

De nouvelles approches pour de nouveaux enjeux

Les différentes approches des biotechnologies ont produit des outils applicables à la conservation des ressources génétiques des arbres forestiers. Ces outils servent également à multiplier du matériel végétal destiné à la sélection ou la diffusion de variétés végétales.

La culture *in vitro*

La culture *in vitro* de tissus végétaux consiste à propager végétativement des plantes ou parties de plantes en conditions stériles dans un environnement contrôlé. Elle permet et nécessite à la fois l'assainissement des végétaux concernés (insectes, acariens, virus, phytoplasmes, bactéries et champignons). Les techniques utilisées procèdent de trois démarches types qui peuvent se combiner : 1) une

version miniaturisée – éventuellement en cascade - de procédés classiques de multiplication végétative comme le bouturage ou le greffage, 2) la production d'embryons (dits somatiques, harvengt et Lelu 2003) sans passer par la voie sexuée ou 3) la culture de cellules isolées. Elle s'accompagne d'une miniaturisation contrôlée des plantes, qui facilite la modification de leur physiologie. On obtient ainsi des effets de restauration de la vigueur et de la morphologie juvénile, facilitant la multiplication, en particulier du point de vue de l'enracinement, à partir d'individus âgés.

L'effet est particulièrement spectaculaire chez les conifères dont la capacité d'enracinement décroît très rapidement avec l'âge. Ainsi, la culture *in vitro* de

bourgeons de séquoia multicentenaire permet, contrairement au bouturage classique, d'en produire des plants s'enracinant vigoureusement et présentant une morphologie juvénile (Arnaud *et al.* 1993 et figure 1). Chez les espèces qui se bouturent, la culture *in vitro* est fréquemment utilisée pour produire des pieds mères fournissant des pousses plus nombreuses et plus aisément enracinables. La culture étant réalisée en laboratoire, elle s'affranchit des contraintes saisonnières, permettant de produire l'hiver des végétaux qui pourront immédiatement être travaillés en pépinière dès le début de la saison de végétation. Pour les espèces ou individus/variétés rares et/ou disponibles en quantité limitée, la culture *in vitro* permet une multiplication végétative efficace - même si le végétal considéré est complètement réfractaire aux techniques classiques – avec une mise à disposition rapide et synchrone d'une quantité suffisante de matériel végétal pour reconstituer ou diversifier une population ou encore implanter un verger à graines.

La cryoconservation

La cryoconservation est la conservation cryogénique (soit à ultra basse température, habituellement dans l'azote liquide à -196°C) de matériel végétal. Il peut s'agir de pollen, de graines ou de fragments de plantes. Le pollen et les graines peuvent généralement être conditionnés et réactivés de manière simple (pollinisation et germination *in vivo*). Les fragments de plantes doivent soit posséder une capacité naturelle à survivre à la congélation (bourgeons pleinement dormants), soit être conditionnés de manière parfois très complexe à l'issue d'une étape préalable de multiplication *in vitro*. Par ailleurs, les fragments de plantes cryoconservés doivent obligatoirement passer par la culture *in vitro* lors de leur réactivation.

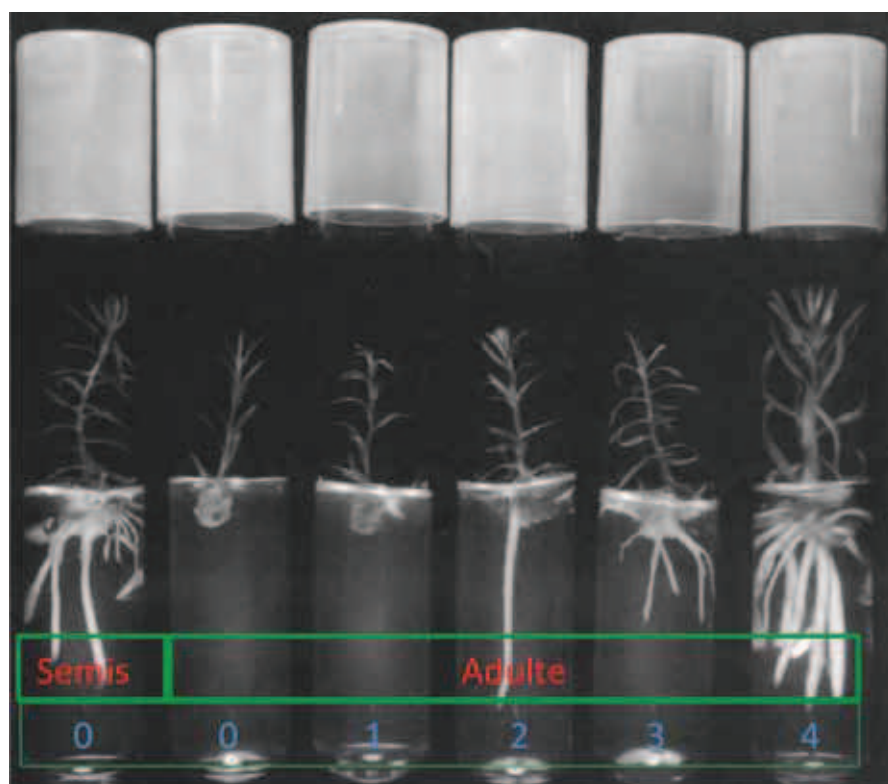


Fig. 1 : «rajeunissement» physiologique par culture *in vitro* chez *Sequoia sempervirens* avec un impact sur la morphologie, la vigueur végétative (croissance et propagation végétative) et le stade reproductif (floraison)

Les chiffres au bas de la photo indiquent le nombre de cycles successifs de microgreffage. (photo originale tirée de Huang *et al.* 1992, *Plant Physiol.* 98 :166-173)

Nous avons ainsi conservé un noyau de 444 clones d'une collection représentant la diversité européenne (y compris française) des ormes (cf. E Collin dans ce dossier) ainsi qu'une cinquantaine de clones français supplémentaires. Leur multiplication est réalisée par microbouturage et, pour certaines espèces difficiles à enraciner (orme de montagne), par le microgreffage sur un porte-greffe dont les rejets peuvent facilement être différenciés morphologiquement de ceux du greffon (figure 2). Quelques accessions clonales ont été introduites en cryoconservation à partir d'arbres remarquables multiséculaires.

Les empreintes ADN

Les empreintes ADN sont utilisées depuis longtemps chez les arbres forestiers. Les outils les plus performants en routine sont les portions d'ADN du type microsatellite (pour une présentation vulgarisée, voir Harvengt 2005 ; pour une présentation détaillée : voir ONF 2005, RDVT Hors série numéro 1). Ces dernières années, leur emploi a été croissant pour assurer la traçabilité du matériel forestier de reproduction commercial, expérimental ou destiné aux collections de ressources génétiques.

Il s'agit classiquement de rectifier des erreurs d'identification entre clones, variétés ou provenances. D'ailleurs ces outils permettent régulièrement de confirmer la redécouverte d'espèces considérées comme éteintes, regrouper en une seule ce que l'on considérait être plusieurs espèces ou à l'inverse confirmer que ce que l'on croyait être des morphotypes au sein des mêmes populations d'une seule espèce correspondent à des espèces distinctes. En matière d'arbres forestiers, le cas le plus remarquable est probablement celui de l'orme anglais, considéré comme une espèce distincte jusqu'à ce que des études de diversité génétique des ormes montrent qu'il ne s'agit que d'un clone d'orme champêtre propagé depuis l'antiquité (Gil *et al.* 2004). Plus récemment, les études de structuration de la diversité génétique ont permis de vérifier l'adéquation de parcelles ou préciser la délimitation de zones dédiées à la conservation *in situ*. La qualité des



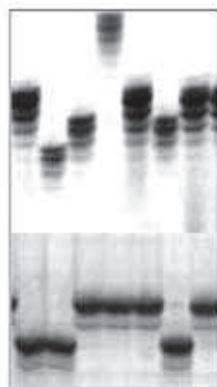
Fig. 2 : microgreffe d'*Ulmus glabra* sur *U. minor* photographiée *in vitro* deux semaines après la greffe (à gauche, barre = 5 mm) et, quelques mois plus tard, en pépinière (à droite, barre = 5 cm)
SPG = porte greffe (Harvengt et Dumas 2003)

régénérations naturelles et de la production de graines peut être estimée.

Les progrès en accélération constante de l'analyse des génomes (la séquence complète de l'ADN d'un individu voire d'une cellule unique) permettent un passage actuellement en cours vers des outils plus fins qui permettront progressivement de fiabiliser les caractérisations jusqu'à approchées par l'analyse d'une poignée de microsatellites (figure 3). Il s'agit non seulement d'analyser des centaines ou des milliers de marqueurs, voire de caractériser de manière exhaustive de la structure de l'ADN, mais, en plus, ces données pourront être assorties

d'une valeur prédictive de l'adaptation aux conditions environnementales : le progrès vient à la fois des machines toujours plus puissantes et rapides mais surtout des études de corrélation entre les variations de l'ADN et l'adaptation à l'environnement. Les outils commencent à être très au point chez les animaux et plantes modèles (Savolainen 2011, Futurasciences 2011), aboutissant à un concept de plus en plus précis que l'on pourrait qualifier d'« écologie assistée par marqueurs » (Weigel 2012). Chez les arbres, et particulièrement chez les conifères dont le génome est beaucoup plus grand que celui des feuillus, les outils doivent encore être mis au point.

De l'usage en routine de quelques marqueurs (souvent moins de 10)



Vers l'analyse simultanée de plusieurs centaines/milliers...

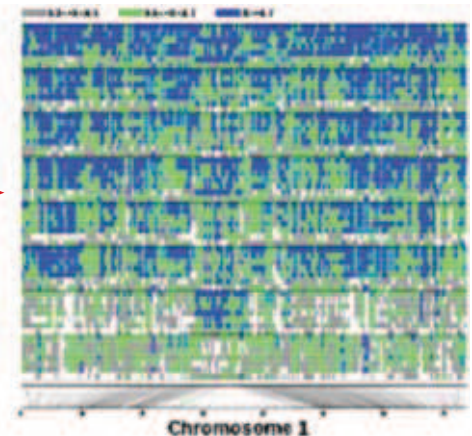


Fig. 3 : évolution des techniques d'analyse ADN disponibles en routine

Cependant, les progrès sont là aussi très rapides et en accélération (Neale et Kremer 2011). Si le génome d'un seul arbre forestier était intégralement connu jusque là, les décryptages de nouvelles espèces de feuillus se sont succédés depuis 2010 et deviennent une routine en 2012. Un grand projet européen de recherche vient d'être lancé pour réaliser la première description complète d'espèces majeures de conifères européens (projet Procogen, 2012-2015) et utiliser cette information pour produire des outils qui serviront à la fois à la sélection de variétés forestières et à la gestion des ressources génétiques sauvages. Par ailleurs des puces ADN spécifiques (voir encadré) traitant simultanément jusqu'à plus de dix mille régions du génome sont utilisées en recherche sur des séries de l'ordre du millier d'arbres. Les conclusions des analyses permettront la conception de puces sur mesure pour différentes situations. Ces puces pourront alors être produites selon les besoins et analysées selon une panoplie de technologies adaptées à des

effectifs de taille différente en termes de nombre de régions génomiques analysées comme en termes de nombre d'arbres à caractériser.

Pour conclure

La mise en œuvre des différentes approches techniques évoquées ici est facilitée par la constitution de plateaux techniques comportant les équipements et les moyens humains nécessaires (compétences et expérience). Des plateaux techniques de ce type sont actuellement mis en place dans le cadre du projet grand emprunt Xyloforest (voir www.xyloforest.org). Par leur ouverture à des utilisateurs ou «simples clients» extérieurs, ils faciliteront l'accès à ces techniques et conduiront donc à une meilleure conservation des ressources génétiques.

Luc HARVENGT

FCBA Bordeaux (Cestas)
Pôle Biotechnologie et
Sylviculture Avancée

Les puces ADN

Les puces ADN sont dénommées par analogie avec les puces informatiques. Au lieu de microcircuits électriques, elles juxtaposent sur une plaque de verre de quelques centimètres carrés des milliers ou millions de dépôts d'ADN en nano gouttelettes. Ce dépôt est réalisé par un équipement très proche dans son principe de fonctionnement des têtes d'imprimantes à jet d'encre. Chaque dépôt est répété plusieurs fois à l'identique, en des endroits suffisamment distants les uns des autres, de manière à répéter la mesure de l'accrochage sur ces cibles de fragments d'ADN correspondants provenant de l'échantillon à analyser. Cet accrochage se réalise spontanément car l'ADN est constitué de deux moitiés complémentaires capables de s'auto assembler comme les deux moitiés d'une fermeture éclair. Pour obtenir cet accrochage, l'ADN de l'échantillon est au préalable cassé en petits fragments auxquels on greffe un traceur fluorescent. Ensuite, ces fragments sont mis en contact de la puce dans de l'eau à température élevée, ce qui sépare les deux moitiés des ADN. Avec le refroidissement, les moitiés vont se réassembler. Si l'ADN analysé contient des fragments correspondant à ceux qui sont sur la puce, ils vont s'y accrocher. À l'issue de lavages destinés à éliminer l'ADN non fixé sur la puce, on pourra détecter les « points » de la puce qui ont leur correspondant au sein de l'ADN analysé à l'aide d'une micro caméra travaillant en lumière fluorescente. On peut analyser simultanément plusieurs échantillons s'ils sont marqués à l'aide de marqueurs fluorescents de couleurs différentes. Le domaine des puces à ADN est un des champs technologiques évoluant le plus rapidement. Une puce peut comporter jusqu'à plusieurs millions de points sur une dizaine de centimètres carrés.

Exemple de puce ADN : en entier à gauche (taille réelle : environ 2 x 8 cm) et, à droite, zoom sur une zone de la puce. La couleur des points correspond à un niveau relatif de présence des cibles dans deux échantillons analysés simultanément.



Bibliographie

Arnaud Y, Franclot A, Tranvan H, Jacques M, 1993. Micropropagation and Rejuvenation of Sequoia sempervirens (Lamb) Endl - A Review. Annales Des Sciences Forestières vol 50 n°3, pp.273-295

Futurascience, 2011. Changement climatique : l'étonnante adaptation des plantes. <en ligne : <http://www.fedre.org/content/changement-climatique-letonnante-adaptation-des-plantes>>

Gil L, Fuentes-Utrilla P, Soto A, Cervera MT, Collada C, 2004. English elm (Ulmus Procera) hides a 2,000 years old roman clone. Nature vol 431 n°1053

Harvengt L, 2005. Identification des arbres forestiers par empreinte ADN. Fiche Informations-Forêt 2005-2 (n°709). 6 p. <en ligne : <http://www.fcbainfo.fr/pages/Archives/fif709.pdf>>

Harvengt L, Dumas E, 2003. La cryoconservation des ligneux, une technique au service de la gestion des ressources génétiques sauvages et domestiquées. Fiche Informations-Forêt 2003-1 (n°664). 6 p. <en ligne : <http://www.fcbainfo.fr/pages/Archives/fif664.pdf>>

Harvengt L, Lelu MA, 2003. L'embryogenèse somatique des conifères, état et perspectives. Fiche Informations-Forêt 2004-3 (n°694). 6 p. <en ligne : <http://www.fcbainfo.fr/pages/Archives/fif694.pdf>>

Neale DB, Kremer A, 2011. Forest tree genomics : growing resources and applications. Nat Rev Genet n°12(2) pp.111-122

ONF, 2005. RenDez-vous techniques de l'ONF - Diversité génétique des arbres forestiers : un enjeu de gestion ordinaire - hors-série n°1

Savolainen O, 2011. Evolution. The genomic basis of local climatic adaptation. Science, vol 334 n°6052 pp.49-50

Weigel D, 2012. Natural variation in Arabidopsis : from molecular genetics to ecological genomics. Plant Physiol, vol.158 (1) pp. 2-22