

***Diversité génétique interspécifique chez
les graminées fourragères pérennes***
**étude de cas dans différentes populations
sélectionnées de Festulolium**

Présenté par Mr. : YEKKOUR Amine

Promoteur : Mr. Abdelguerfi A. Maître de conférences, INA
08/10/2007

Jury: Président: Mme. Mekliche L. Maître de Conférences, INA Co- promoteur : Mr. Ghesquière
M Docteur INRA Lusignan (France) Examineurs : Mme. Abdelgerfi-Laouar M. MR, INRAA Mr.
M'Hammedi Bouzina M. Maître de Conférences, Univ de Chlef Mme. Ben Achour-Ayadi R. Docteur,
MAT Univ de Blida

Table des matières

Remerciements . .	5
ص غ لم . .	6
Resumé . .	7
Abstract . .	8
Liste des abréviations . .	9
Introduction . .	10
Chapitre I : Contexte général . .	11
I- Notions de botaniques élémentaires des graminées fourragères en général, fétuques et ray-grass en particulier . .	11
I.1 Cycle de végétation d'une graminée fourragère . .	11
I-2 Taxonomie et caractéristiques des espèces . .	13
I-3 Résumé des principales caractéristiques des genres <i>Lolium</i> et <i>Festuca</i> . .	19
I-4 Définition des <i>Festulolium</i> . .	20
II- Schémas d'améliorations et stratégie d'obtention des hybrides interspécifiques . .	20
II-1 Schémas classiques d'amélioration des graminées fourragères et inscription au catalogue officiel . .	20
III- Aperçu de quelques résultats phénotypiques obtenus par amphiploïdisation ou introgression . .	29
III-1 Résistance à la sécheresse et au froid . .	29
III-2 Rendement, pérennité . .	30
III-3 Valeur alimentaire . .	30
III-4 Fertilité . .	31
Chapitre II : Matériel et méthodes . .	32
I- Stratégie du travail expérimental . .	32
I-1 Le recensement des marqueurs SSR-PCR . .	32
I-2 Tester les marqueurs recensés . .	32
I-3 Géotypage : . .	32
II- Matériel végétal . .	32
II-1 Espèces parentales . .	32
II-2 Hybrides de première génération (F1) ou hybrides primaires : . .	33
II-3 Rétrocroisements et intercroisements de back-cross1 . .	33
III- Méthodes mises en œuvre . .	34
III-1 Extraction des ADN génomiques . .	34
III-2 Amplifications PCR . .	35
III-3 Migration des produits d'amplification sur gel d'acrylamide- séquenceur . .	36
III-4 Méthodes statistiques utilisées dans l'étude . .	38
Chapitre III : Résultats et discussion . .	41
Recensement des marqueurs SSR-PCR cartographiés . .	41
II- Tester pour les marqueurs recensés (screening) , retenus, la qualité des électrophorogrammes . .	43

III- Génotypage des populations étudiées à l'aide d'un ensemble de marqueurs . .	44
III-1 Etude des fréquences alléliques . .	45
III-2 Comparaison des populations par leurs fréquences alléliques au marqueur B1B6 . .	52
III- 3 Comparaisons des populations 2 à 2 sur la base des phénotypes observés par un test d'indépendance de Kolmogorov Smirnov : Diversité interpopulation . .	55
III- 4 Etude de diversité à l'intérieur même de chaque population . .	58
Conclusion et perspectives . .	60
Références bibliographiques . .	62
ANNEXES . .	65

Remerciements

J'adresse une reconnaissance particulière à **Mr. ABDELGERFI A. et à Mr. GHESQUIERE M.**, pour leurs encadrement et leurs constante disponibilité.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude :

M^{me} MEKLICHE L. pour l'honneur et le privilège qu'elle m'a accordés en présidant le jury.

Mr. M'Hammedi Bouzina M., M^{me} ABDELGERFI-LAOURA M., et M^{me} Ben Achour-Ayadi R. pour m'avoir honoré en acceptant d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui ont participé au succès de se travail.

ص خ لم

دراسة النجليات والتقدم عند فيستوليوم هي طريقة لتكوين نموذج فهم نخيرات الوراثة عند النجليات. النهجين بين فيستوكا والري غراس يمكننا فرض نحسنت وراثية عند النجليات الحلقية من خلال الجمع بين النيات والقيمة الغذائية لكل نوع.

العلامات SSR تمكننا عرض احتمالات جديدة لتحقيق عند أصناف نو تركيبة وراثية معقدة كالفستوليوم. التطبيق المباشر لاستخدام العلامات الجزئية عند فيستوكا – لوليوم هو إكتشاف جينات فيستوكا متعلقة بالدائمة ومقومة الجفاف التي يمكن إدخالها في الري غراس بواسطة البلاك كروس.

29 علامة اختبارات في وقت التنظيم الجيني ولكن وجهنا صعوبات كبيرة لقراءة العلامك ، ولذلك اضطرنا إلى العمل بمجموعة محدودة من العلامك، B1B6, OSRB B1B6, B4D7, B1C8. بكشف حديثا جينات فيستوكا أولوليوم.

من أول بوليكروس الضغط الاختباري كان فاسيا جدا مقارنة المجتمعات بواسطة نسبة الأليليك باستخدام B1B6 أو باستخدام الظاهريات الوراثة المحصول عليها عن طريق كل العلامات تبدو أنها تبعد تدريجيا عبر الأجيال. الإستقرار النسبي عند الهجاء تطابق لتركيبية Amphiploïde نام. أما BC1 نسبة النخيرات المرفعة تطابق هيكلة Allotetraploïde أو Autopoliploïde جزئي دراسة النخيرات داخل كل المجتمعات أظهرت نسبة نجانس مرتفعة.

الكلمات الأساسية : نهجين ما بين الأصناف ، فيستوليوم ، خريطة وراثية ، علامات الجزئية الخرامنيات الدائمة ، SSR ، *Lolium multiflorum* ، *Festuca glaucescens* .

Resumé

L'étude de la variabilité chez les *Festulolium* est un moyen de modéliser l'évolution chez les graminées en utilisant la variabilité interspécifique.

L'hybridation entre fétuques et ray-grass permet d'envisager de nouveaux progrès génétiques chez les graminées fourragères en combinant pérennité et valeur alimentaire des deux espèces.

Les marqueurs SSR permettent d'envisager de nouvelles possibilités d'investigation chez des espèces à structure génétique complexe comme les *Festulolium*.

L'une des applications les plus prometteuses du marquage moléculaire dans le complexe *Festuca-Lolium* est la détection de gènes de fétuque liés à la pérennité et à la résistance à la sécheresse que l'on pourrait introgresser par simple back-cross dans le ray-grass.

29 marqueurs ont été sélectionnés après recensement. Lors du génotypage nous sommes heurtés à de grosses difficultés de lecture des gels. Ces artefacts nous ont forcé à n'exploiter que les informations délivrées par un pool restreint de marqueur qui sont : OSRB, B4D7, B1C8, et B1B6. B1B6 présente la particularité de reconnaître spécifiquement des séquences fétuque ou ray-grass.

La sélection subie par les populations étudiées a été très intense et cela dès les premiers polycross.

La comparaison des populations sur la base des fréquences alléliques au marqueur B1B6 et sur la base des phénotypes obtenus pour l'ensemble des marqueurs se rejoignent : Les populations d'hybrides évoluent peu, alors que les populations BC1 semblent s'éloigner progressivement au fur et à mesure de leur avancée en génération.

La relative stabilité des hybrides correspondrait à une structure génomique se rapprochant de l'amphiploïdie stricte, alors que la l'évolution plus prononcée chez les populations BC1 correspondrait à une structure allotétraploïde ou partiellement autopolyploïde.

L'étude de diversité intra-population a révélé une grande homogénéité à l'intérieur de chaque population

Mots clés : Hybridation interspécifique, *Festulolium*, Cartographie génétique, Marqueur moléculaire, Graminées pérennes, SSR, *Festuca glaucescens*, *Lolium multiflorum*.

Abstract

Festulolium variability survey is a way of modelling gramineous evolution using intergeneric variability.

Intergeneric hybridization between fescue and ryegrass offers further opportunities in forage grass breeding through combination of persistency and feeding value of both species.

SSR markers allow to face new investigation possibilities for species with a complex genetic structure like *Festulolium*.

The most promising scope of application for molecular markers in *Festuca-Lolium* complex is detection of perennial and drought resistance fescue genes which can be introduced in ryegrass by simple back crossing.

29 markers were selected. At the time of genotyping we faced big difficulties of gels reading which obliged us to work just with most informative markers OSRB, B4D7, B1C8, and B1B6. B1B6 reveals specifically fescue or ryegrass genes.

From first polycross the selection pressure was very hard.

Population survey using allelic frequency with B1B6 or using phenotypes obtained through all markers concord: Hybrids populations relatively do not change; BC1 populations seem to move away progressively with the generation number.

Relative stability of hybrids would correspond to strict amphidiploid genetic structure.

Intra population survey showed a high homogeneity degree for each population.

Key words: Intergeneric hybridization, *Festulolium*, genetic mapping, Molecular marker, perennial grasses, SSR, *Festuca glaucescens*, *Lolium multiflorum*.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism.

BC : Back Cross.

EST : Expressed sequence tag.

F1 : Résultante de la première génération d'un croisement.

Gish : Genomic In situ Hybridization.

Kb : Kilos bases.

KS : Kolmogorov Smirnov.

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA.

Rflp : Restriction Fragment Length Polymorphism.

SSR : Simple sequence repeat.

Introduction

Les principaux objectifs de l'amélioration des graminées fourragères concernent la pérennité, la valeur alimentaire et le rendement. La pérennité passe par l'obtention de variétés tolérantes à un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques : sécheresse, maladies (rouille, flétrissement bactérien...). La valeur alimentaire des fourrages est une caractéristique complexe qui dépend de nombreux facteurs (composition en éléments peu digestibles comme la lignine, remontaison et ingestibilité...).

Les espèces fourragères pérennes se caractérisent par leur allogamie (polygénétique) et une pollinisation anémophile. En conséquence, les variétés créées sont des variétés synthétiques et le processus de sélection implique l'utilisation de croisements en polycross.

L'hybridation interspécifique permet d'augmenter la variabilité génétique disponible à tout processus de sélection.

La grande proximité génétique des espèces des genres *Festuca* et *Lolium* et leurs complémentarités pour de nombreux caractères agronomiques permet de combiner la pérennité et la tolérance à la sécheresse de la fétuque avec la productivité et la valeur alimentaire du ray-grass.

L'obtention de ces hybrides interspécifiques est possible par différentes voies tant par les espèces botaniques impliquées que par la stratégie utilisée (introgression ou amphiploidisation). L'ensemble des hybrides ainsi obtenus est regroupé sous le terme « générique » de *Festulolium*.

L'intérêt « génétique » de l'étude du modèle *Festulolium* pour les sélectionneurs est de pouvoir agir sur la variabilité génétique intraspécifique de chaque composante de l'hybride en augmentant leur variabilité génétique interspécifique.

Aujourd'hui l'évolution des techniques de marquage moléculaire permet d'envisager de nouvelles possibilités d'investigation chez des espèces à structure génétique complexe (interspécifique, polyploïde) comme les *Festulolium*.

L'objectif principal de ce travail est d'identifier un pool de marqueurs microsatellites fiables (données lisibles et répétables) déjà cartographiés permettant d'étudier l'évolution de certaines populations sélectionnées (dérivant de l'hybride directe ou en génération de back-cross).

Dans un premier chapitre nous aborderons : les notions de botaniques élémentaires de la fétuque et du ray grass, le schémas d'améliorations et la stratégie d'obtention des hybrides interspécifiques et un aperçu de quelques résultats phénotypiques obtenus par amphiploïdisation ou introgression. Le deuxième chapitre porte sur le matériel génétique utilisé et les méthodes utilisées. Les résultats et discussion sont présentés dans le troisième chapitre. Nous terminerons par une conclusion et les perspectives de ce travail.

Chapitre I : Contexte général

I- Notions de botaniques élémentaires des graminées fourragères en général, fétuques et ray-grass en particulier

I.1 Cycle de végétation d'une graminée fourragère

On distingue 3 grandes phases dans le développement d'une graminée fourragère pluriannuelle (Gillet, 1980)

le développement végétatif,

le développement reproducteur,

la maturation des graines.

Avant de développer le cycle proprement dit graminées prairiales il faut noter que ce dernier est perturbé à intervalles plus ou moins réguliers par l'exploitation sous forme de pâture ou bien de fauche.

Une graminée est constituée d'un ensemble de talles (figure 1). Après le semis et la levée commence la phase de tallage. La talle constitue l'unité de base des graminées fourragères et donc de la production végétative et grainière. Chaque talle est constituée d'une tige, même si elle n'est pas toujours visible, de feuilles et de racines. A l'aisselle de chaque feuille se trouve un bourgeon, par lequel se fait l'apparition des nouveaux organes aériens, c'est à dire les feuilles et la tige.

En phase végétative, seule la production de feuilles et de nouvelles talles est visible. La tige a alors des entre-noeuds très courts.

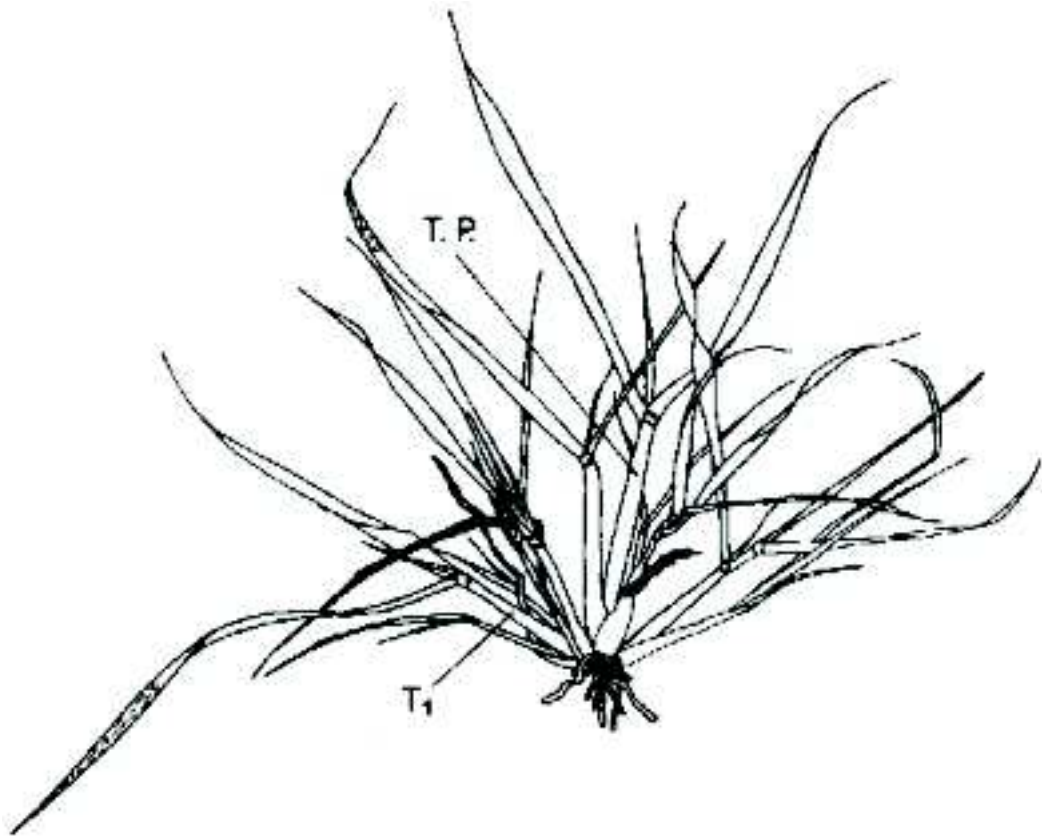


Figure 1 : Une graminée végétative est constituée de talles. D'après Gillet (1980). TP : Talle primaire T₁ : Première talle fille

La figure 2 montre la structure interne d'une touffe végétative.

La feuille naît sur le côté, à la base de l'apex. C'est une ébauche foliaire. La protubérance va ensuite faire le tour du sommet végétatif puis s'allonger sous forme d'un tube qui est caché dans la gaine de la feuille précédente. La zone de croissance correspond au tiers inférieur de la feuille. La feuille adulte est constituée d'une gaine et d'un limbe, la ligule sépare ces deux parties.

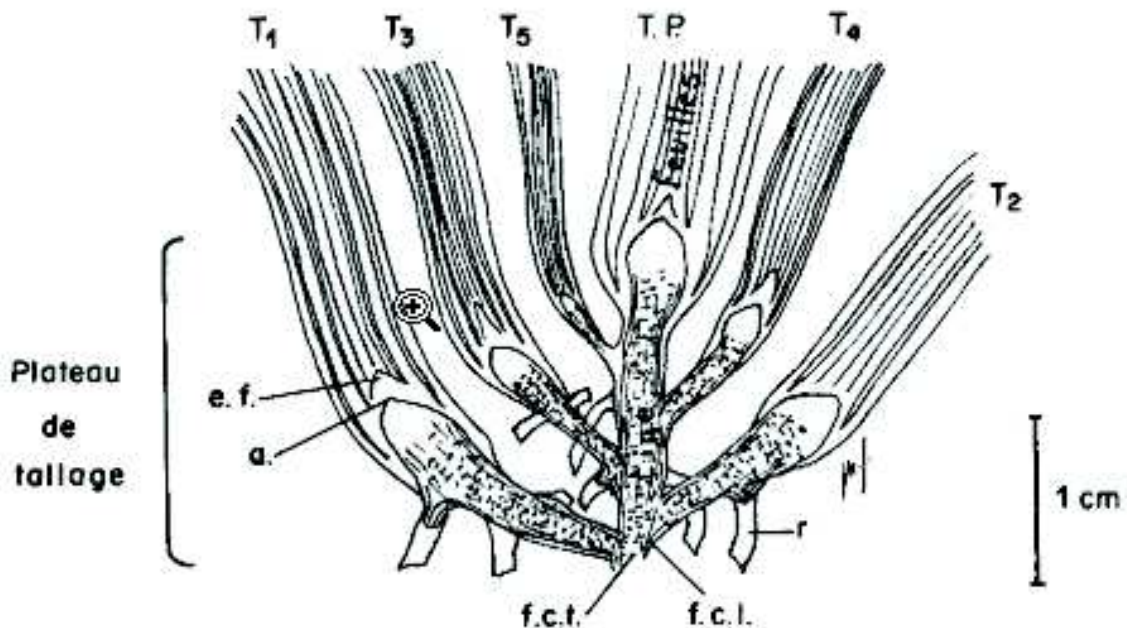


Figure 2 : Structure interne d'une touffe végétative. D'après Gillet (1980). TP : Talle primaire, T₁ à T₅ : Talles filles numérotées dans l'ordre d'apparition, ef : Ebauche foliaire, a : Apex, fct et fcl : Faisceaux conducteurs transversaux et longitudinaux.

Lors du passage à l'état reproducteur, les entre-nœuds s'allongent et l'apex se différencie en inflorescence (épi ou panicule). On appelle montaison, la phase d'allongement de la tige qui va jusqu'à l'épiaison. Ce terme désigne également l'allongement de la tige dans son entier. On appelle épiaison, le moment où l'inflorescence vient de sortir de la gaine de la dernière feuille (feuille culminaire).

Au moment où l'allongement de la tige est le plus rapide, la plante subit la "crise de tallage". Il s'agit du blocage des bourgeons en vie ralentie et de la mort d'une partie des talles végétatives au bas de tiges. Tous les assimilats sont dirigés vers la tige, La crise de tallage entraîne donc un ralentissement du renouvellement végétatif de la plante.

La floraison a lieu au moment où se termine l'allongement de la tige. Les étamines sont visibles hors de la fleur. La floraison a lieu du bas vers le haut de l'inflorescence. Le pollen apporté par le vent tombe sur les stigmates. La fécondation a lieu dans les heures qui suivent. Il s'agit pour la majorité des graminées fourragères d'une allofécondation.

La formation puis la maturation des graines dure environ 1 mois. Contrairement aux céréales, les graines tombent au sol. C'est l'égrenage. Au cours de la maturation, la tige se dessèche.

Cependant, les bourgeons dormants à la base de la tige restent en vie ainsi que certaines racines.

Une espèce est dite "alternative" si elle entre en montaison l'année du semis de printemps.

Une plante "remonte" si elle produit encore des tiges après une coupe ayant interrompu une phase reproductrice. C'est la remontaison.

I-2 Taxonomie et caractéristiques des espèces

Les fétuques (genre *Festuca*) et les ray-grass (genre *Lolium*) appartiennent à la famille des *Poaceae* (ou *graminées*). Ces deux genres sont regroupés dans la tribu des *Festuceae* avec les *Dactyles* (*Dactylis*) et les *Poa*.

I-2.1 Le genre *Festuca*

Le genre *Festuca* rassemble des graminées allogames, en grande majorité pérennes, dont le niveau de ploïdie varie de 2x à 6x (voire 8x et 10x). Elles se caractérisent notamment par une inflorescence en panicule d'épillets étalés assez flexible (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995).

On classe les espèces en deux sous-genres : *Bovinae* et *Ovinae*. Le sous-genre *Bovinae* regroupe les fétuques à grandes feuilles et à limbes plans (fétuques fourragères) et le sous-genre *Ovinae*, celles à petites feuilles et limbes plies (fétuques à gazon) (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995).

Deux espèces sont cultivées en tant que fourrage :

- La fétuque élevée : *Festuca arundinacea* Schreber ssp. *arundinacea*,
- La fétuque des prés : *Festuca arundinacea* Hudson ssp. *pratensis*.

Nous parlerons aussi de *Festuca arundinacea* var *glaucescens* Boiss., fétuque sauvage utilisée en croisement.



Figure 3 : Fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreber ssp. *arundinacea*) en début de floraison (fiches ACTA).

La fétuque élevée (figure 3) est une espèce hexaploïde $2n=6x=42$. Son hérédité est de type disomique grâce à un système génétique de contrôle de l'appariement des chromosomes (Jauhar, 1975). Des résultats d'hybridation *in situ* suggèrent que la fétuque élevée dériverait de la fétuque des prés ($2n=2x=14$) et de *Festuca arundinacea* var *glaucescens* ($2n=4x=28$) (Humphreys et al., 1995), (tableau 1).

Au sein des fétuques élevées, on distingue la race géographique européenne et la race méditerranéenne. La race européenne est répandue dans presque toute l'Europe et elle a été introduite partout dans le monde au travers des variétés. La race méditerranéenne se trouve en Afrique du Nord et dans le sud de l'Espagne (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). Ces deux races se distinguent par leur comportement en températures contrastées. En effet, la race méditerranéenne est sensible au froid, précoce au démarrage en végétation, alternative et à forte dormance estivale. La race européenne est à dormance hivernale, plus résistante au froid, à démarrage plus tardif, non alternative et présente une certaine croissance estivale.

La fétuque élevée européenne est une espèce très pérenne, de grande taille, plus d'un mètre à floraison. Ses feuilles sont rigides, son tallage important et ses racines très profondes, jusqu'à 2 mètres. L'essentiel de sa croissance se fait au printemps et elle entre en semi-dormance en été avant de reprendre sa croissance en automne. Elle supporte aussi l'inondation. L'alternative est variable selon les variétés. La fétuque élevée ne remonte pratiquement pas (Gillet, 1980).

Les qualités responsables de son succès sont sa pérennité et sa productivité. La pérennité est notamment liée à la profondeur de son système racinaire qui permet une alimentation à partir des horizons inférieurs du sol en cas de sécheresse. De plus, elle diminue sa vitesse de pousse en réduisant la zone de croissance des feuilles de 30%. Elle résiste aussi très bien au piétinement. Par contre, elle est faiblement appétente, ce qui est dû principalement à la rigidité des limbes (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). Le rendement total en matière sèche est variable en fonction des variétés : 13 à 18 t/ha/an (Gillet, 1980).



Figure 4 : Fétuque des prés (*Festuca arundinacea* Schreber ssp. *prantensis*) début de floraison (fiches ACTA).

La fétuque des prés (figure 4) est une espèce diploïde $2n=2x=14$ (Tableau1). Elle dériverait d'un des ancêtres de la fétuque élevée (tableau 1). Ces deux espèces ont d'ailleurs longtemps été confondues.

C'est une espèce de taille moyenne à feuilles souples. Elle est très bien adaptée au froid mais supporte mal la sécheresse, sans doute à cause d'un système racinaire superficiel et parce qu'elle continue à pousser au début de l'été (Gillet, 1980). Elle est de bonne valeur alimentaire et supporte les excès d'eau. Elle est surtout utilisée dans le Nord et le Nord-Ouest de l'Europe du fait de sa tolérance au froid. Cette fétuque est pratiquement non alternative mais peut parfois remonter (Gillet, 1980). Le rendement annuel en matière sèche atteint 8 à 13 t/ha/an



Figure 5 : *Festuca arundinacea* var *glaucescens* en pépinière de plantes isolées en condition de Lusignan (Photo M. Ghesquière)

Festuca glaucescens (figure 5) est une espèce tétraploïde $2n=4x=28$ (Tableau 1). On la trouve dans les Alpes méridionales, Embrun jusqu'à 1400m. C'est une fétuque très dure, très coupante dont les feuilles sont d'un vert/bleu glauque, ce qui explique son nom. Elle a une bonne tolérance à la sécheresse et elle est très pérenne. Elle a une vitesse de pousse très lente.

Nom d'espèces Nombre de chromosomes Formule génomique proposée

Fétuque des prés $2n=2x=14$ PP

(*Festuca arundinacea* Hudson ssp. *pratensis*)

Festuca arundinacea var. $2n=4x=28$ G1G1G2G2

glaucescens

Fétuque élevée $2n=6x=42$ PPG1G1G2G2

(*Festuca arundinacea* Schreber ssp. *arundinacea*)

I-2.2 Le genre *Lolium*

Ce genre de la tribu des *Festuceae* comprend uniquement des espèces diploïdes à l'état naturel. Certains auteurs considèrent que les dérivés polyploïdes des ray-grass pourraient se trouver dans les fétuques *Bovinae* (donc la fétuque élevée, la fétuque des prés, ...). En effet, les *Lolium* se croisent mieux avec ces fétuques que les fétuques *Ovinae* X *Bovinae* entre elles. Les ray-grass se distinguent des fétuques par leur inflorescence en épi (Balfourier et Charmet, 1995).

Le genre *Lolium* comprend 8 espèces dont certaines sont allogames et d'autres autogames. Les espèces cultivées pour la production fourragère sont exclusivement allogames. Il s'agit du :

-ray-grass anglais : *Lolium perenne* L. et du,

-ray-grass d'Italie : *Lolium multiflorum* Lam.

Le ray-grass anglais (figure 6) est une espèce naturellement diploïde $2n=2x=14$.

Certaines variétés fourragères sont tétraploïdes après doublement à la colchicine. L'appellation ray-grass provient de la francisation de l'anglais « ryegrass » qui signifie

« herbe à seigle » en raison de la morphologie de l'inflorescence. L'adjectif « anglais » est certainement lié au fait que les premières cultures ont été réalisées en Angleterre au XVIIIème siècle. C'est la plus pérenne des espèces allogames du genre *Lolium*. L'aire de répartition naturelle du ray-grass anglais correspond à la zone tempérée de l'ancien monde : Europe et Asie. Il a été introduit aux Etats Unis, en Amérique du Sud, en Australie, en Nouvelle Zélande et au Japon.



Figure 6 : Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) en début de floraison (fiches ACTA)

Il y a une grande variation à l'intérieur de l'espèce: très alternatif à peu alternatif, très pérenne à peu persistant, précoce et remontant à tardif et reproduction végétative dominante (Balfourier et Charmet, 1995).

Le ray-grass anglais fourrager est utilisé au pâturage, en culture pure ou en association avec le trèfle blanc. Il forme un gazon dense. Cette espèce est d'ailleurs utilisée comme graminée à gazon. On le trouve dans les prairies permanentes et les prairies temporaires. C'est une plante de petite taille, de 20 à 80cm à épiaison. Il est caractérisé par des feuilles étroites, brillantes et très souples. Gillet (1980) considère que ses racines sont très superficielles (10 premiers centimètres). La stratégie de pérennité du ray-grass anglais n'est pas la même que celle de la fétuque. Contrairement aux fétuques, le ray-grass anglais lève rapidement et vigoureusement ce qui en facilite l'implantation. Il est adapté aux températures fraîches mais sensible au froid et à la sécheresse, qui pénalisent sa pérennité. Il est peu ou pas alternatif et remonte. Sa production annuelle de matière sèche atteint 9 à 13 t/ha/an (Gillet, 1980).

Le ray-grass d'Italie (figure 7) est une espèce naturellement diploïde. Il se différencie en deux taxons : l'un très alternatif et l'autre peu ou pas alternatif (Balfourier et Charmet, 1995). Le premier taxon correspond dans le catalogue des variétés aux types "westerwold" Ce sont des ray-grass d'Italie très productifs mais très peu pérennes. Les ray-grass d'Italie "classiques" sont un peu moins productifs mais plus pérennes. Le ray-grass d'Italie est une plante de taille moyenne (30 à 120 cm). Les feuilles sont brillantes et très souples. Son utilisation principale est la fauche après une culture en pure. Il est sensible à la sécheresse. Sa remontaison est très importante à chaque coupe tant que les jours sont longs. A l'épiaison il reste très peu de talles végétatives (Gillet, 1980). La levée est rapide et vigoureuse.

Un ray-grass d'Italie non alternatif produit en semis de printemps, 5 à 12 t/ha de matière sèche entre le semis et le premier hiver. Certaines variétés de ray-grass d'Italie sont tétraploïdes. Elles sont caractérisées par des organes plus gros et moins nombreux, et par une teneur en eau plus élevée de 2 à 4 points.

Le ray-grass d'Italie et le ray-grass anglais ont été croisés pour donner les ray-grass hybrides avec l'objectif d'obtenir des caractéristiques intermédiaires aux espèces de départ: meilleure pérennité et moindre remontaison.



Figure 7 : Ray-grass d'Italie (*Lolium multiflorum* Lam.) en début de floraison (fiches ACTA).

I-3 Résumé des principales caractéristiques des genres *Lolium* et *Festuca*

Le tableau 2 résume les caractéristiques des espèces décrites précédemment

Tableau 2 : Principales caractéristiques des espèces du genre *Lolium* et genre *Festuca*

	genre <i>Lolium</i>		genre <i>Festuca</i>		
	Ray-grass d'Italie 2n=2x=14	Ray-grass anglais 2n=2x=14	Fétuque des prés 2n=2x=14	Fétuque élevée 2n=6x=42	Fétuque duculcescens 2n=4x=28
Vitesse d'installation	+++	++	+	+	
Précocité de démarrage	+++	++	++	+++	++
Croissance estivale	+	++	++	+	
Qualité fourragère	+++	++	++	+	
Résistance au froid	+	++	++	+++	+++
Tolérance à la sécheresse	-	+		+++	+++
Pérennité	+	++	+	+++	+++
Pâturage	+	+++	++	++	
Conservation	+++	++	++	+++	

Les ray-grass et les fétuques sont donc d'une part complémentaires sur différents aspects, et d'autre part les genres *Lolium* et *Festuca* présentent suffisamment d'homologie pour que certaines espèces puissent s'hybrider entre elles naturellement (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). De plus il a même été remarqué que certaines fétuques se croisent mieux avec les *Lolium* que les fétuques entre elles (Balfourier et Charmet, 1995).

En pratique le sauvetage d'embryons d'hybrides permet d'obtenir des plantes suffisamment fertiles Ceci a conduit les améliorateurs à envisager des travaux de sélection en hybridations intergénériques.

I-4 Définition des *Festulolium*

Un *Festulolium* est un hybride intergénérique (spontané occasionnel, ou artificiel) entre une espèce de fétuque et une espèce de ray-grass. Les botanistes du début de XX siècle ont forgé ce mot à partir de *Festuca* et *Lolium*, noms des deux genres à l'origine de cet hybride (Ghesquière et Mousset 2003).

II- Schémas d'améliorations et stratégie d'obtention des hybrides interspécifiques

II-1 Schémas classiques d'amélioration des graminées fourragères et inscription au catalogue officiel

La majorité des graminées fourragères sont allogames à pollinisation anémophile. Seuls les bromes sont autogames. Ceci a des implications dans les schémas de sélection utilisés et dans le type des variétés commercialisées.

La majorité des graminées fourragères est commercialisée sous forme de variétés synthétiques. Il s'agit de populations artificielles résultant de la multiplication d'un nombre déterminé de parents choisis pour leurs qualités agronomiques propres et leur aptitude à la combinaison. Un nombre (i) limité et connu de générations de multiplication sépare le croisement multiparental de départ (Syn 0) de la variété commerciale (Syn i) (figure 8). Les variétés synthétiques diffèrent des variétés-populations car c'est toujours la même

génération de multiplication qui est commercialisée et le nombre de constituants est en théorie assez limité. Ceci permet une certaine utilisation de l'hétérosis chez ces espèces allogames où le contrôle de l'hybridation est difficile à grande échelle (Gallais, 1990).

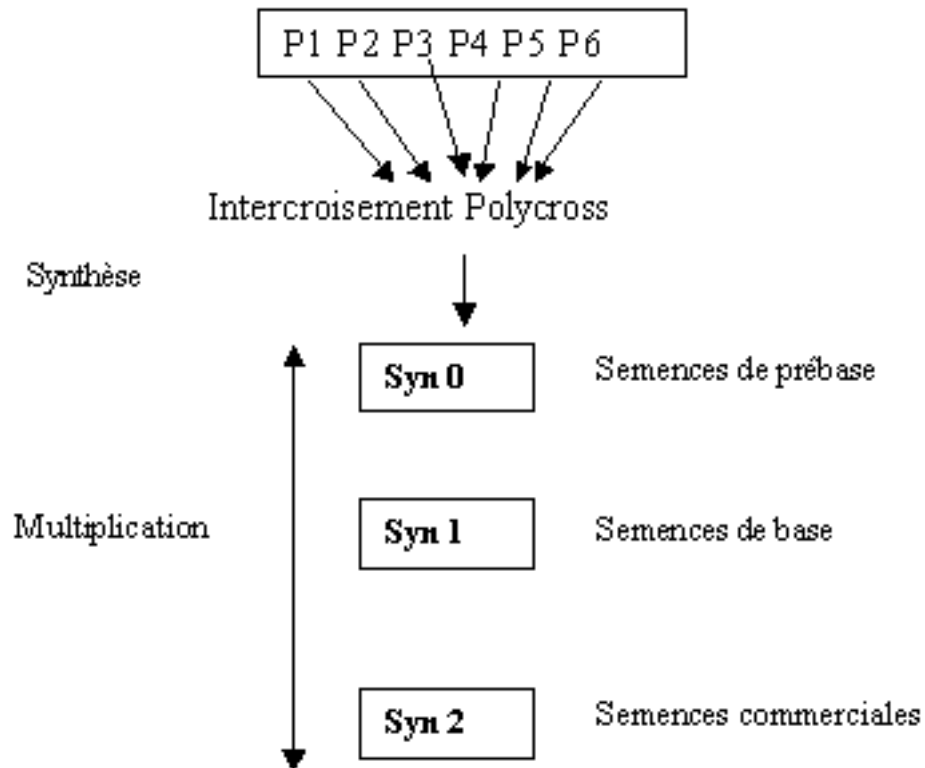


Figure 8 : Formation d'une variété synthétique avec deux générations de multiplication après la synthèse issue d'un polycross de départ à 6 parents. D'après Gallais (1990).

Les constituants d'une variété sont des individus qui ont parfois subi quelques générations d'autofécondation ou des croisements frère x sœur. Ils ont été testés sur leur valeur propre et leur valeur en combinaison. Le type de croisement utilisé est le polycross. Il s'agit d'un dispositif où chaque plante mère a autant de chance d'être pollinisée par toutes les autres. La descendance du polycross est l'ensemble des familles demi-frère récoltées sur chaque plante mère.

Le nombre de parents dans le polycross est un élément important. S'il est trop faible, la consanguinité induite dans les descendance entraîne une baisse de la vigueur moyenne. S'il est trop élevé, la descendance risque de ne pas être très différente d'une population naturelle et de ce fait plutôt hétérogène.

Le nombre de générations de multiplication séparant le polycross de départ de la variété commerciale dépend des caractéristiques techniques liées à l'espèce comme : son taux de multiplication, la quantité de graines ayant été obtenue lors du croisement initial et la pérennité des clones qui constituent le polycross de départ. La vigueur des variétés synthétiques évolue vers une situation d'équilibre, le taux de multiplication peut dépendre de cette vigueur. Cependant, la compétition entre génotypes peut intervenir dans les multiplications. Si elle risque d'intervenir sur le rendement final, les constituants sont multipliés séparément et la synthèse est alors différée. Le numéro de la génération commerciale qui est déclaré est dans la pratique de 3 ou 4.

Comme pour toutes les autres espèces cultivées, la commercialisation des semences de graminées fourragères nécessite l'inscription au catalogue officiel des variétés et des semences.

Pour être inscrite, une variété doit être différente des autres et présenter des caractéristiques agronomiques et techniques intéressantes. Les épreuves sont donc de deux types

- DHS : distinction, homogénéité et stabilité,
- VAT : valeur agronomique et technologique.

Ces épreuves sont réalisées sur la semence commerciale et la semence de base, de façon simultanée et indépendante (quelquefois les expérimentations sont réalisées uniquement sur la semence de base).

Les épreuves de DHS consistent en des notations en pépinière de plantes isolées et en ligne pendant deux années successives. Il s'agit de mesures morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les épreuves de VAT consistent en des évaluations multilocales (7 à 8 lieux) en lignes et en parcelles pendant deux années. Les caractères notés concernent : la croissance et le développement, les niveaux de résistance (maladies, froid, verse, sécheresse), le rendement et sa répartition dans l'année. En fonction des espèces, les expérimentations "miment" les modes d'exploitation : fauche pour le ray-grass d'Italie, les ray-grass hybrides, et les ray-grass anglais précoces; fauche avec déprimage, c'est à dire une coupe en début de stade reproductif avant le stade épi à 10 cm, pour les fétuques et les dactyles ; essai en coupes fréquentes pour les ray-grass anglais intermédiaires et tardifs. D'autres critères sont également pris en compte comme : la pérennité, la remontaison et la production de graines, l'appétibilité mesurée avec des expérimentations sur moutons.

II-2 Proximité génétique des deux genres

Divers arguments floristiques, moléculaires et cytogénétiques confirment la proximité génétique des genres *Lolium* et *Festuca*.

II-2.1 Hybrides interspécifiques naturels

Des hybrides intergénériques naturels ont été décrits par Kerguelen et Plonka, 1989 in Marhadour, 2001. Il s'agit d'hybrides faisant intervenir la fétuque élevée, *Festuca gigantea*, la fétuque des prés et la fétuque rouge (*Festuca rubra*) d'une part et les ray-grass anglais et d'Italie d'autre part (tableau 3). Ceux-ci attestent de la proximité des ces deux genres et de leurs potentiel de compatibilité.

Tableau 3 : Taxonomie des principaux hybrides interspécifiques et intergénériques spontanés au sein du genre *Festuca*, d'après Ghesquière et Jadas-Hécart (1995). "X" signifie "hybride".

	L. perenne L.	L multiflorum Lam.
F. arund'macea ssp. Arundinacea	x Festulolium holmbergii	x Festulolium braunii
F. gigantea	x Festulolium brinckmanii	X Festulolium nisonii cultivars
F. pratensis ssp. Pratensis	x Festulolium loliaceum* et autres cultivars	
F, rubra	x Festulolium frederici	

* synonymes : *Festulolium adscendens*.

II-2.2 Travaux de marquage génétique dans le complexe *Festulolium* et études phylogénétiques

II-2.2.1 Stratégies d'obtention des hybrides

Deux stratégies sont possibles :

a) La voie amphiploïde

Elle consiste à additionner dans une seule structure le génome entier d'une espèce de fétuque et d'une espèce de ray-grass. Les hybrides directs obtenus doivent subir un doublement de leurs stocks chromosomiques afin de rétablir leur fertilité et de leur conférer un comportement disomique (Zwierzykowski, 2004) (Figure 9).

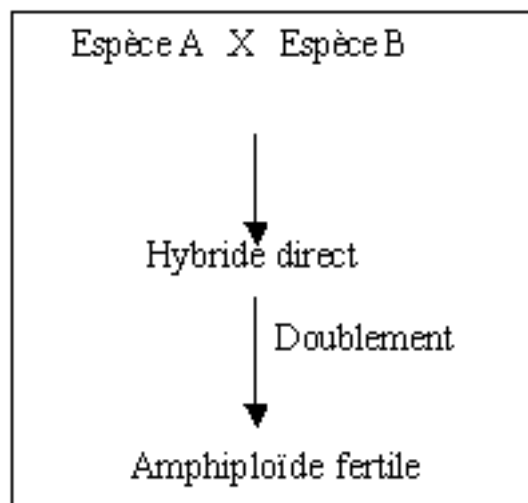


Figure 9 : Principe de l'amphiploïdisation

Pour que ces hybrides soient stables, les espèces parentales ne doivent pas être trop proches phylogénétiquement. En effet, les deux génomes doivent cohabiter en restant juxtaposés afin d'éviter le transfert de gènes qui compliquerait l'hérédité des caractères (Marhadour, 2001).

Il faut noter également que l'hybridation est plus facile si c'est le ray-grass qui est utilisé comme parent femelle dans le croisement. Il existe par exemple des variétés issues d'allotétraploïdes obtenues à partir de [*L. multiflorum* (4x) X *F. pratensis* (2x)] et [*L. perenne* (4x) X *F. pratensis*(2x)] qui combinent haute valeur nutritive du ray-grass, pérennité, résistance au froid et à la sécheresse de la fétuque (Zwierzykowski, 2004).

Les principaux problèmes de la voie amphiploïde sont l'instabilité du matériel obtenu et la faible productivité grainière (Thomas et al., 2002). L'instabilité est notamment dû au contrôle insuffisant de l'appariement des chromosomes homologues. Des études cytogénétiques par hybridation génomique *in situ* (GISH) ont révélé une composition génomique déséquilibrée (hétérologues) (Thomas et al 1994 ; Zwierzykowski, 2004).

b) La voie introgressive

Elle consiste à effectuer un rétrocroisement de l'hybride [fétuque x ray-grass] dans ce même ray-grass. Cette voie cherche à introduire un petit nombre de gènes de l'espèce donneuse (fétuque) dans le fond génétique de l'espèce receveuse (ray-grass). (Figure10)

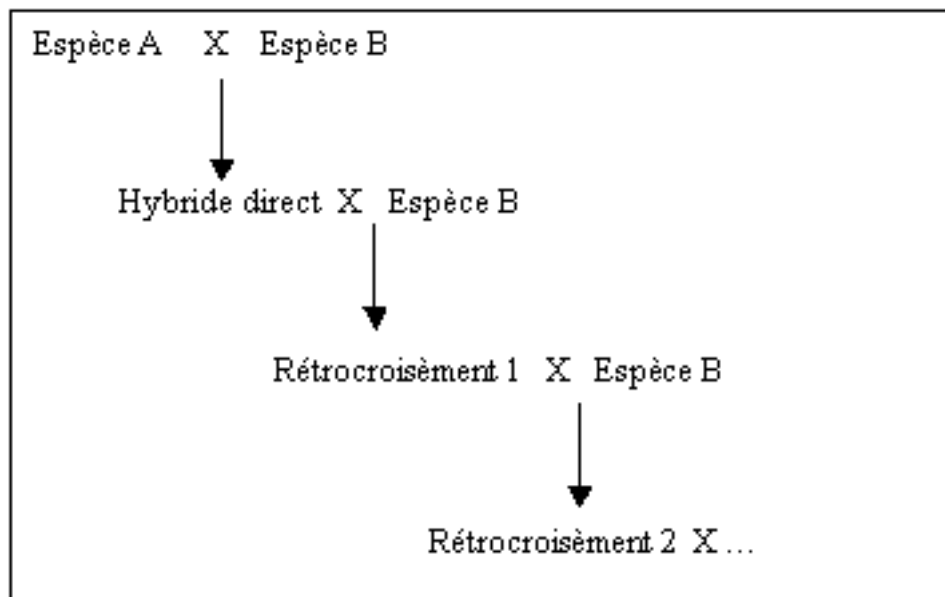


Figure 10 : La voie introgressive , (Le donneur est l'espèce A et le receveur l'espèce B)

Ainsi, les individus résultants sont plus stables que les hybrides directs et leur fertilité est rapidement restaurée car le fond génétique ray-grass n'est que peu altéré par la quantité minimale de matériel étranger introduit.

Cette stratégie est particulièrement intéressante quand les caractères à introduire sont gouvernés par des gènes à effet majeur.

King et al. (1999) ont analysé par GISH la méiose d'un allotripléide (Lp Lp Fp) issu d'un croisement entre *L. perenne* (4x) (LpLpLpLp) et de *F. pratensis* 2x (FpFp). Cette analyse a montré que les chromosomes d'origine *Lolium* et *Festuca* se recombinent de façon libre avec une grande fréquence. Cependant, il existe au niveau des trivalents une plus grande fréquence de chiasma Lp-Lp que de chiasma Fp-Lp.

Dans notre étude, les deux voies sont suivies en parallèle (figure11) avec plusieurs objectifs de sélection : la pérennité, la tolérance à la sécheresse, et la production de semences. Les parents utilisés sont le ray-grass d'Italie (2n=4x=28) et la fétuque glaucescens (2n=4x=28). Le choix de cette fétuque qui est d'un faible intérêt agronomique par elle-même (vitesse d'installation, croissance foliaire et valeur alimentaire faibles) s'explique par sa tétraploïdie et par le fait qu'elle est plus éloignée du ray-grass d'Italie que la fétuque élevée. Ceci devrait éviter, en théorie, un trop fort taux de recombinaison préjudiciable à la stabilité des hybrides amphiploïdes.

Il s'est cependant avéré que la recombinaison a tout de même lieu (Marhadour, 1997), ce qui a relancé l'intérêt pour la voie introgressive.

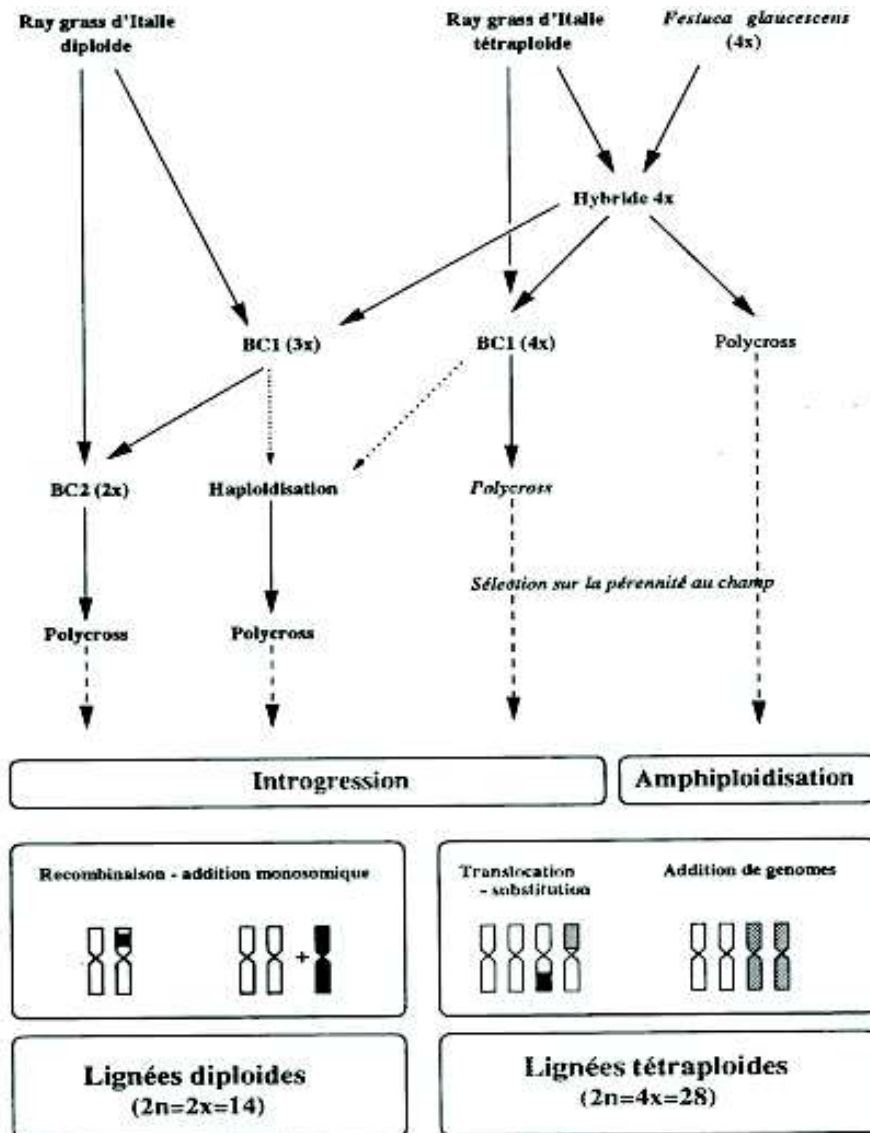


Figure 11 : Schéma d'amélioration des *Festulolium* à Lusignan : voie de l'introgression et de l'amphiploidisation. Les diagrammes représentent quelques réarrangements chromosomiques.

Afin de faciliter la sélection, le matériel génétique introgressé doit pouvoir être repéré dans la descendance présentant des translocations.

Le recours à l'hybridation génomique *in situ* (GISH) permet de distinguer et de quantifier la proportion chromosomique parentale au sein de l'hybride. Les travaux de Kopecky et al. (2005) ont montré que le nombre de recombinaisons chromosomiques est beaucoup plus élevé chez les hybrides [ray-grass d'Italie x fétuque des prés] que chez les hybrides [ray-grass d'Italie x fétuque glaucescens] et [ray-grass d'Italie x fétuque élevée]. On peut ainsi dire que ces deux derniers hybrides se rapprochent plus de l'amphiploïde strict, alors que les hybrides [ray-grass d'Italie x fétuque des prés] permettent une plus large introgression de portions génomiques de la fétuque dans le ray-grass.

L'hybridation génomique *in situ* a permis de suivre ces réarrangements chromosomiques jusqu'à un certain point, mais la difficulté potentielle de détecter des

segments introgressés de plus en plus petits au cours des générations a mené les améliorateurs à recourir au marquage génétique (Humphreys et al., 1998).

II-2.2.2 Travaux de marquage génétique dans le complexe *Festulolium*

Un marqueur génétique ou un locus marqueur est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Ceci permet une utilisation en génétique des populations (De Vienne & Santoni, 1998).

II-2.2.2.1 Les isoenzymes

Ghesquière et al., (2000) ont montré grâce à l'étude du locus isoenzymatique phosphoglucoisomerase (Pgi-2) qu'en rétrocroisant dans le ray-grass hybride réalisé avec la fétuque élevée, une partie des gènes seulement, ceux attribués à la fétuque des prés, étaient transmis et avec un taux faible de recombinaison. En revanche à partir d'hybrides à 28 chromosomes réalisés entre *F.glaucescens* rétrocroisée dans le ray-grass d'Italie tétraploïde, la transmission de marqueurs spécifiques de la fétuque est considérablement augmentée donnant une forte proportion de marqueurs spécifiques.

Les isozymes n'échantillonnent cependant qu'une infime partie des gènes localisés sur les chromosomes. Pour remédier à cet handicap, on a recours au marquage moléculaire afin d'exploiter la variabilité quasi-illimitée qu'offrent ces derniers (Hayward et al., 1994).

II-2.2.2.2 Les marqueurs moléculaires

Au départ, les techniques RFLP ont permis la réalisation d'une carte génétique chez la fétuque élevée (Xu et al., 1995), la fétuque des prés (Chen et al., 1998) mais les lourdes contraintes liées à la mise en œuvre de la technique (radioactivité) et la mise au point de techniques PCR ont justifié l'abandon de la RFLP devenue trop contraignante pour l'étude du potentiel d'introgession de la fétuque dans le ray-grass.

De Loose et al (1994) ont détecté quelque loci RAPD de ray-grass d'Italie, corrélés à la tolérance à la rouille couronnée.

Le développement de méthodes AFLPTM et sa généralisation dans le domaine végétal ont permis la réalisation de plusieurs cartes génétiques : *Lolium perenne* (Bert et al., 1999), *Lolium multiflorum* (Fujimori et al., 2000 ; Inoue et al., 2004).

En effet cette technique, en plus de sa rapidité d'exécution et son faible coût, présente l'avantage de révéler en masse des loci (marqueurs anonymes) et de pouvoir ainsi saturer le génome de l'espèce étudiée. Cependant le manque de reproductibilité et le fait que ceux sont des marqueurs dominants, ne nous permettent pas d'accéder facilement au génome des individus, ceci restreint énormément les potentialités de détection des remaniements chromosomiques potentiels chez les populations introgressées.

II-2.2.2.3 Les marqueurs microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat)

a) Technique proprement dite (De Vienne et al., 1998)

Les SSR sont constitués de répétitions et de tandems de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques. Les plus courants sont (A)_n (TC)_n (TAT)_n (GATA)_n. La valeur de n peut aller de quelques unités à plusieurs dizaines (figure12).

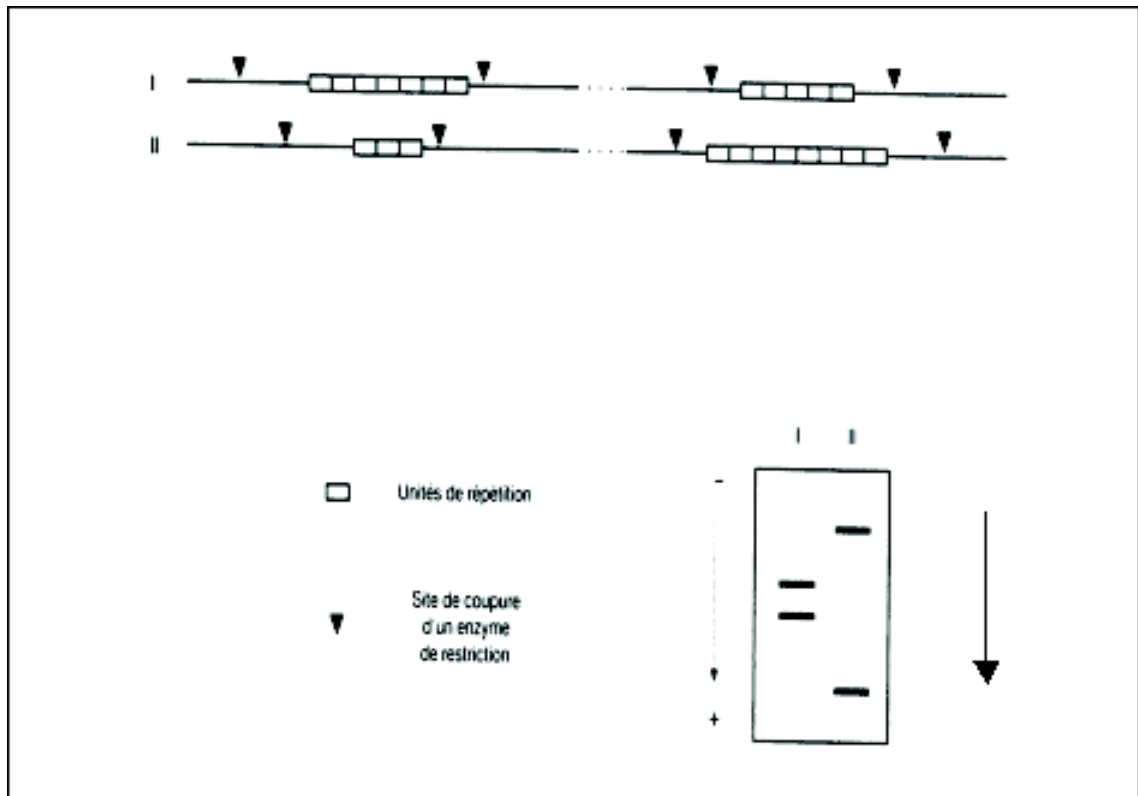


Figure 12 : Structure générale des microsatellites. En un locus, les allèles différents par le nombre d'unités de répétitions, donc par leur longueur.

Chez les végétaux supérieurs, on estime qu'il y aurait en moyenne un microsatellite tous les 30 à 100 kb (Morgante & Olivieri, 1993 *in* De vienne *et al.*, 1998).

Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt des microsatellites en génétique, reside dans leur polymorphisme extrêmement élevé. Il s'agit ici d'un polymorphisme de nombre d'unités de répétitions. En effet, si un motif microsatellite donné n'est pas spécifique d'un locus, les régions flanquantes, par contre, le sont. Une paire d'amorces spécifiques de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul locus microsatellite.

Essor des marqueurs SSR

Les microsatellites fournissent des marqueurs de choix par leur abondance, leur reproductibilité élevée et la détection à un niveau multialléliques de loci (Toshihiko & Momotaz, 2004).

Le développement de marqueurs microsatellites à partir de banques génomiques, d'EST (Expressed sequence tag) et d'autres séquences d'ADN, ainsi que l'évolution de la bioinformatique ont considérablement réduit les coûts de développement de ces marqueurs.

En effet, les approches de synténie et l'étude d'homologie de séquences entre la fétuque ou le ray-grass et certaines espèces de graminées ayant déjà fait l'objet d'un séquençage plus ou moins complet de portions génomiques et dont les informations sont disponibles via des banques de données sur internet. Ils permettent le transfert de loci SSR à travers les espèces apparentées (Saha *et al.*, 2004 a).

Lehvaslaiho et al. (1987) élaborent un arbre phylogénétique à l'aide de données de polymorphisme de restriction d'ADN chloroplastique. Cet arbre présente l'avantage d'intégrer *Festuca glaucescens* (figure 13).

Lehvaslaiho *et al.* (1987) concluent qu'il est possible de séparer les deux genres; et que le ray-grass d'Italie est proche de la fétuque des prés et de la fétuque élevée; et qu'il y a plus de distance entre les fétuques ovines et bovines qu'entre les fétuques bovines et les ray-grass.

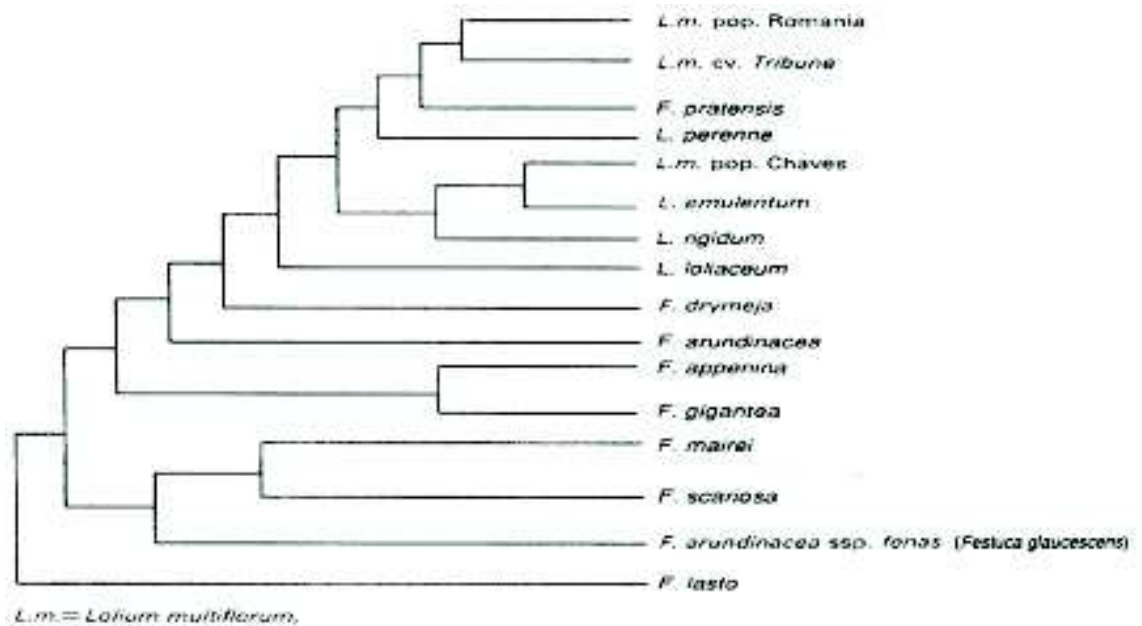


Figure 13 : Arbre phylogénétique du complexe *Lolium-Festuca* (d'après Stammers et al., 1995 in Marhadour, 2001).

II-2.2.3 Etudes cytogénétiques

La présence de bivalents et de chiasmats dans différents hybrides directs entre espèces d'intérêt agronomique atteste que les chromosomes s'apparient même si les espèces sont distantes génétiquement, et même s'il existe des différences de taille de chromosomes entre elles. Le sauvetage d'embryon est le plus souvent nécessaire pour les hybrides directs. L'expérience montre que l'utilisation du *Lolium* comme parent femelle augmente les chances de réussite. La fertilité des hybrides directs est en général variable mais le doublement chromosomique la rétablit en partie (Jauhar, 1993).

Les hybrides montrent un haut niveau d'appariement méiotique, et les appariements sous forme de bivalents sont les plus fréquents même s'il y a des uni, tri et tétravalents. Des amphidiploïdes sont obtenus par doublement à la colchicine ou spontanément des hybrides directs précédents. Ils montrent des bivalents à la méiose mais quelques univalents et multivalents attestent que la méiose n'est pas totalement équilibrée (Kleijer et Morel, 1984 in Marhadour, 2001) L'appariement chromosomique ne semble pas augmenter après doublement des hybrides directs.

Le complexe *Festuca/Lolium* constitue donc un ensemble d'espèces suffisamment proches pour permettre l'hybridation entre les espèces, partager des marqueurs moléculaires obtenus par RAPD RFLP ou SSR et permettre la détection du polymorphisme dans une espèce en utilisant des sondes ADN provenant d'une autre. Les espèces

sont cependant suffisamment différentes pour que les chromosomes de chacune soient distinguables à l'aide de l'hybridation génomique *in situ* ou que des bandes soient déclarées spécifiques d'une espèce.

III- Aperçu de quelques résultats phénotypiques obtenus par amphiploïdisation ou introgression

Les études phénotypiques réalisées ont concerné des caractères complémentaires du genre *Festuca* et *lolium* : résistance à la sécheresse et au froid, pérennité, productivité, valeur alimentaire, fertilité, ...etc.

III-1 Résistance à la sécheresse et au froid

Une sélection efficace pour la résistance à la sécheresse dans des hybrides dérivés de la voie introgressive utilise l'hybride pentaploïde. Ce dernier a été rétrocroisé 2 fois dans le ray-grass d'Italie diploïde puis des polycross ont permis de multiplier le matériel. La sélection a eu lieu ensuite sur 44 lignées d'introgression, chacune représentée par 10 génotypes. Elle a été réalisée sous abris à pluie et se basait sur une notation de 0 pour les plantes mortes à 5 pour les plantes vigoureuses après deux mois de sécheresse estivale l'année suivant un semis d'automne. La moyenne des notes des lignées d'introgression était inférieure à celle du ray-grass d'Italie mais 3% des plantes avaient une note supérieure à celle de la fétuque élevée. La notation a eu lieu indépendamment de la taille des plantes. Le caryotype des plantes résistantes a été réalisé par hybridation génomique *in situ*. Ces plantes résistantes ont été étudiées en parallèle sous abris à pluie où elles ont été comparées à des amphiploïdes dérivés de *Festuca glaucescens*).

Les résultats ont montré que les amphiploïdes étaient supérieurs à tous les autres en terme de rendement dans les conditions de sécheresse naturelle de Lusignan.

La tolérance au manque d'eau des amphiploïdes précédemment cités pourrait être due à une aptitude à extraire l'eau profondément dans le sol, ce qui est une caractéristique de la fétuque.

Le profil d'alimentation en eau d'amphiploïdes dérivés de *Festuca glaucescens* et du ray-grass d'Italie a été évalué. Les résultats ont montré que les hybrides avaient une profondeur d'extraction de l'eau intermédiaire aux espèces parentales. Les mesures ont été réalisées avec une sonde à neutrons. Les deux espèces de fétuque ainsi que le ray-grass anglais extrayaient l'eau jusqu'à 180 cm alors que le ray-grass d'Italie n'extrayait pas d'eau en dessous de 80 cm. Les hybrides extrayaient l'eau jusqu'à une profondeur proche de 120 cm.

Le transfert de la résistance au froid de la fétuque des prés au ray-grass d'Italie a été recherché. Une augmentation de 32% de la survie des talles au froid a été avancée. Des amphiploïdes dérivés de ces mêmes espèces seraient plus tolérants au froid et plus pérennes. Des plantes haploïdes dérivées de l'hybride pentaploïde ray-grass d'Italie diploïde x fétuque élevée hexaploïde ont été testées pour leur tolérance au froid en chambre de culture. Cette tolérance était variable mais 6% des plantes étaient plus tolérantes que le ray-grass d'Italie est donc possible d'obtenir des hybrides interspécifiques introgressés par la fétuque qui ont une tolérance à la sécheresse du niveau de la fétuque

élevée ou une tolérance au froid supérieure à celle du ray-grass d'Italie. De plus, la voie amphiploïde permet d'obtenir des caractéristiques intermédiaires aux espèces parentales pour l'extraction de l'eau.

III-2 Rendement, pérennité

Différents travaux montrent que des hybrides interspécifiques ont de bonnes caractéristiques en terme de productivité, de précocité et de pérennité. Des résultats ont été obtenus à partir d'intercroisements d'amphiploïdes *Lolium multiflorum* ($2n=4x=28$) x *Festuca glaucescens*. L'expérience a duré 2 ans, en parcelle dense, qui étaient fauchées et pâturées.

Les hybrides s'installaient plus vite et étaient plus précoces que la fétuque élevée. Leur rendement annuel était comparable ou supérieur à celui de la fétuque élevée. La pérennité pouvait être supérieure à 3 années (Marhadour, 2001).

Des amphiploïdes dérivés de la fétuque élevée et du ray-grass d'Italie ont été évalués pour différents caractères. Des témoins parentaux étaient inclus. La croissance des semis amphiploïdes était généralement supérieure à celle des semis de fétuque. C'était aussi le cas de la taille, de la largeur des feuilles et du rendement en matière verte.

Des amphiploïdes d'origine variée peuvent donc combiner la rapidité d'installation du ray-grass d'Italie et une pérennité accrue provenant certainement des fétuques.

III-3 Valeur alimentaire

On peut chercher à améliorer la valeur alimentaire de la fétuque en introduisant des caractères ray-grass ou bien à conserver la valeur du ray-grass en introduisant des caractères de résistance aux stress de la fétuque.

La teneur en perloïne, alcaloïde pouvant inhiber la digestion des ruminants, a été mesurée dans des descendances d'hybrides entre le ray-grass d'Italie ou le ray-grass anglais et la fétuque élevée.

Les hybrides directs avaient des teneurs inférieures à celle de la fétuque élevée (716 µg/g).

Les hybrides dérivés du ray-grass d'Italie en avaient le moins : 138 µg/g (17 µg/g pour le ray-grass d'Italie).

Le même matériel (descendances d'hybrides entre le ray-grass d'Italie ou le ray-grass anglais et la fétuque élevée) a été sélectionné pour la succulence c'est à dire la teneur en eau : l'idée était que du matériel avec une plus forte teneur en eau serait plus appétible. Des corrélations positives entre la succulence, la digestibilité et l'appétibilité ont été montrées. L'appétibilité et la digestibilité d'hybrides provenant d'intercroisements d'amphiploïdes *Lolium multiflorum* ($2n=4x=28$) x *Festuca glaucescens* a été évaluée en comparaison avec la fétuque élevée ; Les notes d'appétibilité (échelle de 1 à 9) des familles étudiées étaient toujours supérieures à la variété de fétuque élevée la moins appétante (note 1.4) et elles pouvaient excéder la variété la plus appétante (4.6) avec des valeurs allant jusqu'à 9. La digestibilité des hybrides, mesurée par une digestion pepsine-cellulase, était variable et souvent proche de 80% alors que celle des témoins fétuque élevée était de 75 et 77%.

Il est donc possible d'améliorer certaines composantes de la valeur alimentaire des fétuques par hybridation interspécifique. L'avantage d'utiliser cette méthode est sa rapidité par rapport à une sélection classique dans la fétuque pure.

III-4 Fertilité

La fertilité est un des problèmes les plus importants rencontrés en hybridation intergénériques. Le développement variétal dépend de la productivité grainière.

Zwierzykowski *et al.* (2004) ont sélectionné sur la fertilité dans des générations d'intercroisement d'hybrides ray-grass d'Italie doublés par la fétuque des prés doublée. Les résultats ont montré que la fertilité mâle du matériel était de 80% en moyenne même si elle était très variable ; 50% des fleurs de l'épi ont produit une graine. Zwierzykowski *et al.* (2004) ont également noté que les plantes ayant des inflorescences en forme d'épi avaient une fertilité femelle supérieure à celle ayant des inflorescences en panicules.

La fertilité moyenne de familles dérivées d'intercroisements d'amphiploïdes *Lolium multiflorum* ($2n=4x=28$) x *Festuca glaucescens* était équivalente à celle de la fétuque élevée mais il y avait une grande variabilité (Ghesquière et Jadas-Hécart, 1995). Les comptages chromosomiques ont montré des aneuploïdes mais leur proportion tendait à diminuer avec les générations d'intercroisements. Là encore, les inflorescences en épi étaient plus fertiles que les inflorescences en panicules.

Chapitre II : Matériel et méthodes

I- Stratégie du travail expérimental

I-1 Le recensement des marqueurs SSR-PCR

Le recensement des marqueurs SSR-PCR cartographiés porte sur ceux qui ont été publiés dans le complexe *Festuca / Lolium*, et ceux ayant déjà fait l'objet d'un pré-screening et développés par le laboratoire de biologie moléculaire de l'unité de Lusignan (France).

Les publications considérées sont les suivantes :

A- Carte de liaison génétique de la fétuque élevée (6x) établie à partir de marqueurs SSR et AFLP (Saha *et al.*, 2004 b).

B- Carte génétique d'un ray-grass hybride (2x) [*Lolium multiflorum* x *Lolium perenne*] (Waranke *et al.*, 2004).

c- Carte génétique de ray-grass anglais (2x) établie exclusivement avec des marqueurs SSR (Jensen *et al.*, 2005). Les trois cartes sont représentées en annexe 1.

I-2 Tester les marqueurs recensés

Tester pour les marqueurs recensés, retenus, la qualité des électrophorogrammes (lisibilité des gels).

I-3 Génotypage :

Le génotypage se fait à l'aide de ces marqueurs (retenus) des populations d'hybrides directs ou de back-cross en générations plus ou moins avancées.

II- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est issu des divers programmes de croisement réalisés à la station INRA de Lusignan (France) initiés en 1986 (figure 14). Il se compose de trois groupes de matériel.

II-1 Espèces parentales

L. multiflorum: 10 individus de 3 variétés diploïdes, "Shoot", "Starter" et "Fastyl" et d'une variété tétraploïde, "Lipo", soit 40 individus;

F. glaucescens: 25 individus issus des populations originales prospectées par Jadas-Hécart en 1982;

II-2 Hybrides de première génération (F1) ou hybrides primaires :

25 individus ont été échantillonnés parmi les 50 hybrides obtenus en 1987 par 12 croisements entre *L. multiflorum* ($2n=4x=28$), pris comme parent femelle, et *F. glaucescens* suivis de culture d'embryons immatures.

Population 8007 : il s'agit de la génération F2 des hybrides de Lusignan obtenue sans sélection par un polycross des 50 hybrides F1.

Population 9198 :

Il s'agit de la multiplication, sans sélection, de la récolte d'un polycross de 20 individus retenus après 1 à 6 cycles de sélection (générations F2 à F7). La population 9198 est donc en génération F4-F9.

Les deux origines, Lusignan et Poznan, sont représentées dans cette population, dans une proportion approximative de 2/1 respectivement à la suite d'un polycross réalisé entre 44 hybrides F2 de Lusignan et 29 hybrides F3-F4 de Poznan.

II-3 Rétrocroisements et intercroisements de back-cross1

Le premier rétrocroisement (back cross 1) est issu du croisement entre l'hybride direct –au sens de l'espèce- et le ray-grass d'Italie.

Intercroisement de back cross 1 (BC1) : les individus du BC1 ont été installés en polycross.

Les descendants de ces polycross maximisent les chances de présenter de la variabilité phénotypique pour des caractères de nature interspécifique.

Population 7992 :

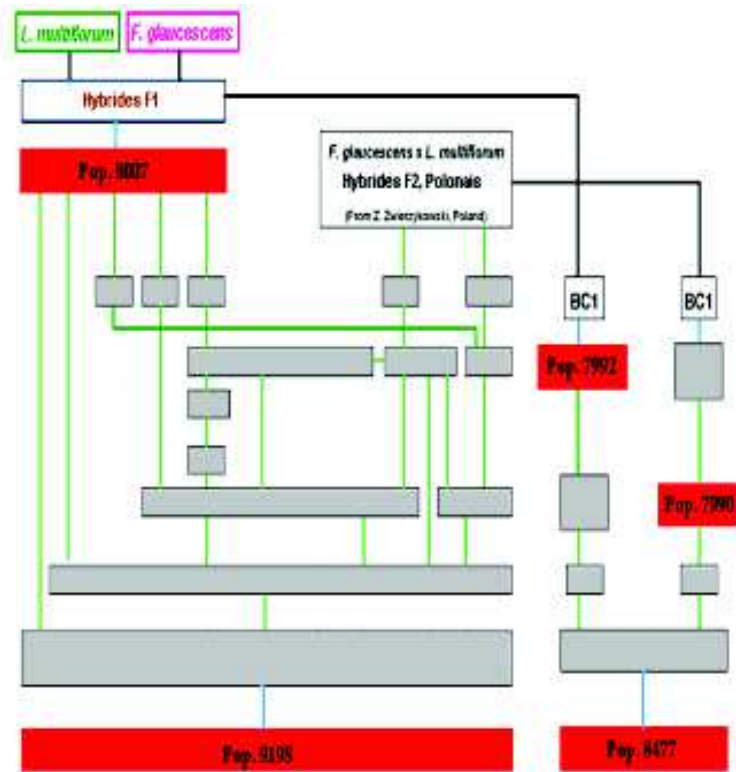
Cette population résulte d'un polycross de 28 individus échantillonnés dans 7 croisements BC1 de 5 hybrides F1 de Lusignan; les individus de la population sont donc en génération F3.

Population 7990 :

La population provient aussi de BC1 mais dont les parents hybrides ont été sélectionnés parmi ceux de Poznan en F2-F3; deux polycross ont suivi la génération de backcross. Au final, la population étudiée est en génération F5-F6.

Population 8477 :

Cette population a été réalisée à partir de la multiplication, sans sélection, de la récolte d'un polycross de 11 individus retenus après 2 cycles de sélection au sein des deux populations BC1 précédentes. La population 8477 est donc environ pour moitié d'origine Lusignan, en F6, et d'origine Poznan, en F8-F9.



Légende :

- Plantes étudiées
- Polycross
- Croisements contrôlés
- Multiplication après sélection
- Multiplication sans sélection

Figure 14 : Représentation simplifiée de la généalogie des populations étudiées (communication personnelle).

III- Méthodes mises en œuvre

III-1 Extraction des ADN génomiques

Deux protocoles ont été suivis

III-1.1 Méthode CIMMYT : Le protocole est décrit en détail dans l'annexe 2

Comme tout notre travail expérimental repose sur la qualité des électrophorogrammes des marqueurs recensés, nous avons opté dans la partie screening (sélection) des marqueurs pour la méthode d'extraction CIMMYT.

En effet, bien qu'elle soit fastidieuse et lente (25 échantillons d'ADN extrait/jour en moyenne), cette méthode permet d'extraire de grandes quantités d'ADN (jusqu'à 500 μ l d'ADN à une concentration de 300-400ng/ μ l).

Cette méthode permet également d'obtenir des ADN de très bonne qualité en purifiant au maximum des débris cellulaires et autres molécules protéiques.

III-1.2 Méthode Cheung (extraction rapide en plaque de 96 échantillons)

Le protocole est décrit en détail dans l'annexe 3

Pour cette méthode, on utilise des plaques de 96 puits ; ceci nous permet d'extraire l'ADN de 96 plantes différentes en une seule manipulation. En moyenne il est possible d'extraire 4 fois 96 ADN /jour.

Dans chaque puit on ajoute 100 mg de feuille avec une bille en acier.

La plaque est ensuite placée dans un agitateur permettant ainsi un broyage très poussé des feuilles.

Toutefois, cette méthode ne permet qu'une extraction de qualité et de quantité moyenne (50 μ l d'ADN à une concentration de 100ng/ μ l).

Vu le nombre total d'individus des populations à génotyper et la rapidité d'extraction par cette méthode, il nous a semblé que cette méthode était la plus appropriée pour cette partie du travail expérimental.

III-2 Amplifications PCR

Le protocole est décrit en détail dans l'annexe 4

L'amplification est réalisée dans un volume final de 20 μ l de milieu contenant :

50ng d'ADN

0,2 mM de dNTP

0,5U de Taq polymerase

Les amorces utilisées possèdent à leur extrémité une extension M13 qui permet après son amplification d'amorcer une queue M13 fluorescente à une certaine longueur d'onde (figure 15).

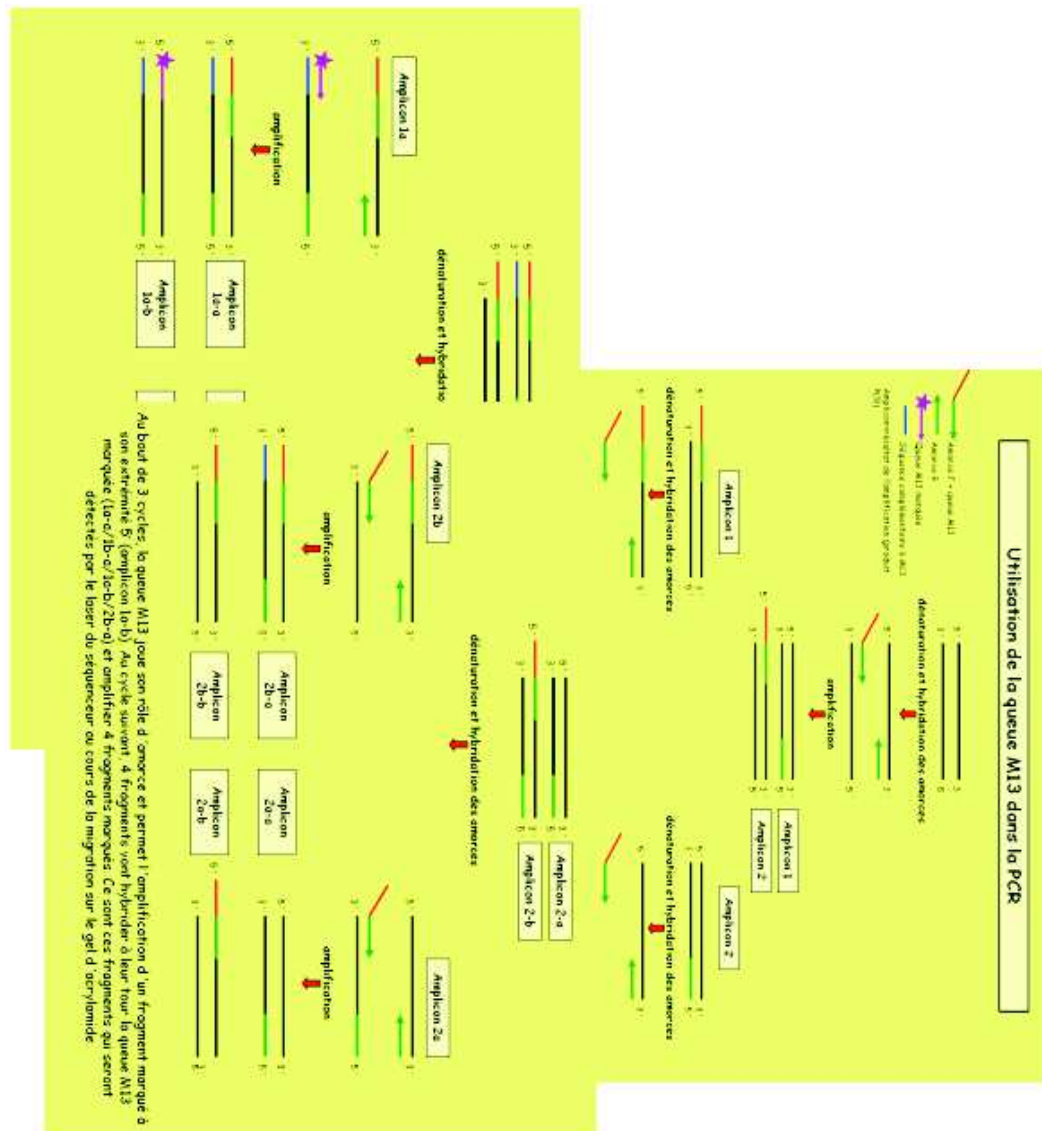


Figure 15 : Principe d'une PCR avec queue M13

III-3 Migration des produits d'amplification sur gel d'acrylamide-séquenceur

III-3.1 Principe du séquenceur

Le principe du séquenceur est basé sur l'utilisation de substances fluorescentes pour détecter l'ADN. Avec le séquenceur Li-COR deux substances fluorescentes peuvent être utilisées, ce qui permet de détecter à la fois deux signaux différents. Les caractéristiques des substances fluorescentes sont:

IRD800 (heptaméthine cyanine) qui fluoresce à 819 nm.

IRD700 (pentaméthine carbocyanine) qui fluoresce à 760 nm.

Les amorces utilisées lors de la PCR sont marquées avec un des deux fluorochromes (queue M13) de façon à ce que les fragments amplifiés soient marqués. Ces fluorochromes

sont capables d'émettre un rayonnement si ils sont excités par un faisceau laser. La longueur d'onde d'émission est spécifique du fluorochrome (700 et 800nm) et détectable par un système d'analyse. (Séquenceur - logiciel d'analyse). Ainsi, le séquenceur permet d'avoir une image en temps réel de la migration. Comme l'on dépose deux plaques de 96 échantillons avec deux fluorochromes différents, l'un à 700 et l'autre à 800 nm, on peut observer deux images en même temps (Figure 16).

Séquenceur LI-COR

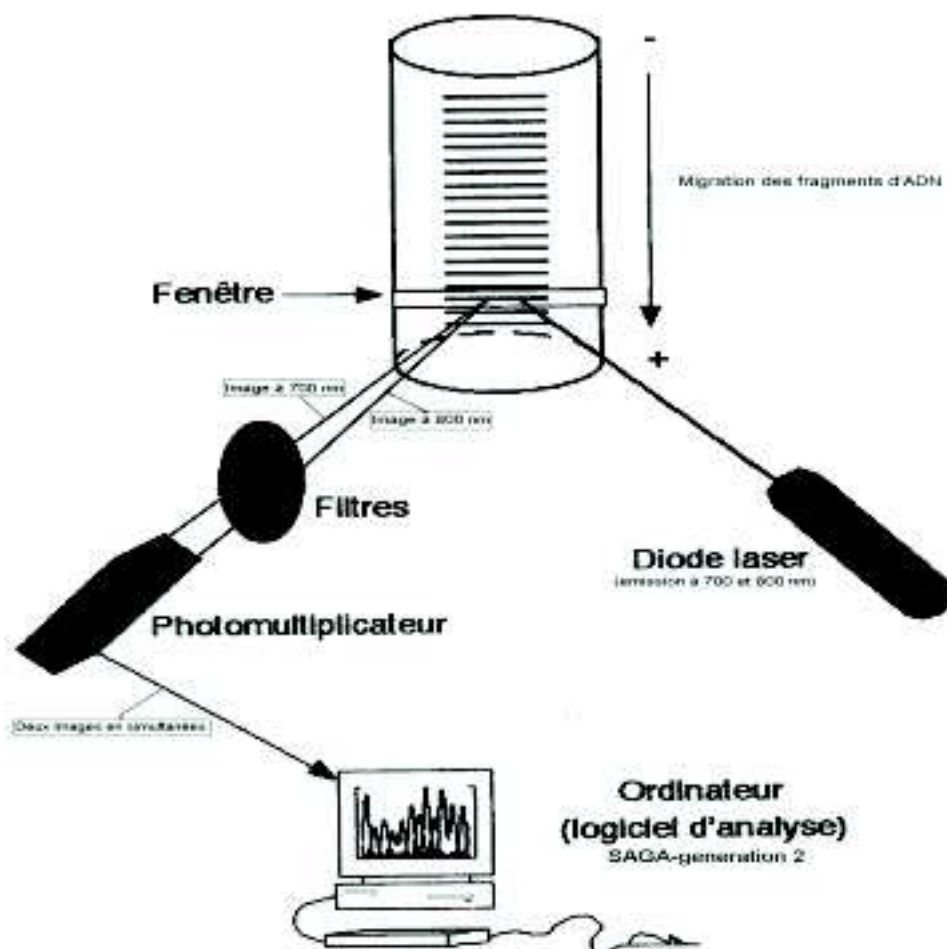


Figure 16 : Principe de fonctionnement d'un séquenceur LI-COR

III-3.2 Préparation des gels d'acrylamide

Préparation des plaques de verre

Les plaques de verre utilisées sont nettoyées méticuleusement, mais n'ont cependant pas besoin d'un traitement spécial car elles sont déjà prétraitées et directement prêtes à l'emploi.

Montage des plaques :

On place les espaceurs (épaisseur de 0,25 mm) aux deux extrémités de la grande plaque, puis on positionne la plus petite plaque sur les espaceurs. Ensuite on serre grâce aux serre-joints de manière homogène sur les deux extrémités (voir schéma en annexe 5)

Préparation et coulage du gel : Voir annexe 6

Le pré-run :

Permet de préchauffer le gel et de régler le focus de la lentille laser du séquenceur

Les conditions de pré-run sont :

- Température : 45°C
- Voltage : 1500 V
- Puissance : 40W
- Durée : 20 min

Préparation de la plaque de dépôt et migration proprement dite :

Un des avantages du séquenceur est de pouvoir passer deux plaques PCR en même temps car l'une sera visualisée à une longueur d'onde de 700 nm et l'autre à 800 nm (2 migrations à la fois) selon le type de fluorochrome incorporé.

Il faut également noter que le gel peut servir pour 2 dépôts successifs. Ainsi, un gel permet de réaliser 4 migrations de 96 individus.

Le protocole de préparation de la plaque de dépôt ainsi que les conditions de migration sont détaillés dans l'annexe 7.

III-4 Méthodes statistiques utilisées dans l'étude

III-4.1 Suivi de l'évolution des fréquences alléliques chez les différentes populations et pour chacun des marqueurs considérés

Dans cette partie, nous raisonnerons en fonction des effectifs efficaces (N_e) et non pas en fonction des effectifs réels (N).

Les équations employées pour décrire le processus stochastique supposent que l'effectif est constant au cours du temps et que chaque individu contribue de façon identique au pool des gamètes et donc à la formation des zygotes. Or, en réalité, un certain nombre d'individus ne se reproduisent pas.

Afin d'utiliser ces équations, on recherche alors un nombre « N_e », sorte de « moyenne pondérée » qui remplace N dans les formules. Une population d'effectif réel N se comportera en fait comme une population « idéale » d'effectif N_e .

Dans notre cas, N_e est approximativement égal à la moyenne harmonique des effectifs réels N à la génération i (N_i) sur la période considérée t (nombre total de générations).

$$N_e = \frac{t}{\sum_{i=1}^t (1/N_i)}$$

Si F et L sont les fréquences des allèles spécifiques f et l dans les populations de *F. glaucescens* et *L. multiflorum* respectivement, alors les fréquences sont $F/2$ et $L/2$ dans les populations hybrides, et $F/4$ et $3L/4$ dans les populations BC1.

Remarque : Comme toutes les populations étudiées sont tétraploïdes, le nombre maximum d'allèle observable pour un locus chez une population correspond à 4 fois N_e

$$F/2(1-L/2)/4N_e \text{ et } L/2(1-L/2)/4N_e$$

Et l'intervalle de confiance des fréquences au risque de 5% par :

$$\pm 1,96 \sqrt{F/2(1 - F/2)/4N_e} \text{ et } \pm 1,96 \sqrt{L/2(1 - L/2)/4N_e}$$

Pour les populations BC1 de petites tailles ($N_e < 7.5$), on utilise le test exact de la loi binomiale au risque de 5%.

Avec dans notre cas :

p (fréquence de l'allèle dans la population BC1) = $F/4$ pour l'allèle f et $3L/4$ pour l'allèle l .
 n (nombre d'allèles) = $4N_e$.

Ceci correspond par exemple à la probabilité de tirer parmi n allèles, k allèles F . *glaucescens* dans une population où la fréquence attendue est de $F/4$

III-4.2 Comparaison des populations et étude de diversité

III-4.2.1 Comparaison des populations par rapport aux fréquences de leurs allèles

Les populations peuvent être comparées globalement 2 à 2 par un test de X^2 (Khi2) d'homogénéité (au risque de 5%) du profil de leurs fréquences alléliques (en regroupant les classes de petites

On peut aussi par ce même teste X^2 comparer les populations pour la fréquence d'un allèle particulier.

III-4.2.2 Comparaisons des populations par rapport aux phénotypes observés

Dans cette partie nous avons utilisé les différentes possibilités qu'offrent le test de Kolmogorov- Smirnov (KS) ⁽¹⁾ : test de KS appliqué à un ou à deux échantillons (au risque de 5%).

L'étude de l'existence d'une diversité à l'intérieur même de la population (diversité intra-population) est testée par un test d'ajustement de KS (test d'un échantillon).

L'étude de l'existence d'une diversité entre les populations (diversité inter-population) est testée par test de KS d'indépendance (test de deux échantillons). Dans ce cas l'ensemble des populations est comparé 2 à 2 pour chacun des marqueurs considérés

Le test proprement dit est effectué avec les effectifs observés dans chacune des classes de génotype ou de génotype partiellement déterminable

Note : dans la suite de nos propos et dans un souci de simplification nous désignerons, par abus de langage, sous le terme "phénotype" le génotype déterminé ou partiellement déterminé.

III-4.2.2.1 Principe du test de Kolmogorov Smirnov (KS)

Le test d'ajustement

Étant donné un échantillon X_1, \dots, X_n et une fonction de répartition de référence $F_0(x)$

le test de KS teste l'hypothèse H_0 selon laquelle l'échantillon a été prélevé dans une population de fonction de répartition $F_0(x)$. Pour cela, il calcule sur l'échantillon une quantité D_k , appelée "statistique de Kolmogorov", dont la distribution est connue lorsque H_0 est vraie. Une valeur élevée de D est une indication que la distribution de l'échantillon s'éloigne sensiblement de la distribution de référence $F(x)$, et qu'il est donc peu probable que H_0 soit correcte.

$$D_k(F_0, F) = \max_{i=1, \dots, n} \left\{ F_0(X_{(i)}) - \frac{i}{n}, \left| F_0(X_{(i)}) - \frac{i-1}{n} \right| \right\}$$

Où F est la fonction de répartition empirique de l'échantillon définie comme suit :

$$F : \mathbb{R} \rightarrow [0, 1]$$

$$x \mapsto F(x) = \begin{cases} 0 & \text{pour } x < X_{(1)} \\ \vdots & \\ \frac{i}{n} & \text{pour } X_{(i)} \leq x < X_{(i+1)} \\ \vdots & \\ 1 & \text{pour } x \geq X_{(n)}, \end{cases}$$

Où les $X_{(i)}$ sont les statistiques d'ordre de l'échantillon (valeurs de l'échantillon rangées par ordre croissant).

b) le test indépendance

C'est une extension du test précédent. C'est un test de comparaison de la distribution de 2 variables à partir de 2 échantillons indépendants ; il est basé sur l'écart maximum entre les fonctions de répartitions empiriques des deux échantillons comparé à une table dite table de Kolmogorov Smirnov pour 2 échantillons.

Calcul de la différence max $D_{n,m}$:

$$D_{n,m} = \max_{x \in \mathbb{R}} |F_n(x) - G_m(x)|, \text{ avec } F_n(x) \text{ et } G_m(x) \text{ les fonctions de répartition pour les échantillons } m \text{ et } n.$$

L'hypothèse nulle H_0 à rejeter : il n'existe pas de différence entre les deux distributions

Si D_{\max} Calculé \square Valeur critique lue sur la table de Kolmogorov Smirnov à $P=5\%$

Chapitre III : Résultats et discussion

Recensement des marqueurs SSR-PCR cartographiés

Les marqueurs recensés sont décrits en détail dans un tableau en annexe 8

Sur les 3 cartes génétiques utilisées (Carte fétuque élevée 6x, carte ray-grass hybride 4x, carte ray-grass anglais 2x), nous avons recensé 148 marqueurs microsatellites cartographiés sur au moins une carte, 10 marqueurs sont communs aux cartes de la fétuque élevée et du ray-grass anglais. Le tableau 4 résume les effectifs et le type de marqueurs recensés.

Carte compense conséquence	Fétuque élevée	Ray-grass Anglais	Ray-grass hybride	Total marqueurs/ par carte
Fétuque élevée	5 Cornell 45 Noble 1 UGAPF	12 UGAPF	4 Cornell 13 Noble	80
Ray-grass Anglais		20 DIAS 5 DLF 3 DVP 19 Kubik 13 UGAPF		72
Ray-grass hybride			2 CNL 6 Nobel	25
Total marqueurs cartographiés	148			

Tableau 4 : Résumé des effectifs et du type de marqueurs recensés. La lecture du tableau doit se faire en « L ».

Sur ces 148 marqueurs recensés nous en avons sélectionnés 28 plus un (OSRB retenu d'office car ayant déjà fait l'objet de travaux par l'unité) (tableau 5) à tester en fonction des critères de sélections suivantes

Balayer le génome le plus largement possible : en sélectionnant au moins un marqueur sur chaque groupe de liaison afin que tous les chromosomes soient représentés.

Diversité génétique interspécifique chez les graminées fourragères pérennes

Distances génétiques entre marqueurs au sein du même groupe de liaisons : choisir des marqueurs suffisamment éloignés entre eux pour maximiser les chances de les voir séparément (plus les marqueurs sont éloignés, plus ils ont de chance de se recombiner indépendamment au cours de la méiose).

Eviter les marqueurs qui nous semblent « douteux » :

Les marqueurs dupliqués au sein du même groupe de liaison ou dupliqués entre deux groupes de liaisons différents.

Les marqueurs dont la taille attendue des allèles varie fortement entre deux cartes génétiques différentes.

Note : lors de notre tri de marqueurs, nous avons privilégié de capitaliser au maximum les informations délivrées par la carte génétique de L. Junsenn (ray-grass anglais) pour diverses raisons :

Tableau 5 : marqueurs sélectionnés à tester

Origine	Marqueurs	Lobum			Festuca			Annonce L	Annonce R		
		TL	Taille des Allèles (pb)	GL sur génome A	Taille des Allèles (pb)	GL sur génome B	Taille des Allèles (pb)			GL sur génome C	Taille des Allèles (pb)
UGAF	B4-D7	LQ1	215				2	216	CGGGAGGCTGTCTCTCTT	TCCAGAACCTTCTGGAGGTC	
UGAF	B3-B7	LQ1	266				2(2)	300-390	AGGCCAGCATACGTTGTGTC	ATCTGTAGGCTTGTGTGTC	
UGAF	B1-B6	LQ1	291						GGAGCTGCATCTTGTGGT	GCAAACCCAGACRCCCATTA	
UGAF	B3-D12	LQ2	298	3	298				GGGCATCACTGAGMAGMGA	TACAAAGGAMGTGGGCATC	
DMS	LSSSR078	LQ2	280						CCCATRGTGGAGGATMAA	AAATTCCCATGAGMAGC	
DMS	LSSSR112	LQ2	260						GACCCGAGCAGSCTA	AGCFATGTCCTGAGMA	
Kuhik 1999	M4-136	LQ2	183-207						AGAGACCATCACCAAGCC	TCTGGAGAGAAATTCCTTG	
Kuhik 2001	PR2	LQ2	183-195						GTATAGTACCANTCGGT	GCDBCCCTGGCCATGCTG	
Kuhik 2001	PR8	LQ2	119-134						AGGGTGTGTGTGCATTC	GCDBTGCACCCCTG	
Kuhik 2001	PR24	LQ2	148-150						TGCTGTGATGCTGAAATG	GTATAGTACCANTTCGCTTGTG	
UGAF	B1-C9	LQ3	193	6(3)	200-202-210				GAAGCCATGACAGGTTACT	AAAGGAAAGCCGGCTATAC	
UGAF	B1-A2	LQ3	218						GTGCAGCAATTTGAAATGGA	AGCATGGGAAAGCTATGAAATG	
UGAF	B3-B8	LQ3	307						TGTCAATGTCCGCTGTGTACG	GAAGATGGGCCATCATCTTC	
UGAF	B1-A10	LQ3	200						GCAGCAGGAGTGAACACTGA	TAAAGCGTAAAGGACCAATG	
UGAF	B4-D2	LQ4	251					15	250	GAAGTCAATACCTGCGTCTTA	GCAGATCAAAAGAACCATGTC
DMS	LSSSR026	LQ4	290						CAATGAGGTCCCAAG	TACCTGGCAAAATCTTG	
DMS	LSSSR023	LQ4	300						ATGCAAGGATTTTATTCAT	GGGAGGCTTAAAGTGT	
Kuhik 2001	PR3	LQ4	140-158						GCAGAGTGTCAAGGT	CTTTTGGCCTTGTA	
Noble	NFFA037	LQ5							GATCTTGTCCACTGATCTG	GCCTCCATCATCTGAAATTCG	
DMS	LSSSR059	LQ5	200						GATCGGATGCGTACAGGAGA	GAAGCCACCCCTGTGTTGT	
Noble	NFFA089	LQ5							CCCAAGAAAGAACAGCA	AGAGCCGAAATGACAGAGAC	
UGAF	B2-F1	LQ5	178						CCAAACATATGCAACGATSA	TCCATTGTCTTGGGGAGGA	
UGAF	B4-E1	LQ5	207						AAACATCAACGGAAAGATGC	TGATATGCATTTGTGATGGAGG	
UGAF	OSTB	LQ5									
UGAF	B3-D4	LQ6	112	4	192				AAACCCATACCCACATACCG	GGCGTGTGTGAAAGTGAATG	
DMS	LSSSR089	LQ6	320						TGATGAGCTGAAAGGAGATT	GAACGGCTAAGGGACAGAA	
UGAF	B1-A8	LQ6	295						GACTTTCAGGCATGATCAT	CCCAAGCTCATTCTTAAATGC	
UGAF	B1-C8	LQ7	198						TTCTGGCAGTGTGATTTGC	GTGTAGGAGGTTGGAGCAGTG	
OLF	DLU020	LQ7	280						ATGATGACGAGGAGGAGAT	ATAGTACGAGGAGGAGATTA	

Le nombre entre () correspond au nombre de duplications d'un marqueur sur un même groupe de liaison

Note : lors de notre tri de marqueurs, nous avons privilégié de capitaliser au maximum les informations délivrées par la carte génétique de L. Jensen et *al.*, 2005 sur le ray-grass anglais pour diverses raisons :

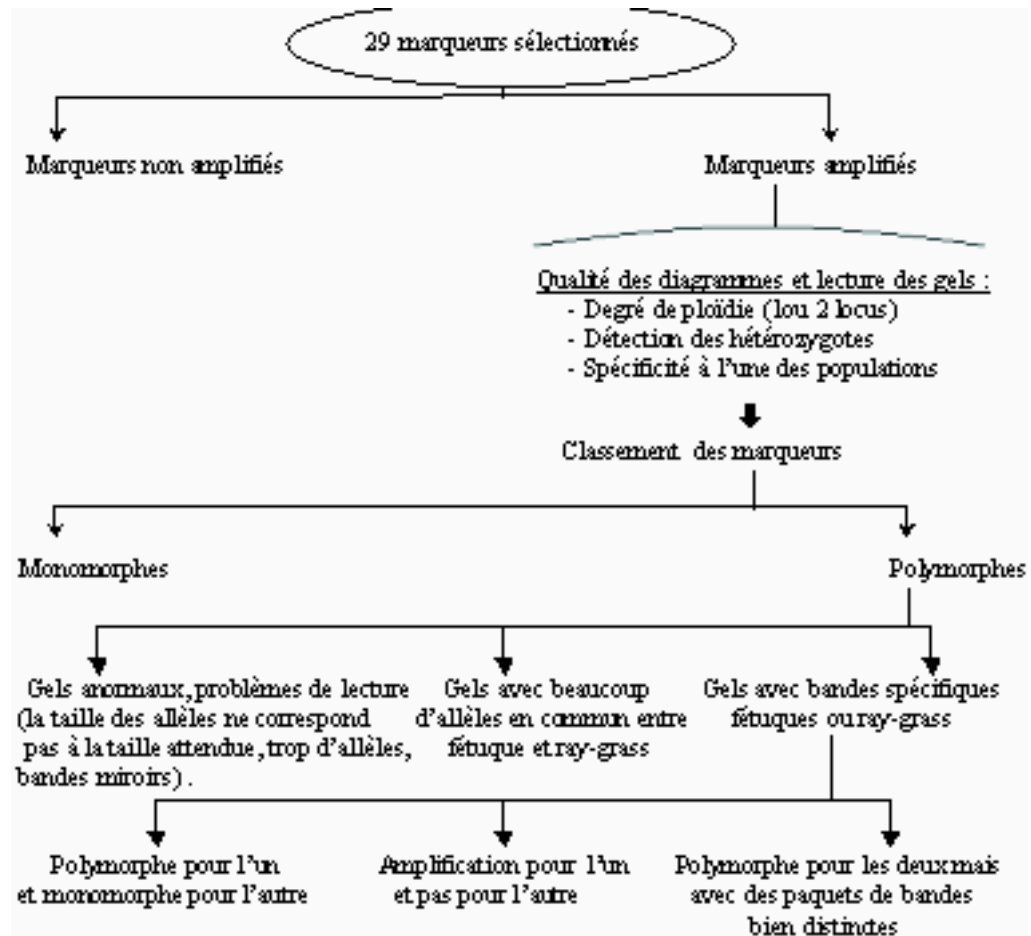
cette carte a été établie avec des marqueurs déjà utilisés par le laboratoire de biologie moléculaire de l'unité. De ce fait ces marqueurs sont les mieux connus par notre laboratoire (polymorphisme, optimisation des conditions PCR, taille obtenue sur certaines populations de cartographie).

La carte génétique de la fétuque élevée montre de multiples incohérences (taille attendue des allèles différents, marqueurs dupliqués au sein du même groupe de liaison et entre deux groupes de liaisons différents). Ces incohérences pourraient être associées à la difficulté d'établir une carte génétique au niveau hexaploïde.

La carte du ray-grass hybride réalisée au niveau interspécifique, nous laisse penser que l'élaboration des groupes de liaisons a pu être biaisée par le fait que les allèles mâles, comme les allèles femelles, ont tendance à rester groupés entre eux.

II- Tester pour les marqueurs recensés (screening) , retenus, la qualité des électrophorogrammes

Le screening des 29 marqueurs retenus a montré plusieurs cas de figures résumés dans le diagramme suivant :



Nous avons essayé de réduire au maximum le nombre de marqueurs dont les profils sont trop complexes (bandes miroirs, allèles en commun dont l'origine fétuque ou ray-grass est inaffirmable, nombre trop faible d'allèles détectés à l'état hétérozygote) en réduisant les quantités d'ADN à amplifier, dans le but de diminuer l'intensité des bandes et les effets miroirs.

Remarque : le seuil de distinction (entre chaque bande) que nous nous sommes fixés pour la lecture des électrophorogrammes (2 à 3 paires de bases) nous amène à éliminer de la suite de notre travail tous les marqueurs dont les gels ne sont pas assez lisibles à ce seuil de distinction.

Notre obligation à faire des lectures très précises est dictée par le fait que nous voulons comparer plusieurs populations apparentées, ce qui nous oblige à distinguer la moindre différence entre les profils électrophorétiques obtenus.

III- Génotypage des populations étudiées à l'aide d'un ensemble de marqueurs

Lors de ce travail nous nous sommes heurtés à de grosses difficultés de correspondance des allèles entre profils parentaux (lors du screening) et les profils obtenus sur les différentes populations de descendants.

Ceci nous laisse penser qu'il est très probable que les ADN stocks utilisés soient de mauvaise qualité. En effet non seulement ces derniers ont été extraits il y a 3 ans mais en plus une partie a été utilisée lors de divers travaux de recherche menés à l'unité, ce qui a pu contribuer d'une part à la dégradation des ADN stocks et d'autre part à leur pollution par des ADN exogènes.

Compte tenu du seuil de précision que nous nous sommes fixés au départ et au regard des difficultés mentionnées plus haut ; nous nous sommes trouvés dans l'obligation de n'exploiter que les informations délivrées par un ensemble restreint de marqueurs qui sont les suivants :

OSRB, B4D7, B1C8, B1B6.

B1B6 présente la particularité de reconnaître spécifiquement des séquences fétuque ou ray-grass et les amplifie (Figure 17).

Cela veut dire que ce genre de marqueurs permettrait de localiser et de suivre au cours de générations interspécifiques des allèles dont l'origine (fétuque ou ray-grass) ce qui le rend très informatif au niveau allélique. Par conséquent nous apporterons un intérêt particulier à B1B6 dans la suite de notre étude (considéré comme référentiel dans notre étude).

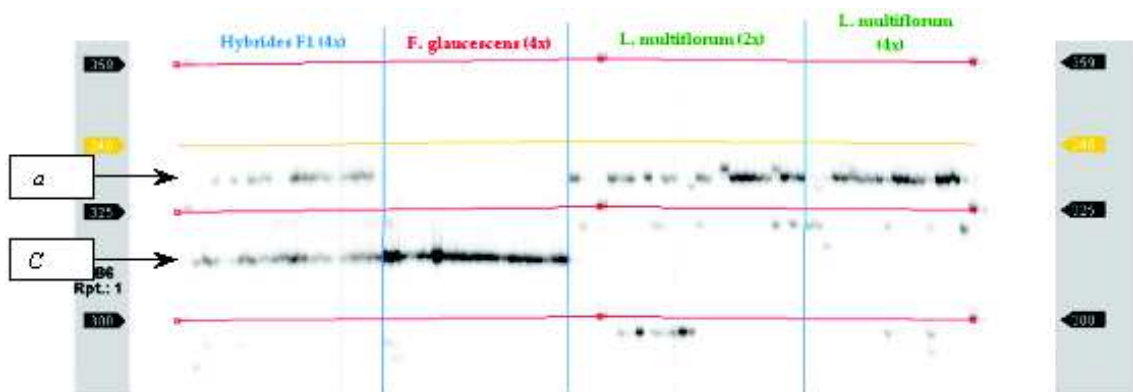


Figure 17 : électrophorogramme obtenu par B1B6 sur une plaque contenant des *F.glaucescens* (4x), *L.multiflorum* (2x et 4x) et 20 hybrides primaires entre les 2 espèces.

III-1 Etude des fréquences alléliques

Le génotypage des électrophorogrammes des différentes populations étudiées, obtenues à partir des marqueurs retenus (OSRB, B4D7, B1C8, et B1B6) est exprimé sous forme de fréquences alléliques (effectif de l'allèle considéré/effectif d'allèles total) dans les tableaux 6, 7, 8 et 9 respectivement.

Les histogrammes 1, 2, 3 et 4 sont des représentations en proportions relatives d'allèles : contribution de chaque allèle dans le pool total d'allèles pour un locus (marqueur) dans une population donnée. Ce type de représentation nous permet de faire un suivi de chaque allèle dans les différentes populations pour chacun des marqueurs.

Note : Du fait que B1B6 reconnaît spécifiquement les séquences fétuque (Allèle C) ou ray-grass (Allèle a) il est très intéressant de calculer les fréquences parentales. En effet ce dernier nous permet de faire un suivi de fréquence chez les descendants (populations étudiées) suivant leurs généalogies et de les comparer à ces dites fréquences parentales.

B1B6	<i>F. glaucescens</i>	<i>L. multiflorum</i>	Hybrides	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477
Effectif d'individus	23	39	18	162	177	163	173	164
Effectif d'allèles	23	97	30	456	495	443	533	445
Frequences d'allèles	<i>a</i>	0.773	0.433	0.287	0.296	0.470	0.309	0.140
	<i>b</i>	0.093		0.123	0.089	0.296	0.296	0.390
	<i>c</i>	1.000	0.567	0.414	0.351	0.124	0.229	0.299
	<i>d</i>			0.105	0.230	0.002	0.075	0.111
	<i>e</i>	0.124		0.070	0.008	0.102	0.073	0.054
	<i>f</i>	0.010			0.024	0.007	0.017	0.005

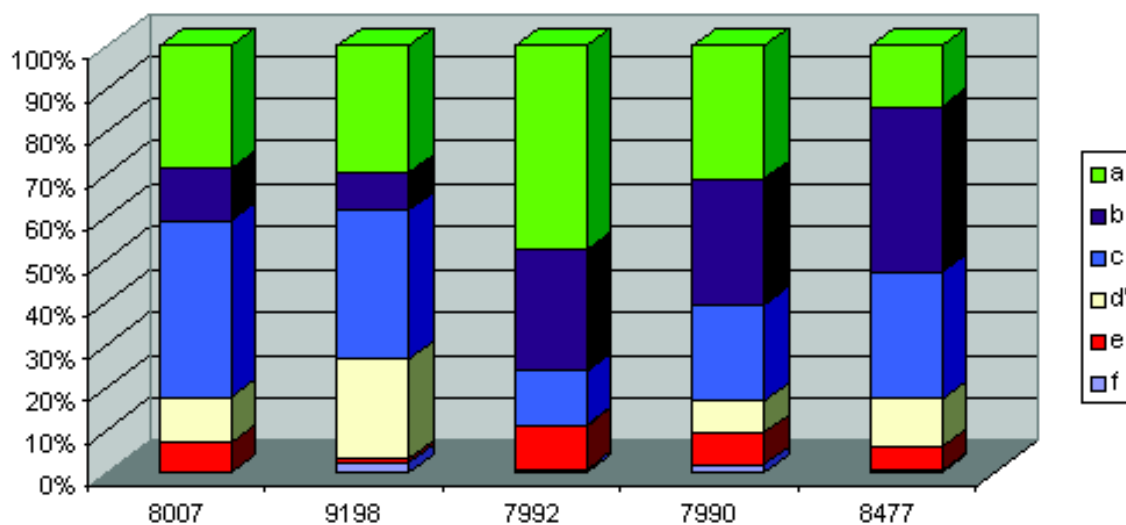
Tableau 6 : fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur B1B6

Les allèles « a » et « c » sont spécifiques de *Lolium multiflorum* et de *Festuca glaucescens* respectivement.

Avec :

La fréquence parentale de l'allèle a est de 0.773

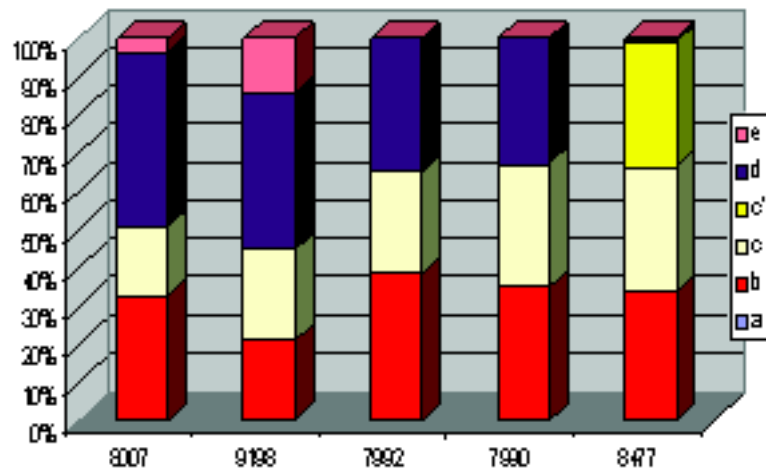
La fréquence parentale de l'allèle c est de 1.000



Histogramme 1 : contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B1B6.

B1C8	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477	
Effectif d'individus	169	181	169	185	172	
effectif d'allèles	514	598	486	547	513	
Fréquences d'allèles	a		0,002		0,002	
	b	0,327	0,207	0,385	0,349	0,335
	c	0,181	0,237	0,267	0,324	0,326
	c'					0,329
	d	0,457	0,408	0,348	0,327	0,002
	e	0,035	0,145			0,006

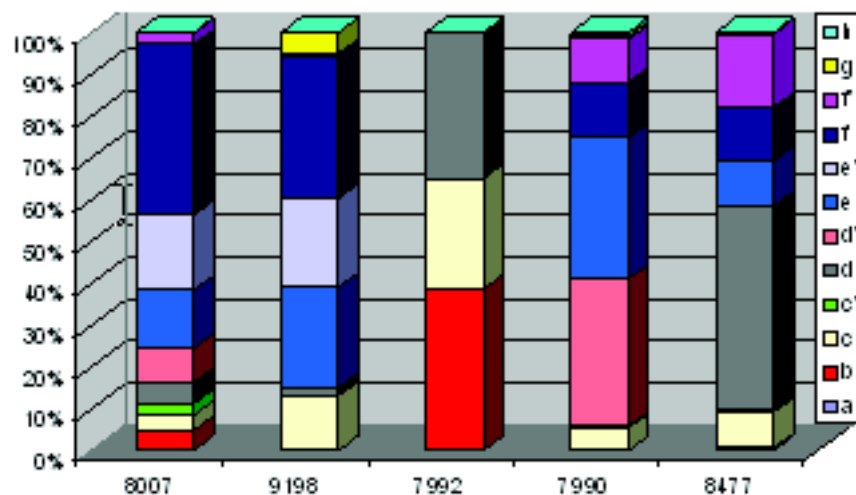
Tableau 7 : Fréquences alléliques obtenues après Génotypage des différentes populations au marqueur B1C8



Histogramme 2: contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B1C8

B4D7	Pop	Pop	Pop	Pop	Pop	
	8007	9198	7992	7990	8477	
Effectif d'individus	178	181	169	185	165	
effectif d'allèles	541	478	486	560	531	
Fréquences d'allèles	a				0,006	
	b	0,048		0,385		
	c	0,037	0,132	0,267	0,054	0,085
	c'	0,026				0,006
	d	0,052	0,021	0,348	0,004	0,490
	d'	0,081			0,352	
	e	0,139	0,238		0,339	0,107
	e'	0,181	0,213			
	f	0,409	0,339		0,134	0,128

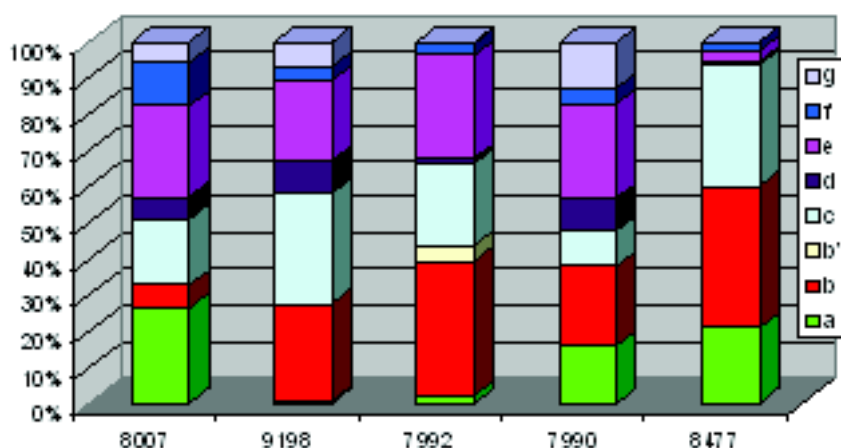
Tableau 8 : Fréquences alléliques obtenues après génotypage des différentes populations au marqueur B4D7



Histogramme 3 : contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur B4D7

OSRB	Pop	Pop	Pop	Pop	Pop	
	8007	9198	7992	7990	8477	
Effectif d'individus	165	145	164	124	53	
effectif d'allèles	468	435	439	334	125	
Fréquences d'allèles	a	0,264	0,007	0,023	0,162	0,208
	b	0,062	0,269	0,371	0,219	0,392
	b'			0,046		
	c	0,183	0,306	0,226	0,099	0,336
	d	0,060	0,090	0,011	0,090	0,008
	e	0,252	0,221	0,285	0,260	0,032
	f	0,122	0,039	0,034	0,042	0,024
	g	0,058	0,069	0,005	0,129	

Tableau 9 : Fréquences alléliques obtenues après génotypages des différentes populations au marqueur OSRB



Histogramme 4 : contribution relative de chaque allèle dans les différentes populations pour le marqueur OSRB

Au regard des résultats exprimés dans le tableau 6 nous pouvons étudier l'évolution des fréquences aux allèles a et c pour les différentes populations par rapport aux fréquences parentales :

1/2 de la dose parentale chez les hybrides

3/4 de la dose parentale *L.multiflorum*, et 1/4 de la dose parentale *F.glaucescens* chez les BC1.

Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe III-4 du chapitre II (méthodes statistiques utilisées) l'estimation de la variance et de l'intervalle de confiance des fréquences alléliques obtenues se fait pour les populations hybrides par une approximation de la binomiale par une loi normale ; alors que pour les BC1 d'effectifs faibles on utilise le test exact de la loi binomiale. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 10.

	F. glaucescens	L. multiflorum	Hybrides F1	Pop 8007	Pop 9198	Pop 7992	Pop 7990	Pop 8477
Effectif d'individus	23	39	18	142	177	143	173	144
Effectif efficace N_e			24	1428	1459	382	327	408
Effectif d'allèles	23	97	30	454	495	443	533	445
Fréquences d'allèles	a	0.773	0.433	0.287*	0.296*	0.580	0.309*	0.140*
	c	1.000		0.567	0.414	0.351*	0.124	0.229
Intervalle de confiance	a			[0.29, 0.50]	[0.38, 0.62]	[0.33, 0.83]	[0.46, 0.86]	[0.43, 0.93]
	c			[0.36, 0.63]	[0.40, 0.59]	[0.06, 0.40]	[0.06, 0.40]	[0.06, 0.40]

Tableau 10 : Fréquences alléliques de a et c et calcul de leurs intervalles de confiance pour les différentes populations étudiées.

* : Correspond aux fréquences qui n'appartiennent pas à l'intervalle de confiance déterminé.

III-1.1 Informations délivrées par le marqueur spécifique B1B6

Pour l'allèle a :

Nous remarquons que pour cet allèle toutes les fréquences hormis celles de la population 7992 sont plus basses que la borne inférieure définie par l'intervalle de confiance. Ceci indique que chez les populations 8007, 9198, 7990, et 8477 l'allèle a a fait l'objet d'une contre sélection.

Chez les populations hybrides cette contre sélection serait intervenue de manière subite dès

la première génération de polycross des hybrides F1 (population 8007).

Pendant les effets de cette contre sélection ne semble pas s'accroître au cours des générations suivantes, de tel sorte qu'une fois contre sélectionnée dans la population 8007 la fréquence de l'allèle a semble se stabiliser pour se maintenir jusqu'à la population 9198.

Chez les populations BC1 la contre sélection semble intervenir chez les populations 7990 et 8477 mais pas chez la population 7992. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par des recombinaisons méiotiques intervenues lors des polycross précédents à la création

de la population 7992 et d'autre part par le fait que la population 8477 soit issue d'un polycross entre 7992 et 7990. Il est évident qu'en plus des recombinaison éventuelles, la contre sélection de l'allèle *a* en amont au niveau de la population 7990 serait également à l'origine de la contre sélection de l'allèle *a* dans la population 8477.

Pour l'allèle *c* :

Hormis pour la population 9198, les fréquences de l'allèle *c* chez les différentes populations appartiennent aux intervalles de confiance définis, ce qui nous laisse penser que globalement, la fréquence de l'allèle *c* n'a évolué par rapport à celle dans les populations parentales que uniquement par effet de dérive génétique ; c'est à dire par réduction de la taille des populations au cours des générations.

Nous pouvons également supposer que d'une manière générale les effets de dérive puissent être suffisamment forts pour contrecarrer les effets de la sélection à travers les générations.

Chez les populations hybrides, contrairement à l'allèle *a* la fréquence de l'allèle *c* n'a pas été contre sélectionnée dès la première génération de polycross des hybrides F1 (8007),

Chez les populations BC1, les intervalles de confiance calculés par le biais du test exact sont tellement grands que la pertinence du test en devient amoindrie. Par conséquent la discussion des résultats devient possible par la comparaison des fréquences dans l'absolu.

Les fréquences des différentes populations pour l'allèle *c* n'ont pas évolué significativement par rapport aux fréquences parentales. On peut même dire que dans l'absolu la fréquence de l'allèle *c* à augmente à travers les générations de BC1, ce qui revient à dire que seul le jeu de la dérive génétique suffit à expliquer cette évolution.

III-1.2 Informations délivrées par les marqueurs non spécifiques

Les histogramme de fréquences relatives (2, 3 et 4) obtenues pour chacun de ces marqueurs (OSRB, B4D7, et B1C8) montrent une apparition de nouveaux allèles au niveau de générations (populations) plus ou moins avancées. Ce qui en principe ne devait pas être le cas. Ces aberrations nous renvoient directement à la qualité de nos gels et aux difficultés de lecture (bandes miroirs, bandes trop épaisses) rencontrées.

Malgré nos multiples essais d'optimisation de la qualité des gels (dilution des quantités d'ADN pour la PCR) la persistance des artefacts de manipulation (PCR ou Licor) nous laisse penser que cela est lié à la qualité des ADN (dégradations du aux différentes manipes menées à l'unité).

Du fait de ces artefacts nous, discuterons cette partie de manière globale ;

Chez les populations hybrides : au niveau de chaque marqueur, nous remarquons que pour les allèles majeurs (grande fréquence relative), l'évolution reste relativement lente.

Chez les populations BC1 : contrairement aux populations hybrides les fréquences des allèles majeurs évoluent de façon beaucoup plus prononcée ; surtout entre la population 7992 et 8477.

L'étude des fréquences de l'allèle *a* et *c* du marqueur spécifique B1B6 et l'étude plus globale avec les autres marqueurs (OSRB, B4D7, B1C8) montre que les générations hybrides successives à la population 8007 correspondraient à des populations allopolyploïdes ou les deux génomes *Festuca* et *Lolium* cohabiteraient tout en évoluant de manière relativement indépendante (structure disomique se rapprochant de l'amphiploïdie stricte), ce qui pourrait expliquer la relative stabilité des hybrides. Cependant la contre

sélection de l'allèle *c* dans la population 9198 nous laisse penser que cet allotétraploïde aurait évolué par recombinaison au moment du polycross entre les hybrides de Lusignan et ceux de Poznan. L'évolution plus prononcée chez les populations BC1 correspondrait à une structure allotétraploïde ou les appariements homéologues seraient plus aisés.

III-2 Comparaison des populations par leurs fréquences alléliques au marqueur B1B6

III-2.1 Comparaison globale des populations 2 à 2 par un test χ^2 (khi2) d'homogénéité du profil de leurs fréquences alléliques au seuil de 5%

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 11.

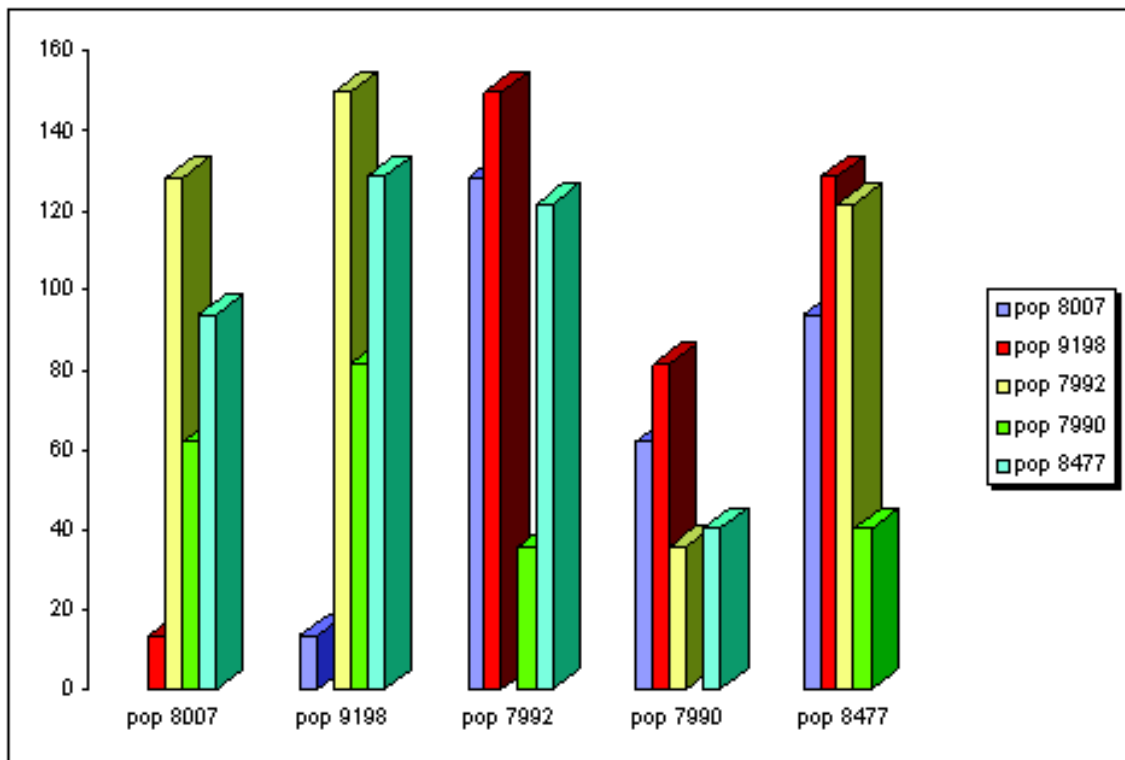
Note : les classes correspondant aux allèles *d*, *e*, *f* ont été regroupées (*d+e+f*) car elles avaient une taille trop faible (≤ 5).

Nous remarquons que les valeurs du χ^2 sont significatives à très significatives entre certaines paires de populations, particulièrement entre les hybrides et les BC1 (Tableau 11).

Tableau 11 : Récapitulatif des valeurs du χ^2 calculées pour les différentes populations Avec ddl = 3 et = 7,814

	pop 8007	pop 9198	pop 7992	pop 7990	pop 8477
pop 8007		13,462	128,280	61,7083	93,7385
pop 9198			149,73995	81,4128451	128,337
pop 7992				35,851	121,557
pop 7990					40,4313
pop 8477					

La valeur du χ^2 devient alors une sorte de mesure de la distance génétique entre les populations (voir l'histogramme 5).



Histogramme 5 : Comparaison des distances
 entres populations par leurs X^2 aux fréquences alléliques

Note : les distances exprimées par X^2 ne sont pas des mesures géométriques, elles ne sont donc pas additionnables.

Comme nous l'avons supposé, nous remarquons que les populations hybrides et BC1 sont très éloignées. Cet éloignement semble s'accroître au fur et à mesure de l'avancée en générations des BC1.

Les deux populations 8007 et 9198 qui dérivent directement des hybrides semblent très proches l'une de l'autre.

La population 7992 (BC1 des hybrides de Lusignan) semble être relativement proche de la population 7990 (BC des hybrides Polonais). Cependant la population 7992 est très éloignée de la population 8477, alors que cette dernière résulte d'un croisement en descendance de polycross de 7992 et 7990.

La population 8477 est donc quasiment aussi éloignée de la population 7992 que des populations hybrides.

III-2.2 Comparaisons des populations sur la base de leurs fréquences alléliques au marqueur B1B6, exemptées des fréquences de l'allèle c

Dans cette partie nous avons tenté comme précédemment de calculer le X^2 par test d'homogénéité du profil des fréquences alléliques, sauf que dans ce cas nous n'avons considéré que les classes correspondantes aux fréquences alléliques non attribuées à *Festuca glaucescens* (omission délibérée des fréquences de l'allèle c). Ceci revient à dire

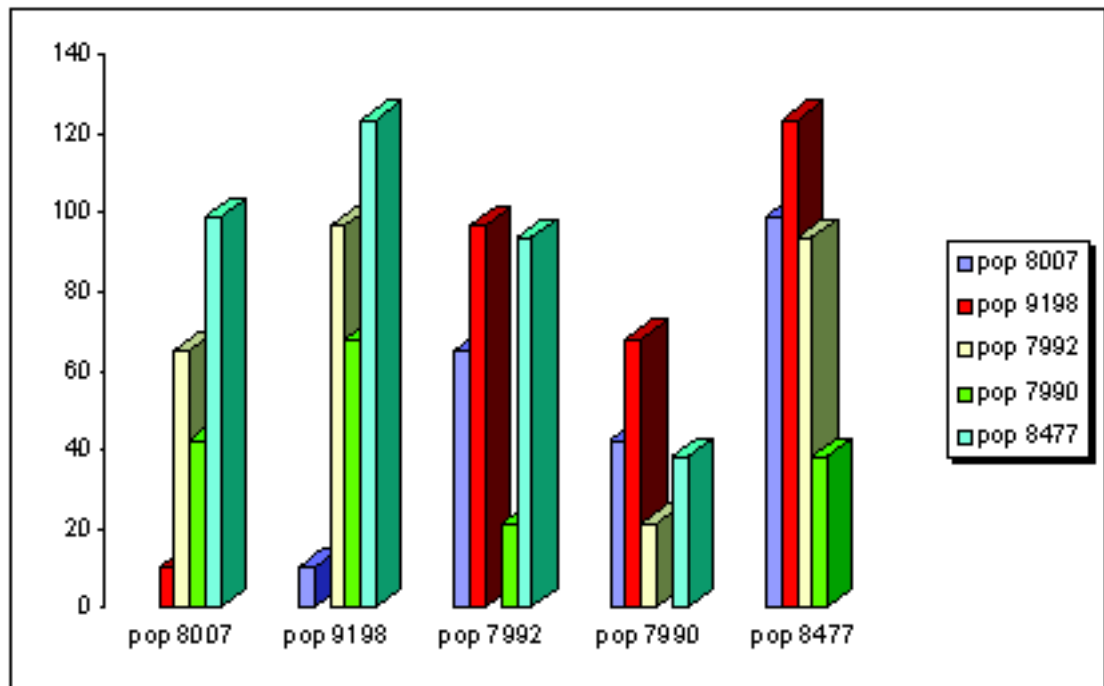
que nous cherchons à évaluer les distances génétiques entre populations expliquées par les allèles non *F.glaucescens*.

Nous noterons ce khi2 par : $X^2 (- c)$

Les résultats sont exprimés dans le tableau 12 et l'histogramme 6.

Tableau 12 : Récapitulatif des valeurs du $X^2 (- c)$ calculé pour les différentes populations Avec ddl = 2 et = 5,991

	pop 8007	pop 9198	pop 7992	pop 7990	pop 8477
pop 8007		10,36942355	65,0891176	42,5159514	99,0139327
pop 9198			96,6519501	67,9504682	123,376766
pop 7992				21,1930738	93,5872136
pop 7990					38,1498407
pop 8477					



Histogramme 6 : Comparaison des distances entre populations par leurs $X^2 (- c)$ aux fréquences alléliques

Hormis que les valeurs de X^2 soient plus faibles pour $X^2 (- c)$ que pour le X^2 calculé par l'ensemble des fréquences alléliques sans distinction à cause d'un ddl plus faible (2 au lieu de 3 au départ), l'allure générale des deux histogrammes (1 et 2) est rigoureusement identique.

Ceci nous laisse penser que la proportion en allèles d'origine *F.glaucescens* ne suffit pas à expliquer les différences entre populations ; bien au contraire ce sont les fréquences aux autres allèles (non attribuées à *F.glaucescens*) qui expliqueraient une grande partie de ces différences.

L'évaluation des distances génétiques entre populations par χ^2 de fréquences alléliques globales est très cohérente avec l'origine génétique des populations (généalogie).

Ainsi il semble que l'évolution des populations hybrides 8007 et 9198 est très lente. Ceci laisse penser que la composition en chromosomes *F.glaucescens* et *L.multiflorum* ne change que relativement peu. Ces hybrides se rapprocheraient donc d'une structure amphiploïde (tétraploïde à hérédité disomique).

Par contre chez les trois populations de BC1 étudiées, comme nous pouvions nous y attendre, l'évolution est beaucoup plus prononcée, surtout entre la population 7992 et 8477. Ceci s'explique par le fait que chez les BC1, les chromosomes d'origine *F.glaucescens* ne se retrouvent qu'en un seul exemplaire, ce qui les oblige à faire des appariements homéologues pour pouvoir se maintenir, alors que les chromosomes d'origine *L.multiflorum* ont la possibilité de réaliser des appariements homologues.

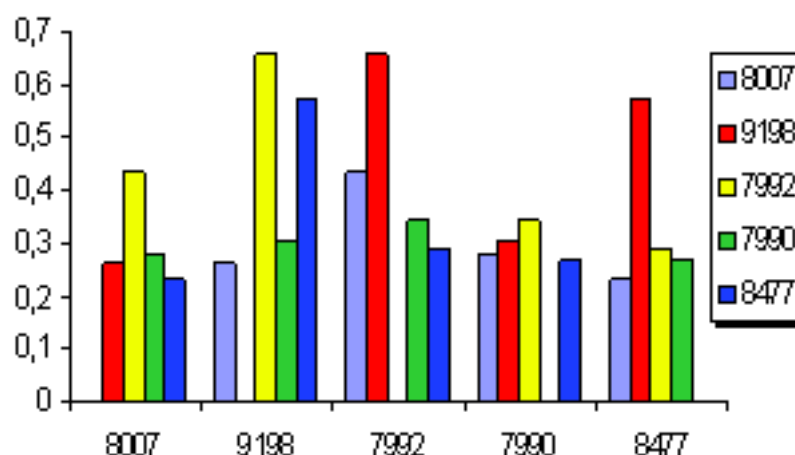
III- 3 Comparaisons des populations 2 à 2 sur la base des phénotypes observés par un test indépendance de Kolmogorov Smirnov : Diversité interpopulation

Dans cette partie nous avons effectué un test d'indépendance des phénotypes obtenus pour les populations prises 2 à 2 de kolmogrov (test de kolmogrov pour 2 échantillons) : lorsque le test est significatif, la valeur de la statistique Dk nous donne une idée sur la distance entre les populations. Dans le cas contraire (non significatif) cela revient à dire que les populations ne diffèrent pas par leurs effectifs phénotypiques.

Les résultats obtenus, pour les différents marqueurs, sont reportés dans les tableaux 13, 14 15 et 16 et les histogrammes 7, 8, 9, 10 et 11, respectivement (voir le détail des calculs en annexe 9).

Tableau 13 : Récapitulatif des valeurs Dk calculées pour les différentes populations au marqueur B1B6

B1B6	8007	9198	7992	7990	8477
8007		0,263	0,432	0,277	0,232
9198			0,655	0,302	0,571
7992				0,34	0,287
7990					0,266
8477					



Histogramme 7 : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur B1B6

Nous remarquons que les résultats de la comparaison des populations sur la base de leurs fréquences alléliques et sur la base des différents phénotypes observés semblent globalement se rejoindre ; avec cependant plus de nuance pour l'étude de diversité sur la base des phénotypes :

Les deux populations 8007 et 9198 dérivant directement de l'hybride reste très proches. Néanmoins il semblerait qu'au niveau phénotypique la population 8007 soit aussi proche de 9198 que de 7990 et 8477. Alors que 9198 se rapprocherait de 7990.

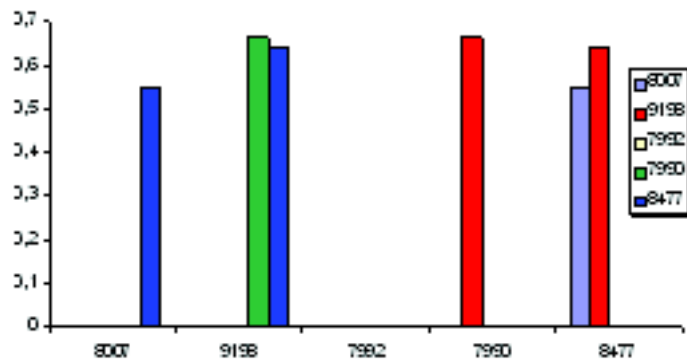
La population 7992 (BC1 des hybrides de Lusignant) est phénotypiquement plus proche de 8477 que de 7990. Cependant 7990 semble avoir quasiment la même distance vis-à-vis de l'ensemble des populations (issues des hybrides et des BC1).

La population 8477 est donc aussi éloignée de 7992 et 7990 que de 8007.

Tableau 14 : Récapitulatif des valeurs Dk calculées pour les différentes populations au marqueur B1C8

B1C8	8007	9198	7992	7990	8477
8007		NS*	NS	NS	0,545
9198			NS	0,663	0,639
7992				NS	NS
7990					NS
8477					

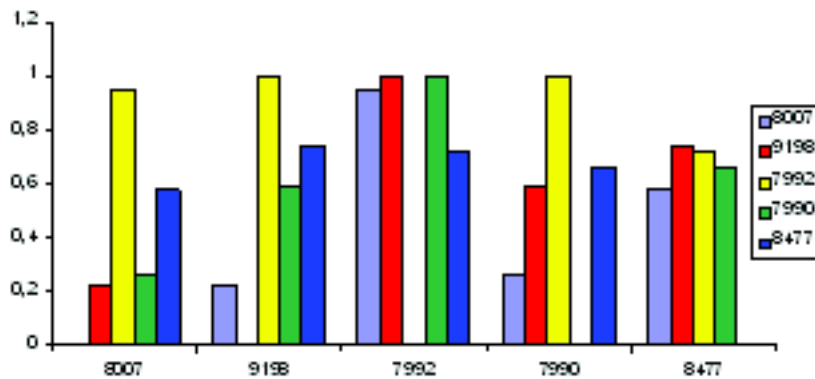
*Non significatif



Histogramme 8 : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur B1C8

Tableau 15: Récapitulatif des valeurs Dk calculées pour les différentes populations au marqueur B4D4

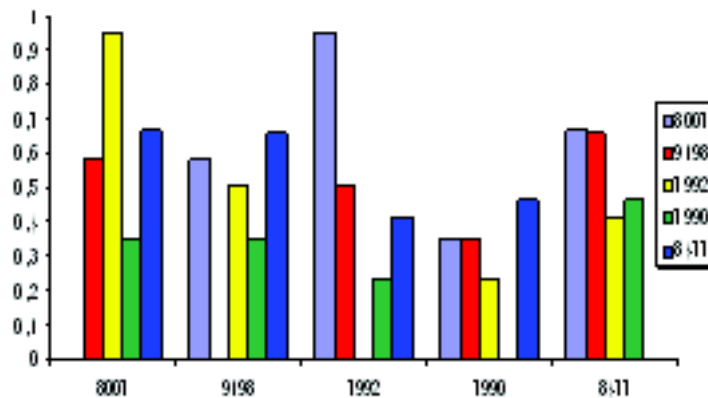
B4D4	8007	9198	7992	7990	8477
8007		0,228	0,949	0,257	0,579
9198			1	0,597	0,74
7992				1	0,721
7990					0,665
8477					



Histogramme 9 : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur B1D4

Tableau 16 : Récapitulatif des valeurs Dk Calculées pour les différentes populations au marqueur OSRB

OSRB	8007	9198	7992	7990	8477
8007		0,582	0,952	0,352	0,667
9198			0,503	0,345	0,657
7992				0,236	0,414
7990					0,464
8477					



Histogramme 10 : Comparaison des distances entre populations par leurs Dk au marqueur OSRB

Le nombre trop important de phénotypes révélés (pour les marqueurs OSRB, B4D7, B1C8) ne nous permet pas de pouvoir comparer les populations l'une à l'autre de façon détaillée sans biais. Autrement dit l'intégration de toute les bandes (l'ensemble de l'information) risque d'amplifier l'effet des artefacts de manipulation Licor et PCR.

L'ensemble des contraintes énumérées ci-dessus ne nous permet pas de tirer des conclusions précises mais juste avoir une vue d'ensemble de la diversité exprimée par les marqueurs OSRB, B4D7, B1C8.

On peut seulement dire que ces résultats ne contredisent pas les conclusions tirées à partir de B1B6.

III- 4 Etude de diversité à l'intérieur même de chaque population

Dans cette partie nous avons effectué un test d'ajustement de Kolmogrov sur les phénotypes obtenus dans chacune des populations et pour chaque marqueur. Ce qui revient à dire que nous avons voulu chercher l'existence de différences entre les effectifs de chaque phénotype (diversité intra population).

Le tableau 17 : résume les valeurs de Dk obtenus lorsque le test de Kolmogrov est significatif (voir le détail des calculs en annexe 10)

Tableau 17 : Résumé des valeurs de Dk obtenus lors du test d'ajustement de KS

	OSRB	B4D7	B1C8	B1B6
7990	NS	NS	NS	NS
7992	NS	NS	NS	NS
8007	NS	NS	NS	NS
8477	0,414	NS	0,483	NS
9198	NS	NS	NS	NS

A l'exception des deux valeurs Dk qui ont à peine atteint la significativité au seuil de 5% le reste du tableau montre une grande homogénéité à l'intérieur de chaque population.

Etant donné que le matériel génétique (populations étudiées) utilisé dans ce travail dérive des différents programmes de croisement sélection réalisés à la station INRA de

Lusignan, l'absence de significativité pour ce test démontre la fiabilité du schéma de sélection vis-à-vis de l'homogénéité variétale.

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus lors de nos travaux mettent en évidence l'utilité des marqueurs neutres comme les microsatellites pour l'étude d'un génome interspécifique.

Le recensement de marqueurs SSR cartographiés publiés a permis d'en sélectionner 29 potentiellement intéressants.

Lors du génotypage nous nous sommes heurtés à de grosses difficultés de lecture des gels (bandes miroirs, nombre trop faible d'allèles détectés à l'état hétérozygote). Afin de réduire ces artefacts, nous avons essayé d'améliorer la lisibilité des gels obtenus lors du screening en jouant sur la quantité d'ADN à amplifier.

Cependant, notre obligation à faire des lectures très précises, dictée par le fait que nous voulons comparer plusieurs populations apparentées, nous a forcé à n'exploiter que les informations délivrées par un pool restreint de marqueurs qui sont : OSRB, B4D7, B1C8, B1B6.

Le marqueur B1B6 présente la particularité de reconnaître spécifiquement des séquences fétuque ou ray-grass et les amplifie, ce qui le rend très informatif au niveau allélique.

L'étude des populations par leurs fréquences alléliques montre que chez les populations hybrides, la fréquence relative des allèles majeurs (grande fréquence) évoluent de façon relativement lente au regard des populations BC1, qui au contraire, ont des allèles qui évoluent de façon beaucoup plus prononcée.

Ces observations lors de l'étude des populations par leurs fréquences nous laissent établir certaines formulations quant à la structuration cytogénétique des populations :

La relative stabilité des hybrides correspondrait à une structure génomique se rapprochant de l'amphiploïdie stricte,

Alors que l'évolution plus prononcée chez les populations BC1 correspondrait à une structure allotétraploïde ou partiellement autoploïde où les appariements hétérologues seraient plus aisés (un chromosome fétuque en un seul exemplaire, ce qui permet des appariements homéologues et des introgressions progressives à chaque méiose).

De plus l'étude des fréquences aux deux allèles spécifiques (*a* et *c*) du marqueur B1B6 révèlent que les allèles fétuques se maintiennent et ne sont pas éliminés au cours des générations, alors que la pression de sélection se répercute sur la partie du génome d'origine ray-grass.

Les conclusions tirées de la comparaison des populations sur la base des fréquences alléliques au marqueur B1B6 et sur la base des phénotypes obtenus pour l'ensemble des marqueurs se rejoignent :

Les populations d'hybrides évoluent peu,

Alors que les populations BC1 semblent s'éloigner progressivement au fur et à mesure de leur avancée en génération.

L'étude de diversité intra-population a révélé une grande homogénéité à l'intérieur de chaque population.

Les marqueurs B1B6 et OSRB, B4D7, B1C8 nous ont permis d'avoir une idée plus ou moins précise de la structuration et de l'évolution du génome au niveau interspécifique. Cependant, la confirmation des informations délivrées par ces marqueurs devra être entreprise, d'une part, par une meilleure optimisation des conditions PCR lors du screening pour avoir des profils les plus propres possibles et, d'autre part, afin d'éviter les problèmes de correspondance d'allèles. Il faudra tout d'abord établir des plans de gels avec des individus parentaux comme témoins dans les plaques des populations à tester. Si le problème de correspondance persiste, cela voudra dire que le problème réside dans la qualité des ADN des différentes populations. Il faudra dans ce cas les réextraire.

De plus, il faudrait envisager d'effectuer des dilutions des amplifiats de PCR afin d'optimiser la qualité des profils obtenus.

L'étude des fréquences alléliques a permis de soulever certaines questions relatives aux populations étudiées et au programme de sélection dont elles sont issues.

En effet, nous constatons que chez les BC1, les effectifs efficaces n'excèdent jamais 4, ce qui revient à dire que la diversité, résultant de ces programmes de croisement, est équivalente à la diversité de 4 individus. Il devient donc évident que ces populations BC1 ne se prêtent pas du tout au type d'études que nous en avons fait.

Il serait, cependant, possible d'augmenter cette diversité tout en permettant aux fragments fétuques introgressées d'être fixés (homozygote au locus). Il faudrait pour cela entreprendre des croisements assistés par marqueurs spécifiques fétuques lors des croisements des BC1 existants avec du ray-grass.

La sélection subie par les populations étudiées a été très intense et cela dès les premiers polycross générés par le programme, ceci induit une baisse rapide de la diversité et une dérive génétique élevée.

La confirmation des résultats obtenus devra être aussi entreprise par un élargissement du panel de populations étudiées en considérant les populations intermédiaires à celles considérées dans notre étude. Ceci permettrait d'évaluer plus précisément l'effet de la sélection et de la dérive génétique.

A plus long terme, on devra déterminer des marqueurs liés à un caractère intéressant [marqueurs spécifiques fétuque liée à la pérennité, à la tolérance à la sécheresse...et parallèlement des marqueurs spécifiques ray-grass liés à la lignification (digestibilité) et à la valeur agronomique] : sélection assistée par marqueur.

La compréhension des mécanismes guidant l'évolution génétique des *Festulolium* permettra aussi de répondre à certaines questions relatives au couvert végétal interspécifique : relations entre évolution génétique et évolution de la valeur agronomique (valeur d'usage) en quantifiant les changements de composition génétique par rapport à la valeur adaptative du couvert.

Références bibliographiques

- Balfourier F., Charmet G., 1995** : Les ray-grass ou le genre *Lolium*. In Ressource génétiques des plantes fourragères à gazon ; Prosperit, Guy M. et Balfourier F. INRA BRG. Paris, pp.87-112.
- Bert PF., Charmet G., Sourdille P., Hayward MD., Balfourier F., 1999** : A high-density molecular map of raygrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. Theor.Appl.Genet. 99:445-452.
- Chen C., Sleper D.A., Johal G.S., 1998** : Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. Theor.Appl.Genet., 97 n1-2: 255-260.
- De Vienne D., Santoni S., 1998** : Les principales sources de marqueurs moléculaires. In Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. D.de Vienne ed. 130p.
- De Loose M., Van Laecke K., Depicker A., Van Bockstaele E., 1994**: Identification of ryegrass using DNA markers. 9th meeting of selection of biometrics in plant breeding. Eucarpia, Wageningen, Netherlands.
- Fujimori M., Hirata M., Sugita S., Inoue M., Cai H., Akiyama F., Mano Y., Komatsu T., 2000** : Development of a high density map in Italian raygrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using AFLP. In Proceeding of Molecular Breeding of Forage crop 2000 2nd International Symposium Victoria, Australia 52p.
- Gallais A. , 1990** :Théorie de la selection et amelioration des plantes. Masson ed. 369p
- Ghesquière M., Barre Ph., Marhadour S., Kerlan M.-C., 2000** : Estimation of introgression of isozymatic marker into tetraploide Italian rayegrass at early generations of backcross. Euphitica 114: 223-231.
- Ghesquière M., Mousset C., 2003** : *Festulolium* ; définitions et perspectives. Fourrage n.176.479-492.
- Ghesquière M., Jadas-hécart J., 1995** : Les fétuques ou le genre *Festuca*. Ressources génétiques des plantes fourragères à gazon .INRA BRG, Paris.53-70.
- Gillet M., 1980** : Les graminées fourragères. Gauthier-villars ed. 306 p.
- Hayward M.D., Mc Adam N.J., Jones J.G., Evans C., Evans GM., Forester J.W., Ustin A., Hossain K.G., Quader B., Stammers M., Will J.K., 1994 : Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. In Possibilités nouvelles offertes par les biotechnologies chez les plantes fourragères. Julier B., Ghesquière M. Fourrage (1996) 147, 273-292.
- Humphreys M.W., Honne B., 1995** : Potential for improved winterhardiness in regrass through hybridation with fescues. In proceeding of XIVth Eucarpia congress, Jyvaskyla, Finlande, pp.79.

- Humphreys MW., Pasakininskiene I., James AR., Thomas H., 1998** : Physically mapping quantitative traits stress-resistance in forage grass. *J.Exp.Bot.* 49 : 1611-1618.
- Inoue M., Gao Z., Hirata M., Fujimori M., Cai H., 2004** : Construction of a high density linkage map of Italian raygrass (*Lolium multiflorum* lam.) using RFLP, AFLP and TAS markers. In Toward markers assisted introgression from *Lolium sp.* to *Festuca arundiculata*. Yamada et al., 2004. 59-61. International workshop of grass genetics and breeding. April 2005, Poland.
- Jauhar P.P., 1975** : Génétique contrôle of diploide-like meiosis in hexaploide tall fescue. *Nature* n.254.595-597.
- Jauhar P.P., 1993** : Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex. Relevance to Breeding. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Vol. 18, Springer-Verlag, Berlin, pp.255
- King IP Morgan WG Harper J.A., Thomad H.M., 1999** : Introgression mapping in the grass. II meiotic analysis of the *Lolium perenne* / *Festuca pratensis* triploide hybride. *Heredity* 82.pp.107-112.
- Kopecky D. Cernoch V., Capkar., Dolezel J., 2005** : Preferential recombinaison among parental genomes in *Festulolium*. In international workshop of grass genetics and breeding. April 2005, Poland.
- Jensen L.B., Muylle H., Arsens P., Handersen C., Holm P.B., Ghesquière M., Julier B., Lubberstedt T., Nielsen K.K., De Riek J., Roldan-Ruiz I., Roulund N., Taylor C., Vosman B., Barre P., (communication personnel).
- Lehvaslaiho H., Saura A., Lokki J., 1987** : Chloroplast DNA variation in the grass tribe *Festuceae*. *Theor.Appl.Genet.*, 74: 298-302.
- Marhadours S., 1997** : Potentiel d'introgresion de la féтуque glaucescens dans le ray-grass d'Italie, marqueurs moléculaires et caracteres asocies a la perinnité. Rapport de stage DEA biologie et Agronomie, université de Renne I, ENSA, 26p.
- Marhadour S., 2001**: Introgression de la féтуque dans le ray-grass au niveau tétraploide ; approche morphogénétique et apports du marquage moléculaire. Thèse doctorat de Rennes. 126p.
- Saha M.C., Rouf Mian M.A ., Eujayl I., Zwonitzer J.C., Wang L., May G.D., 2004 a** : Tall fescue EST-SSR markers with transferabilitiy across several grass species. *Theor. Appl. Genet.* 104:526-532.
- Saha M.C., Rouf Mian M.A., Zwonitzer J.C., Chekhovskiy K., Hopkins A.A., 2004 **b** : An SSR- and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor. Appl. Genet.* (2005) 110: 323–336.
- Thomas H., Morgan HM., Meredith MR., Humphreys MW., 1994** : Identification of parental and recombined chromosomes of *Lolium multiflorum* X *Festuca prentensis* by genome in situ hybridation. *Theor.App.Genet.* 88:909-913.
- Thomas MH., Morgan WG., Humphreys MW., 2002** : Designing grass with a future-combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica* 133, pp.19-26.
- Toshihiko Y., Momotaz A., 2004**: Usefulness of simple sequence repeat (SSR) polymorphism for breeding programs in *Festulolium*. In Development of novel grass

with environmental stress tolerance and high forage quality through intergeneric hybridisation between *Lolium* and *Festuca*. Yamada T., and Takamizo T.ed.pp.43-47.

Warnke S.E., Barker R.E., Jung G., Sim S., Rouf Mian M.A., Saha M.C., Brillman L.A., Dupal M.P., Forester J.W., 2004 : Genetic linkage mapping of an annual × perennial ryegrass population . Theor. Appl. Genet. (2004) 109: 294–304.

Xu W., Sleper DA., Chao S., 1995:Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Shreb.) with RFLP markers. Theor.Appl.Genet.91, 947-955.

Zwierzykowski Z.2004: Amphiploid and introgression breeding within the *Lolium-Festuca* complex- achievements and perspectives. In Development of novel grass with environmental stress tolerance and high forage quality through intergeneric hybridisation between *Lolium* and *Festuca*. Yamada T., and Takamizo T.ed.pp.17-29.

ANNEXES

Pour voir les annexes cliquer sur le lien suivant :

http://cyberdoc.ina.dz/production/ina/2007/yekkour_a/pdfAmont/annexes.pdf