

LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE AU SERVICE DE LA FORÊT WALLONNE

PAR MICHEL BRIQUET

Professeur à l'UCL - Faculté des Sciences Agronomiques,
Centre IRSIA de Recherche et Promotion Forestières,
Unité de Biochimie Physiologique, Louvain-la-Neuve.

En occupant plus de 30% de son territoire, la forêt est avec l'eau, une des dernières grandes richesses naturelles de la région wallonne. Depuis près de deux siècles, l'administration des Eaux et Forêts épaulée par les stations de recherches forestières de l'Etat et maintenant de la Région, ainsi que par les laboratoires de recherche forestières de nos universités dont certains rassemblés actuellement dans le Groupement Régional d'Amélioration Génétique des Essences Forestières (GRAGEF), contribuent largement au maintien et à l'amélioration de ce patrimoine. Les fonctions de la forêt sont très diverses et s'avèrent de plus en plus importantes dans notre société: fonction économique traditionnelle de production de bois d'oeuvre et d'industrie, fonction écologique dans la régulation du climat, la protection

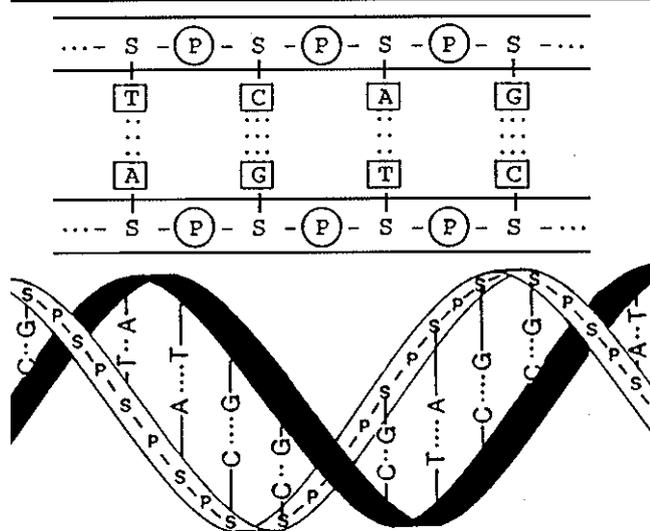


FIGURE 1 :
Structure générale de la molécule d'ADN.

S: Sucre désoxyribose
P: Phosphate
A: Adénine

T: Thymine
C: Cytosine
G: Guanine.

des sols, des eaux, de la flore et de la faune, fonction sociale pour la détente et le délassément de l'homme qui peut s'y ressourcer au contact de la nature et y retrouver son équilibre psychique.

Devant cet intérêt grandissant pour la forêt, les gestionnaires doivent non seulement maintenir celle-ci mais aussi continuer à améliorer la qualité de ses produits pour répondre aux besoins nouveaux.

Des programmes d'amélioration forestière aussi bien pour les feuillus que pour les conifères ont heureusement été entrepris depuis de nombreuses décennies. Ainsi, on peut citer en exemple les travaux d'amélioration génétique des conifères (*épicéa*, *mélèze*, *douglas*) qui ont déjà permis un gain de productivité de l'ordre de 20%, par le choix de variétés (provenances) européennes, américaines ou même japonaises les plus performantes et les mieux adaptées à notre environnement climatique et pédologique. La sélection individuelle entamée depuis le début des années 80 à partir de peuplements à graines des meilleures provenances a permis de sélectionner des «arbres plus» et des «arbres élites» en vue d'établir des vergers à graines, des parcs à clones et devrait donner naissance bientôt à des variétés multiclonaux. Le gain de productivité final espéré serait alors de l'ordre de 45 à 60% (A. NANSON, D. JACQUES ET A. SERVAIS, 1992, *Silva Belgica* 99 n° 2, 31-36). Pour que tout ce long travail de sélection ne soit pas perdu, il est essentiel de prendre des mesures de sauvegarde et de conservation de ce patrimoine génétique ancien et nouveau.

L'établissement d'un comptoir de matériel forestier de reproduction entrepris dès cette année 1994 à Marche-en-Famenne répond à cette nécessité. A côté de méthodes de récolte et de stockage des graines des arbres sélectionnés, ce comptoir devra disposer de méthodes de contrôle précoces, rapides et non-ambiguës du matériel génétique conservé afin d'en garantir aux clients forestiers ou pépiniéristes, l'origine, la qualité et la «conformité» aux normes de l'ONDAH et aux futures normes européennes.

Jusqu'à ce jour, le contrôle des individus sélectionnés les plus performants est réalisé sur la base de critères extérieurs (phénotypiques), le plus souvent morphologiques et de productivité. Or, ces critères extérieurs constituant le phénotype, s'ils sont bien évidemment dépendants de la constitution génétique de l'organisme végétal, c'est-à-dire de son génotype, n'en sont pas moins tributaires des conditions d'environnement dans lesquelles il se développe. Ainsi, les conditions climatiques peuvent modifier le phénotype d'un arbre et masquer les effets génétiques, rendant très difficile une évaluation objective de sa valeur sylvicole. En outre, cette évaluation exige toujours beaucoup de temps, particulièrement chez les arbres dont la maturation morphologique et sexuelle demande de nombreuses années. De nouvelles techniques issues de la recherche en biologie moléculaire permettent de pallier à ces inconvénients de l'examen phénotypique et peuvent répondre aux besoins du sélectionneur et aux exigences des organismes officiels chargés de l'identification et du contrôle du matériel forestier.

La technologie la mieux adaptée à la diversité énorme qui caractérise le génome des arbres et particuliè-



rement des conifères, est sans nul doute la méthode dite «RAPD» (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

La base moléculaire de cette technologie qui utilise des marqueurs génétiques de type «moléculaires» est la molécule d'ADN des chromosomes elle-même, par opposition aux marqueurs de type «morphologiques» utilisés en génétique classique qui sont des traits, des caractères morphologiques ou au mieux physiologiques, résultats de l'expression de gènes portés par l'ADN de ces chromosomes.

L'ADN, support physique de l'information génétique des êtres vivants, animaux ou végétaux, est

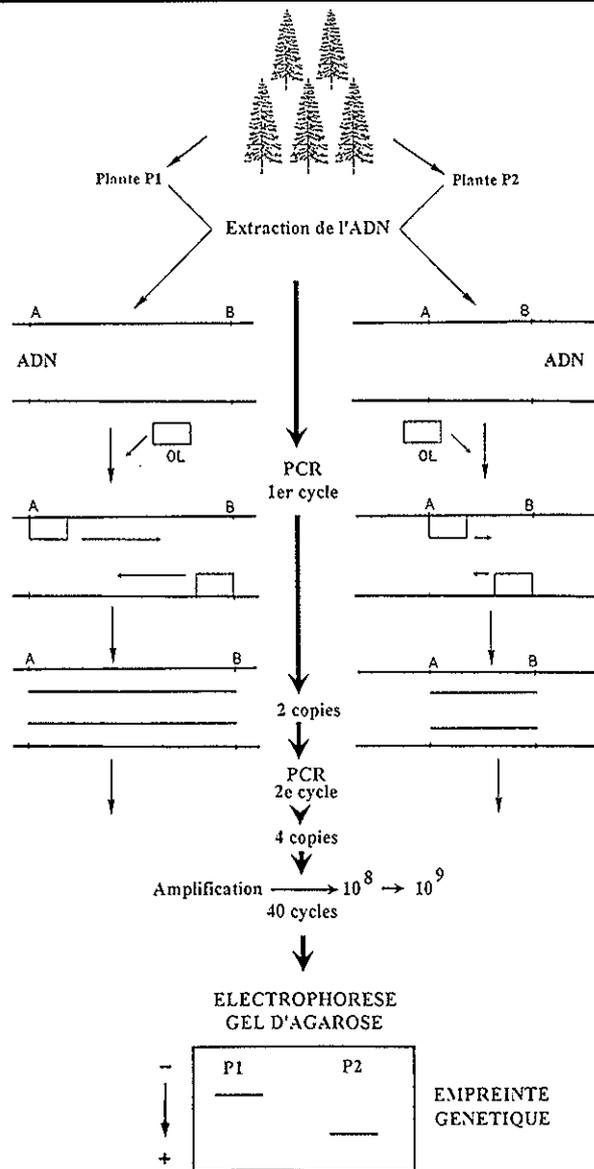


FIGURE 2: Principe de la méthode RAPD.

De l'ADN est extrait d'un fragment (feuille, aiguille, graine...) des plantes à analyser (P1 et P2). Ces ADN à identifier sont amplifiés par l'action d'une enzyme, l'ADN polymérase. Son action débute à partir d'une amorce hybridée à certains segments dénaturés de la double chaîne d'ADN génomique qui vont servir de matrices à recopier en des millions d'exemplaires (amplification) au cours de 35 à 40 cycles répétés suivant la technique PCR.

Par exemple, le segment AB de l'ADN de la plante 2 qui est plus petit que celui de la plante 1 par suite d'une mutation, d'une délétion ou d'un réarrangement, migrera plus rapidement, lors de l'analyse par électrophorèse en gel d'agarose, que le segment AB plus grand de la plante 1. Ces segments amplifiés seront visualisés en lumière ultraviolette sous forme de bandes fluorescentes grâce à la présence dans le gel d'un réactif fluorescent qui possède une grande affinité pour l'ADN.

unique à chaque individu. Cette unicité est due à la structure primaire de cette molécule qui, chose remarquable, n'est constituée que de quatre petites molécules chimiques relativement simples, les nucléotides qui se différencient par un de leurs constituants appelés «bases»: l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) ou la cytosine (C). Celles-ci sont greffées sur une molécule de sucre, le désoxyribose (S) alternant avec une molécule de phosphate (P).

L'ensemble est torsadé en une double chaîne (double hélice) où les bases dites «complémentaires» sont associées par paires par des liaisons chimiques faibles, (A) étant toujours lié à (T) sur l'autre chaîne parallèle et (G) à (C) (FIGURE 1).

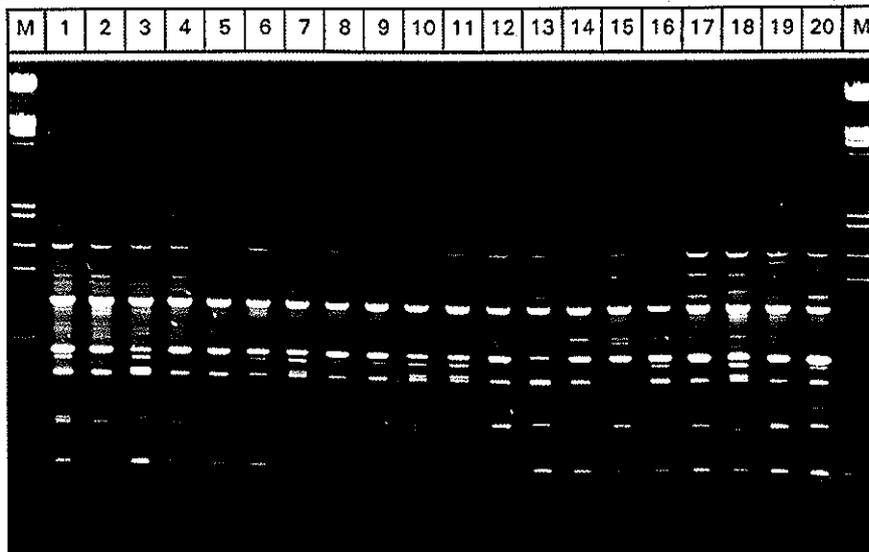
Les quatre bases sont répétées des millions de fois tout le long de l'ADN suivant une séquence déterminée, propre à chaque espèce ou même à chaque individu. Mises bout à bout, ces longues chaînes d'ADN contenues dans les chromosomes d'une seule cellule d'un arbre, par exemple, peuvent atteindre une longueur de plusieurs mètres (environ 4 à 5 mètres pour l'épicéa). Les quelques différences dans la séquence des bases de l'ADN sont le résultat d'événements induits ou spontanés (mutations, recombinaisons, réarrangements) qui se produisent dans les cellules et vont contribuer à la diversité extraordinaire des espèces vivantes. Les nouvelles techniques moléculaires de l'ADN ont été intégrées dans des technologies comme celles du «RADP» et permettent l'établissement de véritables cartes d'identité génétiques ou «empreintes génétiques» des individus. Cette technologie «RAPD» (FIGURE 2) est fondée sur l'utilisation d'une technique de synthèse ou de polymérisation en chaîne de l'ADN, technique dite «PCR» (*Polymerase Chain Reaction*), dont le principe est le suivant: après extraction de l'ADN à partir d'un petit fragment d'un organe de la plante, des séquences particulières de l'ADN génomique étudié sont recopiées jusqu'à environ un milliard de fois en tube à essai grâce à une enzyme, l'ADN polymérase. Cette enzyme utilise comme matrice le fragment d'ADN étudié et synthétise une chaîne d'ADN de séquence complémentaire à ce dernier. La stratégie «PCR» consiste à faire démarrer l'activité de la polymérase à partir d'une amorce d'environ 10 nucléotides qui se lie (s'hybride) spontanément à une portion de l'ADN génomique en vertu du principe de complémentarité des paires de bases AT et GC et qui va donc synthétiser la séquence complémentaire en aval de l'amorce. Sur l'autre chaîne d'ADN génomique, quelques 100 à 2 000 nucléotides plus loin, un autre exemplaire de l'amorce s'hybridera en vertu du même principe et servira de point de départ pour la synthèse en sens inverse de cette deuxième chaîne d'ADN.

On obtiendra ainsi un premier cycle d'amplification du fragment d'ADN compris entre les deux sites de fixation de l'amorce. Chaque cycle d'amplification est composé de trois étapes: dans la première, la double hélice d'ADN est chauffée à 95°C pour rompre les liaisons entre les deux chaînes (dénaturation), dans la deuxième, la température est abaissée rapidement vers 37°C en présence des amorces nucléotidiques qui peuvent alors s'hybrider chacune à sa chaîne d'ADN à amplifier (hybridation), dans la troisième étape enfin,



FIGURE 3:
Analyse par RAPD
d'une provenance
d'épicéa*

L'ADN de 20 individus (1 à 20) d'une même provenance a été amplifié à partir d'une amorce. Les différentes bandes d'ADN amplifiées sont séparées en fonction de leur taille par électrophorèse en gel d'agarose et visualisées par fluorescence en présence de bromure d'éthidium sous U.V. Les lignes M aux deux extrémités sont le marqueur de poids moléculaire de référence.



Les différences entre individus au sein d'une même provenance sont ainsi mises en évidence. Chaque bande est répertoriée pour sa présence ou son absence dans chaque individu et la compilation de toutes les données obtenues à partir de plusieurs amorces permet d'estimer la diversité génétique au sein d'une provenance ou entre provenances.

* Recherches subventionnées par l'IRSI (Convention 5506A)

la température est portée à 72°C ce qui permet à la polymérase de synthétiser les nouvelles chaînes d'ADN à partir des amorces en présence de nucléotides triphosphates qui sont les précurseurs de cette synthèse (élongation).

Ces trois premières étapes constituent un premier cycle d'amplification qui fournit deux copies nouvelles du fragment d'ADN amplifié (2¹), après 3 cycles, il est multiplié par huit (2³) et ainsi de suite de manière exponentielle pendant environ 35 à 40 cycles. Pratiquement, l'amplification n'étant pas efficace à 100%, le taux d'amplification est d'environ 200 000 fois après 20 cycles et de près de 1 milliard de fois après 40 cycles. Les fragments d'ADN amplifiés sont alors séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose contenant une substance fluorescente qui se fixe aux doubles chaînes d'ADN et permet de les visualiser par

illumination sous lumière ultra-violette. Des variations (mutations) dans la séquence de l'ADN induiront des modifications soit dans l'hybridation des amorces nucléotidiques soit dans la longueur des fragments d'ADN amplifiés et cela sera détecté par une mobilité électrophorétique différente de ces fragments amplifiés dans le gel d'agarose révélant le polymorphisme de l'ADN étudié (FIGURE 2).

De cette manière, on peut, en choisissant les amorces, établir l'«empreinte génétique», une sorte de «code-barre», propre à un individu. Cette méthodologie «RAPD» présente pour l'améliorateur forestier les nombreux avantages que procurent l'utilisation des marqueurs moléculaires, c'est-à-dire : la caractérisation individuelle au niveau de l'ADN lui-même, ce qui évite l'interférence des conditions de l'environnement (*température, lumière, fumure...*) qui souvent masquent l'expression de certains caractères, l'évaluation rapide de la diversité génétique de provenances (FIGURE 3) ou peuplements forestiers déjà en place, le contrôle de conformité et la certification de plants de pépinières ou de clones obtenus par bouturage, (FIGURE 4), ainsi que la pureté de lots de graines (pourcentage de contamination). Applicable à un stade très précoce du développement, la méthode procure un gain de temps énorme particulièrement important pour les espèces forestières, un gain de surface de serres ou de pépinières, un gain de main-d'œuvre et donc finalement de coût de production.

Enfin, l'analyse n'est pas destructive. Celle-ci peut être effectuée sur un très petit fragment de la plante (1 ou 2 feuilles ou aiguilles), les jeunes plants intéressants peuvent être conservés et utilisés ultérieurement pour la production de graines ou de boutures.

Les nouvelles technologies moléculaires telles que celles des «empreintes génétiques», ne remplaceront jamais la sélection classique des arbres forestiers, mais elles viennent en renforcer l'efficacité et lui ouvrir un nouveau et très large champ d'action.

Le mariage entre la sélection traditionnelle, qui est et reste indispensable, et la biologie moléculaire, est le meilleur atout actuellement disponible pour un nouveau progrès spectaculaire dans l'amélioration quantitative et qualitative de la production forestière. ■

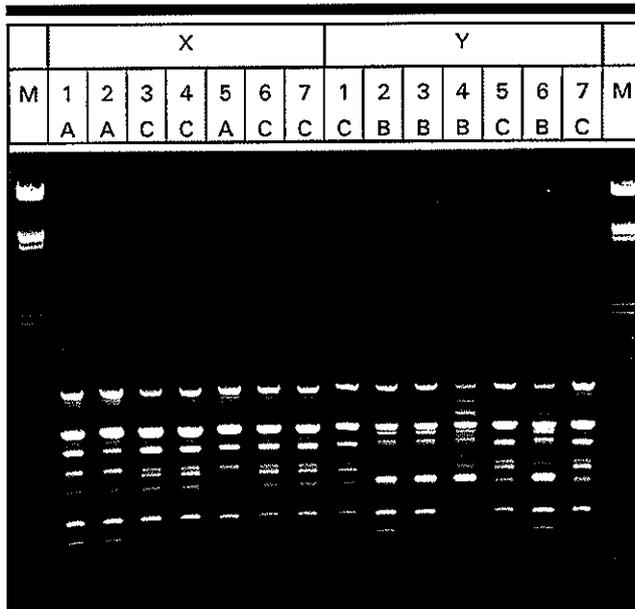


FIGURE 4: La technique RAPD est également utilisée pour la certification de clones.

Les clones X et Y comportant 7 individus chacun sont analysés par la technique de RAPD. Les profils obtenus pour chaque individu montrent que les deux clones X (de profil RAPD A) et le clone Y (de profil RAPD B) sont contaminés par un clone différent de profil RAPD C. Cette technique permet donc de contrôler la conformité d'un clone même à un stade très précoce du développement