"Le Sélectionneur Français" 2007 - 2008 (n° double 58 - 59), **41 - 46**

APPORTS DE LA GENOMIQUE A LA SELECTION DES PLANTES POUR LA TOLERANCE A LA SECHERESSE

Michel Zivy
UMR de Génétique Végétale INRA/Université Paris XI/CNRS/AgroParisTech
Ferme du Moulon - 91190 Gif-sur-Yvette

1 - LA TOLERANCE A LA SECHERESSE, UN CARACTERE COMPLEXE

De nombreux caractères comme la croissance de l'appareil végétatif, la floraison, le nombre de grains, la sénescence foliaire sont affectés ou modifiés par la sécheresse. Ces modifications dépendent du stade de développement de la plante : les caractères affectés seront différents selon que la sécheresse intervient à un stade de croissance végétative ou à un stade de floraison. Elles dépendent également du scénario de sécheresse : les réponses de la plante peuvent varier en fonction de l'intensité du stress et de sa durée, et en fonctions d'autres facteurs environnementaux comme la température.

Différentes fonctions physiologiques et cellulaires interviennent dans la réponse des plantes au déficit hydrique. En dehors des réponses du type échappement consistant à terminer son cycle avant l'arrivée de la saison de faible pluviosité, on peut citer la régulation de la croissance et de l'ouverture des stomates, l'ajustement osmotique, la régulation de la circulation de l'eau dans la plante, la modification du métabolisme carboné. D'autres réponses, même si elles sont dues à des effets secondaires de la sécheresse, peuvent être très importantes : réaction au stress oxydatif induit par le déficit hydrique dans les feuilles, modification de voies métaboliques due à des carences minérales causées par la faible absorption par les racines, réponse à la chaleur entraînée par l'élévation de la température des feuilles en l'absence de transpiration. Ces réponses sont sous le contrôle de différents systèmes de régulation et de transduction du signal, dans lesquels intervient en particulier l'acide abscissique (ABA), hormone végétale dont la synthèse est induite en conditions de sécheresse.

L'existence de nombreuses réponses, différentes selon le scénario (une même réponse peut être avantageuse dans un scénario et désavantageuse dans un autre), fait de la tolérance à la sécheresse un caractère complexe, dans lequel interviennent de nombreux gènes, et qui présente une forte interaction génotype x environnement. Malgré cela, il faut remarquer que, chez le maïs au moins, les méthodes « classiques » de sélection mises en œuvre au cours du XXème siècle ont permis une amélioration de ce caractère. Le rendement du maïs est passé de l'ordre de 1T/ha dans les années 1930 à 7T/ha dans les années 90. Cette progression est due pour 50 à 60% au progrès génétique, le reste étant attribué à l'évolution des pratiques agricoles. Des comparaisons entre variétés mises sur le marché au cours des 50 dernières années ont montré une progression du rendement en conditions de déficit hydrique, même si elle est plus faible qu'en conditions normales (Duvick *et al.* 1999, Campos *et al.* 2004). Le gain génétique ne s'est donc pas fait au détriment de la tolérance à la sécheresse. On pense que cette amélioration involontaire est liée à l'utilisation massive d'essais multi-locaux dans le processus de sélection.

Dans ce contexte, les progrès de la génomique et de la post-génomique interviennent à plusieurs niveaux :

- ***le marquage moléculaire*** permet de repérer les régions chromosomiques contenant des gènes d'intérêt. Il est utilisé dans la sélection assistée par marqueurs, qui permet d'exploiter la diversité naturelle ;
- ***l'analyse de l'expression des gènes*** : la transcriptomique et la protéomique permettent de repérer les gènes régulés par la sécheresse. Cette connaissance peut être ensuite utilisée dans l'utilisation de la variabilité naturelle ou dans l'amélioration par transgenèse ;
- ***la transgenèse*** permet la modification de l'expression d'un ou de plusieurs gènes.

2 - LA SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS

Les marqueurs moléculaires, uniformément répartis sur tous les chromosomes de la plante étudiée, permettent, en analysant des populations en ségrégation, de repérer des régions chromosomiques dans lesquelles se trouvent des gènes dont le polymorphisme a une influence sur le caractère étudié : les QTL (Quantitative Trait Locus).

La tolérance à la sécheresse est, comme nous l'avons vu plus haut, très dépendante des conditions de culture : son héritabilité est faible. Dans de nombreuses études on a préféré utiliser des caractères associés, d'héritabilité *a priori* plus importante. Ces caractères sont choisis en fonction des connaissances sur la physiologie de la plante, qu'ils participent à la réponse ou qu'ils soient révélateurs du stress enduré.

Des analyses de QTL ont ainsi été réalisées pour les dates de floraison, la protandrie, l'importance de l'appareil racinaire, la sénescence foliaire, la conductance stomatique, la photosynthèse, l'efficience d'utilisation de l'eau, la transpiration, le potentiel osmotique, le potentiel hydrique foliaire, la teneur relative en eau, l'ajustement osmotique, la concentration en ABA, le métabolisme carboné, l'intégrité membranaire (fuites d'électrolytes)…

Il faut remarquer qu'il existe un débat sur certains de ces caractères. Ainsi certains auteurs ne pensent pas que l'ajustement osmotique doive être considéré comme un facteur positif pour le maintien du rendement : le maintien de la turgescence, en favorisant la croissance, risque d'épuiser plus rapidement l'eau disponible dans le sol et de provoquer ainsi un stress hydrique plus important.

Une autre façon de traiter le problème de la mauvaise reproductibilité des essais en condition de sécheresse est d'utiliser un modèle écophysiologique qui tient compte de la variation environnementale. Ainsi l'équipe de François Tardieu (Reymond et al, 2003) a mis au point un modèle de croissance foliaire qui tient compte de la température, de l'humidité de l'air et de la sécheresse du sol. Le caractère étudié dans les analyses de QTL n'est plus la croissance elle-même (qui varie selon les essais), mais la réponse de la croissance à la sécheresse (constante) en fonction de l'intensité du déficit hydrique (variable).

Si de nombreuses études de QTL de réponse à la sécheresse ont été réalisées, assez peu sont allées jusqu'à l'utilisation en sélection des QTL cartographiés. Un cas de réussite est celui de la sélection réalisée par le CIMMYT sur le maïs : 5 QTL de protandrie ont été localisés dans une population issue du croisement entre deux lignées (Ribaut et al, 1997). Les allèles favorables ont pu être introgressés par back-cross dans une lignée à bonne qualité agronomique. Ceci a permis une multiplication par 2 à 4 du rendement en conditions de sécheresse. D'autres programmes de ce type ont également permis un gain génétique appréciable, chez le blé (sélection pour une meilleure efficience de l'eau) et chez le sorgho (sélection sur la sénescence foliaire : caractère « stay green »).

3 - ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES ET DE L'ACCUMULATION DES PROTEINES

L'analyse à grande échelle des ARN (transcriptome) et des protéines (protéome) permet d'étudier l'expression des gènes et les variations quantitatives des protéines en conditions de déficit hydrique. Ces analyses ont permis d'identifier des gènes induits lors d'un déficit hydrique, qui participent potentiellement aux réponses de la plante. Pour mieux caractériser leur expression, des comparaisons sont faites avec d'autres types de stress comme les stress salin ou froid, ou avec l'application d'ABA.

Ce type d'analyse a également permis de mettre en évidence les variations selon que le déficit hydrique est accompagné ou non d'un stress thermique. La différence de réponse entre organes ou tissus a aussi été montrée, par exemple entre albumen et placenta, ou entre tissus foliaires à différents stades de différenciation. Ces analyses globales « sans *a priori* » viennent compléter les études portant sur les gènes connus pour être impliqués dans différentes réponses (par exemple, enzymes impliquées dans la synthèse des osmolytes, aquaporines,…). Elles permettent également d'identifier des cibles des facteurs de transcription impliqués, en comparant des plantes qui les sur-expriment avec des plantes non transformées.

En analysant la variation d'expression sous l'effet du déficit hydrique dans différents génotypes, les analyses du transcriptome et du protéome permettent aussi de mettre en évidence des gènes ou des protéines « candidats », dont la variation d'expression pourrait être la cause des variations phénotypiques entre les génotypes analysés (de Vienne et al 1999, Jeanneau et al 2002). Ces candidats peuvent ensuite être utilisés en sélection assistée par marquage (on sélectionne les génotypes qui possèdent l'allèle favorable) ou en transgenèse (on sur-exprime le gène candidat).

4 - UTILISATION DE LA TRANSGENESE POUR L'AMELIORATION DE LA TOLERANCE A LA SECHERESSE

Jusqu'à présent l'essentiel des travaux de transgenèse a porté sur des gènes impliqués dans des fonctions connues pour être induites en réponse à la sécheresse. La très grande majorité des travaux réalisés jusqu'à présent portent sur des plantes modèles, cultivées en pots, dans des serres ou des chambres de culture. Souvent, les stress subis par les plantes sont supérieurs à ceux qu'elles subissent en conditions de culture en champ.

Des gènes impliqués dans différentes catégories de fonctions ont été utilisés.

Gènes impliqués dans l'ajustement osmotique

De nombreux travaux portent sur l'accumulation de solutés compatibles : proline, glycine-betaïne, sucres polyols (mannitol, trehalose, myo-inositol, sorbitol ; par exemple, Garg *et al.* 2002). Dans la plupart des cas les concentrations de solutés compatibles obtenues ne peuvent pas expliquer l'amélioration de la tolérance observée, car elles sont insuffisantes pour avoir une influence sur l'ajustement osmotique. On pense en général que ces composés jouent un rôle dans la protection contre le stress oxydatif, voire un rôle de type chaperon dans la protection de différentes structures cellulaires, ou qu'ils interviennent *via* une régulation du métabolisme carboné. Par ailleurs des phénotypes anormaux (retards de développement, nécrose, faible fertilité) sont parfois apparus.

Gènes impliqués dans la réaction au stress oxydatif

Le déficit hydrique induit la formation de radicaux libres qui endommagent les macromolécules et les membranes. Différentes protéines peuvent les éliminer ou diminuer leur formation : superoxyde dismutase, catalase, ascorbate peroxydase, glutathione reductase, etc… L'un des rares exemples de test en champ a porté sur la sur-expression d'une superoxide dismutase de tabac

dans la luzerne (McKersie *et al.* 1998). Il a permis de montrer un net effet positif de la sur-expression, avec une repousse maintenue à environ 80 % du témoin irrigué pour les plantes transformées alors qu'elle n'était que de 20 % pour les plantes non transformées, après 9 jours d'arrêt de l'irrigation.

Autres fonctions

La sur-expression de gènes codant pour des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins) a été testée, avec ou sans succès selon les cas. Les LEA sont des protéines très hydrophiles et certaines sont induites par le déficit hydrique. On pense qu'elles jouent un rôle de stabilisation des membranes ou de macro-molécules. Des travaux ont également porté, entre autres, sur des gènes impliqués dans le transport d'ions, jouant potentiellement un rôle dans l'ajustement osmotique, et sur des gènes codant pour des protéines de choc thermique.

Facteurs de transcription et gènes impliqués dans la signalisation

Il existe différentes familles de facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes en réponse au déficit hydrique. Certains, comme les AREB (ABA-Responsive Element Binding proteins), sont impliqués dans la réponse à l'ABA, d'autres comme les DREB (Drought-Responsive Element Binding proteins) sont indépendants de l'ABA. L'avantage de l'utilisation des facteurs de transcription en transgenèse est que cela permet d'activer l'expression de plusieurs gènes avec une seule insertion.

Différents travaux ont été effectués sur ces familles de gènes. Il est intéressant de noter que des résultats négatifs ont d'abord été obtenus avec la sur-expression d'un DREB, qui avait un effet négatif sur la croissance de la plante. Par la suite un effet positif a pu être obtenu en utilisant une construction où le DREB n'était induit qu'en condition de déficit hydrique.

Dans bien des cas la sur-expression constitutive d'un gène, facteur de transcription ou non, provoque une diminution de la croissance. Ce n'est pas un effet recherché, et cela peut biaiser les résultats, car la plante transformée, plus petite, épuise moins rapidement le milieu. L'utilisation de promoteurs spécifiques permettant l'expression des gènes seulement en conditions de déficit a déjà permis de palier à ce problème dans certains cas. Par exemple, des résultats intéressants ont été obtenus par transformation du colza avec une construction permettant de sous-exprimer un gène impliqué dans la sensibilité à l'ABA, placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par la sécheresse (Wang et al 2005). De cette façon la plante devient hypersensible à l'ABA en conditions de déficit hydrique, et réagit plus vite au stress. Les plantes ont été testées en champ, et dans des conditions de sécheresse où la production des plantes non transformées baissait de 14 %, elle ne baissait pas chez les plantes transformées.

5 - CONCLUSION

Quelle que soit la méthode d'amélioration utilisée, il est nécessaire de prendre en compte les scénarios de sécheresse et le stade de développement des plantes. Ceci nécessite l'utilisation de modèles écophysiologiques. La complexité des réponses au niveau cellulaire et moléculaire nécessite leur analyse avec les outils de la post-génomique (transcriptomique, protéomique, métabolomique), pour comprendre les mécanismes qui se mettent en place et pour analyser les différences entre génotypes.

Grâce aux marqueurs moléculaires et à l'utilisation de caractères associés, la sélection assistée par marqueurs permet de détecter des QTL. Prolongeant la sélection « classique », elle donne la possibilité de fixer les allèles favorables de plusieurs QTL dans le même génotype. Les marqueurs moléculaires permettent également d'évaluer la diversité naturelle des gènes d'intérêt identifiés par les analyses transcriptomiques et protéomiques.

La transgenèse n'a encore apporté que peu de résultats validés au champ. Des progrès sont attendus en particulier du fait qu'on peut de mieux en mieux cibler les conditions dans lesquelles le transgène s'exprime. Par ailleurs la transgenèse est un des outils utilisés pour analyser les mécanismes de réponse des plantes. Il est peu probable *a priori* que l'expression d'un seul gène permette une amélioration importante pour un caractère aussi complexe que la tolérance à la sécheresse. Cependant, le contrôle fin de l'expression de facteurs de transcription et de gènes impliqués dans la signalisation du déficit hydrique représente des voies intéressantes de progrès.

"Journée de l'ASF du 1er février 2007"
"Nouveaux objectifs de sélection face aux enjeux climatiques, énergétiques et environnementaux de demain"

BIBLIOGRAPHIE

CAMPOS H., COOPER M., HABBEN J. E., EDMEADES G.O., SCHUSSLER J.R. (2004). Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Res*, 90, 19-34

DUVICK D.N. & CASSMAN K.G. (1999). Post-Green Revolution Trends in Yield Potential of Temperate Maize in the North-Central United States. *Crop Science*, 39, 1622-1630

GARG A.K., KIM J.K., OWENS T.G., RANWALA A.P., CHOI Y.D., KOCHIAN L.V., WU R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 15898-903

JEANNEAU M., GERENTES D., FOUILLASSARD X., ZIVY M., VIDAL J., TOPPAN A., PEREZ P. (2002) Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie*, 84:1127-1135.

MCKERSIE B.D., BOWLEY S.R., HARJANTO E., LEPRINCE O. (1996). Water-Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant Physiol*, 111, 1177-1181

REYMOND M., MULLER B., LEONARDI A., CHARCOSSET A., TARDIEU F. (2003). Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyse the genetic variability of the responses of leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiology*, 131, 664-675

RIBAUT J.M., JIANG C., GONZALEZ DE LEON D., EDMEADES G.O., HOISINGTON D.A. (1997). Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor Appl Genet*, 94, 887-896

de VIENNE D., LEONARDI A., DAMERVAL C. ET ZIVY M (1999): Genetics of proteome variation for QTL characterization : application to drought stress responses in maize. *J Exp Bot*., 50:303-309

WANG Y., YING J., KUZMA M., CHALIFOUX M., SAMPLE A., MCARTHUR C., UCHACZ T., SARVAS C., WAN J., DENNIS D.T., MCCOURT P., HUANG Y. (2005). Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant J*, 43, 413-24