

# Production de semences et création de nouvelles espèces hybrides : données récentes et perspectives.

C. DUMAS\*

PRODUCTION DE SEMENCES ET CREATION DE NOUVELLES ESPECES HYBRIDES :  
DONNEES RECENTES ET PERSPECTIVES.

C. DUMAS.

*Fruits*, Sep. 1983, vol. 38, n° 9, p. 653-657

RESUME - L'acceptation et le rejet d'un pollen par le pistil sont aujourd'hui posés en termes de reconnaissance cellulaire. La nature des messagers et des récepteurs impliqués dans les interactions moléculaires entre les S-produits est analysée et discutée en fonction de modèles moléculaires proposés, en outre, en immunologie.

La viabilité des pollens, la création de banque de spermes et la réceptivité stigmatique sont envisagées comme paramètres déterminants dans la production des semences.

L'articulation recherche fondamentale-recherche appliquée en amélioration des plantes devient une nécessité dans le contexte scientifique et économique international.

## INTRODUCTION

A une époque où la biologie moléculaire permettra peut-être de solutionner par le biais des manipulations génétiques quelques-uns des grands problèmes médicaux par la correction de maladies génétiques, la production industrielle d'interferon ou d'insuline, quelle est la situation en amélioration des plantes pour la sélection des semences et la création de nouvelles espèces hybrides par suppression des barrières d'incompatibilité sexuelle ?

Jusqu'en 1950, de très nombreuses études morphologiques et physiologiques ont permis de comprendre l'ontogénèse, l'organisation du pistil et du pollen ainsi que l'embryogenèse des Angiospermes (MAHESHWARI, 1950). Et, si de nombreux travaux ont été réalisés au cours de ces 20 dernières années ; en Angleterre, sous l'impulsion de

généticien comme LEWIS ou de physiologiste comme HESLOP-HARRISON ; en Hollande, grâce à LINSKENS, biochimiste talentueux ; aux Etats-Unis sous la conduite de cytologiste comme JENSEN ou de physiologistes comme STANLEY et ROSEN; la somme des connaissances acquises dans le domaine de la biologie de la reproduction sexuée chez les plantes à fleurs est très inférieure par rapport à celle concernant la biologie animale. Pourquoi un tel retard dans un domaine qui contrôle la production des semences (fruits, graines, caryopses) et la création de nouvelles espèces hybrides ? Le nombre total de chercheurs affecté à cette recherche est très largement inférieur à celui qui touche à l'animal et au domaine médical. Cependant, le potentiel de recherche, grâce à l'INRA, en particulier, est loin d'être négligeable. Mais, plus que jamais les succès en amélioration des plantes sont tributaires des connaissances fondamentales liées à la physiologie de la reproduction sexuée. On ne peut plus, aujourd'hui, continuer à utiliser des techniques empiriques de levée d'incompatibilité sans connaître les modifications que l'on inflige à la plante. Cet empirisme s'explique pourtant par l'absence de données suffisantes à l'échelle cellulaire et moléculaire. Compte-

\* - Université Claude-Bernard, Lyon I, Biologie végétale, CMEABG 43, bld du 11 Novembre 1918 - 69622 VILLEURBANNE (France)

Communication présentée au 2<sup>e</sup> Colloque sur les Recherches fruitières - Bordeaux, 1982.

tenu de la taille des pollens et des pistils, de la complexité des phénomènes qui s'y déroulent, l'emploi des technologies les plus sophistiquées conjugué à l'utilisation de concepts nouveaux devraient marquer les recherches au cours de la prochaine décennie (DUMAS et coll., 1984) dans un secteur de recherche qui a été défini comme un des programmes pilotes en France pour la biotechnologie de demain (PELLISSOLO, 1980).

Dans le cadre de cet exposé introductif, nous soulignons quelques aspects fondamentaux qui conditionnent à la fois la production de semences et la création de nouvelles espèces.

### VIALIBITE DES POLLENS ET CREATION D'UNE BANQUE DE SPERMES

De nombreuses études ont été entreprises dans le but de conserver la viabilité des pollens et d'établir ainsi des banques de spermes à l'usage des améliorations de plantes (revue STANLEY et LINSKENS, 1974). Cependant, là encore, la multiplicité des techniques employées et la variabilité des résultats obtenus soulignent les difficultés à résoudre un tel problème essentiellement par approche empirique.

A notre avis, trois problèmes majeurs doivent guider une telle recherche :

- 1) la recherche d'une méthode rigoureuse d'estimation de la teneur en eau d'un grain de pollen vivant
- 2) l'organisation et la nature des membranes qui limitent les échanges d'eau pollen-milieu environnant.
- 3) la détermination d'une méthode sûre et rapide pour contrôler la viabilité des grains de pollen.

#### Estimation de la teneur en eau d'un grain de pollen

Aucune donnée n'est actuellement utilisable sur ce problème. On admet que les grains de pollen renferment entre 15 et 35 p. 100 d'eau (STANLEY et LINSKENS, 1974). Cependant, les méthodes utilisées - ne tiennent pas compte de la viabilité des pollens -, sont destructives et utilisent comme référence le poids frais (DUMAS et GAUDE, 1983).

#### Etat des membranes dans les organismes déshydratés.

Les travaux de SIMON (1974) permettent de supposer qu'en dessous de 20 p. 100 d'eau, les membranes biologiques sont poreuses et ne peuvent remplir leur rôle dans la perméabilité cellulaire. D'après SHIVANNA et HESLOP-HARRISON (1981), le pollen des Graminées aurait une membrane plasmique poreuse à rapprocher de sa forte déshydratation et de sa courte viabilité. Nous pensons

que ces conclusions sont peut-être critiquables car l'argumentation de ces auteurs s'appuie, en outre, sur des clichés en MET réalisés à partir de pollens fixés en milieu aqueux. Des études effectuées en ATG chez le colza nous incitent à penser que la viabilité des pollens serait dépendante de l'intégrité membranaire (DUMAS, SOULIER et SAID, résultats inédits).

#### Méthodes permettant de contrôler la viabilité des pollens

Actuellement, il existe deux types de méthodes utilisées pour tester la viabilité des pollens :

##### ● Germination *in situ* ou *in vitro*.

Il est incontestable que la méthode la plus sûre consiste à tester la viabilité directement par la production de semence. Seulement, c'est une méthode peu commode et longue. On peut suivre le cheminement des tubes polliniques en utilisant le bleu d'aniline et l'examen en lumière UV (STANLEY et LINSKENS, 1974).

La germination *in vitro* semble a priori plus aisée. Cependant, si les pollens bicellulés sont relativement faciles à cultiver, ce n'est pas le cas pour les pollens tricellulés (STANLEY et LINSKENS, 1974). D'autre part, les milieux de culture et la température peuvent agir comme facteurs limitants. Préalablement, il convient de déterminer le pourcentage de pollens stériles.

##### ● Méthode fluorochromatique (FCR).

La méthode FCR, mise au point par HESLOP-HARRISON et HESLOP-HARRISON (1970), est basée sur les propriétés de perméabilité sélective du plasmalemmes végétatif vis-à-vis d'un sel de fluorescéine. Récemment, SHIVANNA et HESLOP-HARRISON (1981) ont comparé les résultats obtenus par FCR et germination *in vitro*. Ils concluent à une bonne corrélation entre ces deux méthodes. La critique essentielle que l'on puisse adresser à cette méthode rapide et facile d'emploi est sa nature destructive.

##### ● Utilisation de la RMN.

Nous avons testé la RMN (utilisation des temps de relaxation pour  $^1\text{H}$ ) et la méthode FCR et établi une corrélation entre la teneur en eau liée (en terme de RMN) et la viabilité des pollens (DUMAS, DUPLAN et SAID, résultats inédits). Cette méthode est précise, répétitive et non destructive, mais ces résultats doivent être affinés et le protocole expérimental amélioré.

#### RECEPTIVITE DU STIGMATE

La réceptivité stigmatique a été rarement étudiée en tant que paramètre conditionnant le succès de la pollinisation.

Chez le teak (*Tectona grandis* L.), la réceptivité du stigmate est bonne à l'anthèse ( $A = 0$ ) ou un jour après ( $A + 1$ ). Parallèlement, la viabilité du pollen est maximale de  $A = 0$  jusqu'à  $A + 2$  et nulle pour  $A + 3$  (EGENTI, 1978). La stérilité femelle chez *Tannia* (*Xanthomonas sagittifolium* LINN.) serait due, en réalité, à une protogynie. La réceptivité du stigmate est bonne pour  $A = 2$  et nulle pour  $A = 0$  (JOS et coll., 1980). Chez la vigne, CARRARO et coll. (1980) ont précisé que la réceptivité est comprise entre  $A = 0$  et  $A + 10$ .

Plusieurs paramètres semblent conditionner la réceptivité stigmatique : l'intervalle de temps par rapport à l'anthèse, la température, le r.H. l'heure de la journée, la présence d'exsudat stigmatique, etc. (voir DUMAS et GAUDE, 1984).

### ADHESION STIGMATE-POLLEN

L'adhésion stigmate-pollen peut être comprise aujourd'hui comme la résultante de paramètres physiques et physico-chimiques. Peu d'études ont été publiées sur les paramètres physiques qui ont été classés par ordre d'importance décroissante : tension de surface, force du vent, force électrostatique, gravité et ensemble des forces d'inertie et électrodynamique (WOITTIEZ et WILLEMSE, 1979). Chez les animaux, quelques-uns de ces paramètres ont été analysés en détail (GRINNELL, 1978).

Concernant les constituants chimiques formant la glue responsable de l'adhésion, de nombreux points d'interrogation persistent aujourd'hui par suite du manque d'analyses chimiques des surfaces polliniques et stigmatiques (revue ZANDONELLA et coll., 1981). Les arabinogalactanes-protéines (AGP), polymères ramifiés de nature polysaccharidique pourraient jouer un rôle clef comme adhésif de base (CLARKE et coll., 1979). Parmi les autres composés : saccharides libres, glycoconjugués et pigments, pourraient renforcer les propriétés adhésives des AGP (DUMAS et GAUDE, 1982).

### RECONNAISSANCE CELLULAIRE PISTIL-POLLEN

Difficulté de distinguer adhésion et reconnaissance cellulaires.

Très souvent, ces deux notions sont confondues. Si l'adhésion est spécifique, on peut parler de reconnaissance. FRASIER et GLASER (1979) distinguent les séquences non spécifiques et fréquemment réversibles de l'adhésion de celles spécifiques et irréversibles de la reconnaissance. Ces concepts d'adhésion et reconnaissance sont difficiles à utiliser dans le cas d'organismes pluricellulés comme les pollens.

Données générales sur la reconnaissance cellulaire

Si l'on se réfère à GREAVES (1975), il convient de

distinguer au cours de la communication cellulaire à courte distance :

1. une molécule signal qui, émise par une cellule A, interagit avec une molécule récepteur localisée sur une cellule B. le signal peut être soluble ou lié à la surface cellulaire.
2. une molécule «haptène» capable de déstabiliser le complexe réversible signal-récepteur.
3. l'induction d'un second signal à partir de l'interaction moléculaire signal-récepteur.

### Principes généraux applicables aux végétaux eucaryotiques

De nombreux modèles moléculaires ont été proposés chez les animaux. Les principes clef-serrure, enzyme-substrat avec mise en jeu de glycosyltransférases, constitution de protéine oligomérique ou interaction de type lectine-récepteur glycosylé spécifique ont été analysés de manière critique par rapport à la reconnaissance pistil-pollen (CLARKE et KNOX, 1978 ; HESLOP-HARRISON, 1978 ; DUMAS et GAUDE, 1981) et certains d'entre eux peuvent servir d'hypothèse de départ pour de nouvelles expérimentations.

Dans tous les cas, il y a formation d'un complexe contrôlé par une ou plusieurs paires de molécules complémentaires. Une d'entre elles, au moins, serait protéique et correspondrait, si elle est multisite et liée à un sucre, à une lectine.

Chez les plantes, les cellules sont limitées par une paroi qui peut jouer un rôle passif (filtre pour la molécule signal) ou actif (induction d'un signal par un fragment de la paroi). Il semblerait dans le cas d'interaction de type plante-pathogène que des fragments de paroi pourraient éliciter une biosynthèse de phytoalexine (ALBERSHEIM, 1980). Or, on sait que le tube pollinique est parasite du pistil (LABARCA et LOEUWUS, 1973). Aussi, on peut admettre aujourd'hui que la reconnaissance pistil-pollen s'effectue par une série successive d'étapes mettant en jeu signaux et récepteurs (DUMAS et coll., 1984).

Reconnaissance pistil-pollen liée au système sporophytique : le modèle *Brassica*.

HESLOP-HARRISON (1978) a proposé un modèle unilatéral mettant en jeu un signal pollinique et un récepteur stigmatique. L'adhésion et la reconnaissance cellulaires pourraient être contrôlées, en partie au moins, par une ou plusieurs glycoprotéines présentes sur une pellicule extracellulaire fixant la Con A et apparaissant à la maturité sexuelle (ROBERTS et coll., 1981). Une bonne adhésion caractériserait l'auto-compatibilité et un modèle moléculaire a été proposé, modèle qui explique certaines techniques de levée d'incompatibilité (DUMAS et GAUDE, 1981). Les caractéristiques



téristiques des glycoprotéines, récepteur spécifique du gène S, sont rares (NISHIO et HINATA, 1979 ; FERRARI et WALLACE, 1981).

#### Reconnaissance pistil-pollen liée au système gametophytique : le modèle *Prunus*.

Le groupe d'Adrienne CLARKE, à l'Université de Melbourne par une analyse biochimique et immunochimique, a isolé 2 molécules d'extraits stylaires chez *Prunus avium* le cerisier, à partir de deux cultivars : var. Lambert (génotype S<sub>3</sub>S<sub>4</sub>), var. Bedford (génotype S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>).

Ces deux molécules nommées P et S sont présentes uniquement dans les extraits stylaires. On ne les trouve pas dans les autres organes floraux ou végétatifs. Elles ont des propriétés physico-chimiques sensiblement différentes et une distribution spécifique dans l'espace et dans le temps. Dans l'espace, la molécule P existe chez le cerisier mais aussi chez l'abricotier, le pêcher, le poirier (MAU et coll. 1982). Par contre, la molécule S est spécifique au cerisier. Dans le temps, la molécule P est présente à tous les stades ontogéniques de la fleur alors que la molécule S n'apparaît qu'au moment de la maturité sexuelle. La localisation de cet antigène S dans le style, siège de l'auto-rejet, à maturité sexuelle, - fait à rapprocher de la levée d'incompatibilité par pollinisation des bourgeons -, en fait une molécule candidate comme S - molécule (LEWIS, 1979). En outre, une série de bioessais *in vitro* à l'aide de faibles concentrations (10 µg/ml) a permis de révéler son action inhibitrice sur la croissance des tubes polliniques (WILLIAMS et coll., 1982). Aujourd'hui, on ne sait pas si cet antigène S agit seul, s'il correspond à la molécule signal d'un allèle S ou bien à un récepteur spécifique pour ce signal et localisé sur la paroi ou le plasmalemme du tube pollinique (voir DUMAS et coll., 1984).

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Comme nous l'avons montré précédemment, de part la complexité des problèmes, dont quelques-uns ont été à peine abordés dans cet article, et des technologies à utiliser, peu de données sûres existent actuellement permettant aux améliorateurs et aux industriels d'optimiser la pollinisation et d'augmenter la production des semences ou bien de créer de nouvelles espèces d'intérêt économique. A notre avis, plusieurs problématiques méritent d'être particulièrement approfondies.

#### Définition du gène S et création de banque de gènes.

Actuellement, malgré le nombre de travaux réalisés et les nombreuses expériences de croisement basées sur la génétique mendélienne, on est loin de connaître la localisation du gène S qui contrôle les mécanismes d'acceptation et de rejet en cas de croisements intra ou interspécifiques. Si personne ne conteste l'existence de ce supergène ancestral qui aurait présidé au contrôle phylogénique au cours de

l'évolution, les spéculations relatives à son mode d'action sont peu nombreuses et s'appuient essentiellement sur l'hypothèse formulée par LEWIS en 1960 (voir LEWIS, 1979). Ce supergène commanderait par le biais d'une spécificité primaire commune aux Gymnospermes et aux Angiospermes l'interspécificité. Le contrôle de l'intraspecificité (reconnaissance et discrimination préférentielle du soi au profit du non-soi) serait sous le contrôle d'une spécificité secondaire acquise secondairement par les Angiospermes au cours de l'évolution (PANDEY, 1977). Chez les Angiospermes, trois mécanismes différents contrôleraient l'incompatibilité : indépendant, complémentaire ou retardé. Le contrôle indépendant serait le plus primitif, les autres apparaissent plus tard chez les Monocotylédones et les Dicotylédones évoluées (PANDEY, 1980).

La création de banque de pollens, analogue aux banques de spermes chez les Mammifères, est une nécessité en amélioration des plantes. Les recherches sur le contrôle de la viabilité du pollen que nous avons entreprises sont orientées, à court terme, vers la réalisation d'un tel programme.

#### Connaissance des surfaces cellulaires du pollen et du pistil.

La reconnaissance cellulaire qui régit la compatibilité ou le rejet dépend de signaux et de récepteurs dont la nature, la localisation et le type d'interaction restent entièrement à élucider. Quelques équipes de recherche, en Australie (groupe de CLARKE et KNOX), en Angleterre (équipes de DICKINSON et d'HELOP-HARRISON), aux Etats-Unis (groupe de WALLACE, de MULCAHY et de NASRALLAH), au Japon (groupe de NISHIO et HINATA) et notre propre groupe, s'attachent à l'étude de ce problème fondamental. La taille des partenaires en présence : pollen et pistil, leur viabilité ou réceptivité, leur identité génétique, rendent extrêmement délicate l'étude de ce problème qui nécessite des technologies hautement sophistiquées. Supprimer ou modifier les reconnaissances cellulaires revient à lever l'incompatibilité et à créer de nouvelles espèces. L'utilisation de facteurs de reconnaissance apportés par l'effet mentor va dans ce sens (voir DUMAS et coll., 1984).

#### Utilisation de concepts immunologiques.

Poser le problème de l'incompatibilité en termes de reconnaissance cellulaire du soi et du non-soi revient à utiliser les concepts immunologiques basés sur le fonctionnement du système immunitaire et du complexe d'histocompatibilité. La recherche de molécules hautement spécifiques du type « immunoglobuline » chez les végétaux a été entreprise à Melbourne par CLARKE et KNOX (1978) sous l'impulsion de Mac Farlane BURNET (1971), prix Nobel d'immunologie. Nous avons avec ces chercheurs réfléchi et présenté ici les orientations futures de recherche dans la biologie de la reproduction sexuée chez les Plantes à fleurs (DUMAS et coll., 1984).

Compte-tenu de l'enjeu économique, souligné en outre dans le rapport «Biotechnologie demain» (PELISSOLO, 1980) il nous paraît urgent et nécessaire de regrouper les chercheurs maîtrisant les concepts et les technologies appropriées dans une même unité supportée par les moyens indispensables au succès de ces recherches capables d'ap-

porter des solutions révolutionnaires à l'agriculture et à l'industrie des semences de demain. Sans cet effort, nous serons à très court terme dépendants sur le plan scientifique et économique d'autres nations plus avancées dans ce domaine.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALBERSHEIM (P.). 1980.  
Cellular Biology.  
*Communication Congrès Internat. Berlin.*
- BURNET (F.M.). 1971.  
*Nature*, 232, 230.
- CARRARO (L.), LOMBARDO (G.), CARGNELLO (G.) et GEROLA (F.M.). 1979.  
*Vitis*, 18, 285.
- CLARKE (A.E.), GLEESON (P.), HARRISON (S.) et KNOX (R.B.). 1979.  
*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 3358.
- CLARKE (A.E.) et KNOX (R.B.). 1978.  
*Quart. Rev. Biol.*, 53,3.
- DUMAS (C.), CLARKE (A.E.) et KNOX (R.B.). 1984.  
*La recherche* (sous presse).
- DUMAS (C.) et GAUDE (T.). 1981.  
*Acta Soc. Bot. Pol.*, 59, 235-247.
- DUMAS (C.) et GAUDE (T.). 1982.  
*Actualités Bot.* 1, 89-101.
- DUMAS (C.) et GAUDE (T.). 1983.  
*Phytomorphology* 31, 191-201.
- DUMAS (C.) et GAUDE (T.). 1984.  
*Ann. Rev. Pl. Sci.* (sous presse).
- FERRARI (T.E.), BRUNS (D.) et WALLACE (D.H.). 1981.  
*Plant Physiol.*, 67, 270.
- FRASIER (W.) et GLASER (L.). 1979.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 48, 491.
- GREAVES (M.F.). 1975.  
Cellular recognition.  
*Chapman and Hall, London.*
- GRINELL (F.). 1978.  
*Internat. Rev. Cytol.*, 65.
- HESLOP-HARRISON (J.). 1978.  
Cell-Cell recognition S.E.B.  
*Cambridge University Press*, 121.
- HESLOP-HARRISON (J.) et HESLOP-HARRISON (Y.). 1970.  
*Stain Technol.*, 45, 115.
- JOS (J.S.), BAI (V.K.) et HRISHI (N.). 1980.  
*Ann. Bot.*, 45, 123.
- LABARCA (C.) et LOEWUS (F.). 1973.  
Polysaccharides.  
*Academic Press, New York*, 115
- LEWIS (D.). 1979.  
Sexual incompatibility in plants.  
*Edward Arnold, London.*
- MAHESHWARI (P.). 1950.  
An introduction to the embryology of Angiosperms.  
*Mc Graw-Hill Book Co., New York.*
- MAU (S.), RAFF (J.) et CLARKE (A.E.). 1982.  
*Planta* 156,505-516.
- NISHIO (T.) et HINATA (K.). 1979.  
*Jap. J. Gen.*, 54, 307.
- PANDEY (K.K.). 1979.  
The genus *Nicotiana*.  
in : *The biology and Taxonomy of the Solanaceae*  
(Ed. J.G. HAWKES), *Academic Press, London*, p. 241.
- PANDEY (K.K.). 1980.  
*New Phytol.*, 84, 381.
- PELISSOLO (J.C.). 1980.  
La biotechnologie, demain ?  
*Rapport au Premier Ministre, DGRST Documentation française.*
- ROBERTS (I.N.), STEAD (A.D.), OCKENDON (D.J.) et DICKINSON (H.G.). 1981.  
*Theor. Appl. Genet.*, 58, 241.
- SHIVANNA (K.R.) et HESLOP-HARRISON (J.). 1981.  
*Ann. Bot.*, 47, 759.
- SIMON (E.W.). 1974.  
*New Phytol.*, 73, 377.
- STANLEY (R.C.) et LINSKENS (H.F.). 1974.  
Pollen.  
*Springer-Verlag, Berlin.*
- WILLIAMS (E.G.), RAMM-ANDERSON (S.), DUMAS (C.), MAU (S.L.) et CLARKE (A.E.). 1982.  
*Planta*, 156, 517-519.
- WOITTEZ (R.D.) et WILLEMSE (M.T.M.). 1979.  
*Phytomorphology*, 29, 57.

