

## **Les biotechnologies bientôt au service de la sélection du pin maritime assistée par marqueur moléculaire ?**

FCBA et l'INRA ont mené un projet ambitieux (GenoQB) qui visait à mieux comprendre les bases génétiques de la formation du bois de pin maritime et d'accélérer l'amélioration génétique de la croissance et de la qualité du bois. Ces travaux ont permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la formation du bois, de développer des outils d'évaluation rapide des propriétés du bois et d'étudier les relations entre ces propriétés et la variabilité des gènes concernés. Ils ont également conduit au développement chez le pin maritime d'une méthode de validation directe de la fonction des gènes, en modifiant leur expression au cœur même du génome. Il en résultera à terme des outils de sélection précoce des arbres (dès la germination de la graine) qui permettront d'accélérer la création de nouvelles variétés. Un premier marqueur de sélection pour la croissance en hauteur et la circonférence a été identifié.

FCBA et l'INRA collaborent étroitement depuis 2004 pour développer de nouvelles biotechnologies en matière d'amélioration génétique, de création et de déploiement de nouvelles variétés de pin maritime, l'espèce actuellement la plus utilisée pour les reboisements dans le sud-ouest de l'Europe. Ces technologies sont très prometteuses et doivent à terme contribuer à soutenir la production en France de bois de qualité pour l'industrie.

FCBA et l'INRA ont mené un projet ambitieux (GenoQB) qui visait à mieux comprendre les bases génétiques de la formation du bois de pin maritime et d'accélérer l'amélioration génétique de la croissance et de la qualité du bois. Ces travaux ont permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la formation du bois, de développer des outils d'évaluation rapide des propriétés du bois et d'étudier les relations entre ces propriétés et la variabilité des gènes concernés. Ils ont également conduit au développement chez le pin maritime d'une méthode de validation directe de la fonction des gènes, en modifiant leur expression au cœur même du génome. Il en résultera à terme des outils de sélection précoce des arbres (dès la germination de la graine) qui permettront d'accélérer la création variétale. Un premier marqueur de sélection pour la croissance en hauteur et la circonférence a été identifié.

### **L'amélioration génétique se met aux « biotech. »**

Depuis l'émergence de l'agriculture, l'Homme cherche constamment à adapter les caractéristiques des plantes d'intérêt agronomique pour mieux satisfaire ses besoins. C'est le principe de la domestication. Le premier outil forgé il y a plus de 10 000 ans pour atteindre cet objectif est la sélection

consistant à propager un grand nombre d'individus les plus performants d'une population, par graines (reproduction sexuée) et/ou par multiplication végétative (bouturage, greffage, *etc.*). Après avoir constaté que la maîtrise de l'hybridation (croisement) permettait de combiner chez les descendants une bonne part des caractères parentaux suivant des règles de transmission précises (lois de Mendel, 1866) ayant pour support l'ADN (découvert en 1869), l'ère de l'amélioration génétique est née. Il s'agit de réaliser des cycles de croisements successifs en utilisant comme géniteurs les individus les plus performants sélectionnés dans les descendance après leur évaluation à maturité pour le plus grand nombre possible de caractéristiques (phénotype).

L'amélioration génétique a offert un vrai saut technologique, puisqu'elle est principalement responsable des énormes progrès en matière de rendement des variétés de grande culture enregistrés depuis le milieu du XX<sup>e</sup> siècle. Cette stratégie est également appliquée avec succès depuis la fin des années 50 chez le pin maritime (15 % de gain génétique par cycle de sélection), mais à une vitesse bien plus faible en raison de la maturité sexuelle tardive des arbres (3 cycles d'amélioration seulement réalisés chez le pin maritime à ce jour contre plusieurs centaines chez les céréales). Avec la découverte de la structure de l'ADN en 1953, c'est l'accès direct au support de la part héréditaire des caractères (les gènes) qui est devenue envisageable. C'est sur la base de cette information clef que se développent depuis les années 70 de nouveaux outils biotechnologiques qui offrent des perspectives révolutionnaires en termes de gain génétique à chaque cycle d'amélioration et donc d'accélération du processus, en particulier chez les espèces pérennes comme les arbres forestiers. Une importante conférence IUFRO (International Union of Forest Research Organization) vient de se dérouler sur ce thème (**Focus**). L'identification et l'étude des gènes

impliqués dans les caractères d'intérêt permettent ainsi de développer des marqueurs moléculaires de sélection (empreintes ADN) des individus qui présentent les meilleures combinaisons de gènes (génotype). Comme il n'est plus nécessaire d'évaluer le phénotype à maturité, la sélection est très précoce et le gain de temps peut donc être très important.

Diverses biotechnologies très prometteuses dans le cas du pin maritime sont en développement depuis 10 à 20 ans à FCBA et à l'INRA, comme les technologies d'analyse à haut débit de la structure et de l'expression du génome (génomique, transcriptomique, protéomique), de transformation du génome (transformation génétique), de propagation conforme (multiplication par embryogenèse somatique) et/ou de conservation à très long terme des ressources génétiques sauvages ou améliorées (cryoconservation dans l'azote liquide à très basse température). Ces technologies sont maintenant suffisamment matures dans les laboratoires de recherche pour entrevoir leur intégration progressive dans les programmes d'amélioration.

GenoQB est le premier projet d'envergure qui mobilise les équipes FCBA et INRA porteuses de ces biotechnologies dans des efforts complémentaires pour développer des outils de sélection assistée par marqueur de caractéristiques de croissance et de propriétés du bois **(Figure 1)**.

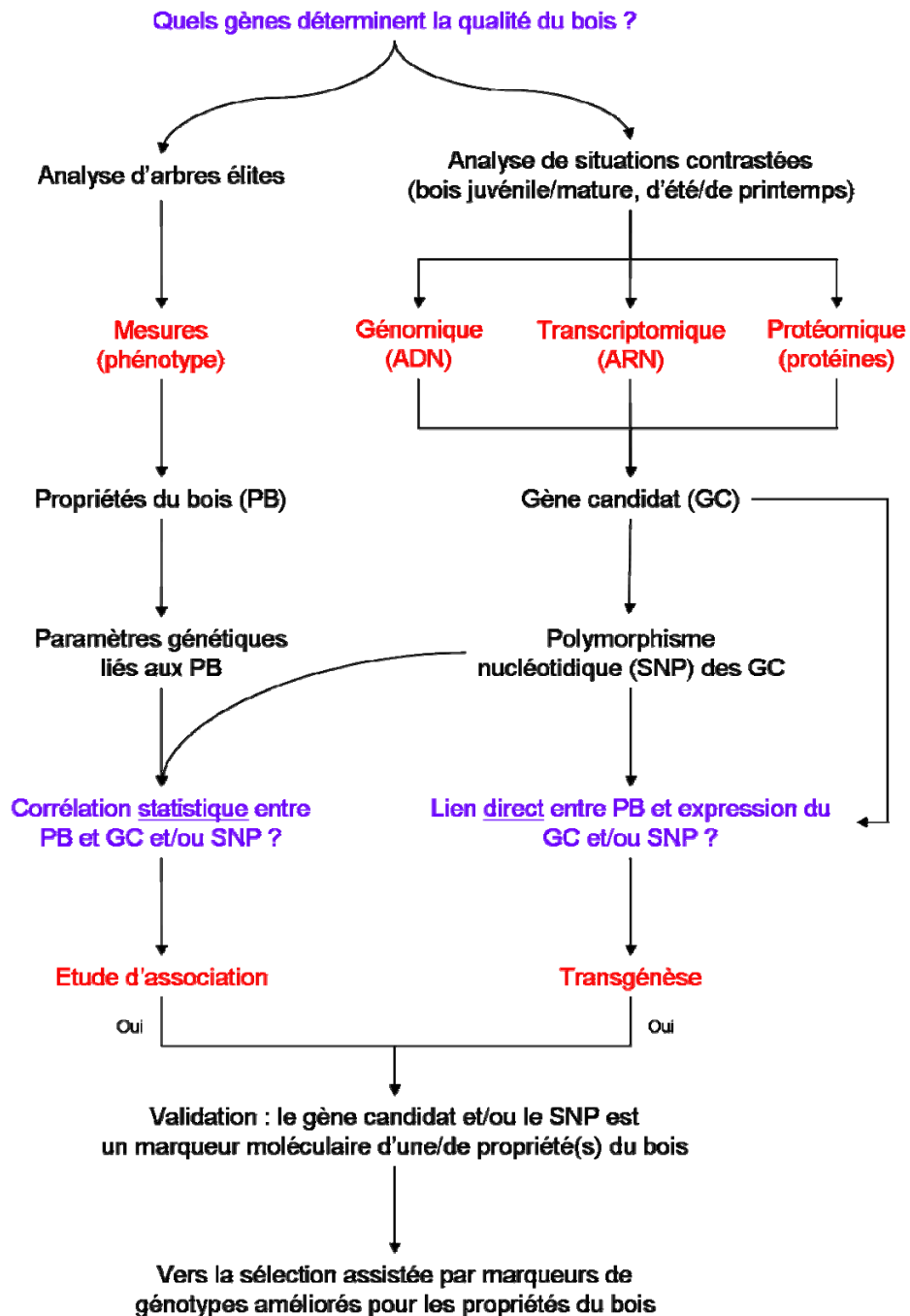


Figure 1 : Les étapes mises en œuvre pour développer des marqueurs de sélection précoce de la qualité du bois chez le pin maritime

L'équipe de génétique INRA de l'UMR Biogeco (Bordeaux, contact : C. Plomion) a ainsi développé et mis en œuvre en collaboration avec FCBA (via une action centrée sur une thèse Cifre co-encadrée) des technologies d'analyse du génome permettant d'identifier les gènes candidats et leur polymorphisme. Une étude d'association, entre ces polymorphismes génétiques et la variation phénotypique des composantes de la croissance et des propriétés du bois, a alors pu être engagée pour une sélection de quelques milliers d'arbres. Cette approche de génétique classique pour valider l'intérêt des gènes candidats a été doublée d'une approche plus originale visant à modifier leur expression dans le génome en étudiant l'impact sur la qualité du bois et la croissance. Ce sont les équipes du Laboratoire de Biotechnologies (FCBA, contact : L. Harvengt) et de l'UAGPF (INRA d'Orléans, contact : M.A. Lelu-Walter) qui ont uni leurs efforts dans ce domaine émergent qui nécessite des compétences en matière de transformation génétique, mais également d'embryogenèse somatique. Cette dernière est une technique de propagation très performante<sup>1</sup> qui se trouve être le support privilégié de la création et de la régénération de plantes transgéniques chez le pin maritime.

---

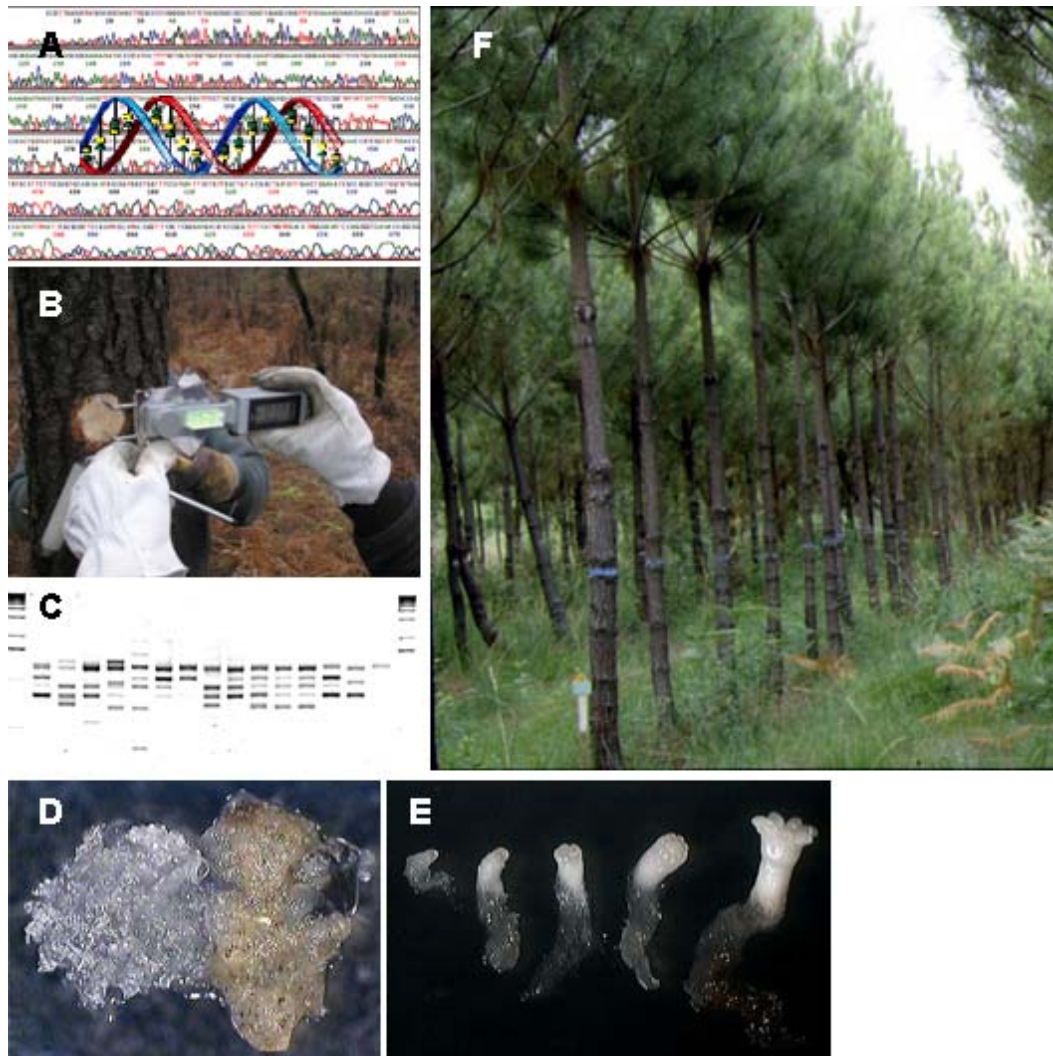
<sup>1</sup> Articles de vulgarisation décrivant cette technique et ses perspectives :

Harvengt L, Lelu-Walter MA (2004)

L'embryogenèse somatique des conifères, état et perspectives. Fiche Informations Forêt, 3 : Fiche N°694

Harvengt L, Pâques M, Philipon P (2000)

La multiplication des pins, Biofutur, 199 : 22-25



La connaissance des variations de la séquence des gènes **(A)** impliqués dans la qualité du bois de pin maritime observée en forêt **(B)** permet de développer en appui avec diverses autres biotechnologies comme la transgénèse et l'embryogenèse somatique **(D, E)** des marqueurs moléculaires **(C)** capables de détecter très précocement, dès le stade du jeune semis voire de l'embryon **(E)**, les caractéristiques génétiques qui détermineront les performances à l'âge adulte des futures variétés de pin maritime **(F)**.

- A** : Résultat du séquençage d'une petite région de l'ADN (gène)
- B** : Mesure non destructive d'un paramètre du bois en forêt (angle du fil)
- C** : Analyse de l'ADN d'une quinzaine de jeunes semis (les « bandes » représentent les marqueurs)
- D** : Tissu embryogène de pin maritime transformé (le tissu blanchâtre à gauche présente une nouvelle caractéristique)
- E** : Séquence de développement d'un embryon somatique à partir d'un tissu embryogène
- F** : Plantation de pin maritime amélioré

**Figure 2 : Du gène aux variétés de pin maritime du futur**

## **Des gènes potentiellement importants pour la formation du bois sont identifiés**

L'équipe de l'UMR Biogeco a utilisé toute la batterie d'outils modernes actuellement disponibles pour détecter les variations d'expression du génome conduisant à la formation de divers types de bois aux propriétés très contrastées comme le bois juvénile, le bois mature, le bois de printemps ou le bois d'été. Ces propriétés anatomiques, physiques ou encore chimiques sont déterminées et peuvent être mises en relation avec des protéines spécifiques dont la présence est sous le contrôle des gènes (ADN) et de leur intermédiaire d'expression, les ARN messagers. Ces approches dites « omique » dans le jargon de la recherche, s'intéressent à ces 3 niveaux d'analyse complémentaires que sont l'ADN (génomique), l'ARN (transcriptomique) et les protéines (protéomique) pour identifier les gènes et plus précisément les polymorphismes de ces gènes (allèles). Ces derniers expliquent la part génétique, héritable des propriétés du bois obtenues dans un environnement donné (déterminisme génétique des composantes de la qualité). Les résultats montrent que l'expression des gènes et des protéines est très largement modifiée au cours de la transition entre bois juvénile et bois mature, ainsi qu'au cours de la saison entre bois de printemps et bois d'été. Cette formidable plasticité moléculaire s'accompagne d'une variabilité très importante des propriétés physico-chimiques du bois. Nous avons constaté une diminution progressive au cours du temps de la quantité de plusieurs ARN et protéines impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine, tandis que des gènes et protéines intervenant dans la voie de biosynthèse de la cellulose montrent un surcroît d'expression à l'approche de l'été, ce qui va de pair avec une réduction de la lignine et une augmentation de la cellulose dans ce tissu. Nous avons

démontré des modifications de l'abondance de nombreux autres ARN contribuant à des modifications de la composition du bois et de la structure cellulaire. Enfin, en plus des variations de ces gènes jouant un rôle majeur dans la formation du bois, nous avons détecté de nombreux ARN caractéristiques des réponses aux stress dont l'expression augmente au cours de la saison de croissance.

### **Les études d'association livrent leurs premiers résultats**

Des techniques de phénotypage à haut débit des propriétés du bois (spectroscopie infrarouge et radiographie aux rayons X) ont tout d'abord été développées et mises à disposition d'une plateforme d'analyse spécialisée. Plus de 4300 arbres ont été échantillonnés et mesurés pour la production de biomasse (hauteur, circonférence), la composition chimique (teneurs en extraits, lignine, cellulose, etc.) et la microdensité du bois (densité intra-cerne). Toutes ces données ont permis de calculer précisément la valeur génétique des arbres élites de la population d'amélioration. On constate que les caractères chimiques sont nettement moins variables (environ 1,5 %) que les caractères de croissance (5-15 %), mais leur héritabilité est plus élevée.

Au-delà des nombreuses données déjà engrangées au cours des projets précédents sur 26 gènes de la lignification et de la biosynthèse de cellulose, la diversité d'une quinzaine de gènes candidats supplémentaires impliqués dans la formation du bois a été étudiée au niveau le plus fin possible, grâce à la technologie des « SNP » qui s'intéresse à la variation des éléments de base de l'ADN (les bases nucléotidiques). La moitié environ de ces 15 gènes est impliquée dans les voies de biosynthèse des composants du bois (lignine et cellulose essentiellement). Pour la première fois chez le pin maritime, des

gènes régulant d'autres gènes ont également été étudiés. Ils présentent une faible diversité, ce qui suggère que ces gènes très importants pour le fonctionnement des cellules sont soumis à une forte sélection.

Cette étude de diversité a permis de sélectionner plusieurs centaines de zones variables de l'ADN (marqueurs SNP) à étudier en priorité dans les études d'association avec les caractères de croissance et les propriétés du bois. Tous ces SNP ont été recherchés simultanément (technologie des « puces » à ADN) chez 443 arbres élités du programme d'amélioration. Une première étude d'association impliquant 147 marqueurs SNP a été conduite pour les caractères de croissance et de composition chimique du bois. Un premier SNP a été trouvé significativement associé à la croissance en hauteur et la circonférence. Ces résultats sont en cours de publication dans des revues scientifiques internationales.

## **La transformation génétique aiguise sa lame d'outil de recherche**

La transformation génétique (ou transgénèse) consiste à introduire dans le patrimoine génétique (génome) d'un être vivant un ou plusieurs fragments d'ADN supplémentaires (les transgènes) dont l'expression conduit à l'obtention de nouvelles caractéristiques dans l'organisme génétiquement modifié (OGM) ainsi obtenu. Au-delà des perspectives d'application pour la création variétale qui font encore débat<sup>2</sup>, cette technologie est un outil de recherche indispensable dans le processus de découverte et de

---

<sup>2</sup> La question est abordée dans cet article de vulgarisation :

Trontin JF, Harvengt L (2002)

Les plantations d'arbres génétiquement modifiés : une stratégie envisageable pour les approvisionnements en bois de demain ?

Fiche Informations Forêt, 3 : Fiche N°652

caractérisation de la fonction des gènes impliqués dans les caractères d'intérêt agronomique. En permettant d'établir un lien direct entre gène et phénotype par surexpression ou répression du gène étudié, la transgénèse apparaît particulièrement prometteuse dans le cas des arbres forestiers dont les caractéristiques biologiques ne permettent pas d'envisager de créer facilement des lignées « pures » comme chez les céréales. C'est dans ce but que la transgénèse est largement développée chez les pins avec des progrès récents très importants<sup>3</sup>. Des protocoles de transformation génétique du pin maritime qui utilisent la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens* ont été mis au point par les équipes de FCBA Nangis et de l'INRA d'Orléans. C'est la technique d'embryogenèse somatique qui fournit le support de la transformation et autorise la conservation à long terme des tissus embryogènes transformés (cryoconservation), la régénération de plantes transformées, puis leur étude en laboratoire et en serres spécialisées (bioconfinement).

Dans le projet GenoQB, cette technologie a été pour la première fois appliquée chez le pin maritime pour contribuer à la validation de la fonction et donc de l'intérêt de gènes candidats impliqués dans la formation du bois. C'est une démarche qui apporte des informations complémentaires aux données statistiques générées par les études d'association (voir paragraphe précédent et **Figure 1**). Une stratégie de répression de l'activité des gènes par réduction ciblée du pool d'ARN messagers qu'ils génèrent a été mise en œuvre. Cette méthode dite « d'interférence par ARN » (RNAi) est

---

<sup>3</sup> Une synthèse complète est disponible dans cet article scientifique (en anglais) :

Trontin JF, Walter C, Klimaszewska K, Park YS, Lelu-Walter MA (2007)

Recent progress on genetic transformation of four *Pinus* spp, *Transgenic Plant Journal* 1 : 314-329.

actuellement considérée comme la plus performante chez les plantes pour rendre un gène « muet ». L'analyse du phénotype des plantes dans le génome desquelles l'expression des gènes candidats est effectivement réduite doit permettre de contribuer à leur validation comme source de marqueurs précoces de sélection des génotypes qui présentent les propriétés du bois désirées.

Nous publierons prochainement un article de vulgarisation plus détaillé portant sur les perspectives d'application concrètes à court et moyen termes de l'emploi des outils ADN pour la sélection de variétés d'arbres performantes, génétiquement diversifiées et mieux adaptées aux bouleversements climatiques qui sont annoncés.

**Jean-François Trontin**  
[jean-francois.trontin@fcba.fr](mailto:jean-francois.trontin@fcba.fr)

**Luc Harvengt**  
[luc.harvengt@fcba.fr](mailto:luc.harvengt@fcba.fr)

FCBA  
Pôle Biotechnologie et Sylviculture  
avancée  
Domaine de Sivaillan-les-Lamberts  
33480 Moulis-en-Médoc  
Tél. : 05 57 88 82 33  
Fax : 05 57 88 82 34

**Marie-Anne Lelu-Walter**  
[leluwa@orleans.inra.fr](mailto:leluwa@orleans.inra.fr)

INRA  
Unité Amélioration, Génétique  
et Physiologie Forestière  
2163 Avenue de la Pomme de Pin  
CS 4001 Ardon  
45075 Orléans cedex 2  
Tél. : 02 38 41 78 39  
Fax : 02 38 41 48 09

**Christophe Plomion**  
[plomion@pierroton.inra.fr](mailto:plomion@pierroton.inra.fr)

INRA  
UMR BIOGECO, Biodiversité Gènes  
et Communautés  
Equipe de génétique  
69 route d'Arcachon  
33610 Cestas  
Tél. : 05 57 12 28 38  
Fax : 05 57 12 28 81

**Ce projet a bénéficié du soutien de l'ANR-Génoplante (projet ANR-05-GPLA-027), de l'ANRT, du Conseil Régional d'Aquitaine et du pôle de compétitivité Xylofutur.**

**Les auteurs remercient chaleureusement tous les participants au projet GenoQB et plus particulièrement les principaux contributeurs :**

Camille Lepoittevin (Thèse FCBA LBT/INRA Pierroton), Grégoire le Provost, Philippe Chaumeil, Céline Lalanne, Jean-Marc Frigerio, Franck Salin et Frédéric Lagane (INRA de Pierroton), Sandrine Debille, Séverine Quoniou et Francis Canlet (FCBA, LBT), Marie-Claude Lesage-Descauses, Michel Vallance, Cécile Grondin et Philippe Label (INRA d'Orléans), Audrey Guillemain, Anaïs Rabilloud, Denilson da Silva Perez et Arthur Janodet (FCBA, NMA), Jean-Pierre Rousseau, Laurent Giraud, Jérôme Moreau, François Besson, Jean-Yves Fraysse, Jean-Mathieu de Boissesson, Pierre Alazard et Guillaume Chantre (FCBA, SO).

Nos remerciements vont également aux relecteurs de cet article (Anne Varet et Pierre Alazard).

**Sites des équipes partenaires :**

[www.orleans.inra.fr/les\\_unites/ur\\_agpf](http://www.orleans.inra.fr/les_unites/ur_agpf)

[www.pierroton.inra.fr/biogeco/genetique/index.html](http://www.pierroton.inra.fr/biogeco/genetique/index.html)

[www.intechfibres.com/](http://www.intechfibres.com/)

[www.fcba.fr/biotechnologie/](http://www.fcba.fr/biotechnologie/)

### Focus sur la conférence « 2009 IUFRO Tree Biotechnology »

La conférence 2009 « IUFRO Tree Biotechnology » qui s'est tenue du 28 juin au 2 juillet dernier à Whistler (Colombie Britannique, Canada) à laquelle FCBA et l'INRA ont participé réunit tous les 2 ans les scientifiques spécialisés dans le domaine des biotechnologies appliquées aux arbres forestiers (250 participants). Des avancées très importantes ont été présentées, entre autres dans les domaines de la sélection assistée par marqueur, de l'embryogenèse somatique ou bien encore de la transgénèse.

Les programmes de séquençage de génomes complets sont à présent quasiment terminés chez le peuplier et l'eucalyptus. Des efforts très importants sont également réalisés pour étudier l'évolution du transcriptome (l'ensemble des ARNs) ou du protéome (l'ensemble des protéines) lors de la formation du bois et des parois pectocellulosiques, en réponse aux stress induits par les ravageurs et/ou le changement climatique. La précision et la densité de toutes ces informations facilitent le développement des études d'association qui permettent de rechercher des polymorphismes de gènes (mutations) pouvant servir de marqueurs de sélection. Concernant la qualité du bois, des avancées majeures sont imminentes chez le peuplier et l'eucalyptus, mais également chez les pins taeda ou radiata. L'efficacité de la sélection pourrait dépasser 80 % pour un caractère « moyen » contrôlé par une cinquantaine de gènes.

Dans un autre domaine crucial pour la création et le déploiement de nouvelles variétés, le clonage par embryogenèse somatique, des résultats démontrent qu'il est possible d'induire chez les conifères la formation d'embryons à partir de « simples » bourgeons collectés sur des arbres âgés de 7 à 15 ans. Si des résultats intéressants avaient déjà été obtenus

précédemment à partir de matériel plus jeune – FCBA a en particulier déposé un brevet dans ce domaine chez l'épicéa commun –, c'est la première fois que cette possibilité est évoquée chez un pin avec preuve moléculaire à l'appui et qu'elle s'avère reproductible chez l'épicéa.

Côté transgènèse, la disponibilité croissante des informations de séquence permet maintenant d'envisager les études de gènes candidats par génétique inverse à l'échelle du génome entier. Des voies métaboliques entières impliquées dans les résistances aux maladies, la croissance, la formation du bois ou bien encore la sécheresse sont littéralement disséquées les unes après les autres pour mieux comprendre leur fonctionnement et finalement développer des outils de sélection précoce. L'ère de la génétique inverse par RNAi à haut débit au service de la recherche a ainsi commencé chez le peuplier. Couplée à des méthodes toujours plus performantes de phénotypage, des analyses extrêmement fines deviennent possibles. La diminution de la densité du bois de peupliers transgéniques fabriquant moins de cellulose est par exemple expliquée par un effet de porosité plutôt que d'épaisseur des parois pecto-cellulosiques. Les perspectives dans ces domaines et bien d'autres sont énormes.

**Pour en savoir plus :** Abstracts: 2009 IUFRO Tree Biotechnology Conference, Whistler, BC, Canada  
(Télécharger les abstracts : [IUFRO\\_abstract.pdf](#))