

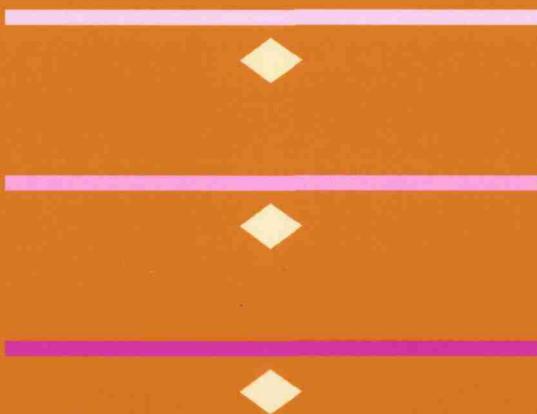
UNIVERSITÉS FRANCOPHONES



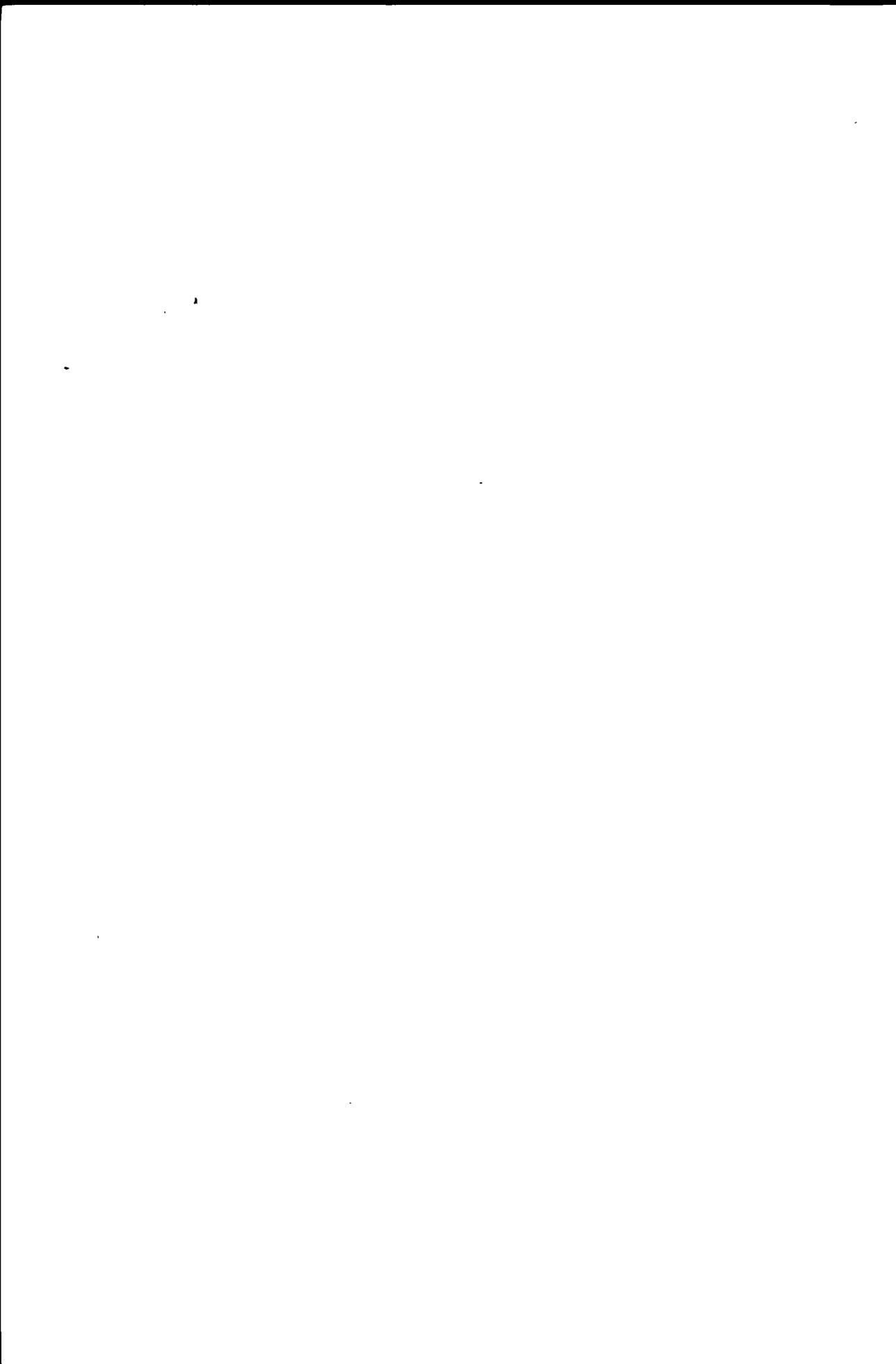
# AMÉLIORATION DES PLANTES ET BIOTECHNOLOGIES

2<sup>e</sup> édition mise à jour

Yves Demarly  
Monique Sibi



JOHN LIBBEY EUROTEXT - AUPELF • UREF



**AMÉLIORATION DES PLANTES  
ET BIOTECHNOLOGIES**

**British Library Cataloguing in Publication Data**

A catalogue record for this book is available from the British Library.

ISBN 2-7420-0102-6

**Éditions John Libbey Eurotext**

127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France

Tél : (1) 46.73.06.60

**John Libbey and Company Ltd**

13, Smiths Yard, Summerley Street,

London SW18 4HR, England

Tel : (1) 947.27.77

**John Libbey CIC**

Via L. Spallanzani, 11

00161 Rome, Italy

Tel : (06) 862.289

© 1996, John Libbey Eurotext, Paris

Il est interdit de reproduire intégralement ou partiellement le présent ouvrage — loi du 11 mars 1957 — sans autorisation de l'éditeur ou du Centre Français du Copyright, 6 *bis*, rue Gabriel-Laumain, 75010 Paris, France.

# **AMÉLIORATION DES PLANTES ET BIOTECHNOLOGIES**

**Pr Yves Demarly**

Laboratoire d'amélioration des plantes

Université de Paris-Sud, France

**Pr Monique Sibi**

ENSAIA

2. avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre, France



## Avant-propos

La diffusion de l'information scientifique et technique est un facteur essentiel du développement. Aussi dès 1988, l'Agence francophone pour l'enseignement supérieur et la recherche (AUPELF-UREF), mandatée par les Sommets francophones pour produire et diffuser revues et livres scientifiques, a créé la collection Universités francophones.

Lieu d'expression de la communauté scientifique de langue française, les Universités francophones visent à instaurer une collaboration entre enseignants et chercheurs francophones en publiant des ouvrages, coédités avec des éditeurs francophones, et largement diffusés dans les pays du Sud, grâce à une politique tarifaire préférentielle.

Quatre séries composent la collection :

- Les manuels : cette série didactique est le cœur de la collection. Elle s'adresse à un public de deuxième et troisième cycle universitaire et vise à constituer une bibliothèque de référence couvrant les principales disciplines enseignées à l'université.
- Sciences en marche : cette série se compose de monographies qui font la synthèse de travaux de recherche en cours.
- Actualité scientifique : dans cette série sont publiés les actes des colloques organisés par les réseaux thématiques de recherche de l'UREF.
- Perspectives francophones : s'inscrivent dans cette série des ouvrages de réflexion donnant l'éclairage de la Francophonie sur les grandes questions contemporaines.

Notre collection, en proposant une approche plurielle et singulière de la science, adaptée aux réalités multiples de la Francophonie, contribue efficacement à promouvoir la recherche dans l'espace francophone et le plurilinguisme dans la recherche internationale.

Professeur Michel Guillou  
Directeur général de l'AUPELF  
Recteur de l'UREF

# SOMMAIRE

## I.—Introduction

<b>L'amélioration des plantes: une science, un art.</b> . . . . .	1
<b>Profils de la création variétale</b> . . . . .	2
<b>Des lois de Mendel à la conception du système «linkat - réseau épigénique».</b> . . . . .	4
Richesse redondante de l'information végétale . . . . .	5
<i>Polyploïdie</i> . . . . .	5
<i>Linkat et batterie de gènes.</i> . . . . .	7
<i>Les pseudogènes et la notion d'allèles</i> . . . . .	7
Mécanismes de régulation du gène végétal . . . . .	8
<i>ADN répété</i> . . . . .	8
<i>Découpage introns-exons</i> . . . . .	8
<i>Transposons</i> . . . . .	9
<i>Organites cytoplasmiques.</i> . . . . .	11
Gestion des mécanismes régulateurs . . . . .	13
<b>Diversité des biotechnologies disponibles</b> . . . . .	15
Biotechnologies du clonage de l'individu . . . . .	15
Vitrovariants . . . . .	15
Haplodiploïdisation. . . . .	16
Hybridation somatique . . . . .	16
Génie moléculaire . . . . .	16

## II.—Amélioration des plantes : phases successives de la création d'une variété

<b>Un carrefour de disciplines</b> . . . . .	19
<b>Phase 1: gestion des ressources dans lesquelles sont choisis les génotypes travaillés.</b> . . . . .	20
Simple préservation des ressources . . . . .	21
Gestion dynamique des ressources . . . . .	22
Evaluation des ressources . . . . .	23
<b>Phase 2: modification des génotypes «bruts» issus des sources.</b> . . . . .	24
Hybridations sexuées intraspécifiques . . . . .	24
Hybridations sexuées interspécifiques . . . . .	25
Hybridations somatiques . . . . .	26
Transferts de gènes . . . . .	28

<b>Phase 3: sélection dans la diversité créée et stabilisation des types retenus</b> . . .	28
Stratégies progressives et douces de sélection et fixation . . . . .	29
<i>La population <math>F_2</math></i> . . . . .	29
<i>La sélection pédigrée.</i> . . . . .	29
<i>Massale pédigrée et reprise en lignées</i> . . . . .	30
<i>Méthode du «vrac» (méthode «bulk»)</i> . . . . .	30
<i>Méthode des descendances monograine ou monofruit.</i> . . . . .	32
Stratégies de sélection et de fixation brutales. . . . .	33
<i>Haplométhodes</i> . . . . .	33
<i>Méthodes par clonage végétatif.</i> . . . . .	35
<b>Phase 4: multiplication en nombre du génotype retenu</b> . . . . .	35
Cas simples chez les autogames et les espèces à multiplication végétative	35
Cas des espèces allogames . . . . .	36
Multiplication par clonage. . . . .	36
<b>Conclusion</b> . . . . .	38

### III.—Biotechnologies du clonage des génotypes : promotion de l'individu d'élite

<b>Les faits biologiques</b> . . . . .	45
Vitroplants . . . . .	45
<i>Fonctionnement des méristèmes et programme génétique</i> . . . . .	45
<i>Régénération des vitroplants</i> . . . . .	48
Embryogenèse somatique . . . . .	49
Semences artificielles . . . . .	50
<b>Résultats positifs actuels</b> . . . . .	52
Dans le domaine des vitroplants . . . . .	52
Pour les semences artificielles . . . . .	52
<b>Plus-values liées à la technologie des semences artificielles</b> . . . . .	54
Plus-values d'ordre génétique . . . . .	54
Plus-values d'ordre sanitaire . . . . .	55
Plus-values d'ordre dynamique . . . . .	56
Problèmes et perspectives . . . . .	56

#### IV.—Vitrovariations ou variations somaclonales

<b>Mise en évidence de la variabilité issue de culture <i>in vitro</i></b> . . . . .	59
Étapes successives. . . . .	59
Mémoire ou hérédité . . . . .	60
<b>Éléments de base de la variabilité</b> . . . . .	61
Fond génétique . . . . .	61
Durée de la culture <i>in vitro</i> . . . . .	62
Types de modifications . . . . .	63
<b>Régénération de plantes modifiées</b> . . . . .	63
Matériel mis en culture . . . . .	63
Organogenèse à partir de cellules aux potentialités différentes. . . . .	64
<b>Transmissibilité héréditaire des modifications.</b> . . . . .	64
Structure d'une plante . . . . .	64
Possibilité d'une hérédité des modifications . . . . .	66
<b>Type d'hérédité et niveau biologique impliqué : diagnostic génétique</b> . . . . .	67
Dénombrement chromosomique chez les plantes régénérées . . . . .	67
Analyse des autofécondations . . . . .	68
<i>Conformité au témoin</i> . . . . .	69
<i>Ségrégation de la descendance</i> . . . . .	69
<i>Phénotype variant homogène sur toute la descendance</i> . . . . .	69
Descendances des croisements réciproques . . . . .	70
<i>Identité des croisements réciproques</i> . . . . .	70
<i>Comportement dissymétrique des croisements réciproques</i> . . . . .	70
<i>Sélection gamétique et contrôle par effets différentiels</i> . . . . .	72
<i>Effets différentiels extrachromosomiques</i> . . . . .	72
<b>Vitrovariants de laitue et de tomate</b> . . . . .	75
Etudes cytologiques . . . . .	75
Analyse des descendances . . . . .	75
<i>Descendances d'autofécondation.</i> . . . . .	75
<i>Croisements diallèles.</i> . . . . .	76
<i>Autofécondation des produits de croisement</i> . . . . .	76
Hypothèse de l'épigénique . . . . .	76
<b>Conclusion.</b> . . . . .	77

## V.—Haploïdisation

<b>Les tissus sporogènes</b> .....	85
<b>Etude détaillée des divers cas d'obtention de plantes haploïdes</b> .....	87
Polyembryonie .....	87
Hybridations interspécifiques .....	88
Traitement des gamétophytes par irradiation .....	88
Androgenèse <i>in vitro</i> .....	89
<i>Effets du génotype</i> .....	89
<i>Etat physiologique de la plante donneuse</i> .....	90
<i>Stade de prélèvement des anthères</i> .....	90
Gynogenèse <i>in vitro</i> .....	93
<i>La procédure dans la gynogenèse</i> .....	93
<i>Identification de paramètres importants</i> .....	93
<b>Les haploïdes doublés</b> .....	94
Utilisation des haploïdes doublés .....	94
Variations liées aux techniques d'haploïdisation .....	96

## VI.—Hybridation somatique

<b>Signification de cette technologie</b> .....	99
<b>Etapas importantes de l'hybridation somatique</b> .....	99
Les protoplastes .....	99
La fusion .....	100
Identification et sélection des hétérofusions .....	103
<b>Présentation et évaluation d'une série de résultats</b> .....	104
Position actuelle .....	105
Analyse d'exemples .....	105
<b>Problèmes et remèdes</b> .....	110

## VII. — Biotechnologies de repérage et d'étiquetage des gènes

<b>Les diagrammes de restriction RFLP</b> .....	117
<b>Les sondes</b> .....	119
<b>Les amplifications de l'ADN : RAPD</b> .....	120
<b>Trois exemples d'utilisation des repérages moléculaires</b> .....	123
Différenciation des maïs hybrides américains .....	123
Les cultivars de piment analysés par RFLP .....	123
Le principe du marquage par transposons .....	124
<b>La sélection assistée par marqueurs (QTL : <i>quantitative trait locus</i>)</b> .....	124
<b>Les limites des biotechnologies de repérage</b> .....	126
<b>Conclusion</b> .....	126

## VIII.—Technologies des transformations moléculaires

<b>Signification de ces technologies</b> .....	129
<b>Les étapes du processus</b> .....	130
Repérage et «découpe» d'un gène intéressant chez le donneur .....	130
Clonage du gène .....	131
Vecteurs et transformations directes .....	132
Accompagnement du gène .....	133
Structures réceptrices .....	134
Comportement de la plante transformée .....	135
<b>Résultats marquants de ces transformations</b> .....	136
Utilisation des plasmides $T_1$ et $R_1$ pour induire la résistance à des molécules .....	136
Utilisation pour la résistance à des pathogènes et des prédateurs .....	138
Utilisation pour des modifications de constitution ou de fonctions .....	139
Des exemples de transformation par le pollen-vecteur .....	140
<b>Problèmes et remèdes</b> .....	142
Régénération .....	142
Vecteur .....	142
Performances des plantes .....	143
Législation et éthique .....	143

**IX.—Nouveaux paramètres  
pour la création dans le domaine végétal**

<b>Des variétés moins hétérogènes</b> .....	145
<b>La sélection individuelle</b> .....	147
<b>Des méthodes rapides mais brutales</b> .....	147
<b>L'ouverture vers de nouvelles sources de gènes</b> .....	148
<b>Des variétés «clones hybrides»</b> .....	149
<b>Des réseaux «Nord-Sud»</b> .....	150

## Préface

Cet ouvrage, à partir des étapes caractéristiques de la création de nouvelles variétés, décrit les méthodes conventionnelles de l'amélioration des plantes et l'enrichissement que peuvent leur apporter les diverses biotechnologies végétales.

Il s'adresse donc à tous les étudiants des Universités et des Ecoles Supérieures Agronomiques qui se spécialisent en génétique. Il doit aussi intéresser les enseignants qui y trouveront le point actuel et une évaluation des possibilités nouvelles offertes par la maîtrise des cultures *in vitro* et des transferts de l'information génétique. Les chercheurs et les techniciens s'y intéresseront aussi, qu'ils soient confrontés à des opérations de terrain ou qu'ils soient des spécialistes de la génétique moléculaire. Les créateurs de variétés nouvelles y trouveront des éléments sur le choix des stratégies génétiques les plus efficaces.

Enfin, le niveau d'expression relativement simple devrait rendre ce travail accessible aux vulgarisateurs et à tous ceux qui sont curieux de mesurer les progrès de la biologie.

Yves Demarly



## Introduction

### L'amélioration des plantes : une science, un art

Il y a des centaines de milliers d'années, alors que l'un de nos ancêtres ramenait dans sa hutte des fruits pour les consommer en famille et laissait s'échapper des graines dans des détritiques permettant une germination à proximité de l'habitation, l'amélioration des plantes était amorcée. Domestication inconsciente d'abord, jardinage ensuite, échanges, codification de l'agronomie, maîtrise des descendance renforcée par les premières lois génétiques, puis développement de l'amélioration des plantes en tant que science et éruption des biotechnologies. Et pourtant la création d'une nouvelle variété est-elle une véritable science ? Dessiner le profil d'un idéotype répondant mieux aux besoins de l'homme et de ses industries est aussi œuvre artistique, intuitive, sensible autant au confort de l'utilisateur qu'aux potentialités techniques du matériau. En revanche, c'est une science que de replacer l'objet rêvé dans le concret et de calculer la trajectoire la plus efficace et la plus économique pour aller du matériau-source jusqu'à cet idéotype. C'est dans ce compromis qui tient de la science et de l'art que se joue l'amélioration des plantes (Fig. 1 et 2).

Les rendements de grandes productions telles que blé, betterave, maïs, colza, etc. ne cessent de progresser. On peut chiffrer statistiquement ce gain à 1% en moyenne chaque année. Bien sûr une bonne partie de ces augmentations doit revenir aux améliorations phytotechniques (engrais, traitements, machinisme).

Mais des estimations de sources diverses annoncent que la moitié des gains réalisés doit être attribuée au progrès génétique, qui se traduit par l'introduction de nouvelles variétés.

Si ces rendements sans cesse croissants ont parfois été obtenus au détriment de la qualité, cela ne constitue que quelques cas très particuliers. La standardisation des blés impose des normes de valeurs boulangères bien définies qui n'ont pas freiné les gains de production, les valeurs diététiques de l'huile de colza ont progressé en même temps

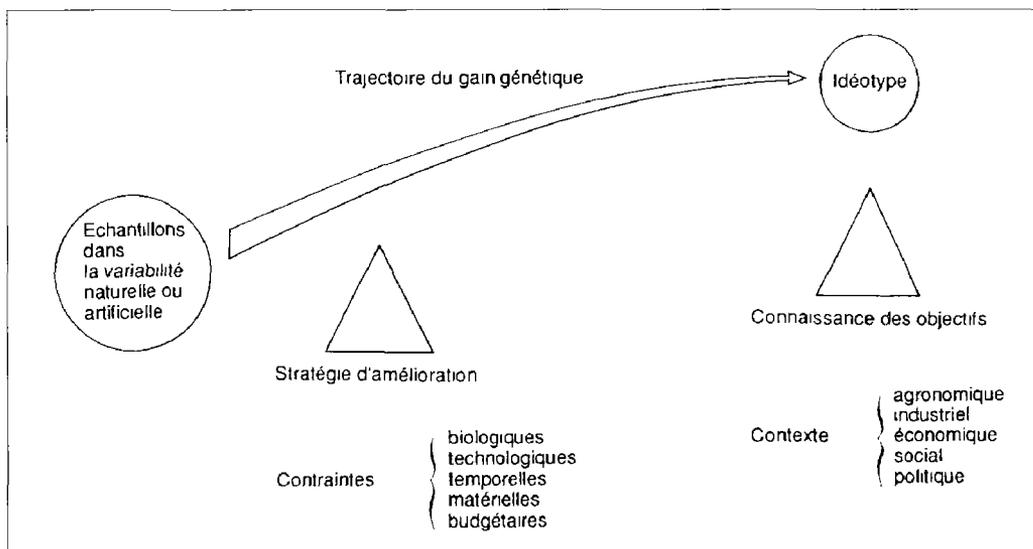


Figure 1. — Définition de l'amélioration des plantes.

que les rendements, les taux d'extraction des jus de betterave à sucre sont meilleurs et les rendements par hectare sont simultanément en augmentation, etc.

L'amélioration des plantes est une stratégie qui se doit d'optimiser une trajectoire. Un pas élémentaire, le long de cette trajectoire, est représenté dans la Figure 2.

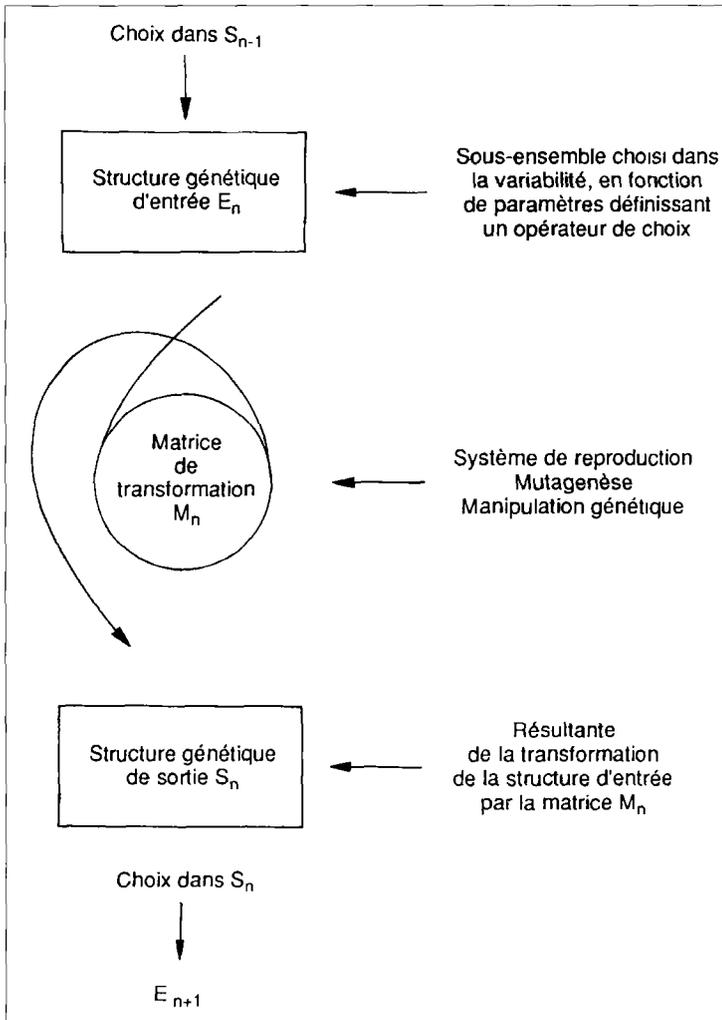
## Profils de la création variétale

Pour répondre aux besoins de l'économie, dans chaque pays, l'obtention de variétés constitue une activité qui s'est structurée selon diverses formules.

— L'un des cas extrêmes est celui où toute la sélection est entre les mains d'organismes d'État ou de leurs satellites : ce type d'organisation se rencontre en Chine où l'Académie des Sciences, les Universités, les Facultés d'agronomie se coordonnent pour valoriser le progrès génétique en utilisant assez souvent la main-d'œuvre et les laboratoires des collectivités régionales et locales.

Une autre formule consiste en des recherches d'État au service d'entreprises coopératives et privées qui valorisent au niveau compétitif les travaux «amont» préparés par les structures nationales. Le système des Pays-Bas se rapprocherait de ce modèle.

— Dans d'autres pays, les activités d'organismes d'État et des firmes privées font l'objet d'une coopération matérialisée par de nombreux contrats sur objectifs. Les États-Unis dans leurs Universités, leurs services agricoles et leurs firmes privées opèrent ainsi avec une très grande mobilité des chercheurs.



**Figure 2.** — Représentation d'un «pas» élémentaire d'une stratégie d'amélioration.

— Dans le système français, l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), les Universités, le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et le CIRAD (Centre International de Recherches pour l'Agriculture et le Développement) effectuent des recherches d'amont, mais l'INRA et le CIRAD poussent les activités jusqu'à l'obtention et la valorisation de variétés, notamment dans les secteurs où des besoins ne sont pas couverts par les très nombreux établissements privés, coopératifs et professionnels. Les plus puissantes de ces firmes et notamment les multinationales développent leurs propres recherches de base et devancent parfois les laboratoires d'État. Ce système se caractérise donc par un aspect compétitif à tous niveaux, ce qui n'exclut d'ailleurs pas des contrats et des alliances par objectifs.

— Une structuration très différente des opérations a été réalisée par les grands centres internationaux spécialisés tels que par exemple l'IBPGR pour les ressources génétiques, l'ICRISAT pour les recherches destinées aux régions tropicales et semi-arides, le CIMMYT pour les céréales, le CIP pour la pomme de terre, l'IRRI pour le riz, le CIAT pour l'agronomie tropicale et notamment les légumineuses ...

Certains pays, pour des raisons d'économie, sont reliés à des centres ou à des stations développées à partir de ces organisations, comme Ibadan au Nigeria ou Haïderabad en Inde, et se contentent de faire une expérimentation d'adaptation et de choix dans les échantillons nombreux de génotypes déjà élaborés, qui leurs sont régulièrement envoyés.

Comme on peut le voir à travers ces positions, qu'il conviendrait d'ailleurs de nuancer dans le détail, l'activité de création variétale des divers États se situe en des positions de compromis entre trois pôles théoriques : celui des firmes capitalistes puissantes, celui d'une dominance des organismes d'État, celui d'une liaison avec des organismes internationaux (Fig. 3). Le niveau des moyens utilisés est lui aussi un compromis entre trois extrêmes théoriques :

- l'expérimentation et l'adaptation régionale à partir d'un matériel très souple et très rustique créé dans des grands centres ;
- l'utilisation d'une méthodologie classique et bien rodée ;
- la priorité donnée aux biotechnologies et aux manipulations génétiques les plus avancées (Fig. 4).

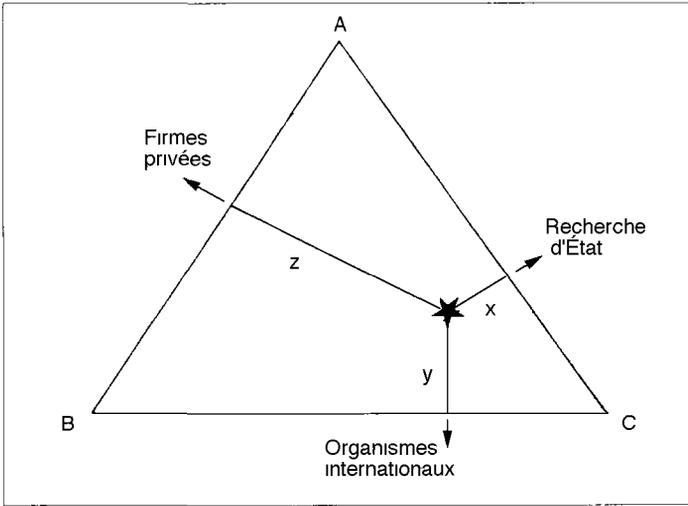
C'est à chaque nation, en fonction de ses besoins, de ses richesses, de son génie spécifique, de se situer dans les triangles formés par ces diagrammes.

## **Des lois de Mendel à la conception du système «linkat - réseau épigénique»**

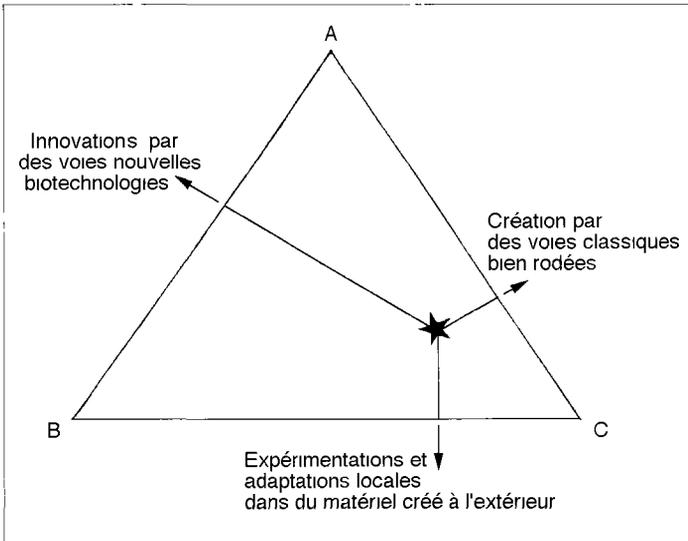
La génétique des végétaux est une science en très rapide évolution. Depuis les premières lois élaborées par Mendel dans les jardins de Brno sur les petits pois, la représentation de ce qu'est un gène a beaucoup changé. D'abord unités de ségrégation au cours de la méiose, puis localisés en des loci précis sur les chromosomes, les gènes ont ensuite pris la forme d'opérons, c'est-à-dire de déterminants d'une protéine, dont l'expression était régie par des gènes régulateurs et autorisée par un gène opérateur. Actuellement, l'idée qu'on se fait du gène d'une plante supérieure s'est beaucoup enrichie.

On peut dire que ses caractéristiques peuvent être résumées en trois aspects bien particuliers :

- la richesse redondante de l'information végétale ;
- la multiplicité des mécanismes assouplissant son expression ;
- le réseau de signaux épigéniques de type «cérébral» qui régule le déroulement du programme génétique.



**Figure 3.** — Positions de l'amélioration des plantes en fonction d'options.



**Figure 4.** — Positions de l'amélioration des plantes en fonction d'options.

## Richesse redondante de l'information végétale

### *Polypléidie*

Plus de la moitié des végétaux supérieurs sont des polypléides, notamment chez les espèces pérennes et chez les formes domestiquées. L'exemple des blés est l'un des plus démonstratifs à cet égard : on sait que notre blé panifiable est un allohexaploïde, c'est-à-dire que le noyau de chacune des cellules de cette plante contient trois stocks diploïdes de 14 chromosomes chacun ; ce blé est l'addition d'informations de trois

espèces ancestrales bien identifiées. On comprendra bien la nature et la signification de cette redondance en notant que dans chacun des trois génomes ainsi regroupés, les chromosomes sont homéologues, c'est-à-dire qu'ils portent des séquences quasi identiques, avec des gènes codant pour les mêmes caractéristiques. Mais ce «luxue» d'information n'est pas gratuit, car on sait que l'un des génomes, celui qui est désigné par B, est plus puissant que les autres et joue un rôle suzerain. Cependant, en cas de défaillance de l'un de ses gènes, ce sont les autres génomes qui prennent le relais et renforcent leur expression.

Ce type de mécanisme est général et peut s'appliquer à de nombreuses plantes polyploïdes.

Les espèces où plusieurs génomes d'origines différentes sont ainsi cumulés sont dites allopolyploïdes ; à leur méiose, les appariements se font sous forme de bivalents, génome par génome.

Mais il y a des cas où la polyploïdie est due à la duplication d'un même génome diploïde : on appelle ce type de structure autopolyploïdie. Dans ce cas, 4, 6, 8 chromosomes sont parfaitement homologues et forment à leur méiose des figures multivalentes. La richesse redondante se traduit alors ici par des interactions très nombreuses entre les allèles homologues (Fig. 5).

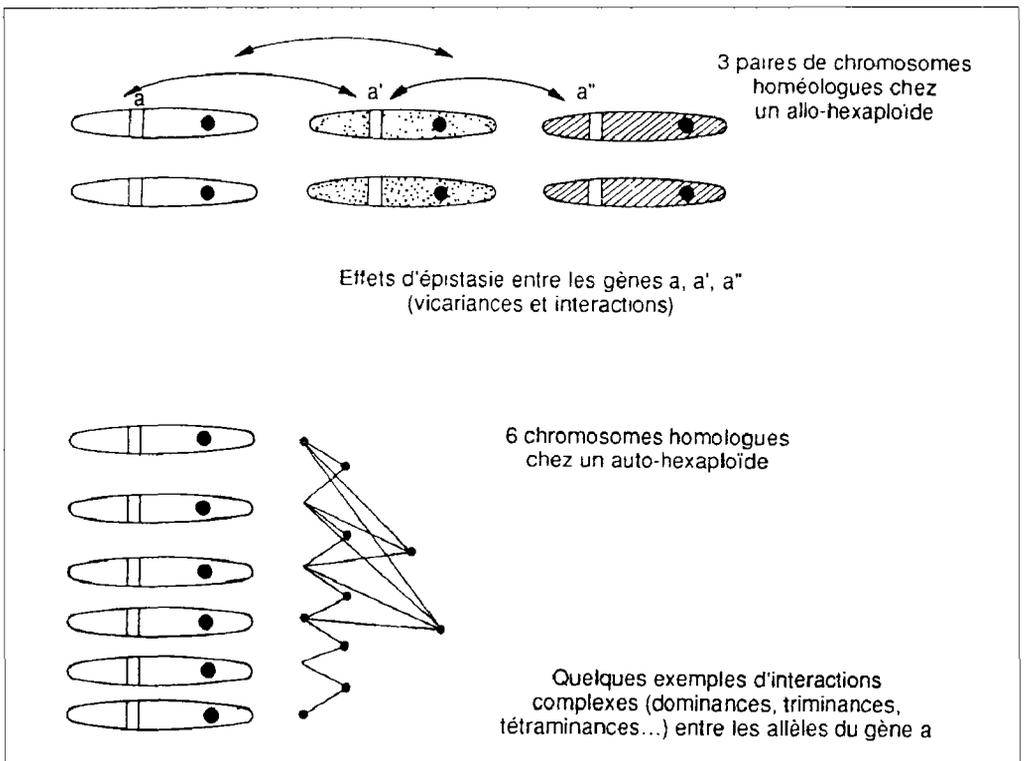


Figure 5. — Comparaison entre les états auto- et allopolyploïdes.

### ***Linkat et batterie de gènes***

Un autre aspect de la richesse redondante de l'information des végétaux supérieurs se situe dans l'organisation des gènes en unités fonctionnelles représentées par des batteries de gènes organisées en linkats. Le linkat est une unité fonctionnelle constituée par deux niveaux essentiels de regroupements [1] :

— un niveau chromosomique qui regroupe dans une même zone du chromosome plusieurs loci où se localisent des codes pour des formes ou des fonctions dont les valeurs adaptatives sont convergentes [2] ;

— un second niveau, plus fin, correspond pour chacun de ces loci au regroupement de plusieurs unités codantes, d'expression à peu près identique, qui forment des batteries de gènes.

Ces gènes peuvent avoir des effets additifs, complémentaires ou vicariants et se présentent donc comme une palette d'expressions voisines donnant une grande souplesse adaptative.

Ainsi chez le maïs, la zéïne, protéine du grain, est codée par une batterie de 7 gènes sur le chromosome 7, de 9 gènes sur le chromosome 4 et d'un nombre important mais non déterminé sur le chromosome 10.

De nombreuses batteries de ce type sont successivement mises en évidence lorsqu'on affine l'analyse génétique : familles des gènes de la leghémoglobine du soja, de la globuline du pois et de l'orge [3], locus d'incompatibilité comprenant des batteries de pseudogènes chez le trèfle violet, etc. Le rôle des unités géniques dans ces batteries est de permettre, comme pour la polyploïdie, des vicariances ou des combinaisons multiples enrichissant ainsi les formes d'expression apportées par un seul gène et permettant, soit selon l'âge de la plante, soit selon l'organe, soit selon une contrainte environnementale, des modalités de multiples régulations.

### ***Les pseudogènes et la notion d'allèles***

La mise en évidence de séries de pseudogènes dont les codes se complètent pour donner l'architecture d'une protéine complexe permet de faire évoluer le concept des séries alléломorphiques. En un locus, par le jeu des combinaisons entre des éléments pseudogènes, on aboutit à une grande diversité de formes alléliques exprimées. Prenons un exemple théorique de 5 pseudogènes où une combinaison de 2 serait nécessaire à l'architecture protéique fonctionnelle ; ces 5 pseudogènes donnent alors, par combinaison 2 à 2, une palette de  $C_5^2 = 20$  types de formes protéiques différentes. On voit bien ici que, en plus des batteries de gènes dans un linkat, la structuration de chacun d'eux en pseudogènes vient encore ajouter un degré supérieur à la grande diversité d'expression du code génétique.

Selon cette conception, un allèle apparaît donc comme une configuration expressive qui résulterait de transpositions intragènes. Le locus n'aurait que le rôle d'une sorte de fenêtre de transcription sur le chromosome (Fig. 6).

## Mécanismes de régulation du gène végétal

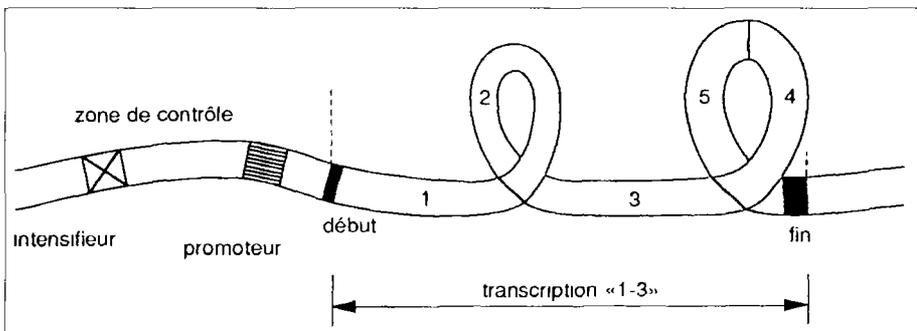
### *ADN répété*

Chaque gène codant est accompagné en amont des séquences codantes (c'est-à-dire les séquences que nous sommes capables d'interpréter en acides aminés transcrits) par des longues répétitions de syllabes d'ADN non codant qui sont donc une sorte de bégaiement intense. Chez les végétaux supérieurs, ces séquences sont très développées et représentent jusque 90% de l'ADN chromosomique alors que chez les animaux supérieurs l'ADN non codant est moins fréquent.

Certaines séquences sont ainsi répétées à des milliers d'exemplaires en amont du gène codant [4]. On commence à clarifier le rôle apparemment absurde de ces zones dans la régulation temporelle et quantitative de l'expression du gène qui les suit ; on a pu, en amont du site d'initiation de transcription, localiser le promoteur de cette transcription et remonter encore plus loin en amont en identifiant des zones intensifiant l'expression (*enhancer*) et d'autres zones la modérant. L'environnement d'un gène sous forme d'ADN répétés permet donc une régulation de ses modalités d'expression selon les situations.

### *Découpage introns-exons*

D'autres mécanismes, bien développés chez les végétaux supérieurs, assouplissent encore le déroulement du programme d'un génotype : le découpage du gène en introns et exons, lors de la transcription, suivi par le rattachement des exons à la sortie du



**Figure 6.** — Schéma théorique d'expression de la forme allélique «1-3» (l'une des formes possibles parmi les multiples combinaisons de 5 pseudogènes 2 à 2).

Il est clair que cette schématisation ne doit pas être prise à la lettre : tout se passe comme si les choses se présentaient ainsi.

noyau, aboutit à un ARN messenger mûri. Par la variété des sites de découpage, en fonction des endonucléases présentes, on aboutit à des mutants dus à d'autres types de maturation de l'ARN messenger. Le schéma ci-dessous explicite le mécanisme de l'excision-épissage sur un gène bien connu : celui qui code pour la phaséoline chez le haricot (Fig. 7 et 8).

### Transposons

Un autre système de régulation très développé chez les végétaux est celui des gènes mobiles, qui sont loin d'être exceptionnels. On compte aujourd'hui plusieurs centaines de transposons chez le maïs. Ces gènes mobiles, autonomes dans leur déplacement ou régulés par d'autres gènes, viennent, en s'insérant en des points particuliers du chromosome, annuler ou modifier l'expression d'un gène, ou encore changer l'orientation de son environnement génétique. La plupart des transposons qui ont été analysés déclenchent des aberrations dans les expressions morpho-génétiques des panachures, des mosaïques, etc. Mais MacClintock a pu montrer que nombre des transpositions avaient des rôles régulateurs tout à fait contrôlés et intervenaient ainsi comme agents de déroulement du programme génétique [5]. De plus, les conditions de milieu, l'âge du tissu végétal, des traumatismes ... interagiraient sur la mobilité des transposons (Fig. 9, 10 et 11).

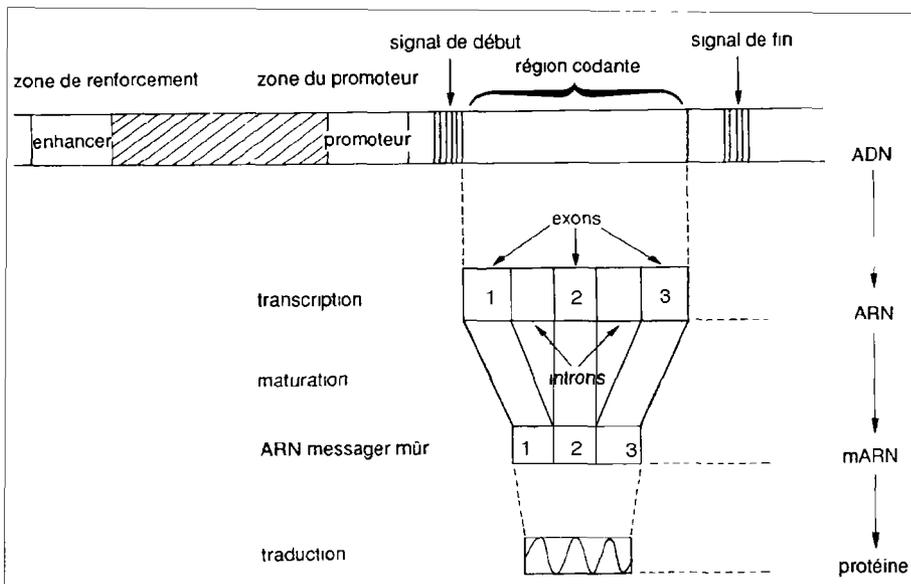


Figure 7. - Un gène, son environnement de signaux ADN et son expression.

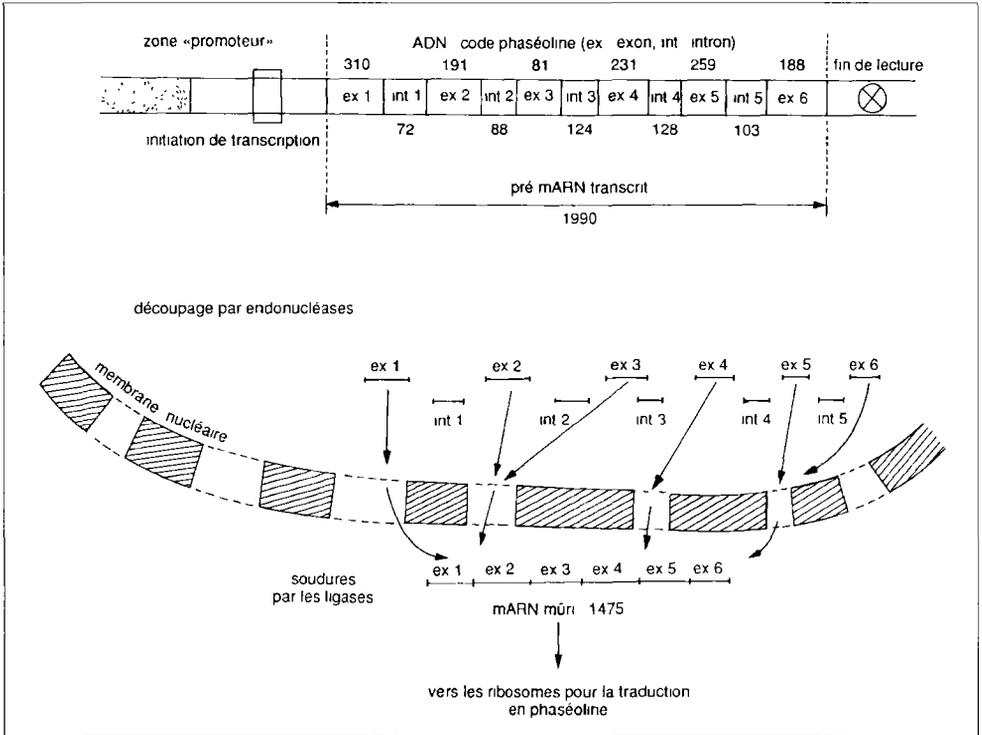


Figure 8. — Le gène «phaseoline» chez le haricot. Les chiffres indiquent les longueurs en paires de bases.

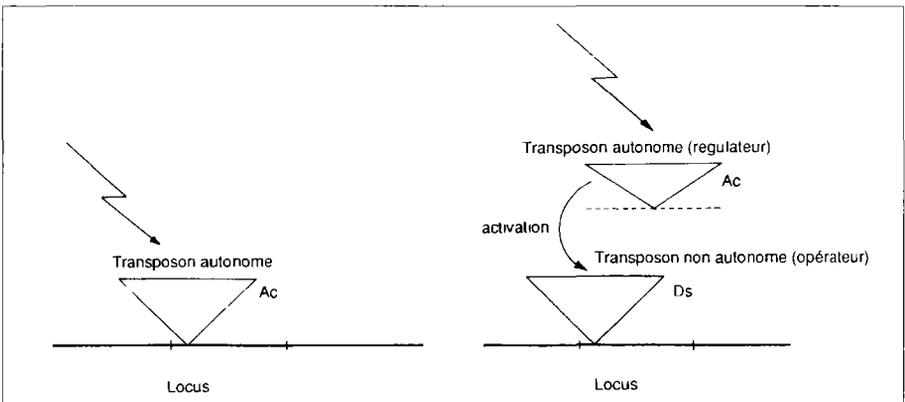
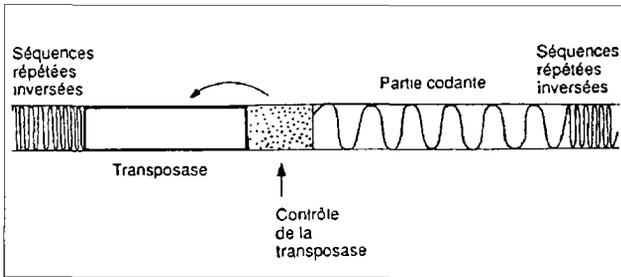
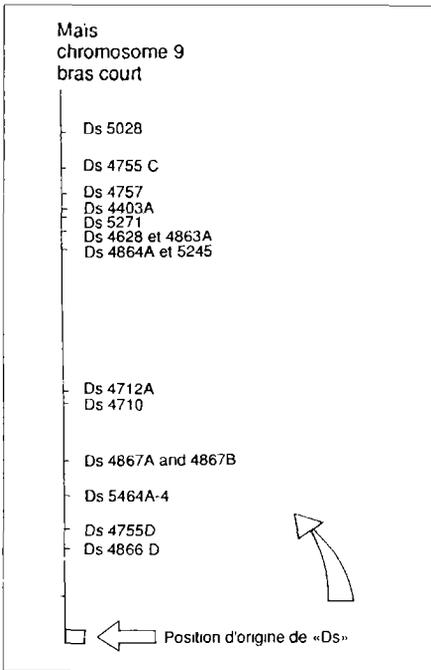


Figure 9. — Les deux types de transposons. Les non autonomes (Ds) ne possèdent pas la région «transposase» et leur mobilité dépend de la présence de Ac.



**Figure 10.** — Détail d'un élément transposable autonome.



**Figure 11.** — Position d'insertion de l'élément transposable «Ds».

**Organites cytoplasmiques**

Un autre compartiment de l'information héréditaire chez la plante, le cytoplasme, peut être lui aussi très souple dans sa régulation.

L'information cytoplasmique de la plante est représentée par l'ADN mitochondrial et l'ADN chloroplastique. Le végétal possède une richesse assez remarquable de ce compartiment du génome. L'ADN mitochondrial (ADN mt) se présente sous la forme de chromosomes circulaires relativement longs, puisqu'ils atteignent jusqu'à 100 fois la taille de celui d'un mammifère. Sur ces chromosomes existent des séquences répétées inversées qui entraînent des recombinaisons et des fragmentations. Une plante donnée héberge donc dans ses mitochondries plusieurs types de chromosomes mitochondriaux. Cette organisation est très variable d'une espèce à l'autre ; ainsi l'ADNmt

de la navette et celui du chou sont des ADN courts de 218 et 217 kb (kilo bases) alors que le melon a un ADNmt de 2 400 kb. Même entre espèces voisines l'organisation est variable.

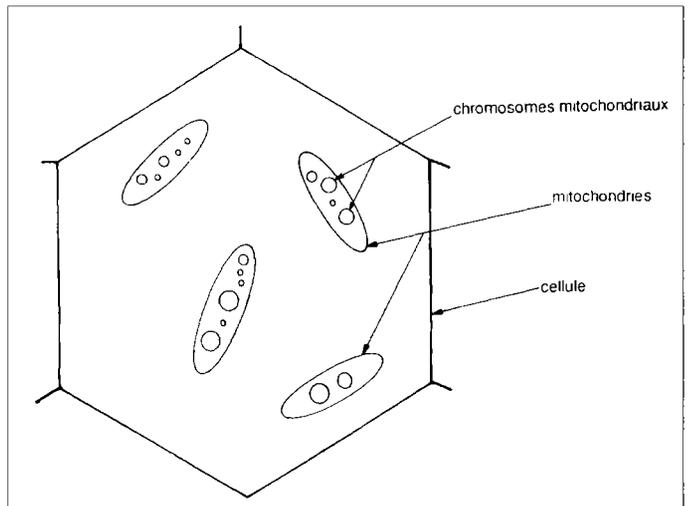
Les chromosomes d'ADNmt ne se répliqueraient pas au même rythme que les mitochondries, qui elles-mêmes ne se répliquent pas au rythme des divisions cellulaires. On a donc dans la plante des possibilités d'évolution démographiques des ADNmt selon l'âge, les conditions, les organes, la culture *in vitro*, etc. (Fig. 12).

Ce génome mitochondrial possède aussi des minichromosomes d'ADNmt qu'on appelle épisomes.

L'ensemble des informations portées par cet ADN coopère avec le génome nucléaire pour la biogenèse de différentes protéines mitochondriales qui interviennent dans la phosphorylation oxydative, donc dans les débits énergétiques cellulaires. Ainsi une régulation importante des fonctions et de la morphogenèse est opérée par ces démographies mitochondriales [6]. Par exemple, la fertilité d'une plante est en grande partie tributaire du débit énergétique de ce compartiment mitochondrial.

Les différents génotypes dans une espèce possèdent donc vraisemblablement chacun un type de population mitochondriale bien défini qui est géré avec l'ensemble du génome et qui caractérise l'hybride ou la lignée. Ainsi chez le maïs, une analyse encore simpliste de ces types de cytoplasmes permet d'en identifier des dizaines qui ont chacun leurs particularités et chacun une plus ou moins grande stabilité.

En ce qui concerne les chloroplastes, on rencontre aussi un ADNcp circulaire, dont l'organisation est plus homogène et dont les séquences sont très conservées, permettant ainsi l'étude des relations phylogénétiques. Comme pour le génome mitochondrial, l'ADNcp coopère avec le génome nucléaire pour la genèse de protéines importantes fixées sur la membrane des thylacoïdes : protéine du photosystème I, du photosystème II, du complexe ATPase, etc.



**Figure 12.** - Structures emboîtées ayant des réplifications indépendantes.

Ce génome chloroplastique, bien qu'apparemment moins souple que le génome mitochondrial, a cependant des mutations, dont certaines ont un intérêt agronomique notable : résistance à l'atrazine, à la streptomycine, albinisme, etc. Par ailleurs, on a montré récemment que l'ADN chloroplastique d'un même individu végétal pouvait présenter un certain niveau d'hétérogénéité.

L'ensemble de l'information du compartiment cytoplasmique, et surtout l'information mitochondriale, peut donc être considéré comme une population hébergée par chaque individu végétal ; cette population a ses démographies, en fonction de l'âge, des organes, des traumatismes, des conditions enregistrées par la plante. Elle code pour des fonctions importantes et joue donc un rôle essentiel sur la régulation et la souplesse d'adaptation.

## Gestion des mécanismes régulateurs

L'information de la plante supérieure apparaît donc comme un clavier très riche en informations redondantes (polyploïdie, batteries de gènes, séries de pseudogènes), dotée de systèmes de régulation très sensibles (ADN répété, introns-exons, transposons, démographies cytoplasmiques). Il en découle donc une souplesse adaptative très spécifique du végétal supérieur et qui constitue vraisemblablement une des grandes stratégies de la vie.

La gestion de cet ensemble se fait tout spécialement au niveau des méristèmes pour ce qui est de la mise en place des formes et des fonctions, qui constitue le programme génétique, ainsi qu'au niveau des tissus les plus actifs de la plante (vaisseaux, stomates...).

Cette gestion a la forme d'un réseau complexe de signaux moléculaires constituant une information mobile qui circule d'environnement à tissus, d'organe à organe, de cellule à cellule, de cytoplasme à noyau, et qui détermine donc au contact de l'ADN une population d'informations mobiles appelée «épigénique» [1, 7].

Chaque élément tissulaire et cellulaire de la plante intervient dans la transmission de ces signaux comme les neurones dans une structure cérébrale. La plante apparaît donc dans son ensemble comme une structure très sensible, totalement cérébralisée, l'épigénique étant le cerveau qui gère et interprète en termes de programme génétique les réseaux de sensations transmises (Fig. 13).

Cette conception d'une grande stratégie évolutive vers le végétal supérieur n'est pas gratuite. Elle explique que, malgré une diversification et une sophistication poussée, la plante soit un matériau de choix pour les biotechnologies :

- parce que son information génétique est souple ;
- parce que la régulation en est très sensible et accessible à des expérimentations (ruptures de corrélations) ;
- parce que le programme génétique, géré par l'épigénique, s'appuie sur une morphogénèse continue, un peu analogue à un état embryonnaire permanent, l'âge

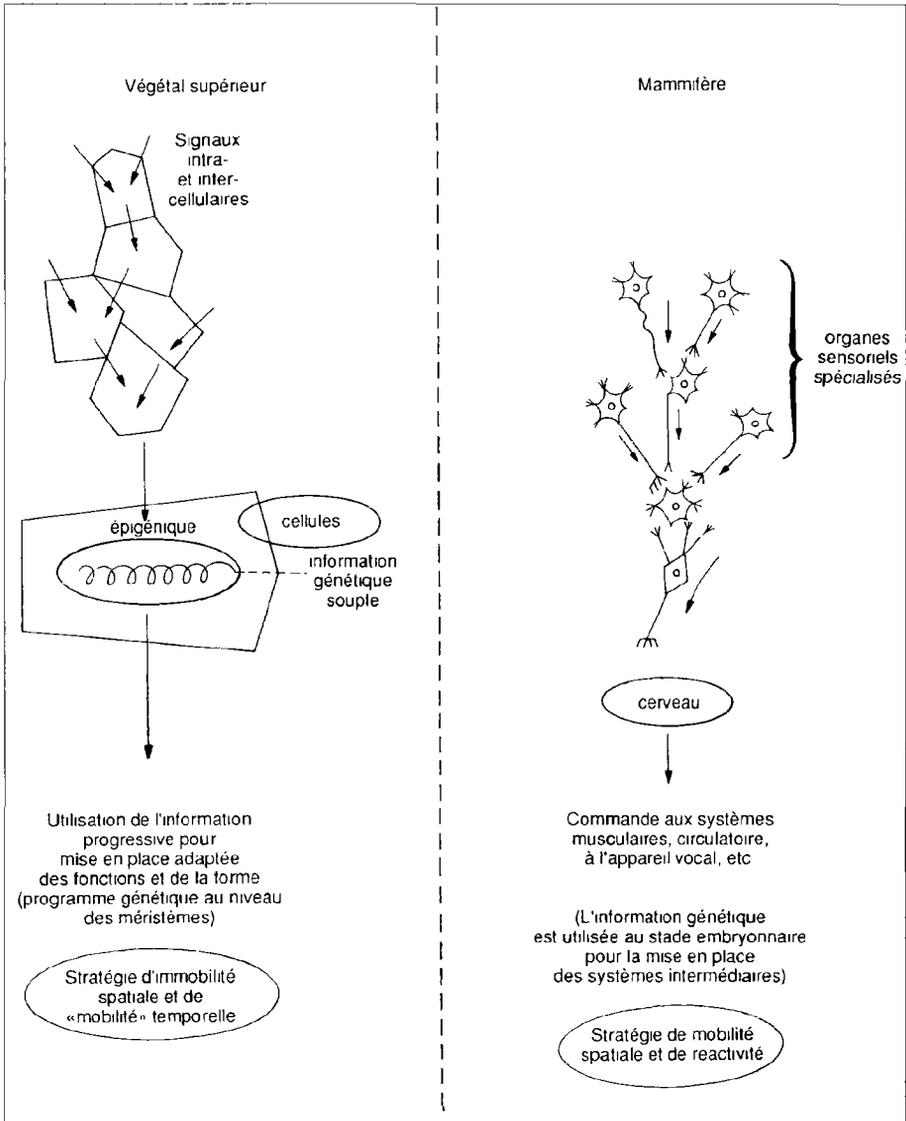


Figure 13. — Opposition entre deux stratégies du «vivant».

génétique d'un tissu végétal est donc réversible. On peut «laver la mémoire» des cellules et les réorienter dans une autre expression, on peut aussi les éduquer, c'est-à-dire induire certains mécanismes qui s'entretiendront ensuite sous forme d'équilibres stationnaires influant sur l'épigénétique.

## Diversité des biotechnologies disponibles

Le terme de biotechnologies est difficile à définir du fait que pour chacun il recouvre des domaines différents. On peut cependant dire que, par rapport à des voies de manipulation du végétal très anciennes (greffes, boutures, hybridations), les biotechnologies impliquent une attaque plus intime des mécanismes et une modification dirigée aux niveaux les plus fins de ces mécanismes. Comme plusieurs modalités d'approche sont réalisables, il est normal d'utiliser le terme «biotechnologies» au pluriel.

### Biotechnologies du clonage de l'individu

Nous avons vu que le végétal est constitué de quelques centaines de millions de cellules : chacune d'elles porte l'ensemble de l'information génétique, qui sous la gestion épigénique exprime un niveau donné du programme génétique.

Lorsqu'on prélève un fragment de plante, le réseau de signaux qui parvient est allégé, simplifié ; l'épigénique l'interprète comme un rajeunissement et le fragment, s'il est placé dans de bonnes conditions *in vitro*, reconstitue une morphogenèse de l'individu global : on peut ainsi obtenir des copies végétatives de l'individu donneur. Certains organes et certains tissus se prêtent mieux que d'autres à cette opération.

Avec un choix judicieux et de bonnes conditions de culture, on régénère en routine des milliers de copies. Les produits de ce clonage sont appelés des vitroplants.

On peut pousser plus loin l'opération, c'est-à-dire cultiver en milieu liquide (cyto-culteurs) des cellules isolées de l'individu donneur et régénérer des structures embryonnaires (embryons somatiques) qui se développent en plantules et aboutissent à des individus viables. Lorsqu'elles sont au point, ces soupes embryonnaires ont un pouvoir de multiplication inégalable. Les embryons somatiques peuvent être utilisés tels quels ou enrobés dans des gels nutritifs et des coques protectrices : c'est la technologie des semences artificielles.

### Vitrovariants

Lorsque les éléments excisés sur la plante donneuse perdent les repérages apportés par les réseaux de signaux ou sont incapables, du fait du milieu de culture et notamment de l'utilisation du 2-4 D, de les restructurer, des réactions épigéniques différentes gèrent un déroulement modifié du programme génétique. Par ailleurs, les systèmes de sauvegarde de l'intégrité génotypique sont relâchés, la réparation des mutations, l'excision des erreurs de mitose, les contrôles du nombre de chromosomes liés aux mécanismes d'endoduplication sont affaiblis. Il apparaît alors des copies non conformes (morphologiquement ou physiologiquement) qu'on désigne sous le terme de phénovariants ou vitrovariants [8]. Cette découverte française a été diffusée par les Anglo-Saxons sous l'appellation «variation somaclonale», mais le terme vitrovariations est plus correct.

## Haplodiploïdisation

Les haploïdes ont toujours suscité un très vif intérêt des sélectionneurs, pour la claire lisibilité de leur génome, mais surtout parce qu'ils sont la source d'homozygotes parfaits puisqu'on sait autodoubler leur stock haploïde de chromosomes.

Depuis longtemps on est capable d'obtenir des plantes haploïdes à très faible fréquence à la suite de polyembryonie ou plus simplement de graines à embryons doubles. On sait aussi obtenir des descendances haploïdes à partir d'hybridations interspécifiques suivies de cultures *in vitro* des jeunes embryons ainsi induits.

Mais il y a une trentaine d'années, pour la première fois étaient régénérées des plantes à partir de culture *in vitro* de microspores ayant donc un stock haploïde de chromosomes [9] chez le tabac [10].

Cette voie d'obtention volontaire de plantes haploïdes s'est vite étendue à d'autres espèces, puis on a diversifié les méthodes. A l'androgenèse (régénération de plantes *in vitro* à partir de culture de microspores) s'est ajoutée la gynogenèse obtenue à la suite de culture d'ovules non fécondés ; puis, plus récemment, des apomixies provoquées par irradiations, soit du gamétophyte mâle, soit du gamétophyte femelle, ont aussi été sources d'individus haploïdes [11].

## Hybridation somatique

Lorsque, partant de tissu somatique, on dissocie les cellules et qu'on attaque leurs parois cellulodiques avec les enzymes appropriées, la lyse dénude la cellule qui ne possède plus que sa membrane plasmique et apparaît sous la forme dite «protoplaste». Ces protoplastes ont un état épigénique très perturbé et leur probabilité de régénérer l'intégrité cellulaire, puis la plante, est faible et nécessite des soins nombreux. En revanche, à ce stade de dépersonnalisation des réseaux de repérage, le protoplaste est apte à recevoir tout élément étranger sans l'identifier comme un «non-soi». On peut donc agglomérer deux protoplastes appartenant à des espèces, à des genres... et même à des règnes biologiques différents. On appelle cette opération fusion somatique. La cellule d'addition et de recombinaison résultante peut, avec certaines restrictions, régénérer un individu dit «hybride somatique» [12].

## Génie moléculaire

L'aptitude que possède le végétal de régénérer à partir d'une cellule a ouvert la voie aux plantes transgéniques. Ces plantes résultent du transfert d'un gène, bactérien, microbien, animal, végétal, dans la plante, avec intégration du gène dans les propres chromosomes de la plante. Ce génie moléculaire très récent [13] ouvre des perspectives très larges non seulement pour la création de nouvelles variétés transgéniques, mais aussi pour toutes les industries agro-alimentaires.

## Références

1. Demarly Y. L'épigénique. *Bull Soc Bot Fr* 1985 ; 132 (3/4) : 79-94.
2. Zuckerkandl E. The appearance of new structures and functions in proteins during evolution. *J Mol Evol* 1973 ; 7 : 1-37.
3. Brisson N, Verma DPS. Soybean leghemoglobin gene family: normal, pseudo and truncated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 79 : 4055-9.
4. Flavell RB, *et al*. Repeated sequence relationships in four cereal genomes. *Chromosoma* 1977 ; 63 : 205-22.
5. Peterson PA. Controlling elements: the induction of mutability at the A2 and C loci in maize. In : *Maize breeding and genetics*. London : J. Wiley and sons, 1978 : 601-31.
6. Birky CW. Relaxed cellular controls and organelle heredity. *Science* 1983 ; 222 : 468-75.
7. Sibi M. *Hérédité de variants épigéniques obtenus par culture de tissus in vitro chez les végétaux supérieurs*. Thèse d'Etat. Université Paris-Sud-Orsay, 1981.
8. Sibi M. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. II. Aspect expérimental. *Ann Amelior Plantes* 1976 ; 26 (4) : 523-47.
9. Guha S, Maheshwari SC. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 1964 ; 204 : 497.
10. Bourgin JP, Nitsch JP. Obtention de *Nicotianas* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann Physiol Veg* 1967 ; 9 : 377-82.
11. Raquin C. Induction of haploid plants by *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. *Z Pflanzenzuchtg* 1985 ; 94 : 166-9.
12. Cocking ED, *et al*. Aspects of plant genetic manipulation. *Nature* 1981 ; 293 : 265-70.
13. Zambryski P, *et al*. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 1983 ; 2 : 2143.



## **Amélioration des plantes : phases successives de la création d'une variété**

### **Un carrefour de disciplines**

On sait que l'amélioration génétique d'une espèce nécessite tout un cortège de disciplines qui interviennent sur le corps central des opérations de création variétale proprement dites. L'organigramme d'une station de sélection végétale peut être schématisé (Fig. 14). En fait, toute décision opérationnelle se ramène à un bilan économique : bien plus, le bilan ne s'équilibre pas de la même manière selon qu'il est ramené à un court terme (moins de cinq ans) à moyen terme (cinq à dix ans) ou à long terme (dix ans et plus). A notre avis, le moyen terme constitue une position rationnelle si l'on sait que la création d'une variété exige un délai d'environ dix années entre le moment où son idéotype est esquissé et le moment où elle est commercialisée.

C'est pour n'avoir pas su (ou pu) équilibrer leur trésorerie sur le moyen terme que nombre d'établissements de sélection ont perdu leur autonomie et se sont vus assimilés par des groupes internationaux. C'est peut-être pour avoir trop privilégié une façade de travaux futuristes à long terme que certains grands groupes seront amenés à porter un très sévère jugement sur la rentabilité en «amélioration des plantes».

On peut répartir les opérations génétiques nécessaires à la création d'une variété en quatre phases, plus ou moins concomitantes :

- phase 1 : gestion des sources (ou ressources) dans lesquelles sont choisis les génotypes travaillés.
- phase 2 : remaniements dans les génotypes-sources entraînant des ségrégations ou des diversifications.
- phase 3 : sélection, dans la diversité ainsi créée, s'accompagnant d'une stabilisation des types retenus : on appelle aussi cette phase sélection stabilisatrice.
- phase 4 : opérations aboutissant à la multiplication en nombre du génotype sélectionné.

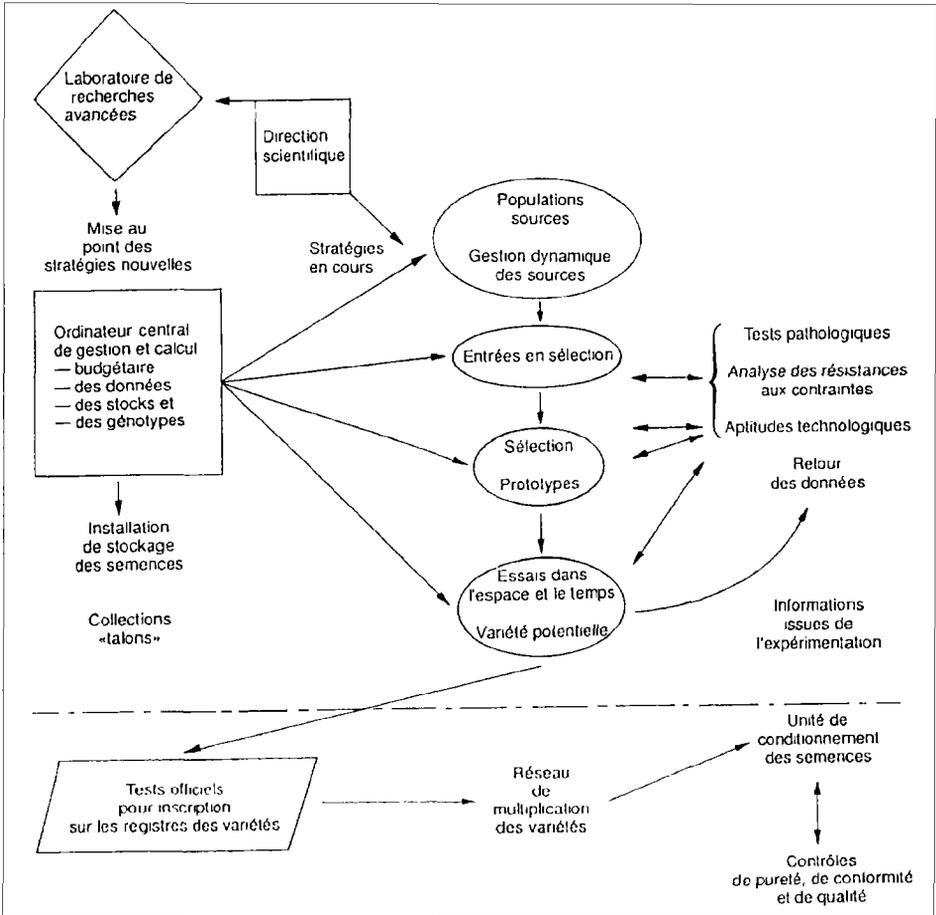


Figure 14. — Type d'organisation théorique d'un établissement d'amélioration des plantes.

Ce clivage peut sembler arbitraire, d'autant plus que les étapes sont plus ou moins concomitantes, mais chacune d'elles fait appel à des opérations spécifiques.

### Phase 1: gestion des ressources dans lesquelles sont choisis les génotypes travaillés

Le matériel de départ pour un sélectionneur consiste en variétés déjà existantes, en populations entretenues soit par lui-même, soit par des instances nationales ou des centres internationaux, en des peuplements naturels et en des espèces apparentées, ancestrales, spontanées, qu'il est possible d'utiliser comme ressources.

Grâce aux biotechnologies, nous verrons (Chap. VII) que la notion de ressources dépasse maintenant largement ce cadre puisque tout gène du règne vivant peut être accessible et, par manipulations moléculaires, transféré dans une espèce donnée.

## Simple préservation des ressources

On peut opérer une simple préservation des ressources, c'est-à-dire une protection statique de ce qui existe. C'est le cas le plus simple en théorie. Pour les espèces autogames qui existent sous forme de lignées pures (c'est-à-dire proches de l'homozygotie), il suffit d'entretenir les stocks par reproduction sexuée en autofécondation. De même pour les espèces à multiplication végétative, il suffit de faire une sélection clonale conservatrice en éliminant tout mutant et tout variant ; il faut aussi exercer une sélection sanitaire sévère pour éliminer les viroses qui entraîneraient des dégénérescences.

En revanche, pour les plantes totalement ou partiellement allogames, le problème est plus délicat : les variétés existantes sont hétérozygotes ; elles donnent donc des ségrégations au cours des multiplications ; de même, les populations naturelles de ces espèces ne sont maintenues en équilibre que dans un écosystème donné où s'exercent d'une manière à peu près stable des pressions de sélection bien spécifiques. Les solutions consistent alors en des stockages de semences dans des conditions qui préservent leur facilité germinative le plus longtemps possible ou en des mises «en réserve» de certaines régions naturelles en y définissant clairement le maintien d'un écosystème de référence.

Quel que soit le régime de reproduction d'une espèce, et spécialement dans ce cas délicat de l'allogamie, les nouvelles technologies peuvent apporter certaines solutions :

— une miniaturisation des plantes par culture *in vitro* qui couvre soit la plante entière miniature, soit des organes (bourgeons, apex, organes floraux), soit des embryons, soit des cellules, soit, même, des microspores. Ces divers éléments peuvent être stockés dans des conditions pratiquement indéfinies par cryoconservation (embryons congelés dans l'azote liquide par exemple) ;

— une autre solution qui s'est développée récemment concerne les banques de gènes : tout l'ADN d'un génotype peut en effet être découpé et conservé sous un volume minuscule. Cet ADN pourra être ensuite cloné et transféré dans une plante selon un processus maintenant bien cadré (Chap. VII). Ces banques de gènes permettent de préserver non seulement l'ADN nucléaire, mais aussi l'ADN cytoplasmique. On pourrait aussi, chez les allogames, ne porter l'intérêt que sur les allèles et les linkats, sans se préoccuper des génotypes eux-mêmes. On est alors dans la situation des gestions dynamiques des ressources génétiques.

## Gestion dynamique des ressources

Il est rare qu'un sélectionneur passe directement d'une population naturelle aux phases suivantes de la sélection. En général, chaque établissement de sélection gère un stock de génotypes où ont déjà été concentrés certains gènes ou certains linkats. Ces ressources améliorées ou, en jargon de sélectionneur, ces « marmites » où s'opèrent des mixages génétiques, des recombinaisons, des fréquences accrues de facteurs favorables sont le plus souvent obtenues après des cycles de sélection récurrente [1].

La sélection récurrente consiste, partant d'une population  $P_0$  d'origine (ou d'un groupe de populations), à en extraire, par une opération d'évaluation, des génotypes supérieurs, qui recombinaés entre eux donneront, comme résultante de ce premier cycle, la population récurrente  $P_1$  puis après un second cycle  $P_2$ , puis  $P_3$ ... A chaque cycle, l'opérateur d'évaluation doit conserver des fréquences accrues, des balances internes meilleures, des aptitudes à la combinaison mieux ajustées ... Évidemment, la nature de l'opération d'évaluation détermine le type et l'intensité du progrès à chaque cycle.

— Dans les cas où l'opération d'évaluation porte uniquement sur le phénotype des individus retenus, on a une sélection massale-récurrente dont l'efficacité portera surtout sur les caractères à très forte héritabilité.

— Si l'évaluation porte essentiellement sur la qualité des descendance obtenues par autofécondation d'un échantillon aléatoire des génotypes de  $P_0$ , le 1<sup>er</sup> cycle de sélection accroîtra les fréquences de toutes les caractéristiques à forte variance additive et à épistasie *cis* ; il renforcera aussi la cohésion des linkats intéressants.

— Si l'évaluation se fait sur des descendance en *top-cross* d'un échantillon de génotypes de  $P_0$ , c'est l'aptitude générale à la combinaison et tous les systèmes géniques liés à sa variance qui seront sélectionnés.

— Si la sélection récurrente est réciproque, cela signifie qu'on améliore une population  $P_0$  relativement à une autre population  $P_0'$  et réciproquement ; on dispose donc dans ce cas, après un cycle, de deux populations  $P_1$  et  $P_1'$  qui possèdent l'une vis-à-vis de l'autre de meilleures aptitudes à la combinaison : les génotypes dans  $P_0$  ont pu être sélectionnés, soit pour leur aptitude générale à la combinaison avec  $P_0'$ , soit pour leurs aptitudes spécifiques vis-à-vis d'un génotype de  $P_0'$  et réciproquement.

Ce dernier type de sélection récurrente semble être l'une des stratégies les plus efficaces pour des espèces allogames où existent des grands groupes distincts de populations de départ :  $P_0$ ,  $P_0'$ ,  $P_0''$  [2].

— Les biotechnologies apportent aux sélections récurrentes un opérateur d'évaluation des génotypes à retenir, nouveau et performant : l'haploïdisation. On sait en effet, pour un nombre sans cesse croissant d'espèces, obtenir des plantes haploïdes par l'androgenèse, la gynogenèse, l'hybridation interspécifique, ou l'apoximie provoquée (Chap. I).

Chez ces structures haploïdes ou haplodiploïdisées (haploïdes autodoublés), on peut cribler aisément les additivités, les épistasies *cis* et les qualités de linkats. On peut

aussi, par la variance intrahaploïdes issus d'une même plante, évaluer les épistasies *trans* et la richesse allélique interne à un génotype  $P_0$ . Grâce à ces critères, les progrès génétiques de  $P_0$  à  $P_1$ , de  $P_1$  à  $P_2$ , etc. peuvent être maximisés.

## **Evaluation des ressources**

Lors de cette phase 1, la gestion des ressources serait sans valeur si elle n'était accompagnée d'une évaluation agronomique et génétique des individus stockés.

Cette évaluation peut porter sur des caractéristiques morphologiques physiologiques et agronomiques. Toute grande collection de génotypes possède maintenant un bulletin de «descripteurs», qui contient une évaluation, selon un code international, d'un certain nombre de traits (appelés descripteurs) définis par des experts internationaux.

On publie aussi pour certaines espèces où la génétique factorielle est suffisamment avancée des catalogues des gènes disponibles (tomate, riz, par exemple).

Ici encore, les progrès de la génétique moléculaire permettent d'aller plus loin dans l'investigation. On sait actuellement distinguer deux structures nucléaires, ou deux structures cytoplasmiques, par leurs électrophorégrammes de restriction, c'est-à-dire par la distribution selon leur longueur des fragments d'ADN découpés spécifiquement par des enzymes (endonucléases de restriction). Dans un champ électrophorétique, ces fragments migrent en fonction de leur longueur et donnent un profil de distribution caractéristique du génotype. C'est le polymorphisme de découpe (RFLP pour *restriction fragments length polymorphism*).

Les sondes moléculaires permettent, elles aussi, de localiser les gènes codants recherchés : la sonde radioactive est capable de s'hybrider, sur un profil de restriction, avec le gène porteur de la même séquence de bases, c'est-à-dire du code correspondant. On découpe alors le fragment porteur avec des endonucléases de plus en plus précises et on peut ensuite en faire le clonage (Chap. VII).

Ce type de sondage-repérage porte sur l'ADN, mais on peut aussi l'appliquer aux ARN messagers ou même à la protéine. De la protéine, on remonte ensuite au gène par les synthétiseurs d'oligonucléotides qui permettent de fabriquer une sonde d'ADN. Les anticorps monoclonaux ont aussi le même rôle très précis de repérage d'un gène codant pour un polypeptide donné. Enfin, une dernière technique «d'étiquetage» de gènes par les transposons est en voie de développement. Un transposon marqué, introduit dans un génotype, peut s'insérer dans un gène et le neutraliser, permettant ainsi de déceler où était le gène. Comme on peut le constater, les méthodes d'évaluation récentes permettent de pénétrer dans l'intimité structurelle d'un génotype. Elles seront bien utiles pour détecter la présence de tel ou tel allèle dans une plante ancestrale ou dans une espèce spontanée, etc.

## Phase 2 : modification des génotypes «bruts» issus des sources

Au cours de cette phase, on utilise généralement les génotypes, extraits des sources ou du commerce, comme géniteurs. Il existe cependant quelques exceptions à cette procédure :

- la recherche de mutants par traitements avec des agents mutagènes [3] (notons ici que la mutagenèse sur culture de tissus *in vitro* s'avère beaucoup plus efficace que la mutagenèse sur plantes entières). Plus récemment, on a découvert un intense pouvoir mutagène de fragments moléculaires d'ADN injectés dans la plante ou introduits lors de la pollinisation ;

- la recherche de variants (vitrovariations) aléatoires ou dirigés (Chap. IV).

### Hybridations sexuées intraspécifiques

Dans la grande majorité des cas, les génotypes sont croisés à l'intérieur d'une même espèce avec un ou plusieurs partenaire(s) qui apportent des qualités complémentaires ou qui intensifient, par effet cumulatif, les performances.

Lorsque la caractéristique à transférer est génétiquement simple, on opère par des séries de croisements de retour sur la variété à améliorer (*back-cross* en série).

La technique consiste à prendre comme femelle la variété à améliorer, à la croiser avec le donneur, puis à reprendre leur  $F_1$  qui est recroisée sur la mère : cela donne le  $BC_1$  (croisement de retour 1).

La descendance du  $BC_1$  est à nouveau recroisée en retour sur la mère ( $BC_2$ ), etc.

A chaque cycle de croisement de retour, la moitié des gènes restants du donneur est éliminée ; puisqu'on recherchait chez le donneur une qualité oligogénique, il importe de vérifier que cette qualité est bien restée chez les individus qui serviront comme pères pour le cycle suivant de croisements sur la mère [3].

En revanche, lorsque c'est tout un ensemble de caractéristiques qu'on veut compléter entre deux parents, ou lorsqu'on manipule des performances conditionnées par des ensembles polygéniques, on croise entre eux deux géniteurs : on obtient une  $F_1$  qui est autofécondée et produit ainsi une  $F_2$  où chaque individu est une structure de recombinaison entre les chromosomes des deux géniteurs hybridés. La  $F_2$  présente une variance génétique d'autant plus vaste que les géniteurs étaient plus distants génétiquement (ayant donc un plus grand nombre de linkats différents) (Fig. 15).

Il arrive que l'on combine entre eux plus de deux parents pour obtenir des recombinaisons plus riches entre plusieurs structures : on appelle ce type de croisements des croisements pyramidaux [3] (Fig. 16) qui donnent une multi  $F_1$ . Cette dernière, autofécondée, produira une multi  $F_2$  de très grande variance génétique.

Dans le cas des populations ou des variétés-sources chez les espèces allogames, il n'est pas nécessaire de pratiquer mutagenèse ou hybridation sur le génotype extrait ; en

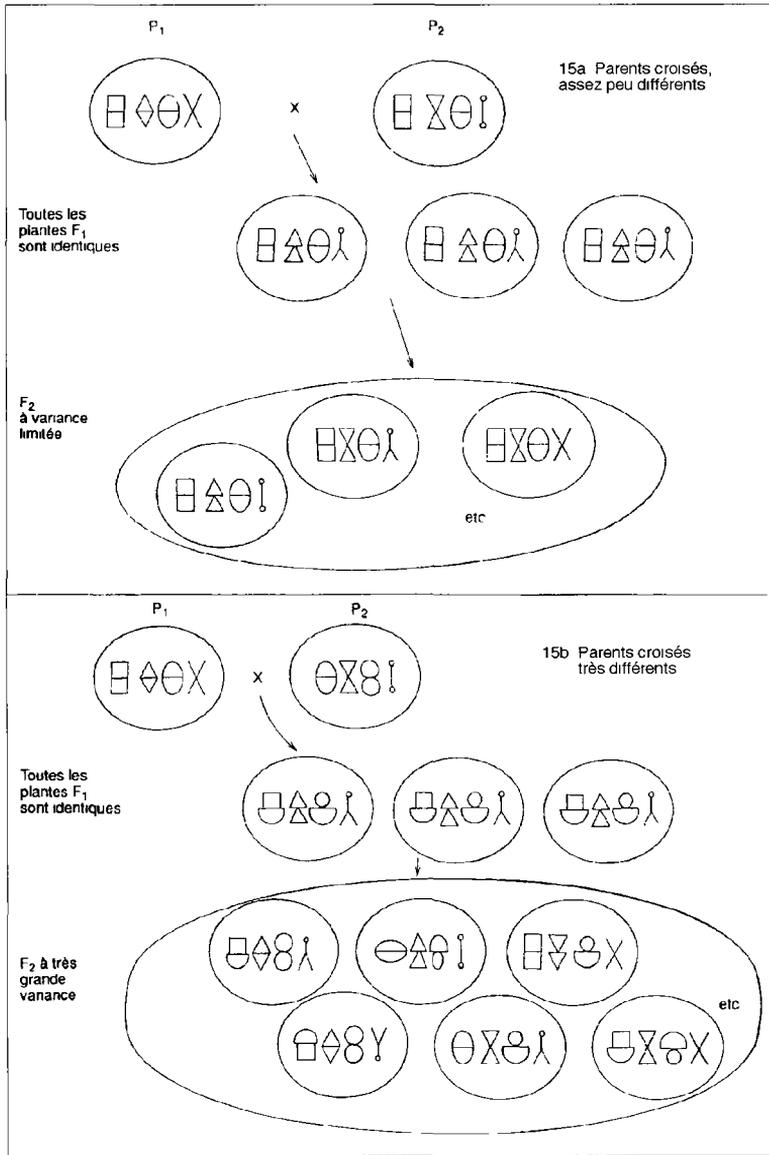
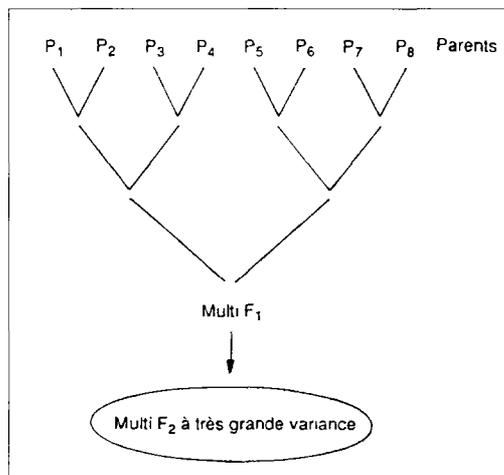


Figure 15. — Deux cas d'hybridation P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>.

effet, ce dernier est, d'emblée, hétérozygote : il suffit donc de l'autoféconder pour qu'il exprime sous forme d'une ségrégation sa composition génétique interne.

### Hybridations sexuées interspécifiques

Il n'existe pas toujours à l'intérieur de l'espèce travaillée les caractéristiques que l'on désire introduire dans la variété à créer. Dans ce cas, on fait assez fréquemment



**Figure 16.** — Schéma d'un croisement pyramidal à 8 parents.

appel à des plantes issues d'espèces voisines (par exemple rusticité du seigle introduite chez le blé ; résistance aux nématodes de *Lycopersicon peruvianum* introduite chez la tomate *Lycopersicon esculentum*). Ces hybridations entre espèces font souvent appel à des formes spontanées, très résistantes. Les hybridations sont difficiles, les embryons avortent fréquemment : la culture des jeunes embryons *in vitro* est maintenant une voie de sauvetage classique. Les produits de telles hybridations présentent de fortes stérilités et de laborieux doublements des chromosomes pour créer des amphidiploïdes (Fig. 17), nécessitent des contrôles cytogénétiques très soigneux [4]. La voie des hybridations interspécifiques se développe cependant très fortement, apportant des résistances, des précocités, des stérilités mâles, des développements d'embryons haploïdes, etc. Néanmoins, ce type d'hybridations est toujours limité au cortège d'espèces proches, ou de genres ayant de très grandes affinités entre eux : raphanus (radis), brassica (chou) par exemple.

Ici encore, les nouvelles biotechnologies ouvrent des horizons plus larges grâce aux hybridations somatiques et aux transferts de gènes (plantes transgéniques).

## Hybridations somatiques

La cellule végétale est cernée par des parois pectocellulosiques contre lesquelles s'appuie, par tonicité, le plasmalemme. Ces parois ne sont d'ailleurs pas continues ; des perforations, les plasmodesmes, permettent la mise en communication de l'ergastoplasme d'une cellule avec celui de ses voisines.

On peut lyser par des attaques enzymatiques appropriées la paroi pectocellulosique et recueillir des unités cellulaires dénudées dont la membrane prend une forme sphérique ; ce sont les protoplastes (Chap. VI). On peut agréger entre eux deux protoplastes de génotypes différents, à l'intérieur d'une même espèce, mais aussi entre des groupes très éloignés : champignon-végétal supérieur, animal-plante ...

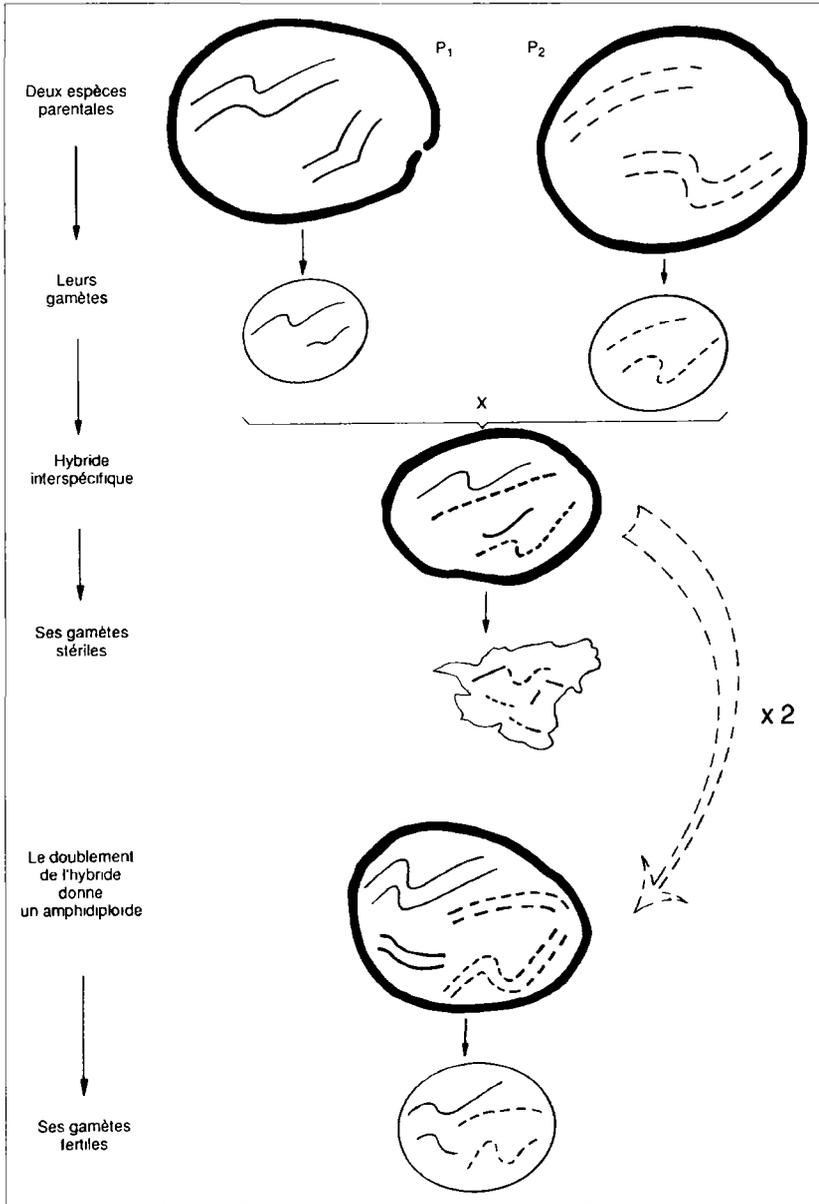


Figure 17. — Amphidiploïde.

De telles opérations sont appelées «fusion de protoplastes», élargissant ainsi considérablement les potentialités de l'hybridation sexuée [5]. Bien évidemment, lorsque les protagonistes de la fusion sont trop éloignés, animal-plante par exemple, la régénération du produit de fusion est impossible ; mais on a pu régénérer des formes nouvelles issues de fusions interspécifiques et intergénériques impossibles à obtenir par voie sexuée : ces hybrides somatiques constituent des géniteurs nouveaux intéressants. Dans

certains cas, la fusion de protoplastes ne touche que des échanges ou des recombinaisons cytoplasmiques ; de telles formes appelées «cybrides» (cytoplasmes hybrides) ouvrent, elles aussi, des perspectives nouvelles.

Dans la même ligne, la technologie de fusion protoplastes-microplastes est en cours de mise au point ; un microplaste est constitué d'éléments cellulaires enveloppés d'une membrane (mitochondries ou chloroplastes entourés d'un peu de cytoplasme par exemple).

### **Transferts de gènes**

Les développements des connaissances sur le code génétique et la régulation de son expression par les zones voisines du gène sur le chromosome et surtout la découverte d'enzymes, les endonucléases de restriction, qui découpent avec précision la molécule d'ADN ont ouvert des perspectives incommensurables au génie génétique. On peut dès maintenant extraire, après repérage, un gène de l'ensemble du domaine vivant (du virus, de la bactérie, jusqu'à l'homme) et le transférer sur les chromosomes de la plante qui, à partir de là, le transmettra à ses descendants au même titre que ses propres gènes. Nous en sommes aux toutes premières réussites de l'expérimentation par les sélectionneurs de telles plantes dites transgéniques, mais on peut prédire que les prochaines décennies exploiteront, en routine, cette très puissante technologie. Pour l'instant, l'utilisation de résistances monofactorielles à des molécules insecticides ou herbicides représente le champ d'application de ces transferts moléculaires (Chap. VII).

Mais déjà on se préoccupe de la manipulation non seulement de l'ADN codant, mais aussi des produits de transcription (ARN messagers) ou de traduction (polypeptides) du gène. Ici encore, des attaques post-transcriptionnelles, par voie moléculaire, vont révolutionner les champs d'application du génie génétique.

Comme on le constate, le sélectionneur peut, par de nombreuses voies, introduire une diversité génétique dans les génotypes qu'il a extraits des populations sources ou des collections variétales disponibles. Dans tous les cas, cette diversité constituée, par les ségrégations et les remaniements d'expression qu'elle entraîne, un champ de sélection dans lequel il faut individualiser et modeler le futur prototype d'une variété nouvelle.

### **Phase 3 : sélection dans la diversité créée et stabilisation des types retenus**

Les voies conventionnelles de sélection et de fixation d'une nouvelle variété nécessitent beaucoup de temps ; nous en sommes au paradoxe suivant : pour des espèces comme le blé ou l'orge, la durée de création est de l'ordre de dix à quinze ans et la durée de vie commerciale de l'obtention nouvelle est de l'ordre de cinq ans !

## Stratégies progressives et douces de sélection et de fixation

### *La population F<sub>2</sub>*

Après avoir introduit par une voie d'hybridation une hétérozygotie, la structure hybride résultante, appelée F<sub>1</sub>, présente assez peu de ségrégations (aucune si les parents sont homozygotes). En revanche, sa descendance en autofécondation, ou en régime frère x sœur, exprime la variabilité la plus large. Cette descendance, dite F<sub>2</sub>, est une collection d'individus tous génotypiquement différents et qui présentent une structure fortement hétérozygote. Pour fixer les idées, si les parents hybridés étaient des lignées pures, ou des structures proches de l'homozygotie, la F<sub>1</sub> est homogène et sensiblement 100% hétérozygote et chaque plante F<sub>2</sub>, issue de l'autofécondation d'une plante F<sub>1</sub>, conservera 50% de ses loci sous la forme hétérozygote [6].

Toutes les difficultés des voies de sélection proviennent de cette difficulté du choix dans la F<sub>2</sub>, choix qui ne peut se décider que sur un exemplaire (puisque tous les individus sont différents) et qui porte sur une structure encore très hétérozygote dont la valeur est occultée par les relations de dominance. La décision de l'intensité de choix à ce stade est donc à débattre avec beaucoup de doigté en fonction de la distance génétique des parents, du type de caractéristique en ségrégation, de son organisation en linkat, etc.

Nous attirons l'attention du lecteur sur le fait que les remarques concernant la population F<sub>2</sub> s'appliquent non seulement aux espèces autogames mais aussi aux espèces allogames où une plante issue d'une population ou d'une variété a, de par son hétérozygotie élevée, la signification d'une F<sub>1</sub> (et donnera donc par consanguinité une F<sub>2</sub> ou l'équivalence). Ces remarques s'appliquent aussi aux espèces à multiplication végétative où un faible reliquat de sexualité ou d'autres ouvertures offertes par la voie des biotechnologies peuvent permettre l'expression d'une diversité génétique sensiblement du type F<sub>2</sub>.

### *La sélection pédigrée*

A partir du choix d'individus dans la population F<sub>2</sub> à forte variance, la méthode la plus classique est une étude des descendance en autofécondation en suivant la filiation généalogique de chaque plante, d'où le nom de méthode pédigrée ou sélection généalogique [7].

Les plantes F<sub>2</sub> donnent donc une descendance sous forme d'une ligne F<sub>3</sub>. On dit qu'on fait un semis «épi-ligne», c'est-à-dire qu'un épi F<sub>2</sub> donne une ligne F<sub>3</sub> (terme anglo-saxon : *ear-to-row*), où chaque individu a hérité statistiquement de la moitié de l'hétérozygotie de la plante F<sub>2</sub> d'où il provient. Les individus d'une même ligne F<sub>3</sub> ont un coefficient de parenté élevé (théoriquement de 0,5 si les parents initiaux étaient homozygotes et non apparentés).

Cette ressemblance qui se dessine dans les lignes  $F_3$  permet un choix entre lignes et intra-lignes. Les plantes retenues donneront par autofécondation ou croisements consanguins des petites parcelles  $F_4$  où les individus auront encore statistiquement perdu une proportion notable de l'hétérozygotie des plantes  $F_3$  (la moitié si c'est une autofécondation qui a permis de passer de  $F_3$  à  $F_4$ ).

Et le processus se poursuit ainsi jusqu'en  $F_8, F_9, F_{10}$  selon la rigueur exigée sur le taux d'hétérozygotie résiduelle (elle est de 1/1 000 environ en  $F_{10}$  dans le cas théorique de géniteurs initiaux homozygotes, non apparentés, et où les descendances  $F_2$  à  $F_{10}$  sont obtenues en autofécondation) [8].

La méthode généalogique est donc «douce» et progressive : à chaque génération, un choix affine la progression vers un idéotype ; à chaque génération, on fait un pas vers une plus grande homozygotie, donc une plus grande stabilité et une meilleure homogénéité des descendants.

A partir de la  $F_5$ , on dispose de quantités de graines suffisantes pour faire des essais avec répétitions et dans plusieurs localités (essais multilocaux) ; on teste ainsi la rusticité et l'adaptabilité des génotypes selon des dispositifs statistiques permettant l'analyse de la variance d'interaction «génotype x localités».

Il arrive que les choix en  $F_4, F_5$  et  $F_6$  soient effectués de manière à donner à la future variété une adaptabilité très large ; pour ce faire, on utilise la méthode de sélection dite «navette» où, par exemple, si la génération  $F_4$  est choisie dans la station A, les descendances retenues seront sélectionnées dans la station B, puis les graines issues de cette  $F_5$  en B donneront des parcelles  $F_6$  testées dans la station A et ainsi de suite, d'où le nom de navette.

Le point délicat, comme nous l'avons signalé, restant le premier choix, un peu hasardeux, dans la  $F_2$ . C'est la raison essentielle qui a donné naissance à des méthodes voisines, dérivées, comme nous le verrons, de cette sélection pédigrée [3] (Fig. 18).

### ***Massale pédigrée et reprise en lignées***

Lorsque le cultivar n'est pas totalement «pur», c'est-à-dire lorsque l'homozygotie est imparfaite, du fait de mutations, de pollinisations «illégitimes» ou d'un certain taux d'allogamie dans la plante, on peut refaire une sélection dans le cultivar en choisissant des individus qui sont exactement du type recherché (sélection dite «massale» puisqu'elle se fait dans la masse du cultivar) et, à partir de ces individus choisis, on opère une «reprise en lignées», c'est-à-dire une filiation de descendance en régime de consanguinité intense (autofécondation, frère-sœur, etc.) pour restabiliser le cultivar [9].

### ***Méthode du «vrac» (méthode «bulk»)***

Pour éviter des choix délicats à la  $F_2$ , et même à un degré moindre à la  $F_3$ , on peut chez une espèce autogame où à chaque génération le taux d'homozygotie s'accroît de

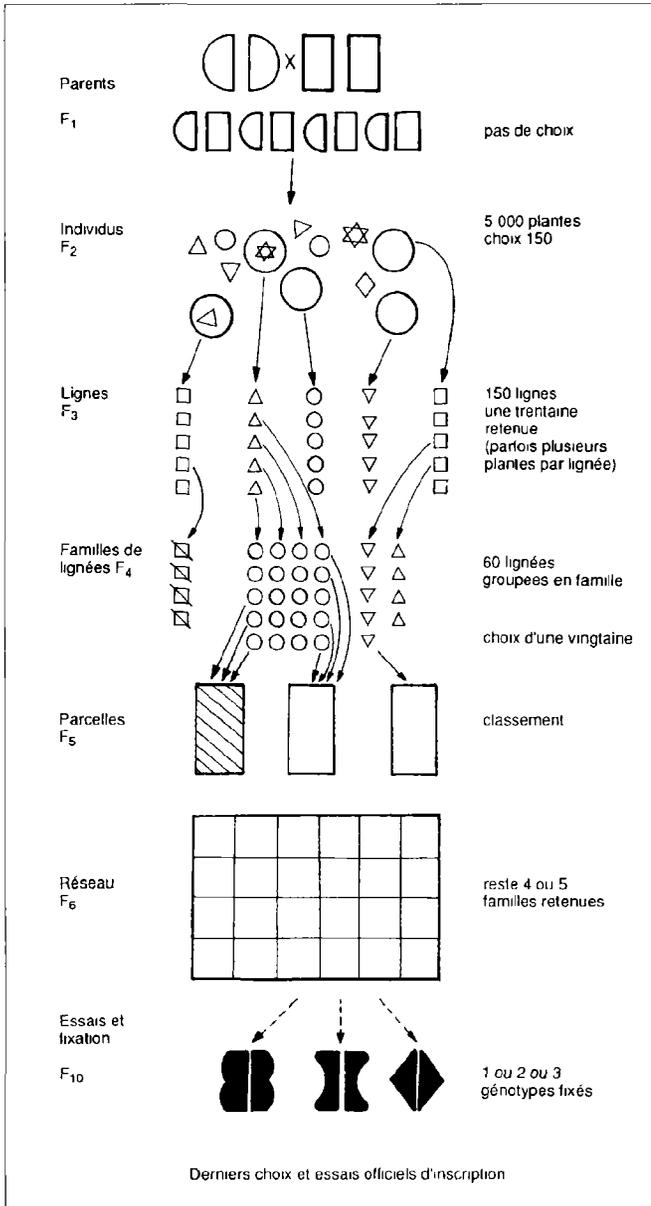


Figure 18. — Exemple d'une sélection pédigrée (ou généalogique).

50% reporter le départ en sélection pédigrée à la F<sub>4</sub>, par exemple. Jusqu'à ce stade, les premières générations F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> ... sont récoltées en vrac et ressemées sans aucune identification de pédigrée : aucun choix, sauf des éliminations par compétition ou par sélection naturelle, ou éventuellement par élimination sur l'aspect phénotypique, ne s'effectue durant ces phases ; on peut cependant renforcer l'élimination par sélection naturelle en y faisant des infections artificielles ou en choisissant les localisations des

parcelles. Il faut bien noter que cette méthode donne évidemment l'avantage aux génotypes les plus prolifiques qui, donnant plus de graines, seront fortement représentés dans la génération suivante. Cela peut être un inconvénient ou un avantage selon l'espèce ou la caractéristique travaillée.

A un stade donné, généralement en  $F_4$ , on repart en sélection pédigrée. L'intérêt de la stratégie est d'avoir considérablement allégé les premières générations et de reporter les choix sur des structures  $F_4$  déjà fortement homozygotes : les choix ont donc à ces stades une bien meilleure acuité.

N.B. On pratique le bulk pour des générations «dérobées», c'est-à-dire lorsqu'on fait deux générations par an ou plus ; l'une des générations faite dans la période normale de culture de la plante peut faire l'objet d'appréciations valables, donc de choix, les autres générations, en conditions trop artificielles, ne permettant pas d'évaluations rationnelles, sont alors conduites en «vrac» [10].

***Méthodes des descendance monograine ou monofruit (dites aussi SSD : single seed descent et single pod ou single ear descent)***

Ce sont elles aussi des variantes de la méthode généalogique qui amortissent les aléas du choix dans la  $F_2$ . Au lieu de décider quelle plante  $F_2$  sera retenue, on récolte systématiquement une seule graine (méthode monograine), un seul épi, une seule gousse ou une seule capsule (méthode monofruit) par plante  $F_2$ . On peut prolonger la méthode en  $F_3$  et même  $F_4$  si on le désire. Mais dans tous les cas, lorsque les plantes ont bien progressé vers un taux d'homozygotie satisfaisant, on poursuit par la méthode pédigrée qui autorise alors un choix bien plus pertinent [11].

Ces méthodes négligent la variance intraplante au profit de la variance interplante (la méthode monograine néglige totalement la variance intraplante, donnant un seul descendant par plante ; la méthode monofruit corrige un peu ce défaut). On peut noter que la variance intraplante ainsi négligée représente dans des descendance par autofécondation la variance interplantes d'une même ligne de la génération suivante [3].

Dans cette méthode, la compétitivité et la prolificité des individus sont totalement ignorées, puisque, quel que soit son nombre de graines ou de fruits, chaque plante ne compte que pour une unité.

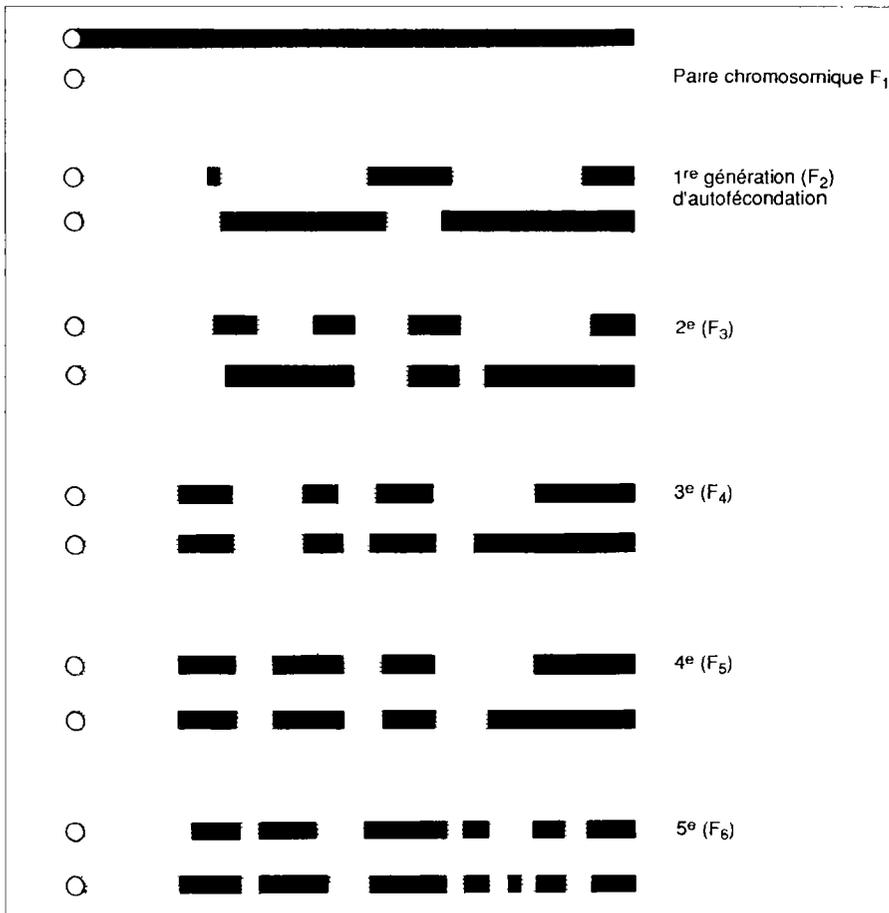
Les méthodes monograine ou monofruit combinées, à partir d'un certain stade, avec la méthode généalogique aboutissent à des génotypes dits «fixés», c'est-à-dire à des lignées pures ayant un taux d'homozygotie élevé. Ici encore les choix s'affinent au cours des dernières générations de consanguinité. Les quantités de graines très apparentées disponibles permettent des essais en parcelles, répétés dans plusieurs environnements.

## Stratégies de sélection et de fixation brutales

Les biotechnologies ont ouvert la voie à des approches très différentes de sélection et d'homogénéisation de la variété.

### Haplométhodes

En opposition avec les méthodes classiques, la possibilité d'obtenir des individus haploïdes peut s'appliquer notamment sur les structures hétérozygotes en  $F_1$ . Une plante  $F_1$  peut être considérée comme une structure 100% hétérozygote (si les géniteurs hybridés étaient des lignées pures non apparentées). Les gamètes de cette plante  $F_1$  présentent des recombinaisons qui se réalisent, durant la méiose, par des *crossing-over* déterminant des échanges entre les chromosomes parentaux (Fig. 19).



**Figure 19.** — Comment une paire chromosomique hétérozygote devient homozygote par autofécondation.

Étant donné la longueur moyenne d'un chromosome végétal, on peut estimer que un ou deux *crossing-over* se produisent en moyenne par bras chromosomique. La forte structuration en linkats des plantes supérieures donne une probabilité forte de localisation des points de recombinaison dans les zones inter-linkats : les gamètes  $F_1$  sont donc des mosaïques de longs segments parentaux, ne donnant que peu ou pas de remaniements à l'intérieur des linkats [12].

Les plantes issues de l'haploïdisation à la  $F_1$  sont stériles si on les maintient au niveau haploïde, mais bien souvent elles s'autodoublent durant la culture *in vitro* qui permet leur régénération, ou, si cela ne se produit pas, on utilise la colchicine, alcaloïde qui permet l'autodoublement d'un stock chromosomique en inhibant, lors de la mitose, la montée anaphasique des chromosomes-fils (par perturbation des microtubules du fuseau). Les chromosomes restent donc centrés dans la cellule qui, au lieu de donner deux cellules-filles aux pôles d'anaphase, effectue une télophase centrale qui englobe un noyau doublé.

Chaque individu haploïde ainsi autodoublé (soit spontanément, soit à l'aide de colchicine) est obligatoirement parfaitement homozygote. Si la plante est ensuite multipliée en autogamie, elle donne une descendance immédiatement fixée. L'ensemble d'une opération d'haplodiploïdisation demande environ douze mois. On réalise donc une fixation très brutale d'un état homozygote, avant même d'avoir pu observer la plante dans des conditions normales. Nous n'avons envisagé l'application de l'haploïdisation que sur la  $F_1$  alors que la méthode pourrait, certes, être utilisée plus tardivement, en  $F_2$ ,  $F_3$ , etc. Mais les atouts majeurs de l'haplométhode étant le gain de temps et le respect de l'intégrité intralinkat, l'application en  $F_1$  est plus rationnelle. Notons bien, ici, la différence essentielle de structuration chromosomique d'une variété produite par haplométhode, comme le montre très clairement la Figure 20 et d'une variété obtenue par affinage au cours d'une dizaine de générations de consanguinité.

Dans ce dernier cas, à chaque génération la méiose recombine plus finement les chromosomes parentaux (Fig. 19).

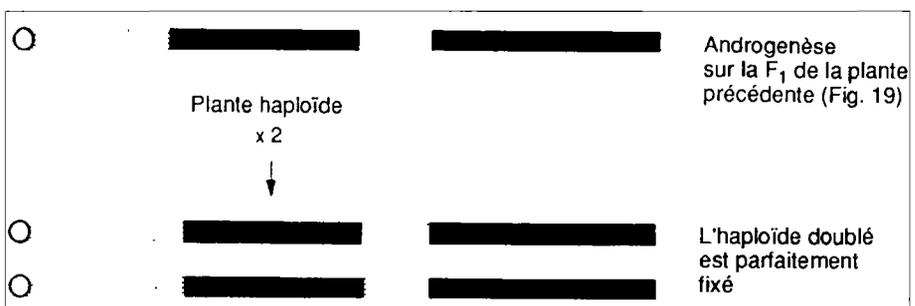


Figure 20. — Fixation de l'homozygotie après androgenèse.

Nous verrons (Chap. V) que les haplométhodes ne peuvent pas encore s'appliquer à toutes les plantes, ni même à tous les génotypes ; cependant, elles représentent d'ores et déjà une stratégie très performante qui remet en cause non seulement les méthodes de choix, mais aussi les types d'hybridation au départ et l'ensemble de l'organigramme de la création variétale [13].

Dans le même esprit, les biotechnologies du clonage impliquent des choix brutaux et une homogénéisation rapide du prototype d'un cultivar.

### ***Méthodes par clonage végétatif***

Chez les plantes à multiplication végétative, parmi la diversité des formes hybrides produites, le problème est d'évaluer l'individu le plus prometteur et de le copier végétativement pour l'observer en plusieurs exemplaires ; on confirmera ainsi la validité du choix individuel préalable : c'est ainsi que naissent cannes à sucre, rosiers, pommes de terre... On peut, grâce aux progrès des cultures *in vitro*, étendre ce type de méthodes à de nombreuses espèces en utilisant des vitroplants et, mieux encore, des embryons somatiques (ou tout autre propagule) enrobés sous forme de semences artificielles.

Si l'on a pris soin de s'assurer que la procédure de clonage maintenait la conformité du type (avec un taux de variants très faible), on peut diffuser des cultivars homogènes bien que chaque individu puisse être très hétérozygote : on concilie ainsi vigueur hybride et homogénéité de la variété. Ces méthodes de clonage s'appliquent donc tout particulièrement aux espèces allogames qui tolèrent très mal la consanguinité.

## **Phase 4 : multiplication en nombre du génotype retenu**

Lorsqu'un sélectionneur a élaboré un génotype assez proche de l'idéotype qu'il s'était fixé comme objectif, il lui reste encore à le produire en quantité suffisante pour satisfaire la demande du marché. Ce passage du protocultivar au cultivar s'accompagne d'un retour au mode de reproduction naturel de l'espèce et peut donc présenter chez les allogames un problème de maintien du type choisi.

### **Cas simples chez les autogames et les espèces à multiplication végétative**

Il est facile de passer à la multiplication sexuée d'une lignée pure chez les espèces autogames. Les seuls problèmes à éviter sont les contaminations par pollinisation croisée ; car, même chez les plantes à très forte autogamie, il y a toujours une faible possibilité d'hybridations accidentelles. Il est facile d'éviter ces accidents en éliminant les quelques mètres de bordure des parcelles lors des premières générations de multiplication de la variété. Il faudra aussi veiller à faire des «reprises en lignées», c'est-à-dire à réexaminer et à épurer des lignées qui, en autofécondation contrôlée, serviront de noyau de départ pour les multiplications.

Lorsque l'espèce est à multiplication végétative, on reprend de même régulièrement des «têtes de clones» qui sont examinées pour éliminer les «hors-types», mutants, plantes virosées, etc., de manière à ne cloner que des individus sains et parfaitement conformes à la description de la variété.

### Cas des espèces allogames

Pour les espèces à fécondation croisée, le problème est notablement plus complexe. Nous avons vu, à propos de la sélection pédigrée, qu'en imposant un régime de reproductions consanguines à ce type de plantes on peut aboutir à des lignées ayant un taux d'homozygotie relativement élevé. Cependant les espèces allogames supportent très mal la consanguinité ; beaucoup de génotypes deviennent alors stériles ou manifestent des faiblesses qu'on appelle effet de consanguinité. Cette dépression rend impossible la mise au commerce de structures ayant un certain degré d'homozygotie.

On doit donc rétablir un état hétérozygote en diffusant le produit de croisement entre des types parentaux sélectionnés. En fait, chez les allogames on sélectionne, au cours des générations pédigrées, les lignées parentales à la fois pour les gènes de qualité qu'elles apportent et pour les facteurs favorables à la combinaison hybride avec le (ou les) partenaire(s). On appelle aptitude à la combinaison la qualité de la descendance produite par la combinaison parentale. Cette aptitude à la combinaison est dite générale lorsqu'on l'estime sur la valeur moyenne des descendances produites par l'hybridation d'un parent apparié à un ensemble général de partenaires [14].

Ainsi lorsque AA est croisé par BB, CC, DD, EE, FF, GG..., la valeur moyenne des descendances  $AB + AC + AD + AE...$  mesurera l'aptitude générale à la combinaison de AA.

Si l'on mesure la valeur d'une descendance d'un croisement particulier, on dira qu'elle représente l'aptitude spécifique à la combinaison du croisement [3, 14]. Ainsi la performance de la descendance AD mesure l'aptitude spécifique à la combinaison de AA  $\times$  DD.

Chez les nombreuses plantes allogames (maïs, mil, palmier à huile, tournesol, luzerne, etc.), le choix des lignées parentales tient prioritairement compte de leurs aptitudes à la combinaison. Les modalités d'évaluation de ce paramètre varient selon que l'on voudra commercialiser un hybride simple, un hybride trois voies, un hybride double, ou une variété synthétique [15, 16].

### Multiplication par clonage

Cette multiplication est une voie normale pour les espèces à reproduction végétative (tubercules, stolons, rejets, œilletons, greffe, bouturage ...). Tout au long des cycles de multiplication, c'est la qualité du plant qui constitue l'objectif principal : il faut éliminer radicalement tout clone portant des viroses, même si elles sont asymptomatiques

(le test ELISA et ses dérivés permettent de travailler en toute sécurité). L'état physiologique du plant et son taux de multiplication sont aussi des critères importants [17].

Comme nous l'avons vu, les possibilités du clonage *in vitro* par la production de vitroplants, puis dans quelques années de semences artificielles, constituent une véritable révolution dans les stratégies de production d'un nouveau cultivar. Même chez les espèces à multiplication végétative comme le fraisier, le bananier ou la pomme de terre, la potentialité de la culture *in vitro*, par sa rapidité et par son taux de multiplication très supérieur à celui des voies conventionnelles, a entraîné un développement d'ateliers où cette production est devenue de la routine. Chez les espèces autogames, la production de vitroplants est pour l'instant assez peu développée du fait que les producteurs de ce nouveau produit n'ont pas voulu (ou pas su) y associer des plus-values génétiques, tel l'hétérosis, et ne multiplient que des cultivars qui peuvent être produits par semences.

Il est clair que, dans ce cas, pour nombre d'espèces, la culture *in vitro* est très difficilement concurrentielle. Il pourra en être autrement quand on mettra au commerce des sojas hybrides, des pois ou des haricots hybrides, voire des arachides, des melons ou des tomates triploïdes ... sous forme de semences artificielles. On est en droit d'attendre de ces nouveautés des gains de rendement, de précocité, de tolérance, de texture ... très importants qui compenseraient largement le surcoût de la semence [18].

Chez les espèces allogames, les modifications que les biotechnologies entraîneront dans la vie du sélectionneur sont encore plus spectaculaires : astreint jusqu'ici à sélectionner progressivement des lignées à bonnes aptitudes à la combinaison, obligé de le multiplier avec difficulté pour obtenir un tonnage commercial de l'hybride, tenu à produire une variété homogène sans éléments issus de l'autoreproduction du parent femelle, ce qui entraîne les laborieuses utilisations de la stérilité mâle ou de la castration manuelle, parfois amené à produire des variétés synthétiques triploïdes après de très pesantes multiplications des parents, telle est la liste non exhaustive des contraintes du sélectionneur.

Face à cela, le repérage précoce et rapide de l'individu exceptionnel et son clonage, en évitant les sources de variations, représente un schéma beaucoup plus léger qui amène alors le sélectionneur à une tout autre stratégie : créer une structure d'entrée en sélection très diversifiée, se doter des outils d'évaluation rapide et applicables à un seul individu, être performant dans les taux de multiplication de l'idéotype repéré font basculer les centres principaux de l'activité du sélectionneur de plantes allogames. Notons deux points principaux :

— la production de plants ou de semences *in vitro* rend la multiplication d'une variété indépendante du climat et des pays, c'est une opération de pure biotechnologie industrielle ;

— cependant, l'expérimentation, les contrôles de stabilité, les définitions des idéotypes entraîneront toujours la participation essentielle du sélectionneur de terrain.

La structure des variétés-clones a des aspects bien particuliers : variance génétique nulle malgré une très grande hétérozygotie et uniformité cytoplasmique importante.

Ces particularités ne sont pas sans inquiéter les sélectionneurs qui ont vécu les expériences douloureuses à la suite d'opérations qui avaient abouti à la diffusion de cultivars très homogènes : citons les hybrides de maïs sur cytoplasme Texas largement diffusés en Amérique du Nord, qui ont très rapidement été détruits par la foudroyante propagation d'une race T d'helminthosporiose spécifique de cet unique cytoplasme. Citons aussi la brutale destruction par une race adaptée d'un champignon pathogène, le *melampsora*, d'un clone de peuplier hybride qui avait été planté sur de trop grandes surfaces dans la vallée du Pô.

L'homogénéité de l'hôte et, apparemment, surtout du cytoplasme de l'hôte, entraîne donc très rapidement le développement explosif de races pathogènes inféodées à un génotype. Pour éviter de tels accidents, il est nécessaire d'envisager le clonage simultané de plusieurs cultivars différents génotypiquement, mais très proches dans leurs qualifications agronomiques. Ces mosaïques de clones pourront être diffusées sous forme de variétés composites, c'est-à-dire en compositions mélangées, ou séparément avec des instructions sur les modalités de leur plantation [19].

## **Conclusion**

Les étapes de la création d'une variété sont donc diverses, elles découlent d'une stratégie globale choisie par le sélectionneur et on ne peut en négliger aucune. Pour chaque phase, nous avons constaté des voies multiples, des plus conventionnelles aux plus «avancées». Les biotechnologies y ouvrent des perspectives plus larges. Néanmoins, il faut insister sur le fait qu'une opération de création d'un protocultivar est un tout cohérent. On ne peut donc valablement greffer une phase biotechnologique dans une stratégie pensée en termes de méthodes conventionnelles. On ne peut, de même, utiliser un équipement et une infrastructure adaptés à l'évaluation progressive des familles, pour réaliser le choix décisif et brutal asservi à l'évaluation d'un individu génétique unique qu'imposent des stratégies nouvelles, comme l'haplométhode ou le clonage.

Le métier d'un sélectionneur moderne devient donc de plus en plus délicat, en ce sens qu'il fait maintenant appel à des connaissances allant de la génétique moléculaire à l'expérience du terrain et à la prévision de marchés sans cesse évoluant [20].

**Tableau I.** Données sur les principales espèces intervenant en amélioration des plantes.

Nom latin	Nom français	Nom anglais	Système de reproduction	Nombre de chromosomes
<i>Actinidia chinensis</i>	Actinidia (Kiwi)	Actinidia	Al	116, 160, <u>x</u>
<i>Aegilops sp.</i>	Aegilops	-	Al	18, 28, <u>7</u>
<i>Agave sisalana</i>	Sisal	Sisal	Al	138, <u>30</u>
<i>Agropyrum sp.</i>	Agropyron chiendent	Agropyron	Al	14, 28, <u>7</u>
<i>Agrostis sp.</i>	Agrostis	-	Al	14, 28, <u>7</u>
<i>Allium cepa</i>	Oignon	Onion	Al	16, 32, <u>8</u>
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Amaranthe	-		8, 17
<i>Andropogon</i>	Andropogon	-	Al	20, 40, 5, <u>10</u>
<i>Apium graveolens</i>	Céleri	Celery	Al	22, <u>11</u>
<i>Arachis hypogea</i>	Arachide	Groudnut, peanut	Au	20, 40, <u>10</u>
<i>Asparagus officinalis</i>	Asperge	Asparagus	Al	20, <u>10</u>
<i>Avena sativa</i>	Avoine	Oat	Au	14
<i>Beta vulgaris</i>	Betterave	Sugar beet	Al	18, <u>9</u>
<i>Brassica campestris</i>	Navet	Turnip	Al	20
<i>Brassica juncea</i>	Moutarde brune	-	Al	8, 9, <u>10, 11</u>
<i>Brassica napus</i>	Colza	Rape	Int	38
<i>Brassica oleracea</i>	Choux	Cabbage	Al	18
<i>Brassica chinensis</i>	Choux chinois	Shantung cabbage	Al	20
<i>Brassica pekinensis</i>	Choux de Pékin	Pe tsai	Al	20
<i>Bromus inermis</i>	Brome inerme	-	Au	42, 56, <u>7</u>
<i>Cajanus cajan</i>	Pois de cajan	Pigeon pea	Au	22, 44, 66, <u>11</u>
<i>Camellia sinensis</i>	Thé	Tea		30, <u>15</u>
<i>Cannabis sativa</i>	Chanvre	Hemp	Al	20, <u>10</u>
<i>Capsicum annuum</i>	Poivron	Paprika, pepper Chili	Au	24, <u>12</u>
<i>Capsicum nigrum frutescens</i>	Piment	Parika pepper, Cayenne	Au	24, <u>12</u>
<i>Carica papaya</i>	Papaye	Papaya papaw	Al	<u>18, 19</u>
<i>Carthamus tinctorius</i>	Carthame	Safflower	Al	24, <u>12</u>
<i>Carum carvi</i>	Cumin	Caraway	Al	20, <u>10</u>
<i>Castanea sativa</i>	Châtaignier	Chestnut	Al	24, <u>12</u>
<i>Cicer arietinum</i>	Pois chiche	Chick pea	Au	16, <u>7, 8</u>
<i>Citrullus vulgaris</i>	Pastèque	Watermelon	Al	22, <u>11</u>
<i>Citrus limon</i>	Citron	Lemon	Al	18, 36, <u>9</u>
<i>Citrus aurantium</i>	Orange	Orange	Al	18, <u>36</u>
<i>Citrus paradisi</i>	Pamplemousse	Grapefruit	Al	
<i>Citrus sinensis</i>			Al	
<i>Cocos nucifera</i>	Cocotier (grand) (nain)	Coconut	Al Au	32, <u>16</u>
<i>Coffea arabica</i>	Caféier	Coffee	Au	44, <u>11</u>
<i>Coffea canephora var robusta</i>	Caféier	Coffee	Al	22, 44, <u>11</u>
<i>Corylus avellana</i>	Noisetier	Hazel	Al	22, 28, <u>11, 14</u>
<i>Cucumis melo</i>	Melon	Cantaloupe	Al	24, <u>7, 12</u>

Nom latin	Nom français	Nom anglais	Système de reproduction	Nombre de chromosomes
<i>Cucumis sativus</i>	Concombre	Cucumber	Al	14, <u>7</u> , <u>12</u>
<i>Cucurbita moschata</i>		Pumpkin	Al	24, <u>10</u> , <u>12</u>
<i>Cucurbita pepo</i>	Courge	Squash	Al	40
<i>Cychorium endiva</i>	Endive	Witloaf	Al	
<i>Cydonia oblonga</i>	Coing	Quince	Al	34, <u>14</u>
<i>Cynara scolymus</i>	Artichaut	Artichoke	Al	34, <u>17</u>
<i>Dactylis glomerata</i>	Dactyle	Cocksfoot orchardgrass	Al	32, <u>8</u>
<i>Daucus carota</i>	Carotte	Carrot	Al	18, <u>9</u>
<i>Digitalis lanata purpurea</i>	Digitale	Foxglove		56, <u>28</u>
<i>Dolichos</i>	Pois lablab	Lablab	Au	22, <u>11</u>
<i>Elaeis guineensis</i>	Palmier à huile	Oil palm	Al	32, <u>11</u>
<i>Elymus</i>	Elymus	Elymus		
<i>Euchlaena</i>	Teosinte	Teosinte	Al	20, <u>10</u>
<i>Fagus sylvatica</i>		Beech	Al	24, <u>12</u>
<i>Festuca arundinacea</i>	Fétuque élevée	Tall fescue	Al	28, 42+0 à 2 (B) <u>7</u>
<i>Festuca pratensis</i>	Fétuque des prés	Meadow fescue	Al	14, +0 à 1 (B) <u>7</u>
<i>Ficus carica</i>	Figuier	Fig	Al	26, <u>16</u>
<i>Fragaria ananassae</i>	Fraisier	Strawberry	Al	56, <u>7</u>
<i>Glycine max</i>	Soja	Soyabean soybean	Au	40, <u>10</u>
<i>Gossypium barbadense</i>	Cotonnier	Coton	Au	52, 26, <u>13</u>
<i>Gossypium hirsutum</i>	Cotonnier	Coton	Au	52, 26, <u>13</u>
<i>Helianthus annuus</i>	Tournesol	Sunflower	Al	34, <u>17</u>
<i>Helianthus tuberosus</i>	Topinambour	Jerusalem artichoke	Al	102, <u>17</u>
<i>Hevea brasiliensis</i>	Hevea	Rubber	Al	36, <u>9</u>
<i>Hibiscus cannabinus</i>	Roselle	Rosella		36
<i>Hibiscus esculentus</i>	Gombo	Okra	Au	120, <u>7</u> à 12
<i>Hordeum bulbosum</i>	Orge bulbeuse		Au	14, <u>7</u>
<i>Hordeum vulgare</i>	Orge cultivé	Barley	Au	
<i>Humulus</i>	Houblon	Hop	Au	
<i>Hyoscyamus niger</i>	Jusquiame	Henbana	Au	
<i>Ipomea batatas</i>	Patate	Sweet potato	Al	90, <u>15</u>
<i>Juglans regia</i>	Noyer	Walnut	Al	32, <u>16</u>
<i>Lactuca sativa</i>	Laitue	Lettuce	Au	18, <u>8</u> , 9
<i>Lathyrus odoratus</i>	Pois de senteur	Sweet pea	Au	14, <u>7</u>
<i>Lens culinaris</i>	Lentille	Lentil	Au	14, <u>7</u>
<i>Linum usitatissimum</i>	Lin	Linseed, flax	Au	30, <u>15</u>
<i>Litchi sinensis</i>	Litchi	Litchee		38, 30
<i>Lolium multiflorum</i>	Raygrass d'Italie	Annual ryegrass	Al	4
<i>Lolium perenne</i>	Raygrass anglais	Perennial ryegrass	Al	14, <u>7</u>
<i>Lupinus albus</i>	Lupin	Lupin		30, 40, 50, <u>12</u>
<i>Lupinus luteus</i>				48, 52, <u>12</u>
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	Tomato	Au	24, <u>12</u>
<i>Malus communis</i>	Pommier	Apple	Al	34, 51, <u>17</u>
<i>Mangifera indica</i>	Mangue	Mango		40, <u>10</u>
<i>Manihot esculenta</i>	Manioc	Manioc cassava	Al	36, (72), <u>9</u>

Nom latin	Nom français	Nom anglais	Système de reproduction	Nombre de chromosomes
<i>Medicago sativa</i>	Luzerne	Lucerne, alfalfa	Al	32, <u>8</u>
<i>Musa sapientium</i>	Banane	Banana	Veg	22, <u>33</u> , <u>44</u> , <u>11</u>
<i>Nicotiana glauca</i>	Nicotiana	Nicotiana	Au	24, <u>9</u> ; <u>10</u> , <u>12</u>
<i>Nicotiana sylvestris</i>	Nicotiana	Nicotiana	Au	24, <u>9</u> , <u>10</u> , <u>12</u>
<i>Nicotiana rustica</i>	Nicotiana	Nicotiana	Au	48, <u>9</u> , <u>10</u> , <u>12</u>
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabac	Tabacco	Au	48, <u>9</u> , <u>10</u> , <u>12</u>
<i>Olea europea</i>	Olivier	Olive	Al	46, <u>23</u>
<i>Onobrychis sativa</i>	Sainfoin	Sainfoin	Al	14, <u>28</u> , <u>7</u>
<i>Oryza sativa</i>	Riz	Rice	Au	24, <u>12</u>
<i>Panicum maximum</i>	Herbe de Guinée	Guinea grass	Al	18, <u>36</u> , <u>9</u>
<i>Papaver somniferum</i>	Pavot, œillette	Poppy	Al	22, <u>11</u>
	Orientale	Oriental poppy	Al	28, <u>7</u>
<i>Pennisetum typhoides</i>	Mil	Pearl millet		14, <u>7</u>
<i>Persea americana</i>	Avocat	Avocado	Al	24, <u>12</u>
<i>Petroselinum sativum</i>	Persil	Parsley	Al	20, <u>11</u>
<i>Phalaris arundinacea</i>	Phalaris	Reedgrass		14, <u>28</u> , <u>7</u>
<i>Phaseolus lunatus</i>		Lima bean		22, <u>11</u>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot	French bean	Au	22, <u>11</u>
<i>Phleum pratense</i>	Fléole	Timoty	Al	42, <u>7</u>
<i>Phoenix dactylifera</i>	Dattier	Date	Al	36, <u>18</u>
<i>Pistacia vera</i>	Pistachier	Pistachio	Al	
<i>Pisum sativum</i>	Pois	Pea	Au	14, <u>7</u>
<i>Poa pratensis</i>	Paturin	Bluegrass	Veg	56, <u>28</u> , <u>70</u> , <u>7</u>
<i>Poncirus trifoliata</i>	Poncirus	Trifoliate orange	Al	18, (36), <u>9</u>
<i>Prunus amygdalus</i>	Amandier	Almond	Al	16, <u>8</u>
<i>Prunus armeniaca</i>	Abricot	Apricot	Au	16
<i>Prunus avium</i>	Merisier	Wildcherry	Al	16
<i>Prunus cerasus avium</i>	Cerisier	Cherry	Al	32
<i>Prunus domestica</i>	Prunier	Plum	Al	-48
<i>Prunus nectarina</i>	Nectarine	Nectarine	Au	
<i>Prunus persica</i>	Pêcher	Peach	Au	16
<i>Pyrus communis</i>	Poirier	Pear (tree)	Al	34, <u>51</u> , <u>17</u>
<i>Pyrus malus</i>	Pommier	Apple (tree)	Al	34, <u>51</u> , <u>17</u>
<i>Quercus robur</i>	Chêne	Oak	Al	24, <u>12</u>
<i>Raphanus sativus</i>	Radis	Radish	Int	18, <u>9</u>
<i>Ribes nigrum</i>	Groseillier	Black current	Al	16, (32), <u>8</u>
<i>Ribes rubrum</i>	Groseillier	Red whit	Al	16
<i>Ricinus communis</i>	Ricin	Castor-oil plant	Int	20, <u>10</u>
<i>Rosa</i>	Rose	Rose		14, <u>28</u> , <u>21</u> , <u>7</u>
<i>Rubus idaeus</i>	Framboise	Raspberry	Al	14, <u>21</u> , <u>28</u> , <u>7</u>
<i>Saccharum officinarum</i>	Canne à sucre	Sugarcane	Al	80 à 173, <u>10</u>
<i>Secale cereale</i>	Seigle	Rye	Al	14, <u>7</u>
<i>Sesamum indicum</i>	Sésame	Sesame		26, <u>13</u>
<i>Setaria italica</i>	Sétaire, Millet des oiseaux	Foxtail millet	Al	18, <u>9</u>
<i>Solanum melongena</i>	Aubergine	Eggplant	Au	24
<i>Solanum nigrum</i>	Morelle noire	Nightmare	Au	24, 48

Nom latin	Nom français	Nom anglais	Système de reproduction	Nombre de chromosomes
<i>Solanum tuberosum</i>	Pomme de terre	Potato	Al	48, <u>12</u>
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgho	Sorgo	Au	20, <u>5</u>
<i>Sorghum sudanense</i>	Sorgho, soudangrass	Sudangrass	Al	20
<i>Spinacia oleracea</i>	Epinaud	Spinach	Al	12, <u>6</u>
<i>Theobroma cacao</i>	Cacaoyer	Cocoa	Al	20, <u>10</u>
<i>Trifolium pratense</i>	Trèfle violet	Red clover	Al	14, <u>7</u>
<i>Trifolium repens</i>	Trèfle blanc	White clover	Al	28, <u>7</u>
<i>Tripsacum dactyloides</i>	Tripsacum	-	Al	36, <u>9</u> , <u>18</u>
<i>Triticum aestivum</i>	Blé tendre	Wheat	Au	42, <u>7</u>
<i>Triticum durum</i>	Blé dur		Au	28, <u>7</u>
<i>Triticum monococcum</i>	Engrain		Au	14, <u>7</u>
<i>Triticum spelta</i>	Epeautre	Spelt	Au	42, <u>7</u>
<i>Vicia faba</i>	Feverole	Horsebean	Au	12, <u>6</u>
<i>Vicia sativa</i>	Vesce	Common vetch	Au	12
<i>Vigna mungo</i>	Haricot mongo	Angola	Au	
<i>Vigna unguiculata</i>	Niébé		Au	

Les nombres chromosomiques soulignés sont les nombres chromosomiques de base.

Al : Allogame ;

Au : Autogame ;

Int : intermédiaire ;

Veg : multiplication végétative.

(D'après Demarly 1984).

## Références

1. Sprague GF, *et al.* Recurrent selection for specific combining ability and type of gene action involved in yield heterosis in corn. *Agron J* 1959 ; 51 : 392-4.
2. Eberhart SA. Factors affecting efficiencies of breeding methods. *Afr soils* 1970 ; 15 : 669-80.
3. Demarly Y. *Génétique et amélioration des plantes*. Paris ; Masson, 1977 (287 p).
4. Essad S. La polyploidie et ses aspects évolutifs en relation avec l'amélioration des plantes. *Ann Amélior Plantes* 1957 ; 7 : 199-226.
5. Téoulé E. Culture *in vitro* de tissus, fusion de protoplastes et perspectives dans l'amélioration des plantes. In : Scriban, *Biotechnologie*. Paris : Technique et documentation, Lavoisier, 1988 (906 p).
6. Hanson WD. The breakup of initial linkage blocks under selected mating systems. *Genetics* 1959 ; 44 : 857-68.
7. Allard RW. *Principles of plant breeding*. New York : Wiley, 1969 (347 p).
8. Allard RW, *et al.* The genetics of inbreeding populations. *Adv Genet* 1968 ; 14 : 55-131.
9. Valdeyron G. *Génétique et amélioration des plantes*. Paris : Baillière 1961 (291 p).
10. Comstock RE, *et al.* Genotype. Environment Interactions., In : Statistical Genetics and Plant Breeding. Publication 982. NAS/NRC Washington, 1963 : 164-96.

11. Brim CA, *et al.* Inheritance of quantitative characters in soybeans. *Crop Sci* 1961 ; 1 : 187-90.
12. Demarly Y. Les plantes haploïdes. *Le courrier du CNRS* 1983 ; 50 : 35-40.
13. Demarly Y. Anther and pollen culture for production of haploids. Their utilization in plant breeding. In: *Report Eucarpia meeting*. Ed. B. Nuesch, Zurich, 1975 : 142-54.
14. Demarly Y. Commentaires sur les aptitudes à la combinaison. *Ann Amélior Plantes* 1972 ; 22(2) : 187-200.
15. Gallais A. Evolution de la vigueur des variétés synthétiques diploïdes au cours des générations de multiplication. I. En régime de panmixie. *Ann Amélior Plantes* 1967 ; 17 : 291-301.
16. Gallais A. Evolution de la vigueur des variétés synthétiques diploïdes au cours des générations de multiplication. II. Avec déviations par rapport à la panmixie. *Ann Amélior Plantes* 1970 ; 20 : 5-26.
17. Rives M. Bases génétiques de la sélection clonale chez la vigne. *Ann Amélior Plantes* 1961 ; 11(3) : 337-55.
18. Demarly Y. Amélioration des plantes et biotechnologies. *CR Soc Biol* 1994 ; 188 : 77-91.
19. Demarly Y. Relations hôte-pathogène et stratégie des multilignées. *Ann Phytopathol* 1977 ; 9 (1), : 21-31.
20. Demarly Y. Voies nouvelles de l'amélioration des plantes, exigences technologiques et qualités nutritionnelles. *Cahiers de nutrition et de diététique* 1986 ; 5 : 279-82.



## **Biotechnologies du clonage des génotypes : promotion de l'individu d'élite**

### **Les faits biologiques**

Comme nous l'avons vu, l'évolution qui a diversifié de grands rameaux représentant des stratégies de la vie a retenu, chez le végétal, des structures (épigénique-linkat) de l'information permettant une morphogenèse adaptative permanente des individus. Il n'est donc pas surprenant que les tissus végétaux aient gardé une forte aptitude à régénérer des organes et même des individus entiers. D'ailleurs, depuis longtemps, les horticulteurs et les pépiniéristes utilisent le marcottage, le bouturage, la greffe... comme voies de propagation de certains génotypes difficiles ou impossibles à maintenir identiques par voie sexuée (par exemple : cultivars d'arbres fruitiers, hévéas, rosiers). Plus récemment, les cultures *in vitro* ont élargi le domaine de ces techniques de clonage en permettant la production de vitroplants et même en ébauchant les premiers pas de la fabrication de semences artificielles.

### **Vitroplants**

Les progrès dans la définition des milieux artificiels et dans les séquences des différents milieux à utiliser *in vitro* permettent aujourd'hui de régénérer des individus à partir de presque toutes les parties de la plante. Cependant, les potentialités des diverses régions, organes ou tissus, de la plante sont très différentes.

#### ***Fonctionnement des méristèmes et programme génétique***

Les plantes possèdent des zones de multiplication qui ébauchent les organes et les tissus et qui sont appelées méristèmes.

Considérons l'un de ces méristèmes, le méristème apical, qui constitue le bourgeon terminal, ou apex, d'une plante. Ce méristème est situé dans une zone sub-apicale, où un massif circulaire de cellules appelé «anneau initial» subit des mitoses très fréquentes [1] (pour fixer les idées, nous pouvons considérer que chaque cellule fait une division par 24 heures dans cette zone [2]).

Au-dessus, jusqu'à l'extrême sommet de la plante, les cellules se divisent aussi, mais à des rythmes décroissant à mesure que l'on s'éloigne de l'anneau initial (Fig. 21).

On sait qu'une cellule végétale qui est en mitose n'a que les gènes du métabolisme basal, et ceux qui sont nécessaires à la division, qui sont en fonctionnement. Autrement dit, pendant la durée de la division cellulaire, si une cellule est à l'étape «15» (par exemple) de son programme génétique (Fig. 22), les deux cellules filles se retrouveront à la même étape «15», puisque tous les gènes codant pour des enzymes ou des protéines faisant avancer le programme génétique sont réprimés durant la division.

Le programme génétique n'avance donc pas dans l'anneau initial. En revanche, au-dessus de l'anneau initial, les cellules ont un temps de latence entre les divisions et pendant ce temps des gènes fonctionnent, des enzymes des protéines modifient les situations épigénétiques ; le programme génétique avance ; il avance d'autant plus que les intervalles entre mitoses sont longs (Fig. 22). Pour de telles cellules qui seraient par exemple elles aussi à l'étape «15» du programme, ce fonctionnement amène à l'étape

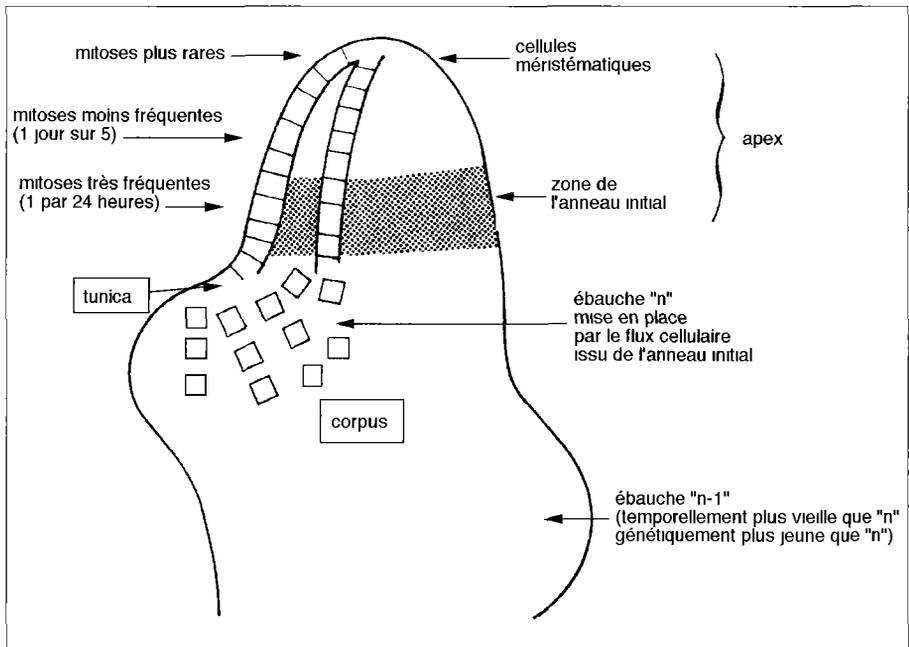


Figure 21. — Schéma d'une zone apicale.

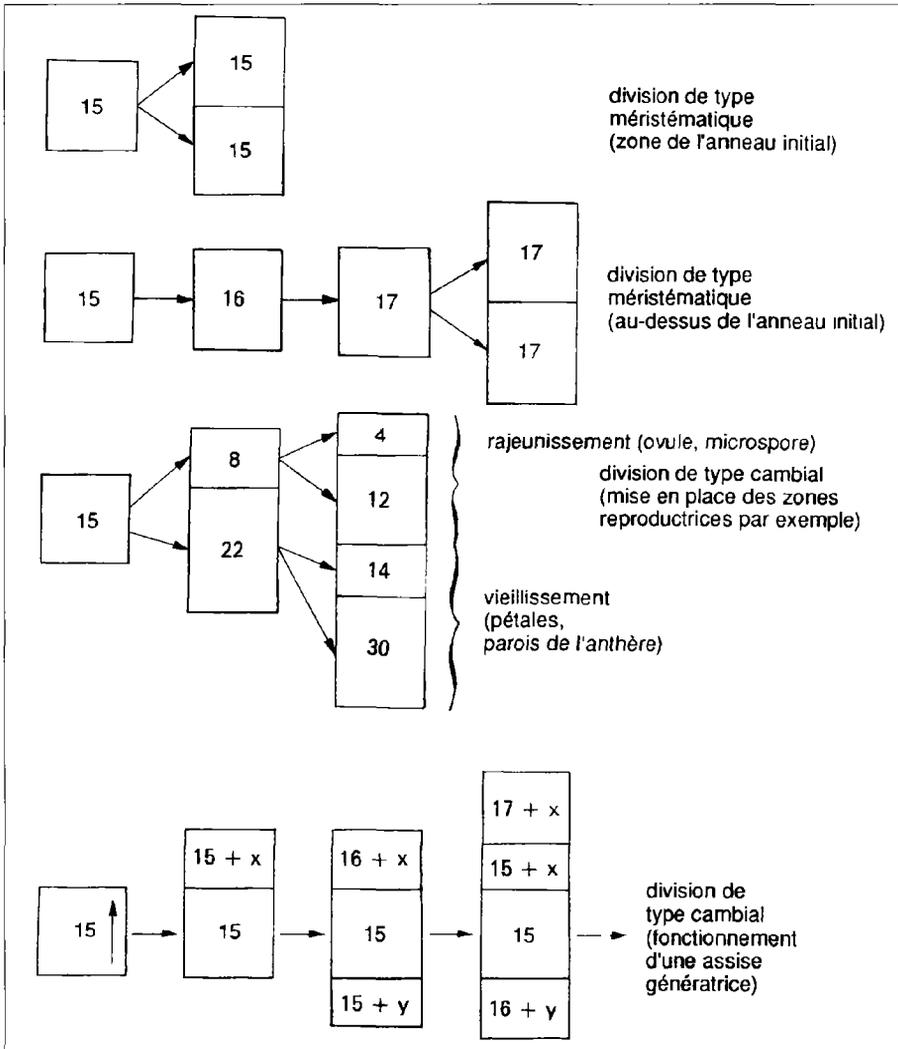
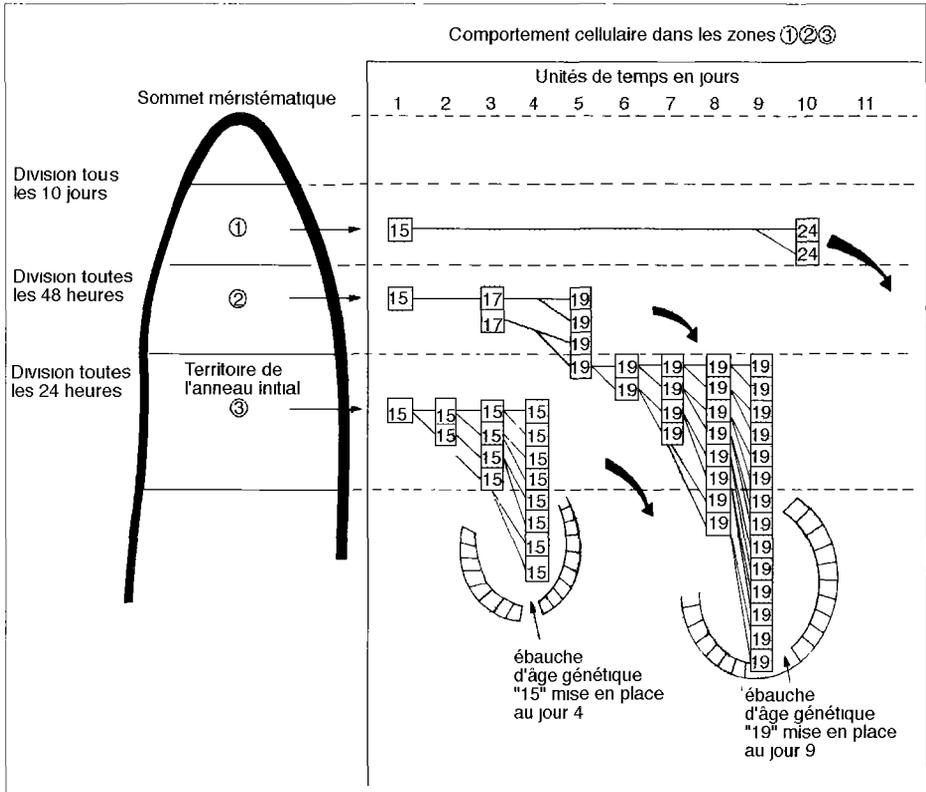


Figure 22. — Les mitoses et le programme génétique.

«16» ou «17»... avant la division. Comme le territoire de l'anneau initial est à une distance fixe du sommet, toute division d'une cellule située au-dessus de cette zone envoie vers le bas l'une des deux cellules filles, de même que l'anneau initial qui se double toutes les 24 heures envoie sous lui les masses cellulaires ébauchées (Fig. 23).

Ainsi, entrent dans la zone des divisions intenses des cellules du dessus, de plus en plus avancées en âge génétique. L'anneau initial les amplifie et positionne, sous lui, en montant (croissance en hauteur), des ébauches de plus en plus avancées en programme génétique. Par exemple, à un certain moment de déroulement du programme les ébauches récemment mises en place seront potentiellement florales [3].



**Figure 23.** — Représentation du fonctionnement apical. Les cellules des zones 1, 2 et 3 ont un score «15» tout à fait arbitraire.

Dans les méristèmes apicaux, des filiations cellulaires transversales spécialisées se dégagent très rapidement à partir de cellules initiales ou de massifs cellulaires initiaux : ils aboutissent à la constitution de couches ou assises différentes [1, 4] (voir Fig. 25) ; la plus externe  $L_1$  comprend l'épiderme. La partie intermédiaire  $L_2$  comprend les zones intermédiaires, cellules sous-épidermiques, endoderme, péricycle et notamment les cellules reproductrices, enfin la couche profonde  $L_3$  donne la moelle. Pour d'autres auteurs, la distinction n'est pas aussi nette : ils individualisent la zone épidermique ou *tunica* (sensiblement équivalentes à  $L_1$ ) et les régions plus profondes ou *corpus* ( $L_2 + L_3$ ).

Le fonctionnement du méristème racinaire n'est pas différent dans son principe de celui de l'apex de la tige.

### **Régénération des vitroplants**

On comprend aisément que l'excision suivie de la culture *in vitro* des méristèmes aboutisse à la régénération de la plante. Selon l'espèce et les hormones utilisées dans

le milieu, le méristème excisé donne des formations diverses : plantes, tiges, embryons, cals régénérants d'autres méristèmes, etc. Toutes ces structures produites par les méristèmes gardent une très forte potentialité de déroulement du programme de morphogénèse et sont généralement très fortement régénérantes.

Ce sont donc des explants de choix pour produire des vitroplants, surtout dans les cas où un méristème excisé donne *in vitro* une structure développant de nombreux méristèmes adventifs, augmentant ainsi le pouvoir de multiplication de l'opération [5].

Chaque ébauche mise en place par les méristèmes terminaux est pré-programmée pour son développement ultérieur (bourgeons végétatifs et bourgeons floraux chez un fruitier par exemple). La partie terminale de l'ébauche est stratifiée, elle aussi, en un méristème qui se mettra à fonctionner comme le méristème apical mais en prenant comme origine de programme génétique l'étape qui est inscrite dans ses cellules.

On peut aussi *in vitro* cultiver ces méristèmes axillaires. S'ils sont très jeunes (sous l'angle du programme génétique), ils régénèrent des individus qui ont un développement sensiblement normal ; s'ils ont un âge génétique plus avancé, ils peuvent donner des régénérants déjà «âgés» (par exemple des pieds de tomate dont la floraison est ainsi hâtée, ce qui peut être intéressant). Mais il faut noter aussi que le milieu de culture *in vitro* constitue, en lui-même, un système de résonance avec l'explant et qu'il peut, par les hormones choisies, différencier le tissu mis en culture,; c'est-à-dire décorrélérer le réseau épigénétique et ainsi rajeunir le programme génétique. Un stade, se rapprochant du point zéro, est obtenu fréquemment en utilisant le 2-4 D qui déclenche la production d'une forte callogenèse.

Le type de production en culture *in vitro* est donc une fonction de l'étape génétique inscrite dans l'explant et de la rectification de cette programmation épigénétique sous l'effet du milieu et des conditions de culture *in vitro*. Plus l'explant est volumineux, moins il sera sensible au milieu (puisque son réseau de signaux sera plus fortement structuré).

On appelle souvent «polarité» l'intensité de tension structurelle des réseaux de signaux qui génèrent la situation épigénétique.

En d'autres termes, l'explant possède, au moment du prélèvement, sa polarité propre, mais l'interaction avec le milieu de culture modifie cette polarisation [6].

On peut donc, en principe, produire des vitroplants à partir de nombreuses parties de la plante : bourgeons, tiges, feuilles, racines, inflorescences, etc. Les jeux d'interactions entre polarité de l'explant et statut polarisant (en positif ou en négatif) du milieu expliquent l'aspect «cuisine» des recettes de chaque laboratoire et de chaque producteur de vitroplant.

## Embryogenèse somatique

L'ovule comprend un territoire haploïde, le sac embryonnaire, qui, après fécondation, se différencie en embryon et albumen.

L'embryon avancé s'appelle plantule. On y reconnaît déjà un pôle radicaire et un pôle gemmule, entre les cotylédons. On peut, à partir d'explants appropriés (et de conditions de culture *in vitro* très spéciales), maintenir dans les cellules d'un tissu cultivé *in vitro* les potentialités embryogènes; on peut même en faire dériver des cals embryogènes. Dans ces types de formations, il se développe des massifs sphériques qui prennent les formes «cœur» et «torpille» caractérisant les phases du développement de l'embryon. On parlera d'embryons somatiques pour désigner ces formations qui possèdent une autonomie vis-à-vis du tissu générateur avec un pôle radicaire, un méristème caulinaire et des «pseudo»-cotylédons bien différenciés [7].

Chez la plupart des espèces, pour obtenir de telles structures, il faut que l'explant soit marqué par un programme génétique très jeune, très proche de l'état embryonnaire : parois de l'ovaire, pièces inflorescentielles proches de l'embryon, embryon immature, zone hypocotyle de la plantule, bases cotylédonnaires. Il faut aussi que l'explant soit d'une dimension telle que sa polarité soit suffisante, mais pas trop marquée, sinon on régénérerait un vitroplant différencié, et non des embryons. Il faut encore que le milieu *in vitro* dans lequel est plongé l'explant soit adapté aux conditions de l'embryogenèse ; c'est pourquoi, pour beaucoup de cas, des séquences de deux, trois... six milieux différents et bien caractérisés s'avèrent nécessaires. Le conditionnement d'une polarité de type embryonnaire est très délicat ; si le gradient est insuffisant, l'embryon somatique est mal formé et ne «germe» pas (gemmule ou racine non différenciée) ; si le gradient est trop marqué, on n'observe plus d'embryogenèse mais une régénération plus banale. Les potentialités d'embryogenèse somatique sont donc fugaces et très localisées [8, 9].

## Semences artificielles

Les embryons somatiques sont difficilement utilisables tels quels, en particulier ils sont très sensibles à la déshydratation. Cependant, on peut assez facilement les enrober dans des gelées nutritives et protectrices (classiquement on utilise les alginates et un milieu de type Murashige-Skoog dilué). On peut également surajouter à l'enrobage une coque plus dure. L'ensemble de l'embryon et de ces couches protectrices est appelé «semence artificielle» (Fig. 24).

À l'heure actuelle cette technologie est très évolutive ; chaque laboratoire résout les différents problèmes posés :

- production synchrone d'un grand nombre d'embryons somatiques, ce qui suppose une maîtrise des cytoculteurs adaptés, une sélection des souches embryogènes pour l'«inoculation» des cytoculteurs, un tri au cours de l'embryogenèse ;
- technique de récolte des embryons «mûrs» pour les enrober individuellement ;
- stabilisation des embryons enrobés pour éviter qu'ils ne continuent à croître dans le gel qui les enrobe ;
- faculté germinative comparable à celle d'une semence naturelle ;

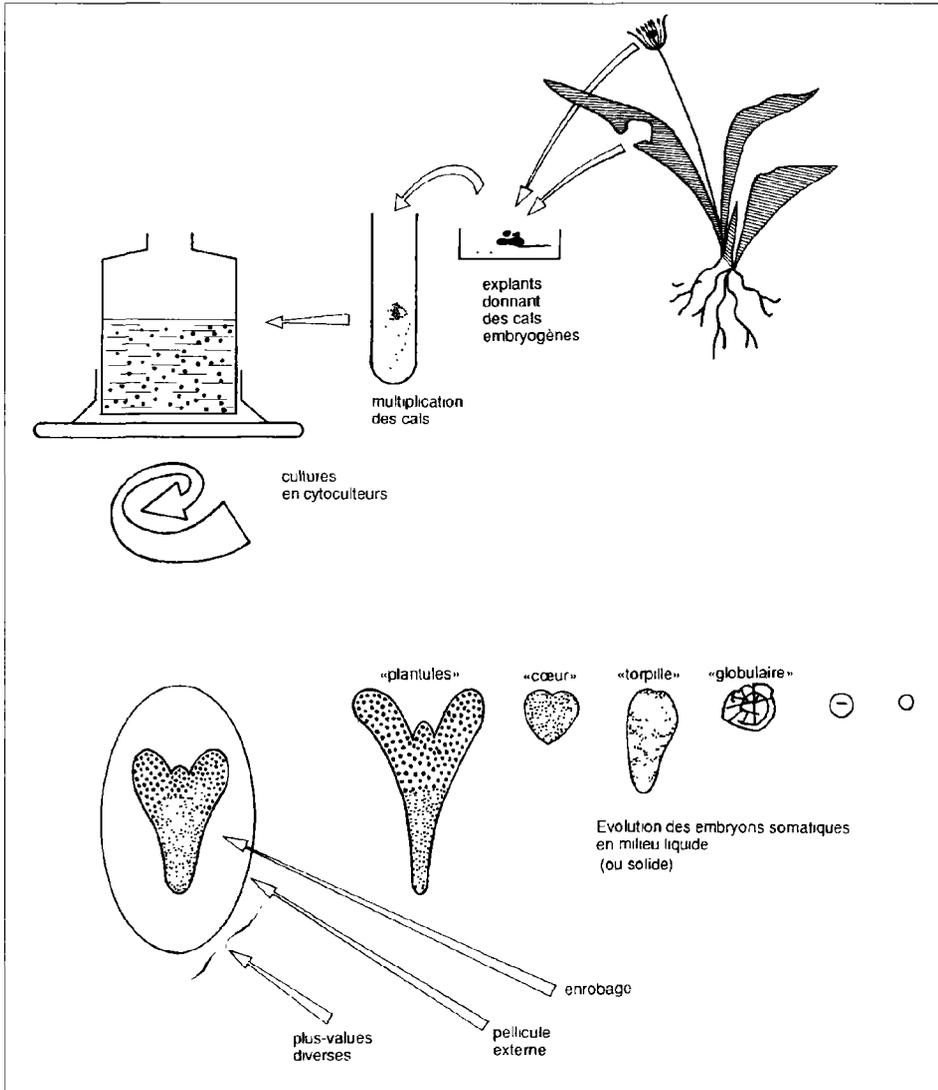


Figure 24. — Schéma d'obtention d'une semence artificielle.

— conformité de la plante obtenue avec le type de la plante mère qui a ainsi été clonée.

L'énorme enjeu économique que constituera la maîtrise de la technologie des semences artificielles entraîne, hélas, une vive compétition entre laboratoires et nuit à la diffusion des résultats, même les plus ponctuels [10].

## Résultats positifs actuels

### Dans le domaine des vitroplants

Environ dix ans après les stabilisations de souches *in vitro* par White aux États-Unis et Gautheret et Nobécourt en France (1939), Ball sur le lupin et Wetmore et Morel sur les fougères obtinrent des régénérations de plantes entières [11].

Peu de temps après, Limasset et Cornuet (1949) démontrèrent clairement que les apex de tabac étaient sans virus, ce qui permit à Morel et Martin de guérir en 1952 des dahlias virosés en régénérant des plantes saines à partir des méristèmes.

Cette technique s'est rapidement développée : en 1963 [12], l'assainissement des orchidées s'appliquait commercialement et l'on assistait aux débuts de la propagation des œillets par culture de méristèmes *in vitro*. Depuis, le nombre d'espèces ainsi produites croît sans cesse ; nous ne citons que les plus importantes : fraisier, œillet, gerbera, rosier, rhododendron, pomme de terre (premières générations), sainpaulia, très nombreuses plantes vertes, palmier à huile, bananier, porte-greffe de pêcher, merisier, eucalyptus, pommier, cerisier...

Pour les espèces ornementales en France, plus de 30 millions de pieds sont vendus chaque année et l'augmentation, si elle n'est pas tout aussi spectaculaire qu'aux Pays-Bas (7 millions en 1980, 35 millions en 1985 et bientôt 100 millions de vitroplants), n'en est pas moins très marquante [13].

Le nombre des entreprises pratiquant la micropropagation de manière significative en France atteint la trentaine et s'accroît lui aussi d'année en année.

### Pour les semences artificielles

Il est important de bien faire la distinction entre l'enrobage de semences sexuées classiques et les semences artificielles : les problèmes sont très différents et les technologies, au moins au départ, divergent notablement.

Si la commercialisation de graines enrobées est courante chez la betterave, la laitue etc., à l'heure actuelle aucune semence artificielle n'a été commercialisée dans le monde. Les aspects positifs enregistrés sont donc des succès de laboratoire développés souvent de manière artisanale et il faudra encore franchir de grands pas pour aboutir à la commercialisation de ce nouveau produit.

La réponse des diverses espèces à l'embryogenèse somatique est très diverse : des ombellifères réagissent bien (carotte, panais, fenouil), les crucifères sont une famille favorisée (chou, colza, bourse à pasteur, arabidopsis...), certaines légumineuses donnent de bons résultats (luzerne...), certains cépages de vigne et certains génotypes de bananiers peuvent être cités parmi les succès importants.

En revanche, d'autres familles comme les solanacées ne paraissent pas très favorables, les monocotylédones du groupe des graminées posent des problèmes alors que les palmacées présentent beaucoup moins de difficultés [10].

En ce qui concerne le choix de l'explant, on a pu maintenant cerner le problème : d'une manière générale les inflorescences immatures, et surtout les embryons immatures, sont à l'origine de calcs embryogènes, mais les axes hypocotyles de très jeunes germinations fournissent aussi des tissus qui répondent positivement. Cependant, si bien souvent on parvient à révéler des tissus embryogènes qui génèrent de nombreux embryons sphériques, il est plus difficile de maintenir des souches embryogènes qui soient stabilisées dans cette aptitude : il faut souvent repartir au type d'explant d'origine pour maintenir l'aptitude.

Les calcs embryogènes sont souvent développés en culture *in vitro* sur milieu solide. Une fois obtenus, on utilise des fragments de ces calcs pour démarrer une culture en milieu liquide agité dans un cytotuteur (encore appelé fermenteur). Là, le cal se scinde en cellules qui, sur le mode d'un zygote, donnent un développement embryonnaire en passant par les stades sphériques (morula) puis par la forme «torpille» où apparaissent les deux ébauches de cotylédons, la forme «cœur» où se marque l'allongement de l'hypocotyle et de la zone radicaire et enfin la morphogenèse «plantule» avec cotylédons, gemmule, axe hypocotylé, racine bien différenciés [14].

Chez les ombellifères, les crucifères, la vigne, la luzerne, ces stades se succèdent assez aisément, pour un grand nombre des cellules dans le milieu. Chez la carotte, par exemple, on peut obtenir dans de bonnes conditions jusqu'à 1 million d'embryons en développement par litre de culture !

L'un des problèmes rencontrés est l'hétérogénéité des vitesses de développement des embryons. Dans un cytotuteur coexistent des embryons de tous âges, sphériques, torpilles, cordiformes, plantules...

Avant d'entreprendre une production de routine, il est nécessaire de synchroniser cette morphogenèse : une solution partielle consiste à cribler la culture tous les deux ou trois jours sur des filtres à mailles calibrées, de dimensions adaptées à la taille croissante des embryons.

Mais il est évident que les cytotuteurs actuels ne sont pas adaptés à cette technologie et qu'il faudra les modifier. Pour des cultures bien menées, la production des embryons demande environ un mois, mais cela dépend largement de l'espèce et du géotype. Au stade plantule bien différenciée, on récolte les embryons et ils sont enrobés dans une solution nutritive gélifiée. L'alginate est le gélifiant le plus couramment expérimenté. On coagule la solution d'alginate contenant les embryons par une précipitation, goutte à goutte dans un sel de calcium. Là aussi la technique utilisée est artisanale et imparfaite : certaines gouttes contiennent deux et parfois trois embryons, d'autres sont vides.

Les embryons somatiques ainsi entourés de leur gelée nutritive peuvent, en plus, être superficiellement pelliculés. Il existe pour ce faire une technologie de pelliculage

des semences conventionnelles, qui est bien au point et qui peut s'appliquer aux «billes» d'alginate.

Mais la difficulté majeure rencontrée à ce stade du processus réside dans le fait que l'embryon somatique n'a pas de «quiescence» ou, encore moins souvent, de dormance ; c'est-à-dire qu'il continue immédiatement à se développer en jeune plante. De nombreuses expérimentations sont mises au point pour stabiliser cette semence artificielle : on a tenté d'utiliser la déshydratation, la pression osmotique, le froid, la carence en sels minéraux indispensables et les traitements par acide abscissique.

Dans toutes ces directions, des résultats positifs partiels ont pu être obtenus et chaque laboratoire progresse continuellement. Les meilleurs résultats, par déshydratation modérée, font état de deux à trois semaines de stockage possible, mais la survie des semences n'est pas parfaite [10, 14].

On peut mettre en terre, comme pour une graine, la semence artificielle et elle se développe par une «germination» en jeune plante ; cependant, très souvent l'embryon somatique est enzymatiquement mal équipé pour métaboliser les réserves nutritives mises à sa disposition : il faut parfois aider sa germination en arrosant pendant quelques jours avec une solution de sucre très diluée.

Les quelques expériences qui ont été menées jusqu'au bout dans la culture des plantes issues de ces semences artificielles ont montré que les individus produits étaient vigoureux, homogènes, mais qu'ils n'étaient pas toujours des copies conformes de l'individu «donneur» de départ ; des vitrovariations sont apparues : carottes ramifiées où l'orthotropie radiculaire n'était pas maintenue par exemple. Cela pose le problème très général du contrôle des vitrovariations (Chap. IV).

Comme on le constate aisément, la technologie des semences artificielles est loin d'être arrêtée : de nombreux progrès restent à faire pour vaincre les diverses difficultés rencontrées. Cependant, cette technologie va s'implanter au cours des prochaines années pour deux types de raisons :

— la production de semences artificielles est tout à fait «robotisable», beaucoup plus facilement que la production de vitroplants [15] ;

— de nombreuses plus-values sont spécifiquement adaptées à ce mode de propagation d'un génotype (on verra qu'une partie d'entre elles est applicable aux vitroplants et une autre partie aux semences conventionnelles enrobées).

## **Plus-values liées à la technologie des semences artificielles**

### **Plus-values d'ordre génétique**

Actuellement, pour développer une variété hybride il est nécessaire d'entretenir une lignée paternelle et une lignée maternelle, chacune ayant été sélectionnée pour sa bonne aptitude à la combinaison spécifique avec l'autre. Il faut ensuite réaliser

l'hybridation entre ces deux parents en évitant qu'il ne se produise de l'endogamie par autofécondation ou par pollinisations intralignées parentales.

Ainsi la graine récoltée donnera des plantes hybrides  $F_1$ . On assure l'hybridation entre les deux parents, soit en introduisant génétiquement dans la lignée maternelle des facteurs de stérilité mâle, soit en faisant la castration mécaniquement.

Le pollen de la lignée paternelle est transféré sur la lignée maternelle par le vent (anémophilie) ou par les insectes (entomophilie) ou l'hybridation est faite à la main (tomates hybrides, cototiers nains hybrides, etc.). Tout cet ensemble, lignées à produire, champs semenciers, castrations, pollinisation, récolte sur la lignée maternelle, constitue une charge importante. Le clonage de l'individu hybride sous la forme de vitroplants, ou mieux encore de semences artificielles, supprime tous ces aspects laborieux : la sélection créatrice se ramène à la détection du meilleur individu hybride.

Dans le cas des espèces autogames (blé, orge, riz, soja, pois, laitue, arachide, cotonnier, par exemple), il est difficile de valoriser la vigueur hybride, car la plupart des variétés sont fortement homozygotes. Or on pourrait, d'un coup, gagner environ 30% sur toutes les performances si l'on était capable de diffuser un cultivar hybride  $F_1$  : par exemple, une laitue  $F_1$  fournirait une «pomme» commercialisable beaucoup plus rapidement, une arachide  $F_1$  serait plus précoce avec un rendement accru, un soja  $F_1$  aurait un rendement en graine de 30% supérieur, etc.

Il suffirait, pour diffuser de telles structures, de réaliser, une fois pour toutes, par hybridation manuelle un bon individu hybride, qui serait ensuite cloné.

De même pour certaines plantes à multiplication végétative, comme la pomme de terre, la banane, le manioc..., on pourrait envisager la propagation par semences artificielles, ce qui donnerait des taux de multiplication beaucoup plus élevés et éviterait la diffusion de viroses.

Enfin certaines plantes issues de manipulations génétiques pourraient devenir stériles, ou encore on pourrait avoir avantage à sélectionner des mécanismes inhibant le développement floral chez certaines espèces (lin à fibres, épinard, laitue...).

Dans ces cas, la voie idéale est la multiplication *in vitro* du génotype ainsi créé.

Il est donc clair que le cultivar diffusé par micropropagation doit être une structure génétique supérieure, un produit génétique nouveau différent de ce que l'on diffuse par les semences classiques.

## Plus-values d'ordre sanitaire

L'usage le plus fréquent, déjà au point dans les semences conventionnelles enrobées, est l'addition d'un pesticide inclus dans l'enrobage : on utilise ainsi une localisation précise, près de la jeune plante, ce qui permet des microdoses de produit.

Une solution élégante consiste aussi à ajouter dans la gelée nutritive des organismes vivants antagonistes des pathogènes de la jeune plante (par exemple des antagonistes

des *Pythium* ou des *Fusarium* ); les *Trichoderma* et les *Pseudomonas* sont les antagonistes qui sont les plus efficaces.

Enfin la thérapie (dans le cas de virus intracellulaires) et la prémunition pourraient être valablement adaptées pour un traitement au stade plantule ; on aurait ainsi des semences artificielles très bien protégées.

Il faut noter, en outre, que les semences artificielles sont produites dans des milieux stériles, elles sont donc parfaitement débarrassées de tout germe pathogène.

### Plus-values d'ordre dynamique

On peut aussi, dans l'enrobage, ajouter des additifs nutritionnels importants et même accompagner les substances de réserve des enzymes fixées qui les lyseraient pour les pré-digérer pour la jeune plante. Des hormones de croissance favorisant le développement racinaire sont aussi utilisables pour des germinations plus vigoureuses.

La technique permet aussi d'enrober des embryons «pré-germés» qui donneraient ainsi une levée très rapide, mais cette particularité de la semence artificielle nécessitera des soins très précis au moment du semis (contrôle soigneux de l'hygrométrie du milieu).

Par ailleurs, la mycorhization par addition d'endomycorhizes à l'embryon somatique a été réalisée avec succès. Le développement de cette expérience donnera des interactions très spectaculaires permettant d'accroître notablement les performances des jeunes plantes. Dans le même ordre d'idée, la symbiose avec les rhizobium des légumineuses pourra être amorcée dès le stade plantule.

On voit donc qu'un cultivar hybride  $F_1$  diffusé avec un grand nombre de plus-values est un produit nouveau, sophistiqué mais très performant et vraisemblablement à terme très rentable. Ce produit nouveau impliquera un utilisateur éduqué et ayant une grande technicité pour en tirer tous les aspects positifs [16].

Il est difficile au stade des premiers pas de réalisation artisanale de tenter une estimation du coût des semences artificielles. Il devrait en toute logique se situer à un niveau intermédiaire entre celui de la semence naturelle et celui du vitroplant.

Les délais d'apparition sur le marché de ce nouveau produit sont eux aussi difficiles à évaluer. Dès maintenant des semences artificielles de palmier dattier pourraient être semées en palmeraie expérimentale, mais, pour la grande majorité des espèces, il faut avant tout résoudre plusieurs problèmes.

### Problèmes et perspectives

Les problèmes se situent, pour la plupart, à la charnière entre une réussite artisanale et l'industrialisation. Par exemple, on sait produire des embryons somatiques en

nombre élevé pour certaines espèces intéressantes (famille des ombellifères et des crucifères, luzerne, vigne), mais comment se passer du retour à la plante pour maintenir les souches embryogènes de départ ? Quel type de stockage des cals embryogènes ? Pour la régularité des embryons produits, on peut atteindre un niveau satisfaisant, mais il est clair que les cytotculteurs actuels ne sont pas adaptés aux filtrations fréquentes, ni au calibrage, ni à la récolte, ni à la sortie des embryons un à un, pour l'enrobage. L'industrie des cytotculteurs devra inventer un «embryoculteur» de conception totalement différente, avec des oxygénations critiques à certains stades. Il est donc vraisemblable que la production en milieu liquide ne correspond pas à un optimum.

De nombreuses recherches sur les phases de l'embryogenèse devront accompagner les tentatives de stabilisation à la récolte. Des études comparatives entre l'évolution de l'embryon sexué et l'évolution de l'embryon somatique, notamment en ce qui concerne les teneurs en eau, devront être réalisées, espèce par espèce et, peut-être, génotype par génotype. Il est très probable que l'enrobage par alginate ou tout autre gélifiant ne représente qu'une étape expérimentale bien commode, mais d'autres formulations, polysaccharides, tourbes, coques plastiques, etc. paraissent nécessiter des études expérimentales.

Enfin l'addition de la plupart des éléments de plus-value, tels qu'ils ont été mentionnés, doit être, elle aussi, réalisée en routine, notamment en ce qui concerne la production des structures hybrides. On le voit, la solution de ces problèmes est pluridisciplinaire : c'est l'affaire d'une concertation de tous.

Néanmoins les vitroplants aujourd'hui, les semences artificielles dès demain, vont gagner du terrain. Qu'on songe aux nombreuses sociétés commerciales (une bonne centaine) qui, déjà, en Californie et en Floride, vendent des produits du clonage *in vitro*.

En face de cette réalité qui s'installe progressivement, les problèmes ne se situent pas seulement au niveau scientifique, il faut aussi que, sur le plan social, l'éducation des producteurs de semences amorce leur futur transfert dans le domaine de l'embryoculture ; il faut que les acheteurs et utilisateurs acquièrent des compétences leur permettant de valoriser des cultivars plus performants, plus précis, mais plus délicats aux premiers stades, répondant à des techniques de semis nouvelles : semis liquides ? Supports souples contenant des embryons ? Gélules ? Enrobages sphériques hydrophobes ? Les pépiniéristes deviendront-ils des puériculteurs de la future plante ?

Dans un autre domaine, il importe que cette technique de production ubiquiste de n'importe quelle espèce (on pourra produire dans une usine de banlieue en Suède les semences d'une espèce tropicale) n'accroisse pas la dépendance de certaines nations. Là encore, il faut devancer l'événement et associer, dès maintenant, les scientifiques des régions utilisatrices afin qu'ils soient à la base du développement national de cette technologie.

## Références

1. Buvat R. Le méristème apical de la tige. *Ann Biol* 1955 ; 31 : 596-656.
2. Essad S. Le cycle mitotique et le cycle chromosomique. *Le sélectionneur français* 1974 ; 19 : 41-60.
3. Demarly Y. *Génétique et amélioration des plantes*. Paris : Masson, 1977.
4. Tilney-Bassett RAE. *Plant chimeras*. Londres : Edward Arnold, 1986.
5. Margara J. Bases de la multiplication végétative. *Les méristèmes et l'organogenèse*. Paris : INRA, 1984.
6. Nozeran R, *et al.* Intervention of internal correlations in the morphogenesis of higher plants. *Adv Morph* 1972 ; 2 : 1-66.
7. Steward F, *et al.* Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am J Bot* 1958 ; 45 : 705-8.
8. Margara J, *et al.* Différents types d'organogenèse observés chez le colza *Brassica napus L* var. *oleifera*. *CR Acad Sci* 1978 ; série D, 287 : 17-20.
9. Schroeder C. Adventive embryogenesis in fruit pericarp tissue *in vitro*. *Bot Gaz* 1968 ; 129 : 374-6.
10. Fujii JAA, *et al.* Artificial seeds for plant propagation *TBTECH* 1987 ; 5 : 335-40.
11. Boxus Ph. *In vitro* vegetative propagation of plants. In : *Nestle Research News* 1986/87. Vevey Suisse : Nestlé, 1987 : 73-9.
12. Morel G. La culture *in vitro* du méristème apical de certaines orchidées. *CR Acad Sci* 1963 ; 256 : 4955-7
13. Bry A. La production de vitroplants pour l'horticulture ornementale en France. *PHM Revue horticole* 1987 ; 277 : 15-23.
14. Demarly Y. Kunstzaad. *Zaadbelangen* 1986 ; 2 : 41-2.
15. Grand d'Esnon A, *et al.* Tri d'embryon et de cals par camera en production de semences artificielles. In : Moët-Hennessy, ed. *Electronique et pilotage des plantes*, Monaco 1987. Paris : Moët-Hennessy, 1987 : 22.
16. Demarly Y. L'impact possible des biotechnologies sur les semences de l'an 2000. *IAA* 1987 ; 1 : 15-21.

## IV

### **Vitrovariations ou variations somaclonales ?**

La régénération à partir de cultures *in vitro* est l'un des outils de plus en plus utilisés, soit pour la multiplication, soit pour la conservation du germplasma, ou encore dans le cadre des biotechnologies. Mais au cours de ces régénérations, il arrive que de façon surprenante de nouveaux phénotypes apparaissent.

#### **Mise en évidence de la variabilité issue de culture *in vitro***

##### **Étapes successives**

Après les balbutiements de la culture *in vitro* décrits par Robbins en 1922 [1], puis par White au cours des années 30 [2-5], les premières expérimentations présentant des phénomènes de régénération sur carotte ont été publiées par Nobécourt en 1946 [6]. Ensuite, de nombreux travaux réalisés dans les années 1950 ont été présentés par Gautheret [7-9]. Ultérieurement, les techniques se sont diversifiées et l'identité ou reproduction conforme du matériel de départ était posée comme dogme.

En fait, le développement de plantes entières à partir de méristèmes amène rarement aux variations telles que celles présentées sur le chou par Clare et Collin [10], alors que la régénération de bourgeons à partir de cals primaires ou de souches entretenues semble être une source commune de variabilité.

Des réflexions relatives aux causes et aux origines biologiques de ce phénomène ont été proposées par Sibi dès 1974 [11, 22, 23], Brettell et Ingram en 1979 [12], Larkin et Scowcroft en 1981 [13], Reisch en 1983 [14], Orton en 1984 [15], Karp et Bright en 1985 [16] et par Gould en 1986 [17]. La terminologie désignant les nouveaux types obtenus a été très diversifiée mais la dénomination «phénovariant» fut la première proposée par Sibi en 1971 [18]. Cependant, en 1981, Larkin et Scowcroft [13] employèrent l'expression «variation somaclonale», qui paraît être communément utilisée.

Les premières plantes variantes régénérées sur tissus somatiques ont été signalées avant 1970 sur le tabac par Lutz [19] et Mousseau [20], sur la canne à sucre par Heinz et Mee [21] et sur la laitue par Sibi [18].

La transmission héréditaire par autofécondation de ces variants a été effectuée pour la première fois en 1971 sur la laitue par Sibi [18, 22, 23], puis sur le tabac par Binns et Meins [24]. Depuis, ce type d'analyse a été largement utilisé ; ainsi de nombreuses expériences sur la tomate ont été présentées [25-27] et donnent une vaste gamme de résultats.

Cependant, l'utilisation de dispositifs expérimentaux avec analyse de croisements réciproques est assez peu fréquente. Les premiers travaux de ce type ont été réalisés par Sibi chez la laitue [22, 23] et la tomate [28-31].

L'apparition de plantes modifiées après régénération de gamétophytes mâles par culture *in vitro* puis doublement des chromosomes a également été signalée chez le riz [32-38], le blé [39] et le tabac [40]. De plus, chez l'orge, l'androgénèse (par culture d'anthers) aussi bien que la gynogénèse (par culture d'ovaires non fécondés) amènent à des variations qui ont, en 1982, été décrites et analysées par San-Noeum et Ahmadi [41].

Il semble donc que les termes «vitrovariant» et «vitrovariation» soient des dénominations plus exactes pour désigner la variation exprimée au travers des divers tissus ou techniques de culture *in vitro*.

## Mémoire ou hérédité

Le niveau biologique impliqué dans la «vitrovariation» a parfois été recherché par analyse de la «mémoire», de la stabilité ou même de la transmissibilité du caractère modifié.

Sur le plan biochimique, que les souches établies soient animales ou végétales, il arrive fréquemment que les changements manifestés ne puissent être interprétés en seuls termes de mutations. Ainsi, en comparant les fréquences des mutants et des révertants chez des cultures de tissus humains, De Mars [42] conclut à un nouvel état de fonctionnement du matériel. Il qualifia de «périgénique» le phénomène pour signifier qu'il devait impliquer un compartiment cellulaire situé autour du gène. Par ailleurs, des variants de lin obtenus *in situ* ont été décrits par Durrant [43] comme des «génotrophes» et des mécanismes de modifications de même type chez le maïs furent appelés «paramutations» par Brink *et al.* [44], terme repris et discuté par Tartoff [45] et par Holliday [46]. Holliday, pour regrouper cet ensemble, proposa le terme «épimutation», désignant des modifications au niveau de l'ADN, qui apparaissent *in situ* à très fortes fréquences. Simultanément, sur des cultures de tissus de tabac, des modifications, soit transitoires, soit stables, après régénération et reproduction sexuée, ont été appelées «habituations» par Binns, Meins et Lutz [24, 47-49] ou *mutation-like adaptation* par Skokut et Filner [50] ; ces changements, en effet, ne pouvaient être classés comme des résultats de mutations spontanées conventionnelles.

Le fait que certaines de ces modifications aient été classées comme «épigénétiques» (c'est-à-dire non permanentes) bien qu'elles soient héréditairement transmissibles par voie sexuée amena Filner, en 1980 [51], à souligner les confusions de la terminologie.

Depuis 1971, des recherches entreprises par Sibi sur des lignées homozygotes de laitue [18, 22, 23] et de tomate [25, 28-31] ont montré que la culture *in vitro* s'accompagne d'un taux accru de mutations. Plus de 10% de mutants nucléaires monogéniques ont été observés chez la laitue ; et, sur la tomate, le taux de mutations, monofactorielles ou multiples, atteint 56% des individus régénérés. Cela est en accord avec les résultats de Buiatti *et al.* [52] et de Evans *et al.* [53] sur la tomate, qui signalent des taux de 17% et 5,6% de plantes mutantes.

Par ailleurs, à la fois chez la laitue et la tomate [22, 31], on a pu enregistrer une autre catégorie de variations qui, dans ce cas, ne peuvent être explicitées en termes de supports génétiques strictement cytoplasmiques ou nucléaires. Leur stabilité héréditaire et leur fixité génétique ont pu être vérifiées à travers plusieurs générations d'autofécondation. Les descendance de croisements réciproques manifestent une dissymétrie d'expression, plus précisément des effets maternels ou parfois paternels. Dans certains cas, lorsque l'on croise ces variants issus d'un même génotype, soit entre eux, soit avec le type d'origine, il apparaît des descendance manifestant des transgressions de performances (mimant la vigueur hybride) au-delà des types parentaux du croisement : cela est d'autant plus étonnant que le génome nucléaire du matériel de départ est homozygote et *a priori* non modifié.

Ce même type de comportement héréditaire avec asymétrie d'expression des croisements réciproques a été observé sur des variants de riz [34] et d'orge [41] obtenus après haploïdisation suivie de doublement chromosomique.

Compte tenu de cet ensemble de faits, l'expression «variation épigénétique» a été proposée et discutée par Sibi [11, 22, 23, 25, 28-31] et par Demarly [90] pour décrire ces modifications transmissibles par voie sexuée et dont le comportement héréditaire est inhabituel.

## Éléments de base de la variabilité

### Fond génétique

L'impact du génotype sur la réussite de la culture *in vitro* a été mis en évidence par des analyses quantitatives chez le trèfle violet [54] et chez le pétunia [55].

Les relations entre structure génétique et mutabilité (gènes spécifiques et interactions avec l'ensemble du génotype) ont aussi été montrées par De Nettancourt et Devreux [56] chez la tomate après analyse de l'auto-incompatibilité gamétophytique de *Lycopersicon peruvianum*.

Chez cette espèce allogame et très fortement hétérozygote, les auteurs ont signalé que la transformation d'un allèle d'auto-incompatibilité en un autre ( $S_1 \rightarrow S_2$ ) n'avait jamais pu être obtenue par traitement mutagène, mais apparaît au cours de la fixation de lignées par consanguinité, comme si des mécanismes alternatifs contrôlaient la présence d'une forme ou l'autre selon le degré d'homozygotie de la plante. En outre, les cultures *in vitro* de tissus somatiques engendrent spontanément l'apparition de nouveaux allèles S chez les plantes régénérées.

Ces analyses ont été poursuivies par Sree-Ramulu [57], qui a établi la régénération *in vitro* de plantes de *Lycopersicon peruvianum* par les diverses voies suivantes : culture d'entre-nœuds, de tiges, et culture d'anthères [58]. Les plantes issues d'entre-nœuds, restant donc hétérozygotes, ne manifestent aucune modification au locus S, alors que pour les plantes issues de culture d'anthères les auteurs observent de nouvelles expressions d'allèles S, dont des réversions, et même quelquefois le passage d'un contrôle gamétophytique vers un contrôle sporophytique. Cela confirme la stabilité de l'allèle S dans un fond génétique à fort degré d'hétérozygotie, et l'impact marquant de la consanguinité sur les modifications de comportement du système —S. La conclusion est alors tirée que les nouvelles spécificités —S apparues *in vitro* ne résultent pas de mutations ponctuelles au locus S [59], mais plutôt de modifications au niveau de la régulation du génome.

### Durée de la culture *in vitro*

La durée de la culture *in vitro* et, plus précisément, la longueur de la phase non morphogène était apparue depuis longtemps comme facteur de variabilité [11, 22, 60]. Plusieurs expériences ont permis de vérifier cette relation. Ainsi, un fort accroissement de la fréquence des mutants et l'expression de types ancestraux ont été observés [22, 23], mais aussi, les taux de mutations semblent liés au nombre de transferts *in vitro* [26, 61-65], comme si cette phase avait un effet mutagène sur les cellules cultivées ou si la régulation des systèmes de réparation de l'ADN était perturbée [28].

Par exemple, les plantes de tomates obtenues à partir des apex [66] ou régénérées directement à partir de feuilles [67] ne donnent aucune variation, alors que de nombreux auteurs ont pu observer des variabilités de tous types sur des plantes régénérées à partir de cals [25-27, 29, 31, 52, 68-70], la majorité des vitrovariants de tomate paraissant être des mutants de gènes nucléaires, avec les taux extrêmes déjà signalés de 56% [25] à 5,6% [53] et la valeur intermédiaire de 17,04% [52].

L'un des cas, assez particulier, concerne l'effet de la culture *in vitro* sur l'expression des taux de recombinaisons observé par Sibi *et al.* [71]. Chez la tomate, après culture *in vitro* de génotypes possédant des marqueurs, l'accroissement des taux de recombinaisons atteint 25% à 30%. Cela impliquerait, soit l'amplification de gènes entre les marqueurs comme le suggèrent les travaux de Nuti Ronchi [72], Nagl [73, 74], Buiatti [75], Schimke *et al.* [76], soit des modifications du contrôle du *crossing-over* [46].

Ainsi, outre l'apparition fréquente de mutants, la culture *in vitro* semble entraîner de nouvelles régulations particulières qui s'expriment à travers différents systèmes, comme ceux qui contrôlent le *crossing-over* ou qui régulent la mutabilité.

Cependant, l'impact de la durée de culture *in vitro* observé sur les taux de mutation ne semble pas affecter la fréquence des modifications épigéniques ; celle-ci semble essentiellement dépendre du génotype (espèce, variété) et des conditions de culture *in vitro*. Ces modifications peuvent apparaître dès le premier cycle *in vitro* et leur fréquence semble stabilisée à partir du troisième ou quatrième transfert [23, 26, 29, 31]. Pour la tomate, les plantes régénérées après une courte phase de culture *in vitro* ont donné jusqu'à 17% de descendances issues de plantes mères porteuses de modifications épigéniques. Cette valeur n'est pas plus élevée chez les souches plus âgées. Le passage par cal et parfois le nombre de cycles de culture *in vitro* apparaissent donc comme les principaux facteurs induisant, permettant ou révélant une variabilité, mais il semble aussi que la plasticité du génotype et de l'espèce ait un rôle essentiel.

## Types de modifications

L'observation des vitrovariations obtenues aléatoirement peut se situer à plusieurs niveaux phénotypiques (cytologique, morphologie générale...). Les premières expériences incluant des pressions sélectives effectuées par Carlson chez le tabac [77] ont donné des résultats positifs, mais, à cette époque, ces expériences difficiles à interpréter furent controversées.

Cependant, depuis, des sélections *in vitro* pour tout type de caractéristique ont de plus en plus été tentées et de nombreux auteurs les ont signalées. Par exemple, la résistance ou la tolérance à des maladies [78], à des herbicides [79-82], aux sels minéraux [83], au froid [84], aux traumatismes [85] etc., ou l'obtention de qualités spécifiques [86]. Toutes ces recherches sont très stimulantes pour l'amélioration des plantes dans la mesure où ces nouvelles potentialités avantageuses sont maintenues dans la plante régénérée et passent par les organes de multiplication (tubercules ou graines, par exemple).

## Régénération de plantes modifiées

### Matériel mis en culture

*In situ*, une cellule fait partie d'un organe, intégré à l'ensemble de la plante. Son expression et sa régulation sont très précisément programmées et corrélées à l'ensemble [87]. La taille de l'explant prélevé pour la culture *in vitro* détermine des modifications structurales ou relationnelles et joue un rôle majeur sur la diversité d'expression [11, 29, 88]. Un entre-nœud, un bourgeon préformé, un apex différencié ou un gamétophyte sont déjà «stratifiés» ou programmés [89] : peu de modifications sont à

attendre de la régénération directe de tels explants, comme le montre la bibliographie, sauf si la composition du milieu déclenche de fortes perturbations ou entraîne un développement sous forme de cal. Au contraire, les tissus excisés, les cellules dissociées et les protoplastes donnent une large variabilité, cela d'autant plus que leur développement passe par un stade cal. Soulignons que l'embryogenèse somatique peut, elle aussi, entraîner une variabilité qui paraît impliquer le type de tissu utilisé (Tableau I).

En fait, la cellule possède maintes voies d'expression, car l'information chromosomique de base peut fonctionner selon diverses modalités [87, 90]. Dans un cal non morphogène, seules les fonctions de survie sont nécessaires et doivent de ce fait demeurer intactes. En revanche, des modifications portant sur les structures biologiques et génétiques de toute autre fonction sont possibles et sans conséquences à ce stade. Elles apparaissent donc plus fréquemment que dans les tissus organisés, entraînant l'expression d'un large spectre de variations [22]. Les observations et conclusions touchant à la durée de la phase cal et à son rôle sur l'accroissement du taux de variations semblent alors tout à fait logiques.

### **Organogenèse à partir de cellules aux potentialités différentes**

Quand la morphogenèse se produit, elle peut maintenir les modifications déjà présentes dans les tissus ou au stade cal, mais elle bloque l'apparition de nouveaux changements [91]. Les cellules se divisent et s'organisent pour donner un bourgeon. En conséquence, les cellules aux potentialités nouvelles, et concernées par cette morphogenèse, sont étendues à l'ensemble de l'organisme. Les nouvelles expressions cellulaires sont alors «amplifiées» et visualisées au niveau de la plante entière [22] et il est alors possible de poursuivre l'analyse de la stabilité génétique et de la transmissibilité des caractéristiques phénotypiques correspondantes.

## **Transmissibilité héréditaire des modifications**

### **Structure d'une plante**

Un bourgeon régénéré peut être issu d'une seule cellule [61, 92] mais, plus fréquemment, son origine est pluricellulaire. Les plantes de pétunia régénérées à partir d'une chimère péricleine albinos et chlorophyllienne, présentent trois classes de phénotypes [107] : vert, blanc et mixte, ce dernier type démontrant que les assises albinos et vertes ont simultanément participé à la morphogenèse. Cette conclusion a été confirmée sur le tabac [93], la tomate [58, 94], le maïs [95] et sur diverses espèces florales [96]. Les réflexions de Benzion et Phillips [97] sur ces expériences sont en accord avec les conclusions tirées par Sibi [22, 23] chez la laitue : les files cellulaires issues de cellules originelles spécifiques ne doivent pas être considérées comme des clones, mais comme des mosaïques ou comme des tissus en chimère [22, 23]. De plus, chez beaucoup d'espèces, la plante est structurée en au moins trois assises cellulaires [98]

Tableau I. Type d'implant et vitrovariation.

Implant	Conformité	Vitrovariation	
		Modifications extrachromosomiques	Modifications au niveau des gènes codants
<p>Tissus somatiques</p> <p>Embryons immatures </p> <p>Bourgeons </p> <p>Méristèmes </p> <p>Apex </p> <p>Tissus </p> <p>Cals </p> <p>Cellules </p> <p>Protoplastes et fusion, etc. </p>	<p>Embryons somatiques</p> <p>Micropropagation</p> <p>Elimination de virus et micropropagation</p> <p>Embryogenèse ou régénération</p>	<p>Croisements interspécifiques inviables (sauvetage des embryons)</p> <p>Expression d'une variabilité selon les tissus à l'origine des embryons</p> <p>Résistances aux maladies, froid, etc</p> <p>Variantes épigénétiques</p> <p>Modification des gènes nucléaires codants</p> <p><i>biosynthèse de substances biochimiques identiques ou différant quantitativement ou qualitativement</i></p> <p>** introduction de nouvelles potentialités (stérilité mâle cytoplasmique, résistances aux herbicides, etc ) par utilisation de deux espèces ou dans la même espèce</p> <p>* introduction d'organites ou d'ADN</p>	<p>Modifications au niveau des gènes codants</p>
<p>Gamétophytes</p> <p>Mâle </p> <p>Femelle </p>	<p>* Fixité génétique directe</p> <p>* Sélection de parents</p> <p>** Sélection de variétés</p>	<p>Haplodiploïdisation</p> <p>♂ * large spectre de variabilité</p> <p>♀ * variation ténue</p> <p>* expression de types sauvages</p> <p>* fixation chez les croisements interspécifiques</p> <p>* stabilisation d'aneuploïdes</p>	

appelées  $L_1$ ,  $L_2$  et  $L_3$  (Fig. 25) et le phénotype est le résultat de l'interaction entre ces assises [99-101]. Les racines ont pour origine la sous-couche  $L_3$ , la plus profonde, qui est encore appelée *corpus* ; les embryons proviennent de  $L_2$ , et  $L_1$  recouvre les parties aériennes.  $L_1$  et  $L_2$  sont toutes deux impliquées dans la constitution de la graine et du fruit ainsi que  $L_3$  dans certains cas [102, 103]. La lignée germinale, qui engendre la descendance, n'a donc pour origine que la sous-couche  $L_2$  exclusivement.

### Possibilité d'une hérédité des modifications

Le comportement et la stabilité des variations visibles ou non chez la plante régénérée dépendent de deux facteurs au moins :

— Les assises tissulaires de la plante régénérée, concernées par la (ou les) modification(s) : tout changement ne touchant pas des cellules de l'assise  $L_2$  sera perdu à la méiose. Réciproquement, une plante régénérée, phénotypiquement normale, peut donner naissance, par autofécondation, à des descendance qui expriment de nouvelles

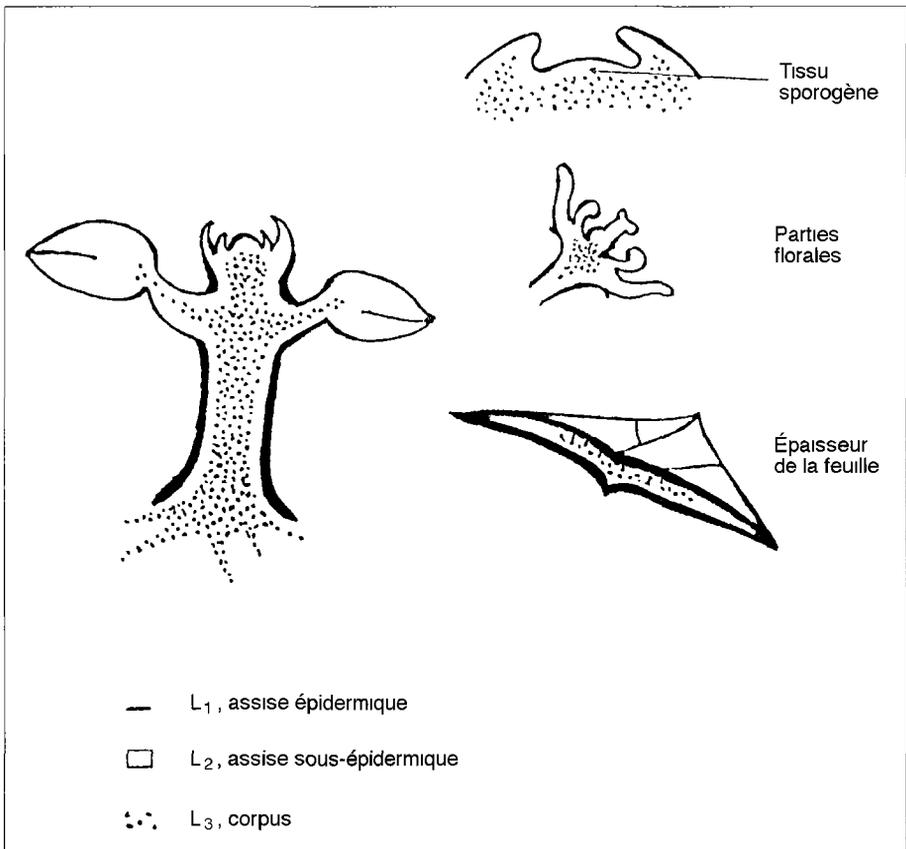


Figure 25. — Organisation de la plante en chimère péricleine.

caractéristiques si les modifications portées par la  $L_2$  n'émergeaient pas phénotypiquement chez la plante mère. Un effet «retard» peut donc être observé en fonction des potentialités cryptiques de la plante.

— Le type de modification chez la cellule originelle : l'amplification de gènes instables [75], les modifications biologiques réversibles ou transitoires [47, 50, 104], l'extinction ou la remise en expression de gènes [105, 106] en fonction de l'intensité, l'efficacité ou la répartition des méthylations de l'ADN [46, 108, 109] constituent des états ou des éléments de modification qui peuvent éventuellement s'effacer plus ou moins rapidement à un stade donné de la morphogenèse de la plante régénérée, ou lors de la méiose dans le passage à la descendance, ou même encore à des stades ultérieurs.

En fonction de ces alternatives, on peut définir des séries de tests pour mettre en évidence le compartiment cellulaire impliqué dans la modification phénotypique.

## **Type d'hérédité et niveau biologique impliqué : diagnostic génétique**

Un matériel biologique convenable pour une approche expérimentale fiable doit inclure les points suivants :

- une espèce diploïde, c'est-à-dire possédant des critères génétiques qui suivent des lois classiques mendéliennes ;
- une structure génétique homozygote, c'est-à-dire un matériel génétiquement fixé, n'exprimant donc pas de ségrégation ;
- un système floral permettant d'effectuer facilement des croisements ou des autofécondations, c'est-à-dire ne dépendant ni d'auto-incompatibilités, ni de stérilité mâle ;
- un nombre de chromosomes assez faible, c'est-à-dire un dénombrement aisé ;
- un matériel où l'on maîtrise *in vitro* la formation de cals et les conditions de régénération.

Remarque : tous les tests qui vont suivre portent sur des effectifs individuels suffisants, à la fois chez les témoins et les autres catégories traitées. Les dispositifs expérimentaux, de type blocs aléatoires avec répétitions, sont conduits dans de bonnes conditions (c'est-à-dire sans compétition ni effets d'interaction entre chacun des individus observés et sa position dans la parcelle) (Tableau II).

## **Dénombrement chromosomique chez les plantes régénérées**

Des modifications caryotypiques comme l'aneuploïdie ou des changements du niveau de ploïdie peuvent être directement détectés par des comptages chromosomiques sur les extrémités radiculaires des plantes régénérées. Ce type de variabilité a été largement décrit [14, 16, 110-112]. Rappelons que les chromosomes doivent être à nouveau dénombrés chez la descendance issue de l'autofécondation, pour vérification.

**Tableau II.** Diagnostic génétique : tests expérimentaux et bases biologiques des modifications touchant la plante régénérée (issue de matériel homozygote).

Type de test	Résultat	Bases biologiques impliquées
Observation cytologique du caryotype	Modification du nombre de chromosomes ou du niveau de ploïdie	Niveau de ploïdie, ou même aneuploïdie
Descendances issues de l'autofécondation	Ségrégation des caractères	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recombinaisons</li> <li>• Mutations dominantes ou récessives sur l'un des 2 chromosomes de la paire</li> </ul>
Croisements diallèles des parents "fixés" et du témoin	Identité des croisements réciproques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Double-mutant monogénique, délétion, amplification spécifique, conversion particulière</li> </ul>
Autofécondation des croisements réciproques	Ségrégation des critères avec retour des classes parentales	
Croisements diallèles des parents "fixés" et du témoin	Comportement dissymétrique des croisements réciproques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sélection gamétique différentielle selon la voie mâle ou femelle</li> </ul>
Autofécondation des croisements réciproques	Phénotype fixé, pas de catégorie parentale	
Croisements diallèles des parents "fixés" et du témoin	Asymétrie des croisements réciproques effets maternels, paternels ou de transgression, retour possible des classes parentales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nouvelles expressions du génome par</li> <li>• Modification au niveau des organites ou de leur démographie</li> <li>• Modification de systèmes extrachromosomiques même nucléaires</li> </ul>
Autofécondation des croisements réciproques	Maintien des potentialités des croisements et de l'homogénéité intra-descendance	

Quand l'absence d'anomalies caryotypiques a été confirmée malgré les modifications phénotypiques, l'analyse doit alors porter sur les produits de l'autofécondation.

### Analyse des autofécondations

Chaque plante régénérée est une entité propre et les comparaisons entre les descendances de l'autofécondation, à la fois des témoins homozygotes d'origine et des plantes régénérées, amènent aux alternatives suivantes.

### ***Conformité au témoin***

Si la descendance de la plante régénérée autofécondée ne montre aucune variation, il semble raisonnable de conclure à la conformité de cette descendance. La modification exprimée par la plante régénérée était transitoire ou « épigénétique » : effet momentané de la culture *in vitro* avec retour au type de départ, perte de la modification avant la différenciation des cellules reproductives, ou encore, assise L<sub>2</sub> du variant non touchée.

### ***Ségrégation de la descendance***

Cette ségrégation peut s'exprimer par une simple disjonction mendélienne pour une caractéristique qualitative, donnant alors naissance aux catégories classiques de génotypes parmi lesquelles le type témoin est représenté. Dans le cas où une caractéristique quantitative est touchée, on observe un accroissement significatif de la variance intra-descendance par rapport à la variance du témoin.

Cette situation est en général attribuée à des modifications de gènes codants situés sur l'un ou l'autre des deux chromosomes d'une même paire et elle entre dans la catégorie des mutations (éventuellement, effets de transposition [120]) déjà signalées, ou elle peut être due à certains remaniements chromosomiques (délétions, inversions...) de petite amplitude et difficilement détectables par la cytologie, sauf par technique de banding.

Pendant, il ne faut pas oublier que la ségrégation d'éléments cytoplasmiques [121, 122] peut entraîner une gamme assez large de catégories qui peuvent se superposer (ou rester indépendantes) aux effets précédents.

### ***Phénotype variant homogène sur toute la descendance***

Dans ce cas plus étonnant, on peut observer de nouveaux types ou de nouvelles caractéristiques biométriques, mais le phénotype témoin n'apparaît jamais et la variance intra-descendance n'est pas accrue.

Ainsi, quel que soit le site de modification au sein de la cellule, les deux chromosomes d'une même paire s'expriment identiquement. Le niveau biologique de ce type de vitrovariations pourrait être localisé dans le compartiment cytoplasmique, mais il peut aussi s'agir d'un phénomène qui affecte simultanément les deux loci homologues comme des doubles mutations, des délétions ou des amplifications spécifiques par conversions particulières [123, 124] ou par des mécanismes de réparation de l'ADN [108] ou encore de nouvelles expressions géniques dues à des modifications de systèmes nucléaires extrachromosomiques.

Ajoutons que tous les types de modification cités peuvent se cumuler. En même temps qu'un événement mutationnel, d'autres modifications peuvent se produire : cytoplasmiques par exemple, inhibant ou masquant l'expression du phénotype témoin.

On ne peut ainsi à partir des descendance d'autofécondation clarifier définitivement les hypothèses et il faut avoir recours aux croisements réciproques.

### **Descendances des croisements réciproques**

Ce type d'analyse est fréquemment utilisé pour démontrer l'expression asymétrique des potentialités parentales transmises par les gamètes mâles ou femelles de la plante hermaphrodite. Deux entités parentales vont donc être confrontées symétriquement, et la série des croisements réciproques pourra être analysée par comparaison des deux croisements entre eux, ou avec le couple de parents respectifs.

Un dispositif diallèle complet est souvent délicat à réaliser, mais c'est lui qui aboutit aux meilleures informations. Plusieurs modèles mathématiques d'analyse de ce dispositif sont proposés, mais la méthode de Griffing [125] sans les autofécondations semble être l'une des moins restrictives.

Des informations complémentaires peuvent être obtenues en opérant un test de «comparaison multiple des moyennes» sur les séries de performances des parents (ou de leur autofécondation) et des croisements. Les valeurs des variances doivent ici encore être testées pour s'assurer de la fiabilité des caractères mesurés. Dans le dispositif diallèle, une paire de croisements réciproques est issue d'un même couple de parents dont chaque individu est fécondé par l'autre. L'analyse des données amène à divers résultats correspondant chacun à une hypothèse spécifique.

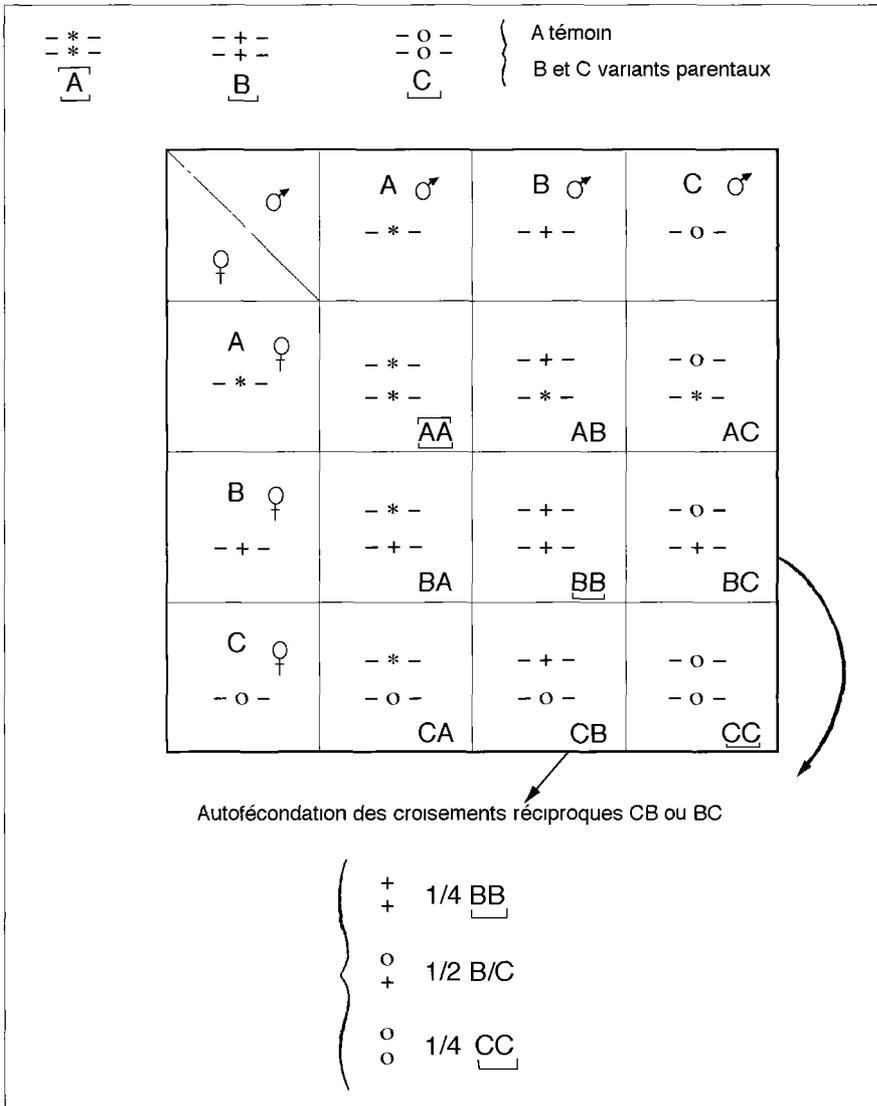
### ***Identité des croisements réciproques***

Le comportement identique des descendance réciproques, à la fois pour les traits qualitatifs et quantitatifs, indique une expression équivalente des potentialités géniques transmises par la voie paternelle et par la voie maternelle. Les nouveaux phénotypes observés sont alors imputés à des modifications de gènes nucléaires ; cela peut être vérifié par autofécondation de ces croisements (Fig. 26).

Les croisements symétriques présenteront, dans leur descendance issue d'autofécondation, les mêmes catégories de phénotypes ou la même variabilité, c'est-à-dire des caractères simples ségrégeant de la même manière, pour des modifications dues à quelques gènes, ou des valeurs identiques des moyennes et variances réciproques, pour les caractéristiques quantitatives.

### ***Comportement dissymétrique des croisements réciproques***

De nombreux travaux révèlent la diversité potentielle cellulaire [113-115]. La contribution dissymétrique selon le sens de croisement est fondée sur ce fait, et sur des mécanismes aboutissant, soit à des contenus génétiques distincts selon que le gamète sera mâle ou femelle [105, 116, 117], soit à des expressions différentielles, chez le



**Figure 26. — Doubles mutants.** Les croisements réciproques sont identiques ; leur autofécondation amène aux seules catégories représentées, parmi lesquelles apparaissent les classes parentales.

zygote, selon l'origine paternelle ou maternelle du gamète. Les phénotypes exprimés par les descendance dépendent en fait de modifications des bases génétiques propres à chaque parent. Ces différences peuvent s'installer pendant la différenciation sexuelle [118] avant la maturation des cellules gamétiques [116], pendant les étapes précédant la fécondation (pénétration du tube pollinique...) ou encore dans le zygote par le biais d'un «sceau» ou marquage imprimé au matériel et spécifique de l'origine sexuelle [118, 119].

Par ailleurs, deux types d'effets doivent être distingués : la sélection gamétique et les potentialités différentielles extrachromosomiques. Pour ces deux éventualités, les caractéristiques réciproques, dans le cas de caractères qualitatifs, ou des valeurs moyennes, dans le cas de caractères quantitatifs, doivent être différentes.

### *Sélection gamétique et contrôle par effets différentiels*

Cette première hypothèse implique des différences de composition en gènes nucléaires chez les gamètes mâles et femelles qui participent à la fécondation. Cela peut être lié à un contrôle ou à des effets sélectifs directs durant la différenciation sexuelle, puis lors de la formation des gamètes mâles ou femelles, et aboutissant à la création de stocks haploïdes différents. Peuvent intervenir aussi des corrections systématiques, par réparation différentielle des ADN [46, 108], pouvant même court-circuiter les événements de recombinaison [123, 126] et donner régulièrement naissance à des gamètes mâles et des gamètes femelles de types nucléaires différents.

Ainsi, les mécanismes de recombinaison pourraient être limités par des structurations chromosomiques empêchant l'appariement entre homologues comme l'ont décrit Sugawara et Szostak [126] ou encore ces remaniements pourraient être réparés systématiquement. Cela pourrait expliquer la stabilité génétique des descendances en autofécondation à partir de parents hétérozygotes (Fig. 27). Ici, les variances des croisements réciproques pourraient être significativement différentes. Par ailleurs, avec ce seul mécanisme qui agirait en permanence, les potentialités parentales pourraient être maintenues chez les descendants d'autofécondation mais elles devraient être perdues définitivement en croisement et donner, soit des formes intermédiaires par hérédité additive, soit des types nouveaux, dans le cas d'effets d'interaction, par réassociation gamétique systématique.

Le maintien d'un tel mécanisme devrait conserver les phénotypes des hybrides dans leur descendance d'autofécondation et les caractéristiques parentales d'origine ne devraient jamais réapparaître. Cependant, dans le cas où le système se bloquerait, divers types de ségrégations pourraient être observées pour chaque croisement selon les lois mendéliennes classiques.

### *Effets différentiels extrachromosomiques*

Dans le cas de cette seconde hypothèse, l'identité nucléaire des croisements réciproques amène à l'homogénéité des variances intra-descendances et à l'uniformité du phénotype au sein d'un sens de croisement. Les différences significatives entre les phénotypes, ou entre des valeurs moyennes des croisements réciproques, mènent à la conclusion que le même génome s'exprime de façons différentes en fonction des structures extrachromosomiques. Ces dernières peuvent aussi bien concerner des systèmes cytoplasmiques que des éléments nucléaires ne suivant pas les lois de Mendel (Fig. 28).

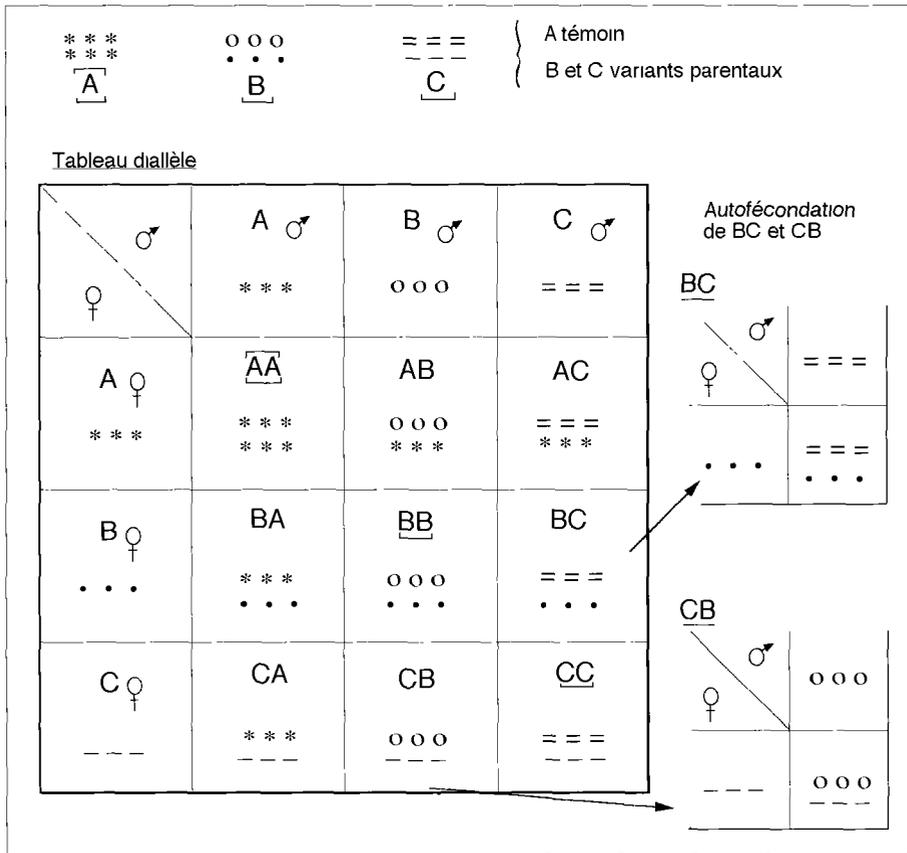
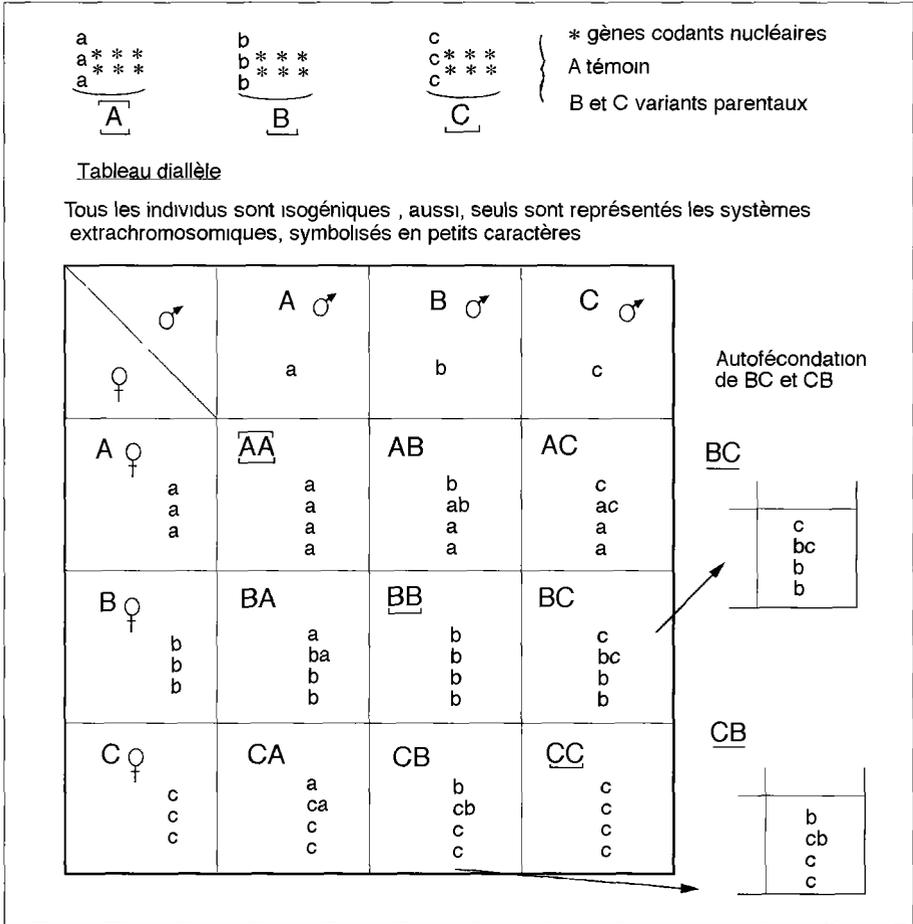


Figure 27. — Sélection gamétique et annulation des recombinaisons. Par ces mécanismes, il y a homogénéité du phénotype de croisements réciproques et maintien après autofécondation, mais les types parentaux n'apparaissent jamais.

Dans des croisements diallèles, les potentialités d'un parent sont confrontées à celles de tous les autres. Pour un croisement donné, tout type de situation peut être obtenu en fonction de la dynamique, la stabilisation et les interactions des potentialités du gamète mâle et du gamète femelle.

Le même comportement pour tous les descendants d'un croisement entraîne une variance intra-descendance non modifiée. Des expressions nouvelles asymétriques peuvent se déterminer au moment de la fécondation et apparaître comme des effets maternels. Mais, dans le cas d'une évolution propre de chacun des apports parentaux, il peut y avoir amplification de certains éléments par le biais de cinétiques de réplication spécifiques. Par ailleurs, des effets synergiques peuvent être dus à la rencontre d'entités extrachromosomiques parentales complémentaires ou à de nouvelles interactions nucléo-cytoplasmiques.

Des comportements inattendus, tels que les effets paternels ou même de transgressions (pseudo-hétérosis), peuvent donc apparaître. Néanmoins, du fait du maintien des



**Figure 28. — Modifications extrachromosomiques ou épigéniques.** Lors de la fécondation, les croisements réciproques peuvent différer sous l'angle qualitatif et quantitatif (types et nombre de lettres). Les couples de lettres tels que «cb» et «bc» représentent des interactions de nature différente, donc  $cb \neq bc$ . La complexité peut s'accroître par le biais d'interactions supplémentaires de type «cbb» (ou en ajoutant des symboles au sein de chaque structure parentale). Selon le croisement, la rencontre peut amener, par stabilisation ou par évolution des structures jusqu'à un équilibre spécifique, à diverses situations. Ainsi, outre des effets paternels ou maternels, il peut apparaître des cas d'identité aux parents ou même des effets de transgression.

Le schéma présente des effets dissymétriques directs, tels que maternels ou paternels. L'autofécondation de chaque croisement peut maintenir ces états dans toute la descendance.

gènes nucléaires inchangés, l'expression du variant parental ou du témoin peut dans certains cas réapparaître.

Les descendance de l'autofécondation des croisements réciproques restent homogènes, dans la mesure où le système extrachromosomique ne ségrège pas [122] après la méiose, et elles peuvent alors présenter à l'identique les performances de la génération antérieure de croisement.

## Vitrovariants de laitue et de tomate

Les recherches ont été conduites sur deux espèces : la laitue (*Lactuca sativa*,  $2n = 18$ ) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*,  $2n = 24$ ). Nous donnons ci-dessous une synthèse de travaux qui se sont déroulés de 1971 à 1986 (plus particulièrement Sibi [23] pour la laitue, et Sibi [31] pour la tomate).

La culture des tissus *in vitro* a été entreprise après vérification du comportement homozygote des génotypes, c'est-à-dire de l'absence de caractères en ségrégation après autofécondation. Ces cultures *in vitro* donnent une très grande gamme de variabilité chez les individus régénérés. Les étapes d'analyse sont les suivantes.

### Études cytologiques

Les analyses de caryotypes sont réalisées, à la fois pour la laitue et pour la tomate, à chacun des stades opératoires explicités (voir paragraphe : «Dénombrement chromosomique»).

La culture *in vitro* de laitue ne donne jamais naissance à des caryotypes modifiés, aussi bien dans les cellules de cals que dans les pointes racinaires des vitrovariants ou de leurs descendances par autofécondation. En revanche pour la tomate, une variabilité chromosomique est largement exprimée dans les cals et parfois même chez les plantes régénérées ; sur 70 individus, 7 sont aneuploïdes et 1 est tétraploïde. Des caryotypes normaux sont aussi observés sur les autres plantes et ces caryotypes restent stables dans la descendance en autofécondation.

### Analyse des descendances

Une série d'analyses statistiques successives est effectuée pour des caractères qualitatifs et quantitatifs (couleur, forme, aspect, taille et nombre de feuilles ; poids et hauteur des plantes ; etc.) amenant au traitement d'environ 42 000 données chez la laitue et 24 000 chez la tomate.

### Descendances d'autofécondation

Cette première comparaison inclut uniquement les descendances des individus à caryotype normal. Elle comprend les 22 descendances issues de l'autofécondation de 15 variants et de 7 témoins pour la laitue et les 30 descendances issues de 25 variants et 5 de témoins pour la tomate.

Des situations de mutation sont trouvées pour 2 descendances chez la laitue et pour 17 chez la tomate, alors que chez toutes les autres descendances de laitue, et dans 8 cas chez la tomate, les nouveaux phénotypes s'expriment sans ségrégation.

Toutes les caractéristiques quantitatives, dans le cas de descendance uniformes, ont été suivies pendant deux générations successives et se révèlent être parfaitement stables, permettant de conclure à l'homozygotie. Les traits qualitatifs des variants stables de laitue les plus faciles à identifier ont fait l'objet de comparaison avec les témoins pendant 6 générations successives et ils restent inchangés.

On peut donc rattacher ce type de variation au «phénotype variant homogène» tel que décrit plus haut, et qui doit être suivi en croisements réciproques. Dans l'expérience en croisements diallèles qui suit, seules ont été incluses les descendance bien typées et les témoins.

### ***Croisements diallèles***

Ces dispositifs diallèles comprennent les variants (3 pour la laitue et 4 pour la tomate) et un témoin. Les descendance sont comparées, les analyses donnent les résultats qui suivent.

Les caractères variants de la laitue présentent, pour la plupart, une hérédité maternelle, de même que certains traits quantitatifs variants chez la tomate. Plus curieusement, une hérédité paternelle fréquente est observée chez la tomate.

Pour la laitue aussi bien que pour la tomate, les produits de croisement entre variants, ou avec le témoin peuvent se comporter statistiquement comme le témoin, relativement à certains critères, et cependant exprimer des effets transgressifs pour d'autres. Pour un même parent, ces comportements spécifiques dépendent essentiellement du partenaire ou du sens du croisement. Ajoutons que la réapparition des caractéristiques du témoin, dans les croisements de certains variants, confère le maintien intrinsèque des potentialités parentales. Dans tous les cas, les variances intra-descendance demeurent identiques.

### ***Autofécondation des produits de croisement***

Ce type de test n'a été effectué que sur les descendance du diallèle de tomate. L'autofécondation n'a été menée que sur une série «ligne-colonne réciproque» du dispositif diallèle, et également sur des descendance réciproques manifestant des effets transgressifs asymétriques, ainsi que sur les parents.

Les analyses des données recueillies après essais comparatifs ont mis en évidence la «mémoire» des expressions transgressives asymétriques et confirme l'homogénéité des variances de l'ensemble des descendance.

### **Hypothèse de l'épigénique**

Ces derniers résultats sont de grande importance et infirment l'hypothèse de doubles mutations ou de sélection gamétique, qui aurait pu expliciter la stabilité des vitrovariants en autofécondation. Du fait que les croisements entre variants et avec

témoin n'ont jamais donné de ségrégation, on peut assurer que le génome nucléaire est resté homozygote et sans modifications. Les phénomènes de transgression observés ne peuvent donc pas être expliqués par des hypothèses d'hétérozygotie résiduelle.

Les transgressions asymétriques et les effets paternels fréquents sont donc en faveur de modifications extrachromosomiques qui auraient une hérédité stabilisée. La multiplicité des réactions d'un parent dans les divers croisements évoque une multiplicité de mécanismes qui pourraient jouer simultanément. Parmi ceux-ci, on pourrait impliquer des rythmes oscillatoires héréditaires au niveau des populations de molécules ou d'organites, ou des interactions entre les ADN nucléaires et cytoplasmiques [127]. Et, du fait de la transmissibilité par voie sexuée de ces mécanismes, ils ont été groupés par Sibi [23] sous le terme de «modifications épigéniques», c'est-à-dire de modifications qui concernent les structures biologiques ou des systèmes dynamiques, n'impliquant pas directement les gènes codants et ne donnant pas de ségrégations dans la descendance.

Soulignons que les haplodiploïdes issus d'une lignée d'orge et obtenus aussi bien par androgenèse que gynogenèse *in vitro* amènent, après la même démarche d'analyse génétique, aux mêmes types de comportements et de conclusions [41, 128, 129]. Il s'agit donc alors de vitrovariants issus des tissus gamétophytiques. Ainsi, tissus somatiques ou gamétophytiques cultivés *in vitro* sont concernés par des phénomènes de même nature entraînant vraisemblablement une déstabilisation du génome, formalisée par une vitrovariation et fréquemment associée à des comportements héréditaires particuliers.

## Conclusion

La régénération de plantes *in vitro*, après passage par cals, donne naissance à un large spectre de variations. Les nouveaux phénotypes observés sont depuis longtemps notre principal centre d'intérêt. «Vitrovariants» et «vitrovariations» sont donc proposés comme des termes ouverts pour qualifier ce phénomène. La possibilité d'une transmission génétique des nouveaux caractères est fonction du type de changement qui s'opère au sein d'une cellule destinée à régénérer, et de l'assise végétale concernée par cette modification chez la plante régénérée.

Seules les modifications liées à une mémorisation au niveau des caractéristiques génétiques et touchant le tissu sporogène de l'assise L<sub>2</sub> chez la plante régénérée exprimeront une hérédité par voie sexuée.

Dans chaque cas, une approche expérimentale systématique peut être mise en œuvre pour déterminer le compartiment cellulaire impliqué et le mode d'hérédité du nouveau phénotype : comptages chromosomiques des régénérants et de leurs descendants ; analyses génétiques par autofécondation et après croisements réciproques ; cela peut être complété par l'étude des familles issues de l'autofécondation des réciproques.

Les conclusions tirées de ce type d'analyses effectuées chez la laitue et chez la tomate montrent que, outre les hypothèses classiques reposant sur des changements nucléaires (nombres chromosomiques modifiés ou apparition fréquente de mutations), des systèmes extrachromosomiques doivent être impliqués pour expliquer le comportement génétique des nouvelles caractéristiques apparues.

Ainsi, tant pour des critères qualitatifs que quantitatifs, une stabilité génétique s'exprime au travers des autofécondations successives.

Les descendance des croisements réciproques donnent des effets paternels fréquents et, dans un certain nombre de cas, des performances transgressives asymétriques qui se maintiennent chez les autofécondations.

De plus en plus de données biochimiques, relatives aux comportements particuliers des plantes régénérées, apparaissent dans la littérature ; ainsi les travaux effectués chez l'orge apportent-ils des compléments d'information. Mais les premières étapes, présentées ici avant même les analyses biochimiques qui tentent d'aborder les bases moléculaires de ces phénomènes, portent sur l'identification du compartiment cellulaire concerné par ces modifications. On peut d'ailleurs supposer que plusieurs systèmes peuvent être modifiés, soit simultanément, soit par inter-relations en cascade.

Cet ensemble démontre qu'aussi bien des modifications de l'ADN codant du noyau que des modifications strictement cytoplasmiques constituent des hypothèses insuffisantes pour rendre compte des comportements exprimés après culture *in vitro*.

Le terme de «modifications épigénétiques» proposé implique donc des changements qui ne suivent ni les lois classiques mendéliennes, ni même une hérédité cytoplasmique maternelle stricte.

Quoi qu'il en soit, tout cela laisse supposer qu'un système biologique qui passe au travers de la méiose et qui joue sur des régulations variées a pu être modifié ou révélé par la culture de tissus. Ce système peut être situé non seulement dans le cytoplasme, mais aussi dans des zones nucléaires extrachromosomiques ou même sur le chromosome dans les parties non codantes, comme l'ADN répété non exprimé, dont le rôle et la réplication sont pour l'instant mal connus.

## Références

1. Robbins WJ. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Bot Gaz* 1922 ; 73 : 376-90.
2. White PR. Plant tissue cultures. The history and present status of the problem. *Arch F Exp Zelforsch* 1931 ; 10 : 501-18.
3. White PR. Plant tissue cultures. A preliminary report of results obtained in the culturing of certain plant meristems. *Arch F Exp Zelforsch* 1932 ; 12 : 602-20.
4. White PR. Influence of some environmental conditions on growth of excised root tips of wheat seedlings in liquid media. *Plant Physiol* 1932 ; 7 : 613-28.
5. White PR. Plant tissue cultures. Results of preliminary experiments on the culturing of isolated stem-tips of *Stelleria media*. *Protoplasma* 1933 ; 19 : 97-116.

6. Nobécourt P. Productions de nature caulinnaire et foliaire sur des cultures de racines de carotte en milieu synthétique. *CR Soc Biol* 1946 ; 140 : 944-53.
7. Gautheret RJ. Catalogue des cultures de tissus végétaux. *Rev Gen Got* 1954 ; 61 : 672-702.
8. Gautheret RJ. *La culture des tissus végétaux*. Paris : Masson et Cie, 1959.
9. Gautheret RJ. La culture des tissus végétaux : son histoire, ses tendances. *Rev Cyt Biol Vég* 1964 ; 27 : 99-220.
10. Clare MV, Collin HA. Meristem culture of brussels sprouts. *Hor Res* 1974 ; 13, 2/3 : 111-8.
11. Sibi M. Multiplication conforme, non conforme. *Sélectionneur Fr* 1978 ; 26 : 9-18.
12. Brettell RIS, Ingram DS. Tissue culture in the production of novel disease resistant crop plants. *Biol Rev* 1979 ; 54 : 329-45.
13. Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 1981 ; 60 : 197-214.
14. Reisch B. Genetic variability in regenerated plants. In : Evans DA, Sharp NR, Ammirato PV, Yamada Y, eds. *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1 : Techniques for propagation and breeding. New York : Macmillan Publishing Company, 1983 : 748-69.
15. Orton TJ. Somaclonal variation : theoretical and practical considerations. In : Gustafson JP, ed. *Gene manipulation in plant improvement*. New York : Plenum, 1984 : 427-68.
16. Karp A, Bright SWJ. On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol* 1985 ; 2 : 199-234.
17. Gould AR. Factors controlling generation of variability *in vitro*. In : Vasil IK, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3, Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc, 1986 : 549-67.
18. Sibi M. Création de variabilité par culture de tissus *in vitro* chez *Lactuca sativa*. DEA Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay, 1971.
19. Lutz A. Etude des aptitudes morphogénétiques des cultures de tissus. Analyse par la méthode des clones d'origine unicellulaires. *Rev Gén Bot* 1969 ; 76 : 309-59.
20. Mousseau J. Fluctuation induite par la néoformation de bourgeons *in vitro*. Coll inter CNRS, Strasbourg 1969. Les cultures de tissus de plantes, 1970 : 235-9.
21. Heinz DJ, Mee GWP. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum species* hybrid clones derived from callus tissue. *Am J Bot* 1971 ; 58 : 257-62.
22. Sibi M. Création de variabilité par culture de tissus *in vitro* chez *Lactuca sativa*. Thèse spéc Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay, 1974.
23. Sibi M. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. II Aspect expérimental : obtention de variants par culture de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa* L., apparition de vigueur chez les croisements. *Ann Amélior Pl* 1976 ; 264 : 523-47.
24. Binns A, Meins F. Evidence that habituation of tobacco pith cells for factors promoting cell division is heritable and potentially reversible. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 ; 70 : 2660-2.
25. Sibi M. Expression of cryptic genetic factors *in vivo* and *in vitro*. In : Zeven AC, van Harten AM, eds. Proc Conf. Broadening Genet. Base Crops : 1978 Wageningen. Wageningen : Pudoc, 1979 : 339-40.
26. Mikoko-Nsika E. Analyse de la variabilité dans la descendance des plantes obtenues par culture *in vitro* de tissus somatiques de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Thèse Spéc Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay, 1982.
27. Evans DA, Sharp WR. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 1983 ; 221 : 949-51.
28. Sibi M. Variants épigénétiques et cultures *in vitro* chez *Lycopersicon esculentum* L. In : *Application de la culture in vitro à l'amélioration des plantes potagères*. CR. Eucarpia CNRA 1980. Versailles 1980 : 179-85.

29. Sibi M. Hérité de variants épigéniques obtenus par culture de tissus *in vitro* chez les végétaux supérieurs. Thèse Doct ès-Sciences, Université Paris-Sud, Orsay, 1981.
30. Sibi M. Heritable epigenetic variation from *in vitro* tissue culture of *Lycopersicon esculentum* (var Monalbo). In : Earle ED, Demarly Y, eds. *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Proc NSF-CNRS Congrès 1980 Orsay. New York : Praeger CBC Inc, 1982 : 228-44.
31. Sibi M. Non-mendelian heredity. Genetic analysis of variant plants regenerated from *in vitro* culture : epigenetics and epigenics. In : Semal J, ed. *CEC Symposium somaclonal variation and crop improvement*, 1985. Belgique, Gembloux, 1986 : 53-83.
32. Truong I. Variabilité des plantes issues d'androgénèse *in vitro* ; tentatives d'application directe en sélection de cette variabilité et de la mutagenèse obtenues par voie haploïde chez le riz, *Oryza sativa*. Thèse spéc Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay, 1977.
33. Odjo JA. Analyse biométrique de niveaux de variations observées chez des plantes de riz (*Oryza sativa* L. var. Cigalon) obtenues par androgénèse *in vitro*. Thèse Doc-Ing Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay, 1978.
34. Kouadio YS. Analyse génétique de la variabilité observée dans une descendance de lignée pure de riz (*Oryza sativa* L var Cigalon) traitée par androgénèse *in vitro*. Thèse Doc-Ing, Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay, 1979.
35. Dossou-Yovo S, Prioul JL, Demarly Y. Croissance et photosynthèse de phénovariants de riz. Effet de l'ombrage. *Agronomie* 1982 ; 2 : 493-502.
36. Schaeffer GW. Recovery of heritable variability in anther-derived doubled haploid rice. *Crop Sci* 1982 ; 22 : 1160-4.
37. Schaeffer GW, Sharp FT Jr, Cregan PB. Variation for improved protein and yield from rice anther culture. *Theor Appl Genet* 1984 ; 67 : 383-9.
38. Wakasa R. Application of tissue culture to plant breeding. Method improvement and mutant production. *Bull Nat Inst Agric Sci* 1982 ; D33 : 121-200.
39. Picard E. Contribution à l'étude de l'hérédité et de l'utilisation en sélection de l'haploïdisation par androgénèse *in vitro* chez une céréale autogame : *Triticum aestivum* L. Thèse Doc ès-Sciences Université Paris-Sud, Orsay, 1984.
40. Matzinger DF, Burk LG. Cytoplasmic modification by anther culture in *Nicotiana tabacum* L. *Heredity* 1984 ; 75 : 167-70.
41. San-Noeum LH, Ahmadi N. Variability of doubled haploids from *in vitro* androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare*. In : Earle ED, Demarly Y, eds. *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Proc NSF-CNRS Congrès 1980 Orsay. New York : Praeger CBC Inc, 1982 : 273-83.
42. De Mars R. Resistance of cultured human fibroblasts and other cells, to purine and pyrimidine analogues in relation to mutagenesis detection. *Mutat Res* 1974 ; 14 : 335-64.
43. Durrant A. The environmental induction of heritable change in *Linum*. *Heredity* 1962 ; 17 : 27-61.
44. Brink RA, Styles ED, Axtell JD. Paramutation : directed genetic change. *Science* 1968 ; 159 : 159-61.
45. Tartof KD. Unequal mitotic sister chromatid exchange and disproportionate replication as mechanisms regulating ribosomal RNA-gene redundancy. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1973 ; 38 : 491-500.
46. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987 ; 238 : 163-70.
47. Meins F, Binns A. Epigenetic variation of cultured somatic cells : evidence for gradual changes in the requirement for factors promoting cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 ; 74 : 2928-32.
48. Meins F, Lutz J. The induction of cytokinin habituation in primary pith explants of tobacco. *Planta* 1980 ; 149 : 402-7.

49. Meins F. Heritable variation in plant cell culture. *Annu Rev Plant Physiol* 1983 ; 34 : 327-46.
50. Skokut TA, Filner P. Slow adaptative changes in urease levels of tobacco cells cultured on urea and other nitrogen sources. *Plant Physiol* 1980 ; 65 : 995-1003.
51. Filner P. Possible origins of heritable variations in plant cell cultures. In : *J Tissue Culture Assoc. In vitro* (abstr) 1980 ; 163 : 232.
52. Buiatti M, Marcheschi G, Tognoni F, Lipuci di Paola M, Collina Greci F, Martini G. Genetic variability induced by tissue culture in the tomato *Lycopersicon esculentum*. *Z Pflanzenzucht* 1985 ; 94 : 162-5.
53. Evans DA, Sharp WR, Medina-Filho HP. Somaclonal and gametoclonal variation. *Am J Bot* 1984 ; 71 : 759-74.
54. Keyes GJ, Collins GB, Taylor NL. Genetic variation in tissue of red clover. *Theor Appl Genet* 1980 ; 58 : 265-71.
55. Bergounioux C, Perennes C, Miloux B. Analysis of the nucleoplasmic interactions in the phenomenon of heterosis. In : Earle ED, Demarly Y, eds. *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Proc NSF-CNRS Congrès 1980 Orsay. New York : Praeger CBC Inc, 1982 : 331-42.
56. De Nettancourt D, Devreux M. Incompatibility and *in vitro* cultures. In : Reinert J, Bajaj YPS, eds. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Berlin : Springer Verlag, 1977 : 426-64.
57. Sree-Ramulu K. Genetic instability at the S-locus of *Lycopersicon peruvianum* plants regenerated from *in vitro* culture of anthers : generation of new S-specificities and S-allele reversions. *Heredity* 1982 ; 49 : 319-30.
58. Sree Ramulu K, Devreux M, Ancora G, Laneri U. Chimerism in *Lycopersicon peruvianum* plants regenerated from *in vitro* cultures of anthers and stem internodes. *Z Pflanzenzucht* 1976 ; 76 : 299-319.
59. Sree Ramulu K. Failure of EMS to induce S-locus mutations in *Nicotiana glauca* Link and Otto. *Environ Expt Bot* 1980 ; 20 : 149-55.
60. Demarly Y. Les effets cytoplasmiques et l'amélioration des plantes. *Le sélectionneur Fr* 1974 ; 19 : 61-88.
61. Skirvin RM, Janick J. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. *J Am Soc Hortic Sci* 1976 ; 101 : 281-90.
62. Deshayes A. Effets de cycles successifs de néoformation de bourgeons *in vitro* sur l'aptitude à la variation somatique chez un mutant chlorophyllien de *Nicotiana tabacum* var Samsun. *Mutat Res* 1976 ; 35 : 331-46.
63. Brettell RIS, Thomas E, Ingram DS. Reversion of Texas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile, T-toxin resistant plants. *Theor Appl Genet* 1980 ; 58 : 55-8.
64. McCoy TJ, Phillips RL. Chromosome stability in maize *Zea mays* L tissue cultures and sectoring in some regenerated plants. *Can J Genet Cytol* 1982 ; 24 : 559-65
65. Lee M. Cytogenetic analysis and progeny evaluation of maize *Zea mays* L plants regenerated from organogenic callus cultures. MS Thesis, Minneapolis : University of Minnesota, 1984.
66. Novak FJ, Maskova I. Apical shoot tip culture of tomato. *Sci Hort* 1979 ; 10 : 337-44.
67. Kartha KK, Champoux S, Gamburg OL, Pahl J. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J Am Soc Hort Sci* 1977 ; 3 : 346-9.
68. Padmanabhan V, Paddock EF, Sharp WR. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. *Am J Bot* 1972 ; 52 : 1429-32.
69. Langhe de E, de Bruijne E. Continuous propagation of tomato plants by means of callus cultures. *Sci Hort* 1976 ; 4 : 221-7.

70. Evans DA. Case histories of genetic variability *in vitro* : tomato. In : Vasil IK, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc 1986 : 419-34.
71. Sibi M, Biglary M, Demarly Y. Increase in the rate of recombinants in tomato *Lycopersicon esculentum* after *in vitro* regeneration. *Theor Appl Genet* 1984 ; 68 : 317-21.
72. Nuti Ronchi V. Amplificazione genica in cellule differenziate di cotiledoni di *Lactuca sativa in vitro*. *Atti Ass Genet Ital* 1971 ; 16 : 47-50.
73. Nagl W. Evidence of DNA amplification in the orchid *Cymbidium in vitro*. *Cytobiol* 1972 ; 5 : 145-54.
74. Nagl W, Hendon J, Rucker W. DNA amplification in *Cymbidium* protocorms *in vitro* as it relates to cytodifferentiation and hormone treatment. *Cell Diff* 1972 ; 1 : 229-37.
75. Buiatti M. DNA amplification and tissue culture. In : Reinert J, Bajaj YPS, eds. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Berlin : Springer Verlag, 1977 : 358-74.
76. Schimke RT, Kaufman RJ, Alt FW, Fellems R. Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells. *Science* 1978 ; 202 : 1051-5.
77. Carlson PS. Methionine-sulfoximine resistant mutants of tobacco. *Science* 1973 ; 180 : 1366-8.
78. Sacristán MD. Isolation and characterisation of mutant cell lines and plants : disease resistance. In : Vasil IK, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc 1986 : 513-25.
79. Crocomo OJ, Ochoa-Alejo N. Herbicide tolerance in regenerated plants. In : Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y, eds. *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1. Techniques for propagation and breeding. New York : Macmillan Publishing Company 1983 : 770-81.
80. Hugues KW. Selection for herbicide resistance. In : Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y, eds. *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1 Techniques for propagation and breeding. New York : Macmillan Publishing Company, 1983 : 442-60.
81. Chaleff RS. Selection for herbicide-resistant mutants. In : Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, eds. *Handbook of plant cell culture*. Vol. 4. Techniques and applications. New York : Macmillan Publishing Company, 1983 : 133-48.
82. Chaleff R.S. Isolation and characterization of mutant cell lines and plants : herbicide-resistant mutants. In : Vasil IK, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3 : Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc. 1986 : 499-512.
83. Rains DW, Croughan SS, Croughan TP. Isolation and characterisation of mutant cell lines and plants: salt tolerance. In : Vasil IK, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc, 1986 : 537-47.
84. Chen THH, Gusta LV. Isolation and characterisation of mutant cell lines and plants : cold tolerance. In : Vasil IK, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc, 1986 : 527-47.
85. Tal M. Selection for stress tolerance. In : Evans DA, Sharp NR, Ammirato PV, Yamada Y, eds. *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1. Techniques for propagation and breeding. New York : Macmillan Publishing Company, 1983 : 461-88.
86. Yamada Y, Sato F. Selection for photoautotrophic cells. In : Evans DA, Sharp NR, Ammirato PV, Yamada Y, eds. *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1. Techniques for propagation and breeding. New York : Macmillan, 1983 : 489-500.
87. Demarly Y. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. I. Aspects théoriques. *Ann Amélior Pl* 1976 ; 26 : 117- 38.

88. Demarly Y. Experimental and theoretical approach of *in vitro* variations. In : Semal J, ed. CEC *Symposium somaclonal variation and crop improvement*, 1985. Gembloux, Belgique, 1986 : 84-99.
89. Demarly Y. *Génétique et amélioration des plantes*. Paris : Masson, Col: Sciences agronomiques, 1977.
90. Demarly Y. L'épigénique. *Bull Soc Bot Fr* 1985 ; 132 Actual Bot ; 3/4 : 79-94.
91. Demarly Y. Régulation et hétérosis. *Ann Amélior Pl* 1972 ; 22 : 143-66.
92. Skirvin RM. Separation of phenotypes in a periclinal chimera. *J College Science Teaching* 1977 ; 7 : 33-5.
93. Carlson PS, Chaleff RS. Heterogeneous associations of cells formed *in vitro* . In : Ledoux L, ed. *Genetic manipulations with plant materials*. New York : Plenum Press, 1974 : 245-61.
94. Sree Ramulu K, Devreux M, De Martinis P. Origin and genetic analysis of plants regenerated *in vitro* from periclinal chimeras of *Lycopersicon peruvianum*. *Z Pflanzenzuchtg* 1976 ; 77 : 116-24.
95. Springer WD, Green CE, Kohn KA. A histological examination of tissue cultures initiated from immature embryos of maize. *Protoplasma* 1979 ; 101 : 269-81.
96. Skirvin RM, Carlson L, Gorske S. Natural and tissue cultured-induced variation in *Portulaca* hybrid. In : Earle ED, Demarly Y, eds *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Proc NSF-CNRS Congrès 1980 Orsay. New York : Praeger CBC Inc, 1982 : 245-67.
97. Benzion G, Phillips RL, Rines HW. Case histories of genetic variability *in vitro* : oats and maize. In : Vasil IK, ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc, 1986 : 435-48.
98. Satina S, Blakeslee AF, Avery AG. Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer J Bot* 1940 ; 27 : 895-905.
99. Cameron JW, Soost R, Olson F. Chimeral basis for color pink and red grapefruit. *J Heredity* 1964 ; 55 (1) : 23-8.
100. Dermen H, Stewart RN. Ontogenic study of floral organs of peach utilizing cytochimeral plants. *Am J Bot* 1973 ; 603 : 283-91.
101. Péreau-Leroy P. Genetic interaction between tissues of carnation petals as periclinal chimeras. *Radiation Botany* 1974 ; 14 : 109-16.
102. Sagawa Y, Melhquist GAL. The mechanism responsible for some X-ray induced changes in flower color of the carnation, *Dianthus caryophyllus*. *Am J Bot* 1957 ; 44 : 397-403.
103. Péreau-Leroy P. Recherches radiobiologiques sur des chimères d'œillet. *Dianthus caryophyllus* L. Thèse Doc ès-Sci, Université Clermont-Ferrand, 1975.
104. Reisch B, Bingham ET. *In vitro* selection of ethionine-resistant variants of diploid alfalfa. *Agronomy* 1979 (Abstr) : 74.
105. Sager R, Grawoby C. Differential methylation of chloroplast DNA regulates maternal inheritance in a methylated mutant of *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 3025-9.
106. Siminovitch L. On the nature of heritable variation in cultured somatic cells. *Cell* 1976 ; 7 : 1-11.
107. Bergounioux C. Déclenchement des phénomènes de régénération sur des pétales de *Petunia hybrida*. *Ann Amélior Plantes* 1974 ; 24 (1) : 55-62.
108. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. Developmental clocks may depend on the enzymatic modification of specific bases in repeated DNA sequences. *Science* 1975 ; 187 : 226-32.
109. Bird AP, Taggart MH, Gehring CA. Methylated and unmethylated ribosome RNA genes in the mouse. *J Mol Biol* 1981 ; 152 : 1-17.

110. D'Amato F. Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. A critical examination of literature. *Caryologia* 1952 ; 4 : 311-57.
111. D'Amato F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In : Thorpe TA, ed. *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary : Intern. Ass Plant Tissue Culture 197, 1978 : 287-95.
112. Ahloowalia BS. Limitations of the use of somaclonal variation in crop improvement. In : Semal J, ed. *CEC Symposium Somaclonal variation and crop improvement* 1985. Gembloux, Belgique. 1986 : 14-27.
113. Preer JR Jr. Extrachromosomal inheritance : hereditary symbionts, mitochondria, chloroplasts. *Annu Rev Genet* 1971 ; 5 : 361-406.
114. Frankel R, Scowcroft WR, Whitfield PR. Chloroplast DNA variation in isonuclear male-sterile lines of *Nicotiana*. *Mol Gen Genet* 1979 ; 169 : 129-35.
115. Gray MW. Mitochondrial genome diversity and the evolution of mitochondrial DNA. *Can J Biochem* 1982 ; 60 : 157-71.
116. Clauhs RP, Grun P. Changes in plastid and mitochondrion content during maturation of generative cells of *Solanum solanaceae*. *Am J Bot* 1977 ; 64 (4) : 377-83.
117. Lansman RA, Avise JC, Huettel MD. Critical experimental test of the possibility of «paternal leakage», of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 1969-71.
118. Tilney-Basset RAE, Abdel-Wahab OAL. Irregular segregation at the Pr locus controlling plastid inheritance in *Pelargonium* : gametophytic lethal or incompatibility system ? *Theor Appl Genet* 1982 ; 62 : 185-91.
119. Tilney-Basset RAE, Birky CW Jr. The mechanism of the mixed inheritance of chloroplast genes in *Pelargonium* : evidence from gene frequency distributions among the progeny of crosses. *Theor Appl Genet* 1981 ; 60 : 43-53.
120. McClintock B. Intracellular systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symp Biol* 1956 ; 8 : 58.
121. Ohta T. Two-locus problems in transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Genetics* 1980 ; 96 : 543-55.
122. Birky CW Jr. Relaxed cellular controls and organelles heredity. *Science* 1983 ; 222 : 468-75.
123. Nagylaki T, Petes TD. Intrachromosomal gene conversion and the maintenance of sequence homogeneity among repeated genes. *Genetics* 1982 ; 100 : 315-37.
124. Borst P, Greaves DR. Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science* 1987 ; 235 : 658-67.
125. Griffing B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust J Biol Sci* 1956 ; 9 : 463-93.
126. Sugawara N, Szostak JW. Recombination between sequences in non homologous positions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 5675-9.
127. Whisson DL, Scott S. Nuclear and mitochondrial DNA have sequence homology with a chloroplast gene. *Plant Mol Biol* 1985 ; 4 : 267-73.
128. Sibi M, Kandil M. Marqueurs biochimiques de la vitrovariation chez des haplodiploïdes d'orge (*H. vulgare*). In : *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes*. Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, 1993 : 283-99.
129. Sibi M, Fakiri M. Vitrovariation chez des orges (*Hordeum vulgare*) issues d'haplodiploïdisation. Analyse des  $\beta$ -amylases chez les croisements diallèles. In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, 1994 : 337-46.

## Haploïdisation

### Les tissus sporogènes

Les tissus sporogènes vont donner naissance à des structures bien différenciées : les gamétophytes. Ces organes porteront les gamètes ou cellules reproductrices ; il existe donc un gamétophyte mâle et un gamétophyte femelle.

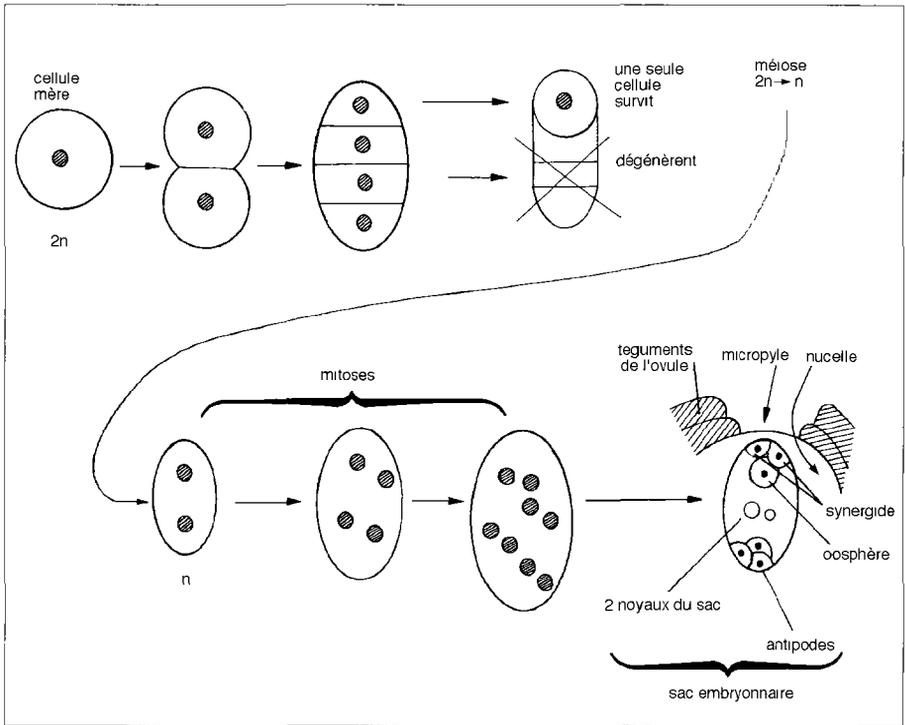
Dans un bouton floral au stade jeune, à l'intérieur des anthères, des files cellulaires donnent naissance aux sacs polliniques. Dans chacun de ces derniers, se différencient sous l'épiderme une assise mécanique puis deux couches sous-jacentes, les assises nourricières qui serviront au développement des cellules internes. Celles-ci sont les cellules mères des grains de pollen, qui vont chacune, à la suite de la méiose, produire quatre microspores haploïdes.

Il existe donc un noyau haploïde mâle dans la jeune microspore. Ce noyau se divise pour donner naissance au noyau reproducteur et au noyau végétatif. Cette structure constituera le pollen mûr chez les espèces dites à pollen binucléé (solanées, légumineuses, rosacées, ...). Chez les espèces dites à pollen trinuéé (composées, crucifères et graminées...), le noyau reproducteur se divise en deux et le grain de pollen mûr comprend donc deux cellules reproductrices et une cellule végétative.

De même dans le jeune ovule sous les téguments, on trouve une masse parenchymateuse, le nucelle. Dans celui-ci, une cellule située près du pôle micropylaire va subir la méiose, c'est la cellule mère du sac embryonnaire [1].

Dans le cas le plus fréquent de quatre cellules haploïdes issues de la méiose de cette cellule mère, les trois supérieures dégèrent, seule l'inférieure se développe et après trois mitoses normales donne les huit noyaux haploïdes typiques d'un sac embryonnaire (Fig. 29).

Notons bien que ces huit noyaux sont identiques sur le plan des gènes puisqu'ils dérivent tous d'un seul produit de la méiose.



**Figure 29.** — La gamétogenèse femelle (cas d'un sac embryonnaire à huit noyaux).

Normalement les tissus sporogènes sont destinés à participer à la fécondation. Mais il arrive qu'avant la méiose on puisse régénérer des plantes à partir des tissus qui différencient les cellules-mères : on dit qu'il y a apomixie.

Quand ce sont des tissus ayant subi la méiose qui, avant la fécondation, sont à la source de régénérations, on parle d'androgenèse pour les microspores, de parthénogenèse pour l'oosphère, d'apogamie pour les synergides, les antipodes ou les noyaux polaires.

L'ensemble de la parthénogenèse et de l'apogamie est plus fréquemment désigné par le terme gynogenèse.

On peut donc à partir des tissus ayant subi la méiose régénérer *in vitro* des structures haploïdes à la condition d'opérer avant la fécondation (androgenèse et gynogenèse).

On peut aussi obtenir des régénérations haploïdes après la fécondation dans le cas où l'un des deux stocks parentaux est éliminé, par exemple dès le stade zygote (il ne sert alors que d'inducteur) ou au cours des premières mitoses de l'embryon.

D'autres situations donnent aussi des plantes haploïdes dans les cas de gemellarités ou de polyembryonie.

## Étude détaillée des divers cas d'obtention de plantes haploïdes

### Polyembryonie

Il existe chez certaines plantes (les citruses, les manguiers, par exemple) une polyembryonie naturelle (Fig. 30) : à côté de l'embryon sexué résultant de la fécondation se développent dans la graine plusieurs embryons dits adventifs ou nucellaires car, comme l'indique leur nom, ils dérivent de massifs cellulaires développés à partir du nucelle ; ces embryons sont donc des copies végétatives de la plante mère, contrairement à l'embryon sexué. Mais chez toutes les espèces, il arrive avec un taux assez faible (de l'ordre de 1 pour 1 000) que deux embryons se développent et donnent des semences à deux plantules. Souvent l'une de ces deux plantules est moins vigoureuse et l'on peut vérifier qu'elle est haploïde [2] ; son développement provient d'une induction de l'une des deux synergides qui, parallèlement à l'oosphère fécondée, se différencie en un embryon apogamique. Pour l'amélioration de certaines espèces, on peut utiliser cette haploïdisation spontanée, à la condition de détecter facilement les graines porteuses de ces embryons doubles : c'est le cas du cacaoyer où la «fève» est plus plate [3] ou de l'asperge où par transparence, après grattage, on discerne l'embryon (ou les deux embryons). Dans d'autres cas, on a pu sélectionner des génotypes qui produisaient des embryons doubles à des fréquences anormalement élevées ; ainsi chez le piment (*Capsicum annuum*) [2], on a tiré parti du phénomène.

Chez le lin, certains génotypes produisent pour environ un sur dix de leurs sacs embryonnaires deux oosphères qui, bien que seule l'une d'entre elles soit fécondée,

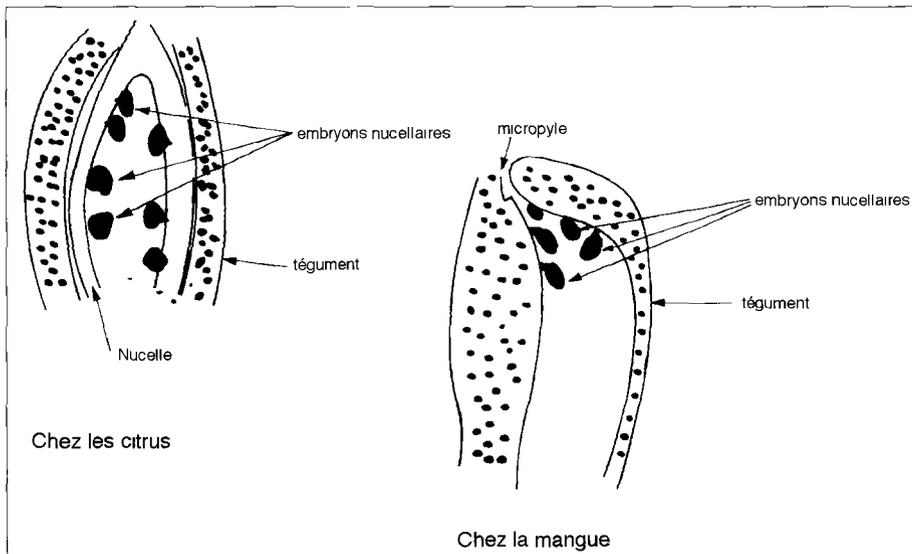


Figure 30. — Polyembryonie naturelle.

développent chacune un embryon, l'un étant sexué et l'autre parthénogénétique. Dans ce cas, l'utilisation pour la création variétale serait possible. En revanche, de nombreuses références à des parthénogenèses, apparaissant à très faible fréquence, ou à des systèmes génétiques très complexes semblent plutôt des curiosités et n'ont pas eu d'impacts (sur le maïs [4], par exemple).

### Hybridations interspécifiques

Dans certains croisements, l'incompatibilité ne se traduit pas au niveau de la reconnaissance pollen-stigmate, ni même dans les phases ultérieures de la croissance du tube pollinique et de la rencontre spermatozoïdes-oosphère, mais au stade de leur fusion ou au cours des premières mitoses qui s'ensuivent.

C'est ainsi qu'on peut obtenir des plantes haploïdes d'orge ou de blé en pollinisant ces espèces par une espèce sauvage (*Hordeum bulbosum*), l'orge bulbeuse, ou même en utilisant *H. bulbosum* comme femelle. La fécondation a bien lieu mais les chromosomes de l'espèce *bulbosum* sont éliminés dès les premières mitoses, laissant un embryon haploïde qui dégénérerait rapidement si on ne le sauvait par culture *in vitro* [5]. Dans ces conditions, on parvient à obtenir des plantules puis des plantes viables. Cette technique est aujourd'hui largement développée par les sélectionneurs d'orge pour fixer leurs descendance après hybridation. Un autre cas d'utilisation pratique de l'haploïdisation après hybridation interspécifique est celui de la pomme de terre, *Solanum tuberosum*. La forme cultivée est tétraploïde ( $2n = 4x$ ) et il est fort utile de l'amener à l'état dihaploïde ( $2n = 2x$ ) afin de pouvoir la croiser avec de nombreuses espèces diploïdes spontanées qui apportent un large spectre d'adaptations climatiques et de tolérances ou de résistances aux pathogènes. Par ailleurs, l'amélioration au niveau diploïde est plus efficace qu'au niveau  $4x$ .

Quand la pomme de terre cultivée  $4x$  est pollinisée par l'espèce sauvage  $2x$  *Solanum phureja*, une forte proportion de graines  $2x$  de type maternel est obtenue, le pollen de *phureja* n'assurant pas la double fécondation : l'oosphère a un développement parthénogénétique alors que l'albumen, lui, est bien hybride, ayant reçu un (ou parfois deux) spermatozoïde(s).

Grâce à des marqueurs, on identifie très facilement ces embryons dihaploïdes [6, 7].

### Traitement des gaméophytes par irradiation

Depuis longtemps on tente de perturber le processus normal de différenciation des spermatozoïdes dans le gaméophyte mâle, de manière à maintenir un pouvoir inducteur de l'embryogenèse en inhibant le pouvoir fécondant. Si l'on réussit à neutraliser l'un des deux spermatozoïdes, il arrive que seuls les noyaux polaires soient fécondés, ce qui engage alors le développement de l'albumen  $3x$  hybride ; par entraînement, l'oosphère peut alors se diviser sans fécondation et donner un embryon haploïde parthénogénétique. On pourra alors mener son développement à terme en le prélevant et en le cultivant *in vitro*.

L'irradiation par rayons  $\gamma$  est l'une des voies les plus expérimentées pour obtenir de telles interventions sur le gamétophyte mâle. Avec des doses atteignant 1 000 Gy sur le pollen de pétunia, Raquin [8] a obtenu d'excellents taux d'haploïdisation.

Des applications de cette technique aux cucurbitacées sont très fructueuses.

Il semblerait que l'irradiation du gamétophyte femelle puisse aussi aboutir à des productions haploïdes (Raquin, communication personnelle).

### **Androgenèse *in vitro***

Une voie très audacieuse a été ouverte en 1964 avec la réussite par Guha et Maheshwari [9, 10] de la culture *in vitro* de cellules sexuelles mâles de *Datura innoxia* et la régénération de plantes entières viables et haploïdes d'origine exclusivement paternelle. Ce processus a été étendu au tabac (*Nicotiana tabacum*) [11] puis dans la décennie qui suivit à plus de cent espèces, le Laboratoire d'amélioration des plantes de l'Université d'Orsay ayant joué un rôle important dans ce développement.

Pour la plupart des espèces, la méthodologie est analogue. Les boutons floraux sont disséqués stérilement et les anthères qui doivent produire le pollen sont prélevées à un stade bien précis du développement des microspores. Elles sont ensuite cultivées *in vitro* dans des conditions qui permettent une réorientation de leur devenir vers un retour à des potentialités embryogènes. Un certain nombre des cellules haploïdes ainsi traitées peut aboutir, soit directement, soit après des transferts dans une séquence adéquate de milieux, à une plante haploïde viable issue d'un gamète paternel [12].

Les taux de réussite de ces opérations sont très variables, mais souvent très bas si on les rapporte au nombre des microspores contenues dans une anthère mise en culture ; c'est pourquoi de très nombreux chercheurs se sont attachés à l'étude des paramètres qui influent sur le déroulement de chaque phase.

### **Effets du génotype**

Les réussites sont fortement liées à la famille végétale expérimentée : les solanacées, les crucifères et certaines graminées semblent posséder des potentialités supérieures à celles d'autres familles ; mais, à l'intérieur des solanacées, certains genres comme *Datura* ou *Nicotiana* donnent de bons résultats alors que *Lycopersicon* s'avère réfractaire. Chez les graminées, le riz répond facilement aux traitements androgénétiques, alors que le maïs reste difficile.

A un niveau plus fin, même à l'intérieur d'une espèce, la variation de réaction des divers génotypes est très notable : des facteurs génétiques sont indiscutablement liés aux processus de déroulement de l'androgenèse puisqu'on a pu mettre en évidence une héritabilité de l'aptitude.

Il faut bien se garder de conclure à l'existence de gènes spécifiquement impliqués, même si, sur un plan pratique, la sélection de lignées de blé présentant des taux

d'androgénèse élevés a été utilisée comme un objectif par plusieurs équipes chinoises, afin d'obtenir ensuite une facilité de fixation des génotypes agronomiquement intéressants [13].

Selon les génotypes, le taux d'androgénèse, mesuré par le rapport du nombre de plantes haploïdes régénérées au nombre d'anthères mises en culture, varie de 0% à plus de 200% (Laboratoire de l'Institut de génétique de Pékin, communication personnelle).

### ***Etat physiologique de la plante donneuse***

Les conditions de culture des plantes sur lesquelles on prélève les anthères paraissent jouer un rôle majeur, bien qu'aucune expérimentation précise n'ait permis de les définir avec précision. On sait que des plantes jeunes, végétativement vigoureuses et en croissance active donnent des résultats en moyenne meilleurs. On sait aussi que certaines périodes, correspondant à l'époque naturelle de floraison de l'espèce, fournissent des anthères plus réactives. Les traitements phytosanitaires ont en général un effet dépressif sur la potentialité des anthères.

Il existe donc des conditions environnementales de culture qui définissent, chez la plante donneuse, un état physiologique plus ou moins favorable. Sur la plante elle-même, la position des rameaux floraux intervient sur les taux de réussite (différence entre les zones basales et apicales dans un épi de blé [14], effet dépressif des fleurs situées sur des rejets chez le tabac...). Une étude plus systématique de ce conditionnement physiologique éclairerait certainement les recherches en vue d'intensifier la production d'haploïdes.

### ***Stade de prélèvement des anthères***

Considérons d'abord la maturation normale d'un grain de pollen. La méiose produit des tétrades haploïdes qui évoluent en une jeune microspore uninucléée. Rapidement de petites vacuoles apparaissent dans une zone cytoplasmique (que nous appellerons «sud» pour la clarté de la description) sous le noyau. La croissance de ces vacuoles repousse le noyau, qui était central, vers le pôle «nord». Ce noyau haploïde entreprend alors une mitose, dont l'axe fusorial est très précisément nord-sud. Compte tenu de cela, les produits de cette mitose, puisque le noyau n'est pas central, sont deux cellules de taille très inégale : une cellule reproductrice au pôle «nord», de faible volume à noyau très condensé et à cytoplasme restreint, ne contenant que quelques mitochondries. En revanche, au pôle «sud» se développe une large cellule végétative à noyau diffus et à cytoplasme abondant avec de nombreux plastes et des vacuoles. Ces deux cellules ainsi différenciées auront des devenir essentiellement différents.

Lors de la pollinisation, la cellule reproductrice se verra propulsée dans le tube pollinique où son noyau après une division produira les deux spermatozoïdes, dont le destin est la fécondation de l'oosphère donnant l'embryon pour l'un, et des deux

noyaux polaires aboutissant à l'albumen triploïde pour l'autre ; pour certaines espèces à pollen nucléé, cette mitose du noyau reproducteur a lieu dans le pollen avant maturation.

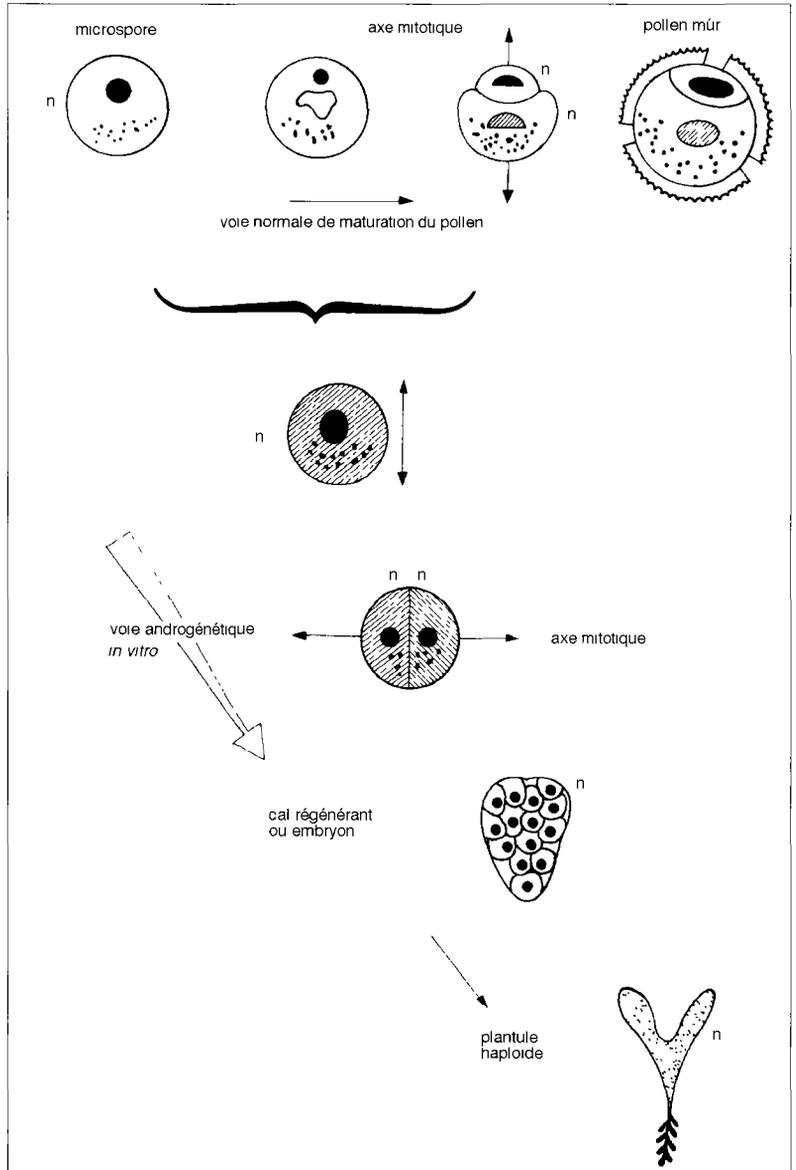
La cellule végétative a un rôle beaucoup moins marqué : elle permet la croissance du tube pollinique et fournit les matériaux du métabolisme lié à la pénétration dans les tissus stigmatiques et stylaires [15].

Lorsque cette différenciation est ainsi marquée entre cellule reproductrice et cellule végétative, le prélèvement des anthères pour culture *in vitro* et induction d'une androgénèse est généralement un échec. Il semble que ce soit le stade où la jeune microspore uninucléée va entrer en mitose qui constitue l'optimum pour la réussite de l'opération (Fig. 31). Cependant, l'évaluation n'est pas aussi simple ; en effet, il n'y a pas synchronisme parfait des stades de développement des microspores dans l'anthère : autrement dit, lorsque l'expérimentateur, grâce à des repères morphologiques et à des contrôles microscopiques, prélève des anthères dans lesquelles une majorité des microspores va entrer en mitose, une certaine proportion des microspores est encore au stade tétrade et une autre est déjà binucléée. Comme un très faible pourcentage des microspores va donner *in vitro* une formation androgénétique (de l'ordre de 1/10 000 dans les cas favorables !), on ne sait si ce sont les microspores représentant typiquement le stade prélevé ou si ce sont des cas atypiques, et lesquels, qui se réorientent en tissus androgénétiques.

Sur le *datura*, Norreel [16] observe que, durant la culture *in vitro*, un certain nombre des microspores possédaient lors de la mitose un axe fusorial «est-ouest» ; en conséquence, les deux cellules produites ont alors des volumes semblables avec une répartition identique de leurs éléments cytoplasmiques. On peut les appeler «cellules embryonnaires», puisqu'elles ne sont ni du type reproduction, ni du type végétatif. De telles cellules indifférenciées [17] sont à la base des développements de nodules sphériques dans l'anthère qui donnent ensuite des embryons cordiformes bien typés. Ce sont ces formations, ou des formes plus proches de calcs, qui placées sur un milieu de régénération aboutissent à de jeunes plantes haploïdes [18].

Dans toutes les expériences décrites, il apparaît que chaque stade de développement des microspores est très strictement délimité, et relativement fugace, si bien qu'une réorientation vers l'androgénèse est toujours délicate : un prélèvement trop précoce de l'anthère ne donne aucun développement ; un prélèvement trop tardif n'a aucun effet, la plupart des microspores évoluant alors vers la maturation du pollen caractérisée précocement par l'accumulation d'amyloplastés [19]. Il n'est donc pas étonnant que tout traitement ralentissant le processus de différenciation des microspores en grains de pollen favorise la réorientation vers l'androgénèse. Des traitements par le froid [20] ont fortement accru le taux d'androgénèse [14, 21]. Des traitements par des températures élevées ont eu quelquefois des effets encore plus marquants : incubation des anthères à des températures variant, selon les espèces, de 25 à 35°C [22, 23].

Une autre voie intéressante, mise au point par E. Picard *et al.* [24], a comme effet, elle aussi, d'étendre la sensibilité à une réorientation de la microspore. Dans ce but, la



**Figure 31.** — Maturation de la microspore et déviation du programme de différenciation lors de l'androgénèse *in vitro*.

plante donneuse est traitée, au moment de sa méiose, par une pulvérisation d'une solution de fenridazon potassium [25] classiquement employée comme gamétocide chez le blé.

La composition chimique des milieux de culture est très variable d'un auteur à l'autre et d'une espèce à l'autre, notamment en ce qui concerne les concentrations et la nature des sucres. En revanche, macro- et micro éléments sont de nature assez classique dans la plupart des milieux, ce qui semble indiquer que ce ne sont pas des facteurs clés de l'androgénèse.

De façon plus récente, la culture de microspores isolées amène, chez les céréales, à des taux de plantes régénérées chlorophylliennes cinq à dix fois supérieures à ceux obtenus par culture d'anthers [26].

### **Gynogenèse *in vitro***

La régénération de plantes haploïdes à partir des cellules sexuelles semble plus logique par la voie femelle, puisque l'oosphère est destinée naturellement à devenir embryon. Cependant, toutes les tentatives de régénération de plantes à partir de la culture *in vitro* d'un ovule non fécondé, avaient échoué jusqu'aux premiers résultats de San Nørum [27] qui, cultivant des ovaires d'orges non pollinisés, a obtenu les premières plantes haploïdes issues du développement du sac embryonnaire. En quelques années, la gynogenèse *in vitro* a été étendue à d'autres graminées (riz, blé, maïs), à des composées (gerbera, laitue), à des solanacées (tabac) ainsi qu'à d'autres espèces de grande importance économique (tournesol, betterave à sucre). Dans cette voie, qui constitue une heureuse alternative à l'androgenèse, les chercheurs du Laboratoire d'amélioration des plantes de l'Université d'Orsay ont joué un rôle prépondérant [28] de 1976 à 1986. Cependant, comme pour l'androgenèse, les taux de production de plantes haploïdes restent souvent faibles et très variables d'une espèce ou d'un génotype à l'autre (de zéro à quelques pour cent). Il est donc important de bien décrire les étapes du phénomène et d'en rechercher les paramètres essentiels.

### **La procédure dans la gynogenèse**

Le but est d'obtenir un développement parthénogénétique de l'oosphère ou une apogamie à partir des autres cellules haploïdes du sac embryonnaire. Il n'y a donc pas, comme pour l'androgenèse, nécessité d'un retour, par dédifférenciation ou réorientation, vers un stade embryonnaire. On prélève donc au contraire l'ovaire ou l'ovule, dans la fleur non fécondée, lorsque le sac embryonnaire est bien développé, c'est-à-dire le plus près possible du stade de réceptivité des gamètes mâles. Les ovaires ainsi prélevés ou les ovules excisés sont placés dans des milieux artificiels qui favorisent le développement des tissus haploïdes. Après un à six mois, l'oosphère [27], parfois les antipodes, et plus rarement les synergides, se divisent et donnent des embryons bien différenciés : un même ovule peut donc donner jusque six et même huit embryons d'origine exclusivement maternelle. Repiqués sur des milieux de régénération, ces embryons se développent en jeunes plantes.

### **Identification de paramètres importants**

Comme pour l'androgenèse, il ne semble pas que le facteur essentiel de la réussite de la gynogenèse réside dans une composition très particulière des milieux de culture. Certes, la pression osmotique des milieux conditionnée par les concentrations en sucres

et leur nature semble jouer un rôle tout à fait déterminant ; mais, pour le reste, les milieux sont de type tout à fait classique.

Généralement c'est une séquence de deux milieux qui est utilisée : le premier déclenche le développement du sac embryonnaire, le second, moins riche en cytokinines, permet une régénération de la masse embryonnaire en jeune plantule [29].

En revanche, le stade de prélèvement a une importance majeure ; si le sac embryonnaire n'a pas atteint le stade de la réceptivité, il est rare d'obtenir des régénérations de plantes. Mais à ce stade de développement, la difficulté provient de pollinisations éventuelles ; même si les fleurs ont été ensachées, l'autopollinisation n'est pas exclue. Pour opérer en toute sécurité, il faudrait donc castrer un très grand nombre de fleurs, ce qui est particulièrement laborieux.

## **Les haploïdes doublés**

Les plantes obtenues par les diverses techniques sont issues, en principe, d'une cellule haploïde : ce sont donc en fait des «plantes sans mère» (androgenèse) ou des «plantes sans père» (gynogenèse). Cependant, dans de nombreux cas, l'individu régénéré est diploïde ou même parfois polyplloïde (pétunia, asperge, par exemple) ; c'est que l'état haploïde est instable et que lors des mitoses haploïdes la télophase ne se déroule pas normalement.

On a donc une endomitose et un retour à l'état  $2n$ . De toute manière, la plante haploïde est stérile dans la majorité des cas où l'individu de départ était un véritable diploïde (lorsque l'individu de départ est tétraploïde, on appelle «dihaploïde» la structure  $2n = 2x$  obtenue après haploïdisation) [6].

## **Utilisation des haploïdes doublés**

Pour utiliser une plante régénérée par l'une quelconque des voies d'haploïdisation, il faut donc la rendre fertile et provoquer artificiellement un doublement des chromosomes si celui-ci n'a pas été spontané. Par des traitements qui inhibent l'alignement des microtubules du fuseau, on provoque des endomitoses qui rétablissent le niveau diploïde. La colchicine est l'un des agents les plus couramment employés pour obtenir cette autocopie du stock haploïde.

On récupère donc chez ces haploïdes doublés une homozygotie totale. De telles plantes fertiles, diploïdes et homozygotes reproduites par autofécondation donnent des descendants tous parfaitement semblables à la plante mère ; on a «fixé» le type sous la forme d'une lignée pure.

Pour un sélectionneur partant d'une hybridation, l'haploïdisation dès la  $F_1$  donne, sous forme d'individus régénérés tous différents les uns des autres, l'expression visuelle d'une ségrégation gamétique. Avec le doublement des chromosomes, on rend fertiles

et stables ces nouveaux génotypes parmi lesquels il suffit de choisir ceux qui sont les plus proches de l'idéotype (Chap. I, fig. 1 ; Chap. II) (Tableau I).

Des sélectionneurs et des chercheurs ont tenté d'évaluer ce système, en comparaison avec la méthode généalogique : quand faut-il haploïdiser ? Combien faut-il d'individus haploïdes pour représenter la variance d'une ségrégation  $F_2$  ? En fait le système haploïde n'a pas à être comparé à une autre méthode, car il donne dans des temps différents (beaucoup plus rapidement) des génotypes différents (les segments recombinés sont beaucoup plus longs, mais statistiquement ils contiennent 50% des gènes de chaque parent ayant engendré la  $F_1$ , comme pour la méthode généalogique).

**Tableau I.** — Calendrier des opérations dans la méthode généalogique et l'haplométhode.

Sélection généalogique		Haplométhode	
Printemps		Réalisation de l'hybridation	
Année 1		Semis de la $F_1$	
Production de la $F_2$ (à condition d'avoir produit la $F_1$ à contre-saison)		Culture des anthères Production des haploïdes Doublement à la colchicine	
Année 2	$F_2 \rightarrow F_3$ sélection	Multiplication des lignées obtenues	
Année 3	$F_3 \rightarrow F_4$ sélection	Choix entre lignées	
Année 4	$F_4 \rightarrow F_5$ sélection	Essais de rendement dépôt pour inscription au catalogue	
Jusqu'en année 10			
↓			
suite de la fixation et des sélections			

Si l'on fait un rapide inventaire des variétés aujourd'hui diffusées après haploïdisation, c'est la Chine qui vient largement en tête avec de nombreux riz et de nombreux blés ; mais comme nous l'avons vu, la structure de la recherche chinoise rend difficile l'évaluation du nombre des espèces et des variétés diffusées ; chaque groupement peut avoir ses obtentions propres et les utiliser.

La France en 1985 a inscrit le premier blé «Florin» issu d'androgenèse à un catalogue officiel de variétés. Le Canada en utilisant l'hybridation par *bulbosum* a diffusé plusieurs variétés d'orge ; cette technique a permis à l'Angleterre et à la Nouvelle-Zélande d'inscrire aussi une variété. La France a par cette voie de nombreuses obtentions en cours d'expérimentation, dont sortiront sans nul doute des cultivars intéressants.

Il est plus difficile d'évaluer le rôle des haploïdes doublés en tant que géniteurs d'une variété inscrite. Cependant en France, chez l'asperge, le blé, le colza, l'aubergine et le piment (ou poivron), l'androgenèse est largement utilisée par les sélectionneurs.

De même, chez la betterave à sucre et le tournesol, la gynogenèse, bien que très récemment mise au point en France, a été rapidement expérimentée en Chine et chez plusieurs grandes firmes européennes.

En somme, pour fixer des lignées chez diverses espèces, le système de l'haploïdisation sera donc le plus efficace ; pour d'autres, il faudra encore accroître les taux d'haploïdisation.

La comparaison avec d'autres méthodes, autrement que sur l'efficacité finale, se justifie d'autant moins que le passage par la culture *in vitro* provoque quelquefois l'apparition de variants (Chap. IV).

### **Variations liées aux techniques d'haploïdisation**

Sur une variété de riz, lignée pure, stable, n'ayant pas montré de ségrégations au cours de nombreuses générations d'autofécondation, on a utilisé l'androgenèse pour obtenir des plantes haploïdes [30-32].

Selon les règles les plus strictes de la génétique, les plantes haploïdes obtenues devaient après doublement redonner la variété de départ. Cependant, non seulement on a régénéré une certaine proportion de plantes identiques génétiquement à la lignée initiale, mais on a découvert en forte fréquence des individus très distincts, par leur taille, leur couleur, la grosseur des grains, le tallage et de nombreux autres facteurs du rendement.

Ces variations ont pu être analysées : les unes proviennent de mutations, les autres de remaniements chromosomiques, d'autres sont des variants fixés qui ne répondent pas, dans leur comportement héréditaire, aux ségrégations mendéliennes. Ces variants sont supposés d'origine épigénétique (Chap. IV).

Une autre expérience à partir d'un cultivar (lignée pure d'orge) a permis la comparaison de trois voies d'haploïdisation différentes. En effet sur cette variété, on a pu obtenir [28] des lignées haploïdes doublées issues du cultivar d'origine, les unes par androgenèse, d'autres par gynogenèse, d'autres enfin par hybridation interspécifique avec *Hordeum bulbosum*. Ces trois familles de lignées ont été comparées, pour des critères biométriques, avec les descendants d'autofécondation du cultivar fixé d'origine. On a trouvé que les lignées androgénétiques produisent des individus très différents de la lignée initiale ; les descendances gynogénétiques présentent, relativement à ce choix de marqueurs, quelques variants, mais restent très proches du témoin. En revanche, les lignées issues d'hybridation interspécifique sont identiques à la variété de départ.

Cependant, le suivi de caractéristiques biochimiques donne une autre vue du phénomène puisqu'alors il n'est plus possible d'associer la forte variabilité à l'androgenèse.

Chaque famille présente en fait un comportement qui lui est propre. Ainsi, selon le marqueur biochimique étudié, la variabilité vis-à-vis du témoin peut être davantage marquée après gynogenèse qu'androgenèse et peut amener à l'expression de comportements très atypiques [33, 34].

## Références

1. Vincent P. Sciences naturelles. Classe terminale D. Paris : Vuibert, 1974.
2. Dumas de Vaulx R, *et al.* Essai d'induction de la parthénogenèse haploïde par action du protoxyde d'azote sur les fleurs de piment. *Ann Amélior Plantes* 1974 ; 24 : 283-306.
3. Dublin P, *et al.* L'haploïdie spontanée liée à la polyembryonie chez *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* 1976 ; 20 (2) : 83-90.
4. Kermicle JL. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science* 1969 ; 166 : 1422-4.
5. Kasha KJ, *et al.* High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 1970 ; 225 : 874-6.
6. Hougas *et al.* Effect of seed parent and pollinator on frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. *Crop Sci* 1964 ; 4 : 593-5.
7. Hermsen *et al.* Selection from *Solanum tuberosum* group *phureja* of genotypes combining high frequency haploid induction with homozygosity for embryo-spot. *Euphytica* 1973 ; 22 : 244-59.
8. Raquin C. Induction of haploid plants by *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. *Z Pflanzenzücht* 1985 ; 94 : 166-9.
9. Guha S, *et al.* *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 1964 ; 204 : 497.
10. Guha S, *et al.* Cell division and differentiation of embryos in the pollen grain of *Datura in vitro*. *Nature* 1966 ; 212 : 97-8.
11. Bourgin J, *et al.* Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann Physiol Veg* 1967 ; 9 : 377-82.
12. De Buyser J, *et al.* Androgenèse chez le blé tendre en cours de sélection. I. L'obtention des plantes *in vitro*. *Z Pflanzenzüchtg* 1979 ; 83 : 49-56.
13. Hu H, *et al.* *Haploids of higher plants in vitro*. Berlin : Springer Verlag, 1986.

14. Picard E, *et al.* Nouveaux résultats concernant la culture d'anthères *in vitro* de blé tendre. Effet d'un choc thermique et de la position de l'anthère sur l'épi. *CR Acad Sci Paris* 1975 ; 281D : 127-30.
15. Vazart B. Ultrastructure des microspores de tabac dans les anthères embryogènes. *Caryologia* 1973 ; 25 suppl. : 303-14.
16. Norreel B. Etude cytologique de l'androgénèse chez le *Datura innoxia* et le *Nicotiana tabacum*. *Bull Soc Bot Fr* 1970 ; 117 : 461-78.
17. Pelletier G. Les conditions et les premiers stades de l'androgénèse *in vitro* chez *Nicotiana tabacum*. *Bull Soc Bot Fr* 1973 ; Mémoire : 261-7.
18. Demarly Y. Anther and pollen culture for production of haploids. Their utilization in plant breeding. In : *Report Meeting Eucarpia*. Zurich : B. Nuesch, 1975 : 142-54.
19. Sangwan RS, *et al.* Ultrastructural cytology of plastids in pollen grains of certain androgenic and non androgenic plants. *Protoplasma* 1987 ; 138 : 11-22.
20. Nitsch C, Norreel B. Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthère ou isolé de l'anthère. *CR Acad Sci* 1973 ; Sér. D, 276 : 303-6.
21. Sibi M, *et al.* Obtention de plantes haploïdes par androgénèse *in vitro* chez le piment (*Capsicum annum* L.). *Ann Amélior Plantes* 1979 ; 29 : 583-606.
22. Keller WA, Armstrong KG. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther culture by elevated temperature treatments. *Theor Appl Genet* 1979 ; 55 : 65-7.
23. Sibi M, *et al.* Androgénèse *in vitro* chez le piment *Capsicum annum* L., impact des prétraitements sur le taux de plantes régénérées. In : *CR Réunion Eucarpia : Application de la culture in vitro à l'amélioration des plantes potagères*. Versailles, 1980 : 143-9.
24. Picard E, *et al.* Significant improvement of androgenetic haploid and doubled haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridization agent. *TAG* 1987 ; 74 : 289-97.
25. Mac Rae HH. Advances in chemical hybridization. *Plant Breeding Rev* 1985 ; 3 : 169-92.
26. Picard E, *et al.* L'haploïdisation, un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales. In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, 1994 : 347-61.
27. San LH. Haploïdes d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaires non fécondés. *Ann Amélior Plantes* 1976 ; 26 : 751-4.
28. San LH, *et al.* Variabilité des haploïdes doublés par androgénèse et gynogénèse *in vitro*. *Bull Soc Bot Fr* 1985 ; 3/4 : 23-33.
29. Demarly Y. Les plantes haploïdes. *Courrier du CNRS* 1983 ; 50 : 35-40.
30. Truong-André I. Variabilité des plantes issues d'androgénèse *in vitro* et tentative d'application directe en sélection de cette variabilité et de la mutagenèse par voie haploïde chez le riz (*Oryza sativa* L.) Thèse 3<sup>e</sup> cycle. Université Paris-Sud, 1977.
31. Truong-André I. Les méthodes haploïdes. *Chambres d'agriculture* 1987 ; 749 (suppl.) : 10-4.
32. Kouadio Y. Analyse de la variabilité observée dans la descendance d'une lignée pure de riz (*Oryza sativa* L. var. Cigalon) traitée par androgénèse *in vitro*. Thèse Dr Ing. Université. Paris-Sud, 1977.
33. Sibi M, Kandil M. Marqueurs biochimiques de la vitrovariation chez les haploïdes d'orge (*H. vulgare*). In : *Le progrès passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, 1993 : 283-99.
34. Sibi M, Fakiri M. Vitrovariation chez des orges (*Hordeum vulgare*) issues d'haplodiploïdisation. Analyse des  $\beta$ -amylases chez les croisements diallèles. In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Paris : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, 1994 : 337-46.

## Hybridation somatique

### Signification de cette technologie

La reproduction sexuée est l'un des mécanismes les plus stricts que les processus évolutifs ont mis en place pour empêcher les flux génétiques entre les espèces. Bien plus, à l'intérieur de l'espèce elle-même, des frontières très précises permettent tel ou tel type d'accouplement autorisant ou non l'allogamie ou l'autogamie et définissant par là même la structure génétique plus ou moins hétérozygote du génotype. La méiose en elle-même impliquant l'appariement des chromosomes homologues élimine tout remaniement profond des chromosomes et contrôle ainsi l'homogénéité de l'espèce.

Les biologistes ont constaté, au cours des manipulations cellulaires, que l'on pouvait obtenir des agrégations entre des cellules débarrassées de leur paroi pecto-cellulosique et qu'il en résultait une fusion des éléments nucléaires et cytoplasmiques ; le principe même de l'hybridation somatique était né [1]. Melchers montra ensuite [2] que cette fusion était possible entre des protoplastes différents (tomate et pomme de terre), indiquant ainsi que l'on pouvait transgresser les frontières de l'hybridation sexuée.

### Étapes importantes de l'hybridation somatique

#### Les protoplastes

Dans la cellule végétale, la membrane plasmatique ou plasmalemmme est doublée par une paroi squelettique constituée de fibres de cellulose et de pectine. La cellule exerce une pression sur ces fibres à la manière d'une chambre à air sur un pneu. Ainsi les plantes herbacées ont une certaine rigidité due à leur tonicité. Bien que l'«état protoplaste» ait été connu depuis le début du siècle, ce n'est que vers les années 1960 que Cocking [3] montrait que, par des enzymes du type cellulase et pectinase, on pouvait

attaquer les fibres pecto-cellulosiques et dissocier les tissus végétaux, mettant ainsi à nu la membrane plasmique de chaque cellule. Divers explants sont utilisables : feuilles, cotylédons, hypocotyles. Il est également possible de partir de matériel déjà dédifférencié : cals ou suspensions cellulaires.

L'accès de l'enzyme aux tissus est facilité, selon le cas, par dilacération des explants ou infiltration sous vide. Pour le mésophylle foliaire, la technique classique consiste à ôter l'épiderme inférieur. Malgré la diversité des origines possibles, le mésophylle foliaire reste la source de protoplastes la plus utilisée. En effet, cet explant est généralement disponible en grande quantité, son prélèvement ne lèse pas trop la plante et le matériel produit est abondant et homogène.

Les explants préparés sont alors incubés dans la solution enzymatique, dans de très strictes conditions de durée, de température, d'éclairement et de pression osmotique.

Chaque unité cellulaire dénudée apparaît alors sous une forme sphérique appelée protoplaste. Chez la luzerne, on obtient ainsi environ  $12 \cdot 10^6$  protoplastes par gramme de feuille traité [4]. Les protoplastes, récupérés par centrifugations et lavages, et mis dans de bonnes conditions de survie, reconstituent très vite leur paroi pecto-cellulosique (en quelques heures on voit apparaître les premières fibres). Ensuite, si les conditions de milieu sont toujours favorables, les protoplastes entrent en mitose et donnent ainsi des microcolonies qui deviennent des microcals, puis des cals. Les premières divisions apparaissent entre le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour de culture. Outre la nature du milieu, la densité de mise en culture joue un rôle important pour l'obtention d'un taux de divisions correct (30 à 80 000 protoplastes par ml, et généralement plus pour les monocotylédones). Les petites colonies sont visibles, à l'œil nu, après une quarantaine de jours.

La totipotence peut être maintenue dans ces cals issus de protoplastes et s'exprime dans un milieu de régénération approprié où le cal donne des formations méristématiques qui se développent en jeunes plantes, ou, dans des cas plus favorables, en embryons somatiques qui donneront des plantules.

Chez certaines espèces, dont le nombre s'accroît sans cesse, on sait donc boucler le cycle plante → protoplastes → plantes. Les pourcentages de régénération de plantes sont généralement faibles, comparés au très grand nombre de protoplastes obtenus dans une opération : ils sont le produit de l'efficacité d'étalement (probabilité pour un protoplaste de donner un cal) par le nombre moyen de plantes régénérées par cal (fréquence de régénération). Même dans de bonnes conditions opératoires et avec un matériel végétal favorable, le cycle plante → protoplastes → jeunes plantes est relativement long (quelques mois).

## **La fusion**

On appelle «fusion» l'agrégation de deux, ou plusieurs, protoplastes.

L'intérêt du passage de la cellule isolée par le stade protoplaste réside dans l'accessibilité de cette dernière structure. Généralement, les protoplastes se repoussent à

cause de leurs charges électrostatiques négatives. Cette charge est due en majorité aux groupes phosphates et pour une part plus faible à des protéines.

L'accrolement des protoplastes, étape préalable indispensable pour la fusion, doit donc être provoquée par l'expérimentateur. Des agents chimiques, comme le calcium ou des substances «surface-actives» non ionisées, comme le polyéthylène glycol (PEG), sont dans ce but assez efficace. Une fois les protoplastes accolés, la dilution de ces substances induit des perturbations membranaires provoquant alors la fusion. Les taux de fusion ainsi obtenus varient entre 0% et 5% environ.

Mais, depuis ces dernières années, on a pu faciliter l'agrégation des protoplastes en pratiquant l'électrofusion. Cette technique consiste à placer sur la solution de protoplastes dans la boîte de Pétri un système multi-électrodes (14 électrodes écartées de 2 mm) relié à un générateur de courant sinusoïdal de haute fréquence couplé avec un second générateur d'impulsion de courant carré. Lorsqu'on applique le champ électrique (125 V/cm, 1MHz) induit par le courant sinusoïdal, les protoplastes se comportent comme des dipôles et s'alignent en suivant les lignes de champs, assurant ainsi leur contact intime.

La fusion a alors lieu dans un deuxième temps où l'on envoie des impulsions très courtes (20 à 30  $\mu$ s) d'un courant carré de 1,3 KV/cm. La fusion peut être observée sous microscope inversé, donnant une estimation des taux de fusion réalisés.

La suspension des protoplastes fusionnés est alors reprise par dilution progressive dans un milieu de culture, comme pour les fusions provoquées par voie chimique. Cette technique permet d'obtenir des taux de fusion de l'ordre de 80% [5].

La fusion se produit d'une manière aléatoire, due aux relations de voisinage des protoplastes et à la neutralisation de leurs charges ; leur volume intervient donc vraisemblablement. Si le mélange contient en quantité égale deux espèces différentes A et B et si l'on admet, de manière théorique, que les divers types de fusion sont équiprobables, on doit observer : un quart d'autofusions AA, une moitié d'hétérofusions AB et un quart d'autofusions BB (dans cette estimation nous ne tenons pas compte des fusions multiples, qui en général sont assez rares, ni des fusions partielles).

Lors de l'accrolement de deux protoplastes, l'ensemble du contenu cellulaire est mis en commun : on peut donc aboutir à l'addition totale des trois compartiments héréditaires : nucléaire, mitochondrial et chloroplastique. Cette addition totale accroît le niveau de ploïdie de l'unité résultante.

Mais deux phénomènes viennent perturber le déroulement sans accident de l'agrégation :

— d'une part, les échanges ne sont pas toujours totaux : on peut aboutir à une addition incomplète et à un microplaste résiduel ;

— dès la fusion réalisée, des compétitions et des éliminations se mettent en place. Par exemple, à chaque mitose subséquente il se peut que certaines paires chromosomiques soient rejetées et ne participent plus aux noyaux télophasiques. Cette éviction chromosomique peut aller jusqu'à l'élimination totale de l'un des deux noyaux parentaux.

Pour le compartiment mitochondrial, les phénomènes sont encore plus complexes, car ils comportent des compétitions entre les vitesses de réplication et des auto- et hétéro-recombinaisons en des sites privilégiés. On peut donc trouver des populations contenant tous les dosages intermédiaires entre l'addition totale et l'absence de l'un des types.

Chez les chloroplastes, les règles paraissent plus strictes puisque généralement l'un des types parentaux élimine totalement l'autre : il ne subsiste donc qu'une seule population d'ADN chloroplastique [6].

Lorsque les noyaux se sont additionnés partiellement ou en totalité, on parle d'hybride somatique ; s'il ne subsiste que l'un des noyaux parentaux avec un cytoplasme composite et/ou recombiné, on parle de «cybrides» (cytoplasme hybride). Bien qu'il apparaisse des formes majoritaires, on voit bien qu'une même opération de fusion produit tout un spectre de structures génétiques entre lesquelles il est parfois difficile de se retrouver (Fig. 32).

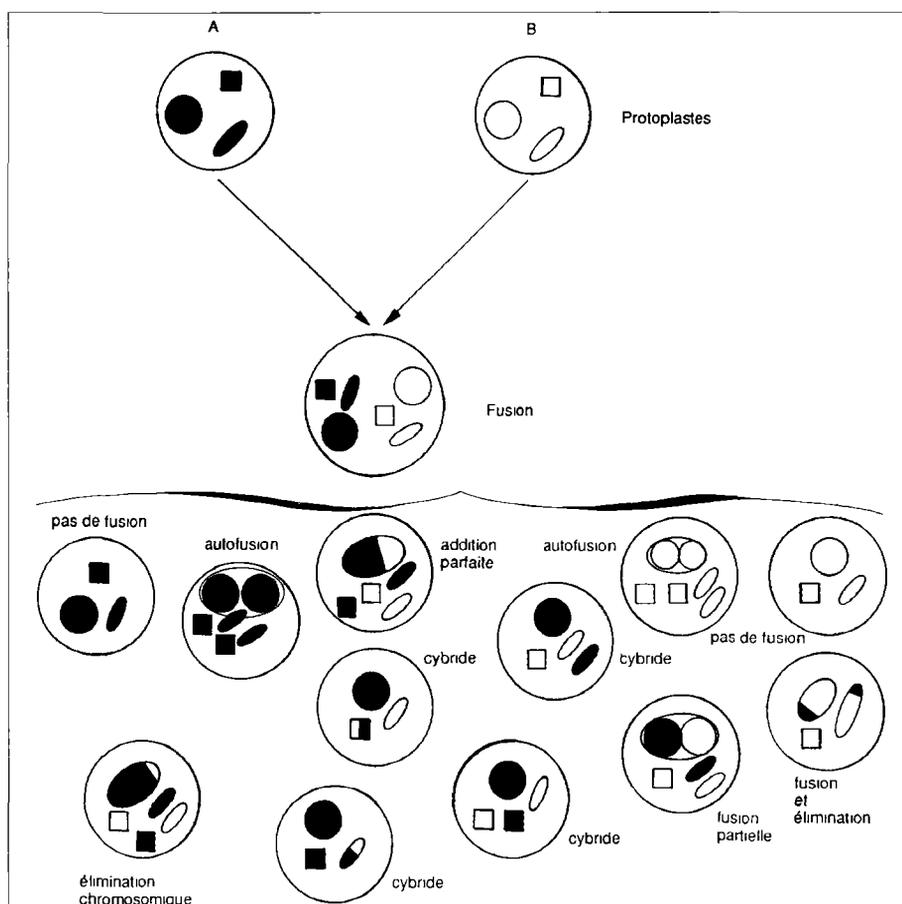


Figure 32. — Grande diversité des produits d'une hybridation somatique.

Une partie de cette diversité obtenue est apte, si les conditions sont satisfaisantes, à donner des colonies qui régénèrent alors une gamme de plantes.

Jusqu'au stade fusion compris, les types parentaux A et B peuvent être très éloignés : le protoplaste, ayant perdu tout signal relationnel avec le tissu dont il est issu et tout repérage inscrit dans la paroi, se trouve dans l'incapacité de reconnaître le partenaire qui lui est confronté dans l'opération ; on peut donc fusionner une cellule animale et une cellule végétale, ou un protoplaste de monocotylédone avec une dicotylédone, etc. On peut aussi, comme nous le verrons, introduire dans un protoplaste, des microplastiques consistant en quelques organites cytoplasmiques, ou des liposomes, globules lipidiques, enrobant une protéine quelconque. On peut enfin par électroporation faire pénétrer des fragments d'ADN et des plasmides.

Le protoplaste est donc un excellent récepteur, son seul défaut réside dans la faible probabilité de régénération.

## Identification et sélection des hétérofusions

Lorsque l'objectif est d'obtenir des hybridations somatiques entre des espèces A et B, il est important de disposer d'un crible permettant d'identifier, le plus rapidement possible, les hétérofusions. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, et la stratégie de sélection dépend des espèces, voire des génotypes en jeu. De plus, bien que théoriquement la fusion de deux protoplastes aboutisse à une cellule où se trouvent additionnés les éléments nucléaires et cytoplasmiques, cette situation idéale est assez rare. Ainsi, lors d'une expérience de fusion entre deux crucifères : *Arabidopsis thaliana* à  $2n = 8x = 40$  chromosomes et *Brassica campestris* à  $2n = 2x = 20$  chromosomes, on a obtenu des hybrides somatiques complets qui possédaient les deux stocks chromosomiques parentaux et des hybrides partiels où une partie des génomes avait été éliminée, le noyau de l'hybride restant malgré tout stable [7, 8].

Ces éliminations peuvent donner lieu à des modifications structurales des chromosomes avec toutes les formes transitoires possibles et à des états de stabilisation composites (fragment de génome étranger dans le génome conservé par exemple).

En revanche, les populations d'ADN cytoplasmiques se présentent, dans la plupart des cas, en mélange. Il est donc nécessaire de pouvoir identifier le plus vite possible les structures cellulaires résultantes. Cette sélection, par exemple, peut s'appuyer sur la complémentation de résistances à des molécules chimiques : antibiotiques, analogues d'acides aminés, herbicides [9, 10]. En effet, schématiquement la souche A étant résistante à un produit *a* et la souche B à un produit *b*, dans un milieu contenant les substances *a* et *b* ne doivent pousser que les hybrides AB ou, tout au moins, des formes recombinant les deux résistances. Ce système peut naturellement être adapté au criblage d'associations noyau-cytoplasme, en choisissant pour l'une des souches une caractéristique codée par les chloroplastes ou par les mitochondries.

Dans la pratique, cette sélection automatique est aisée pour des espèces modèles, comme le tabac, où de nombreuses souches caractérisées sont disponibles. En revanche, l'extension de ces techniques à des fins agronomiques s'avère souvent délicate, car les génotypes intéressants ne sont pas obligatoirement «marqués» et l'introduction de gènes sélectifs peut être laborieuse.

On peut également opérer un tri visuel sous microscope en utilisant pour l'un des partenaires un tissu albinos et pour l'autre un tissu chlorophyllien [11-13] ; une variante peut consister en des colorations vitales ou des marquages fluorescents accompagnés par un passage dans un trieur de cellules [14]. Lorsqu'on veut récupérer uniquement des cybrides, il est possible de détruire les noyaux ou les éléments cytoplasmiques de l'un des parents par des inhibiteurs métaboliques spécifiques ou par irradiations fortement dosées.

Quoi qu'il en soit, toutes ces techniques sont laborieuses et constituent l'une des limitations majeures à l'application en routine agronomique de l'hybridation somatique. La culture en microchambre, ou en goutte, de couples ne contenant qu'un seul protoplaste (ou un très faible nombre) de chaque parent permettrait de conditionner la fusion et les phases subséquentes de manière plus précise, mais, dans ce cas encore, les étapes techniques sont lourdes [15, 16].

Enfin, lorsque toutes ces méthodes s'avèrent inapplicables, on est obligé de régénérer un grand nombre de plantes et d'effectuer le tri sur les plantes régénérées à l'aide de caractéristiques morphologiques ou biochimiques : cette technique a été utilisée par exemple pour l'identification d'hybrides *Lycopersicon peruvianum* + *Petunia hybrida* [17] et *Medicago sativa* + *Medicago falcata* [18]. Ce procédé, bien que long et fastidieux, a l'avantage d'éviter l'élimination de plantes partiellement modifiées ou variantes par un crible trop précoce ou trop sélectif.

Cependant, petit à petit, la technologie des hybridations par fusion de protoplastes évolue et depuis dix ans des progrès constants apparaissent.

## Présentation et évaluation d'une série de résultats

Les hybrides somatiques signalés dans la littérature, qui ont abouti à des plantes viables, sont tous limités à la rencontre de parents appartenant à des genres différents mais proches, ou, plus souvent, à des espèces différentes. Autrement dit, l'hybride sensationnel combinant une monocotylédone et une dicotylédone, ou mieux une angiosperme et une levure ou une cellule animale avec une cellule végétale, est toujours resté au stade de souches cellulaires mais n'a jamais donné de régénérants viables.

Les familles botaniques qui comportent les réussites les plus marquantes sont les solanacées, les crucifères, les ombellifères et dans une moindre mesure les légumineuses. Le Tableau I donne un aperçu des types de fusion qui ont donné des produits

hybrides sous forme de plantes viables. On peut constater que, bien que plus rares, les cas d'obtention d'hybrides entre espèces sexuellement incompatibles existent et indiquent donc une potentialité réelle de la fusion de protoplastes.

## Position actuelle

Au début des recherches sur l'hybridation somatique, les objectifs furent très ambitieux : à la suite de la réussite de Melchers, on pensait pouvoir synthétiser des plantes entièrement nouvelles en fusionnant des protoplastes de parents très éloignés.

Petit à petit, l'intérêt de l'hybridation somatique a évolué lorsqu'on a constaté l'importance des éliminations chromosomiques qui accompagnaient les fusions trop audacieuses et surtout l'impossibilité dans tous ces cas d'obtenir une régénération.

On peut donc dire maintenant que les fusions somatiques permettent :

- des fusions entre espèces d'une même famille produisant des remaniements, des échanges et des insertions chromosomiques intéressantes ;

- des fusions, jumelées à l'irradiation d'un des partenaires, qui augmentent les hybridations incomplètes ;

- des constructions cytoplasmiques nouvelles et de nouveaux rapports noyau-réseau épigénétique, ce qui n'est pas exploitable avec les hybridations conventionnelles ;

- des montées de niveau de ploïdie qui ne s'accompagnent pas d'un accroissement de la consanguinité. En effet, l'autodoublement d'un stock chromosomique par les agents mitoclasiques comme la colchicine entraîne une augmentation de l'homozygotie et des dépressions due à la consanguinité résultante. La fusion entre protoplastes n'ayant pas cet inconvénient ouvre aux formes polyploïdes un avenir nouveau.

Nous allons illustrer ces aspects très positifs par quelques exemples de travaux marquants.

## Analyse d'exemples

En 1977, Belliard *et al.* [6] utilisèrent deux lignées de *Nicotiana tabacum*, l'une normale, l'autre ayant les gènes nucléaires de *tabacum* et le cytoplasme de *debneyi*. Cette dernière est mâle stérile à cause de l'alloplasmie : ses anthères sont féminisées et la morphologie florale est modifiée. Après fusion, 1 500 plantes régénérées ont été observées : 57 furent considérées comme hybrides ; en revanche, 250 plantes furent classées comme cybrides ayant les caractéristiques nucléaires de l'un ou de l'autre parent et des morphologies florales intermédiaires.

Des croisements ont montré que le type floral était à hérédité maternelle et dans 90% des cas stable au cours des générations sexuées. L'ADN mitochondrial étudié en électrophorogramme après découpage par des enzymes de restriction démontra que chaque cybride possède son propre diagramme indiquant sa composition. Les auteurs montrèrent ainsi que ces plantes issues de fusion contenaient de nouveaux types de

**Tableau I.** — Récapitulatif des principales fusions à l'origine de produits hybrides viables.

Hybridations somatiques réussies (janvier 1989)		
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>N. langsdorffii</i>	1972	Carlson <i>et al.</i> [19]
	1976	Smith <i>et al.</i>
	1977	Chen <i>et al.</i>
	1978	Chupeau <i>et al.</i>
	1983	Uchimiya <i>et al.</i>
	1987	Morikawa <i>et al.</i> [20]
<i>N. knightiana</i> + <i>N. sylvestris</i>	1977	Maliga <i>et al.</i> [21]
	1978	Menczel <i>et al.</i> [22]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. sylvestris</i>	1977	Melchers [23]
	1978	Zelcer <i>et al.</i>
	1979	Evans
	1980	Aviv et Galun
	1980	Medgyesy <i>et al.</i>
	1983	Hein <i>et al.</i> [24]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. knightiana</i>	1978	Maliga <i>et al.</i> [25]
	1981	Menczel <i>et al.</i>
<i>N. tabacum</i> + <i>N. rustica</i>	1978	Nagao [26]
	1980	Iwai <i>et al.</i> [27]
	1981	Douglas <i>et al.</i>
	1981	Peitian <i>et al.</i>
	1988	Pental <i>et al.</i> (gaméto-somatique)
<i>N. tabacum</i> + <i>N. alata</i>	1979	Nagao [26-28]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. debneyi</i>	1979	Gleba <i>et al.</i> [12]
	1980	Kosakovs'ka [29]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. glutinosa</i>	1979	Nagao [28]
	1982	Uchimiya [30]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. glauca</i>	1980	Evans <i>et al.</i> [31]
	1982	Uchimiya [30]
	1986	Pirrie et Power [37]
		(gaméto-somatique)
<i>N. tabacum</i> + <i>N. mesophila</i>	1981	Evans <i>et al.</i> [32]
	1982	Evans <i>et al.</i> [33]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. stocktonii</i>	1981	Evans <i>et al.</i> [32]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. repanda</i>	1982	Nagao [34]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. otophora</i>	1983	Evans <i>et al.</i> [35]
<i>N. tabacum</i> + <i>N. plumbaginifolia</i>	1985	Gleba <i>et al.</i> [12]
	1987	Bates <i>et al.</i> [36]
		Power <i>et al.</i> [38]
<i>Petunia hybrida</i> + <i>P. parodii</i>	1976	Power <i>et al.</i> [38]
	1977	Cocking <i>et al.</i> [13]
	1983	Izhar <i>et al.</i>
<i>P. hybrida</i> + <i>P. axillaris</i>	1979	Izhar et Power [39]
<i>P. parodii</i> + <i>P. inflata</i>	1979	Power <i>et al.</i> [40]
<i>P. parodii</i> + <i>P. parviflora</i>	1980	Power <i>et al.</i> [41]
<i>Daucus carota</i> + <i>D. capillifolius</i>	1977	Dudits <i>et al.</i> [42]
	1981	Kameya <i>et al.</i> [43]
	1981	Toshiaki <i>et al.</i> [44]
	1987	Ichikawa <i>et al.</i> [45]

<i>Datura innoxia</i> + <i>D. discolor</i>	1978	Schieder [46]
<i>D. innoxia</i> + <i>D. stramonium</i>	1978	Schieder [46]
<i>D. innoxia</i> + <i>D. candida</i>	1980	Schieder [47]
<i>D. innoxia</i> + <i>D. sanguinea</i>	1980	Schieder [46]
<i>Brassica oleracea</i> + <i>B. campestris</i>	1982	Schenck et Robbelen [48]
	1987	Sundberg <i>et al.</i> [49]
	1987	Terada <i>et al.</i> [50]
<i>B. napus</i> + <i>B. hirta</i>	1988	Primard <i>et al.</i> [51]
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>S. chacoense</i>	1979	Butenkes et Kuchko [52]
<i>S. nigrum</i> + <i>S. tuberosum</i>	1982	Binding <i>et al.</i> [53]
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. brevidens</i>	1988	Fish <i>et al.</i> [54]
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. phureja</i>	1986	Puite <i>et al.</i> [55]
<i>S. melongena</i> + <i>S. sisymbriifolium</i>	1986	Gleddie <i>et al.</i> [56]
<i>S. tuberosum phureja</i> + <i>S. pinnatisectum</i>	1987	Sidorov <i>et al.</i> [57]
<i>S. melongena</i> + <i>S. torvum</i>	1988	Guri et Sink [58]
<i>S. melongena</i> + <i>S. khasianum</i>	1988	Sihachakr <i>et al.</i> [5]
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>L. pennellii</i>	1987	O'Connell et Hanson [59]
<i>Lotus corniculatus</i> + <i>L. conimbricensis</i>	1987	Wright <i>et al.</i> [60]
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>B. campestris</i>	1979	Gleba et Hoffmann [7]
	1981	Hoffmann et Adachi [8]
<i>Moricandia arvensis</i> + <i>B. oleracea</i>	1987	Toriyama <i>et al.</i> [61]
<i>Sinapis turgida</i> + <i>B. oleracea</i>	1987	Toriyama <i>et al.</i> [61]
<i>S. turgida</i> + <i>B. nigra</i>	1987	Toriyama <i>et al.</i> [62]
<i>B. napus</i> + <i>Eruca sativa</i>	1988	Fahleson <i>et al.</i> [63]
<i>N. tabacum</i> + <i>Petunia hybrida</i>	1976	Binding [64]
	1982	Xianghui <i>et al.</i> [65]
<i>N. tabacum</i> + <i>Salpiglossis sinuata</i>	1982	Nagao [34]
<i>Duboisia hopwoodii</i> + <i>N. tabacum</i>	1988	Endo <i>et al.</i> [66]
<i>N. plumbaginifolia</i> + <i>S. tuberosum</i>	1987	de Vries <i>et al.</i> [67]
<i>N. plumbaginifolia</i> + <i>Atropa belladonna</i>	1988	Gleba <i>et al.</i> [68]
<i>Datura innoxia</i> + <i>Atropa belladonna</i>	1979	Krumbiegel et Schieder [69]
	1981	Krumbiegel et Schieder [70]
<i>Daucus carota</i> + <i>Aegopodium podagraria</i>	1979	Dudits <i>et al.</i> [71]
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>S. tuberosum</i>	1978	Melchers <i>et al.</i> [2]
<i>L. esculentum</i> + <i>Solanum rickii</i>	1986	O'Connell et Hanson [72]
<i>L. esculentum</i> + <i>Solanum acaule</i>	1988	Schweizer <i>et al.</i> [73]
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Severinia disticha</i>	1988	Grosser <i>et al.</i> [74]
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Poncirus trifoliata</i>	1988	Gross <i>et al.</i> [75]

mitochondries obtenus par recombinaison entre les types parentaux. Ce type d'approche a été ensuite utilisé dans le cas de plantes déficientes en chlorophylle.

Bannerot *et al.* [76] ont introduit par hybridation sexuée intergénétique le cytoplasme d'un radis japonais porteur de la stérilité mâle dans le genre *Brassica*. La stérilité mâle s'y exprime parfaitement et permet d'envisager l'utilisation pratique de la vigueur hybride dans divers cultivars de *Brassica* (variétés de chou, de colza...). Malheureusement ce cytoplasme-radis entraîne chez les *Brassica* une déficience chlorophyllienne

très marquée aux températures faibles, ce qui est un défaut rédhibitoire. De plus les fleurs des *Brassica* sur cytoplasme-radis n'ont pas, ou très peu, de nectar et n'attirent pas les pollinisateurs.

L'hypothèse d'une mauvaise interaction entre le compartiment nucléaire et le compartiment chloroplastique ayant été avancée, une expérience en vue d'obtenir des cybrides ne gardant du radis que le compartiment mitochondrial a été conduite par hybridation somatique entre un *Brassica napus* (colza) normal et un colza mâle stérile, donc porteur du cytoplasme «radis».

De cette fusion ont été sélectionnés les régénérants qui étaient les plus verts à basse température et qui avaient des fleurs mâles-stériles [77]. On a vérifié que ces plantes possédaient effectivement les électrophorogrammes des ADN nucléaires et chloroplastiques du colza et des ADN mitochondriaux du radis, c'est-à-dire que ces plantes résultaient d'un échange du seul compartiment chloroplastique entre parents.

Ces cybrides sont stables par descendance sexuée et peuvent entrer comme géniteurs dans les programmes de création d'un colza hybride. Dans la même ligne de recherche, un colza mâle stérile résistant à l'atrazine a été obtenu en sélectionnant les cybrides de l'opération de fusion des deux colzas suivants :

- le premier détient une stérilité mâle venant des mitochondries de *Raphanus sativus* (radis) croisé par *Brassica oleracea* (chou) et suivi d'une série de *back-cross* sur *B. napus* pour retrouver un colza mâle stérile ;
- le second possède la résistance à l'atrazine issue des chloroplastes de *Brassica campestris* (navette) après croisement et, là aussi, une série de *back-cross* sur *B. napus* (colza).

Les cybrides résistants et mâles stériles sélectionnés ont donc la formulation génétique suivante : noyau-colza + mitochondries-radis + chloroplastes-moutarde. Ce sont eux aussi des géniteurs possibles de cultivars de colzas hybrides et résistants à l'atrazine.

Ce type d'expériences, en plus de l'intérêt pratique direct qu'il démontre, confirme un nouveau domaine de sélection grâce aux fusions somatiques : la recherche des meilleurs couples «linkats-compartiment épigénique». On a récemment démontré que divers cybrides de *Brassica* avaient tous leurs diagrammes d'ADN mitochondrial propres.

Des expériences récentes, conduites par la station d'amélioration des plantes de l'INRA de Rennes apportent, par ailleurs, les résultats montrés par le Tableau II (Morice, communication orale).

Ce type d'expérimentation indiquerait donc la possibilité pour un sélectionneur de «regonfler» une variété en recherchant avec quelle structure cytoplasmique (ou plus exactement, épigénique), la synergie est la meilleure : toute une voie est ouverte en ce sens.

Une autre voie d'utilisation des fusions de protoplastes d'objectif assez différent présente elle aussi un grand intérêt. La domestication a créé progressivement une rup-

**Tableau II.** Effets de l'alloplasmie sur les rendements chez le colza.

Structure du cultivar de colza	Rendement
Cultivar de colza Brutor sur son propre cytoplasme	100
Cultivar de colza Brutor sur cytoplasme cybride 27	109
Cultivar de colza Brutor sur cytoplasme cybride 58	116
Cultivar de colza Darmor sur son propre cytoplasme	100
Cultivar de colza Darmor sur cytoplasme cybride 27	109
Cultivar de colza Santor sur son propre cytoplasme	100
Cultivar de colza Santor sur cytoplasme cybride 27	114
Cultivar de colza Santor sur cytoplasme cybride 58	121

ture entre l'espèce cultivée, remaniée, sélectionnée et les populations ancestrales dont elle est issue. Généralement l'espèce cultivée a pris des structures allopolyploïdes qui ne permettent plus les flux géniques entre ses ancêtres et elle. Or le réservoir ancestral a généralement gardé des caractéristiques de rusticité, de tolérance aux intempéries et de résistances horizontales aux pathogènes que recherchent les sélectionneurs.

On imagine aisément que l'hybridation somatique soit la meilleure solution pour remettre en communication la plante domestiquée et ses ancêtres spontanés.

Ainsi Nagao [78] a transmis au tabac cultivé la résistance au feu bactérien de *Nicotiana rustica* ; Helgeson *et al.* [79] ont transféré à la pomme de terre la résistance au virus de l'enroulement apporté par *Solanum brevidens*. Si l'on couple les technologies d'haploïdisation, aux remontées de ploïdie apportées par la fusion de protoplastes, on peut proposer des stratégies de sélection très séduisantes dont nous donnerons deux exemples. La pomme de terre cultivée est tétraploïde et dérive d'un ancêtre diploïde initial, *Solanum stenotomum* (Pérou, Bolivie), qui aurait lui-même donné une série d'espèces ancestrales diploïdes : *Solanum chacoense*, *S. phureja*, *S. vernei*... qui se localisent toutes dans les mêmes zones géographiques (Pérou, Bolivie, Colombie, Argentine, Brésil...). Ces espèces constituent un réservoir de variabilité inégalable : résistances aux virus, aux nématodes, à la sécheresse, au froid...

L'idée de remettre en communication l'espèce cultivée avec ces formes est séduisante ; dans ce but on peut proposer les étapes suivantes.

Application à un cultivar (tétraploïde) d'une technologie d'haploïdie qui l'amènera au niveau diploïde. A ce stade on peut faire communiquer *tuberosum* et un «pool génétique» diploïde contenant des facteurs génétiques intéressants. Cet échange génique (nucléaire et éventuellement cytoplasmique) peut se faire de deux manières, soit par voie sexuée, soit par fusion de protoplastes ; on remonterait dans ce dernier cas directement au niveau tétraploïde [80].

En tout état de cause, on peut à ce niveau diploïde opérer une sélection sur *S. tuberosum* beaucoup plus efficace qu'au niveau tétraploïde. Wenzel [81] proposait une seconde haploïdisation qui mènerait du niveau diploïde au niveau haploïde avec

une lisibilité encore plus grande des génotypes ; cette proposition ne semble pas réaliste car elle impliquerait beaucoup trop d'étapes techniquement délicates.

En revanche, après mixage et sélection récurrente au niveau diploïde, la fusion de deux *Solanum tuberosum* 2x les remonterait au niveau 4x en maintenant l'hétérozygotie indispensable à une bonne vigueur de la plante [80].

On pourrait aussi tenter de resynthétiser d'autres formes tétraploïdes avec d'autres combinaisons d'espèces. Un autre exemple de stratégie voisine qui est également poursuivie en France concerne une espèce fourragère, la luzerne *Medicago sativa*. Cette espèce cultivée est, elle aussi, tétraploïde. Bien que gardant une certaine variabilité, il semblerait qu'on ne puisse plus trouver dans les meilleures populations de l'espèce cultivée des facteurs de rusticité, de compétitivité, d'adaptation à la sécheresse ou aux sols salins qui étendraient les potentialités de ce fourrage. On pourrait aussi s'attaquer aux facteurs qui entraînent la météorisation du bétail et qui interdisent la consommation «en vert» de cette plante.

Les espèces spontanées qui sont apparentées à la luzerne cultivée sont diploïdes ( $2n = 2x$ ) ou, elles aussi, tétraploïdes ( $2n = 4x$ ). Dans les deux cas, la communication génétique entre espèces par la voie d'hybridations somatiques implique une maîtrise de l'haploïdisation, car sans elle on aboutit à des formes 6x ou 8x qui, de manière générale, ne semblent pas très performantes.

La stratégie proposée pourrait donc consister à descendre la luzerne cultivée au niveau 2x et à la fusionner avec les espèces spontanées diploïdes, ou encore à la fusionner d'abord avec une espèce spontanée tétraploïde et à redescendre ensuite au niveau 4x par haploïdisation. Pour l'instant, des hybrides somatiques ont été obtenus entre la luzerne cultivée (*Medicago sativa* 4x) et une espèce sauvage rustique et résistante au froid et à la sécheresse (*M. falcata* 4x) [4]. Les plantes hybrides 8x sont vigoureuses et intéressantes. Leurs descendances sont en cours d'étude [18]. Dans des fusions avec d'autres espèces (*M. lupulina*, *M. polymorpha*, *M. romanica*), des plantes ont pu être régénérées mais leur nature hybride n'apparaît ni à travers leur morphologie, ni à travers l'analyse enzymatique. Ces expériences, aussi bien chez la pomme de terre que chez la luzerne, mettent bien l'accent sur les difficultés à résoudre avant d'entamer un véritable programme d'amélioration par ces voies.

## Problèmes et remèdes

La première difficulté vient de l'absence de marqueurs qui permettraient, dans la grande quantité des produits d'une opération de fusion, de déterminer rapidement ceux qui résultent d'une hétérofusion : l'utilisation du génie moléculaire (Chap. VIII) pour introduire de tels marqueurs est sans doute une solution élégante qui ne perturbe pas le génotype choisi pour l'hybridation (introduction de résistance à un antibiotique ou à un désherbant par exemple).

Un autre facteur limitant important réside dans l'aptitude à la régénération, très variable d'un génotype à l'autre d'une part (ce qui engendre des déséquilibres et des compétitions néfastes dans les effectifs de régénérants après une opération de fusion) et surtout, d'autre part, très limitante pour certaines espèces. La nécessité d'adapter le milieu spécifiquement à chaque type de plante entraîne souvent des régénérations préférentielles d'un type parental plutôt que des hétérofusions. Par ailleurs, ces limitations des taux de division et de régénérations rendent presque impossibles les opérations en microgouttes de quelques protoplastes de chacun des partenaires.

Les difficultés qui surgissent dès que l'on vise la régénération de types hybrides interspécifiques éloignés ou intergénériques semblent indiquer que les objectifs de la fusion somatique doivent désormais plutôt viser l'obtention de cybrides et la recherche d'adéquations optimales entre nouveaux cytoplasmes et génotypes nucléaires ; une nouvelle stratégie est donc en cours de naissance :

- créer un bon cultivar par les méthodes conventionnelles par exemple ;
- fabriquer par fusion de protoplastes une assez large collection de populations cytoplasmiques dans l'espèce et aux frontières de l'espèce ;
- confronter le cultivar créé aux cytoplasmes cybrides et tester les meilleures relations noyau/épigénique ;
- vérifier la stabilité de la nouvelle structure ainsi «gonflée».

La fusion de protoplastes, jumelée à la biologie moléculaire, représente un excellent outil d'investigation de la génétique des populations cytoplasmiques, que les croisements sexués ne permettaient d'aborder que très superficiellement.

Il conviendrait sans doute de développer les technologies qui dissocieraient, dans les fusions, les trois compartiments constitutifs du génome : le compartiment nucléaire, le compartiment mitochondrial et le compartiment chloroplastique. La reconstitution, à volonté, par fusion «enveloppe + noyau» avec des mitochondries exogènes et des chloroplastes d'une troisième origine, apporterait, si elle était maîtrisée, des voies nouvelles très puissantes.

Enfin, un autre problème soulevé par ces fusions de protoplastes concerne les plantes hybrides obtenues. L'étude des premiers hybrides somatiques entre *Medicago sativa* et *M. falcata* a mis en évidence des comportements très particuliers des plantes issues de fusion et de leurs descendance [18]. Il serait nécessaire de développer des recherches qui analyseraient les relations entre des génomes amenés ainsi à coexister dans une cellule, spécialement sous l'angle de la variabilité somatique et génétique qu'ils sont susceptibles d'exprimer.

En effet, il a été démontré que, en plus de la variabilité génétique issue de toutes les formules d'additions nucléaires, mitochondriales et chloroplastiques trouvées dans les produits de fusion, le passage par protoplastes est une très active source de vitrovaryations (Chap. IV) qui viennent se surajouter et oblitérer la variation recherchée. Ces variants, par leurs multiples facettes, sont un élément positif, mais aussi une source de perturbation dans l'analyse des phénomènes.

## Références

1. Keller WA, *et al.* Effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z Naturforschung* 1973 ; 28c : 737-41.
2. Melchers G, *et al.* Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res Commun* 1978 ; 43 : 203-18.
3. Cocking EC. Selection and somatic hybridization. In : Thorpe TA, ed. *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary : University Calgary Press, 1978 : 151-8.
4. Téoulé E. Somatic hybridization between *Medicago sativa* L. and *Medicago falcata* L. *CR Acad Sci Paris* 1983 ; 297 : 13-6.
5. Sihachakr D, *et al.* Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. clark. *Plant Sci* 1988 ; 57 : 215-23.
6. Belliard G, *et al.* Fusion de protoplastes de *Nicotiana tabacum* à cytoplastes différents : étude des hybrides cytoplasmiques néoformés. *CR Acad Sci Paris* 1977; 284D : 749-52
7. Gleba Y, *et al.* *Arabidobrassica* : plant genome engineering by protoplast fusion. *Naturwissenschaften* 1979 ; 66 : 547-54.
8. Hoffman F, *et al.* *Arabidobrassica* : chromosomal recombination and morphogenesis in asymmetric intergeneric hybrid cells. *Planta* 1981 ; 153 : 586-93.
9. Glimelius K, *et al.* Somatic hybridization of nitrate reductase deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Physiol Plant* 1978 ; 44 : 273-7.
10. Lazar GB, *et al.* Recent developments in plant protoplast fusion and selection technology. In : Potrykus *et al.*, ed. *Protoplasts*. 6th Intern Protoplast Symp. Bâle : Birhauser, 1983.
11. Melchers G, *et al.* Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of haploid light sensitive varieties of tobacco. *Mol Gen Genet* 1974 ; 135 : 277-94.
12. Gleba Y, *et al.* Transmission genetics of *Nicotiana* hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1985 ; 4 : 19-27.
13. Cocking EC, *et al.* Selection procedures for the production of interspecific somatic hybrids of *Petunia hybrida* and *Petunia parodii* II. Albino complementation selection. *Plant Sci Lett* 1977 ; 10 : 7-12.
14. Redenbaugh K, *et al.* Characterization and separation of plant protoplasts *via* flow cytometry and cell sorting. *Pflanzenphys* 1982 ;107 (1) : 65-80.
15. Gleba Y, *et al.* Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna* x *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products. *TAG* 1982 ; 62 : 75-9.
16. Menczel L, *et al.* Isolation of somatic hybrids by cloning *Nicotiana* heterokaryons in nurse culture. *Planta* 1978 ; 143 : 29-32.
17. Tabaeizadeh Z, *et al.* Increasing the variability of *Lycopersicon* Mill. by protoplast fusion with *Petunia* L. In : Potrykus *et al.*, ed. *Protoplasts*. 6th Intern Protoplast Symp. Bâle : Birhauser, 1983.
18. Téoulé E. Culture *in vitro* de tissus, fusions de protoplastes et perspectives dans l'amélioration des plantes. In : Schriban R, ed. *Biotechnologie, technique et documentation*. Paris : Lavoisier, 1984 : 683-702.
19. Carlson PS. The use of protoplasts for genetic research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 ; 70 : 598-602.
20. Morikawa H, Kumashiro T, Kusakari K, Iida A, Hirai A, Yamada Y. Interspecific hybrid plant formation by electrofusion in *Nicotiana*. *Theor Appl Genet* 1987 ; 75 : 1-4.
21. Maliga P, Lazar G, Joo F, Nagy AH, Menczel L. Restoration of morphogenetic potential in *Nicotiana* by somatic hybridization. *Mol Gen Genet* 1977 ; 157 : 291-6.

22. Menczel L, Nagy F, Kiss ZR, Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* plus *Nicotiana glauca* : correlation of resistance to *Nicotiana glauca* plastids. *Theor Appl Genet* 1981 ; 59 : 191-5.
23. Melchers G. Microbial techniques in somatic hybridization by fusion of protoplasts. In : Brinkley BR, Porter KR, eds. *International cell biology*. New York : Rockefeller University Press, 1977 : 207-15.
24. Hein T, Przewozny T, Schieder O. Culture and selection of somatic hybrids using an auxotrophic cell line. *Theor Appl Genet* 1983 ; 64 : 119-22.
25. Maliga P, Kiss ZR, Nagy AH, Lazar G. Genetic instability in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca*. *Mol Gen Genet* 1978 ; 163 : 145-51.
26. Nagao T. Breeding by somatic hybridization based on protoplast fusion. 1. The combination *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca*. *Jpn J Crop Sci* 1978 ; 47 : 491-8.
27. Iwai S, Nagao T, Nakata K, Kawashima N, Matsuyama S. Expression of nuclear and chloroplastic genes coding for Fraction I protein in somatic hybrids of *Nicotiana glauca* cultivar Bright Yellow and *Nicotiana glauca* var. *glauca*. *Planta* 1980 ; 147 : 414-7.
28. Nagao T. Somatic hybridization by fusion of protoplasts. II. The combination of *Nicotiana glauca* and *N. glutinosa* and *N. glauca* and *N. glauca*. *Jpn J Crop Sci* 1979 ; 48 : 385-92.
29. Kosakovska IV. Subunit structure of D-ribulose-1,5-diphosphate carboxylase of paraxial hybrids, *Nicotiana glauca* and *Nicotiana glauca*. *UKR Bot ZH* 1980 ; 37 : 86-8.
30. Uchimiya H. Somatic hybridization between male sterile *Nicotiana glauca* and *N. glutinosa* through protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 1982 ; 61 : 69-72.
31. Evans DA, Wetter LR, Gamborg OL. Somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana glauca* obtained by protoplast fusion. *Physiol Plant* 1980 ; 48 : 225-30.
32. Evans DA, Flick CE, Jensen RA. Disease resistance : incorporation into sexually incompatible somatic hybrids of the genus *Nicotiana*. *Science* 1981 ; 213 : 907-9.
33. Evans DA, Flick CE, Kut SA, Reed SM. Comparison of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana glauca* hybrids produced by ovule culture and protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 1982 ; 62 : 193-8.
34. Nagao T. Somatic hybridization by fusion of protoplasts. III. Somatic hybrids of sexually incompatible combinations *Nicotiana glauca* + *Nicotiana glauca* and *Nicotiana glauca* + *Salpiglossis sinuata*. *Jpn J Crop Sci* 1982 ; 51 : 35-42.
35. Evans DA, Bravo JE, Kut SA, Flick CE. Genetic behaviour of somatic hybrids in the genus *Nicotiana* : *N. glauca* + *N. glauca* and *N. glauca* + *N. glauca*. *Theor Appl Genet* 1983 ; 65 : 93-101.
36. Bates GW, et al. Asymmetric hybridization in *Nicotiana* by fusion of irradiated protoplasts. *TAG* 1987 ; 74 : 718-26.
37. Pirrie A, Power J.B. The production of fertile, triploid somatic hybrid plants *Nicotiana glutinosa* (n) + *N. glauca* (2n) via gametic somatic protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 1986 ; 72 : 48-52.
38. Power JB, Frearson EM, Haywood C, George D, Evans PK, Berry SF, Cocking EC. Somatic hybridization of *Petunia hybrida* and *Petunia parviflora*. *Nature* 1976 ; 263 : 500-2.
39. Izhar S, Power J.B. Somatic hybridization in *Petunia* : a male sterile cytoplasmic hybrid. *Plant Sci Lett* 1979 ; 14 : 49-56.
40. Power JB, Berry SF, Chapman JV, Cocking EC, Sink KC. Somatic hybrids between unilateral cross-incompatible *Petunia* species. *Theor Appl Genet* 1979 ; 55 : 97-100.
41. Power JB, Berry SF, Chapman JV, Cocking EC. Somatic hybridization of sexually incompatible petunia : *Petunia parviflora*, *Petunia parviflora*. *Theor Appl Genet* 1980 ; 57 : 1-4.

42. Dudits D, Hadlaczky GY, Levi E, Fejer O, Haydu ZS, Lazar G. Somatic hybridization of *Daucus carota* and *Daucus capillifolius* by protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 1977 ; 51 : 127-32.
43. Kameya T, Horn ME, Widholm JM. Hybrid shoot formation from fused *Daucus carota* and *D. capillifolius* protoplasts. *Z Pflanzenphysiol* 1981 ; 104 : 459-66.
44. Toshiaki K, Horn ME, Widholm JM. Hybrid shoot formation from fused *Daucus carota* and *Daucus capillifolius* protoplasts. *Z Pflanzenphysiol* 1981 ; 104 : 459-66.
45. Ichikawa H, Tanno-Suenaga L, Imamura J. Selection of *Daucus* cybride based on metabolic complementation between X-irradiated *D. capillifolius* and iodoacetamide-treated *D. carota* by somatic cell fusion. *Theor Appl Genet* 1987 ; 74 : 746-52.
46. Schieder O. Production and uses of metabolic and chlorophyll deficient mutants. In : Thorpe TA, ed. *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary : University Calgary Press, 1978 : 393-401.
47. Schieder O. Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill + *Datura discolor* Bernh. and of *Datura innoxia* Mill + *Datura stramonium* L. var. *tatula* L. I Selection and characterization. *Mol Gen Genet* 1978 ; 162 : 113-9.
48. Schenck HR, et al. Somatic hybrids by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *Z Pflanzenzucht* 1982 ; 89 : 278-88.
49. Sundberg E, et al. Fertility and chromosome stability in *Brassica napus* resynthesized by protoplast fusion. *TAG* 1987 ; 75 : 96-104.
50. Terada R, et al. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Brassica campestris* ; selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *TAG* 1987 ; 73 : 379-84.
51. Primard C, Vedel F, Mathieu C, Pelletier G, Chèvre AM. Interspecific somatic hybridization between *Brassica napus* and *Brassica hirta* (*Sinapis alba* L.). *Theor Appl Genet* 1988 ; 75 : 546-52.
52. Butenko RG, Kuchko AA. Physiological aspects of procurement cultivation, and hybridization of isolated potato protoplasts. *Fiziol Rast* 1979 ; 26 : 1110-9.
53. Binding H, Jain SM, Finger J, Mordhorst G, Nehls R, Gressel J. Somatic hybridization of atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*, Part I : clonal variation in morphology and atrazine sensitivity. *Theor Appl Genet* 1982 ; 63 : 273-7.
54. Fish N, Karp A, Jones MGK. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. *Theor Appl Genet* 1988 ; 76 : 260-6.
55. Puite KJ, Roest S, Pijnacker LP. Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Reports* 1986 ; 5 : 262-5.
56. Gleddie S, Keller WA, Setterfield. Production and characterization of somatic hybrids between *S. melongena* and *S. sisybriifolium* & am. *Theor Appl Genet* 1986 ; 71 : 613-21.
57. Sidorov VA, Zubko MK, Kuchko AA, Komarnitsky IK, Gleba YY. Somatic hybridization in potato : use of  $\gamma$ -irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* in genetic reconstruction. *Theor Appl Genet* 1987 ; 74 : 364-8.
58. Guri A, Sink KC. Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. *Theor Appl Genet* 1988 ; 76 : 490-6.
59. O'Connell MA, Hanson MR. Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Theor Appl Genet* 1987 ; 75 : 83-9.
60. Wright RL, Somers DA, McGraw RL. Somatic hybridization between birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and *L. conimbricensis* wild. *Theor Appl Genet* 1987 ; 75 : 151-6.
61. Toriyama K, Hinata K, Kameya T. Production of somatic hybrid plants, *Brassica moricandia* through protoplast fusion between *Morieandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Sci* 1987 ; 48 : 123-8.

62. Toriyama K, Kameya T, Hinata K. Selection of a universal hybridizer in *Sinapis turgida* Del. and regeneration of plantlets from somatic hybrids with *Brassica* species. In : Puite KJ, et al., eds. *Progress in plant protoplast research*. Kluwer Academic Publishers, 1987.
63. Fahleson J, Rahlen L, Glimelius K. Analysis of plants regenerated from protoplast fusions between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. *Theor Appl Genet* 1988 ; 76 : 507-12.
64. Binding H. Somatic hybridization experiments in *Solanaceous* species. *Mol Gen Genet* 1976 ; 144 : 171-5.
65. Xianghui L, Wenbin L, Meijuan H. Somatic hybrid plants from intergeneric fusion between tobacco tumor B653 and *Petunia hybrida* W43 and expression of LPDH. *Scientia sinica* (B) 1982 ; 25 : 611-9.
66. Endo T, Komiya T, Mino M, Nakanishi K, Fujita S, Y. Yamada. Genetic diversity among sublines originating from a single somatic hybrid cell of *Duboisia hopwoodii* + *Nicotiana tabacum*. *Theor Appl Genet* 1988 ; 76 : 641-6.
67. de Vries SE, Ferwerda MA, Loonen AEHM, Pijnacker LP, Feenstra WJ. Chromosomes in somatic hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and a monoploid potato. *Theor Appl Genet* 1987 ; 75 : 170-6.
68. Gleba YY, Hinnisdaels S, Sidorov VA, Kaleda VA, Parokanny AS, Boryshuk NV, Cherep NN, Negrutiu I, Jacobs M. Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by «gamma-fusion». *Theor Appl Genet* 1988 ; 76 : 760-6.
69. Krumbiegel G, Schieder O. Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. *Planta* 1979, 145 : 371-5.
70. Krumbiegel G, Schieder O. Comparison of somatic and sexual incompatibility between *Datura innoxia* and *Atropa belladonna*. *Planta* 1981 ; 153 : 466-70.
71. Dudits D, Hadlaczy G, Bajszar G, Koncz C, Lazar G, Horvath G. Plant regeneration from intergeneric cell hybrids. *Plant Sci Lett* 1979 ; 15 : 101-12.
72. O'Connell MA, Hanson MR. Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum rickii*. *Theor Appl Genet* 1986 ; 72 : 59-65.
73. Schweizer G, Ganal M, Ninnemann H, Hemleben V. Species specific DNA sequences for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule*. *Theor Appl Genet* 1988 ; 75 : 679-84.
74. Grosser JW, Gmitter FG, Chandler Jr, Chandler JL. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species : *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor Appl Genet* 1988 ; 75 : 397-401.
75. Grosser JW, Gmitter FG, Chandler Jr, Chandler JL. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *Plant Cell Reports* 1988 ; 7 : 5-8.
76. Bannerot H, et al. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. Proc Eucarpia Meeting Cruciferae, 1974 ; 25 : 52-4.
77. Pelletier G, et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 1983 ; 191 : 244-50.
78. Nagao T. Somatic hybridization by fusion of protoplasts. I. The combination of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica*. *Jpn J Crop Sci* 1978 ; 47 : 491-8.
79. Helgeson JP, et al. Somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum* : expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll resistance. *Plant Cell Reports* 1986 ; 3 : 212-4.
80. Austin S, et al. Intraspecific fusions in *Solanum tuberosum*. *TAG* 1986 ; 71 : 172-5.
81. Wenzel G. Protoplast techniques incorporated into applied breeding programs. In : Ferenczy L, Farkas GL, eds. *Advances in protoplasts research*. Oxford : Pergamon Press, 1980 : 327-40.



## VII

### **Biotechnologies de repérage et d'étiquetage des gènes**

Le progrès des connaissances sur l'expression des gènes, puis les avancées sur la structure moléculaire de l'information ont permis de revoir totalement les méthodes de repérage génétique. Ces méthodes sont de deux types :

- les plus anciennes identifient le gène par son produit ;
- les plus récentes sont directes et détectent le code génétique lui-même.

Nous ne nous attarderons pas sur les premières qui sont aujourd'hui classiques ; citons :

- l'établissement des cartes chromosomiques à l'aide des taux de recombinaison ;
- la séparation des protéines par les électrophorogrammes mono- ou bidimensionnels ;
- la détection par des anticorps poly- ou monoclonaux et, en particulier, les méthodes de marquage de type ELISA (*enzyme linked immunosorbant assay*).

Ces méthodes révèlent, avec des moyens simples, les structures ponctuelles des génotypes. Elles ont été abondamment utilisées pour préciser les régimes de reproduction de certaines espèces, les relations entre espèces et les filiations évolutives, les parentés et les identités variétales, etc.

Cependant, l'une des plus grandes innovations biologiques de la décennie réside dans l'identification de l'ADN lui-même.

#### **Les diagrammes de restriction : RFLP**

Chez les végétaux supérieurs, chaque chromosome comprend une double hélice de deux molécules complémentaires d'acide nucléique, que l'on sait aujourd'hui assez facilement extraire. On connaît un assez grand nombre d'enzymes, dites enzymes de restriction, qui sont capable de couper l'ADN double brin en des sites spécifiés :

chaque type d'enzyme reconnaît une séquence de bases qui lui est propre (en général 6 à 9 paires de bases) et coupe l'ADN en ces emplacements (Tableau I). On peut ainsi obtenir un découpage plus ou moins fin selon l'enzyme utilisé. Il est évident que deux génotypes, différant génétiquement, n'auront pas les mêmes séquences et, donc, ne seront pas découpés de la même manière : c'est cette différence que l'on appelle polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (*restriction fragment length polymorphism*) : RFLP [1]. Chaque génotype est donc visualisé par le spectre électrophorétique de migration des fragments en fonction de leur longueur (Fig. 33). En adoptant des jeux d'enzymes de restriction correspondant à l'objectif recherché, on peut obtenir une grande précision dans ces diagrammes de découpage. Bien qu'elle nécessite une technicité et une certaine mise de fonds, l'utilisation des enzymes de restriction est une opération assez simple, à la portée de la plupart des laboratoires. Cette technologie présente, en outre, les avantages suivants :

- elle révèle des séquences, même si le gène n'est pas exprimé ;
- elle ne nécessite que des quantités minimales de matériels ;
- elle détecte les codominances entre allèles ;
- elle est indépendante des effets de l'environnement et des épistasies avec d'autres gènes.

**Tableau I.** — Exemples de quelques enzymes de restriction : sites spécifiques et nombre de coupures sur le virus SV 40.

Enzyme	Site spécifique	Nombre de coupures
Hind III	A/AGCTT	6
Eco RI	G/AATTC	1
Bam HI	G/GATCC	1
Bsu I EI	CC/GG	18
FI	CG/CG	?
Sma I	CCC/GGG	0
Eco RII	/CCTGG	16

Cependant, ce découpage en fragments ne donne, par lui-même, qu'un diagramme «anonyme» puisque l'on ne connaît pas les gènes portés sur chacune des coupures. Si l'on s'en tenait là, l'approche serait sensiblement de même nature que celle de la génétique quantitative, c'est-à-dire qu'elle ne permettrait que des évaluations statistiques des structures de génotypes, des linkats, des parentés, des distances génétiques entre populations, des niveaux d'hétérozygotie d'un génotype, etc. Il existe plusieurs formulations pour le calcul des distances entre diagrammes RFLP [2], ou pour le calcul des index d'hétérozygotie relative [3].

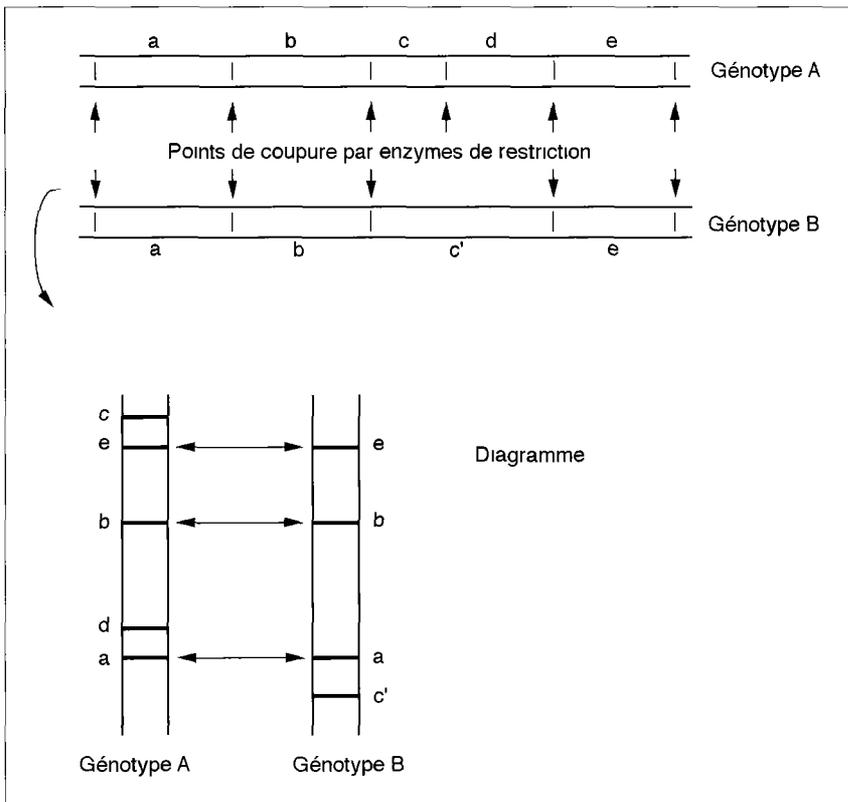


Figure 33. — Diagrammes de restriction.

## Les sondes

Une autre propriété de l'ADN permet de sortir de l'anonymat des fragments en les étiquetant avec des sondes

Les deux chaînes d'ADN complémentaire constituant la double hélice peuvent être séparées par rupture des ponts «hydrogène» qui les relient : on appelle cette opération, dénaturation de l'ADN. Elle se réalise par divers agents physiques ou chimiques (température, PH...). On nomme «stringence» du milieu réactionnel les conditions qui déterminent la dénaturation plus ou moins facile de l'ADN. Lorsque le fragment d'ADN à identifier a été dénaturé et que les conditions de stringence du milieu sont permissives, il peut se réassocier à tout ADN complémentaire présent : c'est l'hybridation moléculaire (voir également chapitre VIII).

Lorsque la stringence du milieu n'est pas trop forte, l'hybridation ne nécessite pas une complémentarité absolue, il suffit d'une certaine homologie. Les sondes sont donc des séquences de bases identifiées (correspondant à des gènes connus) accompagnées

d'un marqueur, radioactif dans le cas des sondes chaudes, visible pour les sondes froides (Tableau II). Ces sondes vont s'hybrider sur les fragments RFLP et les étiqueter.

**Tableau II.** — Les sondes.

— Quand 2 brins d'ADN ont un certain degré de complémentarité,	} Il y a appariement (hybridation)
— Si le milieu réactionnel est permissif (conditions de stringence),	
1. Un ADN à identifier, appelé <i>cible</i> , est fixé sur un support (squash, dot blot, southern...)	
2. On le place en présence d'une «sonde» dans un milieu réactionnel (la sonde est un fragment d'ADN porteur de la séquence recherchée dans la cible et marqué : sondes radioactives ou sondes froides)	
3. Si la cible a un site homologue de la sonde, il y a hybridation et après lavage la sonde reste (s'il n'y a pas d'homologie, la sonde est lavée)	
4. On détecte ainsi : (sur des fragments très petits, parfois inférieurs à 1/1000 nanogramme, ou anciens)	
— la présence de virus ou de bactéries dans un organisme	
— toute identité génétique	
— les relations de parenté	
— les impuretés	

On dispose actuellement d'un très grand nombre de sondes, pour la plupart des grandes espèces végétales ; cela est d'autant plus facile que l'hybridation moléculaire n'exige qu'une homologie approximative : les sondes du maïs conviennent pour le riz, celles de la pomme de terre sont valables pour la tomate, celles de la luzerne s'utilisent chez l'arachide... [4].

Par ces étiquetages et par le jeu des nombreuses enzymes de restriction, on peut avancer très vite dans la construction des cartes génétiques totales, (dites saturées), chez la plupart des espèces, ce d'autant plus qu'il existe des logiciels (Gene links, Map makers...) qui facilitent toute interprétation.

Actuellement, on peut dire que de telles techniques sont des opérations de routine. L'utilisation des sondes froides évite la nécessité d'avoir un laboratoire agréé pour la radioactivité.

## Les amplifications de l'ADN : RAPD

Lorsqu'on ne dispose que de très faibles quantités de l'ADN à identifier, et surtout avec les sondes froides (50 à 100 fois moins sensibles), on peut amplifier l'ADN pour

franchir de nouveaux seuils de sensibilité. Les techniques les plus fréquemment utilisées sont les PCR (*polymerase chain reaction*) accommodées par les RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) [5]. Dans les PCR classiques on amplifie un gène bien spécifié, alors que dans les RAPD on amplifie des zones aléatoires.

Pour amplifier une séquence d'ADN (Fig. 34), il faut disposer d'un milieu contenant :

- 1/ l'ADN cible (double brin) extrait de la cellule ;
- 2/ des molécules d'ADN polymérase ;

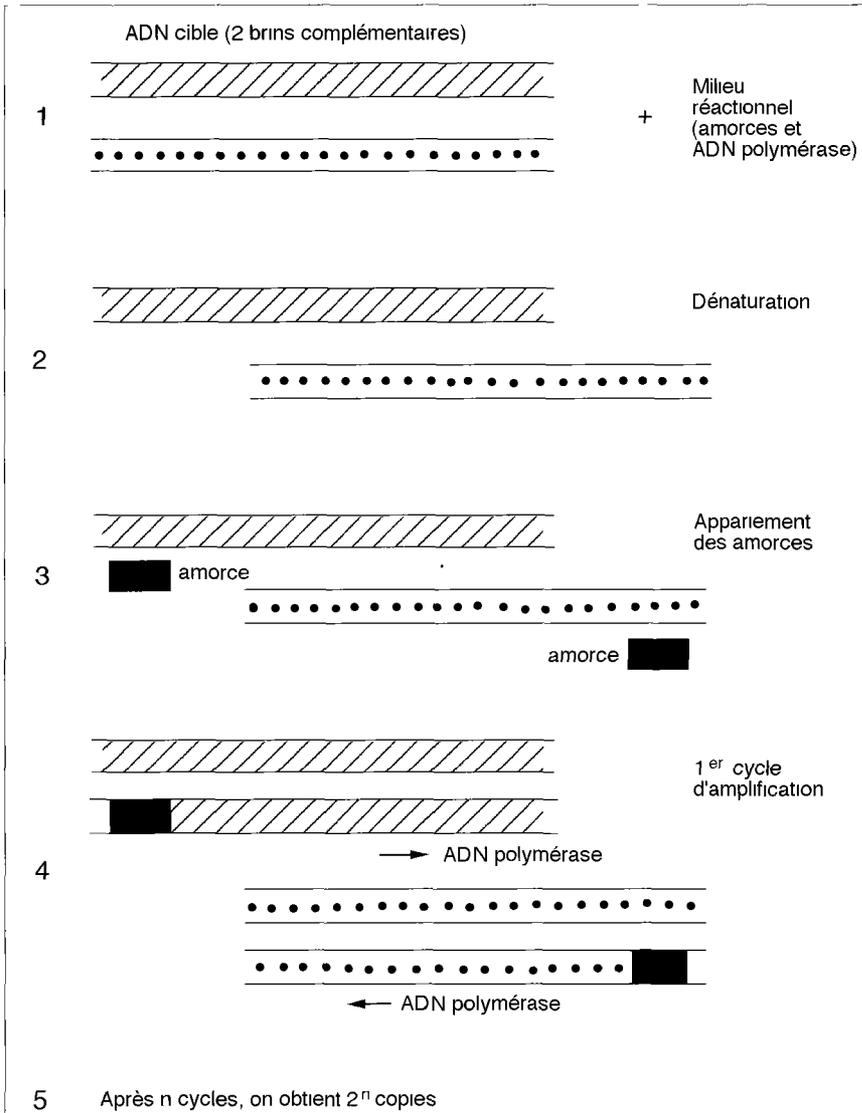


Figure 34. — Amplification de l'ADN (PCR).

3/ des amorces (*primers*), qui sont des séquences complémentaires de chaque extrémité de la zone d'ADN cible à amplifier. C'est ici que l'amplification est spécifique (amorçage en début et fin de la zone délimitant un gène spécifié) ou aléatoire (amorçage avec des séquences aléatoires, calculées pour couvrir statistiquement une longueur codante déterminée) (Tableau III).

**Tableau III.** — Amplification de l'ADN (comparaison entre deux méthodes).

<p><i>Méthode PCR</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— amorces (<i>primers</i>) spécifiques de l'organisme dont on doit amplifier une séquence (Il existe des banques de données et des logiciels permettant le choix des amorces les mieux adaptées)</li> </ul> <p><i>Méthode RAPD</i> (random amplified polymorphic DNA)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— amorces plus courtes et aléatoires (logiciels de séquences) (synthétiseurs de nucléotides)</li> <li>— s'hybrident au hasard en plusieurs endroits de la cible (plusieurs fragments amplifiés)</li> <li>— on choisit les amorces qui aboutissent à la meilleure discrimination du polymorphisme</li> <li>— utilisation :             <ul style="list-style-type: none"> <li>- marquage</li> <li>- description de la variabilité</li> <li>- cartes génétiques rapides</li> </ul> </li> </ul>
--

Le milieu réactionnel, dont la stringence est ajustée, reçoit donc ADN, polymérase, amorces. Il est alors soumis à des cycles successifs constitués de trois phases :

- 1/ dénaturation de l'ADN cible ;
- 2/ appariement des couples d'amorces ;
- 3/ copie complémentaire de chaque brin par l'ADN polymérase. Au bout de  $n$  cycles de ce type (dans un appareil appelé «cycleur»), on doit récolter, en principe,  $2^n$  copies de l'ADN initialement amorcé, c'est-à-dire du gène précisément recherché ou d'un segment spécifique dans la PCR classique, de multiples zones aléatoires (qu'on pourra étiqueter) ensuite dans la RAPD.

La fabrication des couples d'amorces, longues d'une vingtaine de nucléotides dans les PCR est facilitée par des banques de données sur les séquences utilisables chez la plupart des espèces importantes. Pour les RAPD, les amorces sont plus courtes, 4 à 10 nucléotides ; le principe de leur fabrication, par un synthétiseur de nucléotides est simple : calcul des probabilités d'existence de séquences de 4 à 10 paires de bases dans un génome végétal donné, et probabilité de répartition de telles séquences sur 2 brins complémentaires en des points distants de quelques centaines de nucléotides (afin que la polymérase puisse agir).

Les combinaisons de ces séquences oligonucléotidiques formant les amorces possibles sont pratiquement illimitées : des logiciels permettent de faire son choix. Les RAPD donnent donc facilement de très grands nombres de profils d'amplification.

Outre la PCR, se sont développées, au cours des dernières années, plusieurs méthodes nouvelles d'amplification de l'ADN ; chacune possède ses avantages et ses inconvénients, mais la PCR reste la voie classique.

On peut donc dire que, dans ce domaine, les biotechnologies sont parvenues à une grande sensibilité de repérage et d'identification. Le Tableau IV donne, à titre d'exemple, les sensibilités des diverses voies pour détecter le virus de la Sharka, pathogène des arbres fruitiers.

**Tableau IV.** (D'après [1].)

Méthode	Quantité de virus détectable
ELISA	1 ng
Hybridation moléculaire :	
par ADNc	0,1 ng
par ARNc	0,005 ng
PCR	0,0002 ng

## Trois exemples d'utilisation des repérages moléculaires

### Différenciation des maïs hybrides américains [6]

Les classifications antérieures des maïs hybrides par des marquages biochimiques étaient critiquables car elles étaient basées sur un échantillonnage trop partiel du génome. Dans l'analyse RFLP, on a utilisé trente-huit sondes, qui mirent en évidence 288 variations. Cela a permis la distinction des 69 hybrides testés avec une très grande sensibilité. Le classement était en accord avec les différences antérieurement trouvées et avec le comportement en champ ; il confirmait également ce que l'on savait du pédigrée des hybrides.

### Les cultivars de piment analysés par RFLP [7]

Par des méthodes classiques, des groupes de linkage avaient pu être déterminés chez le piment. Grâce à 41 sondes moléculaires ont été analysés les diagrammes de restriction de 14 origines de piments. Cette étude, mettant en évidence 82 loci, permet d'envisager l'élaboration d'une carte chez *Capsicum annuum*. Par ailleurs, sur les diagrammes comprenant 118 fragments, les 13 types de *C. annuum* ont été décrits ; 14,4 % des fragments sont spécifiques d'un cultivar, 54,2 % sont communs à l'en-

semble et 31,4 % donnent des informations sur les parentés entre ces types. Cela illustre bien la valeur de l'outil RFLP - sondes.

### **Le principe du marquage par transposons**

Considérons un génotype possédant un caractère donné «C» dont on voudrait localiser le (ou les ) gène(s). La procédure est la suivante : on intègre, par génie génétique (voir chapitre VIII), un transposon dans ce génotype. Le transposon transféré est marqué par une résistance à la kanamycine, par exemple, et l'on possède une sonde qui permet de le repérer. En culture *in vitro*, on sélectionne alors, parmi les clones cellulaires résistants à l'antibiotique, ceux qui régénèrent des phénotypes mutés pour le caractère «C». Il est facile ensuite par RFLP, en utilisant la sonde, de repérer le fragment porteur du gène ou du linkat conditionnant le caractère «C»[8, 9].

### **La sélection assistée par marqueurs (QTL pour *quantitative trait locus*)**

L'étiquetage de nombreux gènes ou, mieux, de nombreux linkats ouvre aux sélectionneurs l'espoir d'associer des caractères agronomiques à des gènes marqueurs. Cela présente d'autant plus d'intérêt que les gènes d'intérêt agronomique sont nombreux, mais avec des effets hiérarchisés, sont très modulés, dans leur expression, par les conditions de milieu et nécessitent pour leur mise en évidence des analyses longues et coûteuses. En fait, l'espoir est que la génétique quantitative pourra être éclairée par des marqueurs moléculaires simples.

Ainsi seraient plus lisiblement localisés les linkats, les zones recombinogènes (à fréquents CO), les sites conditionnant des variances inter- et intrapopulations et les aptitudes à la combinaison, etc. Bien que l'on puisse, effectivement, attendre une aide à la sélection d'un caractère, par le marquage lié, il y a une certaine naïveté dans les nombreux travaux entrepris dans ce domaine [10]. Les situations, où les résultats sont nettement positifs, concernent les classifications de la variabilité, la conduite éclairée des *back-cross* (quand les caractères sont oligogéniques), l'étiquetage de gènes dont le repérage est coûteux (notamment pour en entreprendre la sélection récurrente).

En revanche, la sélection assistée par marqueurs reste assez peu efficace lorsque les gènes conditionnant le caractère sont répartis en nombreux linkats interactifs ou lorsque les linkages marqueurs-caractère sont peu étroits, ou encore lorsque l'héritabilité de la caractéristique à étudier est faible. D'une manière générale, il faut donc relativiser l'importance de l'aide apportée. Nous illustrerons cette conclusion un peu restrictive en considérant la carte génétique de la tomate et trois caractères quantitatifs (poids du fruit, teneur en sucres, pH du fruit) avec les marquages associés (Fig. 35). On se demande quel parti direct en tirerait un sélectionneur ? Et cependant nous sommes dans un cas simple [11].

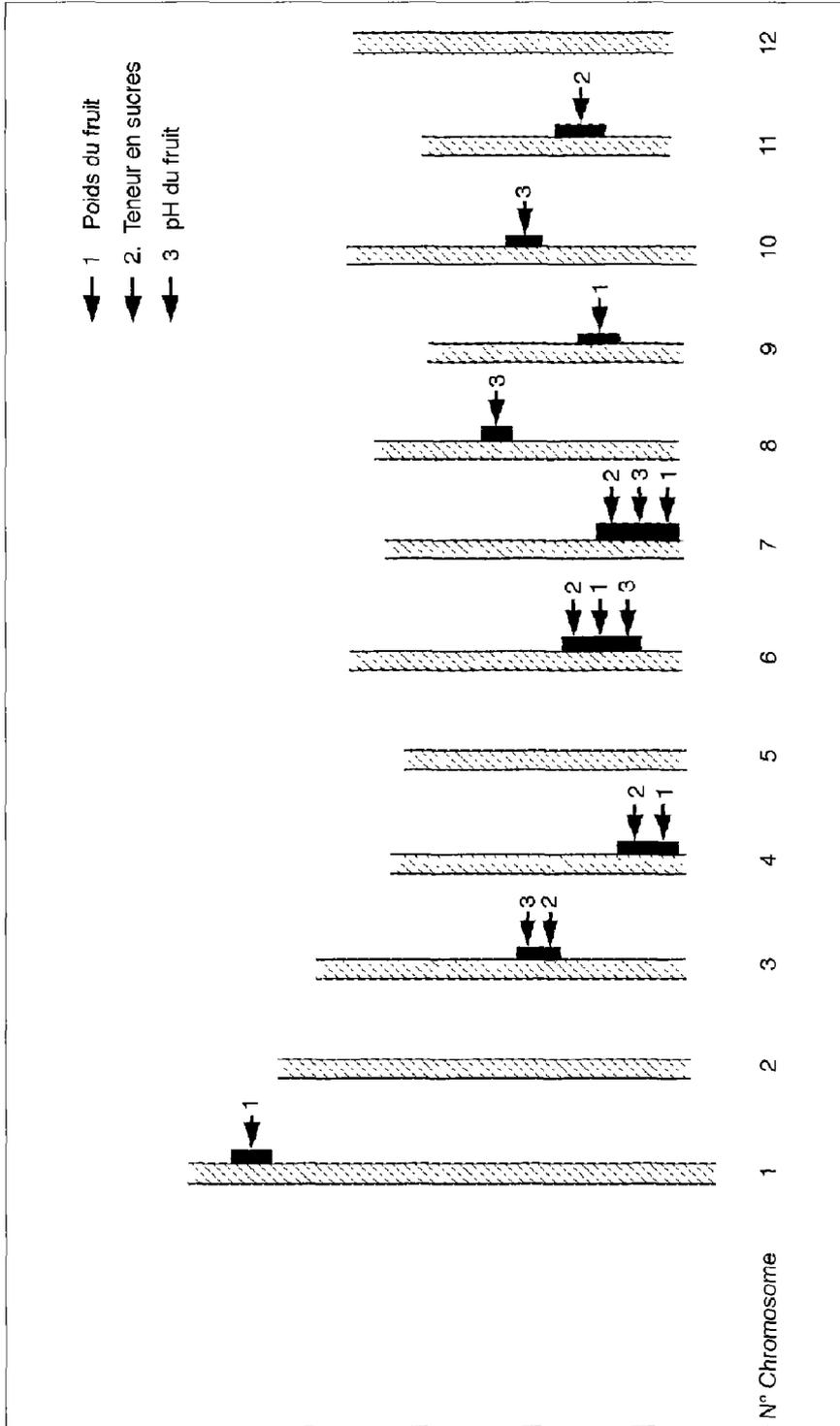


Figure 35. — Localisation des QTL chez la tomate. (D'après Paterson et al. Nature 1988 ; 335 : 721-6.)

## Les limites des biotechnologies de repérage

La génétique quantitative atteint ses limites d'efficacité lorsque les interactions entre locus prennent le pas sur les effets d'additivité. Dans cette situation (comme l'ont montré de nombreuses publications), la cohérence des théories est ébranlée. On retrouve ces mêmes limites dans les espoirs liés à l'étiquetage des gènes et à la cartographie fine du génome :

- les nombreux cas où il n'y a pas de liaison entre le niveau d'hétérosis et la distance génétique entre parents ;
- le cas où les aptitudes à la combinaison sont meilleures entre des lignées relativement apparentées (si elles sont complémentaires) ;
- l'absence de liens entre le polymorphisme génétique détecté et la variabilité phénotypique mesurée ;
- l'intérêt plutôt descriptif de la cartographie.

Toutes ces limitations constituent une grande source de réflexions conceptuelles : par exemple, chez certaines espèces (tomate, maïs), le polymorphisme révélé par les marqueurs moléculaires est en accord avec le système de reproduction (autogamie, allogamie) ; mais ce n'est pas du tout une loi générale : le riz, autogame, a un polymorphisme allélique aussi élevé que celui du maïs (allogame), et le melon (allogame) aussi réduit que celui du soja (autogame) [12,13]

Au même titre, une étude chez l'arachide (*Arachis hypogea*), légumineuse allotétraploïde, conduit les auteurs à la conclusion suivante : des études utilisant les méthodes moléculaires n'ont pas révélé de niveau de polymorphisme génétique significatif alors qu'une variabilité morphologique et physiologique est très visible entre les familles [14].

En outre, les cartes génétiques saturées (voir p. 135) montrent, par exemple, qu'entre le riz et le maïs il y a 70 % de colinéarité (mais bien plus cette colinéarité serait presque aussi forte entre le riz et la tomate !) Par ailleurs la tomate et la pomme de terre ne diffèrent que par quatre inversions [15] (cela indépendamment de la tétraploïdie chez la pomme de terre) (Fig. 36).

## Conclusion

Compte tenu de ces remarques, et tout en reconnaissant l'immense avantage d'avoir des repérages ponctuels et des moyens d'appréciation et d'identification très sensibles pour les pathogènes, pour les cultivars, pour les impuretés, pour la parenté, pour la description du polymorphisme etc., nous sommes à la conclusion suivante.

La carte génétique ainsi obtenue traduit très imparfaitement les différences morphologiques entre espèces et ne reflète qu'approximativement les aptitudes fonctionnelles des plantes. Dès lors, que ferons-nous des cartes génétiques complètes ? En

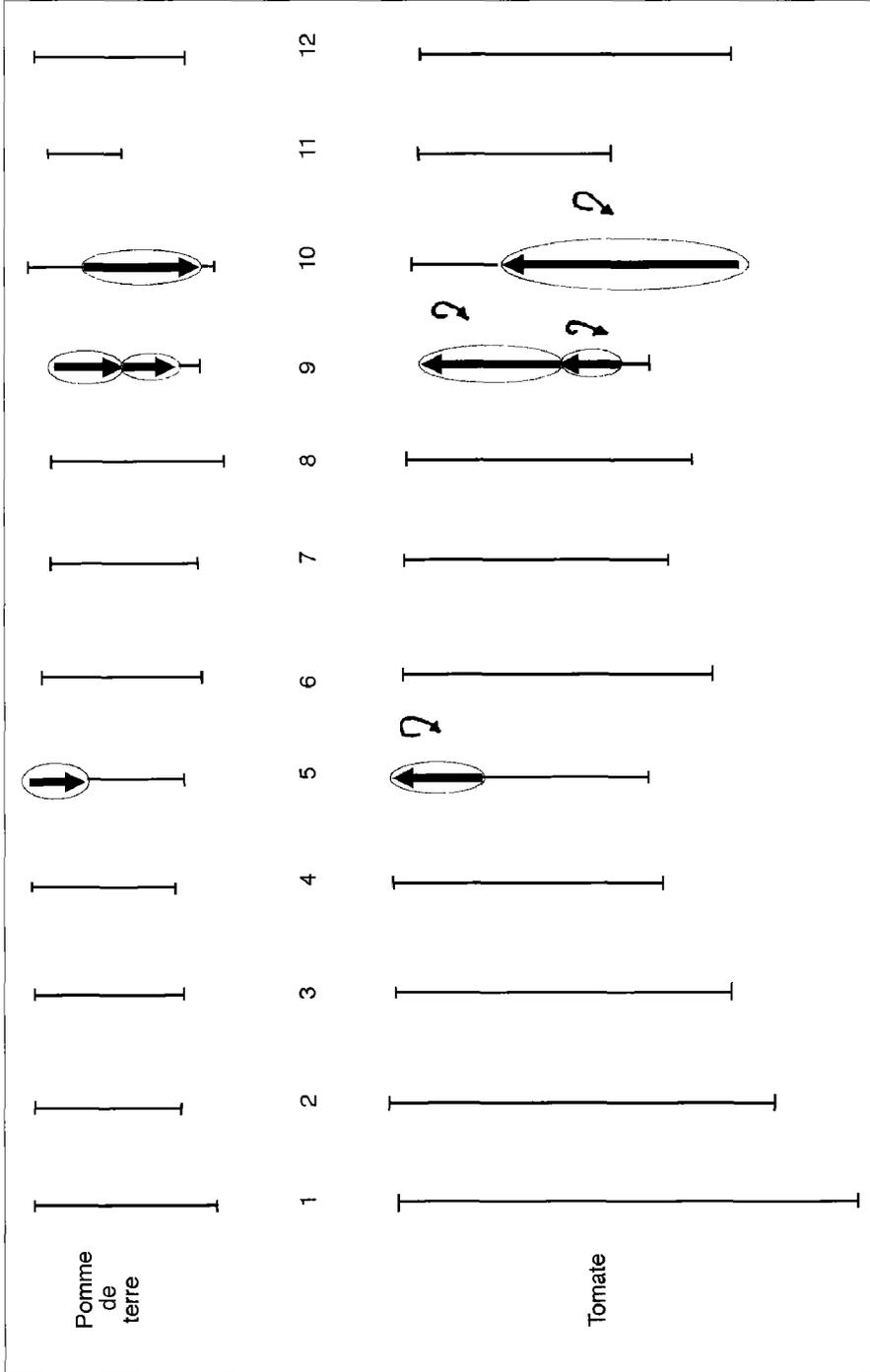


Figure 36. — Comparaison des cartes chromosomiques de la pomme de terre et de la tomate. Les 12 chromosomes de la pomme de terre et de la tomate ne diffèrent que par 4 inversions (ordre des gènes identiques).

tout état de cause, cela relance la réflexion sur la différenciation génétique des espèces et sur les mécanismes génétiques de l'évolution.

Cela nécessite également une meilleure conceptualisation des interactions inter-gènes, ainsi que inter- et intra-linkats (un linkat n'est pas du tout la résultante de l'addition des effets des locus liés).

## Références

1. Bertheau Y. L'amplification enzymatique (PCR). Technique future de détection des agents phytopathogènes. *Phytoma* 1991 ; 439 : 1-48.
2. Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979 ; 76 : 5269-73.
3. Gebhart C, *et al.* RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *TAG* 1989 ; 78 : 65-75.
4. Bellemare G, *et al.* High-yield method for directional cDNA library construction. *Gene* 1991 ; 98 : 231-5.
5. Willam GK, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990 ; 18 : 6631-5.
6. Smith JSC, Smith OS. Restriction fragment length polymorphisms can differentiate among US maize hybrids. *Crop Sci* 1991 ; 31 : 893-9.
7. Lefebvre V, *et al.* Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annum* L). *Euphytica* 1993 ; 71 : 189-99.
8. Semal J, *et al.* *Traité de pathologie végétale*. Gembloux : Les presses Agronomiques de Gembloux ASBL (Belgique). 1989.
9. Dooner HK, *et al.* Variable patterns of transposition of the maize element activator in tobacco. *Plant Cell* 1991 ; 3 : 473-82.
10. Lange R, Thompson R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 1990 ; 124 : 743-56.
11. Paterson AH, *et al.* Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato : comparison across species, generations and environments. *Genetics* 1991 ; 127 : 181-97.
12. Helentjaris T, *et al.* Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied breeding. *Plant Mol Biol* 1985 ; 5 : 109-18.
13. Apuya NR, *et al.* Restriction fragment length polymorphism as genetic markers in Soybean *Glycine max* (L) merill. *TAG* 1988 ; 75 : 889-901.
14. Halward T, *et al.* Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome* 1991 ; 34 : 1013-20.
15. Bonierdale D, *et al.* RFLP maps based on a common set of clones reveals modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 120 : 1095-103.

## **Technologies des transformations moléculaires**

### **Signification de ces technologies**

L'évolution, à partir des premiers ARN et ADN doués de la capacité d'auto-reproduction, s'est déroulée par un enrichissement dans les arrangements des bases puriques et pyrimidiques qui constituent les briques de l'architecture moléculaire. Mais ces arrangements, qui se sont accompagnés d'une diversification des formes visibles des être vivants, n'ont pas donné naissance à un continuum biologique, mais au contraire à des groupes séparés que les systématiciens ont classifiés en familles, genres, espèces... Ces entités distinctes ont la particularité de ne plus échanger de flux génique entre elles (sauf cas exceptionnels). Autrement dit, les formes intermédiaires, transitoires ont disparu, éliminées par la sélection naturelle, ou n'ont pas existé ; c'est-à-dire que l'évolution a pu progresser par bonds successifs franchissant brutalement et irréversiblement des seuils (théorie des catastrophes) [1].

Quoi qu'il en soit, ce clivage constitue pour les sélectionneurs un obstacle majeur leur interdisant d'aller chercher dans une famille botanique voisine le, ou les gène(s) dont ils avaient besoin ; les efforts déployés, pour utiliser l'hybridation interspécifique, montrent à quel point les échanges génétiques, même entre espèces voisines, sont laborieux.

C'est le mérite du génie génétique de permettre aujourd'hui un accès potentiel à la totalité des gènes de l'ensemble du règne vivant et d'entrouvrir des possibilités de transfert de cette information. Les végétaux ainsi transformés sont nommés « plantes transgéniques ».

Cependant, pour que cette involution (remontée dans l'évolution), très prometteuse, puisse aboutir à des plantes bien structurées et très performantes, beaucoup de conditions doivent être réunies au cours des diverses étapes du processus.

A partir du donneur, une fois que la qualité recherchée est décelée, il reste encore à :

- découper son information génétique et repérer la zone intéressante ;
- cloner le gène repéré ;
- associer au gène désiré une séquence «promoteur» qui régule son expression ;
- construire un vecteur ou une technologie vectrice ;
- disposer, pour le receveur, d'une plante, d'un organe, de tissus, de cellules ou de protoplastes aptes à accepter le vecteur ;
- être capable, ensuite, à partir de l'élément précédent, de repérer les tissus transformés et de régénérer une plante transgénique ;
- vérifier, chez la plante nouvelle, que le gène étranger n'est pas rejeté au cours du développement et, dans le cas où l'on utilise la reproduction sexuée, s'assurer que le nouveau gène est bien transmis à la descendance ;
- étudier l'intensité d'expression du gène transféré et surtout l'effet du promoteur sur la régulation temporelle et spatiale de l'expression ;
- évaluer le rendement agronomique et le maintien de l'ensemble des performances des plantes transformées.

## Les étapes du processus

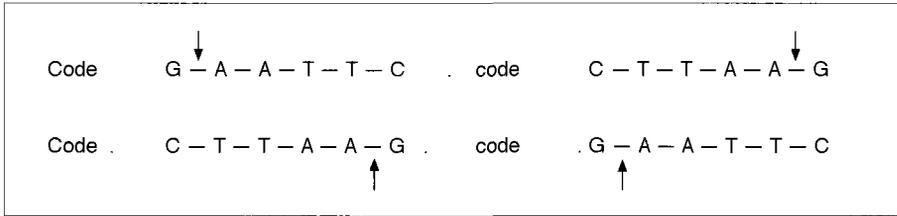
### Repérage et «découpe» d'un gène intéressant chez le donneur

Une fois identifié un donneur intéressant, possédant la qualité recherchée, il faudra réussir à extraire proprement son information génétique et à la découper en fragments. Comme nous l'avons vu au chapitre VII, nous reprenons ici un exposé technique similaire : depuis une vingtaine d'années, on maîtrise l'utilisation d'une famille d'enzymes, les endonucléases de restriction. Chaque type d'endonucléase est capable de découper les deux chaînes de l'ADN chaque fois qu'elle rencontre une certaine séquence de paires de bases (généralement quatre à six paires). Comme l'ensemble de l'information d'un être vivant possède plusieurs fois cette séquence, l'action de l'endonucléase aboutit à la fragmentation du ou des chromosomes en morceaux de différentes longueurs qu'on peut classer par électrophorèse, dans un gel d'agarose par exemple ; on obtient ainsi un électrophorégramme de restriction. Par exemple, l'endonucléase de restriction EcoR1, qui est l'une des plus connues, coupe l'ADN chaque fois qu'elle reconnaît la séquence GAATT C (Fig. 37).

On constate qu'une telle modalité de découpe donne des extrémités appelées «colantes» en ce sens qu'elles se souderaient automatiquement dès qu'on les mettrait en présence [2].

Pour repérer sur l'électrophorégramme de restriction les gènes portés par tel ou tel fragment, il est nécessaire de disposer d'une «sonde» moléculaire.

La manière la plus courante pour fabriquer une telle sonde nécessite souvent que l'on dispose en quantité suffisante du produit du gène intéressant. Cela n'est générale-



**Figure 37.** — Coupure de l'ADN par Eco RI ; formation de «bouts collants».

ment pas trop difficile : il suffit de se placer dans les conditions où ce gène fonctionne au maximum. A partir de ce produit du gène (protéine codée, ou ARN messenger...), on fabrique une sonde par accrochage *in vitro* d'un  $^{32}\text{P}$  nucléotide (c'est-à-dire une base radioactive).

A partir de l'ARN marqué, qui correspond au gène que l'on recherche, la sonde est placée sur l'empreinte de l'électrophorégramme de restriction et va s'hybrider au gène voulu : après lavage, il restera accroché au fragment porteur permettant de le détecter par sa radioactivité. On voit ainsi qu'avec un jeu d'endonucléases on parvient à repérer sur l'empreinte un gène voulu et à l'isoler. L'hybridation moléculaire sonde-gène ne nécessite pas une homologie parfaite : on peut donc aussi faire des sondes partielles «approximatives», synthétisées à partir d'un synthétiseur d'acides aminés, d'une protéine dont on cherche à isoler le gène : on remonte alors au code correspondant puis au gène.

Ces techniques de filiation ADN  $\leftrightarrow$  ARN  $\leftrightarrow$  protéine codée appartiennent à la méthode *Southern* et à ses dérivés: *Northern*, *Western*, etc. Il faut savoir qu'on peut aussi fabriquer des sondes marquées au  $^{35}\text{S}$ , ou encore des sondes non radioactives, dites froides, qui utilisent des réactions de sulfonation par exemple.

## Clonage du gène

Chez certaines bactéries, en plus du chromosome circulaire normal, existent des sortes de minichromosomes, petites molécules d'ADN circulaires de quelques milliers de bases de long appelées plasmides.

On peut couper ces plasmides par les endonucléases de restriction et, chez certaines bactéries, le plasmide ne comporte qu'un seul site de coupure qui peut porter, lui aussi, les mêmes bouts collants que ceux du gène intéressant qui a été découpé avec la même endonucléase.

On peut donc, bout collant par bout collant, insérer le gène voulu dans le plasmide qui devient alors plasmide recombiné.

De plus, pour certains plasmides, la coupure se fait au milieu d'un gène de résistance à un antibiotique : le plasmide voit donc cette résistance cassée alors que le

plasmide non recombiné garde la résistance. On fait réintégrer les plasmides dans des bactéries hôtes choisies pour leur sensibilité à l'antibiotique. En comparant, par la technique des répliques, la croissance des colonies bactériennes dans des milieux avec et sans l'antibiotique, on discerne immédiatement les bactéries porteuses du plasmide recombiné. Leur culture donnera alors une multiplication, quasi infinie, du gène sélectionné. La bactérie *E. coli* est fréquemment utilisée comme «mère porteuse» pour de tels clonages [2, 3].

Ce gène cloné en milliards de copies par la bactérie porteuse est aisément récupérable sur le plasmide recombiné ; il faudra alors l'introduire dans la plante, soit par un vecteur, soit par une technologie d'insertion.

### Vecteurs et transformations directes

On peut utiliser divers types de vecteurs : les plus courants sont les *Agrobacterium* (mais d'autres possibilités sont offertes par les virus, en particulier le virus de la mosaïque du chou-fleur).

*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie du sol qui provoque une tumeur, le crown-gall. Elle parasite la plante d'une manière curieuse, en insérant une partie de son génome dans les chromosomes de la plante : cet «ADN parasite» entraîne comme conséquence un déclenchement de mitoses anarchiques, tumorales, pour la cellule qu'il infecte et une fabrication d'opine qui nourrit l'*Agrobacterium*.

La partie de génome d'*Agrobacterium* qui est intégrée sur le chromosome de la plante est appelée T-DNA. Elle est portée par un plasmide appelé T<sub>i</sub> (*tumor inducing*) [4, 5].

*Agrobacterium rhizogenes* est une autre espèce parasite qui provoque un développement pathologique de formations racinaires, dites *hairy root* sur les tissus hôtes qu'il infecte. Il utilise le même mécanisme que *A. tumefaciens* [6].

Or, avec des techniques semblables à celles que nous avons décrites, il est possible de fabriquer un plasmide d'*Agrobacterium* recombiné, c'est-à-dire portant dans sa région T le gène intéressant qui vient d'être cloné.

Tout naturellement, *A. tumefaciens* va effectuer la transformation, c'est-à-dire le transport du gène et son insertion en un point quelconque des chromosomes de la plante. En fait, on n'utilise pas les souches naturelles d'*Agrobacterium tumefaciens*, mais des souches sélectionnées, où, dans la zone T du plasmide, les gènes responsables de la prolifération anarchique des cellules hôtes et de la synthèse d'opines sont éliminés sans que leur pouvoir de transformation soit modifié. De tels plasmides sont dits «désarmés».

Certaines importantes familles de végétaux, comme les monocotylédones, sont plus ou moins résistantes au crown-Gall. Il est donc important d'ouvrir d'autres technologies pour ces espèces.

On peut alors utiliser la voie de transfert d'information héréditaire très naturelle qu'est le tube pollinique. Ce dernier, en effet, porte jusqu'aux noyaux du sac embryonnaire les deux spermatozoïdes du grain de pollen ; il est également transporteur d'organites cytoplasmiques. Divers auteurs ont utilisé avec succès cette voie pour transporter physiquement soit de l'ADN nu, soit des plasmides T<sub>1</sub> recombinés, jusqu'au noyau de l'oosphère qui donnera alors un embryon transgénique [7].

Les expériences portant sur l'ADN global d'un donneur, bien qu'apportant indiscutablement des transformations, sont d'interprétation difficile : nous ne nous y attarderons pas. En revanche, les expériences portant sur le transfert de plasmide recombiné, *via* la pénétration du tube pollinique, sont très récentes mais apportent incontestablement une voie nouvelle [7].

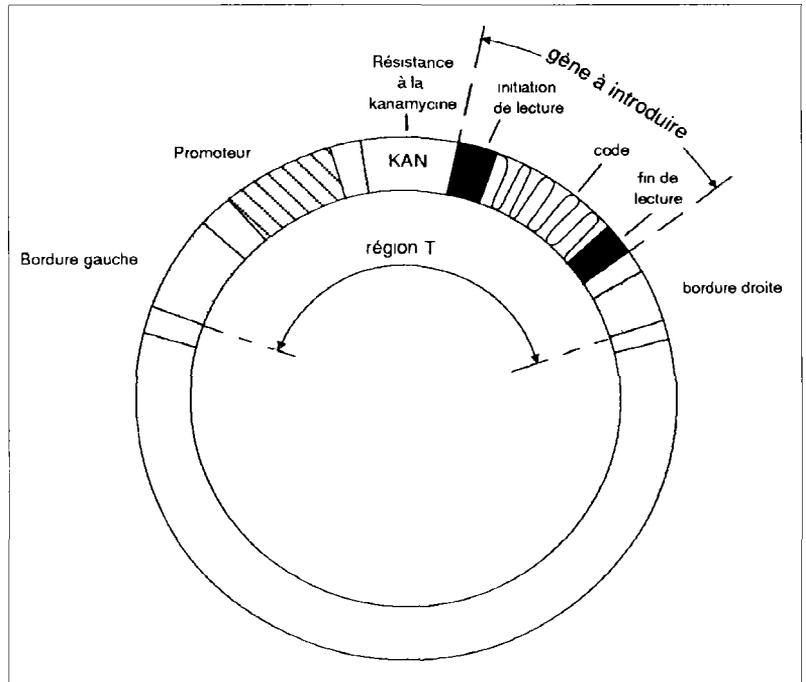
Des transferts directs d'ADN ont aussi été tentés par injection dans divers organes, tissus, cellules, protoplastes. Plusieurs équipes ont ainsi réussi à transformer des protoplastes avec de l'ADN nu additionné au milieu de culture. On peut rendre le transfert plus efficace en soumettant les protoplastes à une décharge électrique qui ouvre de minuscules pertuis dans leurs membranes : c'est l'électroporation. On tente aussi la perforation par laser, ou même l'injection sous pression, dite « canon à ADN ». Ces techniques multiples sont trop récentes, la stabilité des résultats est difficile à apprécier à ce jour.

## Accompagnement du gène

Comme nous l'avons vu à propos du plasmide désarmé, les plasmides véhicules ont été largement manipulés : on a montré l'importance des quelques dizaines de paires de bases de leur extrémité et, entre elles, on a inséré des gènes permettant de reconnaître les cellules transformées, de les sélectionner automatiquement (avec des résistances aux antibiotiques) et surtout on y a intégré l'accompagnement régulant l'expression du gène transféré. En effet, toutes les tentatives pour faire exprimer un gène, transféré seul, se sont soldées par des échecs. Probablement parce qu'il fallait, à côté des séquences codantes, apporter le promoteur et le site d'initiation de la transcription (Fig. 38).

Les promoteurs les plus vulgarisés dans les expériences actuelles sont des promoteurs « forts » entraînant l'expression intense du gène qu'ils bordent, par exemple le promoteur Nos de la nopaline-synthase, ou mieux un promoteur de la RUBP-carboxylase. Ces promoteurs sont dits constitutifs et fonctionnent dans tous les organes de la plante.

Plus récemment, on a sélectionné des zones promoteurs plus longues, contenant des intensifieurs (*enhancer*) et des promoteurs qui n'autoriseront l'expression du gène transféré que là où il le faut et au stade où il le faut. Certains mécanismes assez simples de régulation ont déjà été expérimentés, par exemple, des séquences activatrices, promoteurs d'une protéine de réserve, la phaséoline de la graine de haricot ; introduites dans le tabac, elles ne fonctionnent que dans la graine. Une autre régulation simple du



**Figure 38.** — Le plasmide circulaire  $T_1$  et le gène à introduire.

fonctionnement par la lumière est obtenue en utilisant le promoteur de la petite sous-unité du gène de la RUBP-carboxylase du pois [6, 8].

L'accompagnement du gène introduit comprend encore, dans la grande majorité des expériences, un accompagnement codant pour la résistance dominante à des antibiotiques, de manière que les cellules transgéniques soient automatiquement sélectionnées par l'expression de leur résistance dans un milieu contenant l'antibiotique.

On ajoute enfin le signal approprié de fin de transcription [9]. Les plasmides véhicules ont donc actuellement tous une structure standard (Fig. 38).

### Structures réceptrices

Plusieurs types de tissus, d'organes et la plante entière elle-même peuvent être soumis à l'action de l'*Agrobacterium tumefaciens* ; le taux de transformation est, en général, suffisamment élevé pour ne pas être un facteur limitant. En revanche si la structure réceptrice est pluricellulaire, on recueille alors, d'une part, un ensemble chimère de cellules transformées et non transformées et, d'autre part, parmi les transformées, d'insertions en des loci différents sur les chromosomes. La logique est donc d'utiliser les structures réceptrices les plus petites possibles, l'optimum étant la cellule isolée ou le protoplaste. Mais, dans ces derniers cas, on multiplie la probabilité de transformation par la probabilité de régénération, ce qui, pour certaines espèces,

donne des chances très faibles d'obtenir une plante transgénique. Prenons, par exemple, le cas d'un taux de transformation de 5% et d'une probabilité d'obtention d'une plante viable de un pour mille à partir d'un protoplaste : la réussite de la transformation serait très aléatoire. C'est la raison pour laquelle les laboratoires qui se spécialisent dans ces techniques ont surtout pris comme plante modèle le tabac, ou encore n'utilisent que des espèces où la régénération à partir de disques foliaires *in vitro* est chose aisée : tomate, pomme de terre... Cependant, on a réussi par co-culture avec *Agrobacterium tumefaciens* des transformations sur hypocotyles, sur embryons et sur cellules sexuelles.

Pour identifier les cellules ou les tissus transformés et leur donner un avantage sur ceux qui n'ont pas été touchés, nous avons vu que le plasmide contient un ou plusieurs gène(s) de résistance à un antibiotique : cela permet, lors de la régénération *in vitro* en présence de l'antibiotique, d'éliminer toute prolifération des cellules qui n'ont pas reçu l'insert. L'opération de repérage est donc, ainsi, fortement facilitée.

Dans le même esprit, un raffinement de la méthode pour accroître les taux de transformation consiste à utiliser des souches d'*Agrobacterium* à deux plasmides : le plasmide recombiné désarmé, porteur du gène intéressant à insérer dans le génome de la plante, et un autre plasmide complémentaire contenant les gènes de virulence de T<sub>1</sub>. Ces gènes agissent par épistasie pour intensifier le transfert du plasmide désarmé. Le plasmide virulent auxiliaire est ensuite éliminé par les ségrégations dans les descendants des plantes transformées [9].

Chez les espèces où l'on est capable de régénérer des individus entiers, après culture *in vitro* de racines excisées, on a pu utiliser *Agrobacterium rhizogenes*, où la preuve d'un transfert se traduit par l'émission de racines bien particulières. Ces dernières, une fois prélevées, peuvent *in vitro* régénérer des plantes transformées : pomme de terre, lotier, luzerne, carotte, colza... [6, 10].

Il est clair que les transformations avec pollen-vecteur éviteraient toutes les vicissitudes limitantes de la régénération. Encouragées par de premiers résultats positifs, il est donc logique que des équipes poursuivent dans cette voie, notamment chez les céréales et d'autres monocotylédones où l'utilisation de l'*Agrobacterium* est très problématique [11].

## Comportement de la plante transformée

Lorsqu'une opération de transfert d'un gène intéressant a été réussie, les plantes transgéniques régénérées sont toutes génétiquement différentes, puisque l'insertion de la zone T s'est réalisée en des loci différents sur les chromosomes de la plante. Au vu de ce que nous connaissons aujourd'hui des effets de position et des relations d'épistasie le long d'un chromosome, il est clair que les conséquences de l'insertion ne sont pas identiques pour chaque individu régénéré. On sait actuellement peu de choses sur cet aspect vital pour le succès agronomique de l'opération ; les laboratoires restent discrets, cependant beaucoup de plantes transgéniques sont chétives et déformées. Une

sélection sévère est donc réalisée dès la jeune plante *in vitro*. Cette sélection est concomitante des traitements aux antibiotiques nécessaires pour éliminer l'*Agrobacterium* transformant des plantes régénérées.

Par ailleurs, l'utilisation de promoteurs forts, qui ont pour conséquence un fonctionnement permanent et intense du code inséré, détourne probablement le métabolisme de chaque cellule au profit de ce gène. Pour ces deux raisons, des recherches seront à développer, d'une part, sur le choix de promoteurs spécifiques du gène inséré (autrement dit une «personnalisation» du véhicule T en fonction du type de gène), et, d'autre part, une orientation de l'insert vers les loci les plus adéquats afin de ne pas fragmenter des linkats importants pour la plante.

## Résultats marquants de ces transformations

La complexité des étapes à réaliser pour obtenir une plante transformée de bonne conformation amène, on s'en doute, de nombreuses polémiques sur l'avenir de ces techniques. Cependant certaines réussites démonstratives, encore peu nombreuses, indiquent dans quelles directions des choses intéressantes pourraient être développées.

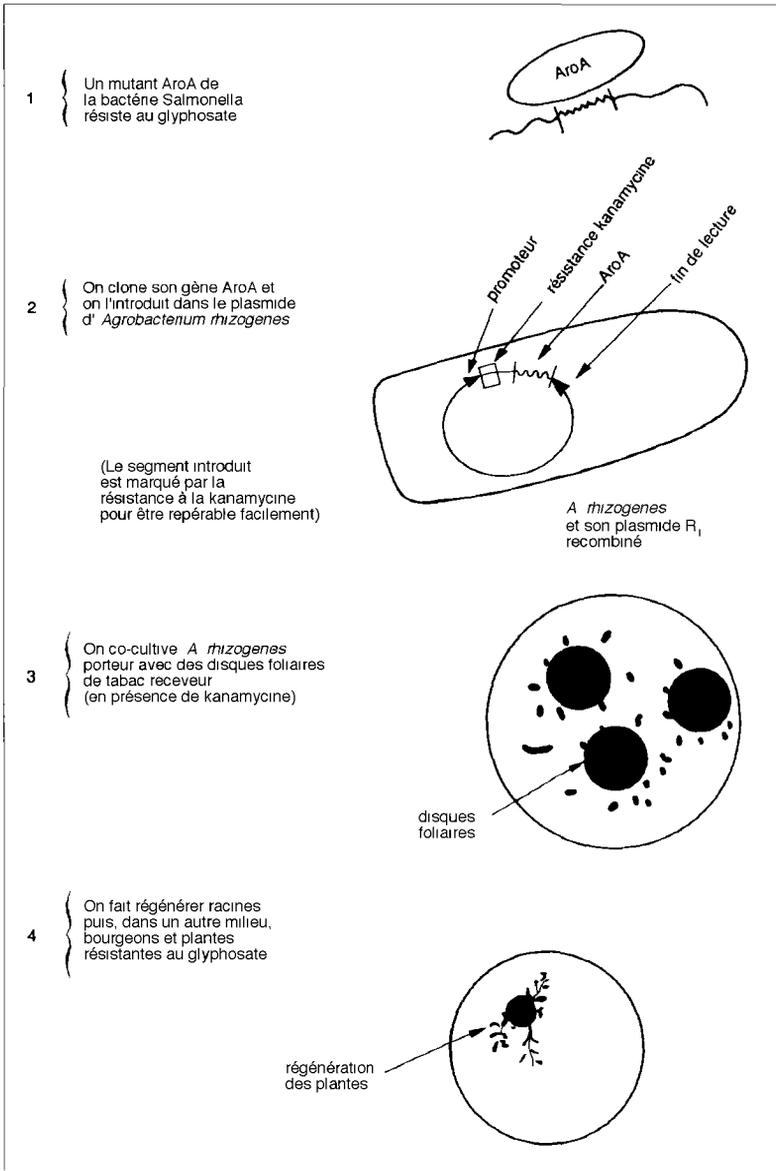
### Utilisation des plasmides T<sub>i</sub> et R<sub>i</sub> pour induire la résistance à des molécules

La première démonstration spectaculaire de plantes transformées présentant un intérêt agronomique est apparue en 1986, quand plusieurs équipes ont annoncé le succès d'opérations apportant des gènes conférant la résistance à une famille d'herbicides : les triazines.

Ces herbicides étaient jusque-là spécifiques du maïs, qui possédait un gène codant pour la détoxification enzymatique de la molécule : ce gène, identifié et cloné, a été obtenu par deux grandes firmes, Monsanto et Ciba Geigy : il a été inséré avec succès chez le tabac, où des plantes résistantes sont en expérimentation au champ. D'autres herbicides ont fait l'objet de recherches intéressantes et spectaculaires. Le Round up® est une marque commerciale d'un désherbant total très efficace, le glyphosate. Or on a découvert une souche mutante de la bactérie *Salmonella* qui résiste à cette molécule : le gène responsable de la résistance AroA a pu être identifié, cloné et introduit sur le plasmide d'*Agrobacterium rhizogenes* par les techniques que nous avons précédemment décrites [12-14].

Le plasmide recombiné R<sub>i</sub> comprenait donc pour la partie transférable la structure suivante : bordure gauche — promoteur fort — résistance à la kanamycine (pour permettre la sélection automatique) — gène AroA — signal de fin de lecture — bordure droite (Fig. 39).

On a réalisé l'infection par *A. rhizogenes* transformant par co-culture *in vitro* de disques foliaires de tabac et de la bactérie en présence de kanamycine. Sur les marges



**Figure 39.** — Exemple d'une transformation : introduction de la résistance à un herbicide, le glyphosate.

des disques foliaires apparaissent assez rapidement les symptômes de l'infection, c'est-à-dire l'émission de racines caractéristiques du *hairy-root*. C'est aussi un indice d'une probabilité de transformation. On fait ensuite régénérer dans un autre milieu de culture ces racines excisées et on obtient des bourgeonnements puis de jeunes plantes de tabac dont la résistance au Round up® a été vérifiée. Depuis cette expérience, des résultats identiques ont été obtenus à partir d'un transfert par le plasmide T<sub>1</sub> d'*Agrobacterium tumefaciens*. Dans la même ligne des recherches de résistance aux herbicides, en 1987, un résultat, à notre avis exemplaire par la méthodologie utilisée, a

été annoncé par la firme belge Plant Genetic Systems à Gand : il s'agit, là encore, d'une résistance à un herbicide total, la phosphinotricine commercialisée sous le nom de Basta® (firme Hoechst).

La molécule de phosphinotricine est produite industriellement en fermenteurs par un actinomycète, le *Streptomyces*. Cet herbicide a le pouvoir d'inhiber la glutamine-synthase, enzyme essentielle chez les végétaux, qui sont donc détruits rapidement. On a donc recherché les raisons qui permettaient au *Streptomyces* de survivre en présence de cette molécule et l'on a pu constater qu'à l'intérieur de l'actinomycète le produit toxique était acétylé et devenait inoffensif. Ce n'est qu'au moment de l'excrétion vers l'extérieur qu'il prenait son pouvoir inhibiteur par désacétylation.

La technologie a donc consisté à repérer et à cloner le gène codant pour l'enzyme acétylase. On a construit le vecteur en y associant un promoteur puissant (le promoteur <sup>35</sup>S de la RUBP-carboxylase). La transformation a été obtenue ici encore par co-culture d'*A. tumefaciens*, vecteur avec des disques foliaires de tabac, pomme de terre, tomate.

Sur ces espèces, après régénération, on a pu vérifier que chez des plantes transgéniques le gène introduit fonctionnait avec une telle intensité que ces plantes toléraient parfaitement une dose cinq fois supérieure à la dose mortelle du dés herbant total.

La plupart des grandes firmes agrochimiques développent aujourd'hui des travaux de ce type qui sont maintenant presque classiques. On peut se demander pourquoi ce choix de la résistance à un dés herbant a été fait.

— D'une part, il faut noter la facilité relative de l'opération : généralement dans tout atelier de production d'un herbicide (ou de toute molécule toxique) survivent des bactéries, des actinomycètes, des levures, mutants qui résistent aux inévitables poussières moléculaires. Il suffit donc de les identifier et de repérer (après analyse du mécanisme, ou non) le gène responsable de la survie : ensuite commence la technologie classique de transfert.

— D'autre part, pour étendre la gamme des utilisations d'un dés herbant ou d'un produit de traitement, il est intéressant de maîtriser des espèces et, mieux, des variétés résistantes à la molécule utilisée. La puissance commerciale du couple variété résistante et molécule phytotoxique est tout à fait évidente.

### Utilisation pour la résistance à des pathogènes et des prédateurs

Il peut cependant paraître plus intéressant d'ouvrir d'autres voies d'applications agronomiques. L'une d'elles continue à étendre ses succès et peut servir de modèle.

Dans le cadre de la lutte biologique, on utilise une pulvérisation d'une bactérie — *Bacillus thuringiensis* — pour lutter contre les chenilles de divers lépidoptères qui ravagent de nombreuses cultures. Le coton est la proie de ces chenilles et sa culture est souvent maintenue à coups de traitements insecticides répétés. Les chenilles processionnaires du pin sont aussi un fléau dans de nombreuses plantations forestières.

*Bacillus thuringiensis* détruit les jeunes chenilles, mites, piérides... en produisant une protéine-cristal toxique pour l'insecte. Mais il a semblé aux chercheurs que l'on pouvait trouver une alternative élégante à la lutte biologique en identifiant chez le bacille le gène responsable de la protéine toxique et en l'introduisant chez la plante. Cela a été réalisé par deux grands groupes : Agrigenetics aux États-Unis et PGS en Belgique. Les résultats belges sont particulièrement démonstratifs puisque tout d'abord les plantes de tabac puis de cotonnier transgéniques tuent maintenant les jeunes larves dès qu'elles apparaissent. Le groupe PGS poursuit actuellement l'opération en l'étendant à d'autres espèces pour d'autres parasites (doryphore de la pomme de terre, par exemple). Ici encore le rendement agronomique de la plante transgénique est à étudier en essais comparatifs. Le bilan économique de la lutte biologique par pulvérisation et de la lutte génétique est à évaluer.

Néanmoins, de nombreuses études portent sur diverses formes de résistance à des maladies cryptogamiques bactériennes ou virales. Par exemple, on s'est aperçu que l'introduction chez le tabac du gène qui code pour la protéine de la capsid du virus de la mosaïque du tabac entraîne une tolérance partielle au virus. Sur la tomate, la même opération a donné contre la mosaïque une très significative protection : 10% seulement des plantes manifestaient des symptômes atténués. On s'attaque actuellement aux ARN satellites du virus de la mosaïque du concombre ou à des fragments de l'ARN du génome de virus à ARN, comme la mosaïque jaune du navet. Dans ce dernier exemple, on utilise la technologie des gènes «antisens», c'est-à-dire qu'on bloque l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel en l'annulant par son contraire. Les premiers résultats positifs encouragent à développer une telle voie dont les perspectives sont très vastes [15, 16].

## Utilisation pour des modifications de constitution ou de fonctions

Dans d'autres domaines, le génie moléculaire commence à déboucher sur des applications concrètes : il s'agit de modification des constitutions en acides aminés, ou de l'inclusion de gène codant pour des enzymes (technologie des enzymes endogènes développée en France à l'Université de Compiègne). Ces deux types de recherche aboutissent à donner sous l'angle qualitatif une plus-value au végétal produit.

Bien que pour l'instant, au plan pratique, aucune plante transgénique améliorée n'ait été produite, l'insertion d'enzymes comme l'invertase pour la synthèse des sucres, les amylases pour la germination, des méthylases dans les chaînes de biosynthèses d'acides gras fait partie de programmes en cours ou très prochainement initiés. Un travail remarquable a été accompli aux États-Unis en vue de l'amélioration de la qualité nutritive des végétaux.

Des chercheurs de l'Université de Louisiane (Bâton Rouge) ont réussi la synthèse artificielle, par un synthétiseur de nucléotides, d'un gène «HEAAE» codant pour un polypeptide trois fois plus riche en acides aminés essentiels que la viande de bœuf, dans l'un de ses sens de transcription, et deux fois plus riche dans l'autre sens (le gène

a été fabriqué, en effet, de manière à être lisible dans les deux sens). Ce gène HEAAE a été cloné et introduit dans le plasmide R<sub>i</sub> d'*Agrobacterium rhizogenes* qui a servi de vecteur pour un transfert sur la pomme de terre. Les tissus des racines transformées ont régénéré des plantes chez lesquelles par trois techniques (*Southern, Northern, Western*) la traduction de HEAAE en protéines a été vérifiée.

Le même groupe a également régénéré des plantes à partir de tissus foliaires après transformation par *A. tumefaciens* désarmé. Cette opération est donc très séduisante. Elle est un raffinement de l'expérience qui avait permis au tabac et au tournesol de produire de la phaséoline. Mais il reste encore toute la recherche de bons promoteurs et intensifieurs qui sera à adapter pour avoir une bonne production de telles protéines [17].

### Des exemples de transformation par le pollen-vecteur

Un certain nombre de travaux tentent de se libérer des servitudes d'une régénération de l'effet pathogène des vecteurs tels que les *Agrobacterium* en utilisant le tube pollinique comme vecteur.

Deux modalités se font jour ; dans le cas le plus fréquent, c'est un excès d'ADN total du donneur, découpé en fragments par les endonucléases de restriction, qui a été mêlé au pollen ou injecté au niveau de la pénétration du tube pollinique pour être propulsé vers le noyau femelle.

Les premières publications par Duan et Chen [18] sur le riz montraient que la descendance de plantes ainsi traitées portait la coloration pourpre de la plante donneuse. Mais aucune preuve moléculaire précise n'était apportée. De même sur le maïs, Ohta [19] avait repris des expériences antérieures considérées comme assez douteuses et apportait la preuve de transformations nombreuses mais mal contrôlées.

Dans ces types d'expériences, il est en effet impossible d'éliminer une action mutagène puissante de l'ADN. D'autres résultats positifs auraient été obtenus à Shanghai sur le cotonnier et le riz. En revanche, depuis ces premiers types d'expériences, les chercheurs ont transféré, par la voie pollinique, non plus de l'ADN nu, mais de l'ADN sous la forme de plasmides recombinés. Les résultats sont alors plus précis et convaincants : ceux de Zhong-Xun Luo et Ray Wu à Cornell (Etats-Unis) [20] utilisent le gène de la néomycine-phosphotransférase npt III cloné et intégré dans un plasmide recombiné avec le promoteur <sup>35</sup>S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Cet ADN plasmidial a été déposé deux à quatre heures après pollinisation sur le style coupé. L'efficacité de la transformation est très élevée puisque jusqu'à 20% des semences de riz, obtenues ainsi, contiennent le gène npt III, comme le prouve l'analyse par la méthode *Southern*.

Par une technique du même type, des résultats similaires ont été obtenus sur le blé grâce à une collaboration entre des laboratoires de l'Institut agronomique de Gembloux (Belgique) et de l'Université d'Orsay (France).

Ces deux laboratoires ont fabriqué un plasmide contenant un gène de résistance à la kanamycine et le gène codant pour l'enzyme phosphotransférase. Chez les plantes transgéniques obtenues, la résistance à la kanamycine a été vérifiée, ainsi que la production de l'enzyme phosphotransférase et, mieux, la présence du gène codant pour l'enzyme par hybridation moléculaire avec une sonde.

Très récemment, une équipe japonaise des Universités de Tohoku et de Tsukuba a obtenu un transfert direct dans des protoplastes de riz par électroporation d'un ADN plasmidial recombiné porteur du gène aminoglycoside-phosphotransférase II (APH [3'] II) et a régénéré plusieurs plantes possédant une activité APH (3') II vérifiée par une sonde sur un *Southern* [7].

Ces voies nouvelles, techniquement plus simples, vont donc permettre aux sélectionneurs d'accéder aux manipulations génétiques (Tableau I).

**Tableau I.** — Liste des principales transformations génétiques réalisées à ce jour.

→ Résistances	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herbicides — Pesticides</li> <li>• Virus — Bactéries — Autres</li> <li>• Sécheresse — Froid — Gel — Chaleur</li> </ul>
→ Modifications	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acides aminés</li> <li>• Glucides</li> <li>• Acides gras</li> </ul>
→ Morphologie-Physiologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Feuillages — Pigments</li> <li>• Systèmes reproducteurs</li> <li>• Maturation</li> </ul>
→ Biosynthèses nouvelles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzymes — Anticorps — Hormones</li> <li>• Alcaloïdes — Pigments</li> </ul>
→ Blocages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de biosynthèses</li> <li>• ARN antisens</li> </ul>
→ Effets mutationnels	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transposons</li> <li>• Directs</li> </ul>
→ Régulations	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promoteurs</li> <li>• Antisens</li> </ul>
→ Adressages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effets post-transcription</li> </ul>

## Problèmes et remèdes

Les facettes des manipulations moléculaires de la plante que nous avons présentées sont loin d'épuiser l'ensemble des potentialités de cette technologie. Cependant, d'ores et déjà, divers problèmes sont apparus.

### Régénération

La régénération des structures transformées reste un obstacle pour certaines familles végétales, notamment pour les monocotylédones malgré des progrès récents. Il est donc nécessaire que les études de base sur l'organogenèse et l'embryogenèse somatique soient repensées. La plupart des travaux dans ce domaine ont été très descriptifs et n'ont pas permis de trouver des lois majeures par suite d'une incapacité à identifier des paramètres transcendant l'observable. Par ailleurs, peu de laboratoires se sont attachés à rechercher et à classer des mutants de développement. Enfin, les biologistes qui abordent ces études possèdent rarement la culture thermodynamique et mathématique permettant d'appréhender la régénération en termes de stabilités structurales et de structures dissipatives.

### Vecteur

Le véhicule-plasmide est de capacité limitée, il ne permet pas d'embarquer de longs fragments de la molécule d'ADN tels que des batteries de gènes organisées en linkats. Les transformations réalisées à ce jour sont toutes monofactorielles ; en ce sens elles ne donnent pas un accès facile à des caractéristiques polygéniques nécessitant des linkages, des épistasies, des régulations en cascade : par exemple, le transfert de l'aptitude à la fixation symbiotique de l'azote sera certainement une opération très laborieuse et à long terme, car elle devrait porter sur au moins une vingtaine de loci. De même, le transfert de protections contre des pathogènes qui seraient monogéniques apporterait une résistance dite verticale que la plupart des pathogènes savent assez rapidement contourner.

L'insertion du fragment plasmidial recombiné se fait vraisemblablement de manière aléatoire et, dans la plupart des cas, en des loci qui apporteront une perturbation brutale à la balance interne de la plante. Pour avoir une «bonne» insertion, il faut donc en réaliser beaucoup ; il faudrait aussi initier des recherches sur le guidage de l'insert vers des loci privilégiés.

L'aspect pathogène des bactéries vectrices, ou des virus vecteurs, n'est pas négligeable ; même «désarmé», le plasmide  $T_i$  est accompagné de la bactérie. Avec *A. rhizogenes* il faut pouvoir guérir le hairy root. De plus, la construction des plasmides recombinés n'est pas toujours très simple.

Certes les transformations directes par pollen-vecteur ou par électroporation pourraient être un allégement des techniques, mais il semble pour l'instant que cette voie implique, pour un bon succès, la présentation de l'ADN exogène sous forme du plasmide recombiné.

## Performances des plantes

Le rendement agronomique des plantes manipulées n'est pas encore pleinement évalué. Comme on pouvait s'y attendre, les résultats sont contradictoires : certaines insertions sont plus dommageables que d'autres, certains promoteurs ont une meilleure économie de la thermodynamique cellulaire. Quoi qu'il en soit, la zone «amont» du gène codant transféré doit être soigneusement préparée pour permettre une expression intense du gène, à l'instant voulu, dans les tissus voulus et en harmonie avec le reste du programme génétique : malgré des progrès sur la production des promoteurs inducibles, nous sommes encore loin d'une bonne maîtrise de l'environnement de la zone codante. Il n'est donc pas étonnant que la majorité des plantes transgéniques n'ait pas l'équilibre et la vigueur d'une bonne variété. Quelques cycles de sélection récurrente portant sur une population des plantes issues d'une opération de transformation permettraient peut-être de rééquilibrer les nouveaux rapports linkats-épigénique.

## Législation et éthique

En dernier lieu, les manipulations génétiques des plantes soulèvent des problèmes d'éthique, de sécurité, de droit de propriété que nous citons mais que nous n'analyserons pas.

## Références

1. Ekeland I. La théorie des catastrophes. *La Recherche* 1977 ; 81 : 745-54.
2. Crépin M. *Expression des gènes et génie génétique*. Paris : Hermann, 1987.
3. Brégegère F. Les techniques des manipulations génétiques. *Science et Vie*, numéro spécial «Le Génie génétique» 1980 ; 133 : 58-69.
4. Koukolikova Z, *et al.* Involvement of circular intermediates in the transfer of T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 1985 ; 313 : 191.
5. Zambrisky P, *et al.* Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *Embo J* 1983 ; 2 : 2143.
6. Tempé J, *et al.* La manipulation génétique des plantes. *La Recherche* 1987 ; 188 : 696-709.
7. Picard E, *et al.* Genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum*) by plasmid DNA uptake during pollen tube germination. In : Miller TE, ed. Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium Cambridge, 1988.

8. Herrera-Estrella L, *et al.* Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a T<sub>1</sub> plasmid-derived vector. *Nature* 1983 ; 303 : 209.
9. Magnien E, *et al.* *Genetic engineering of plants and micro organisms important for agriculture*. Dordrecht, Boston, Lancaster : Martinus Nijhoff/DRW Junk, 1985.
10. Birot AM, *et al.* Studies and uses of the R<sub>1</sub> plasmids of *Rhizobacterium rhizogenes*. *Physiol Vég* 1987 ; 25 : 323-35.
11. Tacchini P, *et al.* Transformation in plants. In : Nestle Research News 1986-1987, Nestlé. Le Mont/ Lausanne, Suisse : Jean Genoud SA.
12. Shah D, *et al.* Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 1986 ; 233 : 478.
13. Hernalsteen JP. An *Agrobacterium* transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *Embo J* 1985 ; 3 : 3039.
14. Comañ L, *et al.* Expression in plants of a mutant AroA gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 1985 ; 317 : 741.
15. Ahlquist P, *et al.* Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 7066.
16. Morch MD, *et al.* A new «sense» RNA approach to block viral RNA replication *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 1987 ; 15 : 4123-30.
17. Jaynes JM, *et al.* Plant protein improvement by genetic engineering : use of synthetic genes. *TIBTECH* 1986 ; Dec : 314-20.
18. Duan X, *et al.* Variation of the characters in rice induced by foreign DNA uptake. *China Agricul Sci* 1985 ; 3 : 6-9.
19. Ohta Y. Direct transformation in corn. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 715-9.
20. Zhong-xun Luo *et al.* A simple method for the transformation of rice *via* the pollen-tube pathway. *Plant Mol Biol Report* 1988 ; 6(3) : 165-74.

## Nouveaux paramètres pour la création dans le domaine végétal \*

L'une des préoccupations majeures des sélectionneurs est la stabilisation et la reproductibilité des cultivars améliorés qu'ils ont pu obtenir. La reproduction sexuée d'un individu supérieur donne généralement des descendance en ségrégation qui ne maintiennent que très imparfaitement le haut niveau de performances dans le champ de l'agriculteur. Cela a d'ailleurs été ressenti depuis des siècles et explique très bien pourquoi nos pommes reinettes, nos poires passe-crassanes ou nos cerises bigarreau ont été multipliées par greffage.

### Des variétés moins hétérogènes

Des biotechnologies *in vitro* sont en passe de généraliser la variété-clone (c'est-à-dire la copie végétative uniforme de l'individu d'élite) pour nombre de nos cultures. Sans parler des orchidées, des sainpaulias, des gerberas, des nombreuses plantes vertes déjà depuis quelques années multipliées *in vitro*, les premières plantations expérimentales des vitroplants de palmier à huile, de bananier, d'ananas, de caféier et de canne à sucre se mettent en place. De même les premiers vergers de pêcheurs, de pommiers ou de poiriers issus de culture *in vitro* entrent en production. Cette technique touche aussi une part sans cesse croissante de nos rosiers et un nombre de plus en plus grand de plants forestiers. Pour les décennies qui viennent, les plantes maraîchères et les plantes de grande culture seront successivement touchées ; nous verrons les vitroplants de tomate, d'aubergine, d'artichauts, de laitue, de carotte, d'asperge, de poireau, de soja, de porte-greffe de vigne... Simultanément, par la voie de semences artificielles (copies cellulaires donnant des embryons en milieu liquide, puis stabilisation par un enrobage nutritif et protecteur), pourront apparaître de toutes nouvelles variétés de betteraves, de tournesol, de soja, peut-être même de maïs et de luzerne.

---

\* D'après : L'impact possible des biotechnologies sur les semences de l'an 2000. IAA 1987 ; 1 : 15-21.

Lorsqu'une variété présentera une imperfection (sensibilité à une nouvelle race parasitaire, composition en acides aminés à modifier, fertilité à améliorer...), on tentera de modifier les cinétiques de la régulation en recherchant, *in vitro*, une gamme de variants autour du génotype considéré. Une judicieuse recombinaison entre variants pourra susciter un effet de luxuriance et aboutir à une nouvelle variété corrigée et plus vigoureuse. Déjà de nombreuses variations ont été signalées après culture *in vitro*, non seulement pour des résistances à des pathogènes (chez la canne à sucre, la pomme de terre, la luzerne, le tabac, etc.), mais aussi pour l'insensibilité à des désherbants (tabac, chou, tomate...), ce qui donne au couple «désherbant-génotype résistant» une valeur commerciale considérable.

Pour la fin de ce siècle, nous verrons apparaître les premières variétés issues d'hybridations somatiques par fusion de protoplastes ou transferts d'organites : des prototypes de luzernes plus rustiques, de colzas permettant l'exploitation de la vigueur hybride et de tomates modifiées par des caractères ancestraux sont déjà en observation. De nouvelles formes ne vont pas tarder à apparaître. Elles ne seront vraisemblablement pas spectaculaires : la betterave-carotte, la tomate-melon, etc. font partie des utopies, bien qu'il soit aisé de les réaliser au niveau cellulaire. En revanche des échanges génétiques très positifs entre espèces apparentées peuvent être raisonnablement tentés : la tomate-aubergine, le pois-soja, le trèfle-luzerne devraient fournir un certain taux de nouvelles formes exploitables.

Des plantes transgéniques feront vraisemblablement leur apparition sur le marché. Au début, elles constitueront un matériel rare possédant de nouvelles potentialités enzymatiques utilisables par les industries agro-alimentaires (brasserie, biscuiterie, industries de fermentation de sous-produits...), des gènes de dégradation rapide de substances toxiques (herbicides, pesticides...) ou des facteurs de lutte contre des prédateurs ou des pathogènes (alcaloïdes, acidité ou perméabilité cellulaire modifiées...).

L'ensemble de ces nouveaux végétaux, qu'ils soient variants, hybrides somatiques ou transgéniques, nécessitera très probablement une diffusion initiale sous forme de cellule de méristèmes, vitroplants, semences artificielles. La variété-clone va donc devenir une structure génétique très fréquente dans le panorama des cultivars de demain. L'uniformité interne de ces variétés ne manque pas de poser de multiples problèmes à la fois pour le sélectionneur et pour l'exploitant agricole. Les variétés jusqu'ici diffusées, même si elles présentaient une bonne homogénéité agronomique (notamment chez les variétés lignées pures ou hybrides  $F_1$ ), gardaient, pour la plupart, une certaine réserve de polymorphisme génétique qui leur donnait à la fois une souplesse adaptative et une diversité de cibles défavorisant le développement explosif d'une souche parasite spécifiquement virulente. La diffusion éventuelle d'une variété-clone (à variance génétique théoriquement nulle) sur de grandes superficies va imposer au sélectionneur le développement de nouvelles stratégies.

## La sélection individuelle

On assiste donc à une mutation dans les stratégies de sélection. Les chercheurs chargés de l'amélioration d'une plante suivaient de très près la généalogie de leurs familles sélectionnées. La valeur moyenne des descendance et leur homogénéité constituaient des paramètres importants : il fallait fixer des lignées ou stabiliser les parents d'un hybride. Dans tous les cas, de bonnes performances moyennes et des faibles variances constituaient les objectifs.

A présent, toutes les filières qui aboutiront à des variétés-clones ont pour source le choix d'un individu exceptionnel, appelé tête de clone ; cet individu aura été choisi après des interventions biotechnologiques plus ou moins fines, mais il faudra être capable de le repérer précisément parmi une foule de ses congénères issus de mêmes opérations.

A l'appréciation et au choix des moyennes familiales et sur des généalogies de bons génotypes, doit donc se substituer la création de l'être d'exception décelé grâce à l'utilisation des indicateurs les plus sensibles et les plus précoces des performances individuelles.

Les estimations seront donc plus difficiles, et cela d'autant plus que nous savons très bien que c'est la performance de l'individu placé dans les conditions de densité et de compétition du champ qui a une signification.

Le choix des têtes de clones ne sera donc pas tâche aisée : il faudra réaliser des microparcelles à densité agronomique tout en effectuant sur chaque plante le maximum de sondages analytiques (chimiques, physiques, biométriques, etc.). Pour un certain nombre d'études, les opérations de choix se feront sur des organes spécialisés de la plante : cellules épidermiques ou stomatiques et variants de résistance à la pénétration des pathogènes, culture de gamétophytes pour tester les gamétocides, screening des fongicides pour les pathogènes du sol et des nématocides sur des cultures de racines excisées, voire tests de certains herbicides ou d'autres substances sur échantillons vivants de chloroplastes, de mitochondries ou de ribosomes.

En revanche les possibilités de clonage du super-individu présentent un aspect très positif en ce sens que le sélectionneur voit, lorsqu'il choisit, le phénotype exact de la variété qui sera diffusée. Alors qu'avec les méthodes conventionnelles on façonnait au cours des générations de ségrégations successives la future variété, les choix des premières générations s'opérant avec un flou notoire sur le phénotype du produit final.

## Des méthodes rapides mais brutales

D'autres biotechnologies, telles que les régénérations à partir des cultures de cellules gamétiques *in vitro*, vont raccourcir très significativement les délais de sortie des nouvelles variétés. Cela modifiera les compositions génétiques de ces nouveautés de

trois manières : à la date de sa commercialisation, un cultivar aura profité d'un matériel de départ plus moderne, donc plus performant, il aura aussi exploité des techniques d'analyse, d'identification, de transformation plus récentes, enfin il devrait représenter une meilleure adéquation aux désirs du consommateur, l'objectif-cible plus proche étant nettement plus facile à cerner.

La raccourcissement des procédures de sélection a pour conséquence une durée réduite d'expérimentation en diverses conditions des génotypes retenus. Dans les sélections généalogiques, durant quatre ou cinq générations, on pouvait affiner la fixation d'un groupe de familles en fonction du climat de l'année, des crises de pathogènes, des aptitudes d'adaptation régionales ; sur un nombre élevé de plantes, la sélection se faisait tout en douceur. Les diverses voies biotechnologiques nous livreront de plus en plus des lots d'individus d'exception, chacun d'entre eux assez profondément remanié dans sa structure ou sa régulation génétique. Les choix seront donc brutaux et nécessiteront, comme on l'a vu, une exploration individuelle infaillible. Certes, on devra *a posteriori* évaluer le comportement du clone, dans des environnements variés, mais il ne restera aucune souplesse d'ajustement. On voit ici que l'activité du sélectionneur est en cours d'évolution, l'essentiel des efforts et des moyens étant déporté vers les manipulations d'amont et l'appréciation primaire des performances génotypiques. Contrairement à ce que l'on peut penser, les biotechnologies qui se mettent en place sont des techniques perturbantes pour la plante domestiquée, elles brisent les associations des batteries de gènes, elles désorganisent les co-adaptations entre le noyau et les populations d'organites cytoplasmiques ; dans la plupart des cas, au cours des phases de manipulations *in vitro*, elles opèrent donc une régression de l'âge à la fois physiologique et évolutif de la plante, donnant des individus plus jeunes et plus proches de leurs formes ancestrales. Ces remarques, confirmées par les génotypes déjà observés, amènent à penser que dans les phases des programmes de sélection une méthodologie de la réadaptation à l'état domestiqué est à développer par des cycles récurrents d'ajustement d'une régulation appelée épigénétique (parce qu'elle concerne l'environnement génétique des ADN codants).

## L'ouverture vers de nouvelles sources de gènes

Les sélectionneurs ont depuis longtemps été gênés par les barrières entre espèces. Au cours de l'évolution, les domaines biologiques se sont fragmentés en archipels d'espèces entre lesquelles les flux génétiques étaient impossibles ou très rares. Une telle spéciation correspondant aux ajustements dans des écosystèmes naturels est thermodynamiquement très compréhensible. Elle est cependant très limitante pour l'améliorateur, qui désire souvent prélever chez d'autres espèces ou dans d'autres genres les qualités à introduire sur la plante qu'il travaille. Les progrès de la cytogénétique aidée par l'élevage «en couveuse» *in vitro* des embryons issus de croisements délicats, les fécondations *in vitro*, les hybridations somatiques par fusion de proto-

plastides, les transferts d'organites et de gènes représentent une meilleure gradation dans les possibilités d'ouverture vers de nouvelles sources de gènes.

Cela explique tout le bruit fait autour des collections d'espèces, des banques de génotypes, des vitrothèques et des bibliothèques de gènes. La gestion intelligente des ressources génétiques est à l'ordre du jour ; elle intéressera de plus en plus chaque sélectionneur. Comme la possession de certains génotypes résistants peut constituer une arme stratégique «verte» de grande importance, surtout chez les espèces alimentaires de base, les divers pays se trouvent confrontés à cette délicate alternative d'organiser au plan national, un réseau coûteux et forcément incomplet, ou d'adhérer à des organisations internationales puissantes. Des solutions intermédiaires devraient logiquement être adoptées, car toute collection qui n'est pas accompagnée d'une évaluation des potentialités de chaque «entrée» n'est qu'un outil statique et peu accessible à l'utilisateur. On commence donc à voir se développer, en amont de la sélection, mais en étroite articulation avec elle, une activité nouvelle, étudiant notamment les techniques de prospection des écotypes dans leur zone d'origine ou dans leurs régions de différenciations secondaires, les stratégies d'identification et d'échantillonnage dans les sites prospectés et mettant au point les méthodologies de préservation et d'évaluation sous diverses formes : plantes entières, semences, méristèmes ou embryons *in vitro*, pollens, chromosomes ou gènes isolés... Cette gestion «bancaire» des richesses génétiques sera en outre élargie aux gènes manipulés, aux cytoplasmes, aux vecteurs génétiques, aux collections soigneusement isolées de souches de pathogènes qui permettront des criblages de résistance, etc. Nous assistons donc véritablement à la naissance d'un nouveau secteur dont la gestion informatisée est évidente et qui ne peut laisser indifférents ni les scientifiques ni les politiques.

## **Des variétés «clones hybrides»**

On appelle hétérosis les gains de vigueur et de performances générales liés à l'état hybride. L'hétérosis est l'antithèse de la dépression due à la consanguinité ou à une trop grande homogénéité génétique.

Pour créer une nouvelle variété de qualité, l'exploitation de la vigueur hybride est une solution intéressante. De nombreuses recherches de génétique des populations et de génétique quantitative ont défini les meilleurs schémas de sélection pour aboutir aux meilleures combinaisons statistiques entre gènes. La diversité génétique se gère à partir des distances génétiques entre géniteurs ; on cumule les fréquences des assemblages favorables par des cycles de sélections récurrentes ; on a mis au point les prédicteurs mathématiques des interactions géniques les plus favorables.

Comme un bon nombre de nos plantes domestiquées sont à la fois mâles (elles produisent du pollen) et femelles (elles ont un pistil et un ovaire contenant des ovules), les risques de consanguinité sont importants lors des multiplications de la semence qui sera vendue au cultivateur : la variété perdra alors le bénéfice de sa vigueur hybride.

Par ailleurs, bon nombre d'espèces d'intérêt majeur — le blé, le riz, l'orge, les haricots, les pois, le soja, l'arachide, etc. — ont des organisations florales qui privilégient l'autofécondation (qui constitue le niveau le plus poussé de croisement consanguin). On comprend alors les raisons qui ont poussé de nombreux laboratoires à investir dans des recherches sur la stérilité mâle (interventions mécaniques, chimiques ou génétiques qui aboutissent à la stérilité du pollen). Les plantes ainsi conditionnées ne peuvent se comporter que comme des femelles et les semences récoltées sur de telles plantes proviennent donc de fécondation croisée : elles peuvent donc maximiser l'hétérosis si le génotype pollinisateur a été judicieusement choisi. Malheureusement, les semences ainsi produites coûtent cher : tout producteur de tomates hybrides en a fait l'expérience, et les jardiniers amateurs connaissent le prix de quelques grammes d'un sachet de muflier ou de pétunia ou de choux hybrides  $F_1$ . Et par ailleurs, pour beaucoup d'espèces telles que le blé, l'orge, la laitue, les principales légumineuses, beaucoup de protéagineux, la valeur hybride n'a pu être exploitée au niveau du cultivateur ; on peut estimer à environ un quart le potentiel de productivité que nous sommes ainsi contraints de laisser échapper.

Par chance, dès demain, l'utilisation de variétés clones, soit sous la forme du repiquage de vitroplants, soit par semis de graines artificielles, permettra une valorisation rapide d'un niveau optimal d'hétérosis à une majorité des espèces domestiquées : il suffira de multiplier en millions d'exemplaires le meilleur individu hybride, même s'il a fallu des castrations et des pollinisations laborieuses et coûteuses pour l'obtenir. Les multiples tests d'aptitudes à la combinaison, les longues sélections récurrentes, les stabilisations de lignées parentales, les pesantes gestions de cytoplasmes induisant la stérilité mâle et les délicats ajustements de dosage de gamétocides risquent de se trouver relégués au second plan, par l'apparition de ces vitroplants et de ces semences artificielles hybrides, très rapidement mises à la portée de l'agriculteur.

## Des réseaux «Nord-Sud»

La maîtrise des cycles de reproduction de la plante permet de multiplier plants et semences en dehors de toute contrainte pédo-climatique. A la limite on pourrait ainsi, dans un hall industriel de n'importe quelle banlieue, produire des semences d'une espèce adaptée à un point quelconque du globe. Les spécialisations semencières régionales risquent fort d'être petit à petit atténuées.

Ces biotechnologies ne vont-elles pas accentuer le déséquilibre entre les pays industrialisés et ce qu'il est convenu d'appeler le tiers monde ?

Nous avons cette chance dans le domaine des biotechnologies végétales que le facteur limitant ne soit pas le coût des installations, ni leurs frais de fonctionnement (encore qu'ils ne soient pas négligeables), mais les aptitudes humaines. Les principales opérations nécessitent une connivence intime entre la plante, ses composantes cellulaires, nucléaires, moléculaires et l'opérateur ; cela oblige à une éducation et un

entraînement de plusieurs années. La formation de jeunes spécialistes de tous pays devrait donc devenir un objectif prioritaire. La Chine nous donne une très belle démonstration de la mise à la disposition rapide auprès des agriculteurs de plantes issues de biotechnologies. Nombre de petites installations réparties dans des communes rurales peuvent pratiquer des cultures *in vitro* et valoriser leurs propres produits. Si, dans une première phase coûteuse, des laboratoires français s'attachent par fusion de protoplastes à créer des génotypes de tomates résistants à la sécheresse, des luzernes irrigables par l'eau saumâtre, si, en métropole, on définit les modalités d'obtention de vitroplants ou l'embryogenèse somatique du palmier à huile, du dattier, du caféier, de l'avocatier, de la canne à sucre, du jojoba, etc., c'est pour qu'ensuite les processus mis au point puissent être transférés près de lieux de production permettant à des chercheurs autochtones, formés chez nous, de maintenir un échange privilégié d'informations techniques et scientifiques. Car il ne faut pas perdre de vue que toutes ces technologies sont en évolution permanente : leur valorisation optimale nécessite donc une compréhension et un dialogue constants entre les laboratoires plus fondamentaux et les unités de développement *in situ*.

Bien plus, l'obtention de variants résistants à certains pathogènes (dattiers résistants au bayoud, ce fusarium qui est la plaie des palmeraies maghrébines et qui gagne vers l'Orient, bananiers-plantains résistants à la cercosporiose noire, etc.), à certains environnements difficiles (coups de chaleur desséchante, salinité, toxicité aluminique, etc.) devrait nous permettre de fournir des solutions à des populations en difficulté.

Seules des technologies libérant des contraintes du sol et du climat peuvent être à la source de cette nouvelle forme de dialogue réduisant le déséquilibre entre pays industrialisés et certaines régions du globe. Ces stratégies modernes associent en effet trois conditions qui permettraient de valoriser les coûts de correction de certains facteurs limitants dans des pays où, en revanche, l'ensoleillement et la température créent les conditions d'une luxuriance végétale spectaculaire :

- la formation, dans nos laboratoires, des spécialistes autochtones, sur des sujets qui les intéressent directement ;
- la fourniture de génotypes adaptés ;
- le développement dans des unités installées *in situ* de la production en masse de ces génotypes et leur valorisation.

Ici encore, le passionnant métier de créateur de variété est en cours d'évolution : de nouvelles réflexions, de nouveaux centres d'intérêt, de nouveaux problèmes apparaissent, qui vont vivifier cette profession.



LOUIS - JEAN  
avenue d'Embrun, 05003 GAP cedex  
Tél. : 92.53.17.00  
Dépôt légal : 131 — Février 1996  
Imprimé en France





La collection **Universités francophones**, créée en 1988 à l'initiative de l'UREF, propose des ouvrages modernes répondant aux besoins des étudiants de deuxième et troisième cycle universitaire ainsi qu'aux chercheurs francophones, et se compose de titres originaux paraissant régulièrement.

Leurs auteurs appartiennent conjointement aux pays du Sud et du Nord et rendent compte des résultats de recherches et des études récentes entreprises en français à travers le monde. Ils permettent à cette collection pluridisciplinaire de couvrir progressivement l'ensemble des enseignements universitaires en français.

Enfin, la vente des ouvrages destinés aux pays du Sud, à un prix préférentiel, tient compte des exigences économiques nationales et assure une diffusion adaptée aux pays francophones.

Ainsi, la collection **Universités francophones** constitue une bibliothèque de référence comprenant des ouvrages universitaires répondant aux besoins des étudiants, des enseignants et des chercheurs de langue française.

---

Les stratégies de l'amélioration des plantes s'appuyaient traditionnellement sur la génétique mendélienne et les théories quantitatives qui en dérivent. La maîtrise de la reproduction sexuée et des garnitures chromosomiques en était les outils classiques. Depuis une bonne dizaine d'années, les biotechnologies ont offert des perspectives élargies ; il convenait donc de faire une évaluation critique des possibilités, ouvertes par ces voies nouvelles, dans chacune des diverses étapes d'un processus de création d'un nouveau type végétal. Les scientifiques, qu'ils soient hommes de terrain ou de laboratoire, étudiants, enseignants, chercheurs ou ingénieurs, devraient trouver dans cet ouvrage une aide pour le choix de la stratégie la plus rationnelle en fonction de paramètres comme l'efficacité, la durée, l'équipement, la technicité...

Prix France, DOM-TOM, Europe occidentale, Amérique du Nord, Japon : 160 FF • Prix autres pays : 80 FF •  
Prix Afrique (zone CFA) : 40 FF



I.S.S.N. 0993-3948  
Diffusion HACHETTE D.I. ou ELLIPSES selon pays  
Distribution Canada D.P.L.U.

59.4195.0