

Authentification variétale par marqueurs moléculaires

Dominique Mingeot, Bernard Watillon

Département de Biotechnologie

1. Introduction

La commercialisation nationale et internationale tant de matériel végétal (arbres, semences) que de produits dérivés (fruits, plants, graines, tubercules) exige de plus en plus de garanties d'authenticité variétale. L'authentification variétale s'effectue traditionnellement sur base d'observations morphologiques. Cette identification morphologique nécessite de disposer de nombreuses indications qui ne peuvent souvent être relevées que sur une plante à son complet développement (tubercules, feuilles, fleurs). D'autre part, l'aspect d'une plante peut être modifié par les conditions de l'environnement (composition du sol, présence de maladies...); ces modifications peuvent rendre l'identification d'une variété malaisée.

Ces dernières années, l'utilisation de marqueurs moléculaires en identification variétale a connu un développement spectaculaire. Les marqueurs moléculaires offrent en effet l'opportunité de contourner les difficultés liées aux observations morphologiques en identifiant des variétés directement à partir de leur ADN (empreintes génétiques). L'ADN est présent et identique dans chaque cellule de chaque organe d'une plante; les marqueurs moléculaires offrent dès lors la possibilité de travailler à partir de n'importe quel organe: feuille, tubercule... De même, l'ADN ne se modifie ni en fonction du stade de développement de la plante, ni au cours des saisons et les conditions dans lesquelles la plante est cultivée ne l'affectent pas.

L'identification sur base d'empreintes génétiques est devenue familière au grand public dans le domaine de la criminologie: l'ADN contenu dans un cheveu, dans une trace de sang permet d'identifier un individu. La même technique peut être appliquée aux végétaux: chaque variété possède des empreintes génétiques qui lui sont spécifiques.

2. Qu'est ce qu'un marqueur moléculaire ?

L'ADN, constituant des chromosomes, contient l'information génétique d'un individu. Un marqueur moléculaire est une séquence (un fragment) d'ADN présentant des variations

d'un individu à l'autre (dans le cas de la pomme de terre, d'une variété à l'autre). Lorsque l'on parle de l'utilisation de marqueurs moléculaires, il s'agit de l'utilisation d'une technique permettant de visualiser ces différences.

Il existe différents types de marqueurs moléculaires correspondant à différentes techniques. Le principe de base est toutefois identique. L'ADN est constitué de 4 bases (ATGC); l'ordre de succession de ces bases tout le long des chromosomes constitue l'information génétique contenue dans l'ADN. Il existe, entre deux variétés, une multitude de différences dans cet ordre de succession: il peut s'agir de la substitution ponctuelle d'une base par une autre ou encore de l'insertion d'un fragment d'ADN en un lieu précis du chromosome. L'utilisation d'un marqueur moléculaire permet de visualiser l'une, voire plusieurs de ces différences.

La figure 1 illustre la technique utilisée pour visualiser un type de marqueur moléculaire bien particulier: le microsatellite. Un microsatellite est une séquence d'ADN constituée de répétitions d'un petit motif de 2, 3 ou 4 bases. Ce type de séquence, très fréquent dans l'ADN de toutes les espèces animales et végétales, présente une variabilité élevée entre variétés (différences au niveau du nombre de répétitions du motif). Pour comparer les empreintes génétiques de 2 variétés, l'ADN est extrait des cellules à partir d'un échantillon. Au sein de cet ADN, la séquence microsatellite est multipliée en des millions de copies par un procédé appelé PCR (Polymerase Chain Reaction); une molécule fluorescente accrochée à chaque exemplaire de la séquence multipliée permet de visualiser cette dernière. Enfin, la différence de taille entre les séquences des 2 variétés est mise en évidence par électrophorèse: les molécules d'ADN se déplacent dans un gel d'acrylamide sous l'influence d'un courant électrique; la vitesse de déplacement étant fonction de la taille des fragments.

Chaque marqueur moléculaire va donc donner une empreinte génétique de chaque variété; cette empreinte peut se comparer à un code barre permettant d'identifier la variété.

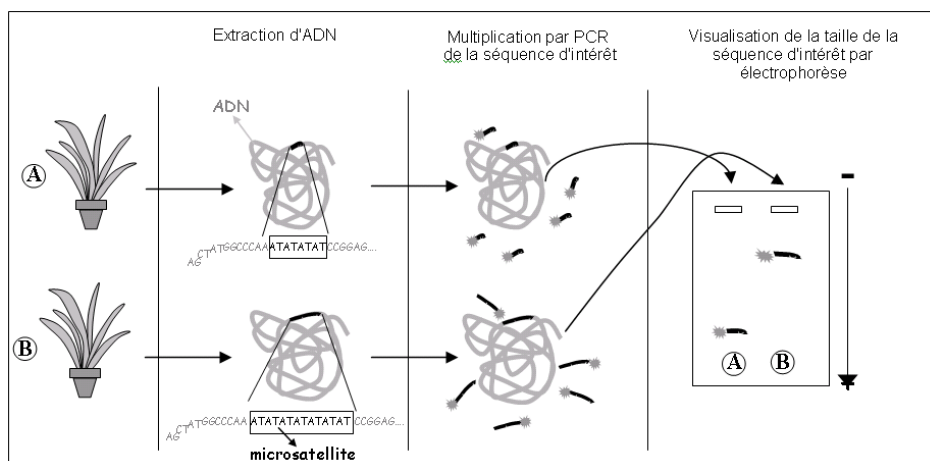


Figure 1. Principe d'utilisation d'un marqueur moléculaire de type microsatellite en identification variétale.

3. Utilisation de marqueurs moléculaires en authentification variétale chez la pomme de terre

Des travaux faisant état de l'utilisation de marqueurs moléculaires sur la pomme de terre ont été publiés par différentes équipes. Ainsi, différents articles décrivent des travaux de mise au point de l'utilisation de microsatellites pour distinguer des variétés de pomme de terre. Ces articles donnent la séquence des microsatellites utilisés ainsi que leurs conditions d'utilisations (Kawchuk L. et al., 1996; Provan J. et al., 1996; Mc Gregor et al. 2000). D'autre part, Ghislain M. et al (2004) décrivent des essais effectués pour sélectionner, parmi les microsatellites déjà décrits, les plus informatifs et reproductibles dans le cadre du génotypage de variétés de pomme de terre.

les conditions d'utilisation de ces marqueurs dans notre laboratoire. Différents paramètres ont été optimisés afin de disposer d'un protocole rapide et fiable permettant de travailler à partir d'échantillons de natures diverses : extractions d'ADN au départ de feuilles, de tubercules et de vitroplants; choix de marqueurs discriminants pour les variétés les plus communes en Belgique; répétitions des essais sur différents échantillons de la même variété pour s'assurer de la reproductibilité du résultat.

Chaque marqueur retenu a été testé sur une dizaine de variétés de référence. Un exemple d'empreinte génétique est donné à la figure 2 : pour un microsatellite, une empreinte caractéristique peut être associée à chacune des 10 variétés testées.

Nous disposons donc à l'heure actuelle d'un outil permettant, à partir d'une feuille ou d'un tubercule, d'authentifier l'identité variétale d'un échantillon par comparaison à un témoin de référence de la variété considérée (voir figure 3). Dans ce cadre, le département Biotechnologie du CRA-W met en place une procédure en vue de l'obtention d'une accréditation selon la norme ISO 17025.

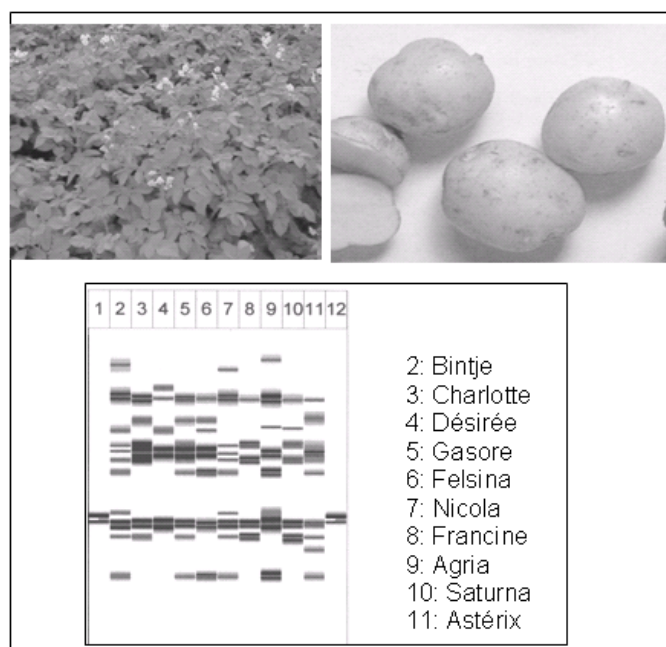


Figure 2. Empreintes génétiques de 10 variétés de pomme de terre obtenues avec le microsatellite STIIKA

4. Avantages et limitations des marqueurs moléculaires

L'avantage majeur des marqueurs moléculaires est de permettre de travailler en toutes saisons, à n'importe quel stade de développement de la plante et à partir de n'importe quel organe.

D'autre part, l'identification par marqueurs moléculaires se base sur la détection de différences au niveau de l'information génétique entre variétés. Ces différences sont en nombre tel que l'on a coutume de dire que les marqueurs moléculaires existent en nombre quasi illimité. Remarquons qu'une énorme proportion de ces différences (plus de 90 % pour certaines espèces végétales) n'ont aucune répercussion visible sur la morphologie de la plante; l'utilisation de marqueurs moléculaires présente par conséquent un intérêt supplémentaire: la possibilité d'ajouter en nombre quasi illimité des critères d'identification impossibles à distinguer à partir du seul aspect visuel de la plante. Certains marqueurs moléculaires présentent en outre un degré de polymorphisme très élevé.

Le département de Biotechnologie du CRA-W possède une longue expérience de l'utilisation de marqueurs moléculaires dans différentes optiques, y compris l'identification variétale. En pomme de terre, nous avons choisi un assortiment de marqueurs microsatellites parmi les publications citées ci-dessus et mis au point

Toutefois, l'information apportée par un marqueur moléculaire est du même ordre que l'information apportée par un critère morphologique: l'empreinte génétique obtenue par un marqueur peut être commune à un grand nombre de variétés. L'identification de variétés par marqueurs moléculaires peut donc nécessiter l'utilisation de plusieurs marqueurs. D'autre part, il faut avoir à l'esprit qu'une identification se fait toujours à partir d'une description de référence. Ainsi, en criminologie un individu ne sera identifié par ses empreintes digitales que s'il est déjà fiché. L'identification par marqueurs moléculaires se fait donc en comparant les empreintes génétiques des échantillons aux empreintes de référence des variétés.

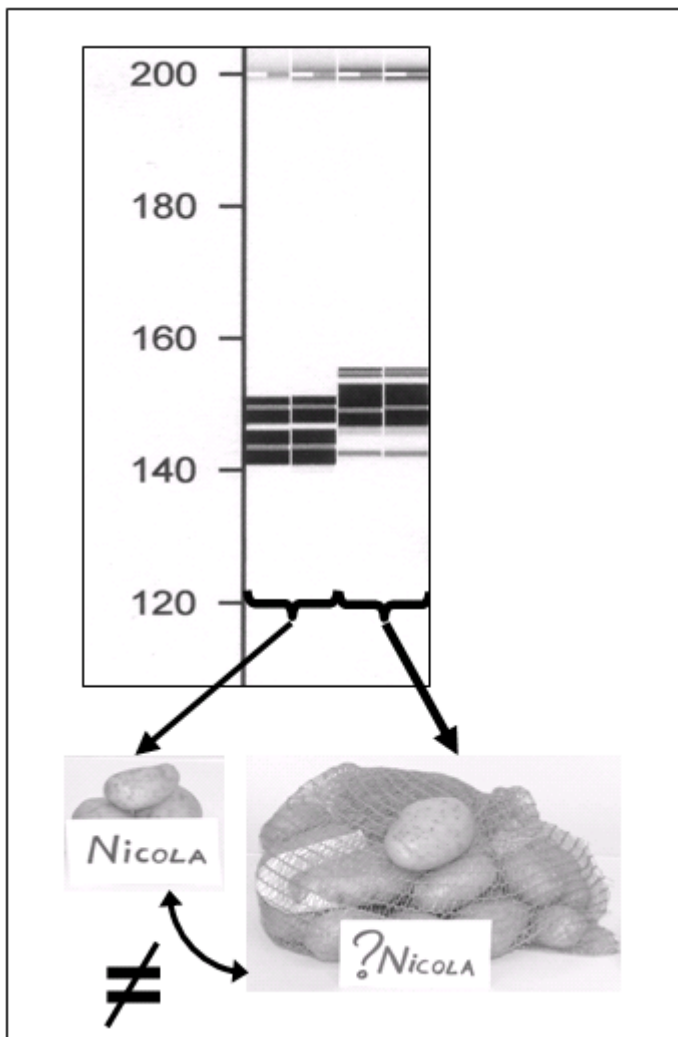


Figure 3. Authentification variétale: comparaison de l'empreinte génétique d'un échantillon avec celle d'un témoin de référence de variété Nicola

Dans ce cadre, nous sommes actuellement capables de contrôler l'identité d'une variété (par comparaison avec un témoin) mais nous ne pouvons pas garantir l'identification d'une variété inconnue. L'identification d'une variété inconnue nécessiterait en effet l'existence d'une base de données des empreintes génétiques des variétés multipliées en Belgique. La constitution d'une telle base de donnée entre dans les projets du département Biotechnologie du CRA-W.

Enfin, si l'on reconnaît déjà une valeur légale aux empreintes génétiques en matière de criminologie, l'usage des marqueurs moléculaires dans le cadre de tests de

distinction, homogénéité, stabilité (DHS) réalisés sur les obtentions végétales par l'UPOV n'est pas reconnu à l'heure actuelle. Toutefois, de nombreux laboratoires de par le monde travaillent à l'élaboration de bases de données d'empreintes génétiques pour un grand nombre d'espèces végétales commercialisées. La constitution de telles bases de données rejoint -et vient avantageusement compléter- le principe de listes de critères morphologiques distinctifs par variété.

Références bibliographiques

Ghislain M., Spooner D., Rodriguez F., Villamon F., Nunez J., Vasquez C., Waugh R. and Bonierbale M. (2004) Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 108: 881-890.

Kawchuk L., Lynch D., Thomas J., Penner B., Sillito D. and Kulcsar F. (1996) Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *Am Potato J* 73: 325-335.

McGregor C., Lambert C., Greyling M., Louw J. and Warnich L. (2000) A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113: 135-144.

Provan J., Powell W. and Waugh R. (1996) Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 92: 1078-1084.