marché. Les techniques d'haplodiploïdisation et de culture d'embryons permettent de raccourcir la durée des cycles de sélection, en diminuant le temps nécessaire à la fixation et à la multiplication des génotypes intéressants.

4.2. Exemples de réponses des biotechnologies

Les biotechnologies ont été intégrées dans les processus de sélection depuis leur développement. Voici trois exemples qui illustrent l'apport des biotechnologies dans le contournement des limites de l'amélioration des plantes par voie classique.

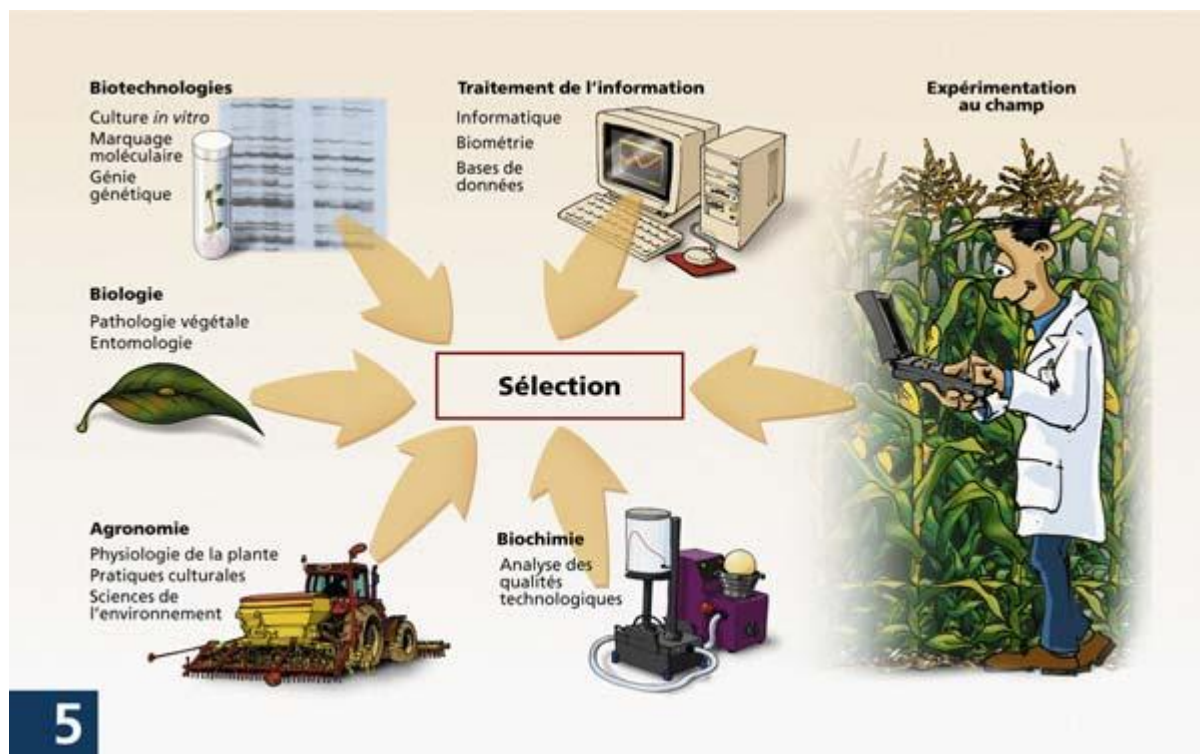
** Les espèces sauvages de tournesol constituent un bon réservoir de source de résistances aux pathogènes. On a donc recours à des croisements interspécifiques entre tournesols cultivés et sauvages. Toutefois, ceux-ci sont souvent limités par des phénomènes d'avortement des embryons issus de ces croisements. La technique de sauvetage d'embryons a donc été appliquée afin de permettre ces apports de gènes. Ainsi, des variétés de tournesol résistant au **mildiou** et au **Sclerotinia**, deux pathogènes majeurs de cette culture, ont pu être obtenues par ces techniques, dès 1985.

** La transgénèse est apparue au début des années 1980 dans le domaine végétal. Elle permet d'améliorer une plante à partir de gènes provenant d'une autre espèce, d'un autre genre, éventuellement d'un autre règne. Cette méthode permet une maîtrise beaucoup plus importante

des transferts génétiques : on introduit de l'ordre de 10 à 100 fois moins d'ADN étranger. Les applications concernent de nombreuses espèces et caractères. On peut citer notamment l'obtention, en 1994 aux Etats-Unis, de variétés de courgettes résistantes aux virus.

** De nouvelles lignées de colza ayant une qualité d'huile et de tourteaux améliorée ont été mises au point. Ce sont les colzas double zéro, sans acide érucique et sans glucosinolate. Cette caractéristique a pu être introduite rapidement et efficacement à l'ensemble des géniteurs grâce à l'haplodiploïdisation. Ainsi, on dispose, depuis le début des années 1990, de variétés de colza double zéro tout à fait compétitives d'un point de vue agronomique et de qualité améliorée.

5- la sélection, une activité pluridisciplinaire



L'**expérimentation au champ** est indispensable pour évaluer les nouvelles variétés en conditions réelles de culture : diversité des conditions climatiques, pédologiques, compétition entre plantes, pression de maladies et de parasites...

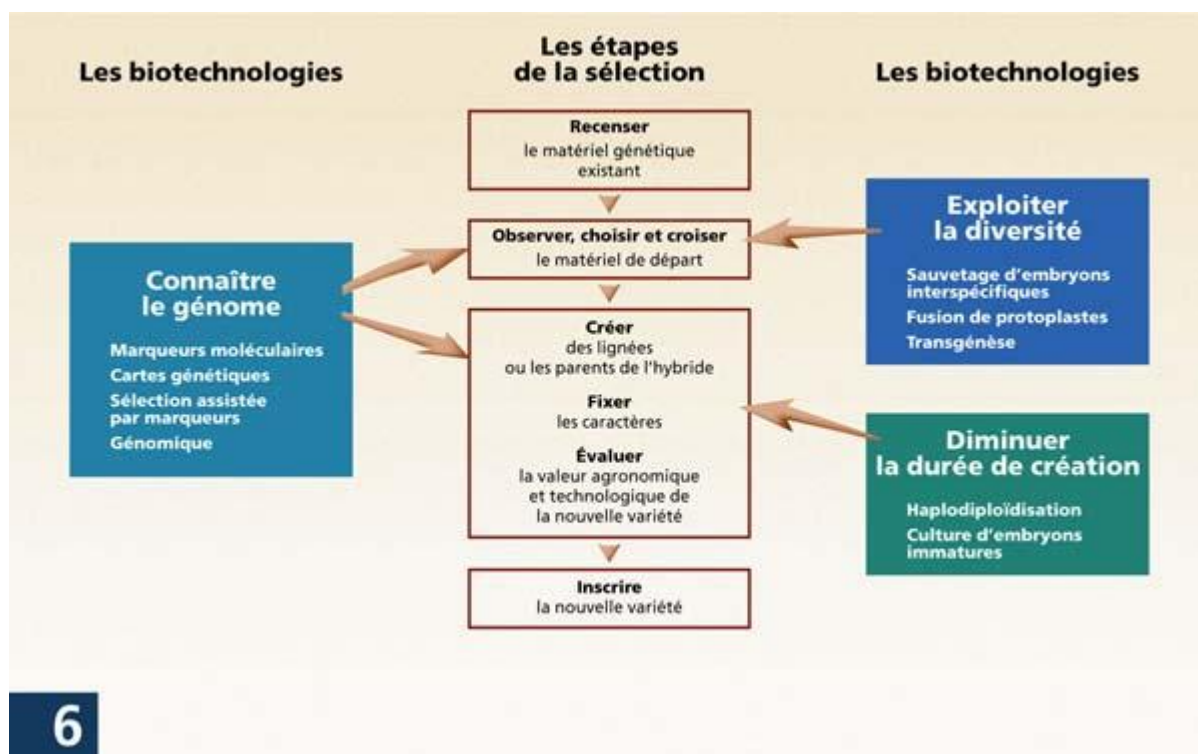
De nombreuses disciplines, les **biotechnologies**, le **traitement de l'information**, la **biologie**, l'**agronomie** et la **biochimie**, offrent des outils précieux aux sélectionneurs et permettent

d'accroître l'efficacité des programmes de sélection.

L'expérimentation au champ ne prend donc en compte que des plantes dont le potentiel génétique est important. Ceci renforce l'efficacité du travail d'expérimentation, et peut également l'alléger en écartant des plantes de moindre intérêt.

Parmi ces techniques, les biotechnologies rassemblent : la biologie cellulaire dont la base est la culture in vitro de cellules végétales, la biologie moléculaire qui permet d'analyser et de caractériser l'information génétique par marquage moléculaire et de la modifier par génie génétique.

6. Les biotechnologies dans un programme de sélection



6.1. Les étapes de la sélection

La démarche suivie par le sélectionneur, même lorsqu'il utilise les biotechnologies, reste celle d'un schéma de sélection classique qui peut se décomposer en quatre grandes étapes :

6.1.1. Recenser le matériel génétique existant en mettant en collection les écotypes et le matériel déjà sélectionné.

6.1.2. Observer, choisir et croiser le matériel de départ. Il s'agit de réunir dans une seule plante les caractères intéressants et complémentaires des parents.

6.1.3. Créer, fixer et évaluer les nouvelles plantes après le croisement des parents. Les grains récoltés sont semés pour donner la première génération, F1, où toutes les plantes sont identiques. A la deuxième génération, la F2, les plantes obtenues sont très différentes les unes des autres car il y a disjonction des caractères. A partir de cette génération, la sélection commence. Le sélectionneur choisit les plantes en fonction de critères définis correspondant le mieux aux objectifs de départ.

Ces plantes, par autofécondations successives, aboutissent à la création de lignées, soumises à l'épuration. Pour la création de variétés hybrides, il faudra en outre choisir le parent se combinant le mieux avec les lignées obtenues.

A partir de la F5, les individus sont plus stables. Le sélectionneur met alors en place des parcelles d'essais pour étudier le comportement agronomique de la variété dans différentes régions. Pour les hybrides, il s'agira également d'étudier le comportement des lignées en fonction de leur aptitude à la combinaison. Des tests de valeur technologique sont également effectués en laboratoire.

Parallèlement, se poursuit la fixation des caractères par autofécondations successives (F5 à F8) et épuration.

6.1.4. Inscrire au Catalogue officiel des variétés. La variété sélectionnée est déposée au Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS) pour subir deux ou trois années d'examen selon l'espèce, en vue de son inscription. La variété sera jugée sur sa valeur agronomique et technologique (VAT) et sur des critères de distinction, d'homogénéité et de stabilité (DHS). Elle pourra ensuite être multipliée et commercialisée sous forme de semences certifiées.

6.2. La place des biotechnologies

Les biotechnologies peuvent intervenir à différents niveaux dans un programme de sélection :

6.2.1. Exploiter la diversité. Il s'agit, pour le sélectionneur, d'accroître les possibilités de choix des parents à l'origine du croisement de départ. Les techniques de biologie cellulaire, sauvetage d'embryons et fusion de protoplastes, parce qu'elles permettent de s'affranchir des contraintes de la reproduction sexuée, constituent une aide largement utilisée, tout comme la transgénèse.

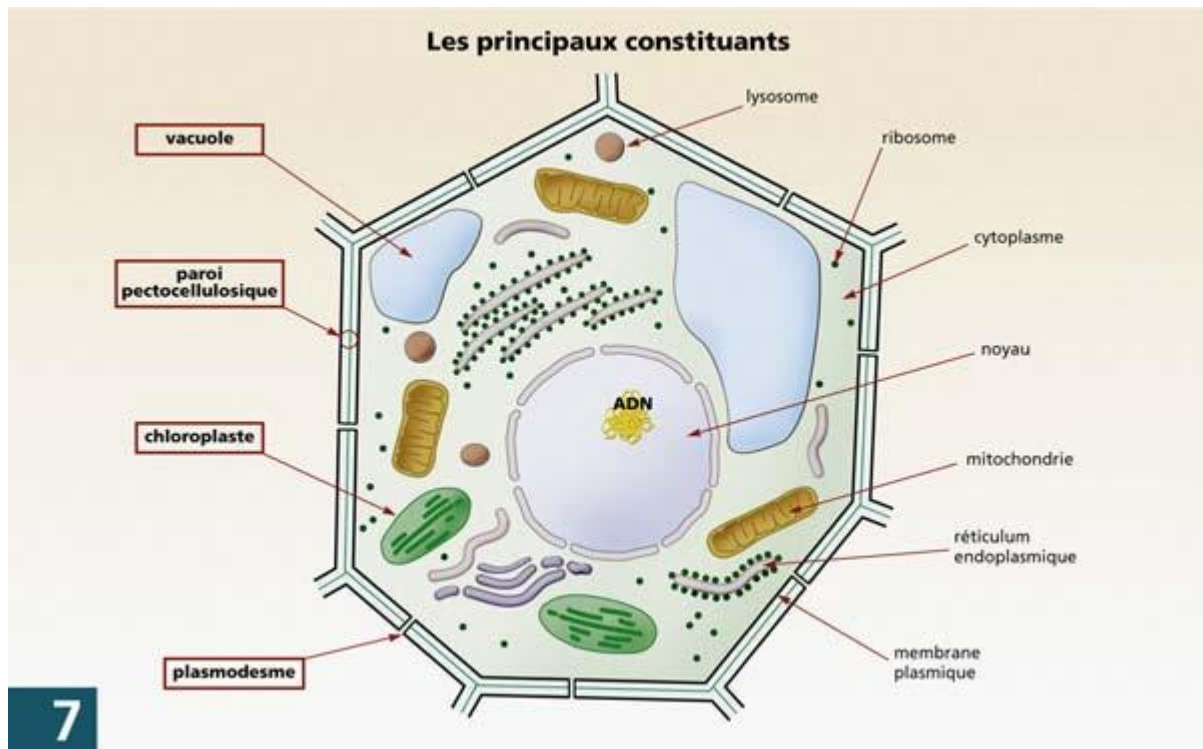
6.2.2. Connaître le génome. Les techniques de marquage moléculaire permettent de rendre plus précises et plus rapides les opérations classiques de sélection. Elles interviennent à chaque étape du cycle de sélection. Les outils mis en place sont les marqueurs moléculaires qui permettent l'analyse des individus, la construction de cartes génétiques pour localiser les gènes sur les chromosomes, la sélection assistée par marqueurs pour suivre les gènes au cours des générations. La recherche des gènes intervenants peut ainsi être facilitée et leur isolement est réalisé grâce à la génomique.

6.2.3. Diminuer la durée de création. Les gains de temps peuvent être réalisés de deux façons : soit en fixant plus rapidement le matériel génétique, pour l'obtention de lignées, soit en augmentant le nombre de générations par an. Les techniques mises en jeu sont alors appelées à la culture *in vitro* de gamètes ou haplo diploïdisation et à la culture d'embryons immatures.

Quelques notions de la biologie

1. Les fondements de la culture *in vitro*

1.1.La cellule végétale



1.1.1. Les principaux constituants

La **paroi pecto-cellulosique** rigide constitue une sorte de squelette externe. Cette paroi est spécifique de la cellule végétale. Elle la protège. Les **plasmodesmes** sont des points qui permettent les échanges entre les cellules.

A l'intérieur de la cellule, se trouve le cytoplasme, entouré d'une membrane de phospholipides appelée membrane plasmique.

Dans le cytoplasme, plusieurs éléments sont présents :

- Le noyau entouré de la membrane nucléaire renferme l'information génétique.
- Les **chloroplastes** sont les organites où se produit la photosynthèse. Ils sont présents dans les organes aériens de la plante, et sont eux aussi spécifiques du monde végétal. C'est le lieu où l'énergie lumineuse est transformée en énergie chimique, puis stockée dans des molécules organiques : les sucres.
- Les mitochondries : elles transforment l'énergie contenue dans les molécules organiques en énergie utilisable par la cellule pour toutes ses fonctions. Cette forme d'énergie, l'adénosine triphosphate (ATP), est universelle au sein des organismes vivants.

- Les ribosomes associés au réticulum endoplasmique sont le lieu de la synthèse des protéines.
- Les **vacuoles** sont spécifiques de la cellule végétale et permettent le stockage de l'eau, d'ions, de sucres, de dérivés azotés et de produits de dégradation.

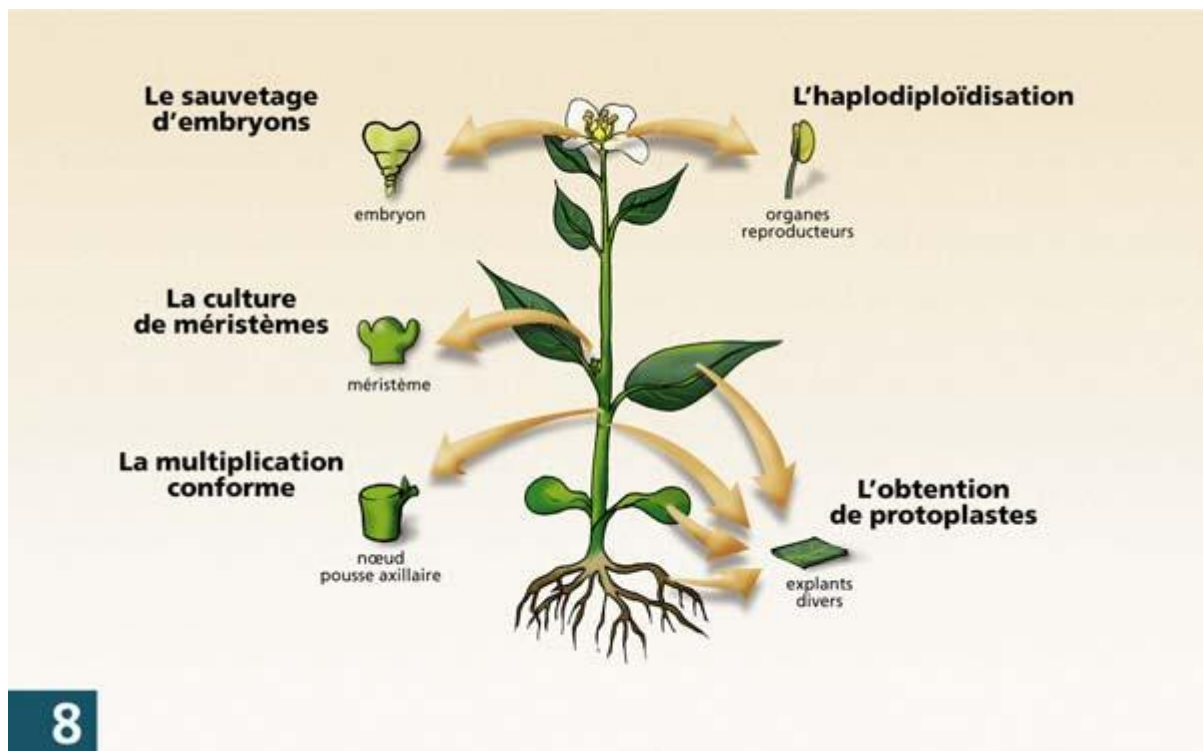
1.1.2. La division cellulaire

Toute cellule résulte de la division d'une autre cellule. Au début de la division, le stock des constituants cellulaires est multiplié par deux. Ainsi toutes les cellules d'une plante possèdent la même information génétique, quel que soit le tissu végétal.

1.1.3. La totipotence des cellules végétales

Les cellules végétales, prélevées sur un organe quelconque d'une plante, possèdent la capacité de régénérer un individu complet identique à la plante mère. C'est la totipotence des cellules végétales. Elle repose sur l'aptitude à la dédifférenciation : les cellules peuvent redevenir des cellules simples, non spécialisées et se différencier ensuite pour donner à nouveau les différents types de cellules spécialisées.

1.2. Des 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.

1.2.1. La multiplication conforme

On peut reproduire à l'identique un individu et le multiplier en très grand nombre, à partir de ou d'un fragment d'organe. C'est la multiplication conforme. Elle se réalise par cellules 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.

1.2.2. 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.

1.2.3. 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.

1.2.4. L'haplodiploïdisation

La mise en culture des organes reproducteurs consiste à faire se développer des individus à partir des cellules reproductrices ou gamètes. Ces cellules contiennent une copie de l'information génétique qui est normalement présente dans une cellule sous forme de deux copies, les deux chromosomes homologues. Au cours de la régénération, on peut réussir à doubler à l'identique cette copie. Les individus obtenus sont des lignées pures, car ils ont la même information sur les deux chromosomes, ils sont homozygotes.

1.2.5. L'obtention de protoplastes

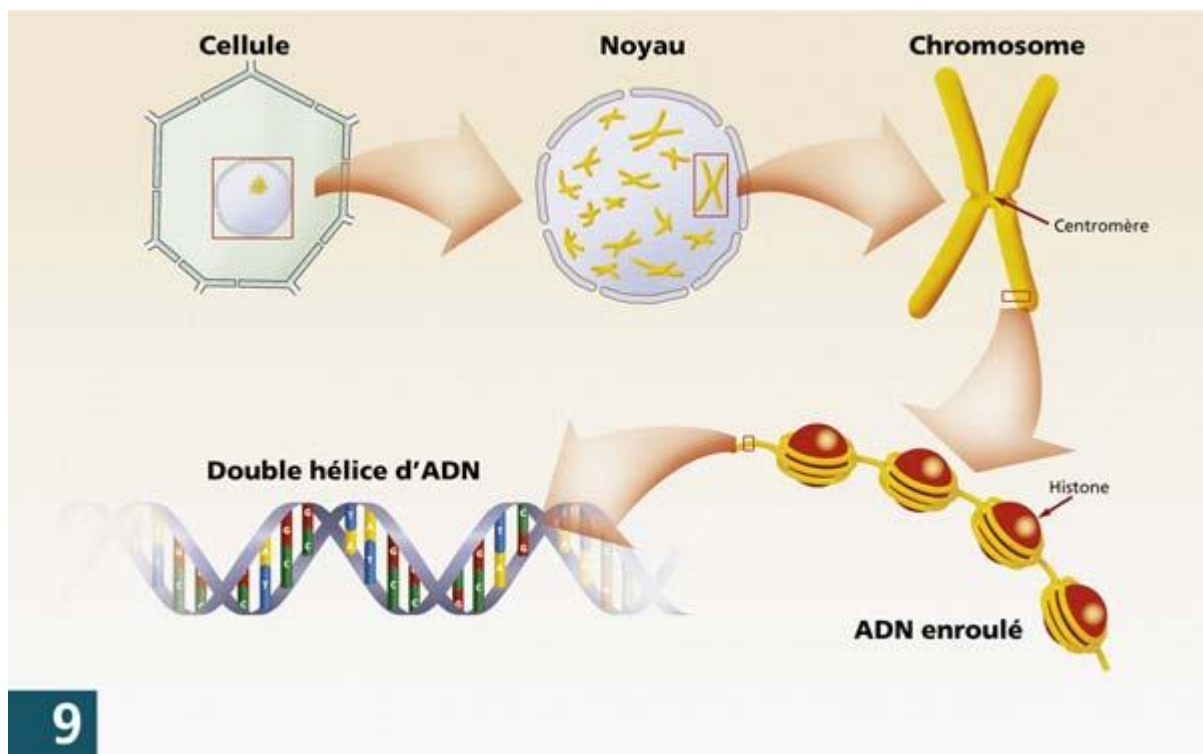
Les protoplastes sont des cellules débarrassées de la paroi pectocellulosique. Ils peuvent être obtenus à partir d'explants divers, c'est-à-dire de fragments prélevés sur les tissus d'une plante, de préférence des limbes de jeunes feuilles.

La fusion de protoplastes permet de créer de nouvelles variétés, d'introduire des caractères à hérédité cytoplasmique, et permet la transformation génétique par électroporation.

L'ensemble de ces techniques permet de régénérer des plantes entières. On peut parfois observer la formation d'un amas cellulaire, le cal. Ensuite une différenciation des tissus sera induite, et des phénomènes d'embryogenèse et d'organogenèse permettent d'obtenir une plantule.

2. L'information génétique des plantes

2.1. L'ADN : support de l'information génétique



L'information génétique détermine les caractères de la plante. Elle est transmise des parents à leurs descendants. L'information génétique, essentielle à la construction et au fonctionnement de la **cellule** et de la plante, se trouve principalement dans le noyau. Elle est la même dans toutes les cellules de la plante, qui la copient à chaque division cellulaire. L'expression de cette information est spécifique selon la fonction et le rôle de la cellule, mais l'information inutilisée reste présente.

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support universel de l'information génétique chez les êtres vivants. Il est constitué de deux chaînes enroulées en double hélice. Les deux brins de l'ADN sont l'assemblage de molécules élémentaires : les nucléotides. Chaque nucléotide comprend un sucre, le désoxyribose, un résidu phosphate et une des 4 bases azotées : adénine, guanine, cytosine, thymine. Les ADN sont les plus grosses molécules du monde vivant : l'ADN d'une cellule humaine, totalement déroulé, mesure 2 mètres de long.

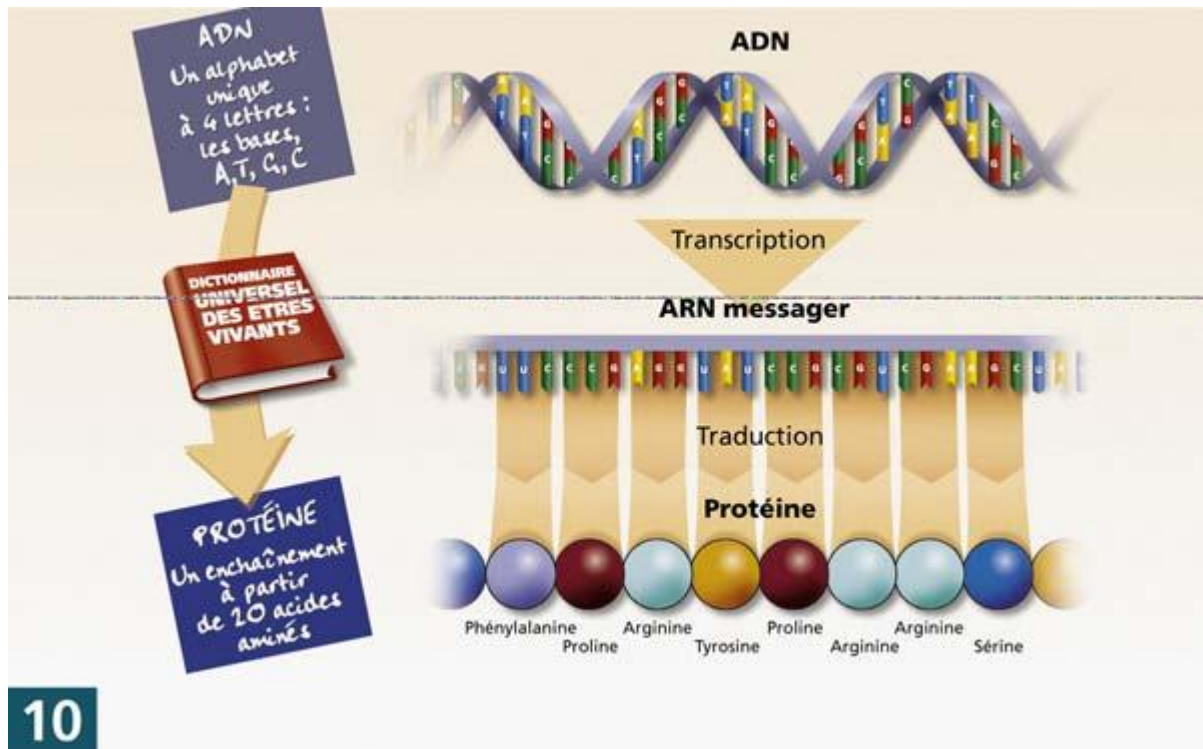
L'ADN enroulé et associé à des protéines, les histones, forme les chromosomes. Une cellule diploïde, notée $2n$, possède des chromosomes associés deux à deux : ce sont les paires de chromosomes homologues. Les cellules reproductrices sont haploïdes, notées n . Elles possèdent un seul exemplaire de chromosomes homologues. Le maïs possède 10 paires de chromosomes différents, soit 20 chromosomes, on note $2n = 20$.

La pomme de terre, espèce tétraploïde, possède 12 chromosomes différents présents en quatre exemplaires. La présentation des chromosomes d'une cellule, rangés par taille décroissante, constitue son caryotype.

Un gène est un fragment d'ADN qui correspond à un caractère héréditaire et constitue l'unité d'information génétique. L'ensemble des gènes d'un individu forme le génome. L'expression des caractères qu'ils gouvernent, telle qu'on peut l'observer, constitue le phénotype.

L'emplacement occupé par un gène sur le chromosome est le locus. On estime que le nombre moyen de gènes par plante est supérieur à 20 000.

2.2. Du gène à la protéine



Un alphabet unique à 4 lettres

Un gène est un fragment d'ADN qui comprend la séquence codant pour une protéine. L'ADN peut être considéré comme un long texte rédigé à l'aide de quatre lettres qui sont les quatre bases : adénine, thymine, cytosine et guanine (A, T, C, G). L'information génétique dépend de l'ordre des bases, c'est la séquence de l'ADN.

Ces bases sont complémentaires deux à deux et ne peuvent s'apparier qu'ainsi : adénine avec thymine, guanine avec cytosine. Ces liaisons sont responsables de la forme en échelle de l'ADN, les liaisons entre bases sont les échelons de la molécule d'ADN, qui s'enroule en hélice. Cette complémentarité entre les bases est également conservée lors de la réplication de l'ADN.

La synthèse d'un ARN messenger

L'ADN est situé dans le noyau, siège de l'information génétique. La synthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme au contact des ribosomes accolés au réticulum endoplasmique. Pour assurer la liaison entre les deux, il y a synthèse d'ARN messenger (acide ribonucléique). On parle de transcription pour caractériser la synthèse d'ARN à partir d'ADN.

Les ARN messagers sont constitués comme l'ADN par l'enchaînement de nucléotides. Une des

quatre bases est différente : l'uracile remplace la thymine. Ils sont simple brin, constitués d'une seule chaîne de nucléotides, contrairement à l'ADN. L'ARN messager passe à travers la membrane nucléaire et transporte dans le cytoplasme l'information qu'il porte. L'ARN messager sert de matrice à la production de protéines. C'est la **traduction**.

Un dictionnaire d'assemblage

Une protéine est formée par un enchaînement précis d'acides aminés. Il en existe 20 différents et de leur ordre dépendent les propriétés de la protéine. Il existe donc un dictionnaire d'assemblage qui permet, à partir de l'alphabet de l'ARN messager à 4 lettres, de composer les mots codant pour chacun des 20 acides aminés. C'est le code génétique. Chaque mot est composé de 3 bases : le triplet ou codon.

La redondance du code génétique

Il y a 64 triplets ou codons et 20 acides aminés. Ainsi plusieurs codons codent pour le même acide aminé : il y a redondance. D'autre part, 3 codons ne codent pas pour un acide aminé, mais commandent l'arrêt de la synthèse de la protéine, ce sont les codons-stop.

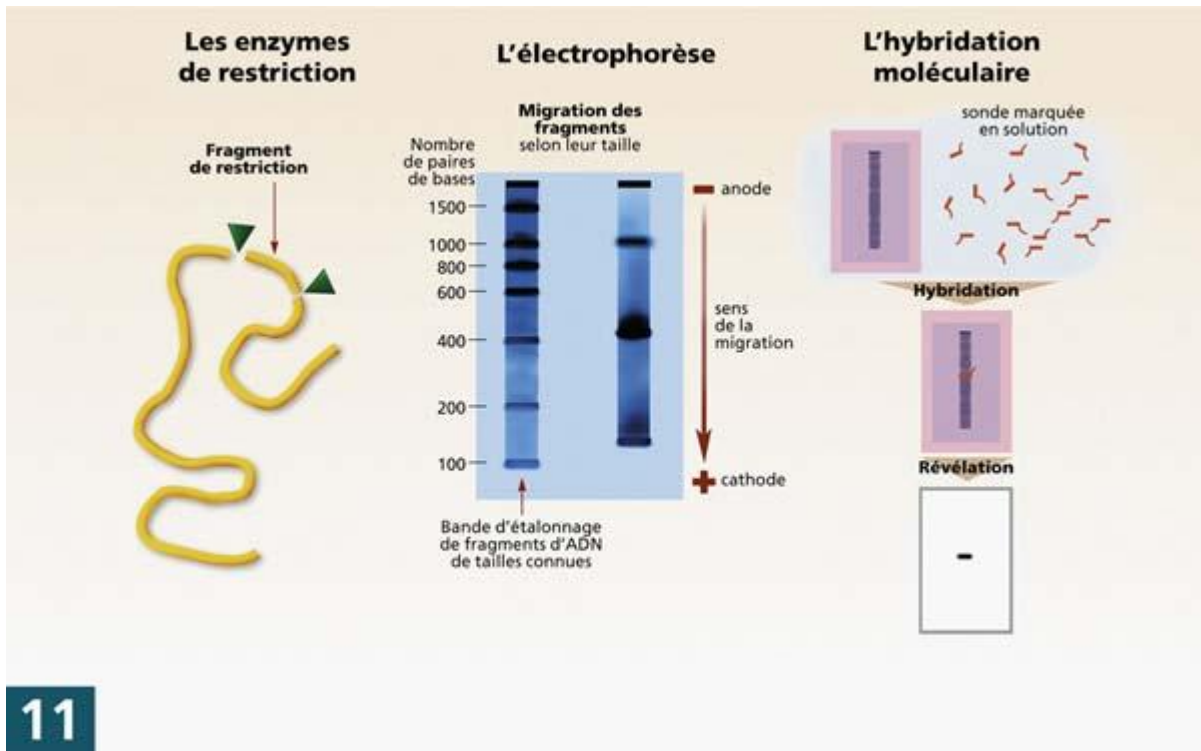
Le code génétique est non chevauchant : une base n'entre dans la composition que d'un seul codon. Le code génétique est ponctué : tous les codons sont contigus. Il n'y a pas de base entre deux codons qui n'entrerait pas dans l'un des deux.

Un langage universel

Le code génétique est commun à tous les êtres vivants, de la bactérie à l'homme, chez les animaux comme chez les végétaux : il est universel. Ceci signifie que lorsqu'un gène, issu d'un organisme codant pour un caractère particulier, est inséré dans un deuxième organisme, ce dernier sera capable d'exprimer la même protéine. Il parle le même langage et comprendra ces informations codées.

3. Les outils d'analyse du génome

3.1. La visualisation d'un fragment d'ADN



3.1.1. Les enzymes de restriction

Chaque enzyme de restriction reconnaît une séquence d'ADN qui lui est spécifique, le site de restriction. Elle coupe alors les deux brins de la molécule d'ADN. Les fragments d'ADN obtenus sont appelés **fragments de restriction**. Ils sont plus facilement utilisables et identifiables qu'une molécule d'ADN entière. Ces enzymes sont utilisées comme des ciseaux biologiques pour réaliser des constructions d'ADN recombiné, ainsi que pour l'analyse de l'ADN, notamment de sa variabilité. Elles sont d'utilisation simple.

3.1.2. L'électrophorèse

L'action d'une enzyme de restriction génère des fragments de restriction de tailles différentes. Ces fragments peuvent être séparés suivant leur taille sur un gel d'électrophorèse. Pour cela, on dépose l'ADN dans des encoches appelées puits, situées à l'extrémité du gel. Celui-ci est ensuite soumis à un champ électrique. Les molécules d'ADN migrent car elles sont chargées négativement. En passant à travers les mailles du gel, elles se séparent suivant leur taille. Ainsi, les molécules les plus grandes sont retardées par rapport aux petites.

La visualisation des fragments d'ADN après électrophorèse se fait par trempage du gel dans une solution de bromure d'éthidium. Cette molécule s'intercale entre les bases de l'ADN et a la propriété d'être fluorescente sous lumière ultraviolette.

Dans le cas d'ADN génomique, on génère une population de fragments, tandis que dans le cas d'ADN mitochondrial ou chloroplastique, on n'observe que quelques fragments de taille déterminée.

Après la migration, la taille des fragments est estimée par comparaison des distances de migration avec celles de fragments de tailles connues qui servent d'étalon.

Par comparaison des profils obtenus dans chaque puits, correspondant chacun à un individu, on peut mettre en évidence des différences entre les individus, c'est-à-dire visualiser le polymorphisme de leur ADN.

3.1.3. L'hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher un fragment d'ADN dans un mélange de fragments. Cette méthode d'étude repose sur deux propriétés de la molécule d'ADN :

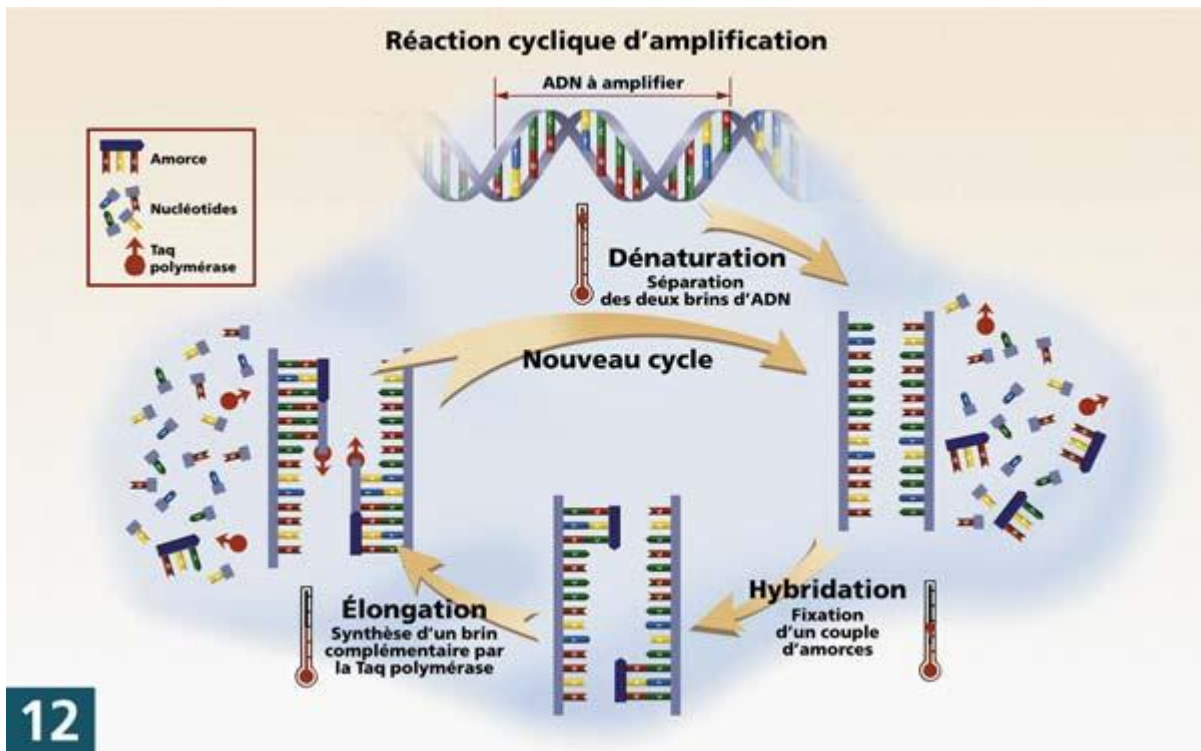
- L'ADN a la faculté de passer de façon réversible de l'état double brin à l'état simple brin, c'est la dénaturation des brins d'ADN ou inversement la renaturation. Sous l'action de la température et/ou d'agents chimiques, il y a rupture des liaisons entre les bases et séparation des brins.

L'abaissement de la température provoque la renaturation des brins, on parle d'hybridation.

- Cet appariement ne se fait pas au hasard, il suit la loi de complémentarité entre les bases de l'ADN. C'est la deuxième propriété des molécules d'ADN : il y a formation uniquement de paires A-T et G-C.

L'objectif de l'hybridation est de révéler si une molécule d'ADN contient une séquence ou un gène particulier. Pour ce faire, on utilise une sonde. C'est un fragment d'ADN correspondant à une séquence connue. La sonde est en général marquée soit radio activement, soit chimiquement. En utilisant le phénomène de renaturation et d'appariement des bases d'ADN, il est possible de repérer la molécule comportant la séquence complémentaire.

3.2. L'amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR



La PCR, réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction), est une technique permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon d'ADN, d'importantes quantités d'une séquence d'ADN spécifique. Cette amplification repose sur la répllication d'une matrice d'ADN double brin. Elle se décompose en trois phases : une phase de **dénaturation**, une phase d'**hybridation** et une phase d'**élongation**. Les produits de chaque étape de synthèse servent de matrice pour les étapes suivantes, ainsi on réalise une amplification exponentielle.

Applications

La PCR permet de multiplier de l'ADN en grande quantité, elle ouvre ainsi la voie à de très nombreuses applications :

** Le diagnostic. Par exemple, lorsque l'on transforme génétiquement des végétaux, il est important de déterminer si l'ADN transféré est intégré dans le patrimoine génétique de la cellule. La PCR permet de réaliser ce diagnostic rapide de présence éventuelle de l'ADN transféré, sur de faibles quantités d'ADN.

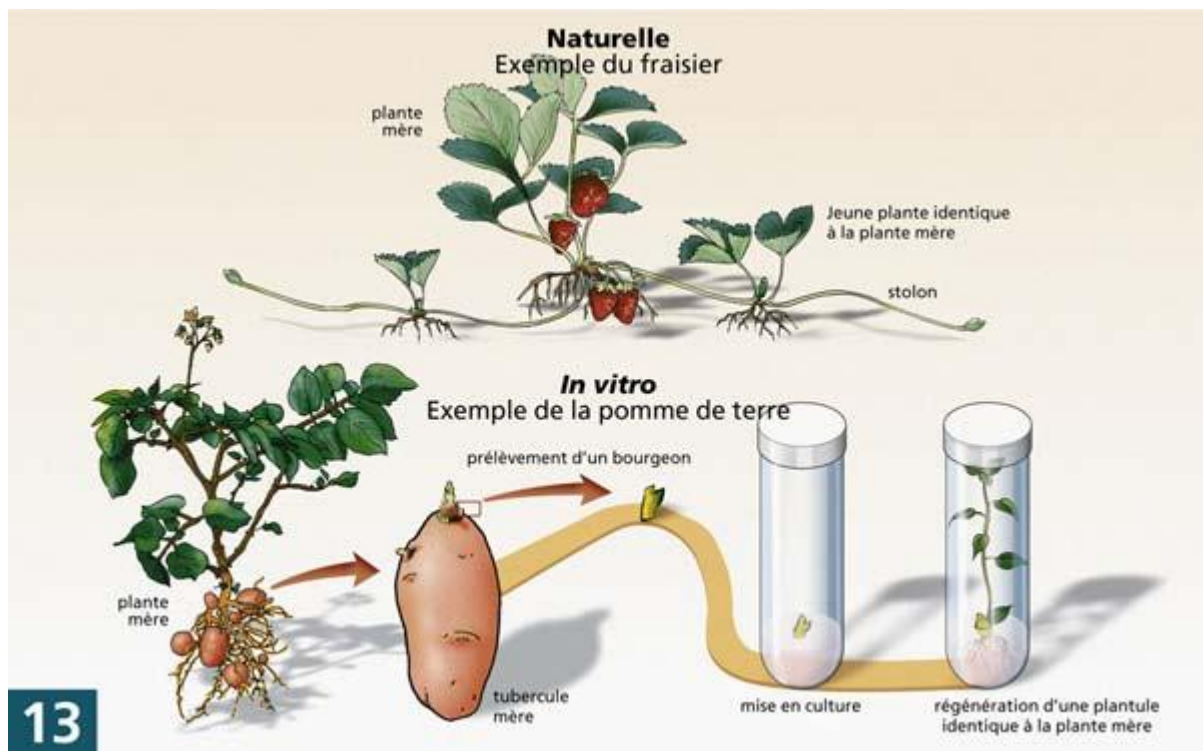
** Le marquage. La PCR par elle-même ne révèle pas de polymorphisme, mais elle

aboutit à la création de nouveaux types de marqueurs, qui révèlent un polymorphisme de fragment d'amplification. Ce sont des marqueurs simples d'utilisation et souvent très polymorphes.

** Le clonage et le séquençage de gènes sont également simplifiés par cette technique.

4. La maîtrise de la reproduction

4.1. La reproduction végétative



4.1.1. Naturelle

Certains végétaux se multiplient naturellement sans passer par la reproduction sexuée. Un nouvel individu se forme à partir d'un organe de la plante "mère" :

** La multiplication par stolons. Dans le cas du fraisier, il y a formation de tiges aériennes rampantes. De place en place, se forment des bourgeons et des racines qui sont le point de départ de nouveaux pieds.

** La multiplication par tubercules. Pour la pomme de terre, des tiges souterraines renflées par les réserves permettent d'obtenir une nouvelle plante par développement de bourgeons (les yeux, donnant des germes).

** La multiplication par rhizomes. Ce sont des tiges souterraines pouvant s'enraciner et donner une nouvelle plante.

** La multiplication par bulbilles, chez l'ail. Les bulbes secondaires, formés sur le côté du bulbe, sont capables de s'en détacher, puis de s'enraciner pour se développer en une nouvelle plante.

On appelle clones tous les individus nés d'un même organisme et possédant le même patrimoine héréditaire. Un tubercule, un stolon, un rhizome, un bulbille sont donc à l'origine d'un clone.

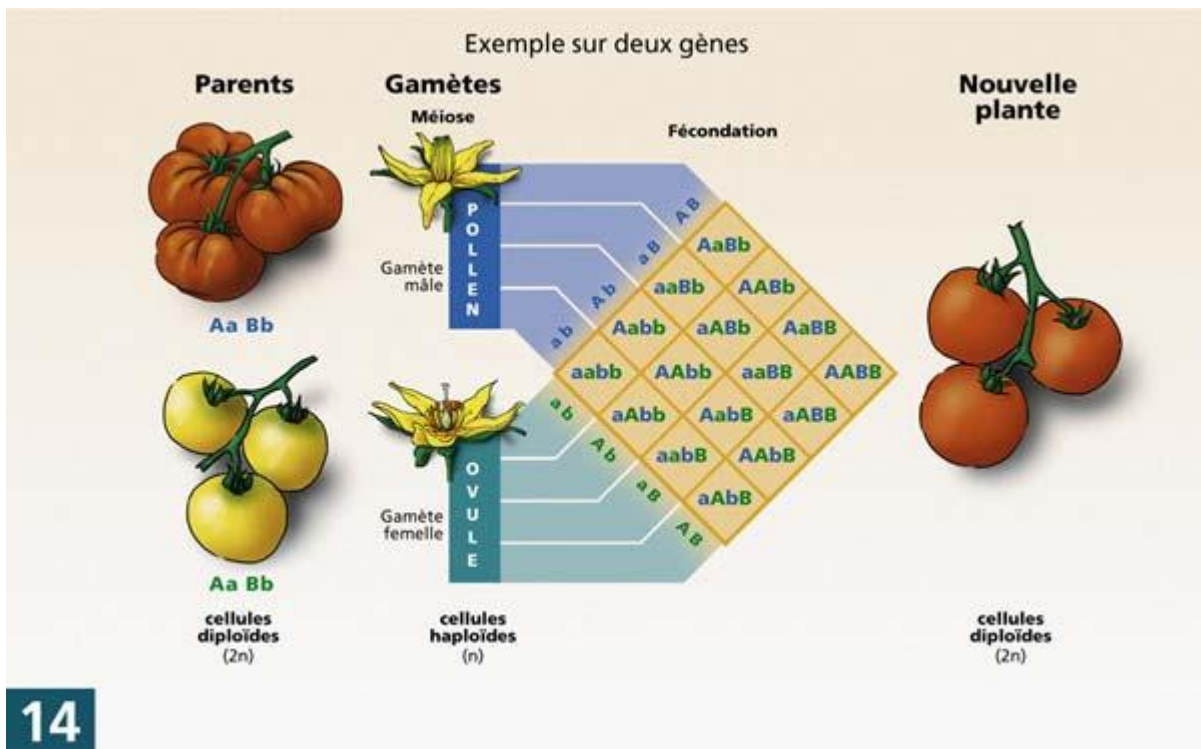
4.1.2. In vitro

C'est une méthode pour cultiver des plantes ou des cellules sur des milieux nutritifs artificiels. A l'origine, la méthode était destinée à régénérer certaines plantes infectées par des virus.

Maintenant, elle est également utilisée pour multiplier des plantes en grand nombre.

Chez la pomme de terre, par exemple, on peut repiquer des fragments de germe comportant un nœud muni d'une petite feuille et d'un bourgeon. La plante issue de la bouture peut être fragmentée à son tour et conduit à d'autres boutures. Un seul bourgeon permet de produire en moins d'un an 2 millions de plantes, toutes identiques à la plante mère.

4.2. La reproduction sexuée



Les descendants par croisement ne sont pas identiques à leurs **parents**. Cette diversité est une conséquence de la reproduction sexuée. Deux phénomènes biologiques fondamentaux caractérisent la reproduction sexuée et sont responsables du brassage de l'information génétique.

4.2.1. La méiose

La méiose assure la production de cellules reproductrices, les **gamètes**. Le pollen est le gamète mâle, l'ovule est le gamète femelle.

Dans le noyau des cellules, les chromosomes d'un individu sont associés par paires, ce sont des chromosomes homologues. L'individu est diploïde ($2n$). A l'issue de la méiose, les gamètes sont haploïdes (n), ils ne possèdent qu'un seul chromosome issu de chacune des paires de chromosomes homologues. La répartition de ces chromosomes étant aléatoire, les gamètes ne possèdent donc pas tous la même information génétique.

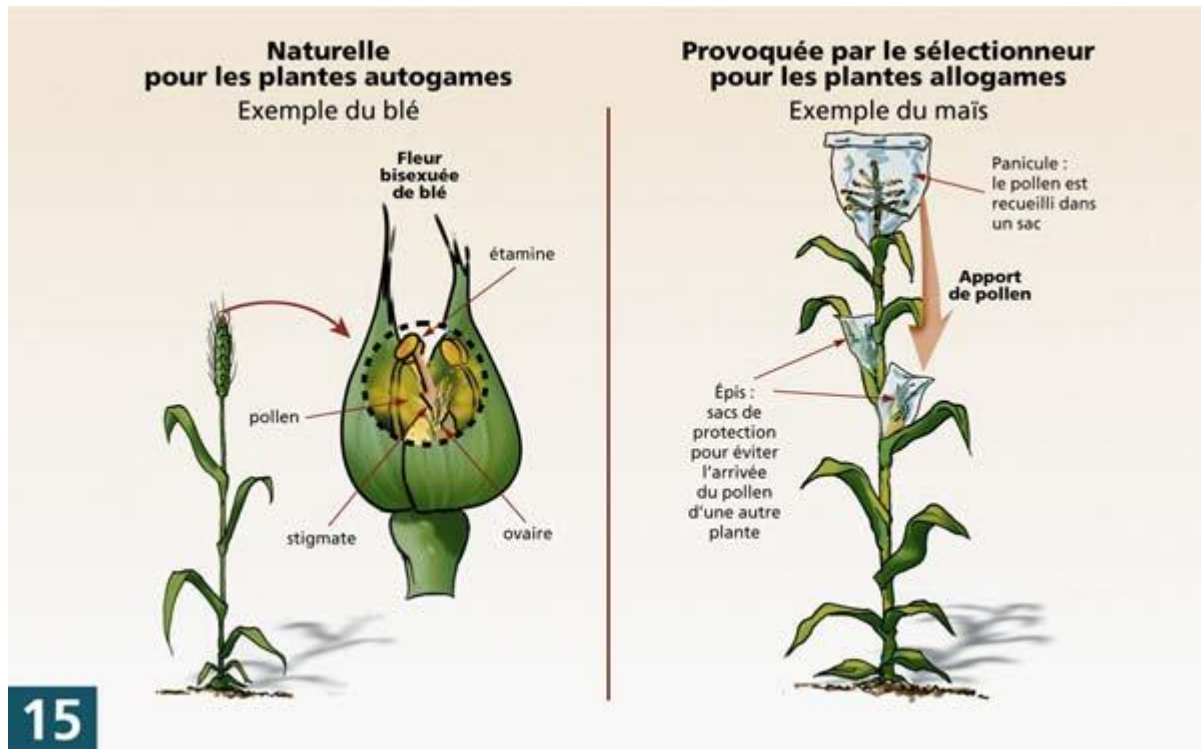
Une cellule diploïde possède deux copies d'un même gène, une sur chaque chromosome de la paire d'homologues : ce sont les allèles. Lors de la séparation des chromosomes homologues par méiose, il y a également séparation des allèles. Chaque gamète ne peut recevoir que l'un ou l'autre des deux allèles d'un même gène.

4.2.2. La fécondation

La fécondation est l'union d'un gamète mâle et d'un gamète femelle. Celle-ci réunit les deux noyaux haploïdes et donne naissance à un œuf diploïde. L'œuf, puis la **nouvelle plante**, possède la même quantité d'information génétique que ses deux parents et les nouvelles paires de chromosomes homologues présentent donc des allèles issus du pollen et des allèles issus de l'ovule.

Ce phénomène est responsable d'un deuxième brassage des chromosomes, car la fusion d'un pollen et d'un ovule se fait au hasard.

4.3. L'autofécondation



L'autofécondation est la fécondation d'un ovule par du pollen issu de la même plante. Les mécanismes qui interviennent sont le plus souvent d'ordre morphologique :

- ** contact direct des stigmates (organes femelles) avec des étamines (organes mâles), ou proximité des deux organes reproducteurs,
- ** protection vis-à-vis du pollen étranger, la fleur ne s'ouvrant pas ou peu.

4.3.1. Naturelle pour les plantes autogames

L'autofécondation est le mode de reproduction habituel des plantes autogames, par exemple du blé, de l'orge et du pois. Leurs fleurs sont bisexuées ou hermaphrodites, c'est-à-dire qu'elles possèdent des organes mâles et femelles dans la même fleur, et la maturité des gamètes est simultanée.

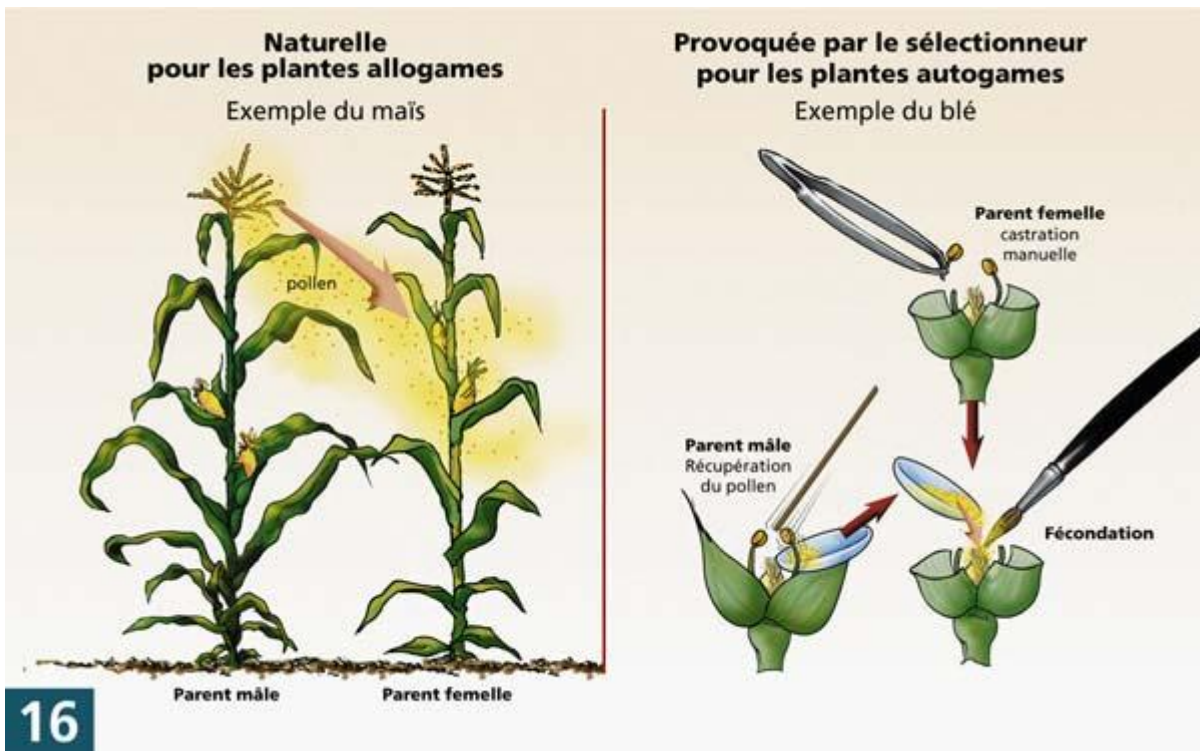
4.3.2. Provoquée par le sélectionneur pour les plantes allogames

Les plantes allogames s'autofécondent rarement. Cependant, le sélectionneur peut souhaiter provoquer l'autofécondation. Pour le maïs, cette pratique est facile, car les fleurs mâles et femelles sont séparées. Les inflorescences femelles sont placées sous sachet pour éviter toute pollution par du pollen étranger. Sur l'inflorescence mâle du même pied, le pollen est recueilli par la pose d'un sachet. Il est ensuite apporté sur les fleurs femelles.

Les individus se reproduisant uniquement par autofécondation sont homozygotes pour tous les gènes. Il y a donc stabilité des caractères au fil des générations, puisque tous les gamètes mâles et

femelles sont identiques. Ce sont des lignées pures.

4.4.L'hybridation



L'hybridation est la fécondation croisée de l'ovule d'une plante par du pollen d'une autre plante de la même espèce.

4.4.1. Naturelle pour les plantes allogames

Les plantes allogames privilégient la fécondation croisée. Elle a lieu pour les plantes qui ont des pieds mâles et femelles séparés, ce sont des espèces dioïques, comme l'asperge. La dissémination du pollen est réalisée par le vent et les insectes.

Chez certaines espèces dites monoïques comme le maïs, les fleurs mâles et femelles sont séparées, mais présentes sur un même pied.

La fécondation croisée est favorisée car les organes mâles et femelles d'une même plante ne viennent pas à maturité en même temps.

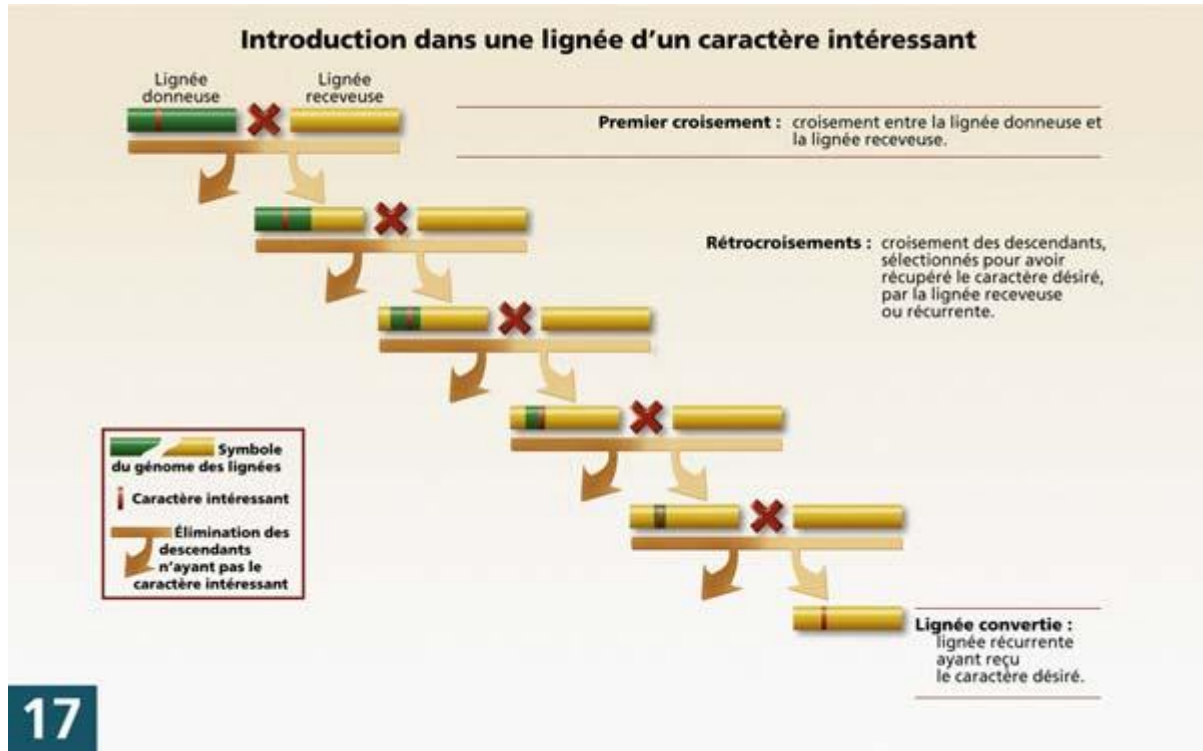
Enfin, pour des espèces où les fleurs sont bisexuées, il peut exister des barrières physiologiques ou physiques à l'autofécondation (luzerne, orchidées, primevère), imposant là encore la fécondation croisée.

4.4.2. Provoquée par le sélectionneur pour les plantes autogames

Le sélectionneur, lorsqu'il croise deux plantes pour associer des caractères intéressants, réalise une fécondation croisée ou hybridation.

Sur le blé par exemple, les deux géniteurs étant choisis, le sélectionneur va castrer manuellement les fleurs d'un épi, c'est-à-dire retirer toutes les étamines contenant le pollen. Cette plante constituera la plante femelle. Il récupère ensuite le pollen de l'autre parent, qu'il dépose sur le stigmate de l'épi femelle castré.

4. 5. Le rétrocroisement



4.5.1. Un cas particulier d'hybridation

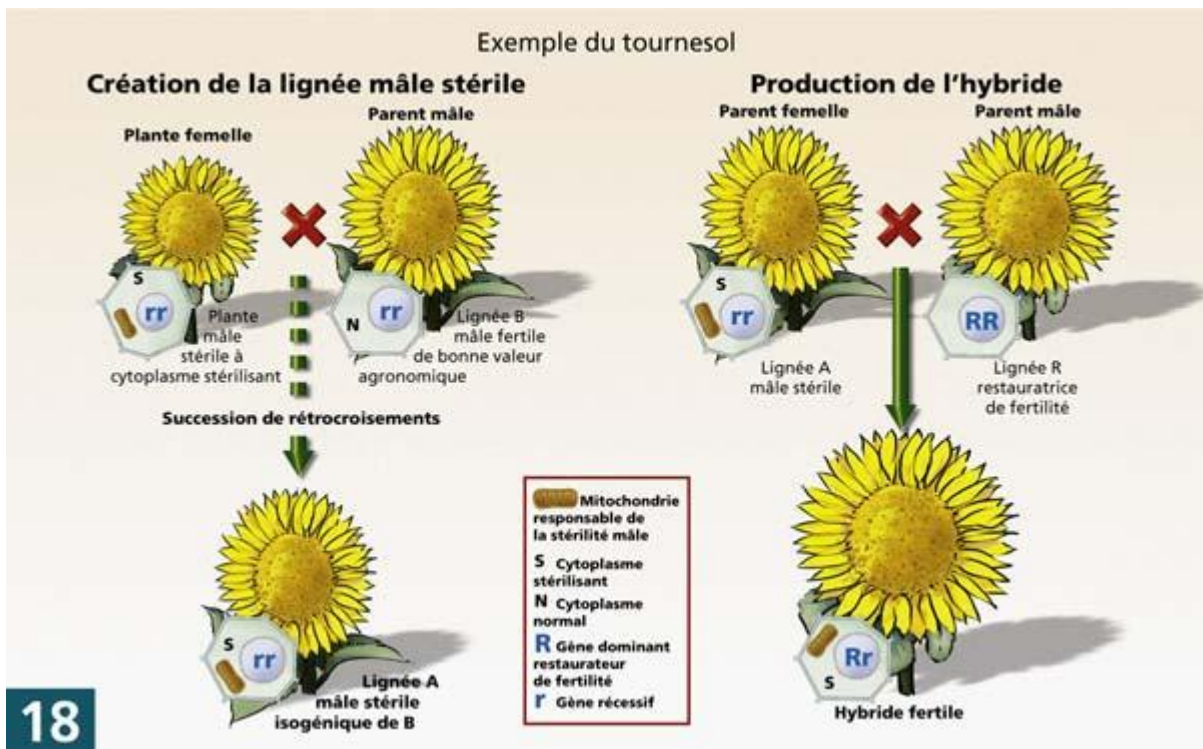
Un **caractère intéressant**, tel que la résistance aux maladies, la tolérance au stress, la stérilité, l'amélioration de critères de qualité, peut être présent dans une plante mais pas dans les lignées élites à la base des variétés commerciales. Le sélectionneur va chercher à créer une lignée identique à la lignée élite, mais possédant en plus ce caractère. Pour obtenir ce résultat, le sélectionneur procède par rétrocroisement, encore appelé back-cross.

Pour cela, il réalise une série d'hybridations entre la **lignée receveuse** ou élite, et la **lignée donneuse** du caractère. Les descendants sont ensuite croisés pendant plusieurs générations par la lignée receveuse ou récurrente. Ceci permet d'augmenter la part de la lignée élite dans le fond génétique des descendants, tout en veillant à conserver le caractère intéressant par élimination des individus n'ayant pas le caractère désiré. Le résultat du rétrocroisement est l'obtention d'une **lignée convertie**, c'est-à-dire quasiment identique à la lignée élite receveuse, mais contenant en plus le caractère désiré.

4.5.2. La génétique du rétrocroisement

Les descendants issus du premier croisement possèdent 50% du patrimoine génétique de la lignée élite et 50% du patrimoine du donneur. Lors des back-cross suivants, la proportion du génotype élite augmente, les individus obtenus au deuxième back-cross sont 75% élite et 25% donneur. Au bout du septième back-cross, la part de la lignée élite est de 96,88%, on estime alors que la lignée obtenue est suffisamment proche de la lignée élite. On tend vers l'obtention d'une lignée isogénique, en ne différant de la lignée élite que par un seul gène. restaurateur

4.6. La stérilité mâle cytoplasmique



Il est intéressant, en amélioration végétale, de créer des variétés de type d'hybride pour bénéficier de l'effet d'hétérosis. Pour produire une variété hybride, il faut disposer d'une lignée mâle et d'une lignée femelle. Pour obtenir la lignée mâle, il faut castrer la plante. Or la castration (manuelle ou mécanique pratiquée par exemple chez le maïs ou chimique pratiquée chez le blé) n'est pas toujours facile ou possible pour une production de semences à grande échelle.

Des mécanismes de stérilité de type génétique ou cytoplasmique ont été découverts. Ils se manifestent par une absence d'anthères, des anthères vides ou du pollen non viable. Cette stérilité est transmise à la descendance partiellement dans le cas d'une stérilité génique, ou totalement dans le cas d'une stérilité cytoplasmique. Très souvent, c'est une production de graines qui est recherchée pour la plante hybride. Dans ce cas, il convient de restaurer la fertilité. C'est le parent mâle de l'hybride qui aura cette fonction.

Cette stérilité est engendrée par une interaction entre des gènes nucléaires et le cytoplasme en particulier les mitochondries. Elle se manifeste quand un gène de stérilité récessif est à l'état homozygote (rr) dans un cytoplasme stérilisant S que l'on oppose au cytoplasme normal N.

4.6.1. L'exemple du tournesol

*** Création de la lignée mâle stérile**

Une source de stérilité mâle a été découverte pour le tournesol. Cette stérilité est apportée par le cytoplasme d'une plante mâle stérile et transmise automatiquement à sa descendance par le cytoplasme de ses ovules.

La lignée mâle fertile de bonne qualité agronomique B, est convertie en son homologue mâle stérile A, par une succession de rétrocroisements avec la plante mâle stérile découverte.

*** Production de l'hybride**

L'hybride est obtenu par croisement de la lignée mâle stérile A avec une lignée restauratrice de fertilité R. Cette lignée apporte le gène dominant (R) qui annule l'effet stérilisant du cytoplasme S de la lignée A. Elle permet ainsi la pollinisation et par conséquent la production de graines sur les plantes hybrides de tournesol.

Quelques notions sur la Biologie

Cette partie est un rappel de quelques notions de biologie, nécessaires à la compréhension de la suite de ce document. Les thèmes développés posent les fondements de la culture *in vitro*, présentent l'organisation de l'information génétique des plantes et les outils d'analyse du génome, et abordent la maîtrise de la reproduction sexuée.

1. LES FONDEMENTS DE LA CULTURE *IN VITRO*

1.1. La cellule végétale

1.2 Des applications de la culture *in vitro*

2. L'INFORMATION GÉNÉTIQUE DES PLANTES

2.1. L'ADN : support de l'information génétique

Trois génomes différents dans la cellule végétale

La structure d'un chromosome

2.2. Du gène à la protéine

L'assemblage des acides aminés

La structure finale de la protéine

3. LES OUTILS D'ANALYSE DU GÉNOME

3.1. La visualisation d'un fragment d'ADN

Description de la technique d'hybridation

Les sondes

3.2. L'amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR

La dénaturation

L'hybridation

L'élongation

4. LA MAÎTRISE DE LA REPRODUCTION

4.1. La reproduction végétative

4.2. La reproduction sexuée

Mécanisme de la méiose

Brassage interchromosomique

4.3. L'autofécondation

L'obtention d'une lignée pure, par autofécondation, à partir d'une plante hétérozygote

4.4. L'hybridation

L'hybridation interspécifique

Les variétés hybrides

4.5. Le rétrocroisement

4.6. La stérilité mâle cytoplasmique

Le maintien de la lignée mâle stérile

Le rôle des mitochondries

1.

Exploiter la Diversité

Les êtres vivants possèdent, selon leurs conditions et modes de vie, des gènes leur donnant des aptitudes particulières.

Ces caractères peuvent être très intéressants pour de nombreuses espèces cultivées. Les domaines d'application sont également très vastes : l'agriculture, l'alimentation, l'industrie, la santé...

Les nouvelles techniques de biotechnologie permettent de franchir les limites de la reproduction sexuée entre espèces et d'exploiter l'immense diversité génétique du monde vivant.

1. L'INTRODUCTION DE NOUVEAUX CARACTÈRES

2. LE SAUVETAGE D'EMBRYONS INTERSPÉCIFIQUES

3. LA FUSION DE PROTOPLASTES

3.1. L'obtention de protoplastes

3.2. L'hybridation somatique

3.3.1. Les hybrides somatiques retenus

3.3.2. Une application de la fusion de protoplastes

4. LA TRANSGÉNÈSE

4.1. Le génie génétique

4.1.1. La transgénèse : différentes stratégies

4.2. Les étapes de la transgénèse

4.2.1. La réalisation de construction génétique

4.2.2. La multiplication de la construction génétique : le clonage

4.2.3. L'utilisation d'*Agrobacterium*

4.3. La transformation biologique

4.4. Le transfert direct

4.5. L'obtention d'une variété OGM

4.5.1. La caractérisation moléculaire des transformants

4.5.2. La caractérisation biochimique des transformants

5. LES DOMAINES D'APPLICATION DE LA TRANSGÉNÈSE

6. LA RÉGLEMENTATION SUR LES OGM

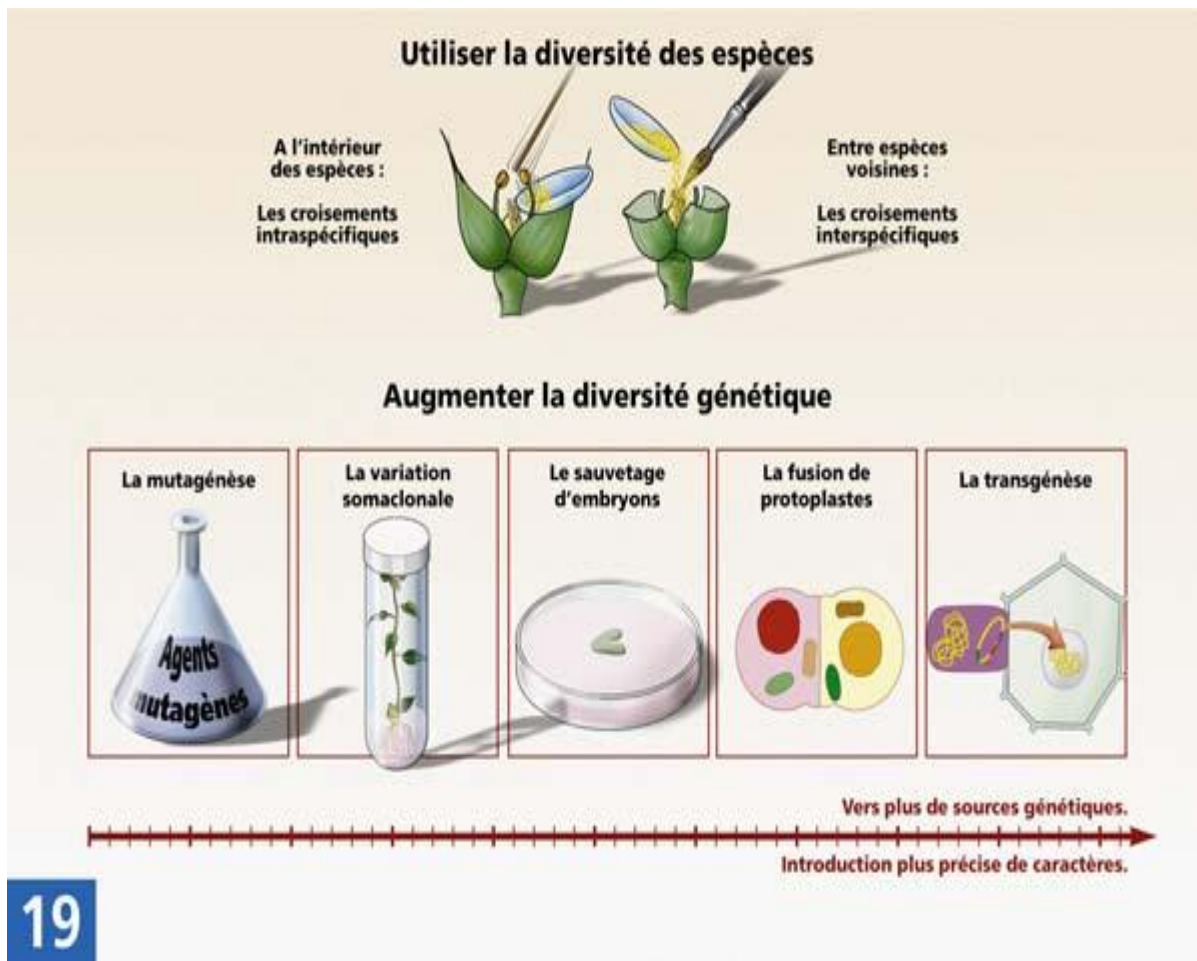
6.1. Les dispositifs d'évaluation et de contrôle des risques

6.2. Les démarches à suivre

6.3. La sécurité alimentaire et l'étiquetage

Exploiter la Diversité

1- L'introduction de nouveaux caractères



1. Utiliser la diversité de l'espèce et des espèces voisines

L'amélioration génétique d'une espèce cultivée repose sur l'exploration et l'utilisation de la diversité naturelle au sein de l'espèce afin d'associer des caractères intéressants. Toutefois, cette variabilité intraspécifique est limitée.

Ainsi, pour l'amélioration de caractères de résistance aux maladies, de rusticité, d'adaptation à certaines conditions de milieu, le sélectionneur a souvent recours à des croisements avec les formes sauvages voisines de l'espèce cultivée. Ces croisements interspécifiques sont utilisés chez des espèces comme le colza, le tournesol, le blé, la betterave, la tomate, le melon, le haricot, la laitue.... .

1.2. Augmenter l'accès à la diversité génétique

Parfois ces croisements se heurtent à des problèmes d'incompatibilité ou ne permettent pas toujours de travailler des caractères intéressants. Le sélectionneur dispose des techniques permettant de contourner ces difficultés :

- la mutagenèse et la variation somaclonale. Ces techniques sont peu utilisées car trop aléatoires,
- le sauvetage d'embryons interspécifiques. Cette technique permet d'élargir les croisements avec des espèces apparentées,
- la fusion de protoplastes. Cette technique permet la fusion de cellules entre des espèces plus éloignées,
- la transgénèse. Elle a pour but d'introduire dans une plante une information génétique définie, provenant d'espèces, de genres ou de règnes différents.

D'une technique à l'autre, de la mutagenèse à la transgénèse, le sélectionneur augmente la source des caractères transmissibles aux plantes en cherchant des gènes chez les êtres vivants de plus en plus éloignés génétiquement de l'espèce à améliorer, tout en introduisant ces caractères de façon plus précise.

**** La mutagenèse**

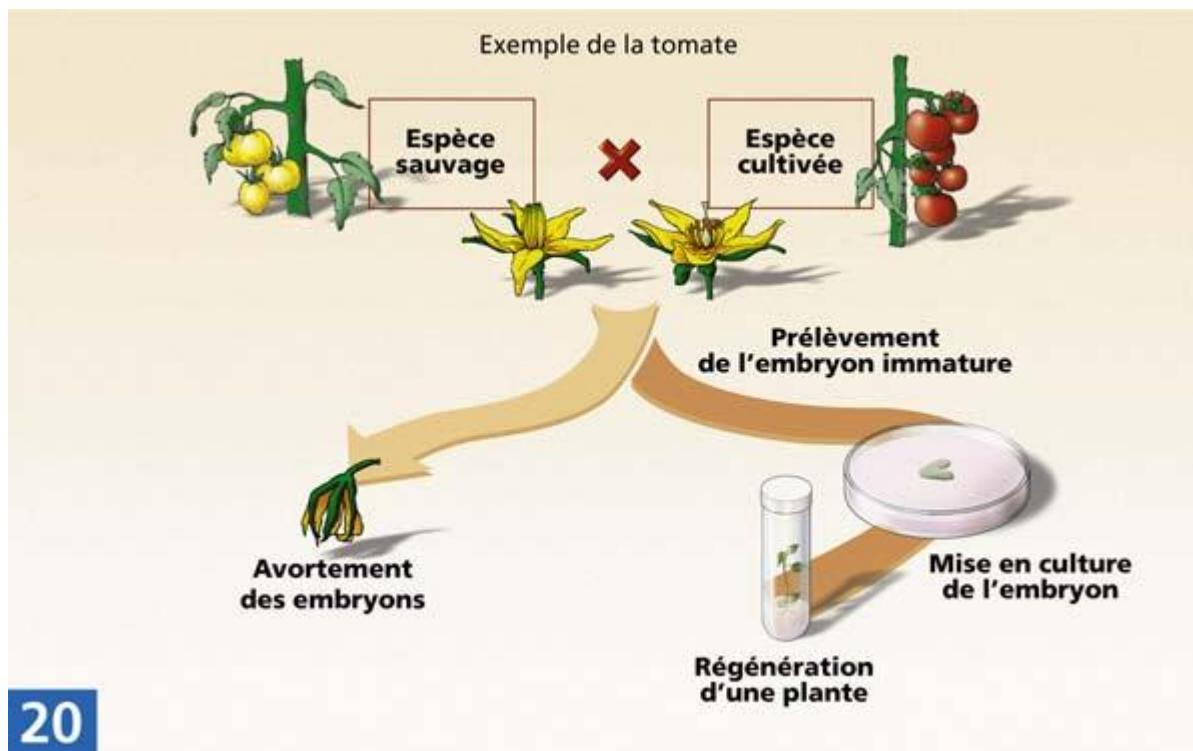
La mutagenèse consiste à provoquer artificiellement des modifications de l'ADN en utilisant des agents mutagènes : produits chimiques ou rayonnements ionisants.

Les principaux succès de cette méthode concernent l'amélioration des plantes autogames. Ainsi chez le riz, une amélioration de la qualité technique du grain a pu être obtenue.

**** la variation soma clonale**

La variation somaclonale est la modification observée chez certaines cellules, après un long cycle de cultures *in vitro* sans régénération. Elles ne sont plus alors identiques à la plante mère. Cette variation peut être due à une modification du génome nucléaire ou du génome des organites cytoplasmiques. Par cette méthode, on a pu obtenir une variabilité pour des caractères tels que la résistance aux herbicides, la résistance aux maladies, la tolérance au stress ou à la salinité.

2. Le sauvetage d'embryons interspécifiques



Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique après fécondation un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif. Cette technique de culture *in vitro* est appelée sauvetage d'embryons interspécifiques.

2.1. La technique de sauvetage d'embryon

L'avortement d'embryons issus de croisements interspécifiques est attribué à un développement retardé de l'albumen, par incompatibilité entre les tissus embryonnaires et maternels. La récupération de l'embryon doit être effectuée avant son avortement, entre 4 et 16 jours après la fécondation, selon les espèces. Il est souvent nécessaire de réaliser ce prélèvement sous une loupe binoculaire. C'est pourquoi on cherche à retarder cette opération pour disposer de matériel végétal plus facilement manipulable.

Les graines immatures sont désinfectées en surface et après dissection, les embryons sont transférés sur un milieu de culture solide approprié. Après deux semaines, les embryons ont généralement atteint le stade cotylédonaire.

Le transfert sur un milieu riche en hormones de croissance permet la production de plantes.

2.2. Exemple de la tomate

La tomate cultivée, *Lycopersicon esculentum*, du fait de son autogamie, possède une variabilité génétique faible. En revanche, les tomates sauvages possèdent de nombreux gènes de résistance aux maladies notamment l'espèce *Lycopersicon peruvianum*. Les barrières d'incompatibilité avec les espèces sauvages génétiquement les plus éloignées de la tomate cultivée ne peuvent être contournées que grâce au sauvetage d'embryons.

L'embryon est prélevé avant la phase de maturation de la graine.

Il est ensuite transplanté et cultivé sur un milieu artificiel riche en sucre, permettant la régénération d'une plante nouvelle. L'hybride obtenu est souvent croisé par le parent de l'espèce cultivée (rétrocroisement) et sa descendance est sélectionnée, pour fixer des caractères nouveaux et intéressants, tout en éliminant les caractères indésirables issus de l'espèce sauvage.

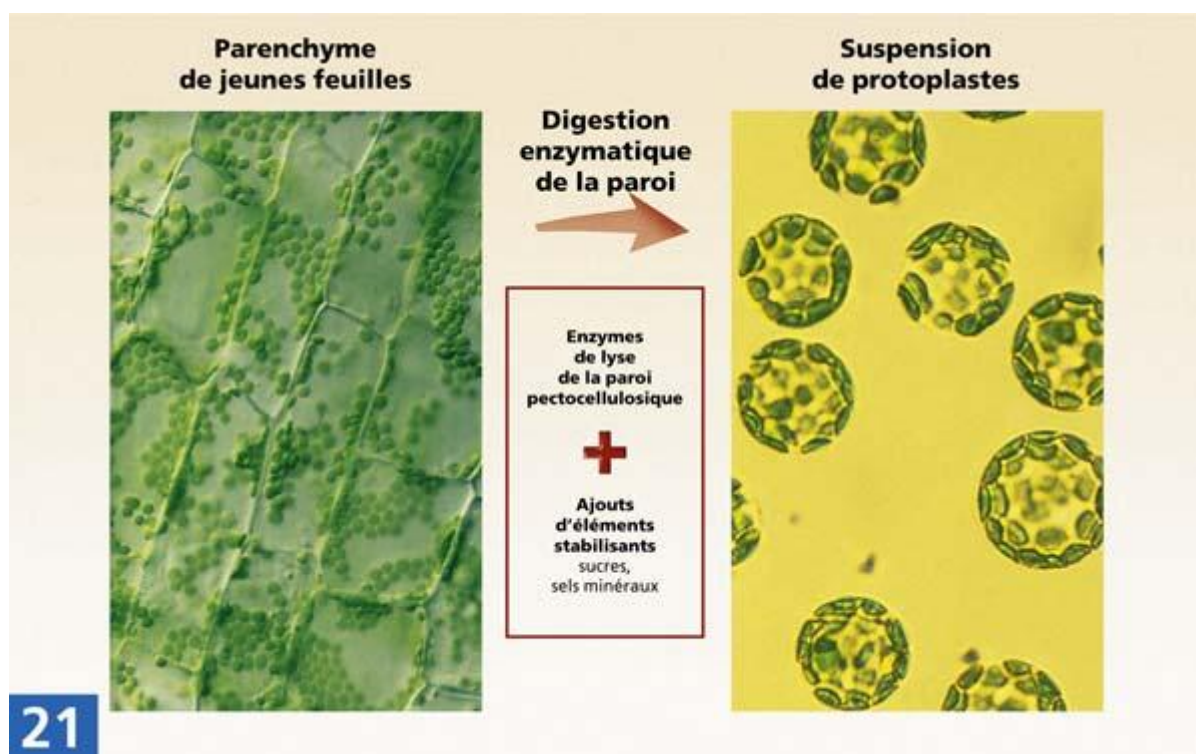
2.3. Autres exemples d'application

- **La courgette** est une espèce fortement attaquée par l'oïdium, les virus de la mosaïque du concombre et de la mosaïque de la pastèque. Les variétés cultivées, *Cucurbita pepo*, sont insuffisamment résistantes à ces parasites. Des croisements avec des espèces sauvages américaines résistantes, *Cucurbita okechobeensis* et *Cucurbita ecuadorensis*, ont été réalisés grâce au sauvetage des embryons immatures, rendant ainsi possible l'amélioration de la résistance aux maladies des variétés cultivées.

- **La laitue**, *Lactuca sativa*, est une espèce sensible au brémia. Le croisement avec deux espèces sauvages, *Lactuca virosa* et *Lactuca saligna*, possédant des gènes de résistance intéressants est difficile à réaliser. Le sauvetage d'embryons interspécifiques a permis d'augmenter considérablement la réussite de ces croisements.

Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique après fécondation un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif. Cette technique de culture *in vitro* est appelée sauvetage d'embryons interspécifiques.

3. La fusion de protoplastes



3.1. L'obtention des protoplastes

La présence de la paroi pectocellulosique des cellules est une des barrières aux échanges d'information génétique. On peut séparer les cellules d'un tissu végétal grâce à l'action d'enzymes généralement extraites de champignons, qui dégradent la cellulose et les matières pectiques de la paroi. Des agents stabilisants sont ajoutés au milieu pour empêcher l'éclatement de la cellule. On obtient ainsi des cellules « déshabillées », qui deviennent sphériques : les protoplastes. Ces derniers peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu végétal, mais ce sont généralement les parenchymes des jeunes feuilles qui sont utilisés pour leur préparation.

A partir de ces protoplastes, il est possible d'obtenir de nouvelles plantes. Si les conditions de milieu sont favorables, la paroi végétale se reconstitue. Les organites cellulaires se réarrangent et les cellules entrent en division. Elles donnent ainsi naissance à des microcolonies, puis des cals, amas de cellules indifférenciées. Transférés sur un milieu de régénération, les cals se développent en embryons somatiques qui donneront des plantules.

S'il est apparemment possible d'obtenir des protoplastes chez toutes les espèces végétales, leur culture puis la régénération d'une plante entière à partir des protoplastes posent encore de nombreuses difficultés et constituent une limite de cette technique. Il semble notamment que les

monocotylédones soient plus récalcitrantes vis-à-vis de la culture des protoplastes que les dicotylédones.

**** Applications**

- L'hybridation somatique. La propriété la plus importante des protoplastes est leur capacité à fusionner entre eux lorsqu'ils sont placés dans un milieu approprié. Cette technique permet de surmonter les barrières liées à la reproduction sexuée et de créer de nouvelles combinaisons entre noyau et cytoplasme.

- La transformation génétique. Du fait de l'absence de la paroi pectocellulosique,

**** Les agents stabilisants**

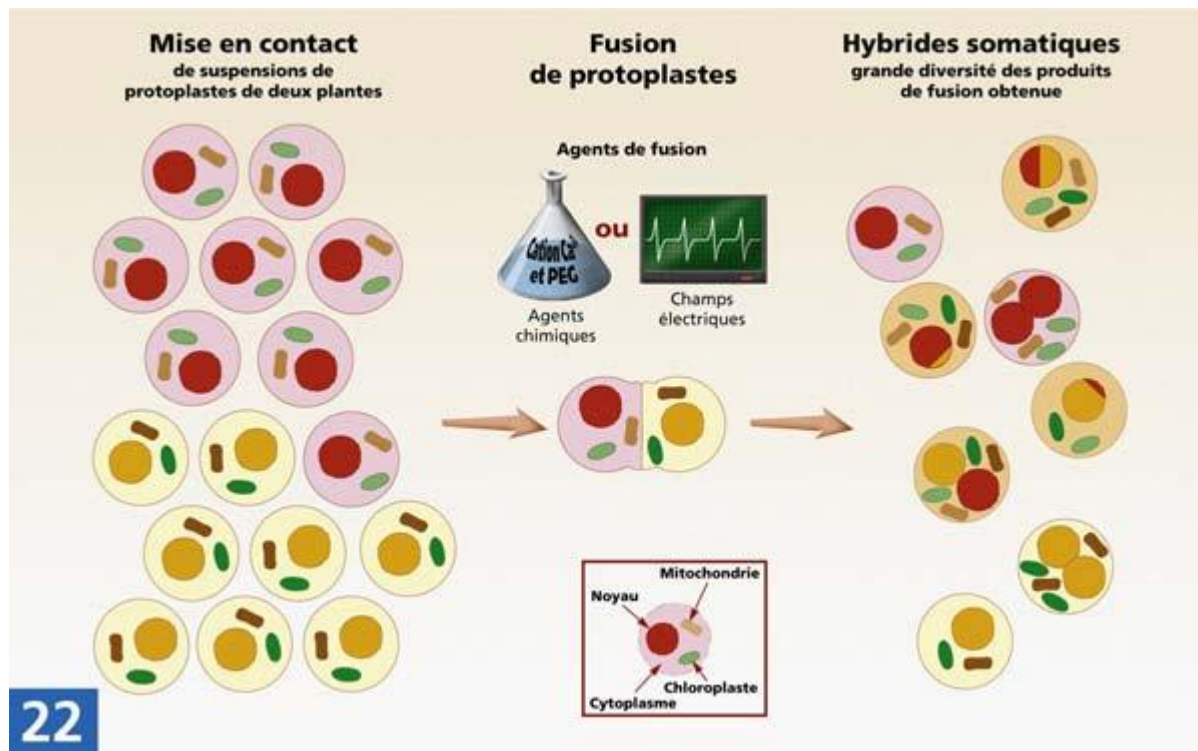
Ordinairement, l'appel d'eau provoqué par le potentiel osmotique de la vacuole de la cellule est contrebalancé par la paroi végétale. La suppression de la paroi doit donc être compensée par l'adjonction dans le milieu d'agents plasmolysants, qui abaissent le potentiel osmotique, tels que des sucres ou des sels minéraux en concentrations déterminées.

**** Les techniques de fusion de protoplastes**

- 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. L'introduction directe de l'ADN dans les cellules est facilitée.

3.2. 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). 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.

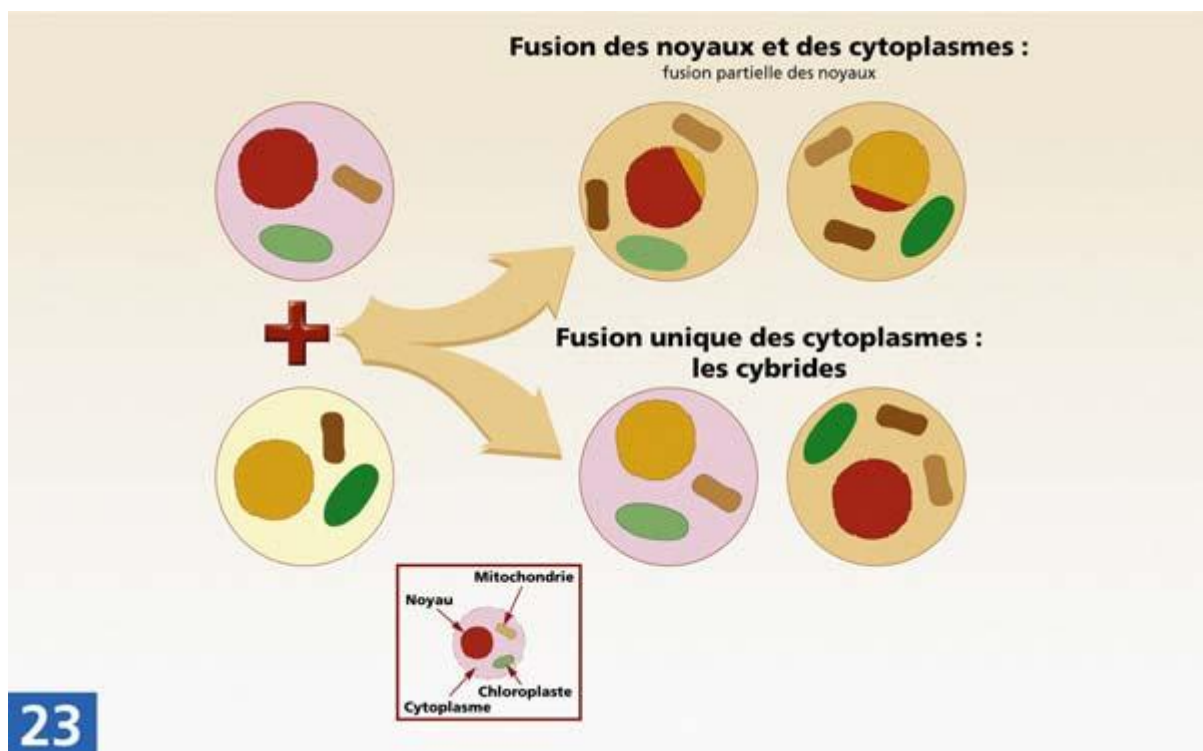
** Applications pratiques

- 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 pomate. 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.

3.2.1. Les hybrides somatiques retenus



Lors de la fusion, tous les échanges sont possibles entre deux protoplastes. On peut ainsi obtenir des degrés de fusion très variables :

3.2.1.1. Fusion des noyaux et des cytoplasmes

Lorsque la fusion des noyaux a lieu, il peut y avoir une recombinaison plus ou moins importante entre les chromosomes des deux parents. Ce phénomène peut être utilisé pour transférer des gènes nucléaires.

On cherchera notamment à obtenir des hybrides somatiques asymétriques, où seuls quelques

fragments d'ADN du parent donneur seront introduits dans l'espèce receveuse. En effet, les cas de fusion importante de génomes entre espèces conduisent à des plantes souvent stériles comme la tomate. Pour favoriser ce transfert partiel, l'ADN du parent donneur est déstabilisé par irradiation ménagée des protoplastes (rayons X ou Y) avant la fusion.

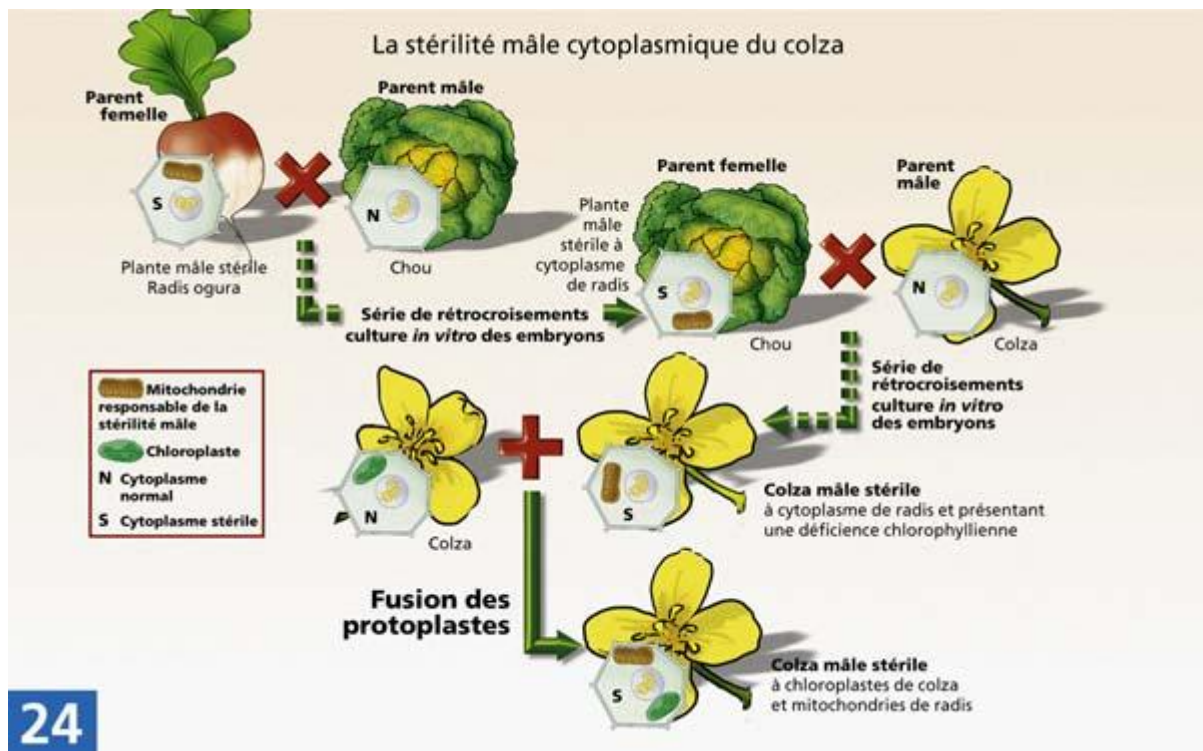
3.2.1.2. Fusion unique des cytoplasmes : les cybrides

Très souvent, la fusion des noyaux n'a pas lieu et au cours des divisions successives, il ne subsistera que l'un des noyaux parentaux. Celui-ci sera associé à un cytoplasme composite ou recombiné. Il contient les organites cytoplasmiques de l'un ou l'autre parent.

On constate souvent une recombinaison des mitochondries. En revanche, les chloroplastes de l'un des deux parents sont souvent éliminés. Il y a alors modification des relations nucléo-cytoplasmiques. L'obtention de ces cybrides peut être également provoquée.

On utilise dans ce cas des doses létales d'irradiation pour les cellules du parent donneur, afin d'inactiver complètement le noyau. Seuls seront transférés ses mitochondries et ses chloroplastes. Le parent receveur peut en plus être traité à l'iodo-acétate, entraînant le blocage de ses organites. Ainsi, les cybrides issus de la fusion seront constitués du noyau du parent receveur et des organites du parent donneur. Les caractères sous la dépendance de l'ADN mitochondrial ou chloroplastique ne sont pas à négliger. Ainsi, la stérilité mâle cytoplasmique est un caractère résultant de l'interaction noyau-mitochondrie. On peut citer également la résistance aux herbicides qui est codée par l'ADN chloroplastique.

3.2.2. Une application de la fusion de protoplastes



3.2.2.1. Une application de la fusion de protoplastes

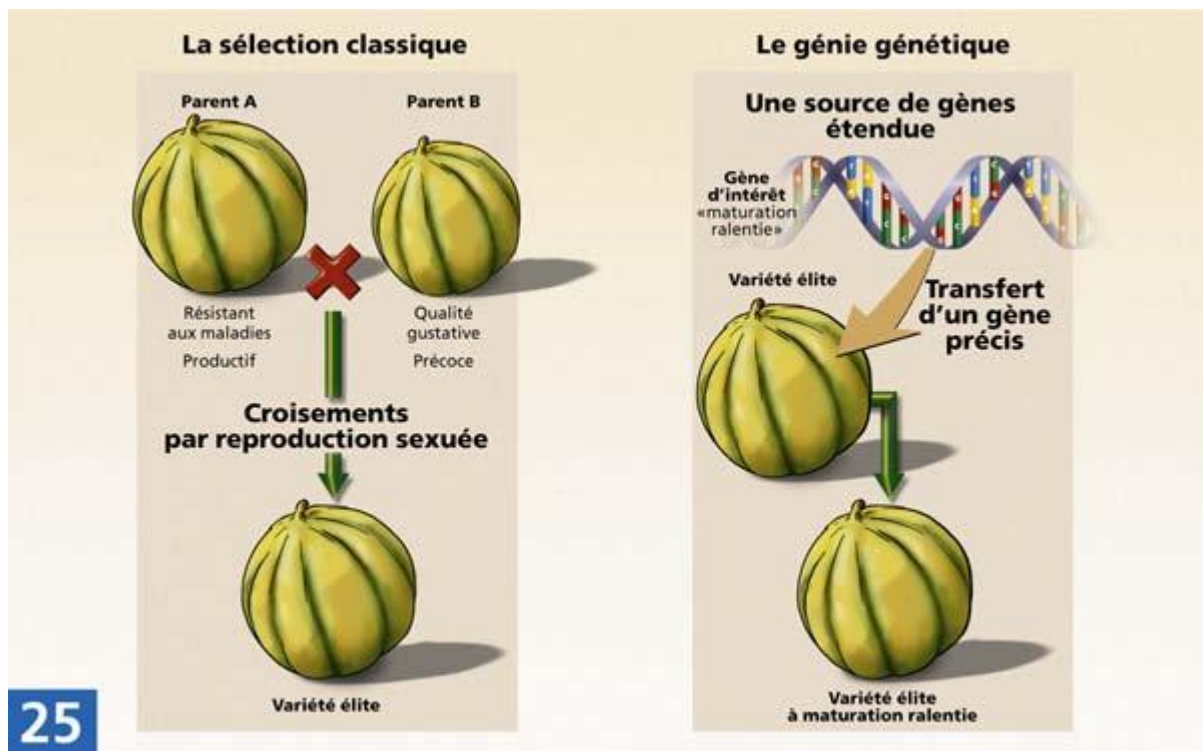
Le colza *Brassica napus* est issu d'un croisement naturel entre la navette *B. campestris* et le chou *B. oleracea*. L'espèce *Brassica napus* présente un fort hétérosis. Ainsi, il est apparu nécessaire de modifier la biologie florale, afin de mieux contrôler la reproduction sexuée, en vue de l'obtention de l'hybride. Des travaux ont été engagés sur la mise au point d'un système de stérilité mâle cytoplasmique. Chez une variété de radis japonaise, il a été découvert par Ogura en 1968 une stérilité mâle spontanée, contrôlée par le cytoplasme. Les chercheurs ont alors supposé qu'une plante qui aurait le noyau, les chloroplastes du colza, et les mitochondries du radis serait un colza mâle stérile. Pour obtenir ce colza, des techniques de fusion de protoplastes ont été mise en œuvre. Ceci s'est déroulé en deux étapes :

- Introduction dans le colza de la stérilité mâle du radis par voie sexuée. La stérilité mâle du radis, introduite au départ dans le chou, a été transférée ensuite dans le colza par une série de

rétrocroisements. On dispose ainsi de colzas mâles stériles, à cytoplasme de radis Ogura. Toutefois, les plantes obtenues présentaient des défauts de verdissement et une absence de nectaires nécessaires à une pollinisation réalisée presque exclusivement par les abeilles du fait de l'absence de chloroplastes dans le colza obtenu.

- Fusion de protoplastes entre ces hybrides et des colzas normaux. Elle a été réalisée en vue de sélectionner des régénérants à chloroplastes de colza, mais ayant des mitochondries recombinées, responsables de la stérilité mâle cytoplasmique.

4. La transgénèse



4.1. Le génie génétique

Le génie génétique désigne l'ensemble des techniques permettant d'introduire et de faire exprimer dans un organisme vivant un ou des gènes provenant de n'importe quel autre organisme. Les organismes ainsi obtenus sont dits Organismes Génétiquement Modifiés (OGM). On distingue les techniques de biologie moléculaire qui permettent de préparer les séquences d'ADN qui seront introduites, on parle de construction génétique, et les techniques de transgénèse qui permettent de transférer le gène. Plusieurs découvertes scientifiques ont permis d'aboutir à l'obtention de la première plante transgénique en 1983. La compréhension des mécanismes responsables de la galle du collet, maladie connue depuis l'antiquité, a permis la mise en évidence d'un transfert génétique naturel. Elle est à l'origine des techniques de transformation génétique utilisées aujourd'hui. La transgénèse permet d'apporter des solutions à des problèmes très variés.

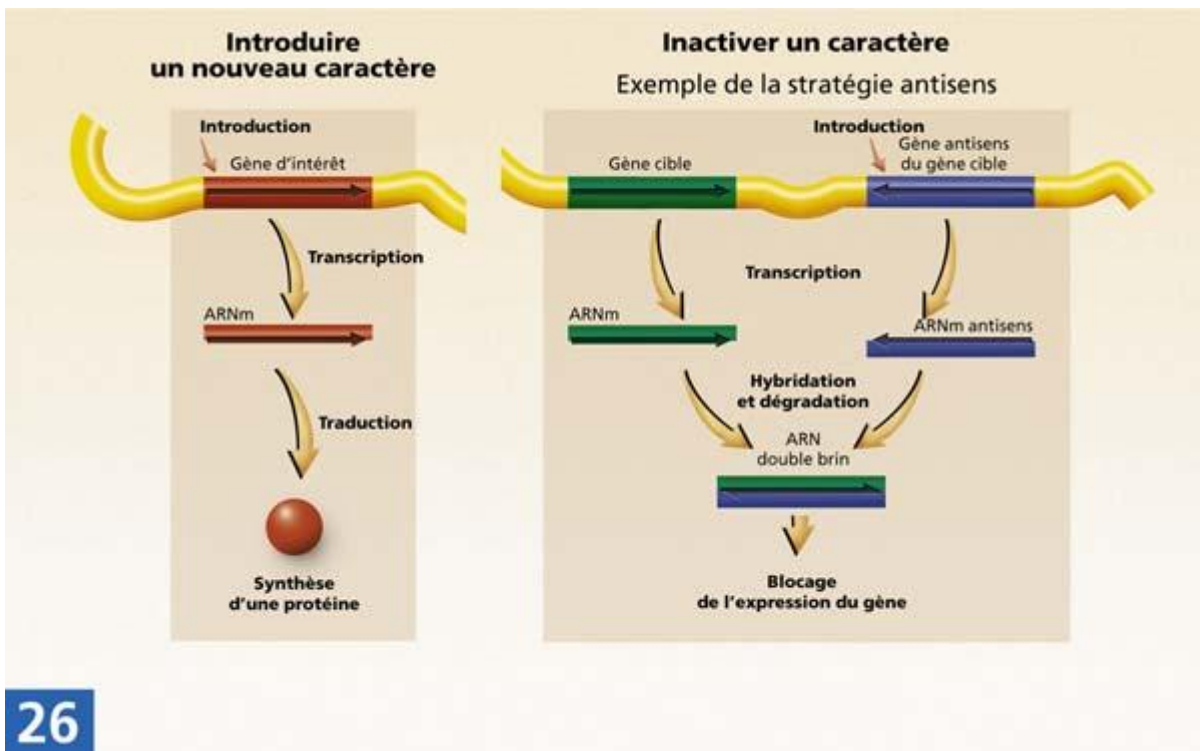
Ils touchent aussi bien l'agriculture, l'amélioration des qualités alimentaires, la santé, l'industrie ou l'environnement. Ce chapitre montre la diversité des espèces concernées et donne un aperçu des améliorations possibles.

Les deux principales caractéristiques du génie génétique en comparaison de la sélection classique basée sur la reproduction sexuée sont :

- Une source de gènes étendue. On peut franchir la barrière des espèces, des genres et des règnes. Ainsi, il est possible d'introduire des caractères qu'il ne serait pas possible d'introduire par sélection classique.

- Le transfert d'un gène précis. Elle permet de transférer le seul gène désiré et non de transférer plusieurs gènes comme lors de la reproduction sexuée.

4.1.1. La transgénèse: différentes stratégies



Introduire un nouveau caractère

C'est un cas où le transfert de gènes s'accompagne d'un transfert de caractère. Une copie du gène d'intérêt est introduite dans la plante. Son expression, par l'intermédiaire d'un ARN messager, entraîne la production d'une protéine, responsable du nouveau caractère.

Les exemples dans ce domaine sont nombreux : introduction d'un gène de résistance à des insectes, à des pathogènes, à des herbicides, modification de la composition des graines, production de molécules d'intérêt industriel ou pharmaceutique.

Inactiver un caractère

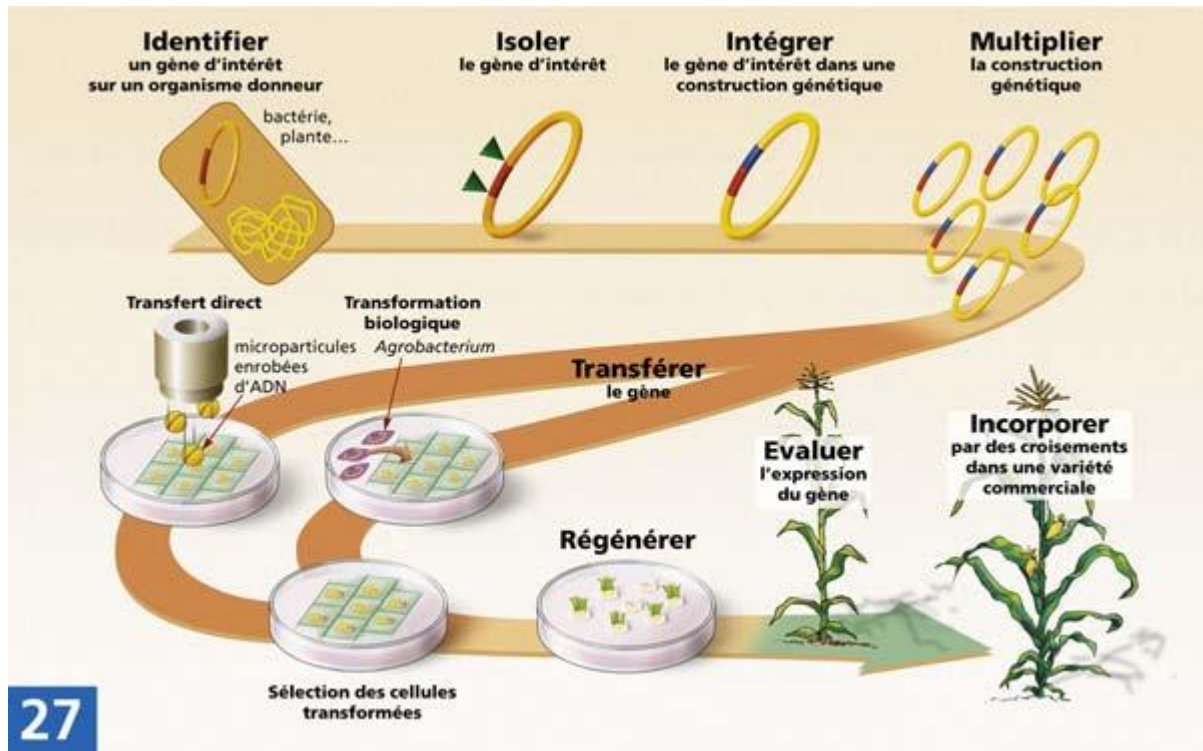
Dans ce cas, il n'y a plus à proprement parler de transfert de gènes, on agit sur l'expression d'un gène déjà présent dans la plante.

La **stratégie antisens** est la voie la plus couramment utilisée.

Elle consiste à bloquer l'expression d'un gène cible. Une copie « inversée » de ce gène est introduite, d'où le nom de la technique. Les ARN messagers (ARNm) produits par la copie originelle du gène et par celle introduite sont complémentaires. Ils s'hybrident donc et forment une molécule d'ARN double brin. Cette molécule aberrante est dégradée. Ainsi l'expression du gène est bloquée et le caractère ne s'exprime plus. Cette technique a permis d'obtenir des espèces végétales à teneur en lignine réduite, des tomates et des melons à maturation retardée, ou des pommes de terre contenant moins d'amidon.

Deux autres techniques permettent également d'inactiver un caractère. L'une repose sur l'introduction dans la plante d'un gène codant pour un ribozyme. Ce sont des molécules d'ARN enzymatiques. Ces molécules d'ARN synthétisées possèdent une séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible à inactiver, le ribozyme s'hybride à cet ARN messager et coupe spécifiquement l'ARN. Dans ce cas également, le caractère ne s'exprime pas.

4.2. Les étapes de la transgénèse



Etape 1 : Identifier, isoler, intégrer et multiplier un gène d'intérêt

La première étape est l'identification d'un caractère que l'on veut introduire dans la plante, comme par exemple des caractères de qualité nutritionnelle, la résistance à certains insectes, à certaines maladies, à des herbicides, etc. Le gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant, plante, animal ou bactérie puisque le code génétique est universel. Il doit ensuite être isolé de l'organisme donneur. Il est intégré dans une construction génétique associant souvent un gène marqueur. Ce gène marqueur permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt. La construction est ensuite multipliée (clonée) afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN pour son introduction dans les cellules végétales que l'on veut transformer.

Etape 2 : Transférer le gène

Il y a plusieurs méthodes pour introduire un gène dans une cellule :

- La transformation biologique.

Cette technique utilise une bactérie du sol, *Agrobacterium*, qui a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante, afin de la parasiter. Ainsi, une construction génétique introduite dans la bactérie (rendue avirulente au préalable) sera transférée dans la plante

et intégrée à son génome. C'est la technique la plus couramment utilisée.

- **Le transfert direct.**

Cette technique fait intervenir :

- soit une projection d'ADN dans les cellules de la plante par l'utilisation d'un canon à particules qui projette dans les cellules des microparticules enrobées d'ADN (biolistique),
- soit l'introduction d'ADN dans des protoplastes, par action d'un agent chimique ou d'un champ électrique (électroporation).

Les cellules issues de différents types de tissus végétaux peuvent être soumises à la transformation. Selon les espèces, ce seront des disques foliaires, des sections de tige, des cotylédons, des embryons, des microspores ou des protoplastes. Par exemple, chez le tabac et la tomate, on utilise des disques foliaires ; chez la pomme de terre, la transformation génétique peut se faire sur des protoplastes.

Etape 3 : Régénérer et évaluer les plantes transformées

Après sélection des cellules transformées, il faut régénérer les nouvelles plantes transgéniques. Les cellules transformées se développent d'abord en cals, larges amas de cellules indifférenciées. Après quelques semaines, on observe le développement de pousses. Elles sont alors placées dans un nouveau milieu de culture permettant le développement des racines. Quand les racines sont suffisamment développées, les plantules sont repiquées en pot et acclimatées en serre. La régénération *in vitro* des cellules transformées est une étape difficile à maîtriser. Aussi, le génotype, le type de tissus et les conditions de culture sont choisis en fonction de leur aptitude à la régénération.

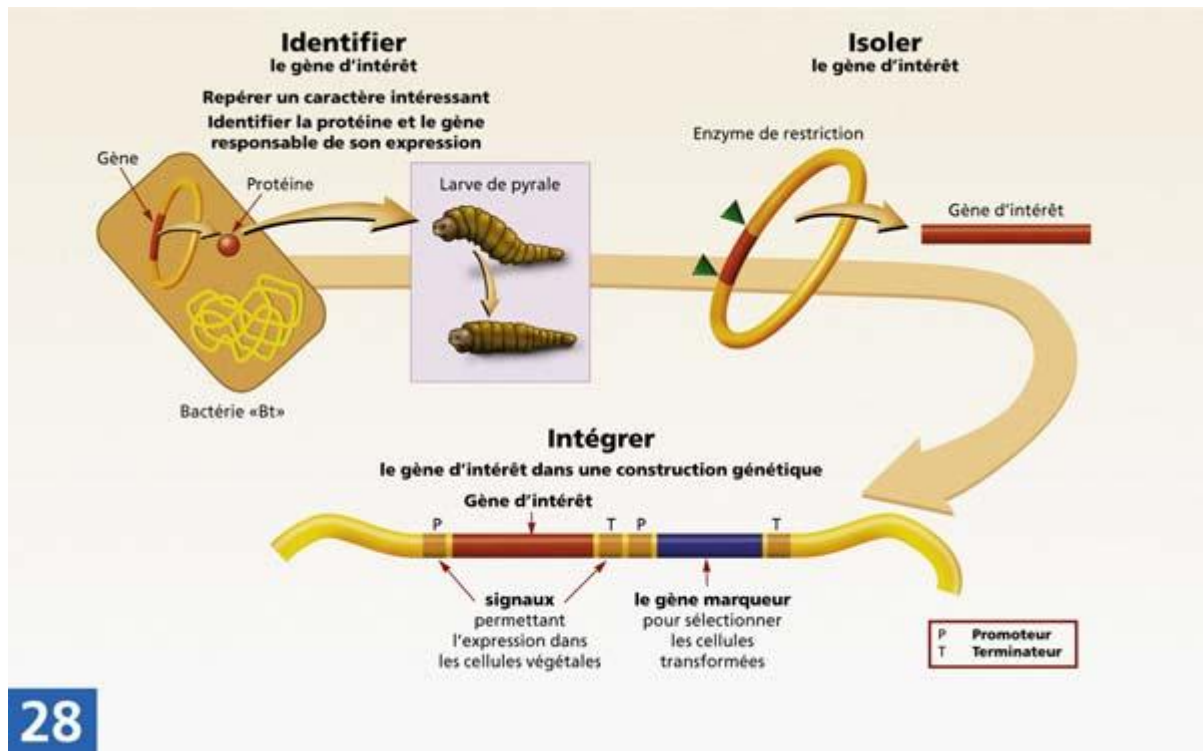
Les plantes régénérées sont ensuite analysées pour confirmer l'insertion de la construction génétique dans leur génome. Des analyses moléculaires sont conduites dans ce sens. Des études sur l'expression du gène ont lieu à plusieurs stades, ce qui permet de caractériser le niveau d'expression et le comportement de la plante exprimant le nouveau caractère.

Etape 4 : Incorporer dans une variété commerciale

Les plantes transformées obtenues sont soumises à des croisements contrôlés pour étudier les modalités de transmission du nouveau caractère à la descendance. La transformation et la régénération étant des opérations délicates, le génotype de la plante choisie est celui facilitant ces étapes. C'est pourquoi les plantes retenues sont ensuite soumises à une

succession de rétrocroisements afin d'introduire le gène dans le matériel élite et d'obtenir de nouvelles variétés commerciales exprimant ce caractère.

4.2.1. La réalisation de la construction génétique



28

Identifier et isoler le gène d'intérêt

La construction d'un transgène débute par le repérage d'un caractère intéressant et l'identification de la protéine responsable de ce caractère, puis du gène codant pour cette protéine.

Par exemple, chez une bactérie, *Bacillus thuringiensis*, utilisée en pulvérisation pour lutter contre certains papillons ravageurs des cultures de maïs, on a découvert le gène qui permet la production chez la bactérie d'une protéine qui se transforme en toxine dans le tube digestif de la pyrale.

C'est ce gène d'intérêt qui a ensuite été isolé à l'aide d'enzymes de restriction.

Intégrer le gène d'intérêt dans une construction génétique

Le gène d'intérêt seul ne peut pas s'exprimer dans la cellule végétale.

- Les signaux

Il est nécessaire de lui ajouter des signaux de régulation. La présence d'un promoteur devant la séquence codante du gène d'intérêt est indispensable. C'est une séquence située en amont du gène, responsable de la transcription de l'ADN.

Une séquence terminateur est également indispensable. Située en aval, elle signale la fin de la séquence codante.

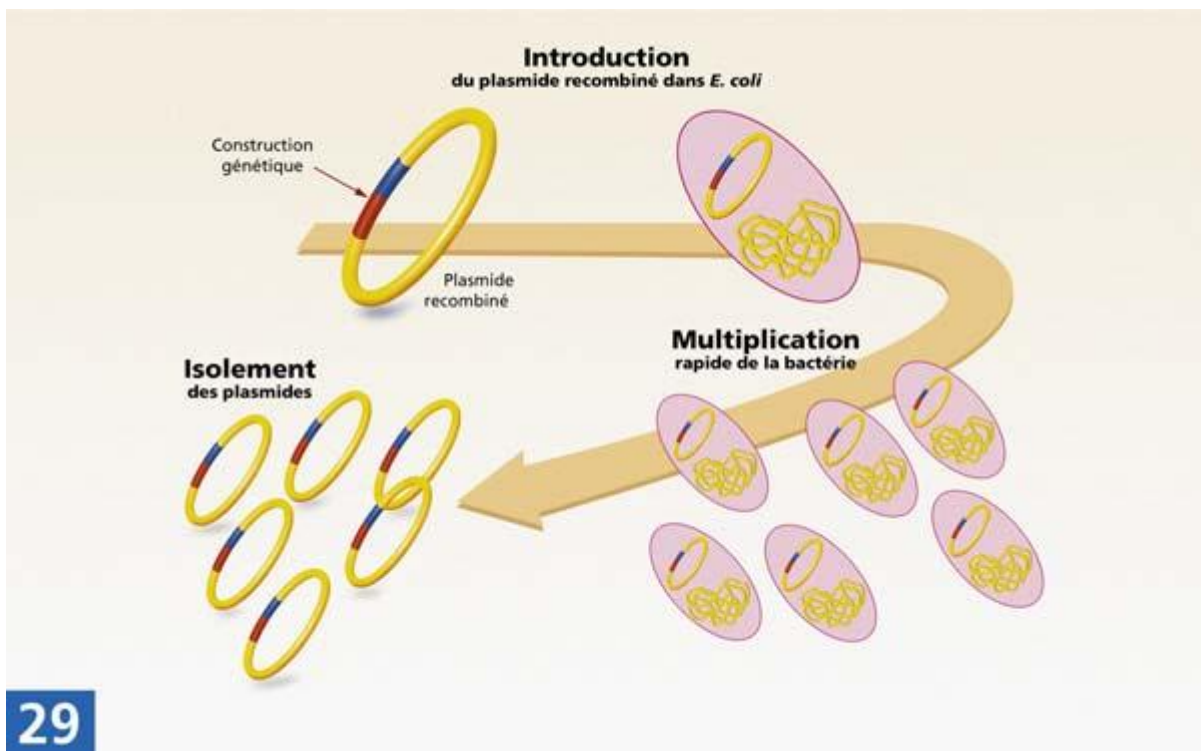
D'autres séquences peuvent être ajoutées. Elles permettent de cibler le lieu d'accumulation du produit du gène dans la plante, et de réguler la force de son expression.

- Les gènes marqueurs

Les gènes marqueurs permettent de repérer et de sélectionner, au cours des étapes suivantes de la transformation génétique, les cellules ayant intégré le gène d'intérêt. Il peut s'agir de gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques ou à des herbicides. Les cellules transgéniques sont alors sélectionnées par l'expression de leur résistance dans un milieu contenant l'antibiotique ou l'herbicide.

Tous ces fragments de gènes d'origines différentes, gènes d'intérêt, gènes marqueurs et signaux, sont assemblés *in vitro*. On obtient ainsi la construction génétique qui est multipliée puis utilisée pour l'étape de transformation.

4.2.2. La multiplication de la construction génétique : le clonage

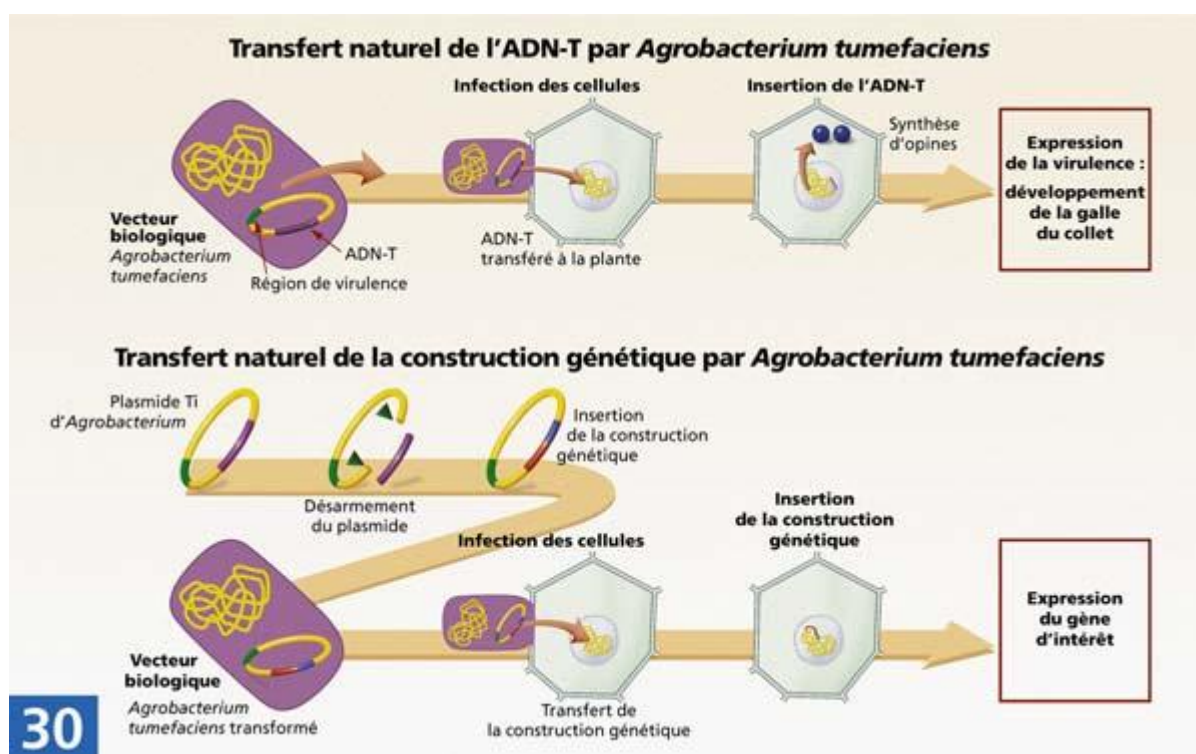


Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires présentes chez les bactéries, en plus de leur unique chromosome. Ils sont utilisés pour héberger la construction génétique, car il est

relativement facile de travailler sur cette petite molécule d'ADN circulaire, qui possède de nombreux sites de restriction. C'est alors un plasmide recombiné.

Le plasmide est ensuite réintégré dans des bactéries hôte, il s'agit le plus souvent de la bactérie *Escherichia coli*. Par culture de cette bactérie, on obtient alors une multiplication rapide du plasmide. On parle de clonage du gène ou de la construction génétique, car on dispose ainsi de nombreuses copies du gène.

4.2.3. L'utilisation d'Agrobactérium



La bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, provoque chez les plantes infectées une tumeur, la galle du collet.

Une autre espèce, *Agrobacterium rhizogenes*, parasite également les plantes selon les mêmes mécanismes qu'*A. tumefaciens*.

Elle provoque alors le développement anarchique du système racinaire appelé chevelu racinaire.

Transfert naturel de l'ADN-T par *Agrobacterium tumefaciens*

On a pu démontrer que le parasitisme d'*Agrobacterium* repose sur le transfert d'une partie de son plasmide dans les chromosomes de la plante. Cette partie qui est transmise au génome de la plante est appelée ADN-T.

Il s'agit d'une partie constante de l'ADN du plasmide de la bactérie, appelé ADN-T, pour ADN Transféré. L'ADN-T est délimité par des bordures, bordure gauche et bordure droite, constituées par des séquences de 25 nucléotides. C'est la région comprise entre ces frontières qui est transférée.

Elle contient les gènes qui confèrent à la plante des propriétés tumorales, c'est-à-dire qu'ils entraînent la prolifération continue et incontrôlée des cellules végétales par production d'hormones de croissance.

Des gènes entraînant la synthèse d'opines sont également présents sur l'ADN-T. Les opines sont des protéines spécifiques des bactéries qui ne sont pas habituellement présentes dans les tissus sains. Relâchées dans le milieu, les opines favorisent la multiplication des souches pathogènes et détournent une partie de l'activité photosynthétique de la plante au profit des bactéries.

Sur le plasmide, en dehors de l'ADN-T, on trouve une région de virulence. Cette dernière n'entraîne pas directement la formation de la maladie, mais est indispensable au transfert et à l'intégration de l'ADN-T.

Transfert naturel de la construction génétique par *Agrobacterium tumefaciens*

C'est ce transfert naturel ou biologique de gènes, à l'aide d'*Agrobacterium*, qui est utilisé pour transformer les végétaux. *A. tumefaciens* est la bactérie la plus employée. Le principe est de modifier son plasmide Ti afin qu'il n'y ait pas de formation de la galle du collet, mais qu'il y ait quand même transfert et intégration des gènes désirés dans le génome des plantes.

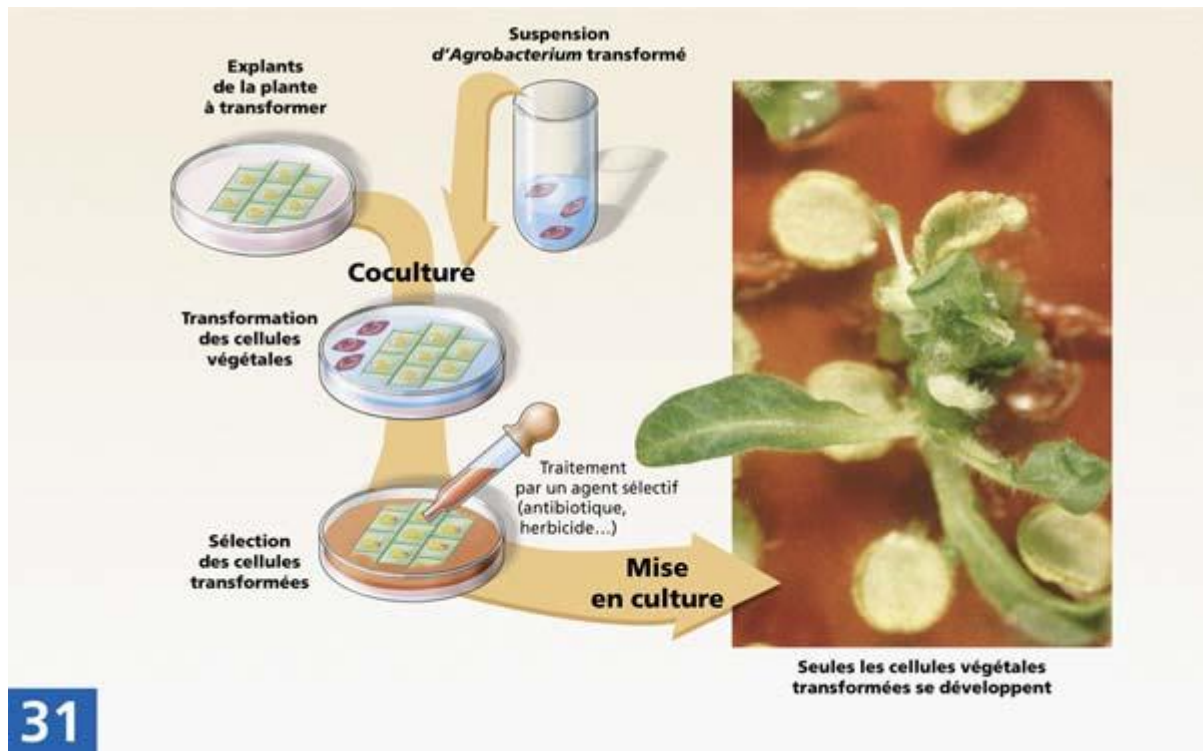
On construit des plasmides Ti désarmés. C'est-à-dire que les gènes, situés sur l'ADN-T, responsables du pouvoir pathogène de la bactérie, sont délétés. Il est toutefois nécessaire, pour la réalisation du transfert de gènes, de garder intactes les deux bordures gauche et droite de l'ADN-T, ainsi que les fonctions de virulence. Entre les deux bordures de l'ADN-T est insérée la construction génétique. Elle est ensuite introduite dans le végétal.

Les systèmes binaires de transfert

Des constructions ont été réalisées pour diminuer la taille des plasmides et pour simplifier les méthodes d'insertion de gènes dans l'ADN-T. Ainsi, l'information génétique, nécessaire au transfert et à l'intégration dans le matériel végétal de la construction génétique, a été répartie en deux plasmides. L'un est le plasmide d'Agrobacterium sans son ADN-T et possédant encore les gènes de virulence. Il induira à distance le transfert de l'ADN-T recombiné de l'autre plasmide, on parle d'action en trans. L'autre plasmide est un vecteur de petite taille qui porte l'ADN-T recombiné, donc la construction génétique. Ce vecteur, appelé vecteur binaire, possède la capacité de se répliquer dans Agrobacterium mais aussi dans E. coli.

C'est donc à la fois un vecteur de transfert et un vecteur de clonage. Cette technique est de plus en plus utilisée.

4.3. La transformation biologique



** Coculture et transformation génétique

La transformation génétique est réalisée en mélangeant une culture d'une souche d'*Agrobacterium* transformée, mise en suspension en milieu liquide, avec des explants de la plante, on parle de coculture. C'est au cours de cette étape que la construction génétique introduite dans la bactérie est transférée dans le génome de la plante.

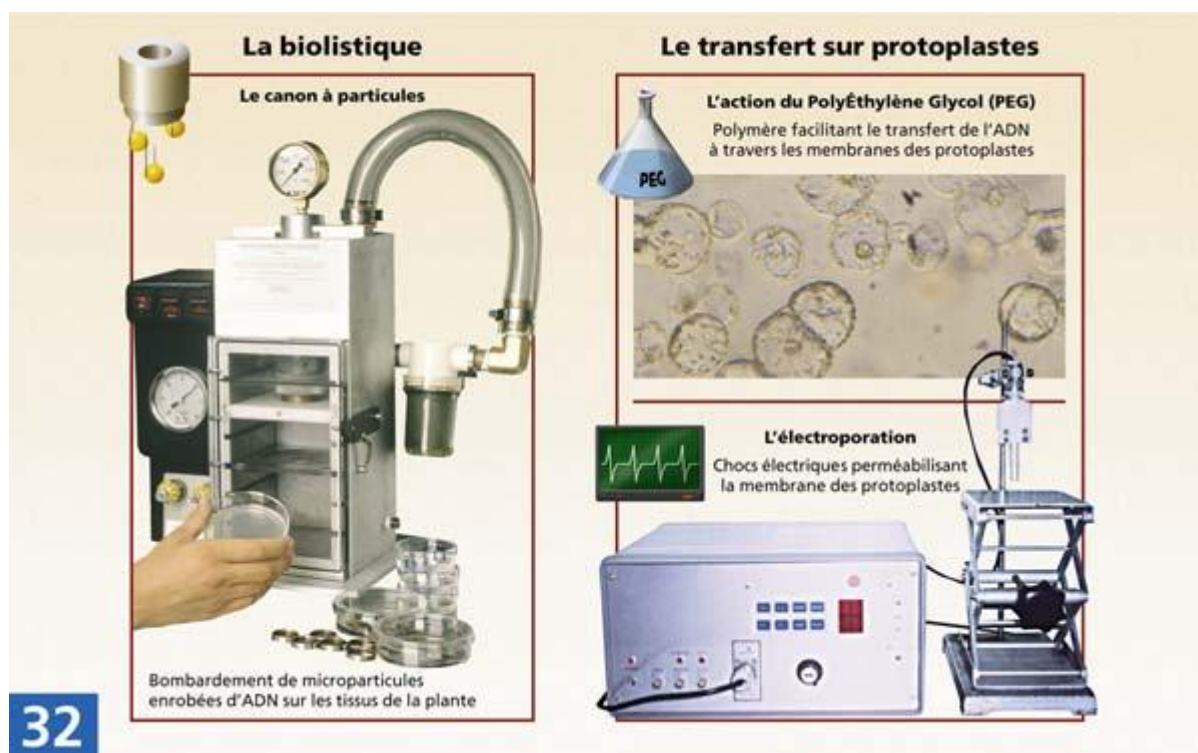
** Sélection des cellules transformées

La coculture est lavée pour éliminer les agrobactéries. Il faut ensuite sélectionner les cellules qui sont effectivement transformées. Pour cela, on apporte dans la culture des explants un agent sélectif approprié: herbicide, antibiotique. Seules les cellules végétales transformées, c'est-à-dire celles possédant et exprimant le gène marqueur de sélection, soit de résistance à un herbicide, soit de résistance à un antibiotique, pourront se développer.

** Applications

Cette technique de transformation par **Agrobacterium** a été appliquée avec succès à différentes espèces végétales dont le colza, la tomate, le coton, la pomme de terre, le soja, la courgette, le tabac, le maïs, le riz... La transformation biologique est également possible chez de nombreuses autres espèces.

4.4. Le transfert direct



Des méthodes dites de transfert direct utilisent des moyens physiques ou chimiques pour permettre la pénétration d'ADN, généralement sous forme de plasmides dans une cellule végétale. Les plus utilisées sont la biolistique et le transfert sur protoplastes.

4.4.1. La biolistique

Le principe consiste à projeter sur des tissus des microparticules de tungstène ou d'or de 1 à 3 μm ($1 \mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$) de diamètre enrobées d'ADN, à l'aide d'un canon à particules. La force de propulsion est obtenue soit par explosion d'une poudre dans une balle, soit par détente d'un gaz sous pression (l'hélium le plus souvent). Certaines des microparticules vont pénétrer dans les cellules, transportant avec elles l'ADN. Cet ADN doit ensuite atteindre le noyau et s'y intégrer.

C'est une méthode facile d'emploi qui a permis d'obtenir de nombreuses plantes transgéniques, notamment chez les monocotylédones, comme le maïs, le blé, le riz. C'est ainsi qu'a été obtenu le premier maïs résistant à la pyrale. En revanche, cette méthode a l'inconvénient de produire des plantes partiellement transformées, appelées chimères et parfois d'engendrer l'insertion de nombreuses copies du gène d'intérêt.

4.4.2. Le transfert sur protoplastes

Les protoplastes sont un matériel privilégié pour le transfert direct de gènes. Débarrassées de leur paroi pectocellulosique, ces cellules ne présentent plus d'obstacle à l'intégration de l'ADN. Sur un mélange contenant les cellules végétales et l'ADN en solution, on modifie les conditions physico-chimiques du milieu pour provoquer une perméabilisation temporaire et réversible de la membrane plasmique.

Les molécules d'ADN pénètrent dans les protoplastes, elles doivent atteindre ensuite le noyau et s'intégrer dans un chromosome de la cellule végétale. Deux techniques principales permettent d'introduire l'ADN dans les protoplastes :

**** L'action du PolyÉthylène Glycol (PEG)**

Le PEG est un polymère qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane.

Cette méthode a permis l'obtention de maïs résistant à une matière active herbicide, le glufosinate. Elle est également utilisée sur la betterave.

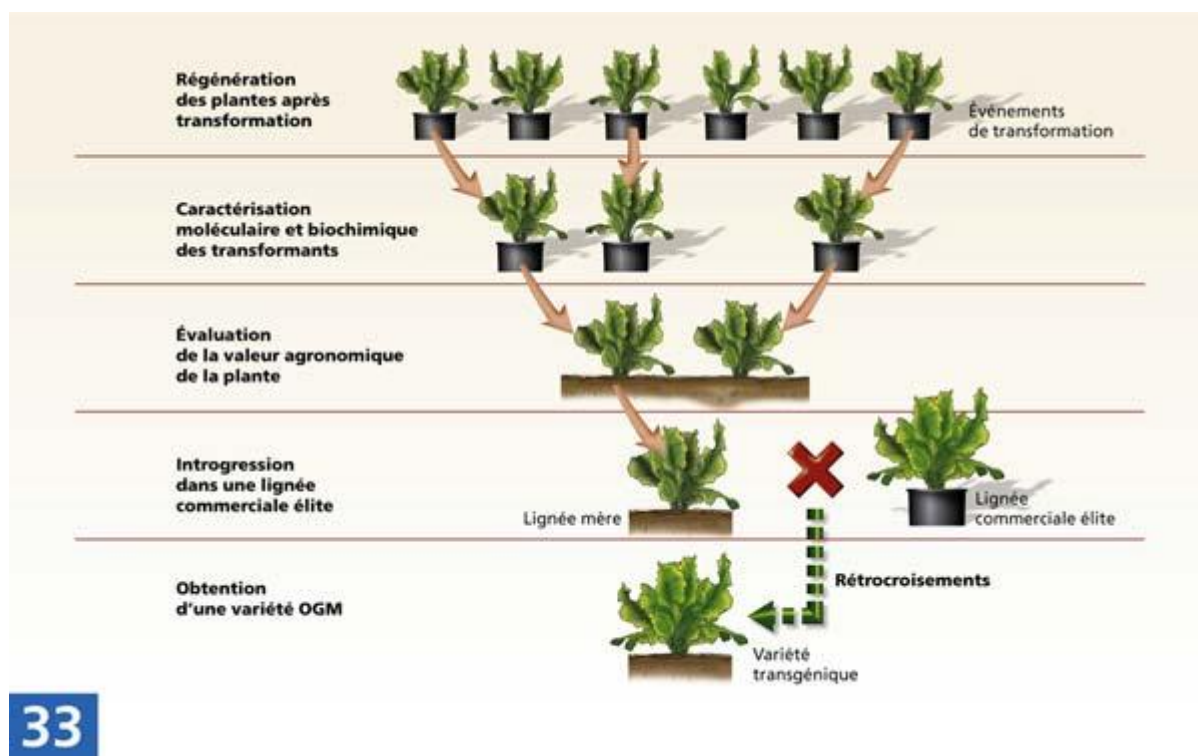
**** L'électroporation**

Cette méthode consiste à soumettre un mélange ADN-protoplastes à un choc électrique pendant une fraction de seconde. La membrane plasmique se trouve ainsi perméabilisée, ce qui permet l'intégration de l'ADN dans les cellules.

Ces deux méthodes sont relativement faciles à mettre en œuvre, mais supposent toutefois la possibilité de régénérer des plantes à partir de protoplastes, ce qui limite leur emploi chez les espèces récalcitrantes à la régénération.

Les techniques de transfert direct nécessitent également une étape de sélection des cellules transformées.

4.5. L'obtention d'une variété OGM



33

Lors de la transformation génétique, une, deux ou plusieurs copies du gène peuvent s'insérer à différents endroits sur les chromosomes. Ainsi, chaque cellule transformée pourra donner une plante différente. Ce sont autant d'événements de transformation.

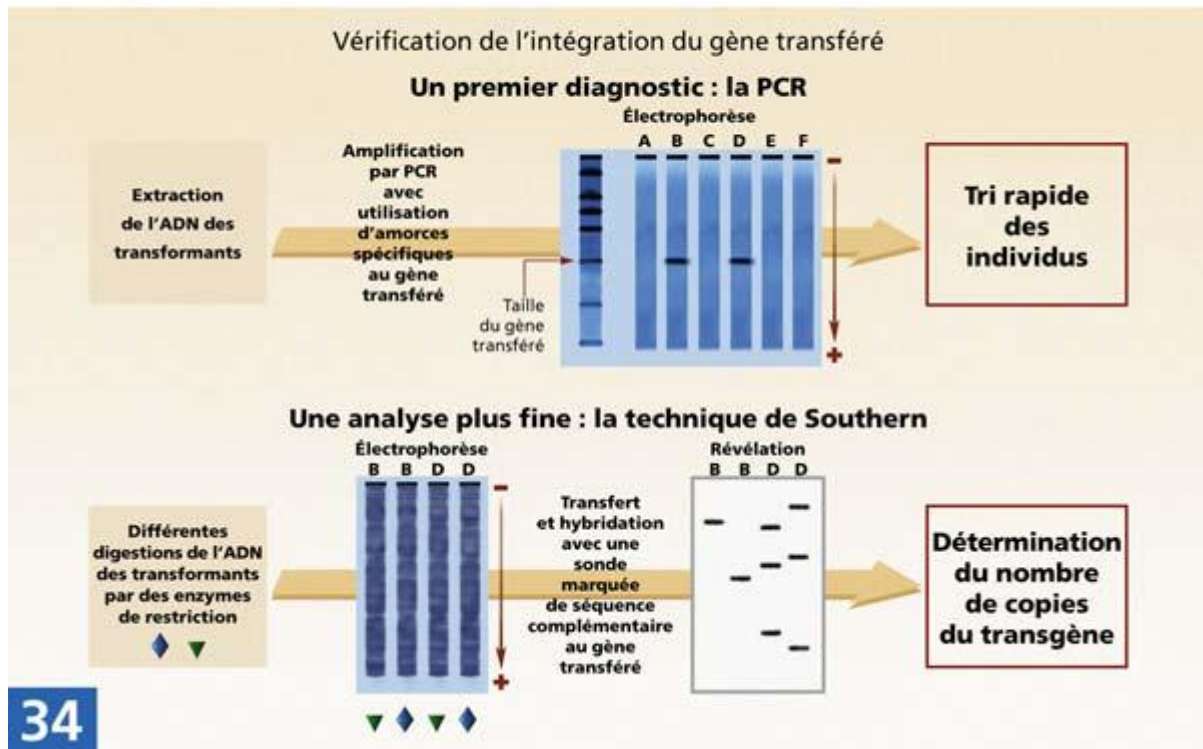
4.5.1. Caractérisation moléculaire et biochimique des transformants

Il faut d'abord s'assurer qu'une plante sélectionnée par sa résistance à un agent de sélection, herbicide ou antibiotique, a bien intégré le gène d'intérêt dans son génome. Ensuite, l'événement de transformation doit être caractérisé. On identifie le ou les sites d'intégration du gène et le nombre de copies intégrées dans le génome. Ces paramètres peuvent influencer le niveau d'expression du gène. Ainsi des analyses moléculaires sont conduites afin d'analyser les événements de transformation. Enfin, il faut s'assurer que le gène introduit s'exprime et produit la protéine désirée, en quantité suffisante. Pour cela, des analyses biochimiques vont être réalisées. A cette étape, de nombreuses plantes transgéniques seront éliminées par défaut d'expression du gène d'intérêt.

4.5.1.1. La caractérisation moléculaire des transformants



La caractérisation moléculaire des transformants



Lorsque l'on transforme génétiquement une plante, il est important de déterminer rapidement si l'ADN transféré est intégré dans le patrimoine génétique de la plante. En effet, la sélection des cellules sur un milieu contenant l'agent de sélection n'est pas suffisamment fiable. Certaines cellules, bien que non transformées, parviennent quand même à se développer sur le milieu de sélection.

Un premier diagnostic : la PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR, réaction de polymérisation en chaîne, permet sur d'infimes quantités d'ADN de détecter l'éventuelle présence du transgène.

A l'aide d'amorces spécifiques, cette technique permet de déterminer si une plante porte le gène transféré ou non, et permet également de suivre la transmission du nouveau gène dans la descendance. Les fragments amplifiés sont visualisés par migration sur un gel et leur taille est comparée à celle du fragment attendu. Ainsi sur la photographie, on observe que seules les plantes B et D possèdent un fragment pouvant correspondre au gène d'intérêt transféré.

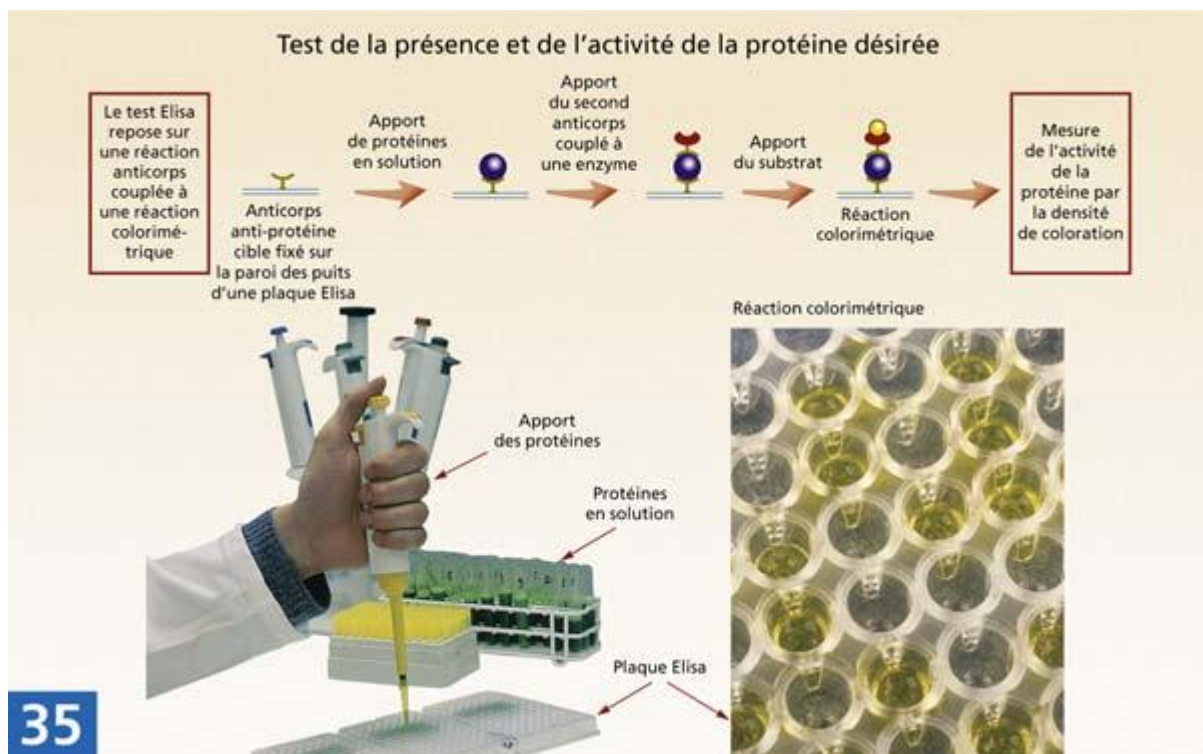
Pour caractériser si ce gène s'exprime, on utilisera la PCR reverse (RT-PCR). Cette technique permet de vérifier la présence d'ARN messager, transcrit spécifiquement à partir du gène

introduit.

Une analyse plus fine : la technique de Southern

Une analyse plus fine pourra ensuite être réalisée par hybridation moléculaire ADN-ADN, selon la technique de Southern. Seule l'hybridation spécifique permet de démontrer que le gène transféré est intégré dans le génome. L'ADN total de la plante est digéré séparément par différentes enzymes de restriction. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse. Ils sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane en nylon. Enfin, une hybridation à l'aide d'une sonde marquée (correspondant à tout ou une partie du gène transféré) permettra de déterminer le nombre de copies du transgène intégrées au génome de la plante. Ainsi dans le cas des plantes B et D, B possède une seule copie et D trois copies.

4.5.1.2. La caractérisation Biochimique des transformants



Après vérification de la présence du nouveau gène dans la plante, il est nécessaire de déterminer si ce gène produit ou non la protéine désirée et en quelle quantité. Pour tester la présence et l'activité de la protéine, un test Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, Immuno-essais avec couplage enzymatique) est utilisé.

Pour cela, les protéines sont obtenues à partir du broyage de tissus de plantes transformées. Ce test repose sur une liaison spécifique entre un anticorps anti-protéine cible fixé à la paroi des puits d'une plaque Elisa et la protéine produite par le gène. Un deuxième anticorps spécifique de la protéine, couplé à une enzyme, est ajouté dans le milieu. Si la protéine est présente, il se forme un complexe anticorps-protéine-anticorps. Ensuite, on réalise un test colorimétrique : le substrat de l'enzyme est ajouté au milieu, il se lie sur les complexes fixés à la paroi et la solution change de couleur. C'est donc une méthode visuelle de détection de la présence de la protéine.

Un lecteur de plaque Elisa permet de mesurer l'activité de la protéine, sur la base de différences d'intensité de couleur.

Sur la photographie représentant la plaque Elisa, certains puits ont changé de couleur. Dans les puits restés clairs, les plantes n'ont pas produit de protéine, elles seront donc éliminées, tandis que dans les puits dont la couleur a changé, il y a eu production de la protéine désirée. C'est une méthode simple de révélation.

4.5.2. Evaluation de la valeur agronomique de la plante

Des analyses portent également sur le comportement général de la plante. Il s'agit de savoir si le gène introduit confère le caractère souhaité, et de valider l'efficacité du caractère. D'autre part, l'activité du gène étranger peut interférer avec le métabolisme général de la plante. Il faut donc vérifier que le potentiel de la plante n'est pas atteint. Ainsi, des tests en serre et en champ sont menés.

Il est notamment très important de vérifier que le comportement au champ de plantes transgéniques correspond à celui attendu sur la base des observations effectuées en serre sur une ou quelques plantes. A ce stade, le niveau et la stabilité de l'expression du caractère dans différentes conditions de culture sont évalués. Seules quelques plantes seront retenues. Enfin, il faut caractériser la transmission du caractère à la descendance.

4.5.3. Introgression dans une lignée commerciale élite

La plante ayant intégré le gène d'intérêt et satisfaisant le mieux à l'évaluation agronomique est retenue, on parle de lignée mère. Toutefois, cette plante n'est généralement pas encore la variété commerciale. En effet, l'efficacité de transformation et de régénération étant dépendante du génotype, la plante qui a été transformée est d'un génotype facilitant ces étapes. Le gène est ensuite transféré dans une **lignée commerciale élite** par rétrocroisements. Au cours de ces générations

d'hybridation, on ne conserve que le gène d'intérêt et on élimine le reste du patrimoine génétique de la lignée mère.

Le résultat de ce processus est l'obtention d'une lignée quasiment identique à la lignée élite, mais contenant le nouveau caractère transgénique. La **variété transgénique** obtenue est alors proposée à l'inscription. L'obtention d'une variété OGM est le résultat de nombreuses années d'analyses et d'expérimentations.

4.5.4. La biosécurité

Au niveau de la production et de la manipulation des OGM, des guides de bonnes pratiques en biosécurité ont été édités par l'AFNOR dans le cadre des recommandations de l'Organisation de la Coopération et de Développement Economique (OCDE). De plus, chaque entreprise applique des règles internes de précaution très strictes.

5. Les domaines d'application de la transgénèse



La publication des travaux de recherche et les demandes d'autorisation d'expérimentation et de mise sur le marché indiquent les espèces concernées par la transgénèse, les applications actuelles et les perspectives à venir.

Celles-ci peuvent être regroupées dans quatre grands domaines : améliorations agronomiques, qualités alimentaires, production de molécules à intérêt industriel et production de molécules

destinées à la santé humaine.

5.1. L'agronomie

De nombreux travaux de transgénèse concernent l'introduction de gènes de résistance aux herbicides ou aux insectes, et dans une moindre mesure, à certains virus et maladies. Associées à un usage raisonné d'herbicides et de pesticides, ces plantes transgéniques vont améliorer l'efficacité de l'agriculture, tout en respectant encore mieux l'environnement.

**** La résistance à des insectes**

La bactérie **Bacillus thuringiensis** constitue un véritable réservoir de gènes de résistance aux insectes. En effet, les différentes souches de cette bactérie du sol recèlent plusieurs protéines insecticides ayant différents modes d'action, et affectant uniquement certains insectes. Chacune de ces protéines est codée par un seul gène, c'est donc un caractère facilement transférable par génie génétique. Plusieurs équipes ont obtenu des tabacs, des pommes de terre, des cotons, des tomates, des maïs résistants à des insectes grâce à cette source de gènes.

Dans le cas du maïs, la résistance à la pyrale est conférée par le gène *Cry A*, appelé communément *Bt*. Ce gène permet dans les cellules du maïs, la production d'une protéine qui se transforme en toxine dans le tube digestif de la pyrale. Chez les autres animaux et chez l'homme, cette protéine est simplement digérée sans aucun effet toxique.

****La résistance à des maladies**

Les virus, les champignons et les bactéries sont responsables de pertes importantes en production végétale. Or, il n'existe aucune méthode de traitement des maladies dues à des virus chez les plantes cultivées. Par transgénèse, il est possible d'obtenir des plantes résistantes aux virus. Ces plantes transgéniques synthétisent des protéines qui bloquent la multiplication et le développement des virus. Ainsi, il a été possible d'obtenir des courgettes et des melons résistant au virus de la mosaïque du concombre.

L'obtention de plantes résistant aux champignons et aux bactéries est en cours de développement.

**** La résistance à des herbicides**

Le glufosinate (Basta ou Liberty) et le glyphosate (Roundup) sont des herbicides totaux qui détruisent aussi bien les mauvaises herbes que les plantes cultivées. Les gènes de résistance à

l'herbicide introduits dans une plante empêchent la matière active d'agir sur celle-ci, transformant l'herbicide total en herbicide sélectif sur cette plante. Ainsi l'herbicide détruit toutes les mauvaises herbes présentes tout en respectant totalement la plante cultivée.

De plus, ces désherbants totaux ont la propriété de ne pas être rémanents. De nombreuses plantes transgéniques ont été développées pour obtenir une tolérance à ces herbicides. Il s'agit de variétés de betterave, colza, coton, maïs, pomme de terre et de soja.

5.2. L'alimentation

Il s'agit de modifier la composition d'une plante afin de lui apporter des avantages nutritionnels et gustatifs ou de lui conférer de nouvelles caractéristiques qui permettent de diversifier les débouchés.

**** Les qualités nutritionnelles**

En alimentation animale, les recherches vont dans le sens d'un développement de plantes permettant un meilleur rendement nutritionnel et évitant l'apport de compléments nutritifs. Ainsi, il est possible d'obtenir des plantes de maïs, colza, soja à teneurs élevées en acides aminés, notamment en méthionine et lysine, et des maïs enrichis en huile. Concernant l'alimentation humaine, des travaux sont menés pour diminuer les propriétés allergènes du riz et du soja. Pour obtenir ce résultat, on cherche à introduire dans la plante un transgène qui inhibe la synthèse de la protéine allergisante.

**** La maturation des fruits**

Ce sont les résultats les plus avancés concernant la qualité alimentaire. Sur le melon, sur la tomate, on a pu obtenir des variétés transgéniques à maturation retardée. Ces fruits peuvent être récoltés à un stade de maturation plus avancé, donc être plus savoureux. D'autre part, il en résulte une meilleure conservation et une aptitude au transport améliorée, réduisant les pertes.

Le melon est le premier fruit génétiquement modifié obtenu par un laboratoire de recherche français. Un gène capable de bloquer la synthèse de l'éthylène a été introduit, ce qui ralentit la maturation. Le détachement du fruit est retardé et le melon maintenu sur pied continue d'accumuler des sucres.

**** La transformation agro-alimentaire**

Dans ce domaine, les champs d'application potentiels sont très variés : il peut s'agir de la production des protéines impliquées dans des procédés agro-alimentaires, ou de la modification des

caractéristiques des végétaux pour optimiser leur utilisation.

Ainsi, des travaux ont permis de modifier la teneur en amidon chez la pomme de terre, afin d'augmenter la teneur en matière sèche, et de disposer ainsi de pommes de terre mieux adaptées à la fabrication de féculé, de purée ou de chips.

Des gènes ont également été transférés chez le colza pour modifier la teneur en acides gras ou pour obtenir des huiles contenant des nouveaux acides gras recherchés en alimentation humaine.

5.3. L'industrie

Les biotechnologies ouvrent de nombreuses perspectives dans les domaines de l'industrie, en produisant des molécules nouvelles (Molecular Farming) et en améliorant les procédés industriels et la qualité des produits.

**** Les pâtes à papier**

Les lignines sont l'un des constituants majeurs du bois, mais elles gênent l'industrie papetière qui ne peut les valoriser et doit les éliminer par des méthodes coûteuses et polluantes.

Des travaux conduits par la recherche publique française ont permis de connaître les gènes impliqués dans la synthèse des lignines et de développer des variétés de peupliers transgéniques, chez lesquels le taux de lignine est fortement réduit. Ceci facilite le blanchissement de la pâte à papier et donc réduit l'impact sur l'environnement. Le même type de travail a été réalisé sur l'eucalyptus.

**** Les huiles industrielles**

Elles sont synthétisées à partir de matières premières fossiles, dont les ressources sont limitées. Il est donc nécessaire de s'orienter vers d'autres ressources renouvelables. Parmi les nombreux programmes de recherche, on peut citer celui destiné à l'obtention d'un colza transgénique à haute teneur en acide gras érucique ou ricinoléique pour la production de lubrifiants, de matières plastiques, etc. Cette stratégie devrait favoriser le développement de lubrifiants et de plastiques biodégradables.

**** Les colorants**

Un exemple original est l'obtention de cotons transgéniques de couleur grâce à l'introduction d'un

gène bactérien ou végétal codant pour un pigment. Ceci évitera l'utilisation de teintures chimiques difficilement recyclables.

5.4. La santé

Génétiquement modifiées, des plantes de tabac, de maïs, ou de pomme de terre peuvent produire des molécules thérapeutiques ou des vaccins. Le grand avantage de la production de ces molécules est l'absence de risques de contamination par des virus pathogènes pour l'homme.

**** Les produits sanguins**

Des recherches menées en France ont déjà permis de faire produire des protéines plasmatiques à des plants de tabac transgéniques, permettant l'obtention d'hémoglobine humaine recombinée.

Des travaux montrent qu'il est possible de synthétiser de l'albumine humaine, employée lors du traitement des traumatismes, à partir de tabac ou de pomme de terre. Cette albumine devrait être moins chère que celle issue du plasma sanguin. Cette nouvelle source permettrait de répondre à l'augmentation des besoins.

**** Les vaccins**

Des chercheurs américains travaillent à la mise au point d'une banane vaccin pour l'homme, prévenant les cas de gastro-entérites provoquées par la bactérie *E. coli*. Il serait alors envisageable de vacciner à faible coût les populations de pays en voie de développement, les plus touchées par ces diarrhées d'origine bactérienne.

**** Les protéines humaines**

Des travaux sont actuellement en cours pour faire produire des protéines ou des glycoprotéines à usage thérapeutique à partir de soja, de tabac, de pomme de terre, de riz ou de colza.

5.5. L'environnement

Le recours à des variétés transgéniques permet une moindre utilisation d'insecticides et d'herbicides et ouvre le champ de la recherche sur les pratiques culturales simplifiées.

**** Des herbicides au profil écotoxicologique favorable**

La création de plantes tolérantes aux herbicides permet l'utilisation de matières actives au

profil écotoxicologique favorable, c'est-à-dire à faible durée de vie, à biodégradabilité rapide, respectant et l'environnement et à large efficacité.

Ces cultures peuvent supporter ce traitement grâce à l'introduction d'un gène de tolérance spécifique. En 1996, un nouveau système de désherbage a été lancé en Amérique du Nord sur des cultures comme le soja, le colza et le maïs.

**** La réduction de l'utilisation des insecticides**

Une étude sur l'impact du coton bt (résistant aux insectes) montre qu'en 1999, les agriculteurs chinois ayant adoptés des variétés bt ont consommé en moyenne 10 kg/ha d'insecticides contre 58 kg/ha pour les agriculteurs ayant cultivé des variétés non transgéniques ("impact of bt cotton in china", Carl E. Pray et al, center for chinese Agricultural Policy, Chinese Academy of Sciences, China, may 2001).

**** La diminution de l'érosion des sols**

Une étude sur 5 ans (1996 à 2001) auprès de 450 cultivateurs américains de soja montre que pour 63 % d'entre eux, le développement des techniques culturales sans labour, qui permet une réduction de l'érosion des sols de l'ordre de 90 %, est rendu possible en premier lieu par l'introduction de variétés de soja transgéniques tolérant à un herbicide.

**** L'enrichissement du patrimoine végétal**

La sélection classique a déjà fait la preuve de sa capacité à enrichir les espèces et variétés. Par la création de variétés nouvelles qui constitue l'objectif premier de son activité, la sélection classique a ainsi doté le "patrimoine végétal" de spécimens nouveaux. Dès les origines de l'agriculture, cette activité de sélection empirique a été à l'origine de nombreuses variétés aujourd'hui partie intégrante de ce patrimoine.

Les biotechnologies modernes, et le génie génétique, s'inscrivent dans cette continuité avec une diversité d'objectifs. Elles ont à leur disposition des outils qui ouvrent davantage encore le champ des possibles. Dès lors, les biotechnologies vont contribuer encore à l'extension du patrimoine végétal.

**** Le maïs transgénique utilisant mieux l'eau disponible**

L'amélioration des rendements du maïs est due à un grand nombre de facteurs, dont l'un des

plus importants est la tolérance aux stress environnementaux. Cette amélioration est surtout attribuée à une augmentation de la performance des lignées parentales, qui sont en partie tolérantes à un déficit d'eau. En effet, pour le maïs, la période pendant la pollinisation et le début du remplissage des grains est la plus sensible à un stress hydrique.

Pourtant, l'eau est une ressource limitée dont l'agriculture est la première utilisatrice, devant l'industrie et la consommation humaine. Pour la culture du maïs, une façon de diminuer l'utilisation d'eau consiste à créer des variétés qui tolèrent une disponibilité réduite en eau, sans que leurs capacités de production n'en soient affectées.

Grâce à des études génétiques, plusieurs variétés de maïs transgéniques ont été créées par l'introduction de gènes impliqués dans la réponse à un déficit hydrique. Par exemple, un maïs plus tolérant à la sécheresse a été mis au point grâce à l'introduction par transgénèse d'un gène de sorgho, céréale africaine particulièrement tolérante à la sécheresse.

Ce gène code pour une protéine impliquée dans la photosynthèse, la PEPc (*Phosphoénolpyruvate carboxylase*). Les plantes transgéniques obtenues surexpriment cette protéine. Des analyses du comportement photosynthétique de ces plantes en situation de contrainte hydrique en serre ont permis de montrer que l'efficacité d'utilisation de l'eau est significativement augmentée (+ 25 %).

**** La résistance des plantes aux insectes ravageurs**

La lutte contre les ravageurs, notamment les insectes, est réalisée essentiellement par l'utilisation d'insecticides chimiques. Suivant les cultures, les zones géographiques et les années, la fréquence et la sévérité des attaques d'insectes sont très variables. Selon les cas, l'application d'insecticide est systématique ou décidée sur la base de comptages des insectes (ou de larves) "nuisibles" lors de contrôles dans les champs.

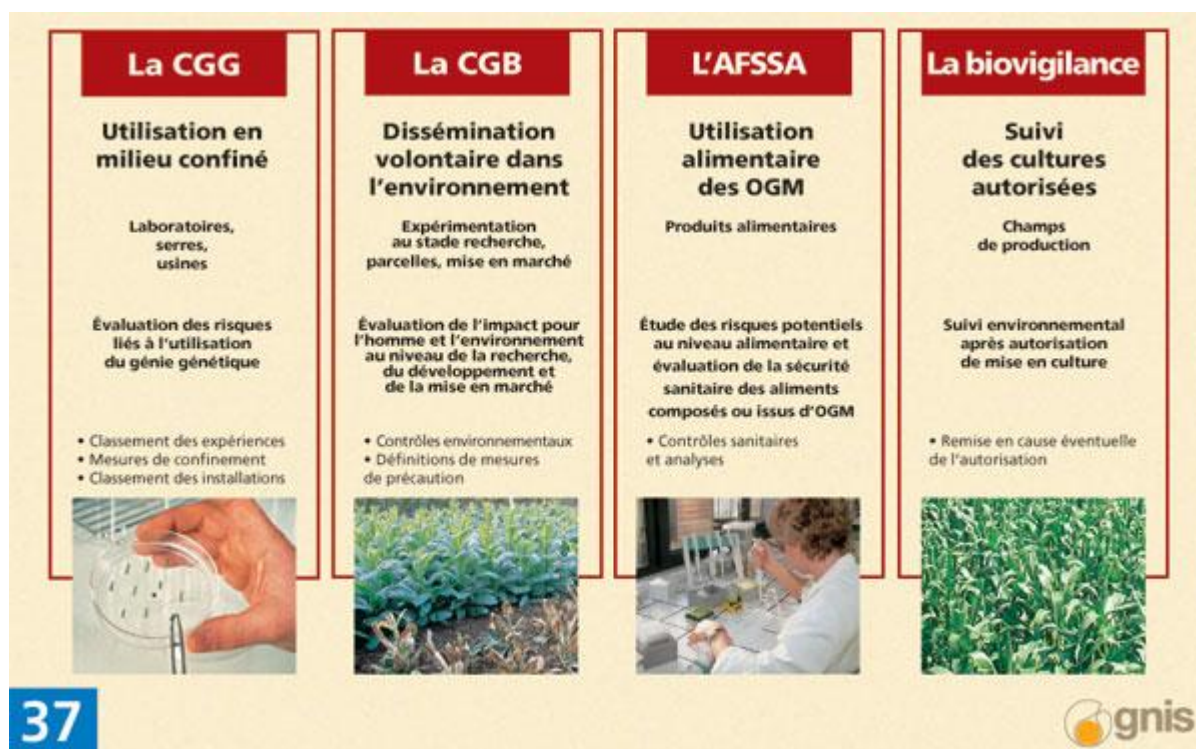
La transgénèse offre aujourd'hui un outil supplémentaire aux agriculteurs pour limiter les traitements chimiques et protéger leurs récoltes contre les insectes et les maladies et ainsi réduire les pertes.

Pour rendre une plante résistante à un insecte, un gène codant une protéine toxique pour cet insecte a été introduit dans le génome de la plante. Jusqu'à présent, pour toutes les variétés mises sur le marché, les gènes introduits proviennent de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (d'où l'abréviation Bt donnée aux plantes de ce type), bien connue depuis longtemps pour ses propriétés insecticides et largement utilisée en agriculture biologique, ainsi que par les exploitants forestiers et les jardiniers.

En 2002, La résistance aux insectes représente 17 % (10,1 millions d'hectares) de la surface totale d'OGM cultivés dans le monde.

6. La réglementation sur les OGM

6.1. Les dispositifs d'évaluation et de contrôle de risques



Les pouvoirs publics ont pris des mesures pour évaluer et contrôler les risques éventuels, pour l'environnement et pour l'homme, dus à l'utilisation ou à la dissémination des organismes génétiquement modifiés (OGM). Sont considérés comme OGM, des organismes modifiés par les techniques d'ADN recombinant (transgénèse). Ainsi, les organismes obtenus par fusion de protoplastes, culture in vitro et mutagenèse ne font pas partie du champ des lois relatives aux OGM.

** La Commission du Génie Génétique : la CGG

En France, l'utilisation en milieu confiné (laboratoire, serre, bio-industrie) des OGM ne peut se faire sans l'autorisation de la Commission du génie Génétique (CGG). La CGG est une commission consultative sous tutelle du Ministère de la Recherche, qui examine les dossiers déposés par les laboratoires et les industriels, propose les conditions d'expérimentations sur les OGM en milieu confiné après une évaluation de la classe de risque et du niveau de confinement souhaitable (étude

des techniques, procédés, organismes, sécurité). Le Ministère de la Recherche prend la décision finale et doit ensuite mettre à la disposition des autres membres de l'Union européenne les dossiers constitués.

**** La Commission du Génie Biomoléculaire : la CGB**

En France, la Commission du Génie Biomoléculaire (CGB) examine, au cas par cas, les demandes de dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement à des fins de recherche et de développement (dites partie B) ou de mise sur le marché (dites partie C) pour en évaluer les risques pour la santé publique et pour l'environnement. La CGB est une commission consultative sous tutelle du Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement qui a été créée en 1986. La CGB propose également des mesures de précaution. Elle émet un avis que la Direction Générale de l'Alimentation traduit en autorisation.

**** L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)**

En France, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) est saisie par la CGB. Elle étudie plus particulièrement les risques potentiels au niveau alimentaire et évalue la sécurité sanitaire des aliments composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés. Ce sont donc les avis de ces deux institutions qui permettent d'éclairer les pouvoirs publics sur les décisions à arrêter. Lorsque les avis de la CGB et de l'AFSSA sont favorables, les pouvoirs publics transmettent le dossier à la Commission européenne.

**** Le Comité de Biovigilance**

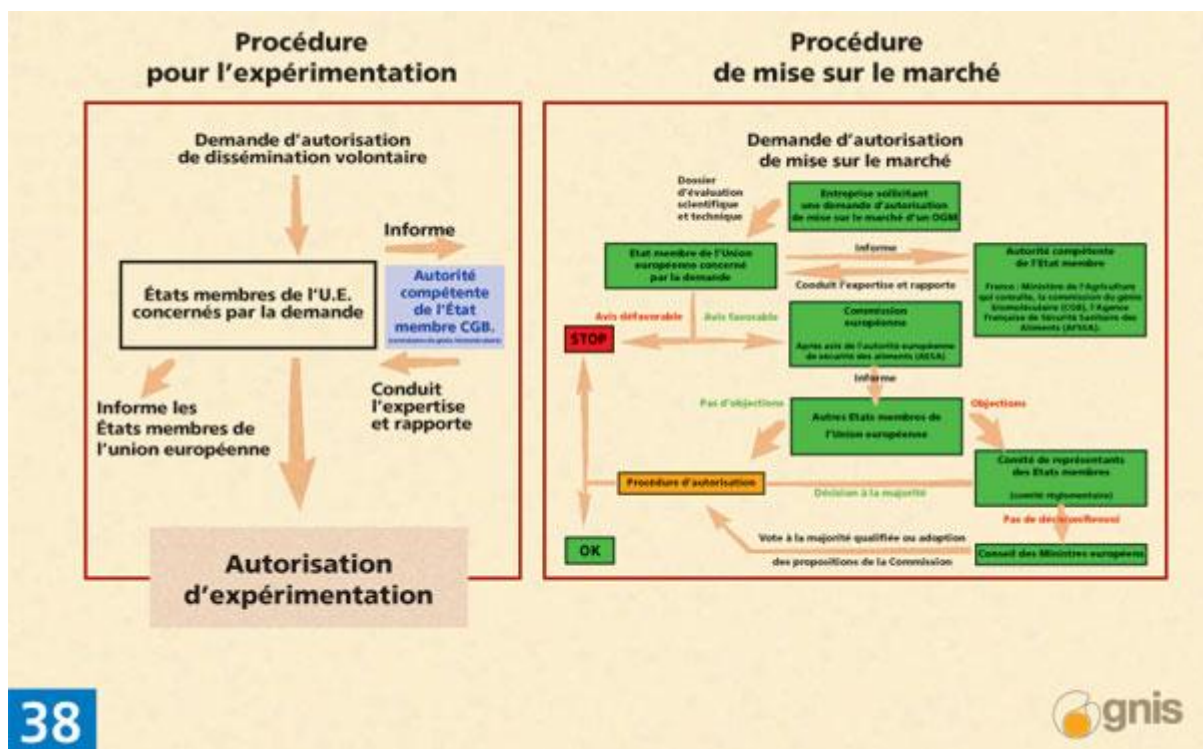
En 1998, le gouvernement français s'est donné les moyens de suivre dans la durée les conséquences éventuelles pour l'environnement des produits ayant reçu une autorisation. Ainsi, un comité de surveillance biologique composé d'experts et de représentants de la société civile a été créé et un suivi environnemental des cultures est assuré par les Services de la Protection des Végétaux, sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et du ministère de l'Environnement. Cette biovigilance garantit une sécurité supplémentaire qui peut, si nécessaire, conduire à remettre en cause les autorisations accordées. La directive 2001/18 renforce les contraintes liées à la dissémination des OGM dans l'environnement, notamment en matière de suivi à moyens et longs termes des OGM dans l'environnement.

Le dispositif de biovigilance distingue deux types d'actions de Biovigilance :

- **Les actions de monitoring** ou de surveillance spécifique, définies en groupe de travail, sur la base d'une interrogation du Comité de Biovigilance. L'action de monitoring est limitée dans le temps (1 à 5 ans) et dans l'espace. elle consiste en la mise en place d'un dispositif dont les principaux paramètres sont maîtrisés (comparaison entre une plante génétiquement modifiée et la même plante non génétiquement modifiée, par exemple).

- **Les actions de surveillance générale**, permettant de définir l'impact de plantes transgéniques sur les milieux, plus spécifiquement faune et flore, dans la parcelle et dans les parcelles voisines. La surveillance générale peut s'exercer sur tout type de parcelle, OGM ou non. Elle a pour objet de détecter des perturbations dans la représentation des espèces dans une perspective de long terme et s'exerce sur une échelle d'espace importante. Chaque année, un bilan de l'utilisation de plantes transgéniques est présenté par les Services de Protection des végétaux aux membres du Comité de Biovigilance. Si des effets indésirables sont mis en évidence, le Comité pourra demander aux ministres de l'Agriculture et de l'Environnement une réévaluation du risque, pouvant conduire à un retrait par les pouvoirs publics des autorisations des variétés transgéniques en cause.

6.2. Les démarches à suivre



**** Procédure pour l'expérimentation**

En France, la **Commission du Génie Biomoléculaire (CGB)** examine, au cas par cas, les demandes de dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement à des fins de recherche et de développement (dites partie B) ou de mise sur le marché (dites partie C) pour en évaluer les risques pour la santé publique et pour l'environnement (Directive 2001/18/CE). La CGB est une commission consultative sous tutelle du Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement. Les demandes d'autorisation de dissémination à des fins de recherche et de développement sont traitées au niveau national. Il incombe toutefois à l'Etat de tenir informés les autres Etats membres et la Commission des activités de recherche conduites sur le territoire national. Le public est informé du lieu d'expérimentation par un affichage dans la mairie de la commune concernée.

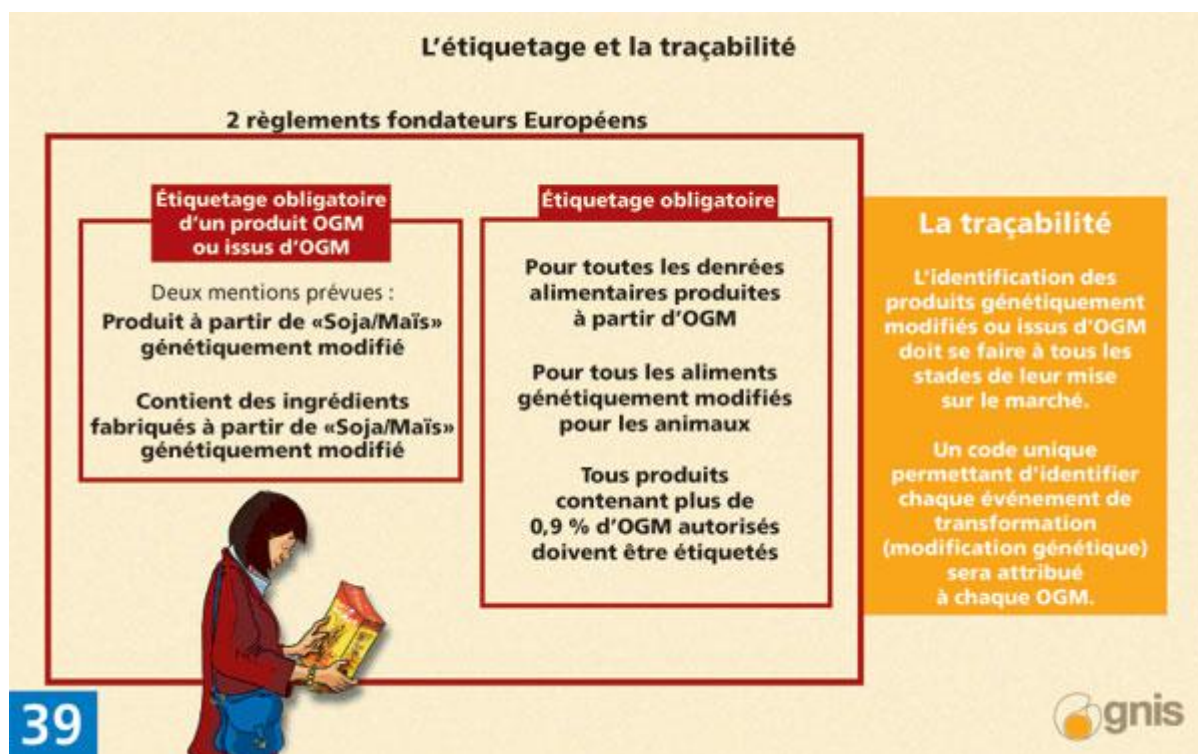
**** Procédure de mise sur le marché**

Une variété OGM ne peut être commercialisée qu'après avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché, correspondant à la partie C de la directive européenne et une inscription au catalogue français, pour les espèces régies par le catalogue.

Les autorisations de mise sur le marché de plantes ou de produits génétiquement modifiés sont demandées pour la culture et l'utilisation ou seulement pour l'importation et l'utilisation. Elles sont données par la Commission Européenne.

La demande d'autorisation doit être faite dans le pays où le produit doit être commercialisé pour la première fois. L'autorité compétente de ce pays analyse le dossier en s'appuyant sur les structures d'expertises nationales et transmet, via le gouvernement, un rapport d'évaluation à la Commission Européenne qui informe les autres pays membres de l'Union. Si le rapport est porteur d'un avis favorable, et si aucune objection des autres Etats membres n'est émise, l'Autorité à l'origine de l'évaluation initiale accorde l'autorisation de mise sur le marché de l'OGM concerné. Celui-ci peut alors être commercialisé dans l'ensemble de l'Union européenne dans le respect des conditions requises par l'autorisation. Par contre, si un pays membre émet des objections, la décision d'autorisation doit être prise au niveau communautaire.

6.3. La sécurité alimentaire et l'étiquetage



** La réglementation en matière d'étiquetage

Le règlement fondateur européen de 1997 dit "nouveaux aliments" (Novel foods) rend obligatoire l'étiquetage des aliments génétiquement modifiés, ainsi que les produits dérivés d'OGM ayant été produits à partir de ceux-ci, dès lors que le produit n'est pas équivalent en substance.

L'obligation d'étiquetage a été étendue par un règlement en 1998, avec une obligation d'étiqueter les aliments et ingrédients fabriqués à partir du maïs Bt et de fèves de soja, dont la commercialisation avait été autorisée avant l'entrée en vigueur du règlement "Novel Foods". Deux mentions obligatoires sont prévues :

- "produit à partir de soja/maïs génétiquement modifié",
- "contient des [ingrédients] fabriqués à partir de soja/maïs génétiquement modifié".

La directive 2001/18/CE prévoit que les Etats membres prennent toutes les mesures nécessaires pour garantir, à tous les stades de la mise sur le marché, l'étiquetage des OGM mis sur le marché en

tant que produits ou éléments de produits.

Le règlement 49/2000/CE concerne la présence accidentelle de matériel génétiquement modifié dans les denrées alimentaires classiques. Il a été fixé un seuil minimal de 1 % de présence accidentelle d'ADN ou de protéines résultant d'une modification génétique dans les denrées alimentaires, au-dessus duquel l'aliment doit être obligatoirement étiqueté.

Le règlement 50/2000/CE, adopté par la Commission européenne en janvier 2000, garantit que les additifs et les arômes soient aussi étiquetés obligatoirement lorsque de l'ADN ou des protéines résultant d'une modification génétique sont présents dans le produit final.

La réglementation actuelle ne couvre pas certains aliments ou ingrédients, dès lors que des traces d'ADN ou de protéines issues de la modification génétique ne sont pas décelables dans le produit final (par exemple, de l'huile de soja ou de maïs hautement raffiné obtenue à partir de soja ou de maïs génétiquement modifié).

**** Une nouvelle réglementation sur l'étiquetage**

Le nouveau règlement est entré en vigueur en avril 2004. Il introduit des exigences strictes en matière d'étiquetage des aliments génétiquement modifiés pour animaux suivant les mêmes principes que les aliments destinés à l'alimentation humaine.

De plus, ce règlement fonde l'obligation d'étiqueter non plus sur la possibilité de détection de protéines ou d'ADN résultant de modifications génétiques, mais sur la possibilité de remonter par la traçabilité à l'utilisation ou non de produits génétiquement modifiés.

Ainsi, le nouveau règlement relatif aux aliments génétiquement modifiés destinés à l'alimentation humaine et animale introduit l'étiquetage de :

- Toutes les denrées alimentaires produites à partir d'OGM, indépendamment de savoir si le produit final contient de l'ADN ou des protéines dérivées d'OGM,
- Tous les aliments génétiquement modifiés pour animaux.

Afin d'éviter un sur-étiquetage, les ministres européens ont décidé que ces obligations devraient s'appliquer uniquement si le produit final contient un OGM à raison de plus de 0,9 % dès lors que la présence de cet OGM est accidentelle ou techniquement inévitable.

Le règlement détermine un seuil de 0,5 % en dessous duquel une présence techniquement inévitable d'OGM, pas encore autorisé dans l'Union européenne, est permise de façon transitoire.

**** La réglementation en matière de traçabilité**

La traçabilité peut être définie comme la capacité de retracer le cheminement des OGM et des produits dérivés, à tous les stades de leur mise sur le marché, tout au long des chaînes de production et de distribution, rendant ainsi le contrôle plus aisé et maintenant également la possibilité de retirer des produits du marché en cas de nécessité.

L'obligation de traçabilité est destinée à faciliter l'étiquetage précis du produit final et à donner les moyens de vérifier et de contrôler les indications figurant sur les étiquettes.

La traçabilité sur les OGM a été introduite en termes généraux dans la législation communautaire par la directive 2001/18/CE qui impose aux Etats membres de garantir la traçabilité à tous les stades de la commercialisation des OGM.

Cependant, la directive 2001/18/CE ne fournit ni la définition de cette notion, ni les objectifs qui s'y rattachent, ni les modalités complètes de sa mise en œuvre.

**** Une nouvelle réglementation sur la traçabilité des OGM**

Une nouvelle règle sur la traçabilité des OGM a été adoptée par les ministres européens de l'Agriculture le 22 juillet 2003. Elle s'applique à tous les OGM, qu'ils soient destinés à l'alimentation humaine ou animale.

Elle prévoit l'obligation de conserver et de transmettre, par les exploitants, les informations sur les produits qui contiennent des OGM ou qui sont fabriqués à partir d'OGM, à chaque étape de la mise sur le marché. L'industrie doit être dotée de systèmes permettant de déterminer par qui, et au profit de qui, les produits génétiquement modifiés sont mis à disposition. Les informations relatives à la présence d'OGM doivent être transmises tout au long de la chaîne commerciale et conservées pendant 5 ans.

Ainsi, la transmission et la conservation de ces informations limiteront les besoins d'échantillonnage et d'essai des produits. De plus, elle limite la perte d'informations spécifiques attachées aux produits lors des traitements successifs qu'ils subissent.

Connaitre le génome

Jusqu'à présent, le sélectionneur abordait la diversité génétique en ne tenant compte que des caractères observables. Il est dorénavant possible, grâce à des techniques de biologie moléculaire, de lire partiellement le génotype d'un individu, et d'étudier la diversité génétique au niveau du génome.

Aujourd'hui, avec le marquage moléculaire, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour le sélectionneur.

1. LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

1.1. Les balises du génome

- 1.1.1. La technique RFLP
- 1.1.2. Les marqueurs RFLP
- 1.1.3. Les marqueurs microsatellites
- 1.1.4. Les marqueurs RAPD
- 1.1.5. Les marqueurs AFLP
- 1.1.6. Les marqueurs SNP
- 1.1.7. L'analyse d'un profil AFLP
- 1.1.8. Les principaux marqueurs moléculaires

1.2. L'empreinte génétique d'une plante

2. LES CARTES GÉNÉTIQUES

2.1. La cartographie des marqueurs moléculaires

2.2. La cartographie d'un gène majeur

2.3. La cartographie comparée

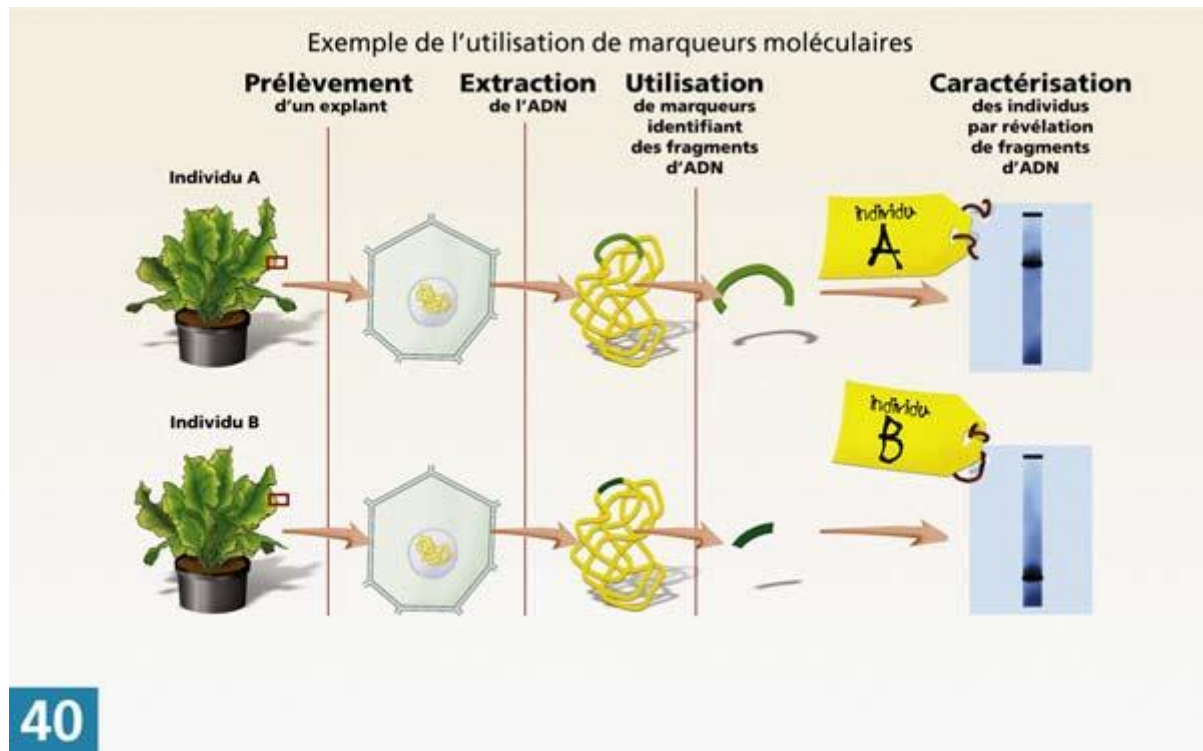
2.4. La cartographie d'un caractère quantitatif

3. LA SÉLECTION ASSISTÉE PAR MARQUEURS

4. LA GÉNOMIQUE

1. LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

1.1. Les balises du génome



Les marqueurs génétiques renseignent sur le génotype d'un individu et ne sont pas modifiés par l'environnement.

Ils peuvent être utilisés tout au long d'une expérimentation et sont observables à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe (l'information génétique de la plante est contenue en totalité dans toutes les cellules).

Les principaux types de marqueurs génétiques utilisés sont :

- **Les marqueurs biochimiques** (isozyme, protéine). Les protéines d'une cellule végétale peuvent facilement être extraites et analysées.

Les marqueurs biochimiques les plus utilisés sont les isozymes. Ils correspondent aux différentes formes d'une même enzyme et permettent de déterminer la présence de l'allèle correspondant à chacune de ces formes. Dans ce sens, ce sont des révélateurs du polymorphisme entre individus pour les séquences codantes du génome.

- **Les marqueurs moléculaires d'ADN**. Ce sont les plus étudiés. Ces marqueurs sont des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Par les techniques de biologie moléculaire, plusieurs outils ont été développés, permettant

d'obtenir directement à partir des marqueurs polymorphes de l'ADN des plantes. Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et les microsatellites.

Applications

Grâce aux marqueurs génétiques, il devient possible :

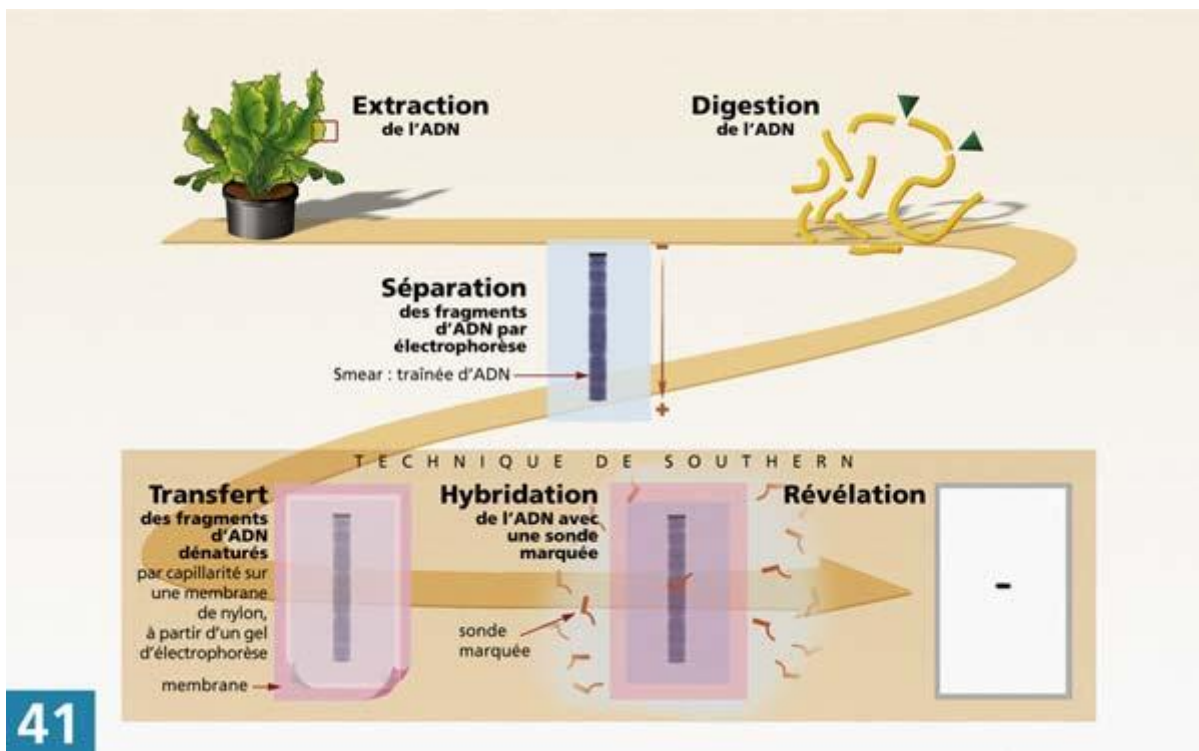
- d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification,
- de mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique ou technologique.

**** Caractéristiques d'un marqueur génétique**

Un bon marqueur doit être :

- **neutre** : ses différents allèles n'ont pas d'effet sur le phénotype de l'individu,
- **polymorphe** : possédant de nombreux allèles permettant de caractériser les différents individus,
- **codominant** : l'individu hétérozygote peut être distingué car il présente simultanément les caractères de ses parents homozygotes,
- **insensible au milieu**,
- **non épistatique**,
- **multiallélique**.

1.1.1. La technique RELP



Polymorphisme de longueur de fragment de restriction

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

Toute modification des séquences d'ADN (mutation, addition, délétion) réorganise fréquemment les sites de restriction. Lors de l'action d'enzymes de restriction, la taille des fragments de restriction est alors modifiée : on observe un polymorphisme.

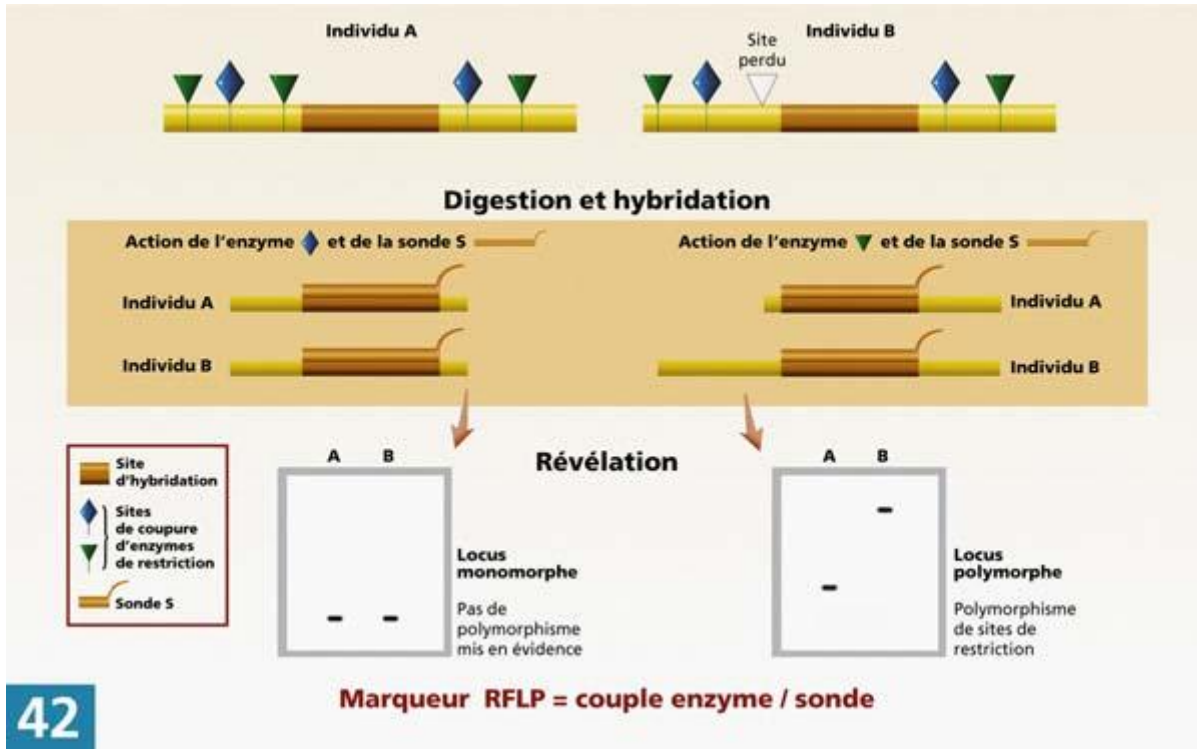
Les étapes de la technique

1. L'ADN de la plante est extrait.
2. Il est soumis à une digestion par une ou plusieurs enzymes de restriction. La taille des fragments obtenus est dépendante des enzymes utilisées.
3. Les fragments sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse. Lors de la digestion de l'ADN génomique, on visualise sur le gel une traînée appelée « smear », car il y a un grand nombre de fragments impossibles à séparer.
4. L'ADN est transféré par capillarité sous forme dénaturée (simple brin) sur une membrane de nylon. Cette technique de transfert permet de conserver la position relative des fragments d'ADN.
5. Cette membrane est mise en contact avec une solution contenant une sonde marquée soit

par la radioactivité, soit chimiquement. Cette sonde s'hybride alors avec le ou les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une homologie.

6. La position de l'hybridation est révélée en plaçant la membrane au contact d'un film sensible, ou en réalisant une réaction enzymatique colorée (selon le type de sonde utilisé). Ces trois dernières étapes de transfert, d'hybridation et de révélation correspondent à la technique de Southern.

1.1.2. Les marqueurs RFLP



Caractéristiques du polymorphisme

Comparons deux individus A et B. Leur ADN sera digéré séparément par des enzymes de restriction données, puis hybridé par une sonde S.

La digestion avec l'enzyme \blacklozenge donne des fragments de restriction identiques pour les deux individus. Les deux profils révélés après électrophorèse ne permettent pas de les distinguer. Avec ce couple enzyme \blacklozenge - sonde S, aucun polymorphisme n'est mis en évidence.

En revanche, pour l'enzyme \blacktriangledown , l'individu B présente une mutation au niveau d'un site de restriction, entraînant la perte de ce site. Ainsi, par digestion, l'individu A donne un fragment plus petit que celui de l'individu B. On révèle le polymorphisme entre les deux individus : un fragment rapide pour A et un plus lent pour B. Ce couple enzyme \blacklozenge - sonde S révèle un

polymorphisme.

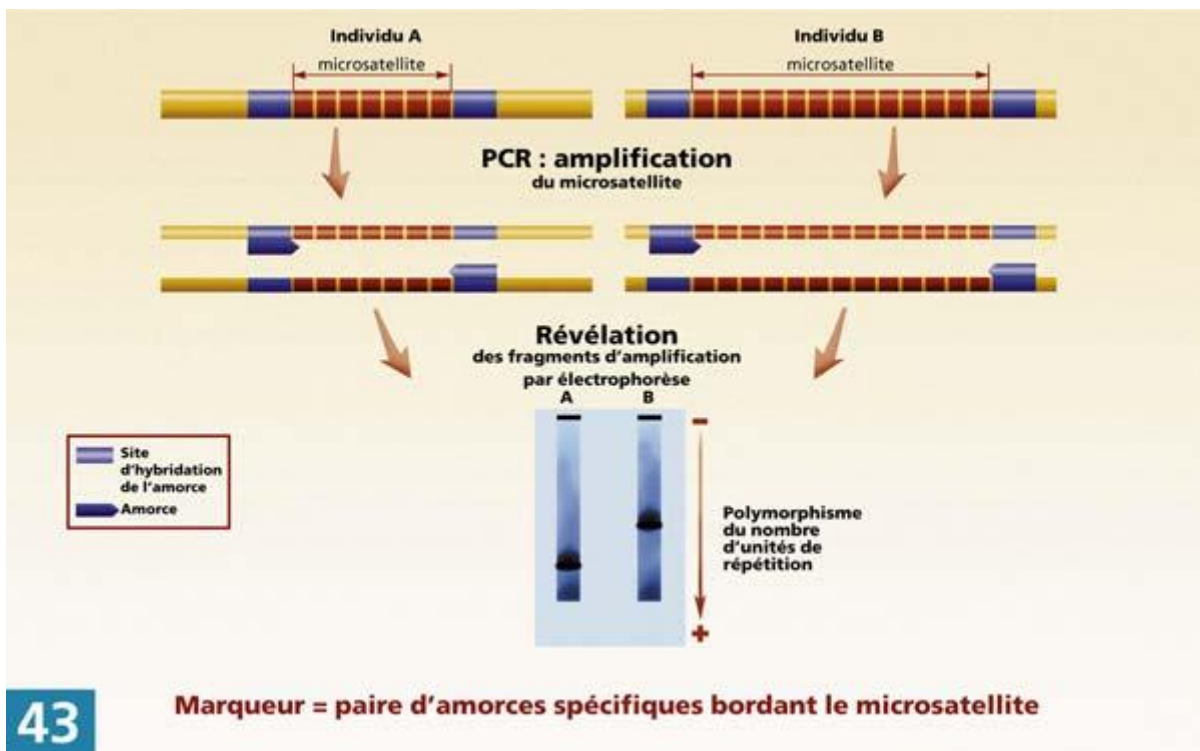
Création de marqueurs

C'est le couple enzyme/sonde qui constitue le marqueur. La sonde révèle un locus polymorphe ou monomorphe. Les enzymes de restriction permettent de visualiser le nombre d'allèles détectables à ce locus dans une population. Chez le maïs, 95 % des sondes utilisées sont polymorphes, alors que chez le blé, plante autogame, 5 à 10 % des sondes seulement sont polymorphes.

Utilisation de la technique

Cette technique de marquage moléculaire est très utilisée, car elle fournit des profils peu complexes permettant de caractériser l'empreinte génétique d'une plante ou de construire une carte génétique. Elle est fiable, les résultats observés peuvent être répétés. Toutefois, elle est lourde à mettre en oeuvre : l'étape de transfert et d'hybridation empêche une automatisation du travail.

1.1.3. Les marqueurs microsatellites



Polymorphisme de nombre d'unités de répétition

Sur le génome, il existe des séquences constituées d'unités répétées de 1 à 4 nucléotides. Ce sont les microsatellites. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n et (GATA)_n, les valeurs

de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. On parle de séquences répétées en tandem ou SSR (Simple Sequence Repeats). L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme. Celui-ci repose sur la variation du nombre d'unités de répétition, constituant le microsatellite.

Les étapes de la technique

C'est la technique de PCR qui est utilisée pour révéler le polymorphisme des microsatellites. Une paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche d'un microsatellite est utilisée pour amplifier le même microsatellite chez différents individus. En effet, chaque microsatellite est bordé par des séquences uniques qui lui sont propres. Les fragments d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse.

Un individu B, possédant plus d'unités de répétition que A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A.

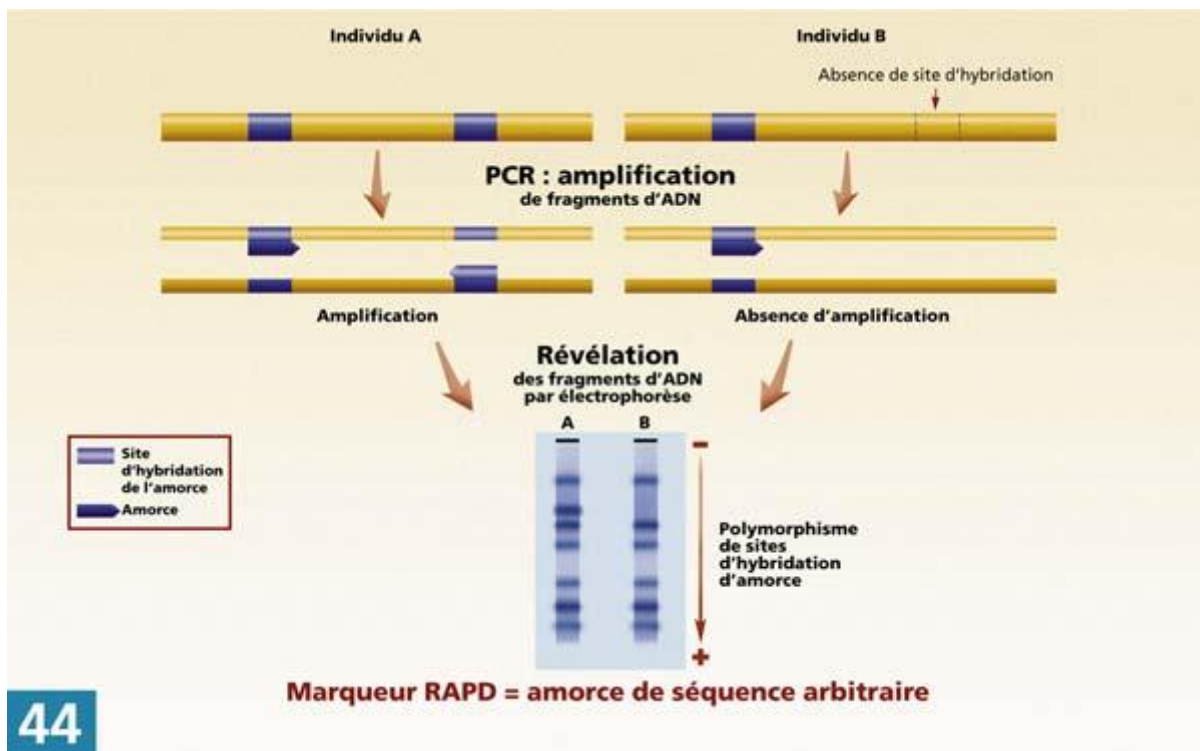
Création de marqueurs

C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur.

Utilisation de la technique

C'est une technique qui nécessite une préparation préalable assez lourde. Il faut en effet connaître, synthétiser et tester les amorces bordant le microsatellite. En revanche, elle est simple d'utilisation car reposant simplement sur une PCR. Elle permet de développer de nombreux marqueurs, notamment sur le maïs ou le colza. Toutefois, elle n'est pas applicable à toutes les espèces, la tomate par exemple ne possède pas de polymorphisme pour les microsatellites.

1.1.4. Les marqueurs RAPD



Polymorphisme de nombre d'unités de répétition

Sur le génome, il existe des séquences constituées d'unités répétées de 1 à 4 nucléotides. Ce sont les microsatellites. Les plus courants sont $(A)_n$, $(TC)_n$, $(TAT)_n$ et $(GATA)_n$, les valeurs de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. On parle de séquences répétées en tandem ou SSR (Simple Sequence Repeats). L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme. Celui-ci repose sur la variation du nombre d'unités de répétition, constituant le microsatellite.

Les étapes de la technique

C'est la technique de PCR qui est utilisée pour révéler le polymorphisme des microsatellites. Une paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche d'un microsatellite est utilisée pour amplifier le même microsatellite chez différents individus. En effet, chaque microsatellite est bordé par des séquences uniques qui lui sont propres. Les fragments d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse.

Un individu B, possédant plus d'unités de répétition que A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A.

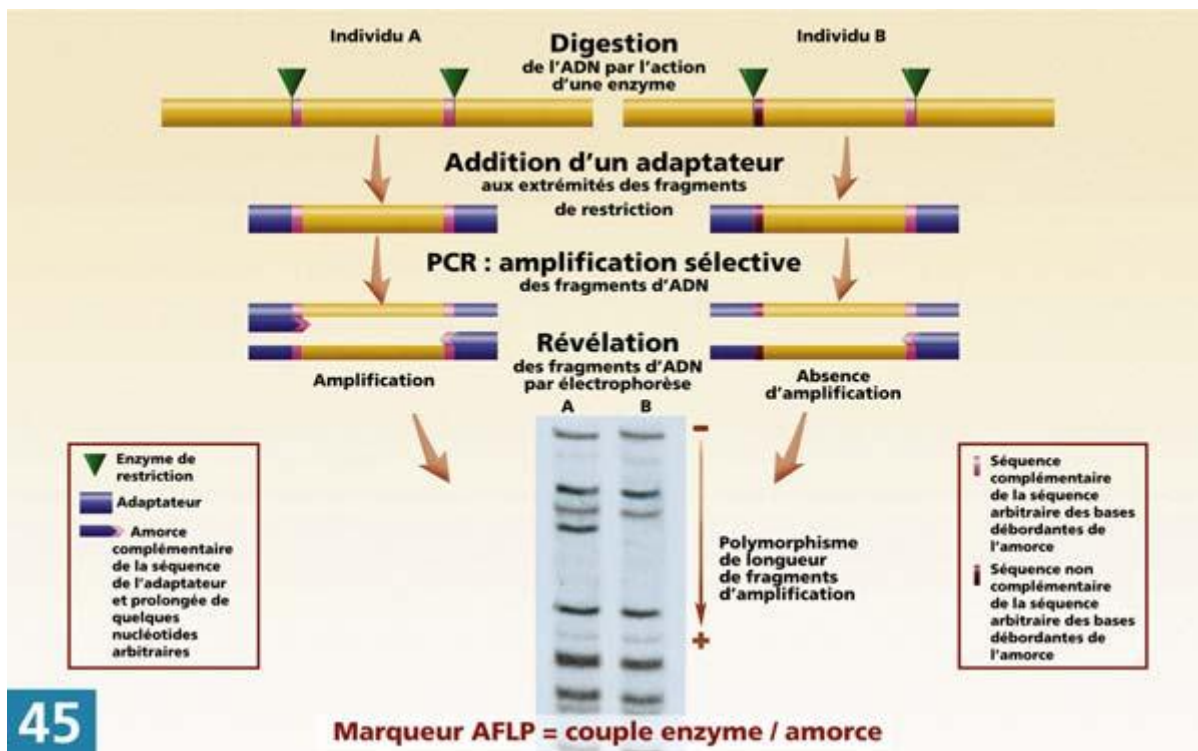
Création de marqueurs

C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur.

Utilisation de la technique

C'est une technique qui nécessite une préparation préalable assez lourde. Il faut en effet connaître, synthétiser et tester les amorces bordant le microsatellite. En revanche, elle est simple d'utilisation car reposant simplement sur une PCR. Elle permet de développer de nombreux marqueurs, notamment sur le maïs ou le colza. Toutefois, elle n'est pas applicable à toutes les espèces, la tomate par exemple ne possède pas de polymorphisme pour les microsatellites.

1.1.4. Les marqueurs AFLP



Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification

(Amplification Fragment Length Polymorphism)

Cette technique est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire.

Les étapes de la technique

L'ADN de la plante est soumis à une digestion par des enzymes de restriction. Les tailles des fragments obtenus sont dépendantes des enzymes utilisées.

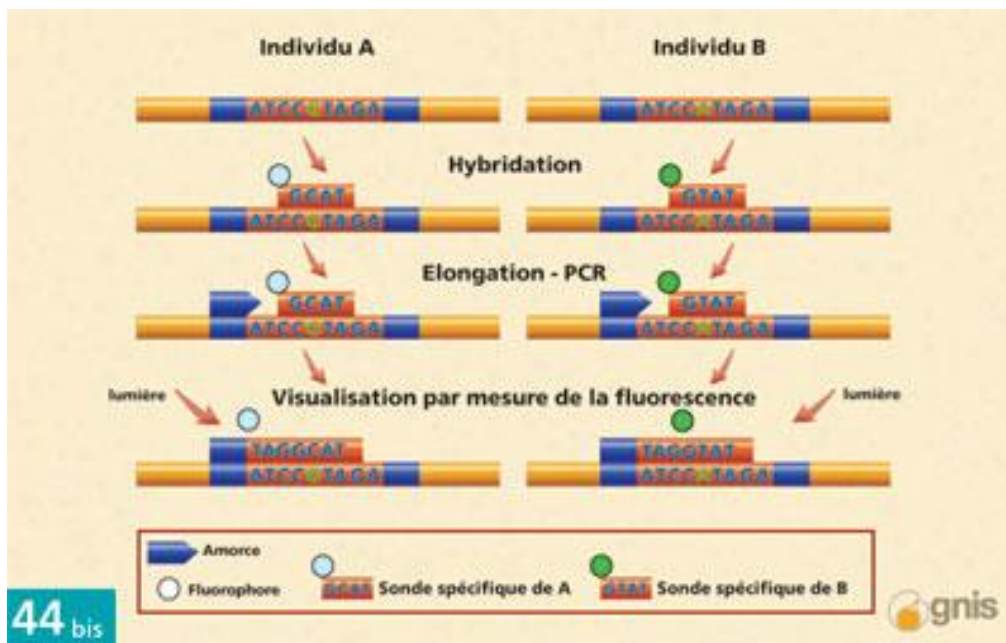
Ensuite, il y a addition aux extrémités des fragments de restriction d'adaptateurs nucléotidiques spécifiques des enzymes de restriction utilisées. Ils sont de séquences connues.

Les fragments sont ensuite amplifiés par PCR. On utilise comme amorce un oligonucléotide complémentaire de la séquence de l'adaptateur, prolongé de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3) appelés bases débordantes. Seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Il s'agit donc d'amorces sélectives permettant de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine : sans ces séquences débordantes, il y aurait amplification de milliers de fragments. Les bandes sont visualisées par électrophorèse.

Création de marqueurs

C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus. Celle-ci constitue le marqueur AFLP. Le locus mis en évidence dépend de la séquence du site de l'enzyme de restriction et des bases arbitraires. Il existe de très nombreuses combinaisons enzyme/amorce. En effet, on dispose d'une dizaine d'enzymes de restriction et il existe de très nombreuses amorces d'amplification par combinaisons de 3 bases débordantes.

1.1.5. Marqueurs SNP



Polymorphisme mononucléotidique : SNP (Single Nucleotide Polymorphisme)

Les récents progrès en matière d'analyse de séquences d'ADN et la mise au point de méthodologies à haut débit ont rendu possible l'identification et l'analyse de la variation nucléotidique à grande échelle.

Le marquage moléculaire par SNP permet de repérer les différences au niveau d'un nucléotide dans une séquence d'ADN.

Cette technique consiste à hybrider sur l'ADN cible une sonde complémentaire portant une molécule fluorescente (le fluorophore). Chaque sonde est spécifique d'une séquence d'ADN donnée.

La deuxième étape consiste en une élongation par action de la Taq polymérase (PCR). Cette enzyme ajoute à l'extrémité des amorces des oligonucléotides présents dans le milieu de réaction et libère les fluorophores fixés sur les sondes.

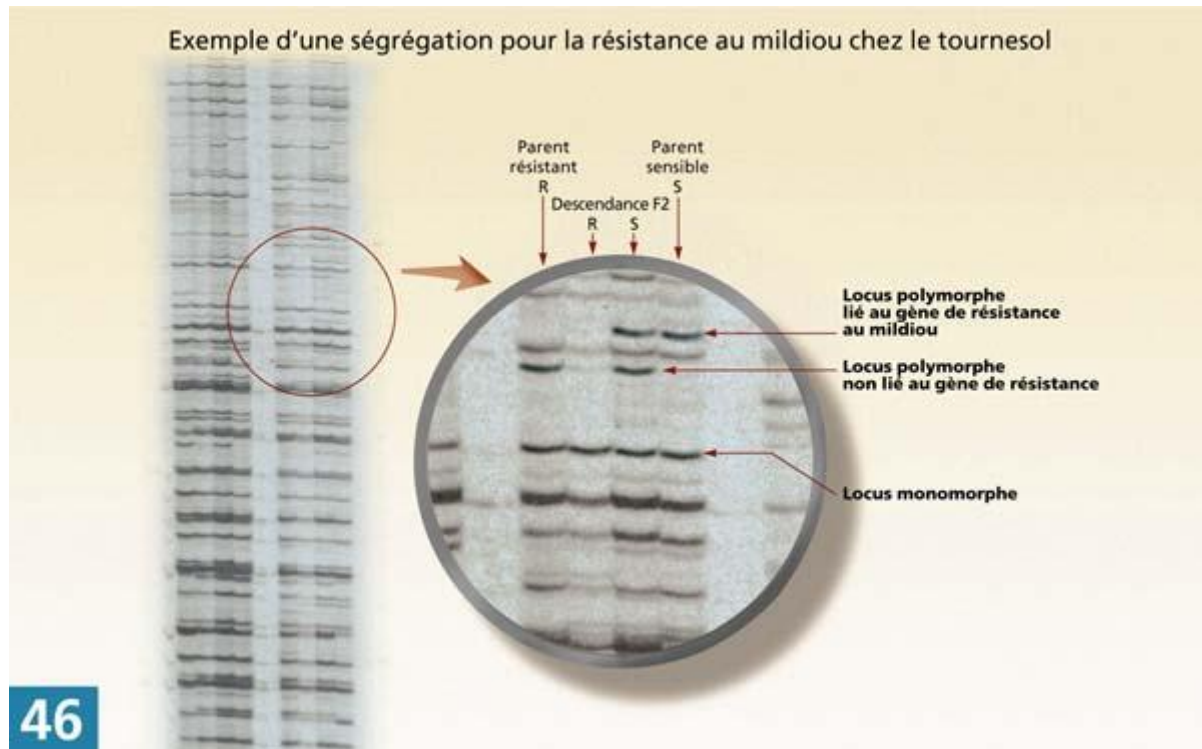
Enfin, une visualisation par excitation et quantification du fluorophore, à une longueur d'onde qui lui est propre, est réalisée. Les individus A et B ne révèlent pas la même fluorescence, ils ont donc un polymorphisme au niveau d'un nucléotide.

- Utilisation de la technique

Cette technologie qui permet d'éliminer entièrement les étapes de séparation de taille par électrophorèse présente un potentiel d'automatisation très supérieur aux technologies

précédentes (RFLP, RAPD, AFLP, SSR...). Elle peut donc être réalisée à très haut débit. Le marquage SNP ou Snip permet d'obtenir des résultats précis pour différencier des allèles entre individus.

1.1.6. L'analyse d'un profil AFLP



Caractéristique du polymorphisme

Sur les quatre pistes est mise en évidence la ségrégation pour la résistance du tournesol au mildiou. Sur la piste de gauche, c'est le parent résistant (R), sur la piste de droite le parent sensible (S).

Sur les deux pistes centrales figurent les individus F2 : la deuxième piste en partant de la gauche correspond à l'ADN en mélange des descendants F2 résistants et la troisième piste à l'ADN en mélange des descendants F2 sensibles.

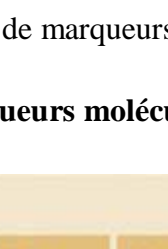

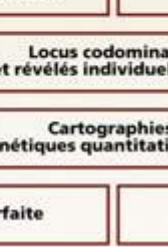
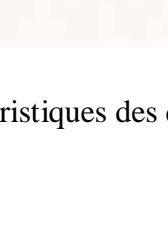
Parmi la centaine de fragments d'amplification séparés par électrophorèse, on peut visualiser des locus polymorphes. Il est notamment possible de mettre en évidence des bandes présentes chez le parent sensible et absentes chez le résistant, et inversement. Cette distinction se retrouve également dans la descendance. Ces locus sont donc liés au gène de résistance par absence ou présence de bande.

Les autres locus soit ne révèlent pas de polymorphisme, soit révèlent des marqueurs polymorphes mais ne permettent pas de faire la distinction entre les individus sensibles et les individus résistants, ils ne sont donc pas liés à la résistance.

Utilisation de la technique

Elle est utilisée notamment pour la sélection de lignées, et pour la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène en vue de son clonage, c'est-à-dire pour positionner dans cette région un grand nombre de marqueurs.

1.1.7. 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

Le tableau reprend les caractéristiques des quatre types de marqueurs moléculaires évoqués précédemment :

- Caractéristiques techniques

Le type et le nombre de tels marqueurs disponibles dans le monde végétal, le polymorphisme révélé par ces techniques.

- Caractéristiques génétiques

Les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus : une sonde RFLP révèle un locus (polymorphe ou pas), de même les amorces des microsatellites n'amplifient qu'un seul microsatellite. En revanche, par les techniques de RAPD ou AFLP, il y a amplification aléatoire d'une séquence, et elles révèlent donc conjointement plusieurs locus.

Les marqueurs RFLP et microsatellites sont codominants, c'est-à-dire qu'il est possible de différencier les individus hétérozygotes des deux types homozygotes. En effet, les individus hétérozygotes sont visualisés par deux bandes. En revanche, pour les techniques RAPD ou AFLP, on révèle un polymorphisme de présence ou d'absence de sites d'hybridation et non un polymorphisme de longueur de fragments. Dans ce cas, il y a ou il n'y a pas amplification du fragment.

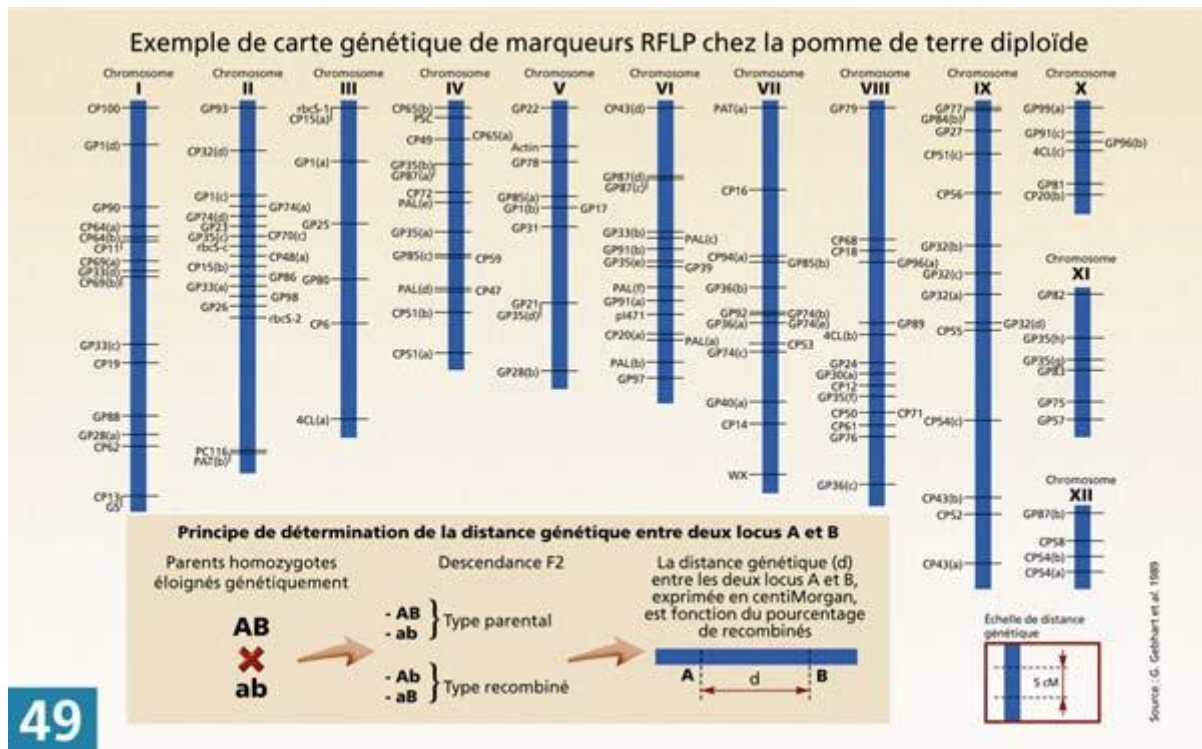
La présence d'une bande signifie que l'individu possède un ou deux allèles "présence de bande", c'est-à-dire que l'on ne peut pas différencier l'hétérozygote de l'homozygote "présence de bande". L'absence de bande signifie par contre sans ambiguïté un individu homozygote pour l'allèle "présence de bande".

- Caractéristiques d'utilisation

Les deux premières techniques RFLP et microsatellites, de par leurs caractéristiques génétiques, sont utilisées pour réaliser les cartographies, et en génétique quantitative pour la détection de QTL. Les techniques de RAPD et AFLP servent à saturer fortement une région particulière du génome. Elles permettent de densifier le marquage au voisinage d'un gène d'intérêt et sont donc utilisées dans le cas de clonage positionnel ou de rétrocroisement.

1.2. Les cartes génétiques

La cartographie des marqueurs moléculaires



49

Les premières cartes génétiques partielles du maïs furent publiées en 1935, et réalisées à l'aide de marqueurs morphologiques.

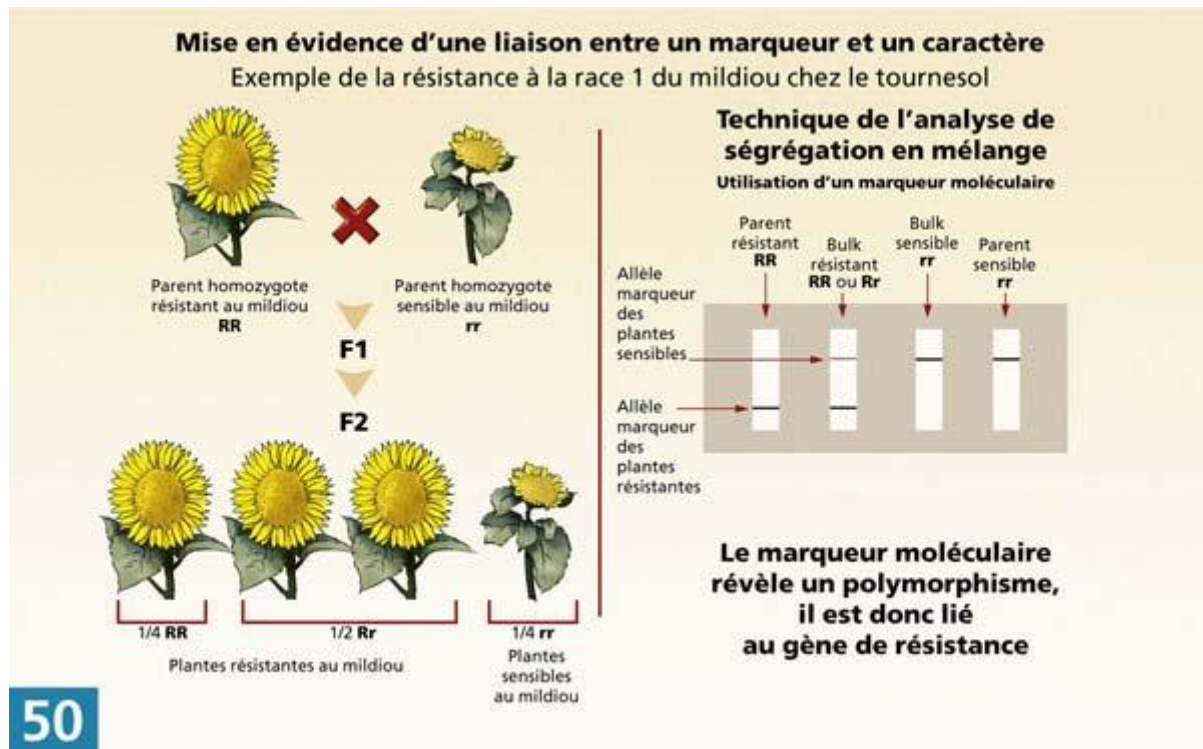
Les cartes génétiques permettent de représenter la disposition des gènes ou des marqueurs sur un chromosome.

La figure représente une carte génétique de la pomme de terre obtenue à partir de marqueurs RFLP. Les 141 marqueurs RLFP utilisés sont répartis sur les 12 chromosomes de la pomme de terre.

Principe d'établissement de cartes génétiques

On utilise les propriétés de la ségrégation des gènes. Le plus couramment, on utilise une descendance issue de deux parents homozygotes. On obtient en génération F2 une descendance en ségrégation, c'est-à-dire où l'on observe une séparation des caractères des deux parents et donc aussi une ségrégation au niveau des marqueurs. En effet, à la méiose, les chromosomes non homologues ségrègent indépendamment. Il en est de même pour les gènes portés par ces chromosomes. En revanche, des gènes portés par un même chromosome ne ségrègent pas indépendamment, et cela d'autant moins qu'ils sont plus proches. Ce sont ces propriétés que l'on met à profit pour estimer la position des marqueurs. Lorsque l'on constate que des marqueurs ne ségrègent pas indépendamment dans une descendance, on dit qu'ils sont liés.

2.1. La cartographie d'un gène majeur



Localiser les gènes majeurs

Quand un caractère est dû à l'effet d'un gène principal, on parle de gène majeur. L'apparition des marqueurs moléculaires a permis l'élaboration de méthodologies pour localiser ces gènes. Le principe est le même que celui servant à l'élaboration des cartes génétiques. Plus la distance qui sépare un marqueur moléculaire et un gène d'intérêt sur la carte génétique est faible, plus la probabilité qu'ils soient transmis séparément à la descendance est infime.

Exemples

De nombreux gènes majeurs ont déjà été localisés. On peut citer par exemple : des gènes de qualité codants pour une protéine de réserve du blé, codants pour le taux en acide érucique chez des oléagineux, des gènes de nanisme chez le maïs ou le colza, des gènes de résistance aux champignons chez la tomate, la laitue, le blé, le tournesol, dont le gène P11 impliqué dans la résistance à la race 1 du mildiou, des gènes de résistance aux virus chez la pomme de terre, l'orge, des gènes de résistance aux nématodes chez la betterave, des gènes de restauration de la stérilité mâle cytoplasmique chez le colza et le tournesol.

Détection de la liaison

Elle consiste à choisir des parents suffisamment polymorphes pour le caractère agronomique et à observer dans la descendance la ségrégation des caractères phénotypiques et du génotype des marqueurs moléculaires.

Une des populations qui peut être retenue pour l'analyse de la ségrégation pour un gène majeur est une descendance F2 issue de deux parents homozygotes.

Dans le cas d'un gène de résistance, il s'agit du croisement d'un parent sensible et d'un parent résistant. Ainsi en F2, on observe un quart d'individus sensibles et trois quarts de résistants. L'idée qui a été émise par Michelmore et al. en 1991 est de regrouper l'ADN des individus F2 sensibles et l'ADN des individus F2 résistants. Cette technique est appelée BSA, Bulk Segregant Analysis, c'est l'analyse de ségrégation en mélange.

Le génotype du marqueur est ensuite déterminé. Si le marqueur testé est lié au gène de résistance, les plantes sensibles portent l'allèle marqueur caractéristique des plantes sensibles. En revanche, les individus résistants sont soit homozygotes pour le gène de résistance, soit hétérozygotes, il en va donc de même pour leur génotype du marqueur. Ainsi, en mélange, les individus résistants présentent au moins l'allèle marqueur caractéristique des plantes résistantes.

Apport à la sélection

La mise en évidence d'une liaison entre un marqueur moléculaire et un gène majeur est une aide précieuse pour le sélectionneur. Comme un fragment de feuille suffit à obtenir l'ADN nécessaire pour établir l'empreinte génétique d'une plante, un tri précoce et précis peut être envisagé dès le début de la croissance des plantes. Ceci permet un gain de temps, il n'est pas nécessaire d'attendre la visualisation phénotypique du gène.

On peut ainsi cribler une collection de géniteurs et déterminer si par exemple des plantes possèdent une source de résistance.

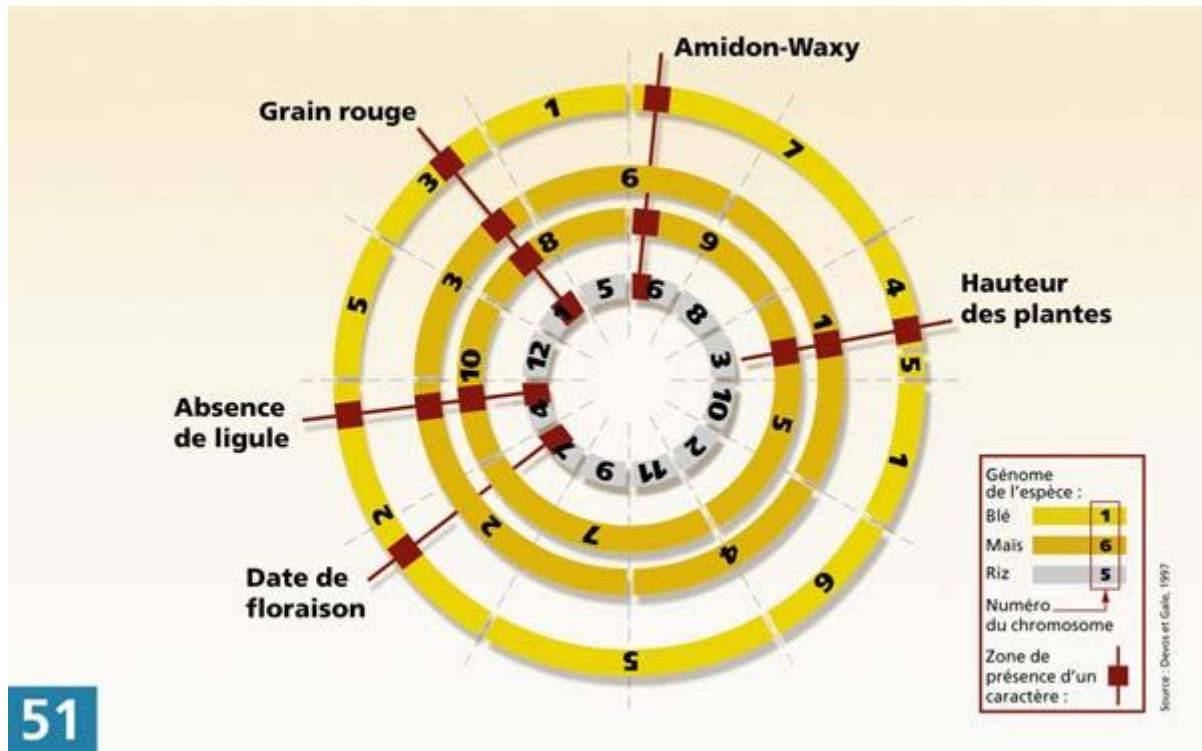
D'autre part, par le biais de marqueurs moléculaires, il est possible d'identifier les plantes hétérozygotes, donc porteuses d'un gène récessif dont le phénotype n'est pas observable.

Analyse fine de la structure du gène

L'objectif final est le clonage du gène et l'analyse de son mode d'action. Ceci fait appel à des techniques de biologie moléculaire, appelées clonage positionnel. Cette caractérisation fine de la structure du gène permet également de faciliter une sélection précoce. L'isolement de ce gène rend

aussi possible son transfert par génie génétique vers d'autres espèces.

1.2.2. La cartographie comparée



Lorsque, entre des espèces, il y a conservation des relations de proximité entre des marqueurs sur les chromosomes, on parle de synténie. Il existe donc des similitudes de séquences codant pour une même protéine et même une similitude de localisation chromosomique de ces gènes semblables entre espèces différentes.

Exemples

Une bonne conservation des groupes de liaisons et de l'ordre des marqueurs a été observée entre le riz, la canne à sucre, le sorgho, le maïs, et les céréales à paille comme le blé, l'orge, le seigle et l'avoine. La figure montre la conservation de quelques gènes sur les trois espèces riz, maïs et blé. Par exemple, le gène waxy, responsable de la synthèse d'amidon à chaîne linéaire, se trouve sur le chromosome

6 du riz, 9 du maïs, et 7 du blé. Il s'agit donc de régions homologues.

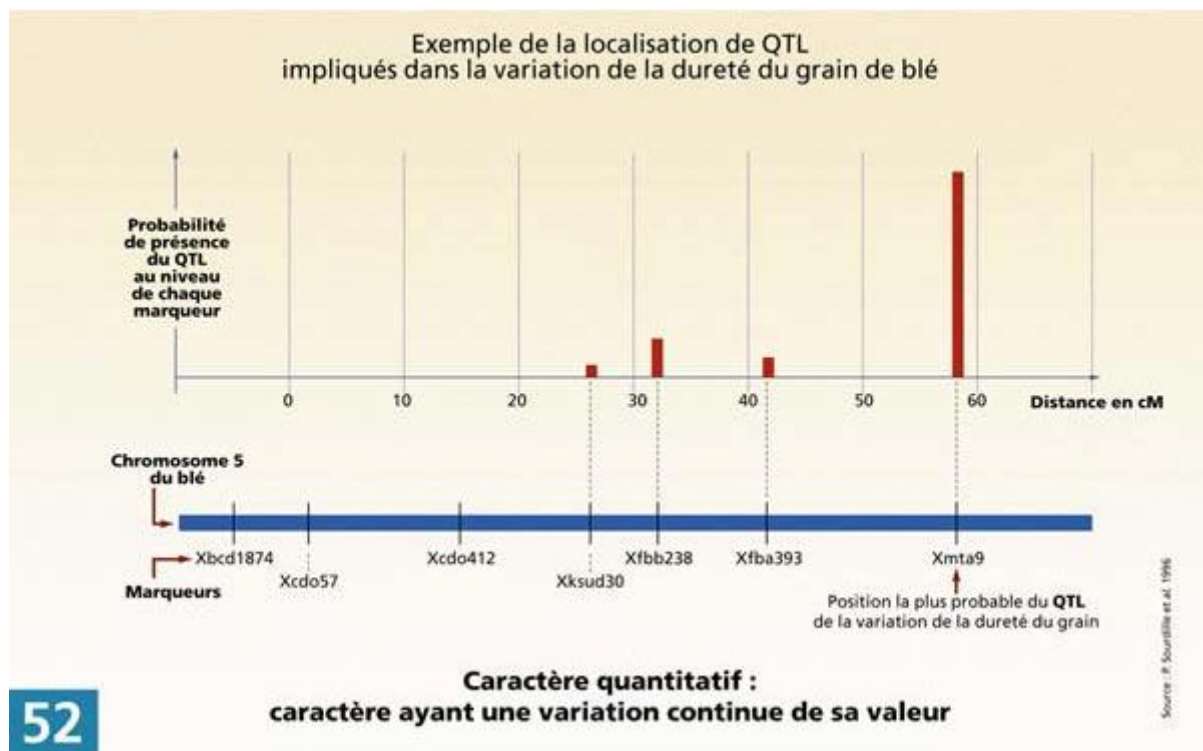
On constate également au sein du génome du maïs des homologies. Le chromosome 5 par exemple a une homologie avec le chromosome 1.

On a montré également que le génome de la tomate et de la pomme de terre sont colinéaires. Il n'y a aucune inversion de l'ordre des gènes de 9 des 12 chromosomes. Seule une inversion paracentrique des 3 derniers chromosomes est observée. Cette synténie se retrouve aussi avec le piment, toutefois les remaniements sont plus nombreux.

Décloisonnement

Cette constatation fait de la cartographie comparée un outil majeur pour décloisonner les programmes de recherche. Un travail réalisé sur une espèce peut ainsi trouver une application rapide et directe sur de nombreuses espèces.

1.2.3. La cartographie d'un caractère quantitatif



Qu'est-ce qu'un caractère quantitatif ?

De très nombreux caractères sont des caractères mesurables comme le rendement, la précocité, la taille, la qualité des fruits. On observe une variation continue de leur valeur. Dans ce cas, il n'y a plus d'opposition absolue entre deux phénotypes comme, par exemple : résistant/sensible. On admet que plusieurs secteurs chromosomiques, portant un ou plusieurs gènes, sont impliqués dans le contrôle de ces caractères dits quantitatifs, et que de nombreux allèles sont responsables de la variabilité. Ces locus sont appelés QTL : Quantitative Trait Loci (Locus de

Caractères Quantitatifs).

Exemple de la localisation de QTL impliqués dans la variation de la dureté du grain de blé

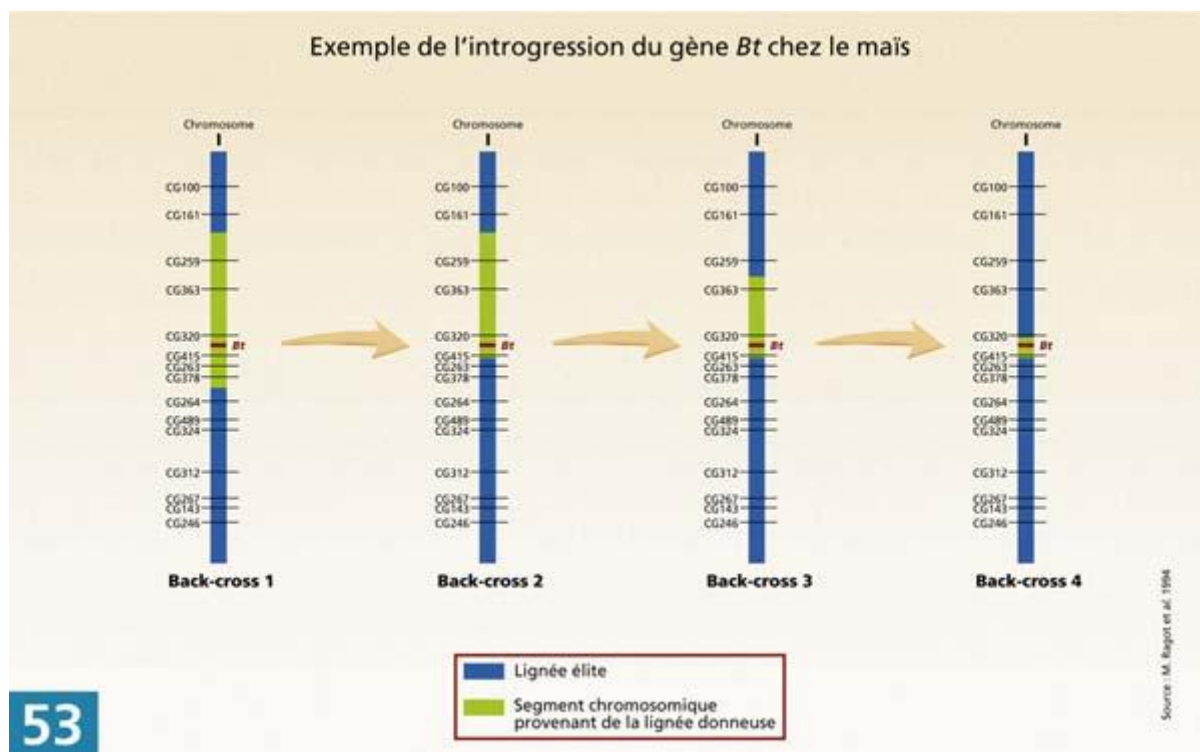
Un des facteurs affectant la qualité boulangère des blés cultivés est la dureté des grains. L'établissement de cartes génétiques sur le blé a permis d'identifier plusieurs QTL impliqués dans la variation de la dureté du grain. Un des QTL majeurs est situé sur le chromosome 5. La figure représente une carte génétique d'une partie du chromosome 5. En abscisse sont données les distances entre les marqueurs RFLP le long de ce bras de chromosome. A la taille des barres est associé un test de présence du QTL : la barre la plus grande correspond à la position statistique la plus probable du QTL. Ainsi, un QTL de la dureté du grain a été trouvé à proximité du marqueur Xmta9. C'est un marqueur du QTL.

Les apports à la sélection

Avec les QTL, il devient possible pour chaque individu d'associer une valeur à un segment chromosomique sur la base de la valeur génétique du QTL. Ainsi, une des premières applications est donc de prédire la valeur génétique d'une descendance, d'un croisement, grâce à la corrélation entre les marqueurs et le caractère quantitatif. On évalue donc plus précisément la valeur des individus candidats à la sélection.

Une autre application repose sur la mise en évidence d'allèles favorables au QTL. Il est alors possible de cumuler ces allèles dans un individu par rétrocroisement notamment. On parle alors de construction de génotypes.

3. La sélection assistée par marqueurs



Conversion assistée par marqueurs

Les rétrocroisements sont utilisés pour réaliser l'introgression d'un gène dans une variété élite. Cette opération est appelée également conversion. Mais en dépit d'un grand nombre de rétrocroisements, il reste toujours dans la lignée receveuse un plus ou moins grand segment du parent donneur autour du gène d'intérêt. Les marqueurs moléculaires sont souvent utilisés pour conduire la conversion car ils permettent de réduire les temps de sélection. En effet, par sélection classique, un minimum de 7 back-cross est nécessaire afin d'obtenir un retour vers le parent récurrent de 97 %. Avec l'aide des marqueurs moléculaires, quatre rétrocroisements suffisent pour arriver au même résultat car on peut à chaque génération choisir les plantes ayant recombiné le plus petit segment chromosomique.

Les marqueurs moléculaires sont ainsi beaucoup utilisés pour les conversions de lignées pour un transgène. A chaque génération, les plantes ayant récupéré le transgène sont sélectionnées sur la base de caractérisation à l'aide de marqueurs moléculaires.

Exemple de l'introgression du gène *Bt* chez le maïs

On réalise une série de back-cross entre la lignée élite et la lignée transformée génétiquement. Cette dernière est caractérisée par une insertion unique du gène *Bt* (transgène de résistance à la

pyrale) sur le chromosome 1.

Au cours des rétrocroisements, on peut sélectionner les individus porteurs du gène Bt, et ayant recombéné le plus petit fragment de la lignée donneuse autour du gène Bt. En effet, grâce aux marqueurs moléculaires, on sélectionne les individus ayant pour les marqueurs proches du gène, le génotype de la lignée élite.

De plus, il est également possible d'accélérer le retour vers le parent élite grâce aux marqueurs moléculaires répartis sur l'ensemble du génome. A chaque rétrocroisement, seront choisis les individus ayant le plus de fragments issus du parent élite récurrent.

A la quatrième génération, on obtient une lignée quasi isogénique de la lignée élite, c'est-à-dire identique à la lignée élite de départ, mais ayant intégré le gène Bt. Il y a donc bien gain de temps, donc d'efficacité.

4. La génomique

Les espèces modèles

Arabette
Riz

Les objectifs

- Localiser et séquencer les gènes
- Étudier la fonction des gènes

Les applications

Construction de génotypes élites

Par :

- la fourniture d'une grande quantité de marqueurs moléculaires
- un meilleur contrôle de la régulation des gènes
- l'identification de gènes candidats pour l'analyse des QTL de caractères majeurs
- l'identification d'allèles favorables

54

La nécessité de disposer de cartes de gènes et l'apparition des cartes à haute densité de marqueurs moléculaires ont fait naître des travaux de séquençage systématique du génome. On disposerait ainsi d'une représentation physique des chromosomes avec le positionnement des marqueurs et des gènes.

Le terme génomique regroupe les analyses qui consistent à localiser, isoler et séquencer les

gènes, puis à étudier leur fonction. Signalons que cette approche ne concerne pas uniquement les végétaux.

Les espèces modèles

L'Arabette ou *Arabidopsis thaliana* a été choisie comme espèce modèle pour les programmes de séquençage, car elle cumule un certain nombre de caractéristiques : un génome de taille réduite (100 à 130 mégabases), un cycle de développement rapide (2 mois), une reproduction autogame. Sur cette espèce, de nombreuses techniques sont facilement mises en œuvre comme la transgénèse. De plus, la structure de son génome est conservée dans les espèces apparentées. Les découvertes seront donc directement transposables sur le colza, notamment.

Le riz est également la plante modèle des graminées cultivées, car c'est la graminée cultivée au plus petit génome. De plus, elle possède une bonne synténie avec l'ensemble des autres espèces de ce genre.

Chez le maïs, il s'agit là d'un programme de grande ampleur car la taille du génome est plus importante. On estime que le nombre de gènes est environ 5 fois supérieur à celui d'*Arabidopsis*.

Le catalogue des gènes

Pour pouvoir accéder à la connaissance du génome des plantes modèles, un inventaire exhaustif des gènes a débuté selon deux approches :

- La première approche est basée sur l'inventaire des gènes exprimés. Les séquences caractérisées sont nommées EST (Expressed Sequence Tags).

Toutefois, cette approche a ses limites. En effet, un gène n'est pas toujours actif dans une cellule. Chez *Arabidopsis*, on estime que 50 % seulement des gènes ont pu être répertoriés par cette méthode.

- La seconde approche s'intéresse au séquençage direct du génome. Ce travail est plus long, mais peut donner la séquence complète des gènes et leurs positions.

Vers la construction de génotypes élités

La génomique devrait permettre d'accroître les connaissances dans le domaine végétal et donc d'identifier de nombreux gènes de plantes. Ainsi, les applications sont dans trois domaines :

- La fourniture d'une grande quantité de marqueurs moléculaires liés à des fonctions ou à des phénotypes. Ceci permet la réalisation de sélection assistée par marqueurs pour des caractères de qualité ou de valeur agronomique.

- Un meilleur contrôle de la régulation des gènes.
- L'identification d'un réservoir de gènes candidats pour l'analyse des QTL de caractères agronomiques majeurs.
- L'identification d'allèles favorables.

Diminuer la durée de création

Les coûts élevés de la recherche, les contraintes agronomiques des agriculteurs, les attentes des industriels et des consommateurs conduisent les sélectionneurs à diminuer constamment la durée de la création variétale. Dans ce chapitre, ce sont principalement les techniques d'haplodiploïdisation et de culture d'embryons immatures qui sont mises en avant. Mais toutes les techniques de biologie qui permettent de mieux connaître le génome et de transférer rapidement des gènes d'intérêt aboutissent également à des gains de temps essentiels

1. L'HAPLODIPLOÏDISATION

1.1. La fixation plus rapide du matériel génétique

1.2. Le principe de l'haplodiploïdisation

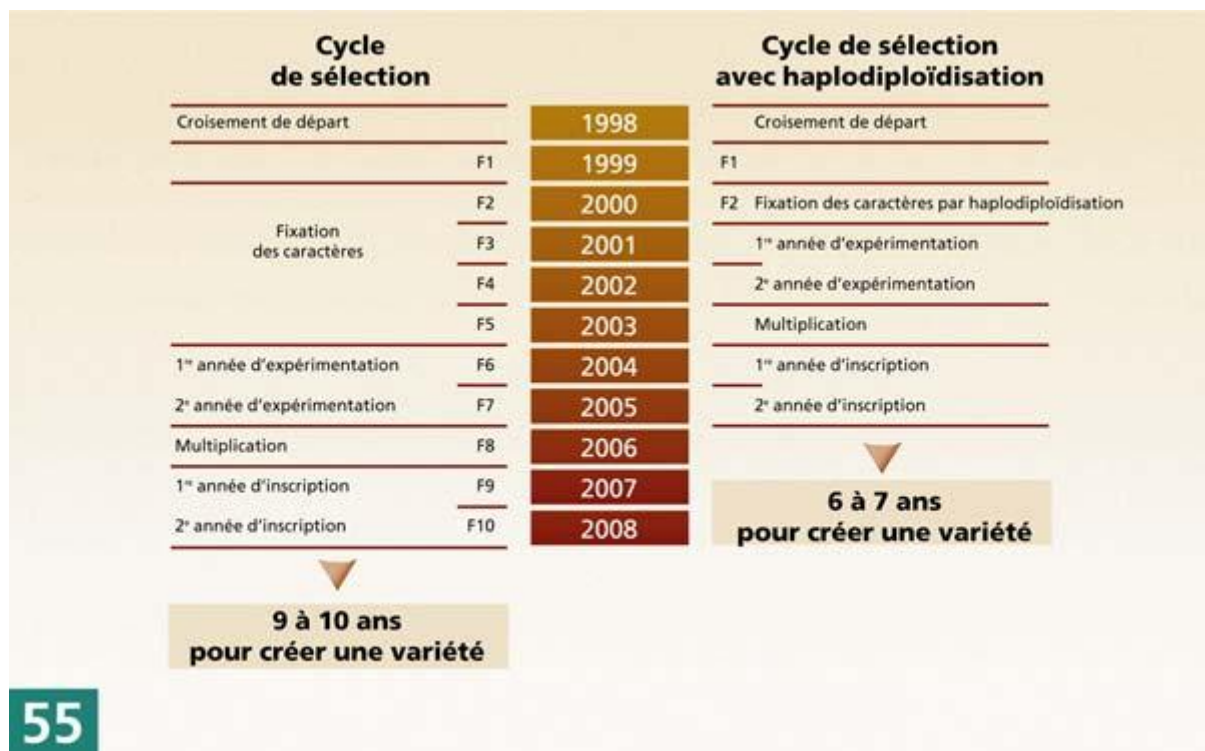
1.3. L'obtention d'haploïdes à partir des organes mâles

1.4. L'obtention d'haploïdes à partir des organes femelles

2. LA CULTURE D'EMBRYONS IMMATURES

1. L'HAPLODIPLOÏDISATION

1.1. La fixation plus rapide du matériel génétique



55

1.1.1. Obtention de lignées fixées en une seule génération

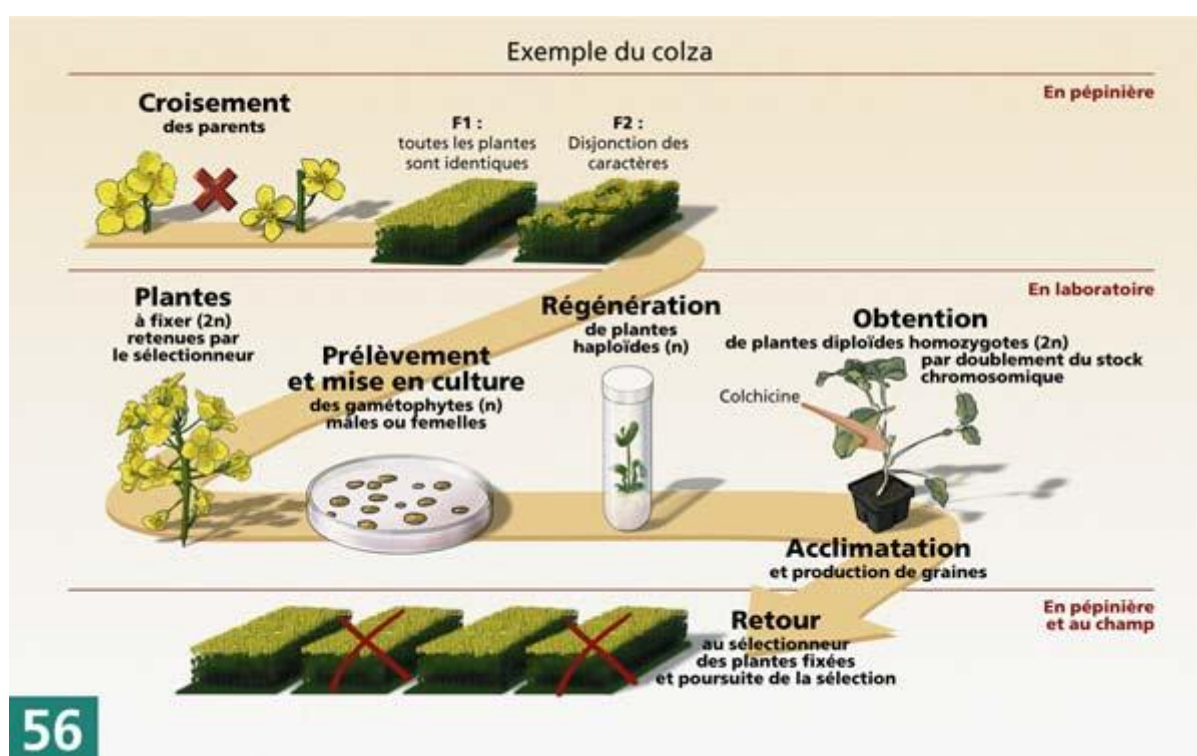
L'haplodiploïdisation est une méthode utilisée pour fixer plus rapidement le matériel génétique en cours de sélection. Elle repose sur l'obtention de plantes haploïdes (n) à partir des organes mâles ou femelles puis sur le doublement du stock chromosomique. Ainsi le sélectionneur va disposer de plantes diploïdes ($2n$) homozygotes où l'ensemble du génome est fixé. C'est donc une technique rapide de production de lignées pures en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations. Avec cette méthode, la durée d'un cycle de sélection est raccourcie de 3 à 4 ans. Cette technique présente en plus l'avantage de faciliter la sélection. En effet, le sélectionneur pourra faire un choix plus large, car l'haplodiploïdisation fixe les différentes recombinaisons possibles entre les caractéristiques des lignées parentales, et il pourra également faire un choix plus sûr car il possède un matériel homogène. Il y a donc séparation des deux phases de la création variétale : la fixation des caractères d'une part et la sélection des meilleures plantes d'autre part.

De plus, cette méthode permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants. Ceci est particulièrement intéressant en sélection.

1.1.2. Applications

Cette technique est largement utilisée chez l'asperge, le blé, le colza, l'orge, l'aubergine et le piment. La variété Florin est le premier blé français issu d'haplodiploïdisation inscrit en 1985, 7 ans après le croisement de départ entre les deux parents.

1. 2. Le principe de l'haplodiploïdisation



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.

1.2.1. 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.

1.2.2. 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'androgénèse. S'il s'agit de gamètes femelles, c'est la gynogénèse.

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.

1.2.3. 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.

1.2.4. 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.

1.2.5. En plus

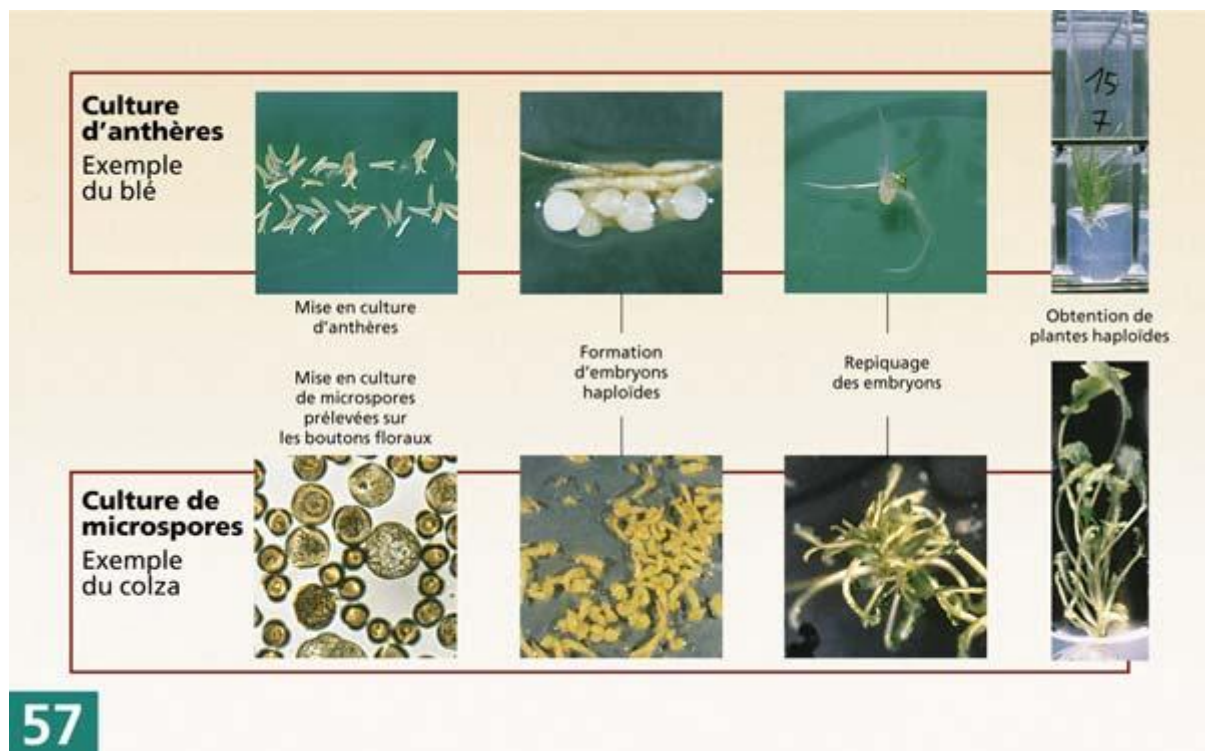
** Traitement à la colchicine :

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.

** 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.

1.3. L'obtention d'haploïdes à partir des organes mâles



L'androgenèse a été la première voie d'obtention d'haploïdes in vitro. Les plantes haploïdes ont été obtenues par culture d'anthères (sacs contenant le pollen). Plus récemment, la culture de microspores (grains de pollen immatures) a été mise au point et tend à se développer.

1.3.1. Culture d'anthères

L'androgenèse est la voie d'haplodiploïdisation privilégiée chez le blé, car il est relativement facile de mettre en culture un très grand nombre d'anthères. Ainsi, cette technique a été mise en place dans les programmes de sélection du blé tendre. Les épis sont récoltés au stade montaison d'où les anthères sont extraites en conditions stériles. Elles sont mises en culture en boîte de pétri sur des milieux spécifiques, induisant le développement embryonnaire des microspores. Des examens cytologiques préalables sont nécessaires pour connaître le moment de prélèvement le plus favorable à ce développement. Les boîtes de pétri sont ensuite placées dans des chambres de culture où l'éclairage, la température et l'humidité sont contrôlés pour favoriser l'androgenèse. Quelques semaines après la mise en culture des anthères, les embryons haploïdes apparaissent. Ils sont prélevés sous loupe binoculaire et repiqués sur des milieux nutritifs permettant une différenciation des tissus et l'induction du développement de la plante. Les plantules bien développées sont à nouveau repiquées en tube. Cette voie androgénique a pu être mise au point également sur le colza, l'orge, l'asperge, le piment et l'aubergine, et son efficacité pour la sélection de ces espèces a pu être démontrée.

1.3.2. Culture de microspores

La culture d'anthères n'est pratiquement plus utilisée chez le colza, en raison du progrès apporté par la culture de microspores.

Les boutons floraux sont sélectionnés sur les inflorescences. Les grains de pollen immatures sont isolés mécaniquement par broyage des boutons, et filtration de la suspension. On induit directement la formation d'embryons par la culture des microspores en milieu liquide agité. A partir d'embryons de trois semaines, il est ensuite possible de régénérer des plantes. Les rendements en embryons sont assez élevés chez le colza de l'ordre de 80 à 200 embryons par anthère. La variété de colza d'hiver Goéland, inscrite en 1990, est issue de cette technique, également utilisée sur maïs, blé, orge, riz et tabac.

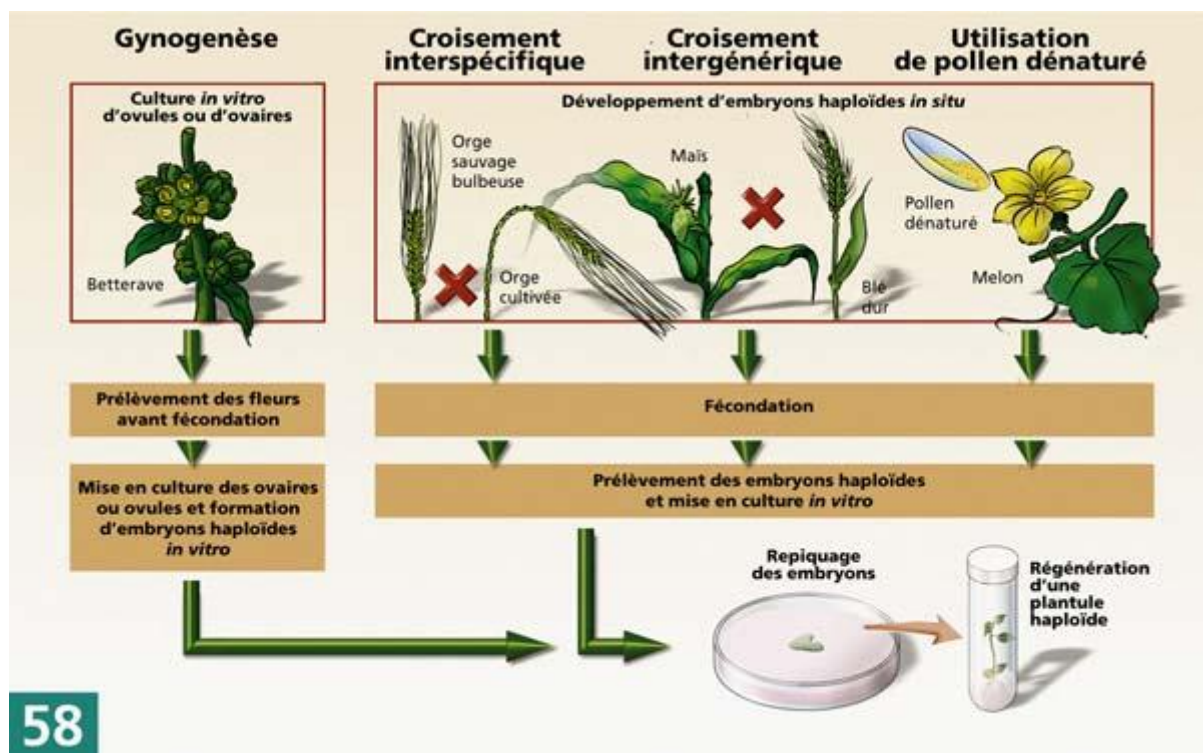
1.3.4. Application particulière à la production d'hybrides chez l'asperge

L'androgénèse a été particulièrement exploitée chez l'asperge, car elle est le seul moyen efficace pour produire des variétés hybrides mâles.

L'asperge est une espèce dioïque, c'est-à-dire qu'elle possède des pieds mâles et des pieds femelles. Les plantes mâles sont recherchées en sélection, car elles sont précoces et plus productives.

Les pieds mâles sont Mm pour les chromosomes sexuels et les femelles sont mm. La voie de l'androgénèse permet d'obtenir soit des individus MM appelés super-mâles, soit des individus mm donc femelles. Les croisements de ces super-mâles avec des femelles donnent des individus mâles. Ainsi en sélectionnant et croisant des super-mâles avec des femelles, on peut créer des variétés hybrides mâles. De plus, ceci permet d'exploiter l'hétérosis, important chez cette espèce. La variété Andréas a été la première variété inscrite en France (1995) intégrant cette technique.

1.4. L'obtention d'haploïdes à partir des organes femelles



Chez un certain nombre d'espèces, comme l'asperge, il apparaît de façon spontanée, à de faibles fréquences, des graines polyembryoniques, où l'un des embryons est parfois haploïde. Mais l'utilisation de cette source haploïde reste très peu efficace. En revanche, des résultats intéressants ont été obtenus concernant l'obtention de plantes haploïdes par l'utilisation de

différentes sources de pollen, ce dernier ayant alors le simple rôle d'induire le développement de l'embryon.

1.4.1. Haploïdie induite par croisement interspécifique

Le croisement interspécifique entre une espèce cultivée et une espèce sauvage permet parfois de produire des plantes haploïdes. En effet, après fécondation au cours des premières divisions cellulaires, les chromosomes de l'espèce sauvage sont éliminés. On obtient ainsi un embryon haploïde ne comportant que les chromosomes de l'espèce cultivée. Cette méthode s'applique à l'orge, à la pomme de terre, ainsi qu'à quelques génotypes de blé.

Le croisement interspécifique de l'orge cultivée par l'orge sauvage bulbeuse permet l'obtention d'embryons haploïdes d'orge cultivée. La culture in vitro est alors nécessaire pour permettre à cet embryon de poursuivre son développement et de donner une plante.

Une application particulière est utilisée pour la sélection de la pomme de terre. La pomme de terre cultivée est tétraploïde ($4n = 48$).

La réduction du stock chromosomique est obtenue par pollinisation de la pomme de terre cultivée par une espèce sauvage *Solanum phureja*. Ce système permet d'obtenir des plantes diploïdes. Ces plantes peuvent être alors facilement croisées par des espèces sauvages, fréquemment diploïdes, ce qui permet de restaurer la tétraploïdie. Cette méthode est utilisée pour apporter de nouveaux caractères chez la pomme de terre cultivée.

1.4.2. Haploïdie induite par croisement intergénérique

Plus récemment, les croisements entre genres ont été étudiés. Les croisements de blé dur par du maïs offrent la possibilité de produire des plantes haploïdes chez le blé dur, espèce récalcitrante aux techniques de culture d'anthers.

1.4.3. Haploïdie induite par l'utilisation de pollen dénaturé

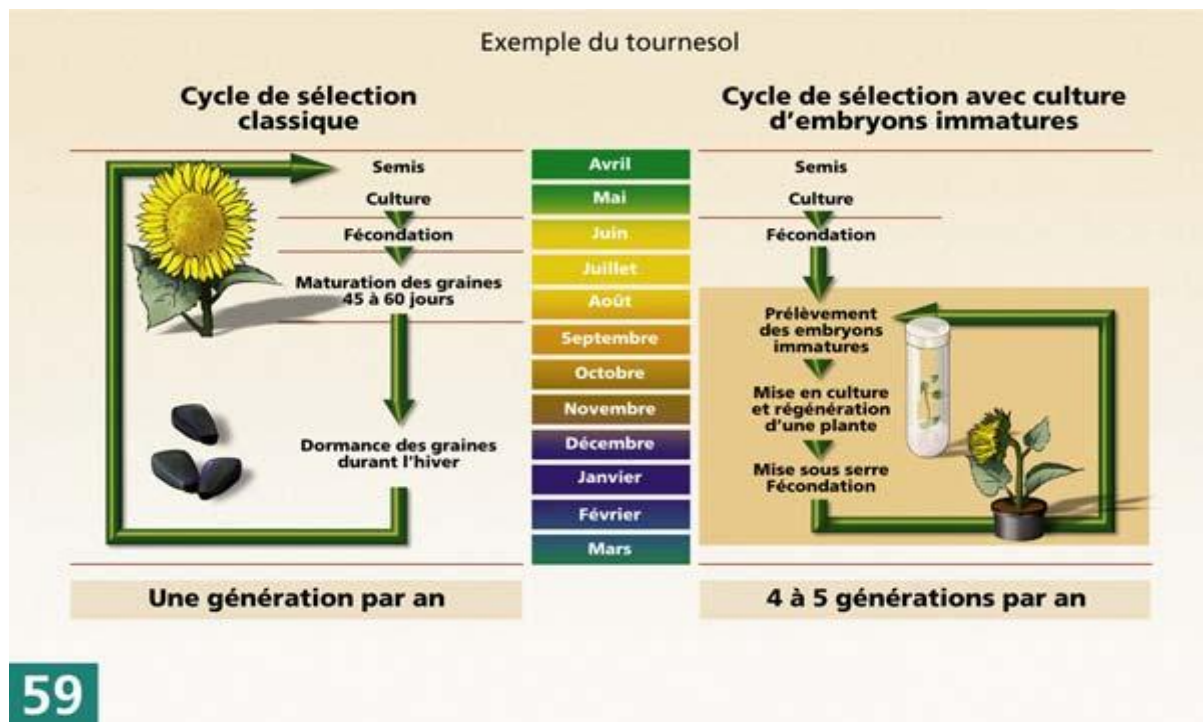
L'induction d'haploïdes est également possible par pollinisation avec du pollen dénaturé par irradiation. Cette technique s'est révélée utile pour tout un ensemble d'espèces légumières et est utilisée couramment chez le melon. L'étape de culture in vitro des embryons haploïdes est là aussi obligatoire.

1.4.4. Haploïdie induite par gynogenèse

Elle consiste à mettre en culture in vitro des ovules ou des ovaires prélevés sur la plante avant fécondation. Des plantes haploïdes ont pu être obtenues chez l'orge, le tabac, le blé, le riz, le maïs, la betterave.

Sur la betterave, la gynogenèse est la technique la plus opérationnelle de production d'haploïdes, même si on obtient moins de 8 % d'haploïdes. Elle permet notamment de travailler sur des betteraves mâles fertiles, aussi bien que sur des betteraves mâles stériles (contrairement à la culture d'anthers). Les fleurs sont disséquées sous la loupe binoculaire en conditions aseptiques. Les ovules sont déposés sur une boîte de pétri contenant un milieu inducteur et sont placés en chambre de culture. Après trois semaines, des embryons commencent à germer et sont transférés sur un milieu permettant le développement des plantules.

2. La culture d'embryons immatures



2.1. La réalisation de plusieurs générations par an

La technique de culture d'embryons immatures permet d'éviter la phase de maturation de la graine. En effet, par cette technique, les embryons sont prélevés quelques jours après la fécondation et non à maturité de la graine et cela permet ainsi de réaliser plusieurs générations

par an. Selon les espèces, les embryons sont prélevés plus ou moins tôt après la fécondation. En effet, un très jeune embryon risque d'avoir une croissance perturbée et plus lente, contrairement à un embryon plus développé qui est par ailleurs plus facile à prélever. Les embryons sont ensuite mis en culture pour régénérer une plante entière. La culture *in vitro* d'embryons permet de réduire fortement la dormance des graines fraîchement récoltées, et ainsi d'assurer un développement homogène des embryons. Cette technique permet donc un gain de temps, par réduction de la durée entre deux générations. On peut cultiver plusieurs générations par an et accélérer les procédures classiques de sélection : la fixation et la conversion de lignées, car plusieurs cycles d'autofécondations ou de rétrocroisements successifs peuvent être réalisés chaque année. Cette technique est très utilisée chez le tournesol et dans une moindre mesure chez le maïs.

2.2. Application au tournesol

La technique de culture d'embryons immatures est très pratiquée chez le tournesol où les phénomènes de dormance des graines sont particulièrement forts. Elle est particulièrement facile à mettre en œuvre, et permet d'obtenir 4 à 5 générations successives par an, au lieu d'une seule en culture normale, car le cycle végétatif est ramené à 80 jours. Elle est utilisée pour réaliser la fixation de lignées, la reconversion de lignées mâles fertiles en mâles stériles, ou l'introduction de gènes de résistance. Les jeunes graines sont prélevées 8 à 15 jours après la fécondation, selon le génotype. Elles sont désinfectées et disséquées. Les embryons ainsi isolés sont mis en culture en boîte de pétri. Au bout de 3 à 5 jours, on observe la formation de cotylédons chlorophylliens. Ils sont alors transférés en milieu d'enracinement, jusqu'à l'apparition d'un système racinaire assez développé. Les plantules ainsi obtenues sont alors mises en acclimatation puis repiquées sur terreau

Simplification de la technique pour le tournesol

Une technique simplifiée de sauvetage d'embryons de tournesol a également été mise au point. Toutes les étapes de l'extraction des graines du capitule jusqu'au repiquage sur terreau sont réalisées en conditions non stériles. Dans ce cas, les embryons immatures sont placés directement sur papier filtre imbibé d'une solution nutritive, jusqu'au développement des cotylédons.

