
Chapitre 7. Culture d'anthère et de pollen

7.1. Variabilité gamétoclonale

La variation gamétoclonale est une technique utilisée pour obtenir de nouveaux variants homozygotes par l'utilisation d'androgenèse ou bien de gynogenèse.

La variabilité est principalement causée par des variations nucléaires et cytoplasmiques déjà présentes dans les microspores (Chaleff, 1983 ; Sangwan et Sangwan-Norreel, 1987).

Elle est aussi induite pendant le passage par cal (Sangwan et Sangwan-Norreel, 1987). Au niveau nucléaire, cette variabilité se caractérise par des changements dans le nombre et la structure des chromosomes (Evans et al., 1984).

Dans le génome des plantes régénérées, il peut y avoir des inversions, des délétions d'une copie d'un gène, une duplication d'un gène ou des crossing-over méiotiques.

Des mutations nucléaires peuvent également affecter les gènes (Evans et al., 1984).

Au niveau de l'ADN cytoplasmique, il peut aussi y avoir des changements suite à des mutations ou à un tri des organites.

La stimulation d'un élément transposable dans le génome de la plante-mère peut aussi causer une variabilité gamétoclonale (Evans et al., 1984).

Ces variations du génome de la plante peuvent se manifester phénotypiquement par une pigmentation anormale (albinisme) ou par des variations des caractéristiques morphologiques.

Les mutations gamétoclonales dominantes ou récessives sont exprimées directement chez les plantes haploïdes et haploïdes doublées, ou une seule copie ou deux copies identiques de chaque gène sont présentes (Evans et al., 1984).

Cependant, l'altération du phénotypique, peut être d'origine physiologique. Dans ce cas, la variabilité est une réponse physiologique des cellules à un environnement de développement anormal et à des changements épigénétiques qui affectent le degré d'expression des gènes.

Seules les variations phénotypiques provoquées par altération du génome (variations gamétoclonales) sont héréditaires et transmissibles à la descendance (Evans et al., 1984).

En androgenèse, le prolongement du passage in vitro peut augmenter la variabilité gamétoclonale et le taux de doublement spontané de la garniture chromosomique des plantes régénérées. L'obtention directe de plantes haploïdes doublées permet d'éviter l'étape de diploïdisation artificielle, ce qui représente un gain de temps et une diminution de la perte de matériel végétal plus ou moins importante selon la technique de doublement et l'agent chimique utilisé (**Chaleff, 1983 ; Evans et al., 1984 ; Thompson et al., 1991**).

7.2. Intérêt de la variation gamétoclonale

La variation gamétoclonale permet d'avoir une variabilité génétique et par conséquence d'avoir une amélioration rapide de certains caractères héréditaires (**Maraschin et al., 2005**).

En plus, il y a une rapidité d'obtention des lignées pures, ce qui va offrir l'avantage de faciliter la sélection et les analyses génétiques.

Elle permet une expression de tous allèles et en particulier des gènes récessifs masqués (**Ghaemi et Sarrafi, 1995**).

7.3. Plantes haploïdes

Une plante haploïde est une plante dont le nombre chromosomique est égal au nombre chromosomique des gamètes, mâles ou femelles, de la plante dont elle est issue (**Chase, 1952**).

Les plantes haploïdes sont morphologiquement identiques aux plantes mères avec une taille plus réduite. Elles n'ont pas perdu la capacité de former de nouveaux gamétophytes mais restent presque totalement stériles.

Une fois l'individu haploïde obtenu, il suffit de doubler artificiellement son nombre chromosomique par une solution de colchicine, pour rétablir sa fertilité. En effectuant le traitement, on duplique en même temps toute l'information génétique, sur chaque chromosome puis on obtient des lignées complètement homozygotes appelées lignées « haploïdes doublées » (**Ghaemi et Sarrafi, 1995**).

Il faut des milliers d'anthères pour avoir des plantes haploïdes doublées intéressantes (**Lacadena, 1974 ; Ochatt et al, 2005**).

7.5. Intérêt des haploïdes

L'intérêt des plantes haploïdes concerne donc la rapidité d'obtention de lignées pures (homozygotes) et la réduction des coûts engendrés par l'accélération de la fixation de la variabilité obtenue par recombinaison ou par la mutagenèse (**Ghaemi et Sarrafi, 1995**).

Les haploïdes facilitent aussi la sélection et les analyses génétiques à cause de l'expression de tous les allèles et en particulier des gènes récessifs masqués (**Choo et al., 1985**).

Les haploïdes sont un matériel de choix pour la mutagenèse puisque toute mutation peut s'exprimer au niveau haploïde sauf si elle est réprimée par épistasie (**Asselin De Bauville, 1976**).

7.6. L'haplo-diploïdisation (création de lignées pures)

Ces techniques ne démarrent pas des cellules somatiques mais de cellules gamétiques (**Keller et Armstrong, 1981 ; de Buyser, 1980 in Demerly, 1985**).

Ce sont des cultures d'anthères (**Androgenèse**) ou de microspores, ou de sacs embryonnaires ou ovaires (**Gynogenèse**).

Ces processus permettent d'obtenir des lignées pures, en passant par l'haploïdisation puis le dédoublement (**Demarly, 1985**), naturellement ou artificiellement afin qu'elles deviennent fertiles.

La plante haploïde possède une morphologie identique mais elle est plus réduite et stérile.

Le doublement artificiel (colchicine bloque la mitose) du nombre de chromosomes permet de restaurer la fertilité. La plante obtenue est dite haploïde doublée ou dihaploïde (**Figure 41**).

Exemple du colza

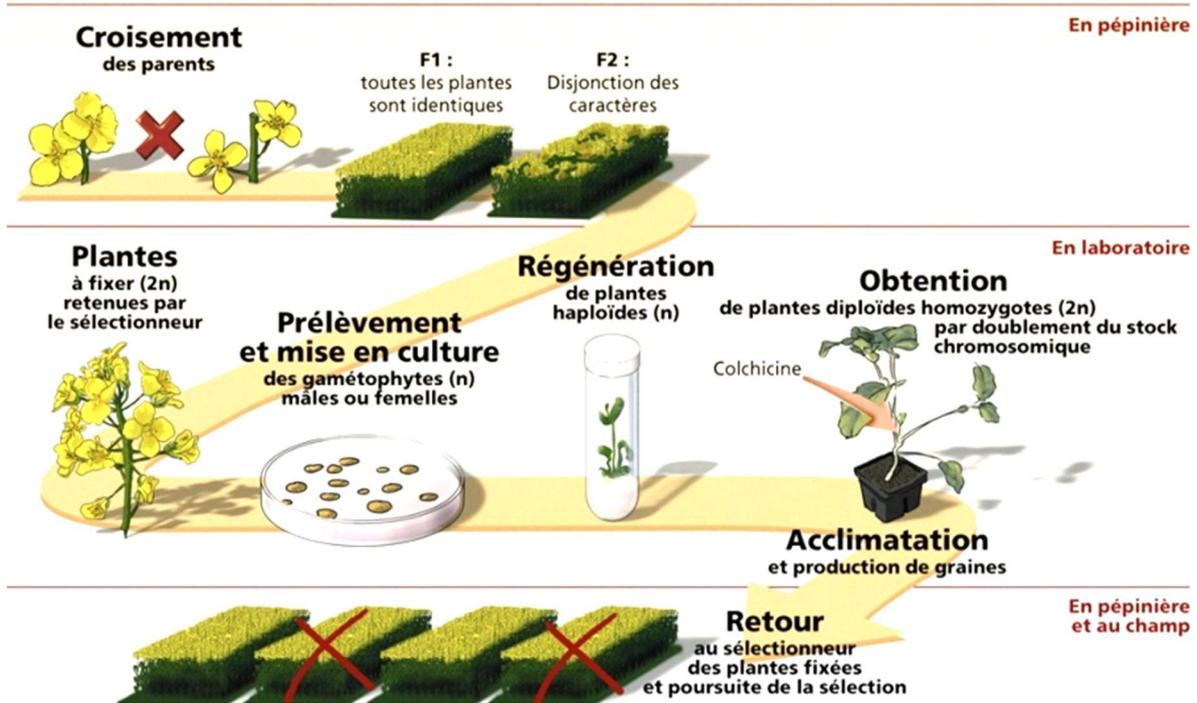


Figure 41. Principe de l'haplodiplidisation

7.7. Obtention de plants haploïdes

In vivo par :

- Apparitions spontanées (rares)
- Méthodes particulières de pollinisation
 - Pollen irradié
 - Pollinisation croisée entre génotypes incompatibles

In vitro par culture *in vitro*

7.8. Intérêts de plants haploïdes

La production d'haploïdes :

- permet aux gènes récessifs de s'exprimer en absence d'hétérozygotie : les caractères ne sont pas perdus grâce à l'homozygotie des dihaploïdes. On peut donc connaître tous les caractères du génome (important pour les sélectionneurs et généticiens).
- Création variétale : haploïde doublé.
- Gain de temps par rapport à la sélection traditionnelle.

- Recherche de mutants spontanés ou provoqués (rayon ou produit chimique) : les relations de dominance entre allèles n'interviennent pas et les caractères récessifs s'expriment et donc les mutants sont directement observables

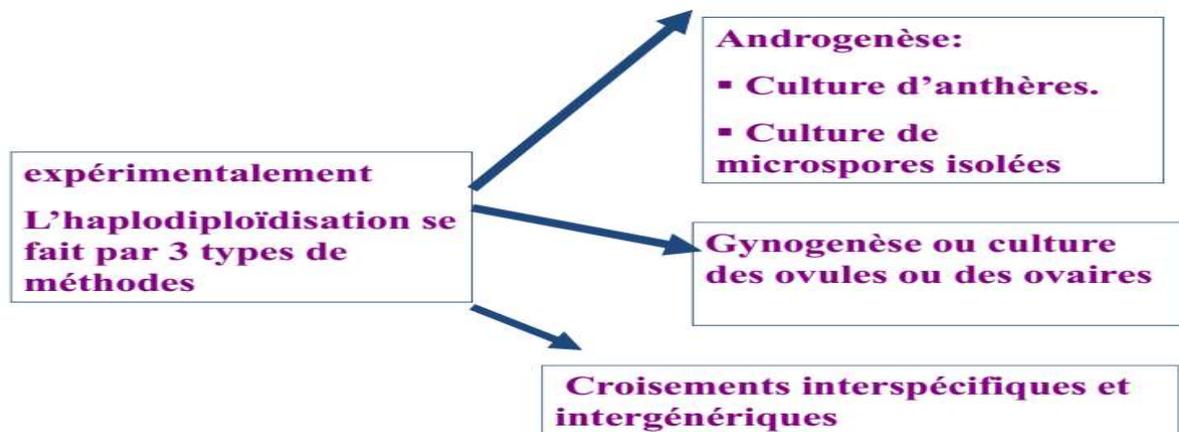
7.9. Production de plantes haploïdes :

1- Spontanément dans la nature Parthénogenèse (dev du gamète femelle -oosphère- sans fécondation :

oosphère à n embryon puis plante à n chro.

- **Apomixie** (formation d'embryon sans fécondation à partir de cellules autres que l'oosphère tel que cell synergide ou antipode)

2- Induites expérimentalement



7.10. Culture d'anthère et de pollen= Androgenèse

1.Définition

Développement sporophytique de gamétophytes mâle → obtention de plants haploïdes

- Culture *in vitro* d'anthère et de pollen
- Pollinisation croisée/ Utilisation de pollen irradié= Parthénogenèse in situ

Cette technique consiste à prélever des anthères à partir des épis et de les placer sur un milieu nutritif où quelques-unes des microspores des anthères se divisent pour former des cals ou des embryons. Ces structures se différencient ensuite pour régénérer un mélange de plantes haploïdes, haploïdes doublées, tétraploïdes, aneuploïdes et mixoploïdes.

2.Principe d'androgenèse

Repose sur la réorientation de la voie de développement gamétophytique naturel vers la voie sporophytique.

Normalement à l'issue de la méiose, le gamétophyte mâle connaît un nombre limité de mitoses (généralement une mitose) et se stabilise à l'état de grain de pollen, forme de conservation momentanée haploïde de l'espèce, mais si le grain de pollen est placé dans des conditions artificielles particulièrement favorables à sa croissance, la voie sporophytique est déclenché par une mitose du grain de pollen (Silva et al., 2000) qui se transforme en cal ou en embryon en suivant l'une des deux voies principales d'androgenèse : l'androgenèse directe et l'androgenèse indirecte.

Dans le cas de la **variation gamétoclonale**, c'est l'**androgenèse indirecte** qui est favorisée. La microspore au stade uninucléée médian à tardif va se diviser, ce qui provoque la formation d'un cal haploïde. Des tiges et des racines parfois des embryons secondaires (chez certaines espèces) se différencient sur le cal (Sangwan et Sangwan-Norrel, 1987 ; Silva et al., 2000 ; Maraschin et al., 2005).

3.Étapes de l'androgenèse

L'androgenèse in vitro est divisée en trois étapes principales :

1) **L'induction**, pendant laquelle le développement habituel du gamétophyte est bloqué et un programme alternatif (sporophytique) est induit,

2) **La culture**, pendant laquelle les microspores produisent des structures callogéniques ou embryogéniques et

3) **La régénération**, au cours de laquelle les plantes haploïdes sont régénérées à partir des embryons ou cals androgènes.

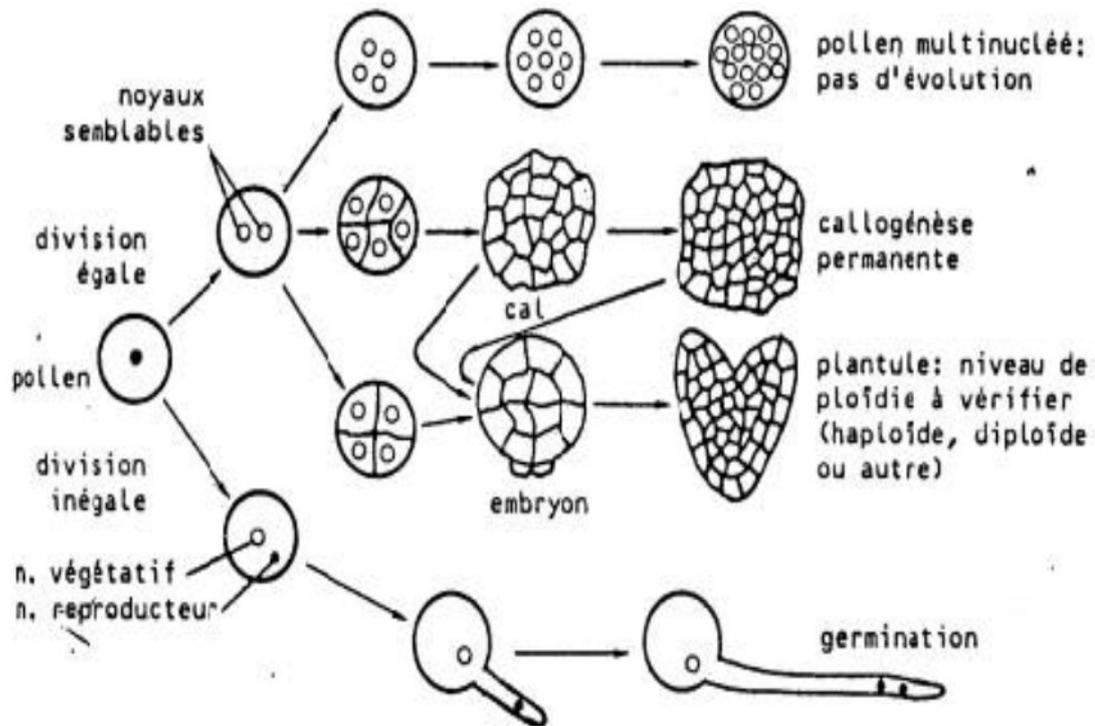


Figure 42. Comportement possible du pollen mis en culture *in vitro* (Augé et al., 1989).

4. Doublement des chromosomes

Spontané (parfois)

Utilisation d'agents mitoclasiques

- Blocage de la polymérisation des microtubules
- Colchicine
- Oryzaline (pesticide ou plus précisément une nouvelle substance active herbicide)

*Contrôle de la ploïdie

- Cytométrie en flux ((CMF) technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser).

7.11. Facteurs affectant l'androgénèse

Le taux de succès de l'androgénèse *in vitro* est sous l'influence de nombreux facteurs :

***Le génotype :**

- Certaines familles, genres, espèces et variétés sont plus « doués » que d'autres pour l'androgenèse.

-Familles prédisposées :

*Dicotylédones : Solanacées -Nicotiana tabaccum - Datura innoxia Crucifères - Brassica campestris

*Monocotylédones - Graminées: riz orge maïs.....

-A L'intérieur du genre il ya des différences entre espèces ; Triticum aestivum +++++
Triticum durum + ;

-A L'intérieur des espèces il ya des différences entre variétés :

*chez tomate sur 100 variétés 10/100 une réponse andro

*chez tomate sur 43 variétés 3/43 réponse andro

2. La variabilité génétique des mitochondries et des chloroplastes.

3. l'état physiologique et de santé des plantes-mères

4. les conditions de croissance des plantes-mères (température, photopériode, spectre lumineux, nutrition minérale, conditions hydriques et humidité relative),

5. le stade de maturité et la viabilité des microspores affectent de façon importante la réussite de l'androgenèse in vitro.

6. La densité des anthères par rapport au volume de milieu d'induction utilisé, affecte également la réussite androgénique.

Roberts-Oehlshlager et Dunwell (1990) ont étudié l'effet de la densité des anthères en culture in vitro. Une densité de 60 à 120 anthères par millilitre de milieu d'induction, ce qui est assez élevé, est recommandée.

7.12. Applications de l'androgenèse

C'est une technique utilisée chez le blé, le riz, la pomme de terre, le tabac, le maïs, l'asperge, le piment, etc. et en routine chez le colza, l'orge et l'aubergine.

Aujourd'hui de nombreux cultivars de diverses espèces et issus de ces techniques d'haplo-diploïdisation sont déposés chaque année.

7.13. Avantages de l'androgenèse

Cette technique amène un important gain de temps, ce qui permet de mettre plus rapidement sur le marché de nouvelles variétés présentant des avantages pour l'agriculteur,

l'industriel ou le consommateur. En effet une plante homozygote **est** directement obtenue, ce qui évite de faire une dizaine de générations d'autofécondations pour obtenir une lignée pure, état nécessaire aux programmes de sélection végétale.

Les plantes obtenues par cette technique sont totalement homozygotes, cela permet de dévoiler des caractères intéressants par l'expression des allèles récessifs habituellement cachés. Ces gènes pouvant être exploités éventuellement.

Des recombinants intéressants peuvent ainsi être détectés et exploités, une résistance à une maladie par exemple.

7. 14. Limites de l'androgenèse

Le rendement, (nombre de plantes viables/100 anthères cultivées) est souvent dépendant du cultivar.

Certaines variétés de céréales produisent un grand nombre de plantes albinos, donc non viables.

7.15. Culture de microspores isolées

Après des progrès réalisés dans le domaine des cultures en milieu liquides ou semi-solide ce sont les méthodes de culture de microspores isolés qui ont fait l'objet des recherches les plus actives

1- Définition :

La culture des microspores isolés est une culture qui se fait en dehors de la paroi des anthères

2- Avantages :

A- les microspores (40 000 *Datura*) sont dispersés dans un milieu de culture au lieu d'être comprimés dans l'anthère = on élimine la concurrence entre les microspores : culture homogène sur milieu de culture : conditions de nutrition plus uniformes que dans l'anthère.

B- culture monocellulaire : on est sûr que toutes les cel sont n et pas de mélange de cell

C – pas de conditionnement de la paroi de l'anthère = on élimine les corrélations +ou-

3-Méthodes de culture

3.1 Culture de microspores avec préculture des anthères

Cette technique consiste à cultiver des anthères en milieu liquide en attendant, ou en provoquant, l'ouverture des loges polliniques et la libération dans le milieu des microspores.

3.2. Culture de microspores isolées sans préculture des anthères

La culture des microspores isolées au sens strict implique un isolement préalable des microspores qui s'effectue le plus souvent par broyage mécanique des anthères ou des inflorescences, suivi de filtrations et centrifugations.

7.16. Culture d'ovaires et d'ovules=Gynogenèse

1-Historique

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 Nøum. (1976)** qui, cultivant des ovaires d'orges non pollinisés, a obtenu les premières plantes haploïdes issues du développement du sac embryonnaire.

2-Définition et Généralités

Elle correspond à la culture d'ovules ou des ovaires non fécondés. On obtient des plantules ayant un seul stock de chromosomes.

Elle a été appliquée avec succès sur un certain nombre d'espèces cultivées : l'orge, le blé, le riz. Chez le maïs l'obtention de plantes haploïdes par cette technique semble difficile.

La culture des ovules est un système expérimental élégant par lequel les ovules sont isolés aseptiquement de l'ovaire et sont cultivés de manière aseptique sur un milieu nutritif chimiquement défini dans des conditions contrôlées.

Peu étudié par rapport à l'androgenèse.

Elle correspond à la culture d'ovules ou des ovaires non fécondés. On obtient des plantules ayant un seul stock de chromosomes.

Elle a été appliquée avec succès sur un certain nombre d'espèces cultivées : l'orge, le blé, le riz. Chez le maïs l'obtention de plantes haploïdes par cette technique semble difficile.

-Peu étudié par rapport à l'androgenèse.

La culture des ovules est un système expérimental élégant par lequel les ovules sont isolés aseptiquement de l'ovaire et sont cultivés de manière aseptique sur un milieu nutritif chimiquement défini dans des conditions contrôlées.

3.Principe :

Un ovule est un megasporangium recouvert d'un tégument. Un ovule contient une mégaspore ou un ovule. Après la fécondation, il se forme un zygote monocellulaire qui conduit finalement à la formation d'un embryon mature possédant des pousses et des primordiums racinaires.

La culture in vitro des ovules aide à comprendre les facteurs qui régulent le développement du zygote à travers des stades organisés en un embryon mature.

4.Protocole de culture des ovules :

1. Recueillir la fleur ouverte. Si l'on désire des ovules fécondés, recueillir les fleurs ouvertes où les anthères sont déhiscentes et où la pollinisation a eu lieu. Pour assurer la fécondation, récoltez la fleur après 48h de déhiscence de l'anthère.
2. Retirer les sépales, pétales, androecium, etc. des ovaires contenant des ovules fécondés ou non fécondés.
3. Trempez les ovaires dans une solution de NaOCL à 6%.
4. Rincer les ovaires 3-4 fois avec de l'eau distillée stérile.
5. En utilisant une technique stérile, on soulève doucement les ovules à l'aide d'une statuette en forme de cuillère en brisant les funicules au niveau de son tissu placentaire de jonction.
6. La spatule avec les ovules est doucement descendue dans le milieu solide ou liquide stérile lorsque le flacon de culture est incliné d'environ 45 ° C.
7. Ovules endommagés ou non organisés sont rejetés si possible pendant le transfert.
8. Incuber la culture dans l'obscurité ou la lumière à 25 0C.

7.17. Etapes de Gynogenèse : Voir l'androgenèse

7.18. Applications de la Gynogenèse

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), la pastèque, le pommier, le triticales,

7.19. Avantages de la Gynogenèse

Par rapport à l'androgenèse, les risques d'obtention de plantes albinos sont fortement diminués voire nuls.

Utilisée chez les espèces qui sont récalcitrantes à l'androgenèse

7.20. Limites de la Gynogenèse : voir l'androgenèse