

REPUBLIQUE DU SENEGAL  
Un peuple - Un but - Une foi

CN0101593  
F319  
TAL

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



ÉCOLE NATIONALE DES CADRES RURAUX  
DE BAMBEY

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET  
DE L'ÉLEVAGE



ISRA - CNRA  
BAMBEY

INSTITUT SENEGALAIS DE  
RECHERCHE AGRICOLE  
ISRA/CNRA-BAMBEY

# MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'INGENIEUR  
DES TRAVAUX AGRICOLES (I.T.A)

**THEME**

**UTILISATION DES TECHNIQUES.  
D'INDUCTION DES MUTATIONS EN  
AMELIORATION DES PLANTES**

**THEME :**

Présenté et soutenu par :

**M. Ousseynou TALL**  
35<sup>ème</sup> PROMOTION

Tuteur de stage  
Ousmane NDOYE  
Sélectionneur  
CNRA - BAMBN

Maître de stage  
Fily DEMBELE  
Professeur à l'ENCR  
BAMBN

Novembre 2000

# DEDICACE

♣ Je remercie **Allah** le tout puissant qui m'a donné la force et le savoir de réaliser ce document,

Je dédie ce travail à:

♣ Mon père **Guilaye Tall** et ma mère **Daba Tall** qui se sont toujours sacrifiés a la réussite et au bonheur de leurs enfants et qui ont fait de moi aujourd'hui l'homme que je suis. Que Dieu leur prête encore une très longue vie de paix et de bonheur,

♣ Mes parents **Binta Diallo** et **Alassane Bâ** qui m'ont pris comme leur fils aîné, mais surtout par leur soutien moral inlassable durant toute la durée du mémoire. 14 travers eux, toute la famille Bâ sans oublier personne,

♣ Tous mes frères et soeurs,

♣ Tous mes camarades de la 35<sup>ème</sup> promo: **Hurbain Ntab; Guy Valentin Medang; Waly Ndour; Seinabou Diouf; Mamadou Wellé; F'rancinc; Alioune Sow No 1; Aly Senghor; Cheikh Sylla; Abdoul Bâ; Leyti Kâ; Joseph Coumba; Tacko Drame; Ahmed Idrissa Thioye; Ibrahima Thiame.....**,

♣ Mon ami, camarade et frère **Marne Niang**,

♣ Toute la 36<sup>ème</sup> et la 37<sup>ème</sup> promo et particulièrement **Lamine Diop**,

♣ **Ousseynou Bèye** le bibliothécaire de l' E.N.C.R et **Amadou Pouye** dit **Mouride** qui m'a soutenu pendant les phases les plus difficile>.

---

# REMERCIEMENTS

Au terme de ce mémoire qui a duré plus de trois mois de travail laborieux, nous tenons **particulièrement** à remercier certaines personnes qui de près ou de loin ont contribué à sa réussite:

♥Monsieur Ousmane Ndoye mon maître de stage pour sa disponibilité, son esprit d'ouverture mais surtout la pertinence de ses idées,

♥Monsieur Matar Hane pour sa disponibilité pour la saisie du document,

♥Monsieur Ameth Sy pour son encadrement technique, sa sociabilité et ses nombreux conseils. A travers lui, tous les travailleurs du département sélection arachide: Badara Tine, Saliou Niane, Idrissa Diouf, Gana Tine, Mbaye Fall, Pape Ngom, Aliou Faye,

♥Monsieur Abdou Ndiaye pour son esprit critique, sa disponibilité, et la pertinence de ses raisonnements,

♥Monsieur Ndiaga Cissé,

♥Mademoiselle Rosalie bibliothécaire au C.N.R.A de Bambey par sa compréhension, sa gentillesse et surtout sa disponibilité,

♥Monsieur Sidy Haïrou Camara Directeur de l' E.N.C.R,

♥Monsieur Fily Dembélé professeur à l'E.N.C.R/DPV pour tout l'effort consenti pour la réalisation de ce document; à travers lui tous les professeurs:

MS	Cheikh Mbacké Mboup	Saliou 'Diouf
	Mbodj	Kalidou Bâ
	Sow	Sène
	Makha Diakho	Dr Faye
	Tine	Dr Diop
	Babacar Faye	Kâne

# **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1:** Propriétés des radiations

**Tableau 2:** Les groupes de mutagènes chimiques

**Tableau 3:** Temps d'hydrolyse de certains agents alkylsants à un pH 7

---

## **LISTE DES ANNEXES';**

---

**Annexe 1:** Procédure d'amélioration par mutation in vitro

**Annexe 2:** Schéma expérimental d'une sélection par induction de mutations (in vivo)

**Annexe 3:** Effets des radiations et des mutagènes chimiques

**Annexe 4:** Pourcentage de germination des graines après irradiation

**Annexe 5:** Nombre de variétés obtenues par mutation de 1966 à 1989

---

# Résumé

Le progrès réalisé en amélioration des plantes repose sur l'exploitation **efficente** de la diversité biologique des plantes. Mais l'obtention et l'exploitation de cette diversité biologique nécessite parfois de longues années d'épreuves. Classiquement les hybridations manuelles entre variétés cultivées **ou** entre variétés cuhivées et variétés sauvages sont les principales sources qui génèrent la diversité biologique.

L'**induction des** mutations par des méthodes physiques ou chimiques constitue un raccourci pour l'**obtention** de la diversité **biologique** souhaitée par les **sélectionneurs**.

Le présent travail est essentiellement une compilation bibliographique qui passe en revue les différentes techniques utilisées en induction des mutations, il donne un aperçu global des **méthodes physiques** et **chimiques** et de leur applicabilité.

**Mots clés:** induction, mutation, hybridation, variété, diversité **efficente**, diversité biologique

# SOMMAIRE

Dédicace:

Remerciements

Résumé

Introduction..... “ “ ..... 1

**Chapitre 1: Les mutations-----2**

1-RAPPELS .....2

*I-1- Le chromosome ..... 3*

*I-2- Le gène..... 3*

*I-3-L'ADN..... ?*

**II- LES MUTATIONS ..... 3**

*II-1- Qu'est ce qu'une mutation ..... 3*

*II-2- Les différents types de mutations ..... 4*

*II-2- 1- Les mutations sommaires ..... 4*

*II-2-2..Les mutations germinales..... .5*

*II-2-2-1 ▪ Les mutations géniques..... 5*

*II-2-2-2- Les mutations chromosomiques ..... 6*

*II-2-2-2-1 Les remaniements..... 6*

*II-2-2-2-2 Les mutations numériques..... 8*

*II-2-2-2-3 Les mutations morphologiques..... 8*

*II-3- Classification..... 8*

**Chapitre II: Utilisation des techniques d'induction des mutations**

**I- Introduction ..... 12**

*II--Justification..... 12*

*III- Les méthodes d'induction des mutations..... 13*

*III-1 ▪ Méthode physique ..... 13*

*III-1-1 ▪ Agents physiques..... 13*

*III-1-1-1- Rayons-X..... 14*

III-1-1-2- Rayons-gamma.....	16
III-1-1-3- Les ultra-violets.....	10
III-1-1-4- Alpha et béta .....	17
III-1-1-5- Neutrons .....	17
III-1-2- Conditions de pré-traitement.. .....	17
III-1-3- Conditions de traitement .....	18
III-1-4- Conditions de post-traitement.....	20
III-1-5- sensibilité à la radiation des facteurs modificateurs.....	21
III-1-5-1 - Facteurs biologiques.....	21
III-1-5-2- Facteurs environnementaux .....	21
III-1-5-3- Facteurs chimiques .....	23
III-1-5-4-Type de matériel.....	4
III-2- Méthode chimique .....	28
III-2-1- Mutagènes chimiques .....	28
III-2-1-1- Agents alkylsants.....	28
III-2-1-2- Acide.....	28
III-2-1-3- Autres mutagènes chimiques .....	30
III-2-2- Conditions de traitement .....	31
III-2-2-1 - La dose.....	31
III-2-2-2- Les facteurs mitigeants .....	35
III-2-3- Conditions de post-traitement.....	37
III-2-4- Type de matériel traité avec les mutagènes chimiques.....	37
III-2-5- Objectifs et méthodes de traitement .....	38
III-2-6- Effets combinés des agents physiques et chimiques .....	39
<b>Chapitre III: Conclusion et recommandations-----</b>	<b>40</b>
Conclusion .....	40
Recommandations .....	41
Bibliographie .....	44

## Annexes

## Introduction

Depuis toujours, un certain nombre de transformations, héréditaires ou non **héréditaires** connues sous le nom de mutations étaient observées dans le monde végétal. Elles furent longtemps "ignorées" par l'homme qui n'y accordait aucune importance car ne percevant pas leur intérêt agronomique, Elles présentaient dans leur plus grand nombre des caractères délétères et soustractifs. Cependant, au cours des années, malgré la dégradation de l'environnement, les conditions climatiques sévères, le déficit hydrique, la pauvreté des sols et l'effet des **pathogènes**, seule une partie infime de ces plantes mutées présentait des performances satisfaisantes sur le rendement, la résistance, etc. . .

C'est en 1901 que la mutation fût introduite par De Vries, qui, observa régulièrement dans ses cultures d'*Oenothera lamarckiana*, l'apparition d'une forme géante qu'il baptisa "gigas" et qui, par la suite, s'avère être un mutant tétraploïde à  $4n=28$  chromosomes ( Génin, 1990).

Depuis lors, un certain nombre de recherches furent orientées dans ce sens avec une prolifération de mutants dans tous les domaines agricoles (maraîchage, horticulture, grande culture etc. . . ). Ceci était dû au fait que la mutation provoquée ne pouvait être dirigée et touchait aveuglément tout le matériel génétique. Cependant, avec les techniques de criblage, on assiste à une élimination des mutations non désirées.

Pour maintenir un niveau de production élevé qui pourrait satisfaire la demande des populations sans cesse croissante malgré la dégradation très poussée des facteurs climatiques; l'induction **des** mutations occupe à présent une place de choix dans l'amélioration des plantes Cette dernière fut longtemps assurée par l'hybridation qui seule **fut** insuffisante et plus ou moins lente car pouvant s'étaler sur plus d'une dizaine d'années.

**La mutagenèse** consiste soit à détecter les mutations naturelles, soit à provoquer des mutations par **diverses** méthodes physiques et chimiques.

Les méthodes physiques et chimiques faisant l'objet de notre étude, reviennent dans la plupart des cas à l'application des mutagènes tels que: les radiations (rayons-x, gamma, etc...), les produits chimiques (éthyle-méthane-sulfonate; éthylène-imine etc.. .) sur du matériel végétal (grain, semence, grain de pollen, plante.. .) dans certaines conditions.

L'objectif fondamental de la mutation induite est de déterminer comment on peut non seulement accélérer les mutations naturelles, mais encore les orienter vers celles qui intéressent l'agriculteur. Enfin elle permet d'obtenir des lignées homozygotes, en évitant des années de croisements consanguins ou d'autofécondation.

# PREMIERE PARTIE

## LES MUTATIONS

# 1 RAPPELS

## 1-1 Chromosome

Il est en forme de bâtonnet recourbé, anguleux et sphérique.

Le nombre de chromosomes **n** varie beaucoup et n'est pas obligatoirement **corrélé** avec le degré de l'évolution phylogénétique; **n** varie de 2 à 600 environ dans le monde végétal.

La longueur des chromosomes varie entre 0.2 et 50µm et le diamètre entre 0.2 et 2µm.

Suivant **leur structure** et leur fonctionnement, le chromosome est source de plusieurs types **de** mutations dans le monde végétal.

## 1-2 Gène

Il semble être des perles disposées côte à côte sur un fil.

Historiquement, le gène fût défini comme l'unité génétique ayant les propriétés suivantes:

- (i) A **chaque** gène on peut associer une fonction physiologique contribuant à réaliser le phénotype de l'individu.
- (ii) **Génétiquement** le gène est insécable, c'est à dire qu'un **crossing-over** ne peut intervenir qu'entre deux gènes.
- (iii) Le gène est l'unité de mutation.

Il comporte l'unité de fonction ou **cistron**, l'unité de mutation ou **muton**, et l'unité de recombinaison ou **recon**.

Le **muton** est l'unité de base de la mutation génétique représentée par un site **mutationnel**. Il est le plus petit élément **altérable** au sein de la structure unidimensionnelle des sites mutationnels du matériel génétique; lorsque le **muton** est altéré, il donne naissance à un organisme muté.

## 1-3 ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est composé de deux chaînes **polynucléotidiques** complémentaires, dont le maintien est assuré par des liaisons hydrogène qui **s'établissent** d'une chaîne à l'autre, transversalement entre une purine et une **pyrimide**, et plus précisément entre adénine et thymine d'une part, guanine et cytosine d'autre part.

Les monomères qui composent l'ADN sont des bases organiques azotées, l'adénine et la guanine (purines), la thymine et la cytosine (pyrimidines), un pentose, le désoxyribose, et l'acide phosphorique.

Il est le siège de l'information à travers la succession des bases dans les chaînes polynucléotidiques.

## 11 Les mutations

Elles sont toujours liées à un changement dans le matériel génétique (ADN).

Des mutations apparaissent spontanément mais avec une fréquence très faible. Elles sont de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  par génération, c'est à dire que parmi  $10^5$  à  $10^6$  gamètes, un seul sera muté pour un locus donné.

La mutation apparaît dès lors comme une modification dans la séquence des paires purini-pyrimidine d'une molécule d'ADN. Elle est l'une des sources de variabilité génétique dans une population. Elle peut être génétique (ou factorielle), suite à des modifications de la structure du gène et à la formation d'allèles nouveaux, ou chromosomique, impliquant des changements au niveau des chromosomes (fragmentation, translocation, inversion, délétion etc.. .) ou des chromosomes entiers.

Une mutation apparaît donc lorsque des nucléotides seront ajoutés, supprimés, remplacés par d'autres, inversés ou transposés vers de nouvelles positions. Cette dernière est augmentée par des rayons UV, les radiations ionisantes et par certains composés chimiques (mutagènes).

La première étape de l'induction des mutations consiste donc à choisir l'agent, la méthode et la dose de traitement appropriés par rapport au matériel végétal.

Pour les plantes à multiplication végétative; la première étape, après le traitement mutagénique des jeunes bourgeons ou des tiges d'un clone, consiste à multiplier ceux-ci végétativement pendant plusieurs générations et, simultanément, à sélectionner en fonction du mutant recherche et de la stabilité végétative; cette dernière peut nécessiter plusieurs générations après l'isolation des clones souhaités.

### 11-1 Qu'est ce qu'une mutation ?

Suivant la diversité de mutants observés dans le monde végétal, un certain nombre de définitions ont été formulées parmi les quelles on peut citer:

- (i) La mutation est un changement héréditaire ou non qui intervient au niveau de la plante.
- (ii) La mutation est tout changement **délectable** et héréditaire du matériel génétique, qui n'est causé ni par la ségrégation ni par la recombinaison génétique et qui est transmis aux cellules filles et même aux générations suivantes.
- (iii) Une mutation doit être n'importe quel changement qui affecte la constitution chimique ou physique, la mutabilité naturelle, le processus de duplication, les fonctions phénotypiques ou la recombinaison d'un, de plusieurs ou d'un grand nombre de nucléotides, ces lettres de l'alphabet **génétique**.
- (iv) Du point de vue moléculaire, les mutations sont des modifications **d'ADN** qui produisent des polypeptides et de là des phénotypes différents.

## 11-2 Les différents types de mutations

Les agents mutagènes ne sont pas discriminatoires et ils produisent un mélange complexe de mutations, de changements structuraux de chromosomes et d'aberrations non génétiques.

### 1.1-2-I Mutations somatiques

Ce sont des changements non héréditaires car n'affectant pas le patrimoine héréditaire. Elles sont souvent partielles sur la plante et se limitent aux cellules **somatiques** (somma = toute la plante sauf le contenu des fleurs ) concernées, siège de la mitose.

Ces changements intéressent qu'une partie végétative de la plante, ils n'affectent pas l'embryon, c'est une mutation gemmaire.

Ces changements disparaissent lors d'une multiplication par voie sexuée et sont maintenus quand il s'agit d'une multiplication végétative.

### 1 1-2-2 Mutations germinales

Ce sont des changements héréditaires car elles atteignent les cellules reproductrices. Elles peuvent être perpétuées tant par la multiplication végétative que sexuée et correspond à l'apparition d'individus nouveaux ou mutants.

Les changements intéressent l'embryon, c'est à dire qu'ils apparaissent après fécondation et se trouvent dans la descendance puisque fixés sur les chromosomes.

Les mutations germinales peuvent être dues soit à:

- \*une altération d'un gène
- \*une modification du nombre de chromosomes du noyau.

### XI -2-2-1 Mutations géniques

La mutation d'un gène affecte la capacité qu'ont les organismes à synthétiser des protéines, soit qu'ils produisent une protéine modifiée à un point tel qu'elle en devient plus ou moins inactive.

La forme mutante d'un gène correspond à une altération de la séquence nucléotidique de l'ADN. Elle est visible, si elle est dominante et ne se voit pas lorsqu'elle est récessive, ce qui fait que beaucoup de mutations intéressantes ont dû ainsi ne jamais être exploitées. Les mutations géniques ne sont pas décelables cytologiquement.

### 1 1-2-2-2 Mutations chromosomiques

Les chromosomes se caractérisent par l'information génétique qu'ils comportent, mais encore par la manière dont cette information est distribuée le long du chromosome. Ils ont une structure et une organisation précise qui ne peuvent être modifiée sans conséquences plus ou moins importantes.

Les mutations chromosomiques correspondent à la perte ou à l'addition de fragments chromosomiques, à l'échange des fragments entre chromosomes non homologues et à la duplication ou à l'inversion d'un segment chromosomique.

Les inversions et les translocations réciproques sont les deux types de modification structurelles les plus stables et les plus intéressantes. Ils ne modifient pas le stock génique et n'altèrent pas, en principe, le déroulement de la division cellulaire.

Les végétaux étant le plus souvent diploïdes ( $2n$  chromosomes), en cas de mutation chromosomique, les noyaux deviennent triploïdes ( $3n$  chromosomes), tétraploïdes ( $4n$  chromosomes) etc. . .

#### 11-2-2-2-1 Les remaniements

##### - Délétion

On parle de délétion lorsqu'un chromosome se brise. Son extrémité devient alors adhésive. Lors de la mitose des chromatides issues du chromosome brisé dédoublé adhèrent fortement les unes aux autres et restent ainsi au cours de la métaphase et de l'anaphase. Lors de la télophase, le chromatide bicentrométrique peut se briser à un endroit différent où la fusion chromatidienne s'était faite. Lors de la seconde division méiotique, le cycle fracture-fusion se répétant, toutes espèces de délétions et de duplications prennent ainsi naissance.

Une délétion ou déficience n'est pas nécessairement terminale; elle peut également correspondre à la perte d'un fragment moyen. Ceci est dû à deux cassures suivies d'un recollement des deux brins.

- Duplication

La duplication correspond à la présence au sein de doubles ou de multiples exemplaires d'un fragment chromosomique.

La présence d'un segment en dose triple dans un chromosome et en dose simple dans son homologue, résulte des modifications plus ou moins importantes de ce même segment présent en double dose dans chaque chromosome: c'est l'effet de position. Il consiste à un changement étant occasionné par une localisation modifiée de l'un de ces gènes par rapport aux autres gènes du génome.

- Inversion

Il s'agit d'une double cassure intervenue sur le même chromosome ou sur deux distincts suivie d'un recollement inverse.

A l'état homozygote, une inversion a pour première conséquence de bouleverser les distances entre gènes et de modifier la carte chromosomique.

A l'état hétérozygote, le premier effet est de diminuer considérablement le nombre de recombinaisons dans les segments inversés.

L'inversion modifie la séquence des bases et, par conséquent, la nature de l'information génétique que comporte la structure.

- Translocation

Lorsqu'un segment chromosomique se fixe, après rupture, à un chromosome non homologue; on parle de translocation. Lorsque deux chromosomes non homologues échangent des segments, alors dans ce cas on parle de translocation réciproque.

Les **translocations** impliquent surtout des bouleversements de la carte chromosomique à l'état homozygote et sont génératrices de semi-stérilité à l'état hétérozygote.

#### 11-2-2-2-2 Mutations numériques

A la suite de mitose ou de méiose irrégulières, il peut se produire des pertes ou des gains de chromosomes, très comparable aux délétions et aux duplications induisant les mutants polysomiques.

Les mutations peuvent donc porter:

- sur la structure élémentaire du matériel génétique (mutations génétiques)
- sur sa distribution dans le chromosome (mutations de structure)
- ou sur le nombre de chromosomes (mutations numériques)

#### 1 1-12-2-2-3 Mutations morphologiques

Ce sont les mutations visibles “curiosités horticoles”.

Les mutations somatiques (ou gemmaire) relatives aux caractères morphologiques jouent un rôle assez faible, en ce qui concerne la culture des plantes clonales, arbustives par exemple; la plupart n'intéresse que des portions de tissus infimes et ne jouant aucun rôle dans la programmation.

### 11-3 Classification

#### **\*Taille**

A/ Mutation ponctuelle: modification d'un très court segment d'ADN (un nucléotide ou une paire de bases)

B/ Grande mutation: la modification porte sur plus d'une paire de bases et peut impliquer un gène dans sa totalité voire un chromosome ou un lot de chromosomes

### **\*Qualité**

A/ Modification de la structure: changement du contenu en bases du gène

1/ Substitution: un nucléotide est remplacé par un autre .

(a) Transition: une purine remplace une purine, une pyrimidine une pyrimidine.

(b) Transversion: une purine remplace une pyrimidine ou réciproquement.

2/ Délétion: perte d'une partie du gène

3/ Insertion: addition de nucléotides supplémentaires

B/ Réarrangement: le locus d'un gène est modifié; on observe un "effet de position" dans la plupart des cas.

1/ Deux mutations affectant un même gène auront, chez un diploïde, des effets différents selon qu'elles seront en position cis ou **trans**.

2/ Si deux chromosomes homologues ne portent pas le même nombre de copies d'un même gène, on peut s'attendre à des changements du phénotype.

3/ Si le locus d'un gène est changé et surtout s'il est transféré près d'hétérochromatine, on pourra observer de nouveaux phénotypes.

### **\*Origine**

A/ Mutation spontanée: origine inconnue

B/ Contrôle génétique de l'aptitude à muter: nous avons que les gènes mutateurs modifient l'aptitude à muter d'autres gènes. Selon les cas ils affectent un ou plusieurs **loci**.

C/ Mutations induites (par exposition d'un organisme à des agents mutagènes).

1/ Radiations ionisantes: qu'il s'agisse de protons, neutrons rayonnements alpha, bêta, gamma, ou X, ils peuvent modifier la valence d'atomes ou de radicaux.

2/ Radiations non ionisantes: augmentent le niveau d'énergie des atomes donc leurs possibilités **réactionnelles**; les UV produisent des dimères de thymine à partir de nucléotides voisins sur un même brin **d'ADN**.

### 3/ Mutagènes chimiques

(a) Erreur de réplication: des analogues de bases, comme l'acridine, en s'intercalant entre deux nucléotides voisins, peuvent induire des additions ou des délétions d'une base a la réplication.

(b) Attaque directe du gène: c'est le cas de l'acide nitreux qui, en l'absence de toute réplication, **déamine** l'adénine en hypoxanthine et la cytosine en **uracile**.

#### **\*Amplitude de l'effet phénotypique**

A/ Changement du taux de mutation

B/ **Isoallèles**: ne peuvent être différenciés par les phénotypes qu'ils réalisent.

C/ Mutants affectant la viabilité: la viabilité relative, par comparaison avec la souche sauvage, peut aller de 0 à 100 %. Si elle est de 0 % on dit qu'il y a létalité.

#### **\*Sens**

A/ On distingue la mutation originelle qui d'un type sauvage, donne un mutant, de la réversion, qui d'un mutant redonne un sauvage.

B/ Parmi les réversions on distingue:

1/ Les réversions vraies: c'est le même site qui mute

(**exemple**: adénine ----- guanine -----(mutation reverse)----- adénine)

2/ **Les suppressions**: la réversion n'est que phénotypique, en fait une seconde mutation est survenue en un autre site, la combinaison des deux mutations produisant un **phénotype** sauvage.

(a) **Suppresseur extragénique**: la seconde mutation porte sur un autre gène que la première.

(b) **Suppresseur intragénique**: les deux mutations portent sur le même gène mais à des endroits différents; par exemple la délétion d'une base intervenant à proximité de l'addition d'une autre base peut avoir un effet supprimeur.

(c) **Les séparations**: c'est le cas de la photoréactivation qui permet l'excision des dimères de thymine par un complexe enzymatique spécifique en présence de lumière.

**\*Cellules affectées**

A/ Cellule somatique: par suite du développement de l'organisme, celui-ci présentera un secteur mutant (mosaïque ou chimère)

B/ Cellule germinale: l'individu sera apparemment sain mais pourra transmettre la mutation à sa descendance.

# DEUXIEME PARTIE

UTILISATION DES TECHNIQUES  
D'INDUCTION DES MUTATIONS

## 1- Introduction

Un **mutagène** est tout agent physique ou chimique qui augmente **significativement** les cas mutationnels et la proportion de mutations au dessus du niveau **spontané** dans le passé (Rieger et Al , , 1976).

L'utilité de tout **mutagène** en amélioration des plantes dépend non seulement de l'efficacité mutagénique, de la relation entre la fréquence de mutation et la dose, mais aussi de l'efficacité mutagénique, et de la production de changements désirables libres sans association avec les changements non désirés (Konzak et Al , 1965). Cette proportion peut être altérée par la variation des facteurs modificateurs.

## 11 Justification

Le monde végétal est constitué de plantes à reproduction sexuée et des plantes à **reproduction** asexuée ou végétative. Parmi les plantes à reproduction sexuée, certaines sont allogames (fécondation croisée) et d'autres autogames (autofécondation).

Suivant l'action des éléments de la nature (vent, eau, etc...), et celle des animaux, on note une **grande** hétérogénéité et une diversité très large au sein des espèces allogames. Ceci permet **l'émergence** de nouvelles espèces présentant des caractères agronomiques intéressants, de nouvelles performances et surtout une adaptabilité aux conditions environnementales.

Cependant chez les plantes autogames, on note une homogénéité au sein de la population due au mode de reproduction. Elles sont constituées dans leur majeure partie de plantes annuelles (arachide, riz, blé, orge etc...), base de l'alimentation dans le monde entier. Au cours du temps, **avec** la dégradation des conditions climatiques, on observe au sein de cette population des modifications (foliaires, **caulinaires**, racinaires.. . .) d'adaptabilité à ces nouvelles conditions. Elles présentaient, pour une infime partie, des intérêts agronomiques (rendement, couleur des fruits, **résistance** ) malgré ces conditions sévères.

L'hybridation, étant toujours la principale source de variabilité génétique dans les plantes, voit son application plus ou moins difficile et lente chez les grandes cultures qui sont conduites une fois par an.

La mutation est l'une des sources de variation génétique dans une population.

La majeure partie des variétés produites par mutagenèse appartient à des plantes annuelles autogames.

Les principaux caractères améliorés sont surtout des modifications de la morphologie de la plante (réduction de la taille), la précocité, la résistance aux maladies, la production, la qualité du produit.

Les plantes à reproduction végétative (tubercule, bulbe, stolon, rhizome) dont la source de variabilité était essentiellement constituée de greffage, de marcottage, etc...voit au sein de sa population une légère variation génétique durant des années, Cependant, dans le souci d'une diversification et d'une amélioration de ces espèces végétales, la mutation a permis une explosion de l'ensemble des caractères récessifs au sein de ces populations présentant des intérêts agronomiques. Avec l'opération du criblage et la multiplication, on assiste à une prolifération de nouvelles variétés adaptées aux différentes conditions pédoclimatiques et l'amélioration de certains caractères présentant des déficiences.

En résumé, on peut dire que la mutation a été introduite comme source de variabilité génétique à côté de l'hybridation surtout pour les plantes autogames.

## 111- Les méthodes d'induction des mutations

### 111-I Méthode physique

#### 11 1-1-1 Agents physiques

Les radiations ionisantes: rayons X, alpha, béta, gamma produits par des substances radioactives, protons, neutrons, induisent des mutations de différents types. Ces

mutations peuvent être de simples mutations géniques généralement récessives mais peuvent également être des mutations de structure chromosomique généralement létales.

Le végétal peut être irradié soit de l'extérieur par les rayonnements soit de l'intérieur à l'aide d'un radioisotope qui, souvent, agit de plus comme substance métabolique (phosphore, soufre).

\* Les rayonnements peuvent être électromagnétiques (cas des rayons X ou des rayons gamma) ou corpusculaires (rayon alpha, bêta, neutrons, protons).

\* Les neutrons provoquent davantage de mutations chromosomiques que les autres rayonnements. Les résultats sont réguliers et peu dépendants du milieu, avec des effets retardés réduits.

\* Les rayons alpha et bêta, sont peu utilisés en radiogénétique par suite de leur pouvoir de pénétration faible. Leur dosimétrie in vivo est incontrôlable.

\* Les rayons X et gamma sont très utilisés car leur pouvoir de pénétration est grand. Par contre, le milieu ambiant a une grande influence sur leur action, Chaque type de radiation diffère de l'autre par son origine et la variété de ses propriétés physiques.

La dissipation d'énergie dans un tissu quelconque, entraîne, soit l'excitation, soit l'ionisation des molécules constituant ce tissu.

Les ionisations ont une densité variable sur leur parcours et suivant le type de rayonnement; ainsi pour une énergie initiale de 3 Mev les rayons alpha provoquent en moyenne 40000 ionisations par centimètre dans l'air, contre 50 seulement pour les rayons bêta (Pelegriin, 1963). (Tableau 1).

#### 11 1-1-1-1 Rayons X

Les rayons X sont des radiations électromagnétiques créées par des électrons accélérés de manière électrique dans une pompe, puis en les desserrant, on les fait heurter une cible qui est généralement du molybdène ou du tungstène. L'arrêt abrupt de ces électrons permet l'émission de la radiation sous forme de photons, Les photons fournissent l'énergie nécessaire qui permet les changements au niveau moléculaire de la cellule (Fehr, 1939).

Le traitement peut se faire avec une machine à rayon X capable de produire des radiations avec des longueurs d'onde désirées. Les rayons X à courte longueur d'onde ont une plus grande pénétration mais avec un potentiel de créer des changements moléculaires inférieurs à celui des rayons X à longue longueur d'onde.

#### Propriétés des radiations

Types de radiation	Sources	Description	Energie	Hasard	Pénétration dans les tissus
<b>Ultra-violet (UV)</b>	lampe à mercure à basse pression	électromagnétique (élec), non ionisante	quelques ev	pas hasardeux	fraction de mm
Rayon X	machine à rayon X	(élec), ionisation faible	généralement 50 à 300 Kev	dangereux, <b>pénétrant</b>	quelques mm à plusieurs cm
Rayon gamma	radioisotope et réacteur nucléaire	(élec) ionisation faible	jusqu'à quelques Mev	dangereux, très pénétrant	plusieurs cm
Neutron ( <b>rapide</b> et terminal)	réacteur nucléaire, accélérateur	particule nucléaire non chargée ionisation forte	moins de 1 ev à plusieurs Mev	très hasardeux	plusieurs cm
<b>Particule beta</b> , électron rapide	radioisotope ou accélérateur	corpuseculaire ionisation forte	jusqu'à quelques Mev	pourrait être dangereux	jusqu'à quelques mm
Particule alpha	radioisotope	noyau hélium ionisation forte	2-9Mev	très dangereux intérieurement	fraction de mm
<b>Proton ou</b>	réacteur nucléaire, accélérateur	noyaux de $^1_1\text{H}$ , $^2_1\text{H}$ , ionisation forte	jusqu'à quelques Gev	très hasardeux	jusqu'à plusieurs cm

Source : Manual on mutation breeding, 1977

### 111-1-1-2 Rayons gamma

Les rayons gamma sont des radiations **électromagnétiques** qui sont produites avec l'utilisation des radio isotopes et des réacteurs nucléaires.

Les deux principales sources des rayons gamma sont le Cobalt 60 ( $^{60}\text{Co}$ ) et le Césium 137 ( $^{137}\text{Cs}$ ).

Les radio isotopes sont dangereux et leur pouvoir de pénétration est très élevé, ils sont conservés dans des emballages en plomb et déplacés grâce à un système de télécommande pour irradier le matériel.

Le traitement peut se faire soit en doses singulières, ou les plantes peuvent être exposées **continuellement** aux radiations gamma pour une longue période. La distance entre le matériel à **irradier** et la source de traitement détermine le niveau de traitement (Fehr, 1939).

### 111-1-1-3 Les ultra-violets

Les radiations ultraviolettes sont utilisées en premier lieu pour traiter des grains de pollen à cause de leur faible capacité de pénétration des tissus. Les longueurs d'onde entre 2500 et 2900 nm sont plus efficaces, parce que les acides nucléiques ont un maximum d'absorption dans cet intervalle.

Le dispositif n'est pas onéreux, cependant certains problèmes sont à tenir en compte:

- (i) La **pénétration** est faible, un seul grain de pollen peut arrêter 50 % de l'efficacité des UV.
- (ii) L'effet pourrait être inversé, réparé, par exposition à la lumière visible. L'obscurité doit être maintenue jusqu'à la fixation et la possibilité de mutation.
- (iii) Les UV pourront endommager la peau **et/ou** les yeux.

L'énergie des radiations ultraviolettes est absorbée principalement au niveau des pyrimidines de l'ADN. Il en résulte des phénomènes d'excitation des électrons aboutissant à une modification du type de liaison.

#### 11 1-1-1-4 Alpha et Béta

Les électrons béta sont des particules chargées négativement qui sont émises par des radio isotopes, tels que Phosphore 32 ( $^{32}\text{P}$ ) et le Carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ).

La plante peut être exposée aux radio-isotopes directement ou en solution.

Les rayons alpha et béta ne peuvent pénétrer le matériel épais et ne sont utilisés que sur le matériel génétique.

Le tritium ( $^3\text{H}$ ) et le carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) peuvent être introduits dans la molécule d'ADN, mais leurs effets mutagéniques sont pessimistes.

#### 11 1-1-1-5 Neutrons

Les neutrons utilisés pour la mutagénèse sont le produit d'une fission nucléaire de l'uranium 235 ( $^{235}\text{U}$ ) dans un réacteur atomique. Ils sont produits à forte quantité. Les neutrons rapides sont ceux qui ont un niveau d'énergie élevé, comme ceux émis du réacteur

Les neutrons terminales contenant un niveau plus bas d'énergie sont produits par une réduction de l'énergie des neutrons rapides.

Cette méthode n'est pas encore largement utilisée dans les cultures, elle est onéreuse et les doses d'absorption ne sont pas faciles à mesurer.

#### 11 1-1-2 Conditions de pré-traitement

La réussite de la mutagénèse relève en grande partie d'un certain nombre de conditions préliminaires. L'ajustement de la teneur en eau à un niveau désiré, s'avère être très important pour l'irradiation des graines et leur traitement aux produits chimiques.

Le trempage des graines dans de l'eau est une pratique habituelle de pré-traitement lors de l'utilisation des mutagènes chimiques. Il permet ainsi de drainer l'ensemble des substances

solubles à l'eau et hydrate la membrane cellulaire et les macromolécules. L'eau devra être changée toutes les 15 à 20 minutes pour empêcher l'accumulation des produits d'hydrolyse. La température étant adéquate pour une bonne germination, le trempage peut initier le métabolisme et la synthèse de l'ADN. Ce phénomène peut être évité en submergeant les graines dans de l'eau à 0° C.

La température de l'eau et la durée de trempage adéquates pourront être déterminées par des expérimentations dans lesquelles, les graines trempées à différentes températures et durées inégales seront exposées à une dose unique de mutagène. Le pourcentage de la germination et la croissance des plantules pourront identifier le traitement le plus approprié.

### 1 11-1-3 Conditions de traitement

L'utilisation des radiations dans l'induction des mutations chez les plantes, nécessite la connaissance d'un certain nombre de paramètres et de précautions à considérer pour une bonne application.

#### \*Installations expérimentales

- (i) Choisir et aménager un champ d'irradiation
- (ii) Installation de l'appareil (exemple bombe à cobalt)
- (iii) **Approvisionnement** en eau pour l'irrigation
- (iv) 'Transport en quantité du type de sable prédominant dans la région concernée à hauteur de 50 cm (le champ d'irradiation doit avoir le même sol que les principales régions agricoles du pays concerné)
- (v) Aménager sur du sol pur
- (vi) Porter l'angle d'irradiation de 90° à environ 130°, de manière à obtenir une plus grande surface d'irradiation.

### \*Dose

L'obtention de mutants désirables en grande quantité et leur bonne multiplication dépend en grande partie de la dose d'irradiation et de son homogénéité sur l'ensemble du matériel biologique.

La dose ou l'exposition pourrait être définie comme la quantité d'énergie absorbée par la masse de substances irradiées.

La dose approximative est déterminée par un certain nombre d'expérimentations. L'objectif général lors d'un traitement du matériel utilisé est d'avoir 50 % de réussite, produisant des plants et de; graines viables. La voie la plus efficace pour déterminer cette dose létale ( $LD_{50}$ ) est de traiter les cultivars intéressés avec des doses variables dans des conditions spécifiques de température et d'humidité. Le développement des plants se fera dans un environnement similaire à celui où le traitement sera accompli, La dose létale ( $LD_{50}$ ) sera ensuite estimée à partir d'un comptage des survivants par rapport à une germination standard. Cependant~ pour rsduire au strict minimum les effets néfastes des irradiations aiguë et chroniques ou récurrentes, lors des multiplications pratiques, il est important de connaître l'exposition ou la dose à une certaine distance de la source radioactive.

**L'unité est le radian ou le gray (Gy):  $1 \text{ rad} = 10^2 \text{ erg/g} = 10^{-2} \text{ joule/kg}$**

$$1 \text{ Gy} = 10^2 \text{ rad}$$

### \*Irradiation aiguë et chronique

L'irradiation chronique est l'exposition du matériel végétal aux radiations pendant une très longue période (jours, mois), alors que l'irradiation aiguë revient à une exposition de ce même matériel durant une courte période (secondes, heures).

La comparaison de ces deux irradiations revient simplement à comparer les fortes et faibles doses.

L'irradiation aiguë entraîne généralement une fréquence élevée de mutations, une plus sévère inhibition du développement, et une fertilité très faible.

Pour l'irradiation chronique, le **mutagène** sera additif au cours du temps, et aboutit presque au **même résultat** que le premier. Il n'y a donc pas de différence significative entre ces deux pratiques.

#### \*Radiation récurrente

Elle consiste à irradier les générations ultérieures pour l'obtention d'une plus **grande variabilité** génétique par rapport au traitement unique dans les programmes de multiplication (Freisleben et **Lein**, 1944).

**Khadr et Frey** (1965) rapportent que les populations d'avoine développées par les irradiations **récurrentes** avec des neutrons terminales montrent une variabilité très étendue pour les traits **quantitatifs** par rapport à l'original ou le pédigrée; mais le second cycle d'irradiation n'a pas **génééré de** variabilité comme le premier traitement. Il n' y a pas de changements significatifs au sein des générations ultérieures issue de ces ré-irradiations.

**S varascia-Mugnozza et Monti** (1966) concluent après sept générations de traitement récurrent du blé avec les rayons X et de l'éthylène imine, que l'augmentation de la fréquence de mutation apparaît très faible pour compenser le dur travail qui y était consacré.

#### Il 1-3-4 Conditions de post-traitement

Les manipulations avant les semis peuvent, **d'une** manière très marquée, **influencer** le pourcentage de survivants des plantules. Les graines traitées avec des rayons **X**, gamma, ou les neutrons rapides ne pourront être accumulées plus de quelques semaines.

L'oxygène, (constituant un élément défavorable pour la conservation, son élimination pourra se faire soit, en maintenant la teneur en eau de la graine très élevée ou en la plaçant dans un endroit **sans** oxygène.

La conservation à long terme ne peut se faire qu'au moins sous une température de 0°C. Cependant, si les graines sont destinées à une utilisation dans le cours terme, la température du laboratoire pourra être utilisée.

### 11.1-1-5 Sensibilité à la radiation des facteurs modificateurs

L'induction des mutations dans les cellules et les plantes supérieures peut être modifiée par un certain nombre de facteurs biologiques, environnementaux, et chimiques. Ces facteurs altèrent l'efficacité et l'efficacité des radiations et dépendent des propriétés spécifiques, du type de radiation et du matériel biologique utilisé.

#### 1.: 1-1-5-1 Les facteurs biologiques

La radiosensitivité d'une espèce est caractérisée par la grandeur et le nombre des cibles génétiques et la longueur moyenne du cycle mitotique.

Les principaux facteurs biologiques sont le volume nucléaire (VN), le volume des chromosomes à l'interphase (VCI) et le contenu de l'ADN. Les analyses statistiques révèlent dans tous les cas étudiés que le VCI est le meilleur indice de radiosensitivité que le VN. Ces rapports permettent une prédiction juste de 50 % de dose létale (LD<sub>50</sub>) pour un grand nombre de plants.

Conger et Al. (1972) montrent que la radiosensitivité des graines relatée par le VCI et le VN ne se manifeste que lorsque les effets de l'oxygène sont éliminés.

Les différences variétales et génétiques en radiosensitivité peuvent être relativement grands (Brunner, 1977) et pourront être dues par des facteurs sévères, sans être relatée par le VN et le VCI. Les différences intraspécifiques en radiosensitivité sont d'habitude plus petites qu'entre les espèces.

#### 1 | 1-1-5-2 Les facteurs environnementaux

### \*Oxygène

L'oxygène est un facteur mitigeant majeur dans la réponse radiobiologique des faibles radiations. Les effets de l'oxygène sont intimement liés aux effets indirects des radiations. Cependant, force est de constater que les facteurs environnementaux sont moins importants avec les fortes radiations semblables aux neutrons.

Les résultats expérimentaux peuvent être résumés comme suit:

- (i) La sensibilité des systèmes biologiques aux faibles radiations augmentent lorsque des doses identiques sont appliquées à l'oxygène comparé aux conditions anoxiques. La relation se confirme avec l'induction des aberrations chromosomiques, les mutations géniques et la létalité (Swanson et Johnston, 1955). En général, une plus grande efficacité mutagénique peut être obtenue si les effets de l'oxygène sont minimisés.
- (ii) Seul l'oxygène présent pendant l'irradiation a des effets sur les cibles biologiques traitées.

Cependant, toute variation de la tension d'oxygène durant le traitement est accompagnée de **changements** quantitatifs correspondant à la réponse radiobiologique (Kirby-Smith et Dolphin, 1958).

Les effets de l'oxygène peuvent être testés en irradiant les graines dans un milieu anoxique ou en ajustant la teneur en eau de la graine jusqu'à 12-14 %.

### \*La teneur en eau

Elle est le deuxième facteur le plus important influençant les radiations. La sensibilité du matériel utilisé aux radiations dépend en grande partie des fluctuations de leur teneur en eau. De ce fait, les graines extrêmement sèches sont plus radiosensitives. Cependant, l'irradiation des graines à forte teneur en eau augmente la radiosensibilité primitivement à travers l'**initiation** de l'activité métabolique.

L'eau contenue dans la graine est tout simplement estimée à l'eau contenue dans l'embryon, qui constitue la région critique. Ainsi, les mesures effectuées précédemment pour équilibrer la teneur en eau de la graine pour l'irradiation apparaissent indispensables pour obtenir de bons résultats. Exemple: lors d'un traitement aux rayons-X, les doses de 15 et 20 KR sont létales pour l'irradiation des graines dont les teneurs en eau sont de 6.6 ou 21.4 % (Mutation in plant Breeding, 1966.). Cependant, si ces dernières sont traitées avec des neutrons rapides, la mesure des teneurs en oxygène et d'eau devient d'une importance mineure.

L'effet de l'oxygène disparaît quand la teneur en eau de la graine atteint 10 % (Conger et Constantin, 1974).

#### \*La température

Les températures d'avant, durant et d'après traitement pourraient être des facteurs modificateurs très importants pour les résultats escomptés.

L'augmentation de la température s'accompagne d'une diminution de la teneur de l'oxygène et vice versa. Généralement, les traitements se font sous une température de  $24^{\pm}1^{\circ}$  C. Le traitement à la chaleur à  $60^{\circ}$  C immédiatement après l'irradiation des graines entraînent, une réduction chez de jeunes plants en Mi, des lésions et des aberrations chromosomiques, sans pour autant qu'il ait une diminution de la fréquence de mutation (Khostova, 1966).

Il a été conclu que pour ces facteurs modificateurs, la fréquence maximale de mutation issue de l'application de ces facteurs, ne peut être supérieure à celle issue d'un simple rayonnement du matériel à l'air libre.

#### 11 1-1-5-3 Les facteurs chimiques

Ce groupe comprend des substances qui pourront être présentes durant l'irradiation faisant l'objet de protection ou de sensibilité à l'action des radiations .

#### \*Les agents protecteurs

Ils constituent les bases du mécanisme de la protection. Suivant leur mode d'action, ces agents protecteurs pourraient être scindés en plusieurs catégories:

(i) Agents **éducteurs**, ils influencent la tension de l'oxygène dans les cellules et affectent l'oxygène dépendant, entraînant des dommages dus aux radiations.

(ii) Des composés chimiques lesquels combinés aux importantes molécules biologiques augmentent ainsi leur radiorésistance.

(iii) Certaines substances peuvent se comporter comme des pièges pour les radicaux libres; leur effet radio-protecteur est dû à un potentiel d'oxydation très élevé comparé à celui aussi important de la biologie moléculaire.

(iv) Les agents qui entraînent un mécanisme de séparation, ce qui réduit les dégâts primaires.

Le **degré** de protection n'excède pas d'habitude la différence entre les effets des radiations sur le traitement avec l'oxygène et le traitement sans oxygène.

Les effets de la radioprotection sont absents lorsque les graines sont traitées avec une forte radiation.

#### \*Agents de sensibilité

Contrairement aux agents protecteurs, les agents de sensibilité peuvent augmenter les effets des radiations au niveau des cellules. Certains métaux lourds comme le manganèse (Mn), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) pourront augmenter considérablement l'**efficacité** mutagénique des radiations sur les cibles biologiques traitées. Cette sensibilité peut être due soit à une augmentation de l'absorption des photons, par de la un accroissement de la dose absorbée, soit à travers une action des métaux sous l'effet de l'oxygène.

#### 11 I-1-5-4 Type de matériel

Des parties de plantes ou des plantes entières peuvent être soumises aux radiations ionisantes .

### \*La graine

La graine est le matériel le plus utilisé pour l'irradiation et le traitement chimique pour les espèces à reproduction sexuée. Les graines sont généralement préférées parce qu'elles tolèrent les effets des conditions environnementales externes et certaines applications telles que le séchage, le trempage, le chauffage, mais aussi la variation de la teneur de l'oxygène ou d'un autre gaz dans son milieu de stockage, sans être réellement affectée dans la réponse biologique.

L'irradiation des graines est essentiellement un traitement de l'embryon méristème. L'anatomie et le développement de l'embryon des graines expliquent cette diversité considérable sur les différentes fonctions et espèces (Osborne et Lunden, 1965).

La partie contenant la mutation est fréquemment rapportée comme un secteur de mutation.

Cependant, du traitement des graines peut résulter des chimères dans n'importe quelle partie de la plante, **différent** génétiquement de l'autre partie.

### \*Le grain de pollen

Le grain de pollen peut être traité avec des radiations ou des mutagènes chimiques. Il est la seule partie de la plante qui peut être traitée avec succès par les radiations **ultraviolettes (UV)**.

L'irradiation des grains de pollen conduit à une altération : (i) de la germination du pollen, (ii) de la formation du sperme et de la pénétration du tube dans l'ovule, (iii) de la formation du **zygote** et croissance de l'embryon, (iv) du développement de l'endosperme et (v) de la viabilité des graines matures et des jeunes plants.

Fréquemment, la formation du tube **pollinique** n'est pas perturbée au delà de 5000 Gy de radiation aux rayons gamma cependant, la formation des graines sera inhibée par les doses faibles (entre 30-200 Gy). La formation des **fruits** n'est principalement pas **affectée** en dessous

de 500 Gy et la viabilité des graines diminue exponentiellement avec la dose. La dose de réduction de 50 % des graines pour plusieurs espèces se trouve entre 20 et 100 Gy.

Les aberrations morphologiques en Mi sont diverses, la senti-stérilité est commune et les dilétions létales conduites dans l'embryon ou les mortalités des plantules ont lieu **fréquemment**.

Le traitement des grains de pollen permettra le développement de zygotes ou de plants **hétérozygotes** pour plusieurs changements génétiques survenus dans le pollen. Cependant, pour le pollen traité il est difficile d'obtenir une bonne viabilité des pollens et leur maintien pour quelques espèces.

**Indépendamment** de tout matériel irradié, la plus grande fréquence de mutation est obtenue à 40 à 50 % de réduction de la fertilité.

#### \*Les organes végétatifs

La structure des régions méristématiques et la formation de nouveaux méristèmes issus de la différenciation des tissus est particulièrement important dans la radiation des organes végétaux. Le traitement à la coupe ou des **apicaux** par l'irradiation ou les produits chimiques peut être efficace au développement des mutants dans les nouvelles pousses ou plantules. **Le** facteur le plus important est le traitement des méristèmes, région à partir de laquelle les nouveaux propagules se développent. L'irradiation des organes végétatifs donne naissance dans plusieurs cas à des chimères.

**Une** des méthodes utilisée est la technique du bourgeon adventice (Broertjes et al. , 1968). Elle est basée sur le fait que le sommet du bourgeon adventice ait pris naissance à partir des cellules épidermiques.

Avant le **traitement**, certains paramètres sont à vérifier:

l'état de la plante mère,

l'âge des feuilles,

conditions environnementales durant et après enracinement,

l'équilibre auxine-cytokinine sur la formation des bourgeons adventices.

L'irradiation des bourgeons avec des doses relativement élevées pourrait, en comparaison avec le traitement des cellules méristématiques dans les embryons des graines, réduire le nombre de cellules initiales responsables du développement d'une ou de plusieurs pousses. Cependant, quelques pousses adventices non chimériques pourront être retrouvées. Cette technique est appliquée à la patate (*Solanum tuberosum*) avec des doses très élevées appliquées aux yeux de la racine tubéreuse. Cependant, les pousses apparaissent trois mois après irradiation à cause de la dormance des yeux (Van Harten et al ; 1972).

#### \*Cellule et tissu

L'utilisation des radiations et des mutagènes chimiques dans les cellules et tissus, constitue une expansion rapide de la recherche.

Plusieurs techniques in vitro ont été développée et sont de nos jours très efficaces telle que l'utilisation de large spectre pour les plantes spécifiques d'une grande importance agronomique (Vasil, 1980; Thorpe, 1981; Bhojwani et Radzan, 1983). La première raison de l'utilisation des mutagènes est d'augmenter la variabilité génétique au dessus des capacités spontanées inhérentes aux végétaux. Les mêmes mutagènes chimiques ou physiques recommandés dans l'induction des mutations dans les graines et autres parties de la plante pourront être utilisés pour induire des mutations in vitro. Les cellules ou les tissus peuvent être traités avec les uns ou les autres mutagènes avant isolement ou quand le matériel est encore en culture.

Le traitement avec de fortes radiations énergétiques peut être fait dans un récipient fermé, etc., tandis que les radiations à capacité de pénétration faible doivent être appliquées dans des récipients ouverts avec une dose uniforme.

Tous les facteurs tels que la dose, la température, l'homogénéité de la population, la durée de la période de recouvrement après le traitement mutagénique, et les autres facteurs modificateurs doivent être considérées. Les cellules en suspension sont incubées à la dose désirée et ensuite sont filtrées, lavées et suspendues dans un nouveau milieu sans le mutagène.

La dose qui doit être utilisée pourrait être déterminée de manière empirique en exposant les cellules et tissus à différentes doses. La dose qui aura présenté un pourcentage plus élevé de

survivants et de nouveaux individus ou un meilleur développement de la matière sèche comparé au matériel non exposé sera utilisée. La dose du **mutagène** doit présenter 40 à 60 % de survivants par rapport à la population non traitée, toutefois la dose moyenne ou meilleure dose dépend des objectifs de multiplication.

## 111-z Méthode chimique

Elle consiste en général en un trempage du matériel végétal dans des solutions aqueuses des mutagènes, à température fixe 24<sup>±</sup>.1° C et pendant un temps déterminé (selon les expériences: 8 h à 24 h).

Les mutagènes chimiques, par leur similitude ou leur réactivité avec certains constituant chimiques du matériel génétique, provoquent des altérations des acides nucléiques (ADN-ARN), porteurs de l'information héréditaire.

Les traitements chimiques sont fréquemment appliqués aux semences, aux bourgeons, ou aux grains de pollen.

Les substances chimiques ont souvent l'avantage, chez les plantes à reproduction sexuée, de produire un pourcentage de survie relativement élevé.

L'utilisation des produits chimiques provoque, par conséquent, plus de mutations géniques que d'aberrations chromosomiques que si la méthode physique était utilisée.

Les substances chimiques présentent des modes d'action différents suivant leurs caractéristiques:

- cas des substances chimiques qui transforment la base (substances qui peuvent par exemple désaminer la cytosine et transformer le NH<sub>2</sub> en OH donnant l'uracile),
- cas des substances chimiques qui perturbent la réplication en s'intercalant dans l'ADN
- cas des substances chimiques qui se comportent comme des analogues de bases.

## 111-2-I Mutagènes chimiques

Plusieurs produits chimiques présentent des potentiels mutagéniques dans divers systèmes, de test. Toutefois, seuls quelques uns sont réellement utilisés pour l'induction des mutations en amélioration des plantes. Plusieurs d'entre eux appartiennent au groupe des agents **alkylisants** tels que: le méthane sulphonate d'éthyl (MSE), le diethyl sulphate (DES), l'éthylène imine (EI), le nitroso méthyl uréa (NMU).

#### 111-2-1-1 Agents alkylisants

Les agents alkylisants sont rapportés comme des substances ionisantes pour la ressemblance de leurs effets à induire des mutations. Ces composés ont un ou plusieurs groupes alkyles capables d'être transférés sur une autre molécule à une position dont la densité des électrons sera élevée. En fonction de leur nombre de groupes fonctionnels, les agents alkylisants sont mono-, bi- ou polyfonctionnels. La toxicité augmente avec l'augmentation du nombre de groupes fonctionnels; les agents alkylisants monofonctionnels sont utilisés presque **exclusivement** en mutagenèse. Les solutions mutagènes doivent être préparées tout juste avant utilisation et ne doivent jamais être conservées du moment que les produits de l'hydrolyse ne sont pas mutagènes; cependant, ils peuvent être toxiques (Kozak et al, 1965).

Les agents **alkylisants** réagissent en générale avec des bases à l'exception de la thymine La réaction avec la guanine est ce cas le plus fréquent, suivie de l'adénine, et la cytosine, cependant aucune réaction avec la thymine n'a été détectée.

#### 111-2-1-2 Les acides

Il est possible d'obtenir des taux de mutation très élevés de chlorophylle et des mutations morphologiques avec une fréquence négligeable d'aberrations chromosomiques dans des conditions acides chez le blé (Kleinhofs et al. , 1974 ). Les molécules de  $\text{NH}_3$  (nitrate) pénètrent très facilement les membranes cellulaires que les ions acides, ce qui explique la plus grande efficacité mutagénique pour les pH les plus faibles. L'acide est reconnu comme un des plus importants mutagènes disponibles pour l'induction des mutation en amélioration des

plantes. Il est le dernier dangereux et plus efficace mutagène, en plus il entraîne une grande production de mutations avec un faible taux de stérilité.

Après chaque traitement avec de l'acide, on procède à un lavage parfait dans de l'eau coulant pour un **minimum** d'une demi heure.

Les graines de céréales doivent être séchées progressivement et conservées avant de les planter. Les graines des légumineuses quant à elles pourront être séchées en surface et semées directement dans une terre humide fraîchement préparée.

L'acide retarde la germination, la production **d'ATP** et par conséquent la synthèse de l'**ADN**.

L'acide induit des mutations dans certaines espèces qui disposent de l'enzyme o- acétylsérine sulhydrolase (OASS) et qui produisent de l'acide alanine.

**Les** acides sont des mutagènes indirects et sélectifs.

#### 1 11-2-1-3 Autres mutagènes chimiques

Ces mutagènes sont essentiellement constitués de l'hydroxylamine, des agents producteurs de radicaux libres (hydrazines, radical organique libre et composés générant de l'hydrogène, du peroxyde), des bases analogues et les composés apparentés, certains inhibiteurs de la synthèse **d'ADN**, les antibiotiques, les mycotoxines, les métaux lourds et complexes, l'oxygène, les enzymes inhibiteurs et les agents intercalant. Malgré leur nombre, une partie **ir.fime** de ces mutagènes est utilisée dans l'induction des mutations en amélioration des plantes.

Tableau 2: Les groupes de mutagènes chimiques

Groupes de mutagènes	Produits simples
Bases analogues	5-bromo-uracil, 5-bromo-déoxyuridine, 2-amino-purine
Antibiotiques	Azasérine, mitomycin C, streptonigrin, actinomycin D
Agents alkylisants	
Moutarde de sulfure	Sulfide d'éthyl-2-chloroéthyle
Moutarde de nitrogène	Amine 2-chloroéthyl-diméthyle
Epoxides	Oxide d'éthylène
Ethylèneimines	Ethylèneimine
Sulfates,, sulfonates, sulfones, et lactones	Méthanesulfonate d'éthyle
diazoalkanes	diazométhane
Composés nitroso	N-éthyl-N-nitroso urea
Acides	Acide de sodium
Hydroxylamine	Hydroxylamine
Acide nitrique	Acide nitrique

Source: Manual on mutation breeding, 1977

### 11 1-2-2      Conditions de traitement

#### 111-2-2-1      **Dose**

La dose souhaitée pour une grande efficacité mutagénique dépend des propriétés de l'agent, du milieu dissolvant et du système biologique.

L'efficacité mutagénique pourrait aussi être influencée par la concentration des produits d'hydrolyse, la concentration des ions de certains métaux et les actions retardées des mutagènes dans certaines conditions.

#### + Propriétés des mutagènes chimiques affectant la dose

Certaines propriétés importantes limitent l'efficacité des mutagènes chimiques:

(i) la solubilité, (ii) la toxicité, (iii) la réactivité.

Plusieurs composés organiques ne sont pas solubles dans l'eau et les milieux dissolvants.

Une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylformamide (DMFA) ou dioxane (DO) pourront accroître la solubilité de l'eau pour certains de ces composés (Salnikova, 1974). Quelque fois, elle aide à dissoudre d'abord l'agent mutagène dans du triéthylène glycole (TEG) et ensuite dans du DMSO pour accroître l'absorption à travers les membranes biologiques.

Les mutagènes sont largement diversifiés en fonction de leur toxicité. A cause de cette toxicité, seulement de faibles doses peuvent être appliquées pour certains mutagènes.

L'hydrolyse du mutagène apparaît être la principale cause de destruction.

Certaines propriétés des systèmes biologiques influent sur les effets des mutagènes: (i) condition physiologique des tissus, (ii) la structure du tissu, (iii) la composition génétique, et (iv) la capacité de séparation des tissus, croissance et reproduction.

Le trempage des graines accroît les performances des mutagènes et permet un contrôle plus uniforme de la dose de mutagène appliquée aux tissus. Les différentes structures des organes de la graine et la composition chimique peuvent affecter l'infusion du mutagène et sa distribution à l'intérieur de la graine. C'est spécialement valable pour les graines de certaines espèces de dicotylédones. La capacité reproductive des différents tissus dans les étapes de la division cellulaire et la capacité de développement des tissus sont variables.

La **variabilité** dans les réponses mutagéniques des graines pourrait être due en partie par l'**hétérogénéité** des cellules méristématiques durant le traitement et les différentes habilités des cellules à réparer ou remplacer les composantes lésées.

+ Détermination de la dose

Elle est fonction de certains paramètres très importants que sont:

(i) la concentration, (ii) la durée du traitement et (iii) la température durant le traitement.

a/ La concentration

Le volume de la solution du traitement joue un rôle très important dans la dose des mutagènes. Il doit être assez large pour éviter des dénivellations de concentration durant le traitement et pour fournir à chaque graine l'opportunité d'absorber le même nombre de molécules de mutagène.

Dans le cas des graines de céréale, un minimum de 1 ml par graine devra être utilisé et ceci rapporté proportionnellement au nombre de grains utilisés.

Jadis, les fortes concentrations étaient relativement appliquées aux graines dormantes pour une longue période, dans une salle dont la température contribue à l'augmentation de la proportion de dommages comparés à la fréquence de mutation. En trempant les graines, les faibles concentrations pourront être utilisées en de plus courtes durées pour décroître la formation de produits d'hydrolyse et améliorer l'efficacité mutagénique.

Les concentrations recommandées pour le traitement avec les produits chimiques ne peuvent être données avant, elles dépendent largement de la méthodologie de traitement appliquée. Le facteur décisif est le dosage du **mutagène** en vue d'une induction d'altérations génétiques dans un **système** biologique en appliquant des traitements par régime.

b/ La durée du traitement

Le traitement doit être assez long pour permettre l'hydratation et l'infusion des tissus cibles par les mutagènes. Des expériences au laboratoire ont montré que la saturation de l'embryon dépend de la grosseur de la graine, de la perméabilité de l'enveloppe de la graine, et des constituants de la cellule. La faible concentration des cibles biologiques ne peut en aucun cas limiter les performances des mutagènes à l'intérieur. La saturation de l'embryon ou de la cellule peut aller jusqu'à 3 - 5 heures pour les petites graines, tandis qu'elle peut aller au delà de 12 heures pour les grosses cibles (grosses graines).

Des études sur l'arachide (*hachis hypogaea*) et le **sésame** (*Sesamum indicum*) révèlent que les performances et la distribution de manière homogène des mutagènes marqués ( $^{14}\text{C}$  EMS et  $^3\text{H}$  EMS) dans les différentes structures anatomiques des graines (cotylédon et gemmule, radicule) sont rehaussées lorsque les graines sont trempées dans de l'eau oxygénée avant le traitement,

Le trempage permettant une grande efficacité mutagénique varie avec la diminution de l'hydrolyse des mutagènes (Tableau 3). Si la durée du traitement est relativement long, comparée à la moitié de vie du mutagène, la solution du traitement devrait être (i) tampon et/ou (ii) renouvelée périodiquement avec une solution nouvellement préparée quand approximativement 1/4 du mutagène a été hydrolysé pour maintenir une concentration relativement constante du mutagène.

### c/ La température

La température de la solution mutagénique a une grande influence sur la vitesse d'hydrolyse, cependant la diffusion est très faiblement affectée. Pendant que la vitesse d'hydrolyse décroît avec la diminution de la température (Tableau 3), un **mutagène** pourrait être stable pour une longue période assurant ainsi la réactivité du centre **nuclée** de la cellule cible. Ceci est très important pour les mutagènes chimiques qui ont une durée de réaction très courte.

Un mutagène dont la moitié de temps nécessaire pour son hydrolyse est plus longue que le temps réel d'infusion de la solution mutagénique pourrait être appliquée à une température plus favorable à la vitesse de diffusion qu' à la vitesse d'hydrolyse.

Tableau 3. Temps d'hydrolyse de certains agents alkylsants à un pH 7

Agents alkylsants	Température				
	0 °C	10 °C	20 °C	30 °C	37 °C
Ethyle méthanesulphonate	1716h	378h	93h	26h	10.4h
Diéthylsulphate	59.2h	13.1h	3.4h	1h	0.3h <sup>a</sup>
Moutarde de sulfure	-	-	-	-	ca 3 min
Méthyle méthanesulphonate	-	-	68h	20h	9.1h
1-méthyl-3-nitro- 1-nitrosoguanidine	-	-	4d <sup>b</sup>	-	-
1 -méthyl-3-nitro- 1 nitrosoguanidine	-	-	ca3 h <sup>c</sup>	-	-
N-méthyl-N-nitroso-uréthane	-	-	-	35h <sup>d</sup>	-
N-méthyl-N-nitroso-uréthane	-	-	-	84h <sup>d</sup>	-

<sup>a</sup> : hydrolyse à 40 °C

Source: Methods of induction of mutations, 1991

<sup>b</sup> : hydrolyse dans une solution tampon de 0.05 M de phosphate, à un pH 6 dans l'obscurité

<sup>c</sup> : hydrolyse dans une solution tampon de 0.05 M de phosphate dans la lumière (1500 lux)

<sup>d</sup> : hydrolyse pourrait être plus longue à un pH acide et 10 fois ou 100 fois plus courte à des pH 8 et pH 9 respectivement

### 11-2-2-2 Les facteurs mitigeants

La production de mutations par des mutagènes chimiques peut être influencée par des facteurs sévères intervenant avant, durant et après le traitement.

#### a/ Le trempage

Le trempage des graines, précédant leur exposition aux agents mutagènes chimiques, pourrait modifier l'état physiologique de la cellule et causer de nombreux autres effets. Cela dépend en général d'une certaine estimation des conditions de trempage (durée, température, solution de trempage) et du type de graine. Une des premières choses est de lessiver dans de l'eau l'ensemble des substances solubles de la graine. Kamra et al. (1960) ont démontré que toutes les substances sont lessivées après seulement 1h 30 mn. de trempage des graines de blé dans la température ambiante de leur laboratoire.

L'activité métabolique des graines de blé est inhibée après 8 à 9 h de trempage dans de l'eau distillée à 0° C bien que les embryons soient sensiblement hydratés.

L'augmentation de la température d'hydrolyse et la disponibilité de l'oxygène permettent un bon développement des cellules. Ce stade de développement constitue la période la plus sensible pour l'application des agents alkylsants.

Le trempage est davantage utile pour séparer les graines à membrane perméable de celles à membrane imperméable par la différence de leur volume.

#### b/ Le pH de la solution mutagénique

Les variations de la concentration en ions hydrogène durant et après le traitement permettront d'obtenir une relation beaucoup plus favorable entre la production de la mutation et les effets secondaires. Les traitements mutagéniques avec les alkylalkanesulphonates, alkylsulphates, suivis de traitements dans un appareil neutre ou alcalin produisent de manière très marquée moins de lésions que lors d'un traitement similaire dans de l'eau ou dans une solution acide (Konzak et al. , 1965).

Le rapport des mutations génétiques, aux aberrations chromosomiques augmente avec l'augmentation du pH de la solution de EMS. Mikaelsen (1967) trouve une augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques en solution acide et une diminution en solution basique de EMS et DES.

Les pH qui se situent entre 6 et 10 exercent une influence sur les effets biologiques induits par le traitement de l'EI à travers un contrôle de la concentration et de la pénétration de l'imine (Wagner et al. , 1968).

Mc Calla et al. , (1968) ont montré une influence significative de la variation du pH sur les actions biologiques induites par le composé nitroso méthyle.

Le pH de la solution devrait être contrôlé avant et après le traitement.

### 1 11-2-3 Les conditions de post-traitement

Pour la méthode chimique, le trempage après le traitement est très recommandé pour faire disparaître les résidus des produits chimiques, Un trempage pendant

8 heures ou plus est particulièrement important si les graines seront séchées avant d'être semées.

Le pourcentage de survie est plus élevé lorsque les graines traitées avec les produits chimiques seront immédiatement semées dans un terrain humecté après avoir été lavées que si elles étaient semées et conservées pendant un moment.

Le séchage est fait dans le vide en présence du  $P_2 O_5$  à  $40^0$  C jusqu'à ce que les graines retrouvent leur poids normal.

La conservation pour une longue période se fait sous une température de  $0^0$  C au minimum.

### 111-2-4 Type de matériel traité avec les mutagènes chimiques

Les mutagènes chimiques ont jusque là produit des résultats décevants pour les matériels autres que la graine, et le pollen, comparés au traitement avec les radiations ionisantes. Ceci pourrait être dû à une **pénétration** insuffisante du **mutagène** chimique et la **faible** reproductivité des effets biologiques induits. Les mutagènes chimiques inducteurs plutôt des aberrations chromosomiques que des mutations géniques pourront être utilisés pour le traitement des organes qui dérivent des plantes à multiplication végétative.

### \*Procédure de traitement

Les graines pourront être traitées aussi bien à l'état de dormance que dans leur phase active de synthèse et de métabolisme.

Différentes méthodes ont été décrites pour le traitement de la graine, du pollen, et de la plante:

- (i) Les graines sont trempées dans une solution de mutagène avec une concentration appropriée et des traitements de régimes variés (pré-trempage, lavage après traitement) pourront être appliqués.
- (ii) Une petite section pourrait être faite sur la tige de la plante intacte et le mutagène est approvisionné à partir du coton saturé avec un agent chimique. Cette méthode peut être aussi utilisée pour le développement indemne des inflorescences (Bianchi et al. , 1961; Plewa, 1982).
- (iii) Le mutagène peut être injecté à l'intérieur ou à côté de l'organe à traiter.
- (iv) Un mutagène pourrait être appliqué à faible concentration dans un milieu de culture et accède à l'intérieur de la plante à travers les racines.
- (v) Le pollen pourrait être exposé à la vapeur du mutagène dans un endroit hermétique et humide (Mabuchi et Arnason, 1969).
- (vi) Le mutagène mélangé avec de l'huile de paraffine peut être utilisé pour le traitement du pollen.

Exemple: le mélange d'un volume d'une solution de 1 % de EMS dans 15 volumes d'huile (0.63 % EMS) a permis de produire de bonnes graines dans l'ensemble avec une fréquence élevée de mutations (Neuffer, 1978).

#### 111-2-5 Objectifs et méthodes de traitement

Toutes les parties de la plante peuvent être traitées avec les radiations ionisantes; cependant, certaines sont plus faciles à traiter que d'autres. Les graines et les grains

de pollen sont généralement les cibles les plus faciles à traiter avec les mutagènes physiques et chimiques. Les autres types de matériel comme, la plante entière, les gamètes, les zygotes, les tissus et organes en culture artificielle et les organes végétatifs tels que les tubercules, les stolons, les bulbes, les bourgeons sont essentiellement traités avec les radiations. L'efficacité des agents mutagènes et le bon choix du type de traitement ont permis d'obtenir une plus grande efficacité mutagénique. Ils dépendent essentiellement des propriétés spécifiques de l'agent mutagène utilisé (son efficacité, le rapport dose-effet et le mode d'application) et des caractéristiques spécifiques du système biologique qui sera traité (la sensibilité des tissus traités dépend de l'anatomie, la physiologie, la biochimie et les particularités génétiques).

L'objectif général visé avec cette méthode est la diversité du monde végétal, l'adaptabilité aux conditions climatiques dégradantes, la résistance aux maladies, etc... Tout ceci converge vers une production de bonne qualité et très diversifiée suivant les goûts des consommateurs.

1 1 1-2-5

### *Effets combinés des agents physiques et chimiques*

La combinaison des mutagènes ayant des processus d'induction des mutations indépendants mais relevant d'interaction est fréquemment appliquée pour accroître la fréquence de mutation et élargir le spectre de mutation. Quelque soit la manière, les résultats obtenus dans les organismes supérieurs n'étaient pas conséquents. La synergie entre mutagènes reflète le traitement de différentes populations de cellules à différents stades ou étapes de la division cellulaire et doit être interprété avec attention, Cependant, force est de constater que l'ordre d'application des mutagènes révèle d'une importance capitale surtout avec le taux de survie et de la germination du matériel utilisé. Le traitement d'abord aux radiations puis aux produits chimiques présente plus d'avantages (taux de survie, et de germination plus élevé) que le contraire. (voir Annexe 7).

# TROISIEME PARTIE

CONCLUSION

ET

RECOMMANDATIONS

## Conclusion

L'utilisation des techniques d'induction des mutations en amélioration des plantes nous a permis de créer de nouvelles variétés, en même temps de diversifier le monde végétal surtout chez les autogames. Elles ont largement contribué au développement de l'hybridation du fait de leur fort taux de stérilité permettant le développement de géniteurs, mais surtout une homogénéisation plus rapide des populations. Ces techniques d'induction des mutations (physique, chimique), présentent des gammes de produits très variés (rayons, isotopes, les agents chimiques) caractérisés par des propriétés distinctes et très variées. Suivant les conditions de traitement et le matériel végétal utilisé, nous observons une multitude de mutants présentant des caractères diversifiés. Ces deux méthodes restent applicables à l'ensemble du matériel végétal, de la plus petite unité à la plante entière. Elles ont permis un élargissement du monde végétal dans l'ensemble des zones écologiques, une répartition plus homogène des végétaux en créant de nouvelles variétés qui recèlent certaines caractéristiques

(résistance aux maladies, à la sécheresse, à la salinité, à la verse etc. ). Souvent les mutants sont utilisés indirectement pour la création de géniteurs dont les caractères seront ensuite transférés par hybridation.

Lors d'une mutagenèse, plus de 50 % des plantes meurent, les autres semblent assez malades. On ne trouve pas facilement de mutants indemnes dans un reste génique stable: dans le matériel propagé par la semence, il existe presque toujours des mutants indésirables et des ségrégants non fertiles qui apparaissent à la suite de changements structuraux de chromosomes qui doivent être éliminés dans les premières générations après traitement; dans les clones, il y a aussi des effets phénotypiques erratiques.

Cependant, certains facteurs limitent l'utilisation des mutations en amélioration des plantes. La mutagenèse n'est pas discriminatoire et elle produit de grandes quantités de variants inutiles qui nécessitent un travail laborieux d'élimination. La mutagenèse recèle des effets secondaires indésirables et la nécessité de tester de larges populations. La grande majorité des mutations est délétère et cause, au sein de l'espèce ou des populations, un préjudice à un certain nombre d'individus; c'est ce qu'on nomme le fardeau génétique. Ce dernier a pour conséquence une diminution des facultés d'adaptation du porteur, de son aptitude à une insertion correcte au

sein de son milieu, de ses possibilités de reproduction, de son adaptabilité, de cet ensemble que les anglo-saxons appellent fitness (aptitude). Lorsque la diminution de l'adaptabilité est telle qu'elle provoque la mort ou une impossibilité totale à se reproduire, on parle de mort génétique.

Malgré tout cela, l'utilisation des techniques d'induction des mutations reste d'actualité et présente des résultats satisfaisants dans l'amélioration des plantes. Cependant, davantage d'études doivent être faites pour une meilleure utilisation et une efficacité de ces méthodes.

## Recommandations

Certaines recommandations sont émises à l'endroit de deux points essentiels à savoir les traitements mutagéniques qui **entraînent** beaucoup d'effets néfastes et la stérilité.

### \*Traitements mutagéniques

Il faudra orienter les études sur les mutagènes suivants supposés être les plus recommandés par leur efficacité à produire des mutations: rayon X, rayon gamma, neutrons, MSE (méthane sulphate d'éthyle), DES (diéthyl sulphate), EI (éthylène imine).

Encourager l'utilisation de la technique de la combinaison des agents mutagènes (chimiques et physiques) qui est efficace et donne de bons résultats. Cependant, l'ordre d'application des mutagènes physiques et chimiques est d'une grande importance et nécessite des recherches très poussées.

Une meilleure détermination des conditions de traitement pour l'application des techniques d'induction des mutations (effets de la température, pH, trempage avant, séchage après, dose et concentration des mutagènes), et leurs répétitions dans le temps est une nécessité afin d'arriver à des résultats fiables.

4 quel stade du cycle de la plante le traitement pourra se faire; graine, pollen, ovule, zygote, la partie végétative, cela dépend de la spéculaton utilisée. Il doit être connu avec précision.

L'utilisation du MSE (méthane sulphate d'éthyle) pour la propagation végétative des polyploïdes n'avait pas si longtemps été essayée; cependant, l'application de cette méthode ou une autre similaire pour pareilles plantes pourrait faire l'objet davantage de recherches.

Il faudra bien distinguer les variétés diploïdes, triploïdes, tétraploïdes pour une meilleure estimation de la dose d'irradiation.

Une meilleure disponibilité des agents mutagènes (physique et chimique) dans tous les centres de recherche agronomique pour une plus grande application, ce qui accroît les chances d'obtention de bons mutants.

Davantage d'études doivent être faites à l'endroit des produits tels que la thiourée, le nitrate de calcium, le chlorure de cadmium, la cystéamine qui accroissent considérablement la fréquence de mutation après irradiation.

Mise en place dans l'avenir de laboratoires ou de lieux d'application des techniques d'induction des mutations où tous les paramètres seront maîtrisés pour l'obtention d'un plus grand nombre de mutations agronomiquement utiles.

Des études très poussées doivent être orientées à l'endroit d'une meilleure connaissance des propriétés des agents mutagènes pour une plus facile utilisation mais surtout pour une estimation plus exacte de la dose appropriée.

## \*Stérilité

Quelle est l'origine de la stérilité dans le matériel traité avec les mutagènes ?

Est-elle due à l'aberration des **chromosomes** et/ou à la mutation génétique ?

Est-elle due aux changements extra-nucléaires ?

Est-ce que les causes sont **aussi** bien les mêmes pour les générations  $M_1$ ,  $M_2$  et la suite ?

Que! est le **rôle** de la mutation, de l'**aberration chromosomique** et des changements **extra-nucléaires** sur l'induction de la **stérilité** quand différents **mutagènes** sont utilisés pour l'étude ?

Toutes **ces** questions sont des axes de réflexion qui à l'avenir occuperont certainement les utilisateurs des **techniques** d'induction des mutations.

## **Bibliographie**

- 1 - **Amano, E.**, 1990. On the mutation breeding mutant genes p 14.
- 2 - **Eléments d'amélioration** génétique des plantes (Manuels scientifiques et techniques). Rabat: Actes Editions, 1932 pp 230
- 3 - **Agence** internationale de l'énergie atomique bulletin, 1969. Les techniques d'irradiation et la "révolution" verte, Volume 11, numéro 5. Pp 16 - 29
- 4 - **Bianchi, A.** , **Mariani, G.** , and **Uberti, P.** 1961. Mutations induced in endosperm and seedlings of maize following X-irradiation and diepoxybutane treatment of mature pollen, **Effects of Ionizing Radiations on Seeds. (Proc. Symp. Karlsruhe, 1960)**, I Vienna, pp 419-439.
- 5 - **Broertjes, C.** , **Haccius, B.** , and **Weidlich, S.** 1968. **Adventitious** bud formation on isolated leaves and its **significance** for mutation breeding, *Euphytica* 17, pp 321-344.
- 6 - **Brunner, H.** 1977. Radiosensitivity of a number of crop species to gamma and fast neutron radiation, **Manual on Mut. Breed.** , IAEA, Techn. Rep. Ser. **119**, 2 nd. ed. , pp 44-45.
- 7 - **Conger, B.V.** , **Constantin, M.J.** , and **Caribia, J. V.** 1972. Seed radiosensitivity: **Wide species**, *Int. J. Radiat. Biol.* **22**, pp 225-235.
- 8 - **Conger, B.V.** , and **Constantin, M. J.** 1974. The **effectiveness** of fission neutrons, 14.7 Mev monoenergetic neutrons and **Co-60** gamma radiation on seedling **growth reduction** and induction of **chlorophyll-deficient** mutations in **barley**, **Biological Effects of Neutron Irradiation.**, (**Proc. Symp. Neuherberg, 1973**), IAEA, Vienna, pp 417-432.

- 9 - Ehrenberg, L. 1960. **chemical mutagenesis: Biochemical and chemical point of view on mechanisms of action**, Abh. Deutsche Akad. Wiss. , Berlin (Med.), **chemische Mutagenese**, Erwin Bauer **Gebächtnisvorlesungen I** , pp 124- 136.
- 10 - Fehr, W.R.. 1930. **Principles of Cultivar development V.1. Theory and technique** pp 536
- 11 - Freisleben, R. , and Lein, A. 1944. **Möglichkeiten und praktische Durchführung der Mutationszüchtung**, **Kühn Archiv** 60, pp211-225.
- 12 - Génin, A. , 1990. **La botanique appliquée à l'horticulture** 4<sup>e</sup> édition pp 180-181
- 13 - Georges Valdeyron. (1961), **Génétique et amélioration des plantes**: Paris; J. B. Baillièrè et fils
- 14 - Harten, A. M. Van, Bouter, H. , and Ommeren, A. Van, 1972. **Preventing chimerism in potato (Solanum tuberosum L.)**, **Euphytica** 17, pp 11-21
- 15 - IAEA, Vienna. (1991), **Plant Mutation Breeding for crop improvement**, Vol. 1. P 553.
- 16 - IAEA and FAO. (1966), **Mutation in plant Breeding: Proceeding of a panel** **vienna**.
- 17 - IAEA/FAO, (1991). **Methods of induction of mutations Standards for laboratory operations involving chemical mutagens**, **A training manual** pp 1-51.
- 18 - International de librairie. (1981), **Genetique frederic lints** pp. 580.
- 19 - John Wiley & Sons Ltd. 1985. **COWPEA Research, production and utilization**.
- 20 = Kamra, O. P. , Kamra, S. K. , Nilan, R. A. , and Konzak, C. F. 1960. **Radiation response of soaked barley seeds. I. Substances lost by leaching**, **Hereditas** 46, p 152.
-

- 21- Khadr, F. H. , and Frey, K. J. 1965. **Recurrent** irradiation for oat breeding, *Rad. Bot.* 5 pp 391 - 402.
- 22 - Khyostova, V. V. 1966. **Mutagenic Treatment of Agricultural Plant.** In: **Xnduced Mutations and Their Utilization**, Proc. Symp. Erwin Bauer Gedachtnisvorlesungen IV, **Gatersleben** 1366, Akademie-Verlag, Berlin.
- 23 - Kirdy-Smith, J. S. , and Dolphin, G. W. (1958), **Chromosome breakage** at high dose rates, *Nature* , 182, pp 270 - 271.
- 24 - Kleinhofs, A. ,Sander, C. , Nilan, R. A. , and Konzak, C. F. 1974. **Azide mutagenicity-mechanism and nature of mutants produced, Poly-ploidy and Induced Mutations in Plant Breeding (Proc. Meeting Bari, 1972)**, IAEA, Vienna, pp 195 - 199.
- 25 - Konzak, C. F. , Nilan, R. A. , Wagner, J. and For-ter, R. J. 1965. **Efficient chemical Mutagenesis. The Use of Induced Mutations in Plant Breeding (Rep) FAO/IAEA Techn. Meeting Rome, (1964)**, Pergamon Press, Oxford, pp 49 - 70.
- 26 - LINTS, Karger. 1978. **Genetic and Ageing.**
- 27 - **Manual on mutation breeding. 1977.** , Technical Report Series NO. 119. International Atomic Energy, Vienna.
- 28 - Mc Calla, D. R. , Reuvers, A. , and Kitai, R. 1968. **Inactivation of biologically active N-methyl-N-Nitroso compounds in aqueous solution: Effects of Various conditions of pH and illuminations**, *Can. J. Biochem.* 46, pp 807-811.
- 29 - Mikaelson, K. 1967. **Studies on mutagenic effects of ionizing radiation and chemical mutagens**, IAEA Laboratory Activities, 4 th Rep. , Techn. Rep. **Ser. 77**, IAEA, Vienna.
- 30 - Neuffer, MG. 1978. **Parraffine oil technique for treating mature corn with chemical mutagens**, *Maydica* 23, pp 21 - 28
-

31 - Osborne, T. S. , and Lunden, A. O. 1955. Prediction of seed radiosensitivity from embryo structure, The use of Induced Mutations in plant Breeding ( Rep. FAO/IAEA Techn Meeting Rome, 1964), Pergamon Press, Oxford, pp 133-149.

32 - Pelegrin P. 1963. Utilisation des rayonnements en génétique végétale, pp 1 - 11.

33 - St. Angelo A. J. et al. , PEANUTS - Culture and Uses. A Symposium. , Oklahoma; American Peanut Research and Education Association, INC. , 1973. pp 684. , ill. Fig. , tabl.

34 - Plewa, M. 1982. Specific locus mutation essays in zea mays. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mut. Res. 99, pp 3 17-337.

35 - Rieger, R. , Michaelis, A. ,and Green, M. (1976) Glossary of Genetics and cytogenetics, Gustav Fischer Verlag, Jena, GDR.

36 = Salnikova, T. V. 1974. The mutagenic activity of a new supermutagen (NDEU) for wheat in relation to solvent and pH, Dok. AK. Nauk. 218, pp 211 - 2 14.

37- Scarascia-Mugnozza, G. T. , et Monti, L. M. 1966. Effect of recurrent mutagenic treatment in durum wheat, Mut. Res. 3, pp 298 = 304.

38 = SIMMONDS N.W. 1988. Principes d'amélioration génétique des végétaux, pp 269 = 273.

33 - Swanson, C. P. , et Johnson, A. H. 1955. Radiation induced pycnosis of chromosomes and its relation to oxygen tension, Am. Nat. 88, pp 425 - 430.

40 - Techniques Agricoles et Productions tropicales XV L'Arachide.

41 - Thorpe, T. A. 1981. plant tissue culture, Methods and Applications in Agriculture, Academic Press, N. Y. , pp 379.

42 - Ulrich Lüttge, Manfred KLUGE, and Gabriela BAUER. 1992. Botanique, TEC & DOC LAVOISIER, pp 166 - 168.

43 - Vasil, I. K. 1980. perspectives in plant cell tissue culture, Int. Rev. of Cytology, Suppl. 11A and 11B, Academic Press, N. Y.

44 - Wagner, J. H. , Nawar, M. M. , Konzak, C. F. , et Nilan, R. A. (1968), The influence of pH on the biological changes induced by Ethylenimine in barley, Mut. Res. 5, pp 57 - 64

45 - WILLIAM D. STANSFIELD ph. D. Serie Schaum. 1 983. Génétique. Cours et problèmes, pp 181 - 184.

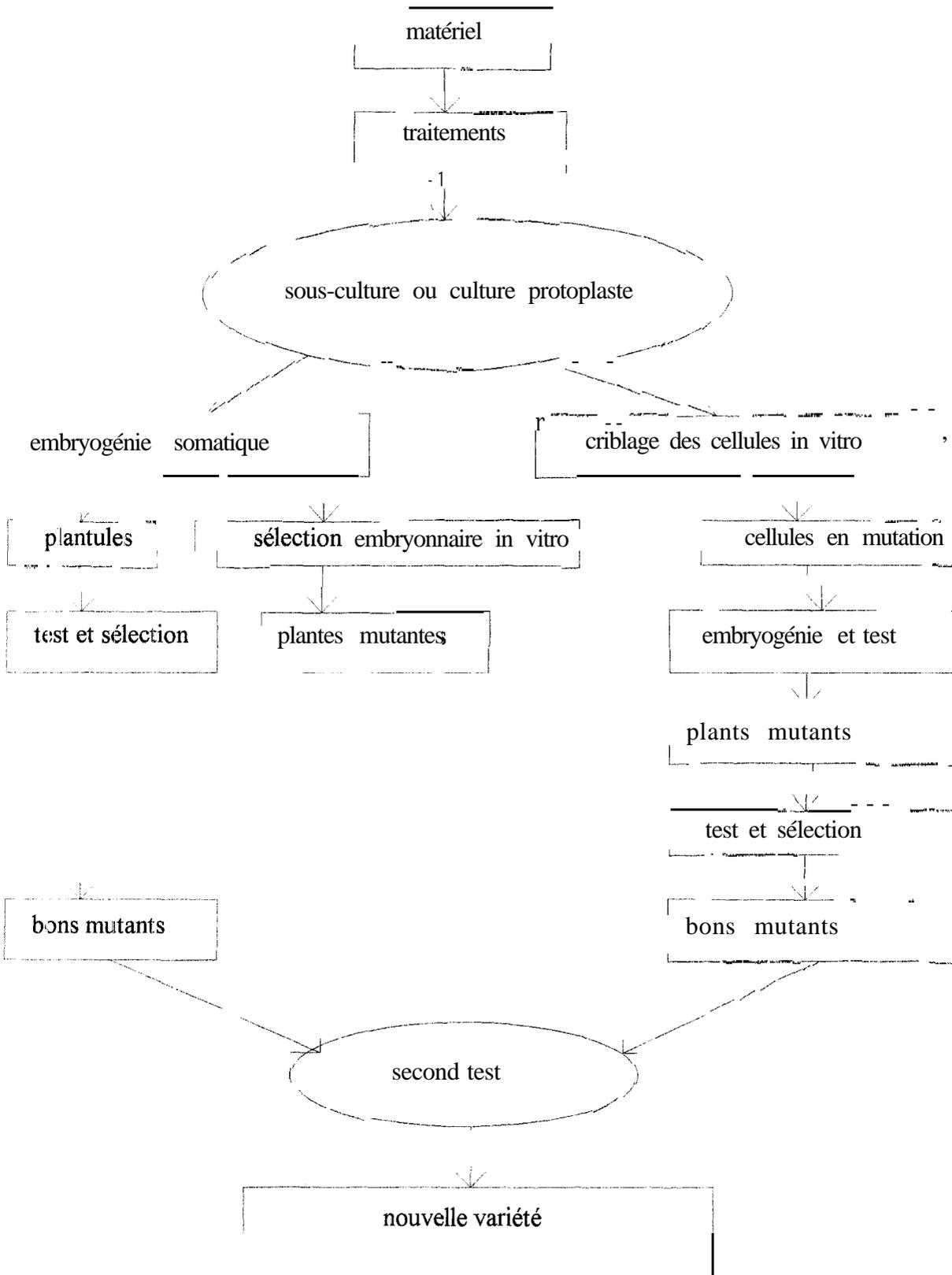
46-Zimmermann, F. K. , 1982. Can we determine mutagenicity or only a mutagenic potential ?, Mut. Res. 92, pp 3 - 7.



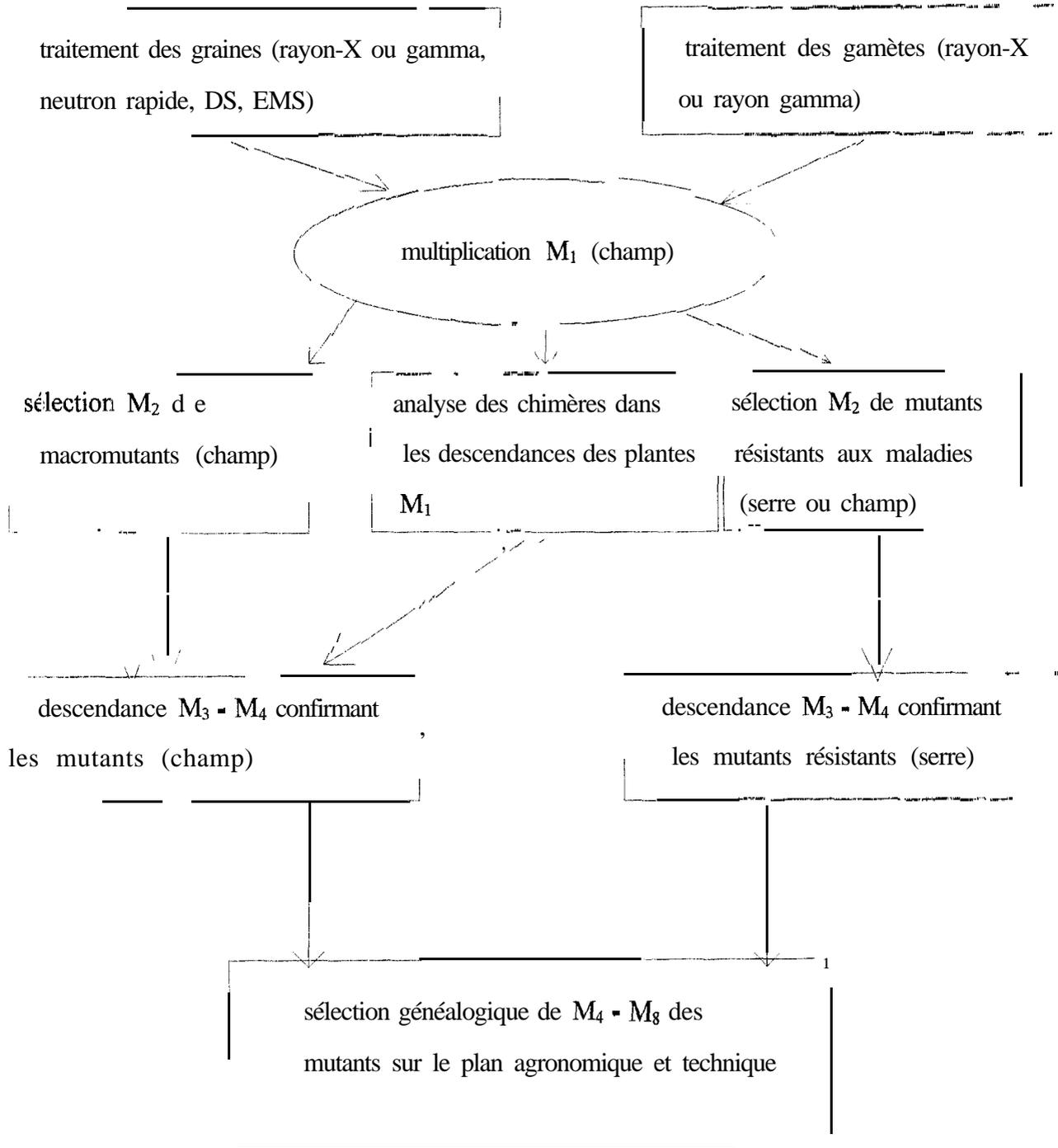
**ANNEXES**

**Annexe 1:** Procédure d'amélioration par mutation in vitro

**Source:** International Atomic Energy Agency Vienna, 199 1

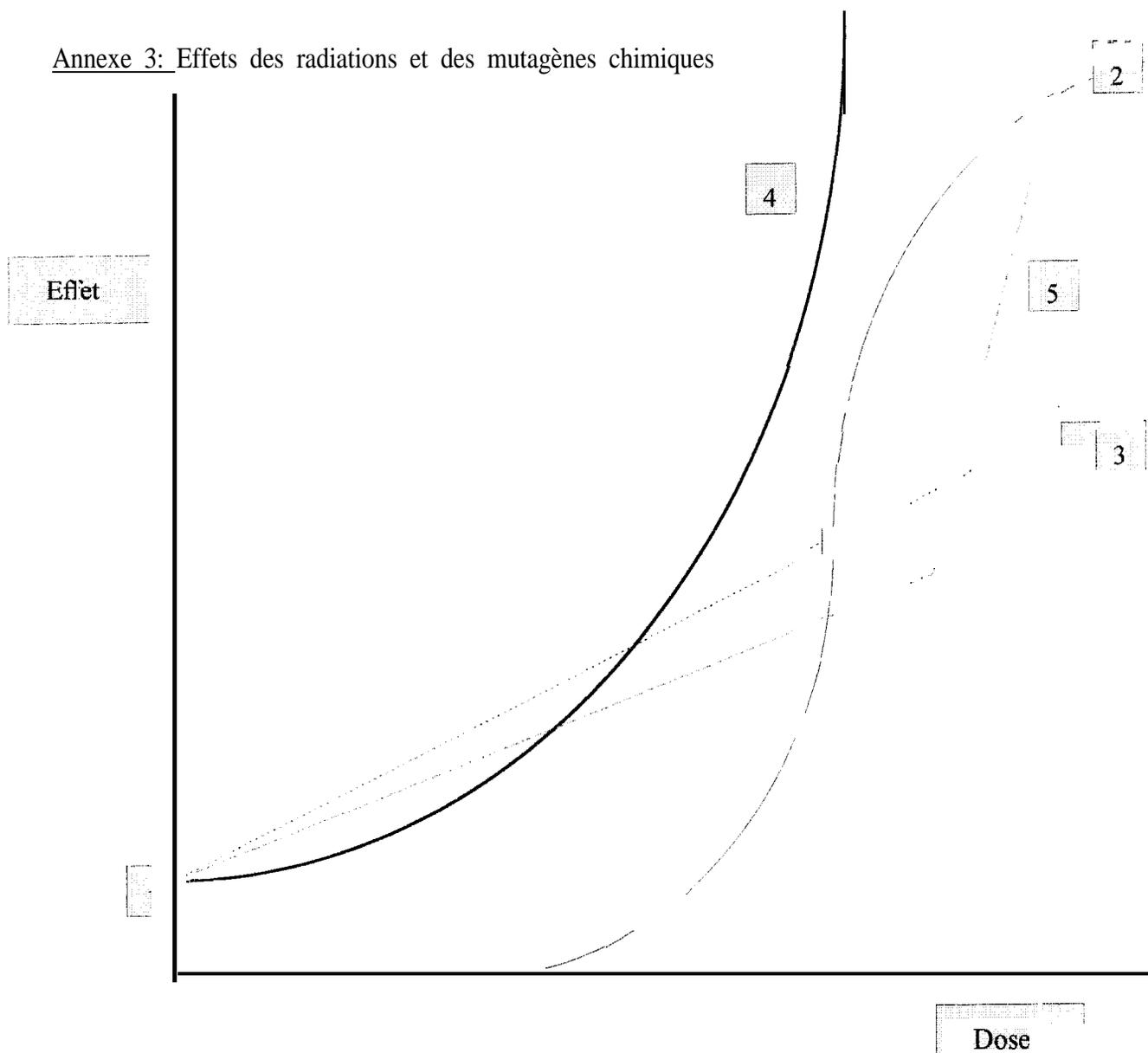


Annexe 2: schéma expérimental d'une sélection par induction de mutations (in vivo)



Source: International Atomic Energy Agency Vienna, 1991

Annexe 3: Effets des radiations et des mutagènes chimiques



- 1- Taux spontané de mutation ou de cancer
- 2- Toxicité chronique ou aigue
- 3- Mutations induites par les radiations
- 4- Cancer induit par les radiations
- 5- Mutations induites par les agents chimiques

Annexe 4: Pourcentage de germination des graines après irradiation

Dosage ( Krad)	Echantillon	Jours après traitement					
		10	20	25	35	45	65
% de germination des graines							
0	100					83	83
0"	100					21	21
2	100					22	22
3	100					34	34
4	<b>100</b>					24	27
5	100					15	-
6	<b>100</b>						"
7	100						..
8	100						..
9	100						
10	<b>100</b>						

a : dessiccation

Source: International Atomic Energy Agency Vienna, 199 1

Annexe 5: Nombre de variétés obtenues par mutation de (1966-1 989),

Espèces	Noms	Dates				
		1966-1970	1971-1975	1978-1980	1981-1985	1986-1989
Les céréales						
<i>Oryza sativa</i>	Riz	17	18	33	22	22
<i>Triticum aestivum</i>	Blé	14	12	20	14	18
<i>Hordeum vulgare</i>	Orge			1	1	
<i>Zea mays</i>	Maïs	1		6	5	4
<i>Panicum miliaceum</i>	Mil	2	3	2		4
<i>Sorghum vulgare</i>	Sorgho	1	1	1		
Les plantes à huile						
<i>Glycine max</i>	Soja	7	3	2		5
<i>Arachis hypogaea</i>	Arachide	1	2			2
<i>Brassica napus</i>	Colza	1		3		
<i>Helianthus annuus</i>	Tournesol					1
Les plantes à fibre						
<i>Boehmeria nivea</i>	Ramie					1
<i>Gossypium</i>	Coton			3	1	2

Les plantes végétaives		
<i>Ipomoea batatas</i>	Patate douce	1
<i>Pisum sativum</i>	Pois	1
<i>Cucumis sativus</i>	Concombre	
<i>Citrullus vulgaris</i>	Pastèque	1
Les arbres et arbres fruitiers		
<i>Citrus</i>	Oranger	2
<i>Pirus</i>	Poirier	
<i>Morus</i>	Mûrier	
Les plantes fourragères		
<i>Astragalus adsurgens</i>	Sandawan	4
Les plantes ornementales		
<i>Rosa</i>	Rose	14
<i>Chrysanthemum</i>	Chrysanthème	17
<i>Canna generalis</i>	Balisier	4
<i>Camellia</i>	Camélia	1
<i>Gladiolus hybridus</i>	Glaïeul	1
<i>Nelumbo nucifera</i>	Lotier	