

UNIVERSITE DE SARH

Institut Universitaire des Sciences Agronomiques
et de l'Environnement (IUSAE)

Département des Sciences Agronomiques

Cours de **BIOTECHNOLOGIE VEGETALE**

Licence 3

Par : *Alain DJIRANTA KEMORAL*

2020

Programme de l'Unité d'Enseignement

Généralités

Chapitre 1 : Les Régulateurs de Croissance (Hormones).

Chapitre 2 : Culture des Méristèmes.

Chapitre 3 : La Micropropagation.

Chapitre 4 : Culture et Fusion des Protoplastes

Chapitre 5 : Production des Haploïdes ou Haplo-Diploïdisation.

Chapitre 6 : Embryogénèse Somatique ou Culture D'embryon.

Chapitre 7 : Le Compostage.

Chapitre 8 : La Transgénèse (Production des OGM).

GENERALITES

Les biotechnologies consistent en l'utilisation des bactéries, des levures, des moisissures, des algues et des champignons des cellules animales et végétales dont le métabolisme et la capacité de synthèse sont orientés vers la fabrication des substances variées utiles à l'Homme.

Les activités bio-industrielles envisagées concernent :

- ❖ La production agricole ;
- ❖ Le traitement et la prévention des maladies ;
- ❖ La satisfaction des besoins énergétiques ;
- ❖ La protection de l'environnement.

Les biotechnologies contribuent à l'avancement et à la diffusion des nouvelles connaissances dans les disciplines fondamentales : la microbiologie, la biochimie, la biologie moléculaire, la génétique, la biologie cellulaire ... qui permettent le progrès des biotechnologies ainsi que la propagation des innovations technologiques. Il existe deux (2) grands processus biotechnologiques :

- ❖ La fermentation microbienne (plus ancienne) ;
- ❖ La recombinaison génétique (plus récente).

L'un des objectifs des bioindustries est de disposer des cellules transformées susceptibles d'exprimer le message génétique étranger qu'elles ont intégrées et de produire des molécules spécifiques en grande quantité.

Les domaines d'application des biotechnologies sont :

- ❖ Domaine agroalimentaire (fromage, yaourt...)
- ❖ Production végétale (amélioration de qualité alimentaire) exemple : production des hormones ;
- ❖ Industries pharmaceutiques (fabrication des vaccins, des acides aminés, des antibiotiques ...)
- ❖ Microbiologie industrielle (production des biomasses microbienne comme les levures, les bactéries, les champignons, les moisissures ...)
- ❖ Domaine environnementale (assainissement de l'environnement).

Les biotechnologies végétales pour quoi faire?

L'introduction et l'utilisation des biotechnologies végétales sont étroitement liées à l'évolution de l'amélioration des plantes en tant que science.

Les objectifs de la sélection variétale sont:

Plus de productivité; plus de résistances aux maladies et aux pathogènes; Meilleures adaptations aux sols et aux climats; Meilleures adaptations aux techniques culturales; régularité de productivité et de forme; meilleures qualités culinaires et adaptation aux processus de transformation industrielle.

Après la Seconde Guerre Mondiale, l'explosion démographique et la demande alimentaire accrue ont bouleversé le domaine de l'agriculture. Productivité et qualité sanitaire furent les leitmotifs du nouveau paysage agricole. Cette évolution s'est faite grâce à une révolution technologique et à un changement des techniques de production agricoles. Engagée dans cette voie, la France est devenue, aujourd'hui, la seconde puissance agricole mondiale derrière les Etats-Unis et la littérature économique parle d'elle comme le grenier de l'Europe pour les cultures céréalières. Depuis la Conférence de Rio en 1992 sur le développement durable, la notion de respect de l'environnement vient désormais s'ajouter à la conception de l'agriculture moderne. Ainsi, les agriculteurs du monde entier doivent relever le défi d'une alimentation saine et abondante dans un environnement préservé.

Ajoutés aux autres solutions (protection chimique des plantes, fertilisation, irrigation, machinisme, sélection variétale etc.), les outils modernes de la biotechnologie sont des moyens supplémentaires de répondre aux enjeux actuels de nos sociétés.

Les biotechnologies végétales offrent et offriront aux agriculteurs des solutions en réduisant la pression sur les ressources naturelles. Elles contribuent à la création d'une forme d'agriculture plus équilibrée, et plus respectueuse de l'environnement. Ainsi, il semble intéressant d'améliorer les caractéristiques génétiques des plantes cultivées afin de leur permettre une meilleure protection intérieure et de rationaliser les épandages de pesticides. C'est pourquoi, les chercheurs ont développé ces plantes qui constituent un moyen de préserver l'environnement, et développent actuellement des plantes qui seront moins sensibles au manque d'eau, ou capable de mieux utiliser l'azote du sol.

CHAPITRE 1 : LES REGULATEURS DE CROISSANCE

Les hormones sont des substances produites par un organe et qui agissent à faible concentration pour modifier le fonctionnement d'un autre organe situé loin de son site de synthèse. Les régulateurs de croissance chez les plantes possèdent des caractéristiques suivantes :

- ❖ Tous sont des molécules de petite taille ;
- ❖ Tous sont synthétisés par la plante ;
- ❖ Tous agissent à faible concentration 10^{-6} à 10^{-8} Mol ;
- ❖ Leurs effets dépendent de leur concentration et de la concentration des autres régulateurs de croissance ;
- ❖ Leurs sites de synthèses ne sont pas souvent des sites où ils exercent leurs actions.

Contrairement aux hormones animales, les hormones végétales ont différents effets même chez la même plante à des moments différents. Il existe cinq (5) groupes de régulateurs de croissance chez les plantes :

- ❖ Les Auxines ;
- ❖ Les Cytokinines ;
- ❖ Les gibbérellines ;
- ❖ Les Acides abscissiques ;
- ❖ Les Ethylènes.

I- LES AUXINES

1- Les différents types d'auxines : Acide indole-3-acétique (IAA ou AIA)

C'est l'auxine naturelle la plus fréquente chez les plantes. Les autres sont d'origines synthétiques et les plus fréquentes sont :

- ❖ 2,4-D : acide 2,4 dichlorophenoxyAcétique ;
- ❖ NAA : Acide 1-Naphtaline Acétique ;
- ❖ IBA : Acide indole-3-Butyrique.

2- Le métabolisme des auxines

L'IAA est synthétisé à partir du tryptophane au niveau des méristèmes des bourgeons apicaux et au cours de la maturation des graines dans les embryons. L'auxine se déplace de manière polarisée et basipète.

L'IAA est continuellement produit chez les plantes mais ne s'y accumule pas contrairement aux autres auxines ceci signifie que l'IAA est soit inactivé, soit détruit, soit combiné à d'autres molécules. Justement l'IAA est soit inactivé en méthylène axindole, soit détruit par les peroxydases, soit combiné à l'acide aspartique.

3- Effets physiologiques des auxines

Les auxines présentent plusieurs effets physiologiques chez les espèces végétales :

- ❖ Promotion de l'initiation des racines à partir des fragments de tiges ;
- ❖ Contrôle de la morphologie et de la formation des racines ;
- ❖ Contrôle de la différenciation des tissus vasculaires (phloème et xylème) ;
- ❖ Contrôle de la dominance apicale ;
- ❖ Stimulation de la division et de l'agrandissement cellulaire ;
- ❖ Retarde l'assainicence (chutes des feuilles) ;
- ❖ Stimule la floraison et la fructification ;
- ❖ Induit la parthénocarpie (grossissement des fruits par rapports à la normale) ;
- ❖ Inhibe l'abscission si appliqué sur les feuilles ou stimule l'abscission si appliqué au point d'abscission.

II- LES CYTOKININES

Du point de vue chimique, les Cytokinines sont les proches de l'adénine. Il existe des cytokinines naturels comme la kinetine (6-furfurylamino-purine), la zéatine (4-hydroxy-3-méthyl trans α -butenyl) et des cytokinines synthétiques comme :

BAP: 6-benzyl amino-purine;

2iP: N⁶ (2-isopentyl) adenine;

PBA: 6(benzylamino)-9-(2-tetra-hydroxypyranil-9-purine);

TDZ: 1-phenyl-3-(1, 2, 3 thiodiazol-5-yl) purine.

1- Effets physiologiques des cytokinines

- ❖ Induit la formation des organes en culture des tissus;
- ❖ Stimule la division et l'expansion cellulaire ;
- ❖ S'oppose à la dominance exercée par le bourgeon apical sur les méristèmes axillaires ;
- ❖ Stimule la formation des bourgeons ;
- ❖ Affecte la structure biochimique des ARNt ;

- ❖ Stimule la photosynthèse en augmentant la vitesse de synthèse des enzymes photosynthétiques ;
- ❖ Empêche l'assainissement en stimulant la synthèse des protéines et en ralentissant leur dégradation par protéases et des nucléases.

2- Interaction auxine-cytokinine.

- ❖ Contrôle la morphogenèse racinaire et foliaire ;
- ❖ Contrôle la division et l'expansion cellulaire ;
- ❖ La balance auxine-cytokinine est très importante en culture des tissus par exemple la néoformation des bourgeons est favorisée par une teneur élevée en cytokinine.

3-Mécanisme d'action de cytokinines

1-Comment se forme la galle de collet chez les plantes infectées par *Agrobacterium* ?

Lorsque la bactérie pénètre la cellule hôte à travers une blessure, elle lui transfère dans le noyau un gène appelé ADN-Ti par l'intermédiaire du plasmide Ti. Dans le noyau de l'hôte l'ADN stimule la production des hormones (cytokinine, IAA, gibbérelline). L'interaction entre ces hormones stimule la division et l'expansion cellulaire conduisant à la formation des tumeurs ou crown gall. La galle ainsi formée confère à la plante hôte une croissance vis-à-vis des hormones de croissances.

2-Comment se fait la transformation génétique par *Callinobacterium fascien* ?

Callinobacterium fascien pénètre aussi la plante hôte par l'intermédiaire d'une blessure et stimule la division cellulaire chez l'hôte, contrairement à *Agrobacterium* il n'y a ni transfert de gènes ni formation de tumeurs.

III- LES GIBBERELINES OU ACIDE GIBBERELIQUE (GA3).

La gibbérelline a été isolée pour la première fois du champignon *Gibberella fungikura*. On le trouve dans toutes les parties de la plante : méristème des embryons, les tissus en développement et en grande quantité dans les parties jeunes de la plante. Les sites de synthèse sont les tissus des jeunes plantes et de semence en développement. Elle est véhiculée par le xylème et le phloème. Seuls quelques types commerciaux sont disponibles le GA3 et le GA4.

Le GA3 est la forme la plus utilisée en culture.

1- Structure de GA3 (à photocopier)

2- Effets physiologiques des gibbérellines

- ❖ Assure l'élongation des tiges ;
- ❖ Stimule l'allongement des entrenœuds ;
- ❖ Induit la germination des graines ;
- ❖ Stimule la production des enzymes pendant la germination des graines (α amylase) ;
- ❖ L'application exogène stimule la formation et la croissance des fruits ;
- ❖ Permet la maturation des fruits ;
- ❖ Stimule la croissance en affectant la division et l'expansion cellulaire ;

3- Mécanismes d'action des gibbérellines

Il existe une relation entre la production du GA et les enzymes hydrolytiques (qui hydrolysent). Le GA migre dans les aleurones ou la production des enzymes hydrolytiques est stimulée ce qui favorise l'hydrolyse des réserves de l'endosperme (**Schéma à photocopier**).

4- Interaction IAA et GA

Le GA produit des effets similaires à ceux des IAA mais pas identiques. Pour certains tissus lorsque l'IAA est appliqué en premier lieu, l'effet de GA est très minime par contre si le GA est appliqué en premier lieu, l'IAA a un effet plus grand sur l'élongation. Ceci signifie que l'action de GA prend naissance au même site que celle de l'IAA pour ce qui concerne l'élongation cellulaire. Dans son rôle de stimulation de la synthèse protéique par l'IAA, le GA interviendrait au niveau de l'induction enzymatique et de la transcription.

IV- ACIDE ABSCISSIQUES (ABA)

1 - Définition

L'ABA est une substance naturelle présente dans les feuilles matures et véhiculée vers les racines par le phloème et de là peut retourner vers les tiges par le xylème. L'ABA est produit au cours des situations de stress (température élevée, froid, déficit ou excès d'eau, de sel ect.)

2- Structure (à photocopier)

3- Effets physiologiques

- ❖ Inhibe la synthèse protéique ;
- ❖ Stimule l'assainissement ;
- ❖ Stimule la fermeture des stomates : le stockage de l'eau augmente la synthèse de l'ABA ce qui provoque la fermeture des stomates (effet positif) ;

- ❖ Initie comme le GA la formation des fleurs.

4- Mécanisme d'action d'ABA

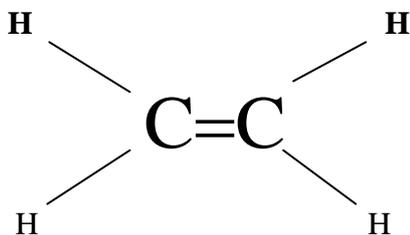
ABA inhibe la synthèse protéique pas au niveau nucléique où l'ARNm est synthétisé mais au niveau ribosomale en empêchant la translocation (traduction).

V- L'ETHYLENE (C₂H₄)

1- Définition

L'éthylène qui est un gaz est aussi une substance de croissance synthétisée à partir de la méthionine dans beaucoup de tissu en réponse à un stress. Il est intensément produit dans les tissus vieillissants ou murissants ou bien qui sont blessés.

2- Structure



3- Effets physiologiques de l'éthylène

- ❖ Inhibe l'augmentation des tiges et la formation des racines ;
- ❖ Stimule le murissement des feuilles ;
- ❖ Stimule la formation des fleurs chez certaines plantes ;
- ❖ Accélère l'assainicence ;
- ❖ Se lie au réticulum endoplasmique pour inhiber la synthèse protéique.

CHAPITRE 2 : LA CULTURE IN VITRO DES MERISTEMES

Introduction

Les méristèmes sont des petits organes fragiles de moins de 1mm, situés au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et assurant la croissance et la mise en place des différents organes de la plante. Exempt de virus, la culture de méristèmes permet la régénération de plantes saines. On distingue habituellement les méristèmes primaires qui assurent la croissance de la plante en longueur au niveau de la tige, des feuilles ou des racines et les méristèmes secondaires, responsables de la croissance en diamètre des organes (comme le tronc) de certaines plantes.

En 1949, le professeur LIMASSET et CORNUET notent l'absence de virus dans les méristèmes de tabacs virosés. En 1952, mettant à profit ces travaux, MOREL et MARTIN à l'INRA de Versailles, régénèrent des plantes entières saines indemnes de virus à partir de culture de méristèmes de plantes infectées par trois virus différents. De la même manière ils sauveront la variété de pomme de terre 'la belle de Fontenay' en 1954. Depuis cette époque, les laboratoires de production des plantes in vitro utilisent cette propriété et cette technique afin d'obtenir des plantes mères totalement saines qui seront à la base de la multiplication des diverses variétés. C'est aujourd'hui encore la seule manière d'éradiquer les virus. En effet, les plantes à multiplication végétative par bouturage, marcottage, drageonnages, bulbes ou tubercules sont particulièrement sensibles aux maladies à virus qui sont transmises à la descendance par les organes de multiplication. Ces maladies virales affaiblissent les plantes le rendement en fruits ou en tubercules est diminuée, la floraison et la croissance sont affectées.

L'assainissement variétal est donc indispensable et doit être accompagné de mesures prophylactiques strictes au niveau de la production pour éviter de nouvelles contaminations.

I- Objectif

C'est la seule manière d'obtenir des plantes saines indemnes de virus.

II- Méristèmes et développement

Seul tissu végétal capable de créer de nouvelles plantes, le méristème est essentiel au développement des végétaux. Il crée ainsi toute la plante : il est à l'origine de la tige, des feuilles, des racines, des fleurs ou encore des branches. Il est en outre responsable de la phyllotaxie (disposition particulière des feuilles, ou des branches autour de la tige).

1- Différents types de méristèmes

Il existe différents types de méristèmes liés aux différents rôles qu'ils jouent au cours du développement et surtout au type de tissus spécialisés qu'ils engendrent.

1-1- Méristèmes primaires

Les méristèmes primaires sont les premiers à se mettre en place et ils forment tous les tissus primaires de la plante.

1-2- Méristèmes secondaires

Les plantes herbacées (dont les monocotylédones) ne font pas de croissance secondaire. Celle-ci permet la croissance en diamètre de la tige qui peut aller jusqu'à la formation d'un tronc. Les méristèmes secondaires créent en effet notamment du bois d'une part et du liège d'autre part. Cependant, cette croissance secondaire de la plante n'a lieu qu'après la mise en place de la structure primaire de celle-ci.

Le méristème secondaire principal est le **cambium** présent uniquement chez les dicotylédones, il est aussi appelé **Assise Génératrice Libéro-ligneuse** (AGLL). Dans les tiges, ce tissu est situé entre le xylème primaire centrifuge d'une part et le phloème primaire centripète d'autre part. Il va ainsi créer des tissus conducteurs secondaires ; les cellules qui le constituent effectuent des divisions radiales de manière à créer :

- ❖ Vers l'intérieur : du xylème secondaire dont la particularité est d'être lignifié. Elles constituent ainsi en plus des vaisseaux un tissu de soutien formant le bois ;
- ❖ Vers l'extérieur : du phloème secondaire que l'on appelle Liber (tissu de soutien).

Les vaisseaux primaires finissent écrasées par la croissance des tissus secondaires. Le deuxième méristème secondaire est le **phellogène** ou **Assise Génératrice Subero-phellogénique**. Celle-ci à l'instar du cambium effectue des divisions radiales créant :

- ❖ Vers l'intérieur : du phellogène. Ce phellogène a pour fonction de régénérer le phellogène ;
- ❖ Vers l'extérieur : du suber plus précisément appelé liège. Le liège a pour rôle la protection de la plante et s'ajoute à celle de l'épiderme.

2- Organisation du tissu méristématique

2-1- Cellules

Les cellules méristématiques ont des fonctions analogues aux cellules souches des animaux : elles sont peu ou pas du tout différenciées et sont capables de continuer la division cellulaire

indéfiniment. La grande différence existante au niveau des cellules souches et les cellules spécialisées, qui n'ont pas le potentiel de différenciation des cellules souches est beaucoup moins marqué chez les plantes : les cellules différenciées des plantes sont capables de se différencier et de reconstruire de nouveaux tissus ou organes. Le bouturage est un exemple de ces capacités.

2-2- Structure du méristème

Le méristème apical primaire peut être divisé en couches ou en domaines :

Figure 1 : organisation en couches d'un méristème apical (à photocopier)

2-2-1- Couches

L'organisation en couches prend en compte les lignées cellulaires qui constituent chacune une couche différente (Fig.1). La couche de cellule la plus externe qui forme l'épiderme est appelé couche L1, la couche sous-jacente est la couche L2. Le tissu le plus interne, qui est plus qu'une couche de cellules forme la couche L3, qui formera le parenchyme médullaire. Les couches L1 et L2 qui ont toutes deux une division anticline forment la tunica du méristème tandis que la couche L3 qui a des divisions à la fois anticline et péricline forme le corpus du méristème.

Figure 2 : organisation en zones d'un méristème apical (à photocopier).

2-2-2- Domaines

Une autre présentation du méristème consiste à le diviser en domaines (ou zones) selon la fonction des cellules. Certains considèrent ainsi que le méristème apical est plutôt un ensemble de méristème spécialisé dans la formation d'un type de cellules spécifique (fig.2). La première zone, la zone centrale est aussi appelé centre quiescent en raison de la faible activité mitotique de ses cellules qui forment ainsi des cellules totalement indifférenciées. Celles-ci se divisent et migrent vers la zone périphérique du méristème. Les cellules de cette zone périphériques sont plus actives et forment les primordia foliaires qui constitueront des organes comme les feuilles (rôle organogénèse). Sous la zone centrale se trouve le méristème médullaire (3), une zone de forte croissance cellulaire qui assure principalement la création des tissus internes (les parenchymes et les tissus conducteurs primaires notamment (4)). Son rôle est donc histogène. La différence principale qui existe entre le méristème apical et le méristème racinaire réside dans le fait que le MAC est à la fois histogène et organogène alors que le MAR est uniquement histogène.

2-3- Régulation de l'activité des méristèmes

L'activité principale du méristème requiert une régulation précise sans quoi le méristème pourrait par exemple s'épuiser ou au contraire produire trop de cellules. En outre, les différents méristèmes doivent avoir une activité déterminée (MAC, MAR, méristème floral ...). Tout cela est réalisable à l'aide des signaux.

3- Etapes de la culture de méristèmes

La culture de méristème est une culture aseptique sur milieu artificiel du dôme apical sans ébauche foliaire. Il mesure 0,2 à 0,3 mm de côté et la dissection se fait sous loupe binoculaire. La technique peut être associée à la thérapie (culture à température élevée pour favoriser l'élimination des virus).

Elle se déroule généralement de la manière suivante : des boutures contenant un bourgeon végétatif sont prélevées sur les variétés à assainir, ces explants sont stérilisés puis disséqués stérilement (sous hotte à flux laminaire) sous une loupe binoculaire afin d'extraire le méristème de l'apex (dôme apical sans feuilles) qui mesure moins de 4 mm. Ce méristème est rapidement déposé dans un tube de culture contenant un gel nutritif. Progressivement les cellules vont se diviser, les feuilles vont se former et au bout d'un mois cette pousse devra être repiquée sur un nouveau milieu pour parfaire sa croissance, puis un mois plus tard il faudra multiplier ou cloner les pousses afin d'obtenir le nombre voulu de plantes saines. Enfin il faudra une étape complémentaire pour enraciner les futures plantes avant qu'elles ne soient acclimatées en serre pour finalement servir de pied mère pour le prélèvement des boutures saines mais préalablement il faudra éviter que les plants obtenus soient bien indemnes de virus en leur faisant subir un test immunologique prouvant l'absence totale de particules virales.

Une partie des plantes assainies peut être conservée au laboratoire à l'abri des pathogènes afin de produire régulièrement à la demande du producteur et sans contingence de saison ou de surface des pieds mères saines sans repasser par la phase du méristème.

4- Avantages de culture des méristèmes

La culture de méristème permet le sauvetage des variétés menacées de disparition car très virosées. Elle concerne essentiellement les plantes à multiplication par voie végétative (bouturage, marcottage...) car cette voie favorise la transmission des virus directement à la descendance. Les plantes produites sont saines : sans virus, champignons et bactéries et répondent aux normes phytosanitaires d'échanges internationaux de plus en plus draconiennes. Les plantes

assainies ont une vigueur accrue et des qualités de floraison et de fructification restaurées. On obtient des variétés conformes à la variété d'origine et que l'on peut multiplier en grande quantité, en plus la production est homogène.

5- Limites de la culture des méristèmes

Les plantes obtenues sont indemnes de virus mais ne sont pas devenues résistantes aux virus. Elles peuvent être récontaminées via des insectes si des mesures de prophylaxie ne sont pas prises. Pour certaines variétés qui présentent des chimères (plantes panachées), par culture de méristèmes il est possible de ne pas retrouver à la régénération ce caractère horticole.

Application sur la culture de l'apex de pommes de terre (travaux de Morel) : on prélève les extrémités de tiges comportant un dôme méristématique et un à deux ébauches foliaires sur des tubercules conservées pendant un certain temps à 50°C. Ils sont mis à germer à 20°C à la lumière et dès qu'ils atteignent 2cm de long, les fragments sont prélevés et stérilisés. Dans une solution d'hypochlorite de sodium, rincés puis l'explant est mis en culture sur un milieu contenant le saccharose, la gélose, la solution de Knop deux fois diluée. Après un certain temps on obtient une cal. Si on ajoute au milieu de la Gibbérelline, il y aura le faible développement des tiges. Des tiges vigoureuses sont obtenues si l'on ajoute de l'acide ascorbique ou du chlorure de potassium. Pour cette culture le K facilite le développement des plantules.

CHAPITRE 3 : LA MICROPROPAGATION IN VITRO OU CLONAGE VEGETALE.

La micropropagation consiste à multiplier un individu donné à partir d'un fragment plus ou moins grand de végétal placé sur un milieu nutritif synthétique. Cette technique est une des premières applications des biotechnologies modernes.

Elle comprend un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part des éléments d'asepsie et d'autre part la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé (milieu défini pour chaque type de plante, condition optimale de température, lumière et d'humidité). Ces méthodes s'appliquent autant à des plantes entières qu'à des fragments de plantes (tissu ou organe) et aussi à des cellules isolées. Alors que la micropropagation traditionnelle est largement utilisée pour les producteurs pépiniéristes par exemple les technologies permettant la sélection des plantes indemnes de parasites ou des plantes résistantes à divers stress ou parasites. La création de nouvelle combinaison génétique par l'hybridation somatique ou la production d'embryon en fermenteurs sont autant d'applications peu transposées dans l'industrie de la production végétale.

1-Technique de micropropagation

Les plantes se reproduisent par la voie sexuée via les graines mais elles utilisent pour certaines aussi une autre voie, celle de la multiplication végétative. La particularité de cette reproduction est que les plantes filles qui en sont issues sont toutes identiques génétiquement à la plante mère : c'est le clonage végétal ou multiplication conforme qui est exploité depuis des siècles par les horticulteurs et jardiniers (bouturage, marcottage, greffage, drageonnage etc.)

La micropropagation in vitro dérive de ce phénomène naturel. On cultive des explants végétaux dans un milieu artificiel et dans un environnement contrôlé. Suite aux subcultures successives, on obtient alors des plantes identiques à la plante de départ et que l'on peut multiplier à l'infini. On exploite ainsi la propriété de totipotence des cellules végétales très différentes :

1. En provoquant le développement de bourgeons axillaires présents naturellement à la base des feuilles (multiplication par bourgeonnement axillaire). Le même développement peut être provoqué à partir de tiges ou d'inflorescences pour autant qu'ils comportent des nœuds et par conséquent des bourgeons axillaires. Cette technique ne fait donc qu'accélérer in vitro le fonctionnement normal de méristèmes de bourgeons déjà formés sur une plante.

2. En provoquant l'apparition de bourgeons adventifs en des endroits inhabituels (multiplication par bourgeonnement adventif). L'initiation de tels bourgeons peut être en principe induite sur n'importe quel type d'organe ou de tissu (feuille, tige, racine ...)

2- Objectif

Il s'agit de produire en grande quantité des cultivars d'intérêts horticoles, sylvicoles ou agronomiques qui viennent d'être créés ou découverts ou qui ont toujours un intérêt. Il peut s'agir également des plantes difficiles à reproduire naturellement.

3-Choix de l'explant

Il varie d'une espèce ou d'une variété à une autre en fonction de l'objectif fixé. Leurs tailles varient de 1 à 5 cm pour les méristèmes à quelques cm pour les nœuds et autres. Chez les ligneux, la dominance doit d'abord être levée à 2°C pendant 7 jours sinon on utilise des fragments de feuilles comme explant.

4-Milieu de culture utilisé

Le milieu de base est le milieu de Murashige et Skoog (1962). Les dilutions sont favorables aux espèces ligneuses. Les autres milieux sont ceux de Quorine et Woody. Les régulateurs de croissance doivent être présents dans ce milieu.

5-Techniques de stérilisation

Les microorganismes sous forme de spore se trouvent partout dans l'air, la paillasse, les doigts, les mains et les blouses. Les travaux doivent être effectués dans une hotte à flux laminaire qui procure de l'air filtré excepté de germe. Les parois de la hotte, la balance et les microorganismes doivent être stérilisés soit à l'alcool 70°C soit à l'hypochlorite de sodium ou de potassium. Il faut également le bec bunsen ou le gaz pour flamber le matériel métallique (pinces, couteaux, anse, scapé ...) avant leur utilisation. La verrerie est stérilisée à la chaleur sèche (dry oven ou étuve) alors que le milieu de culture passe à l'autoclave 121°C pendant 30min. Les substances thermolabiles (hormones, vitamines, aa, protéines) sont ajoutés au milieu après stérilisation par dissociation dans de l'alcool, l'éther, le benzène ou à travers les microspores ou micro filtres.

5-1- Les agents désinfectants

- Hypochlorite de sodium (eau de javel) et de calcium dont le principe actif est l'acide hypochloreux (hoCl). Pour augmenter leur action, on ajoute un agent moussant comme le tween

80 pour faciliter leur pénétration dans les tissus à stériliser soit on dissout l'épiderme dans l'alcool à 90°C ;

- Chlorure de mercure (rincer après pour éliminer leur toxicité) ;

- Eau oxygénée (H₂O₂). L'oxygène forme en présence des tissus végétaux des acides organiques très forts qui agissent en profondeur sur les tissus. Certains antibiotiques comme la streptomycine, la gentamycine, la carbenicilline, les rifampicines ajoutées dans un milieu de culture peuvent définitivement éliminer certaines bactéries. Pour éliminer les champignons on utilise des fongicides agricoles à base de benzimidazole comme le carbendazim ou le fenbendazole ou encore à base d'imidazole comme l'imazalil (Shlieds *et al.*, 1984).

5-2- Désinfection de l'explant

Elle consiste à éliminer les agents contaminants à la surface ou à l'intérieur de l'explant. Plusieurs méthodes sont utilisées en fonction de la résistance de l'explant ou de son degré de pollution.

5-2-1- Méthode classique de Gauthel *et al.*, 1959

L'explant est d'abord lavé à l'eau puis à l'alcool à 70°C pendant 10min. Il est ensuite plongé dans une solution d'hypochlorite de calcium à 5% pendant 10min avant de subir trois rinçages successifs de 5min à l'eau distillée.

5-2-2- Méthode de Haitman et Vester (1983)

Elle est adaptée aux explants fortement pollués. Elle utilise différentes solutions de concentration et à temps d'utilisation variable selon l'explant.

Le tableau ci-dessous indique quelques utilisations des agents désinfectants.

Tissus	Pré-stérilisation	Agents désinfectants	Post-stérilisation	Observations
Graines	Alcool à 70°C (1à2min) et rinçage H ₂ O.	CaOCl, 9à 10% Pendant 5-30min	Lavage à l'eau	On obtient une plantule
Fruits	Alcool à 70°C (1à2min) et rinçage H ₂ O.	CaOCl, 9à 10% ou Na 2%. Pendant 5-30min	3 lavages à l'eau	Efficace, on obtient une plantule

Fragments de tiges	Lavage à l'eau	NaOCl 2%, 2min	Lavage à l'eau	peut-être toxique à l'explant.
Tissus de réserves	Lavage à l'eau	CaOCl, 9-10% 5-30min	Lavage à l'eau	Efficace, on obtient une cal
Feuilles	Alcool 70°C	H2O2, 10-12% 5-15min	3lavages à l'eau	Peu efficace.

L'efficacité de la stérilisation est fonction du temps de trempage de l'explant. Ces paramètres doivent être suffisamment contrôlés puisque la désinfection endommage les tissus. Pour limiter ces dommages la post-stérilisation est indispensable avant l'ensemencement.

6- Mise en culture

Stade préliminaire

L'explant est initialement placé dans une boîte à pétri contenant de l'agar et les éléments minéraux. Si l'explant secrète des composés phénoliques ou toxiques on doit inclure dans le milieu soit un absorbant (charbon actif) soit un antioxydant (acide citrique ou ascorbique). Si l'antioxydant et l'absorbant sont absents, on procède à un transfert successif sur de nouveau milieu.

Stade 1. Etablissement et stabilisation

Il s'agit d'établir l'explant en culture et de stabiliser le milieu pour le développement des bourgeons. Au milieu de base, on ajoute souvent du saccharose. Une concentration modérée de cytokinine (0,5 à 1 mg/l) et une IAA variant entre 0,01 et 0,1 mg/l permettent d'obtenir des tigelles. Une forte concentration en cytokinine permet d'obtenir des bourgeons adventifs. La durée de l'établissement/stabilisation varie en fonction de l'espèce de 6 semaines à un an pour les espèces ligneuses.

Stade 2. Multiplication

Chaque explant du stade 1 qui présente une touffe tigelle ou de bourgeon foliaire ou de cal est séparé et transféré dans un nouveau milieu très souvent du stade 1 mais où la teneur en cytokinine et autres éléments augmentent. La multiplication est répétée plusieurs fois pour accroître le nombre d'individus. Il arrive souvent que les tigelles se nécrosent : on parle de dormance de bourgeons apicaux ou perte de potentialités de multiplication.

Stade 3. Enracinement

Il prépare les microplants à la transplantation en milieu artificiel hétérotrophe en tube à essai ou en atmosphère libre ou autotrophe en serre ou en champs. La transplantation suppose leur enracinement et leur acclimatation. La concentration en agar et en sucre doivent être augmentée ainsi que l'intensité lumineuse. Par contre la concentration en cytokinines doivent être faibles comparées à celle de l'IAA fortes.

Stade 4. Transplantation et acclimatation

Les vitro plantes enracinées de stade 3 sont retirées des tubes. L'agar est complètement éliminé par lavage à l'eau pour éviter les contaminations. Les microplantules sont alors transplantées dans des pots contenant un milieu standard pour l'enracinement puis le transfert en champ.

7- Contamination en cours de culture

Les contaminants les plus courants dans les laboratoires sont les *Staphylococcus*, les *Micrococcus* et les *Lactobacillus* qui sont les contaminants classiques de la peau. Pour éviter ces contaminants, il existe quelques mesures préventives à respecter :

- Repérage précoce des contaminants ;
- Examen minutieux de chaque flacon mère avant repiquage ;
- Flambage et stérilisation minutieux des outils de travail ;
- Désinfection extérieure de flacon mère ;

8- Avantages des techniques de la micropropagation

Les plantes obtenues sont génétiquement identiques à la plante ou variété de départ. La micropropagation permet une production d'un nombre de plantes génétiquement homogènes en un temps relativement court. En 1an, on peut produire en théorie plus de 4millions de plantes alors que traditionnellement on en obtient que 50. Les plantes obtenues sont de qualité car en très bon état de santé avec un enracinement régulier, des ramifications nombreuses donc une vigueur accrue ;

La production des plantes in vitro permet de s'affranchir des saisons. Les cultures peuvent ainsi être programmées afin d'utiliser rationnellement les surfaces en serre. La réduction du nombre de pieds mères nécessaires à la production de boutures permet un gain de place dans les serres donc une économie d'énergie ;

Pour les espèces fruitières ou ornementales, il est possible de en multipliant in vitro de s'affranchir des porte-greffes. Ainsi les arbres ou arbustes obtenus ne présenteront pas de problème de rejet de « sauvageon » ;

La culture in vitro permet de multiplier des plantes stériles. Il est possible de conserver des variétés anciennes à l'abri des pathogènes et parasites dans une espèce très réduit. On peut reboiser très rapidement des plantations qui pourraient être ravagées par des parasites ou des catastrophes naturelles ;

Les vitro plantes sont facilement transportables d'un pays à l'autre sans risque sanitaire.

9- Inconvénients de micropropagation

Le coût du plant in vitro est très élevé que celui d'une bouture obtenue classiquement, il demande une main-d'œuvre spécialisée qui présente 60-70% du prix de revient car l'automatisation est limitée. Les plantes obtenues sont de petites tailles et il y a des possibilités de contamination en cultures.

10- Applications des techniques de la micropropagation

10-1-Technologies appliquées

- Multiplication rapide des plantes ;
- Production d'embryon somatique ;
- Production des plantes dépourvues de virus ;
- Sauvetage de l'avortement d'embryon ;
- Productions des haploïdes ;
- Conservation de germoplasmes ;
- Production de métabolismes secondaires.

10-2-Technologies de développement

- Multiplication des clones adaptés aux conditions environnementales ;
- Transfert génétique par fusion de protoplastes ;
- Transfert génétique par *Agrobacterium*.

CHAPITRE 4 : CULTURE ET FUSION DES PROTOPLASTES

Introduction

La plupart des plantes cultivées sont améliorées en créant artificiellement de nouvelles espèces qui présentent des avantages sélectifs comme la résistance aux maladies, l'augmentation des rendements, l'adaptation aux conditions drastiques. L'obtention des espèces par hybridation ou fusion des cellules somatiques est facilement réalisable chez les animaux mais se heurtent chez les végétaux à la présence de la membrane squelettique. On a donc pensé à débarrasser cette membrane chez les végétaux d'où le nom de protoplaste. La fusion des protoplastes permet :

Soit d'utiliser la diversité des espèces et des celles voisines : l'amélioration génétique d'une variété cultivée repose sur l'exploitation et l'utilisation de la diversité naturelle afin d'associer des caractéristiques intéressants. Toutes fois cette variabilité intraspécifique est limitée. Ainsi pour l'amélioration des caractères de résistances aux maladies, l'adaptation à certaines conditions du milieu, le sélectionneur a souvent recours à des croisements. Ces croisements ont été effectués chez le blé, la betterave, le haricot, le tournesol, la tomate, le melon, la laitue etc.

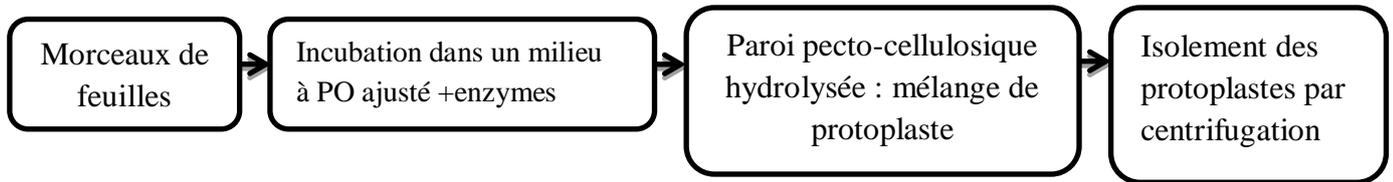
Soit d'augmenter l'accès à la diversité génétique : parfois ces croisements se heurtent à des problèmes d'incompatibilité ou ne permettent pas toujours de travailler les caractéristiques intéressantes. Les techniques permettant de contourner ces difficultés sont les suivantes :

- La mutagenèse et la variation somaclonale (technique peu utilisé car très aléatoire) ;
- Le sauvetage de l'embryon interspécifique (cette technique permet d'élargir les croisements entre les espèces apparentées) ;
- La fusion de protoplaste qui permet la fusion entre les espèces les plus éloignées ;
- La transgénèse qui a pour but d'introduire dans une plante une information génétique définie provenant des espèces, des genres ou de genres différents.

2- Mode d'obtention des protoplastes

On peut séparer les cellules d'un tissu végétal grâce à l'action d'enzymes généralement extraite des champignons qui dégradent la cellule des matières peptiques de la paroi. On obtient une cellule déshabillée qui devient spécifique qu'on appelle **Protoplaste**.

Les protoplastes sont des cellules végétales sans paroi obtenues expérimentalement par digestion de la paroi peptocellulosique. Pour les maintenir en vie il suffit de les conserver dans un milieu Hypertonique. Pourquoi ?



3- Application de la culture de protoplaste

-**Hybridation somatique** : la propriété la plus importante des protoplastes est leur capacité à fusionner entre eux lorsqu'ils sont placés dans un milieu hypertonique. Cette technique permet de surmonter la barrière liée à la reproduction sexuée et de créer les nouvelles combinaisons entre le noyau et le cytoplasme ;

-**Transformation génétique** : du fait de l'absence de la paroi pectocellulosique l'introduction directe de l'ADN dans les cellules est facilitée ;

La fusion de protoplaste est encore appelé Hybridation somatique. Elle consiste à provoquer la fusion de 2 cellules débarrassées de leur paroi. Ces cellules vont ensuite échanger une partie de leur matériel génétique pour donner une cellule aux caractéristiques nouvelles. En théorie la fusion des protoplastes permet d'obtenir toutes les combinaisons mais en réalité de nombreuses régulations ont lieu au même moment de la mitose rendant très difficile cette pratique.

Avec l'hybridation sexuée entre 2 espèces végétales voisines, 2 compartiments génétiques ne seront pas exprimés dans l'hybride : il s'agit de plastides et des mitochondries.

En fusionnant deux protoplastes des espèces différentes plus ou moins proches, les 2 cytoplasmes peuvent s'exprimer dans la cellule obtenue ie confronter les génomes chloroplastiques et mitochondriaux.

Après la fusion, il va se produire plusieurs évènements au sein de la population de protoplaste fusionné :

- a- Soit un seul noyau parental se conserve, soit les 2 noyaux parentaux fusionnent et après la fusion :
 - Soit il se produit une élimination partielle de l'un des génomes ;
 - Soit les chromosomes sont conservés.
- b- Les mitochondries peuvent se réorganiser selon l'une des 2 situations suivantes :
 - soit une seule population parentale est conservée au cours de la régénération cellulaire ;
 - soit l'échange du fragment d'ADN entre les 2 populations parentales vont se réaliser ; on dit qu'il y a une réelle combinaison de l'ADN mitochondrial.

c- Les chloroplastes resteront homogènes et issus d'un seul parent par sélection au cours de la division cellulaire. Au total 24 recombinaisons gène-cytoplasmiques et résultant des distributions d'organites cytoplasmiques.

4- Intérêt et utilisation des hybrides somatiques

Comme elles n'ont plus de paroi, ces cellules se prêtent à divers types d'expérimentations (introduction de matériel génétique étranger, fusion interspécifique, étude électrophysiologiques des membranes plasmiques, études des cycles de vie des virus, étude de la synthèse de la paroi végétale).

5- Limite de la fusion de protoplaste

Le frein essentiel à la mise en œuvre de ces technologies est la difficulté de régénération d'une plante entière à partir de protoplaste fusionné en particulier chez les céréales.

L'élimination plus ou moins complète d'un stock chromosomique de la fusion de protoplaste entre espèces différentes conduit à l'instabilité des hybrides. Les plantes régénérées peuvent être stériles à cause de l'hérédité cytoplasmique.

CHAPITRE 5 : OBTENTION DES PLANTES HAPLOIDES ET HAPLOIDIPLOIDISATION

1- Origine

Les plantes haploïdes sont issues des cellules sexuelles males ou femelles sans fécondation. Les plantes obtenues n'ont qu'un seul lot de chromosomes au lieu de 2 normalement comme chez les plantes diploïdes. Elles peuvent être obtenues par androgenèse, gynogenèse, par fécondation avec du pollen irradié (pollen stérile) ou par croisement interspécifique.

2- Culture d'anthère ou androgenèse ou plante sans mère

C'est la régénération d'une plante entière (n) à partir de la culture des cellules sexuelles males. On cultive soit des pollens immatures, soit des pollens isolés, soit les anthères. L'androgenèse est utilisée pour l'amélioration végétale, par la production des plantes haploïdes. Un doublement de chromosomes permet d'obtenir des homozygotes récessifs diploïdes. Le principe est la mise en culture d'anthère dans lesquels le pollen est formé mais il n'a encore subi la dernière division donnant un noyau végétatif et un noyau reproducteur. Par cette technique, on cherche à obtenir une dérivation du fonctionnement pollinique qui au lieu de présenter une division inégale donnera 2 noyaux fils semblables. Cette modification semble être un préalable indispensable à l'évolution du pollen vers un fonctionnement embryogène ou calogène.

On peut également séparer les grains de pollen et les mettre en culture, ceci supprime les risques de voir les tissus diploïdes se multiplier ce qui est possible avec les anthères. Quand le pollen réagit dans un sens souhaité, on peut noter 3 types de comportements :

Les noyaux se divisent activement mais les cellules ne se séparent pas, on obtient un pollen multi nucléée (30 noyaux) qui n'évoluera pas et disparaîtra ;

Les noyaux se divisent activement ainsi que les cellules, on obtient un cal multicellulaire qui peut être entretenu. Ce cal peut ne pas former de plantule ;

Les noyaux et les cellules se divisent selon un programme ordonné, on observe la formation d'un embryon qui aboutira à la naissance d'une plantule.

Schéma à photocopier

Les plantules obtenues peuvent être repiquées et acclimatées. Certaines d'entre elles seront haploïdes. Cependant l'haploïdie n'est pas obligatoire. En effet, il y a souvent la fusion spontanée de cellules et de noyaux dans les tissus obtenus, ce qui fait qu'on peut y trouver des niveaux diploïdes. Il est donc nécessaire de vérifier par comptage de chromosomes le niveau de diploïdie des plantes obtenues.

Un des principaux avantages de cette méthode est souvent qualifié d'androgenèse in-vitro réside dans la possibilité d'obtenir des plantes haploïdes pouvant servir :

À l'obtention des plantes diploïdes homozygotes (variétés pures), le dédoublement du stock chromosomique peut être obtenu en utilisant la colchicine ;

À la recherche des mutations intéressantes.

3- La gynogenèse ou plante sans père

On cultive des ovules ou des ovaires non fécondées, le plus souvent immature sur un milieu artificiel. On obtient des plantules ayant un seul stock de chromosome. Elle permet de sauver les embryons qui avortent au stade très jeunes s'ils ne sont séparés de la plantule. On peut effectuer les croisements interspécifiques ou la pollinisation avec du pollen irradié. En fécondant un ovule avec le pollen d'une autre espèce souvent sauvage ou proche, il y a développement d'un embryon mais élimination des chromosomes de l'espèce sauvage. La plantule qui se développe peut être donc haploïde.

4- Production des graines haploïdes

Les évènements conduisant à la formation des graines hybrides à la suite du croisement entre 2 parents sont :

- La germination du pollen ;
- La croissance du tube pollinique ;
- Le développement de l'embryon et de l'albumen résultant de la double fécondation ;
- La maturation des graines.

Il existe des barrières d'hybridations qui peuvent se manifester à l'une ou l'autre de ces étapes conduisant à l'échec du croisement. Ces barrières sont généralement classées en 2 grandes catégories :

- **Première catégorie** : les barrières qui quittent de préfécondation qui s'unissent par la non germination du pollen sur pistil, l'arrêt de la croissance du tube pollinique de pénétrer l'ovule ou la non fusion des noyaux males et femelles.
- **Deuxième catégorie** : les barrières dites de post-fécondation qui regroupent celles survenant pendant ou après la syngamie. Ces barrières sont responsables de la non viabilité de l'embryon hybride et peuvent être dus à :
 - l'arrêt de développement de l'albumen ou sa dégénérescence peu de temps après la fécondation privant ainsi le gros embryon des éléments nutritifs normalement fournis par l'albumen ;
 - l'arrêt du développement de l'embryon dû à l'action des gènes dilataires provoquant son avortement au stade globulaire ;
 - l'arrêt de la croissance de l'embryon causé par la dégénérescence du suspenseur ;
 - le développement anormal des tissus maternels ovariens ;
 - l'absence de synchronisme entre le cycle mitotique des chromosomes des 2 parents.

5- Intérêt des haploïdes

Les haploïdes sont très utiles pour les travaux de mutagenèse car ils expriment directement les mutations récessives en l'absence d'interaction allélique. Ils sont également un excellent support pour le géni-génétique. Lorsqu'on double le nombre de chromosome d'un haploïde, on obtient des lignées Haploïdes Doubles (H.D) qui sont parfaitement homozygotes car ils possèdent 2 copies identiques de chaque gène de chromosome. Ces lignées H.D se reproduisent identiquement à elles-mêmes au cours des générations par autofécondation pour donner des lignées pures ou fixées et qui peuvent être exploités pour donner de variétés fixées. L'objectif de l'haplodiploïdisation est d'obtenir des plantes haploïdes doublées.

6- Avantages de l'haplodiploïdisation

Ces techniques amènent un important gain de temps ce qui permet de mettre plus rapidement sur le marché des nouvelles variétés présentant des avantages pour l'agriculteur. En effet, une plante homozygote est directement obtenue ce qui évite de faire une dizaine de génération d'autofécondation pour l'obtention de lignées pures.

7- Limites des plantes haploïdes

Le rendement dépend souvent du cultivar et on obtient également un grand nombre d'albinos non viables.

CHAPITRE 6: EMBRYOGENESE SOMATIQUE OU CULTURE D'EMBRYON

L'embryon est une plante au stade initial de son développement. Il s'agit d'une structure bipolaire qui suite au processus de germination donne une nouvelle plante à partir d'une cellule (zygote) formé lors de la reproduction sexuée (embryon zygotique).

1- Culture d'embryon

On distingue deux types de cultures d'embryon : culture d'embryon mature et culture d'embryon immature.

1.1- Culture d'embryon immature

Cette technique permet d'éviter la phase de maturation des graines. Par cette technique, les embryons sont prélevés quelques jours après la fécondation et non à la maturité des graines, ce qui permet de réaliser plusieurs génération par an. Selon les espèces, les embryons sont prélevés plus ou moins tôt après la fécondation. En effet, un très jeune embryon risque d'avoir une croissance perturbée et plus lente contrairement à un embryon plus développé qui est par ailleurs plus facile à prélever. Les embryons sont ensuite mis en culture pour générer une plante entière. La culture in vitro des embryons permet de réduire fortement la dormance des graines fraîchement récoltées et ainsi assurer un développement homogène d'embryon.

Cette technique permet un gain de temps par réduction de durée entre deux générations. On peut cultiver plusieurs embryons par an et accélérer le processus classique de sélection.

Application de la culture d'embryon immature : cette technique est très pratiqué chez *Helianthus annuus*. Ainsi, elle permet d'obtenir 4 à 5 générations par an au lieu d'une seule génération en culture normale. Elle est très utilisé pour la fixation des lignées, la reconversion des lignées males fertiles en male stérile ou l'introduction des gènes de résistances.

Les jeunes graines sont prélevées 8 à 15 jours après la fécondation selon les génotypes puis elles sont désinfectées et disséquées. Les embryons ainsi isolés sont en culture en boîte à pétrie. Au cours de 3 à 5 jours, on observe la formation des cotylédons. Elles sont transférées en milieu d'enracinement jusqu'à l'apparition d'un système racinaire développé. Les plantules ainsi obtenues sont mises en acclimatations puis repiquées sur le terrain.

1.2- Culture d'embryon mature

Elle provient des fruits mûrs et est utilisé pour enlever l'inhibition de la germination des graines. Ce type de culture est facile car il nécessite un milieu de culture très simple.

Chez les dicotylédones, il ya un seul développement mais on peut assister à un développement pluri cotylédonaire.

a- Facteurs influençant sur le succès de la culture d'embryon.

- Le stade de développement de l'embryon au moment de prélèvement. On dit que les petits embryons indifférenciés sont plus difficile à cultiver ;
- La composition du milieu de culture : les embryons immatures requiert un milieu de culture plus complexe que celui des embryons matures. Les micros et macro éléments doivent être ajoutés à chacun des milieux ainsi que les sucres, l'agar et un Ph compris entre 5-6 ;
- L'oxygène et la lumière sont nécessaires pour induire la germination des graines et la synthèse chlorophyllienne mais la lumière peut inhiber la germination de certaines espèces comme l'orge ;
- Les conditions de développement de l'embryon : le traitement de l'inflorescence par la GA permet d'augmenter la taille de l'embryon ;
- La température : elle est fonction de l'espèce et varie de 4-17°C.

2- Sauvetage de l'embryon interspécifique

Lors du croisement interspécifique, il ya des barrières naturelles empêchant le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on procède à un prélèvement précoce de l'embryon après la fécondation pour le mettre en culture dans un milieu artificielle : cette technique est appelé sauvetage de l'embryon interspécifique.

2.1- Embryogenèse somatique

On appelle embryogenèse somatique une forme de multiplication végétative qui permet d'obtenir une multitude de plantule identique génétiquement à la plante donneuse de l'explant.

a- Types d'embryogenèse somatique

Il existe 3 types :

- L'embryogenèse somatique adventive qui se développement à partir des cellules du cal associées aux appareils reproducteurs. Il s'agit des cellules pro-embryogéniques. Des cals peuvent provenir du tissu nucellaire (tissu de l'ovule) et pourront donnés naissance à des embryons bipolaire qui vont se comporter comme des embryons zygotiques ;

- Polyembryogenèse somatique : il ya mise en culture d'une masse en suspension qui précède la formation de l'embryon. La prolifération des cellules immatures donne lieu à un phénomène embryogénique ;
- Embryogenèse somatique inédite : elle résulte des cellules somatiques et des suspensions cellulaires après que ces tissus ait fait l'objet d'un traitement spécifique.

3- Avantages de l'embryogenèse somatique

Elles s'adaptent à l'automatisation ce qui permet de réduire les temps productions, les rendements sont très élevés et les embryons obtenus sont d'origine cellulaire. Il n'ya pas de chimères.

4- Les difficultés

Le passage par cal peut permettre l'obtention des variantes qui seraient différents de la plante de départ. L'induction du potentiel embryogénique et la régénération sont souvent difficile.

CHAPITRE 7 : LE COMPOSTAGE

INRODUCTION

Le compostage est un processus biologique qui fait intervenir des microorganismes variés (bactéries, champignons, nématodes, protozoaires, levures etc.) pour dégrader partiellement ou complètement diverses matières organiques biodégradables. L'incorporation de ces trois grands groupes de microorganismes (mésophiles, thermotolérants et les thermophiles aérobies) dans le sol augmente la fertilité, la structure ou d'autres effets s'ils ont une activité intense, s'ils sont en nombre élevé ou à travers leurs caractéristiques biochimiques spécifiques. Le compost est alors le produit obtenu lors du processus de compostage.

1- Le processus de compostage en tas

Le processus de la décomposition de la matière organique en tas comprends plusieurs phases qui dépendent de la température dans le tas :

- Une phase d'échauffement ;
- Une phase de refroidissement ;
- Une phase de maturation.

Ces phases sont différentes les unes des autres parce que le processus se déroule très progressivement.

2.1- La phase d'échauffement

Pendant cette phase, on assiste à une production de chaleur dans le tas de compost. C'est ce qu'on appelle échauffement, qui est le résultat de la décomposition des fibres dures et complexes de la matière organique. C'est au centre du tas de compost que l'échauffement est le plus important. La constitution du tas doit tenir compte de trois facteurs importants : la diversité de la matière organique biodégradable ; la diversité et la présence des microorganismes de décomposition ; l'aération (en oxygène et en eau) du tas. Au cours de cette phase, les microorganismes se multiplient et se transforment rapidement, c'est ce qui augmente la production de chaleur et accélère le processus. L'échauffement débute 4 à 5 jours après la formation du tas et peut durer d'une à deux semaines. L'échauffement est maximal lorsque la température dans le tas de compost est comprise entre 60 à 70°C. Grace à sa température élevée, l'échauffement à une action purifiante. Elle détruira un certain nombre de pathogènes à l'Homme et aux plantes.

Pour contrôler l'échauffement il faut :

- Eviter la température très élevée qui détruiraient les microorganismes de décomposition et arrêteraient le processus ;
- A température très élevée, le processus se transformerait en une combustion ce qui ferait perdre les substances nutritives du compost ;
- Réduire l'apport en air en empêchant les températures très élevées.

N.B : Pour limiter l'action des pluies, les pertes en azote et pour maintenir les températures interne élevée, chaque tas est recouvert d'une couche de paille et d'un papier plastique.

2.2- La phase de refroidissement

La phase d'échauffement se transforme progressivement en une phase de refroidissement. La décomposition a lieu sans dégagement de chaleur important si bien que la température baisse. Au cours de cette phase, un autre groupe de microorganismes (thermo tolérant) transforme la combinaison organique issue de la première phase en humus. Le tas reste chaud en son centre et la température baisse de 50 à 30°C. La durée de la phase de refroidissement dépend de la manière dont le tas est construit, du substrat utilisé, de l'entretien du tas ou du climat. Il dure en principe au moins deux (2) mois.

Pour contrôler le refroidissement, il faut régulariser la température en jouant sur l'apport d'eau et d'air.

2.3- La phase de maturation

C'est la phase finale du processus de compostage pendant laquelle la température baisse selon le climat entre 12 à 25°C. En plus des bactéries mésophiles, on voit intervenir les protozoaires qui vivent dans le sol. Ce sont surtout les vers de terre qui se nourrissent de la matière organique fortement décomposée ou des termites. Cette phase peut durer aussi longtemps que possible mais le compost est prêt quand il est meuble et qu'il a l'aspect d'une terre brun-noir. Le compost mûr doit être broyé et tamisé pour en débarrasser les particules non dégradables.

3. Dimensions et construction des tas du compost

La largeur de base idéale de tas de compost est de 2 à 2.5 m. Sa longueur dépend de la quantité de matière organique disponible. Le volume initial du tas doit être supérieur à 1m³, sinon la température interne restera trop basse et le processus de décompositions se déroulera très lentement ou incomplètement.

Le processus de compostage se déroule dans de meilleures conditions lorsque la matière organique en tas est disposée en couches : les couches facilement compostables en alternance avec les couches difficilement décomposables.

Pour augmenter la température le tas sera recouvert tout au moins la partie supérieure d'un plastique. Ce plastique pourra aussi réduire l'excès d'eau pendant les périodes de pluies ou empêcher la plus grande évaporation de l'humidité du tas pendant les périodes sèches. Il est conseillé de pourvoir le tas de conduits d'aération pour empêcher l'acidification et les mauvaises odeurs. Des piquets d'environ 5 cm de diamètre doivent être placés verticalement lors de la construction du tas mais doivent en être 4 à 5 jours après pour éviter de transformer le processus d'échauffement en une combustion. Un tas de compost trop sec doit être arrosé régulièrement.

4. Matériel et méthodes de compostage

Plusieurs méthodes sont employées pour la fabrication du compost : la méthode Indore, la méthode Heating et la méthode Bangalore ; en fonction des facteurs qui influencent le processus, on peut choisir l'une ou l'autre des méthodes ou faire la combinaison des trois méthodes.

La méthode Indore est beaucoup plus utilisée pour la préparation du compost en couches. Le tas sera formé successivement de bas en haut :

- D'une couche de jeunes branches (2 cm) ;
- D'une couche de déchets ménagers (10cm) ;
- D'une couche de l'inoculum (2cm) ;
- D'une couche de paille (2cm) ;
- D'une couche de déchets de bœufs etc.

CHAPITRE 8 : PRODUCTION DES ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIÉS.

Introduction

Des plantes peuvent être régénérées assez facilement à partir d'une cellule somatique. La cellule végétale est donc apparue comme l'unité fondamentale dans le processus de la création d'une lignée de végétaux transgéniques. Sa propriété de totipotence lui confère *in vitro* dans des conditions contrôlées, la capacité de régénérer une plante entière. La paroi pectocellulosique cellulaire rigide constitue un véritable obstacle au transfert de gène, qui est contourné par l'utilisation des bactéries du genre *Agrobacterium* possédant un système naturel de transfert de gènes aux cellules végétales. La transgénèse est la technique permettant d'insérer des gènes étrangers dans des plantes ou des animaux et qui aboutit à la création des organismes génétiquement modifiés.

I- La transgénèse

1- Les étapes de la transgénèse

Étape 1 : Identifier, isoler, intégrer et multiplier un gène d'intérêt.

La première étape est l'identification d'un caractère que l'on introduit dans la plante comme par exemple des caractères de qualité nutritionnelle, la résistance à certains insectes, certaines maladies, à des herbicides etc. Le gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant, animal ou bactérie puisque le code génétique est universel. Il doit ensuite être isolé de l'organisme donneur. Il est intégré dans une construction génétique associant souvent un gène marqueur. Ce gène marqueur permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt. La construction génétique est ensuite clonée afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN pour son introduction dans les cellules végétales que l'on veut transférer.

Étape 2 : Transférer le gène. Il ya plusieurs méthodes pour introduire un gène dans une cellule.

- La transformation biologique : cette technique utilise une bactérie du sol du genre *Agrobacterium* qui a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante afin de la parasiter. Ainsi, une construction génétique introduite dans la bactérie sera transférée dans la plante et intégrée à son génome. C'est la technique la plus couramment utilisée.
- Le transfert direct : cette technique fait intervenir soit une projection d'ADN dans les cellules de la plante par l'utilisation d'un canon à particules qui projette dans les cellules des microparticules enrobées d'ADN (biolistique) soit l'introduction d'ADN

dans les protoplastes par action d'agent chimique ou d'un champ électrique (électroporation).

Étape 3 : Régénérer et évaluer les plantes transformées

Après sélection des cellules transformées, il faut régénérer les nouvelles plantes transgéniques. Les cellules transformées se développent d'abord en cal. Après quelques semaines, on observe le développement des pousses. Elles sont alors placées dans un nouveau milieu de culture permettant le développement des racines. Quand les racines sont suffisamment développées, les plantules sont repiquées en pot et acclimatées en serre.

Étape 4 : Incorporer dans une variété commerciale

Les plantes transformées obtenues sont soumises à des croisements contrôlés pour étudier les modalités de transmission du nouveau caractère à la descendance.

2- Transformations biologiques : Relation naturelle *Agrobacterium*-hôte

Les bactéries du sol des genres *Agrobacterium tumefaciens* et *rhizogenes* accomplissent des transferts naturels de gène dans les plantes à travers une blessure et par l'intermédiaire d'un ADN plasmidique particulier (plasmide-Ti).

Agrobacterium tumefaciens est responsable de la galle de collet «crown gall» chez la plante infestée. C'est une formation tumorale basée sur une prolifération cellulaire anarchique et indéterminée au site d'infection. On peut les trouver sur les feuilles, les tiges ou les racines. Sur les racines, elle est provoquée par *Agrobacterium rhizogenes* et est responsable du chevelu racinaire ou «hairy root». Dans les deux cas, la pathogénécité est portée par le plasmide –Ti ou Ri.

3- Transfert direct

Des méthodes de transfert direct utilisent des moyens physiques ou chimiques pour permettre la pénétration d'ADN généralement sous forme de plasmide dans une cellule végétale. Les plus utilisées sont la biolistique et le transfert sur protoplaste.

3-1- La biolistique

Le principe consiste à projeter sur des tissus des microparticules de tungstène ou d'or de 1 à 3 µm de diamètre enrobées d'ADN à l'aide d'un canon à particules. La force de propulsion est obtenue soit par explosion d'une poudre dans une balle, soit par détente d'un gaz sous pression.

Certaines des microparticules vont pénétrer dans les cellules transportant avec elles l'ADN. Cet ADN doit ensuite atteindre le noyau et s'y intégrer.

3-2- Le transfert sur protoplastes

Les protoplastes sont un matériel privilégié pour le transfert direct. Débarrassées de leur paroi, ces cellules ne présentent aucun obstacle à l'intégration de l'ADN. Les molécules d'ADN pénètrent dans les protoplastes, elles doivent atteindre ensuite le noyau et s'intégrer dans un chromosome de la cellule végétale. Deux techniques principales permettent d'introduire l'ADN dans les protoplastes.

3-2-1- L'action du PolyÉthylène Glycol (PEG)

Le PEG est un polymère qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane. Cette méthode a permis l'obtention de maïs résistant à une matière active herbicide, le glufosinate. Elle est également utilisée chez la betterave.

3-2-2- L'Électroporation

L'Électroporation découle de l'observation selon laquelle la perméabilité de la membrane cellulaire augmente significativement lorsqu'elle est placée dans un champ électrique intense. Chez les végétaux, cette méthode consiste à soumettre un mélange ADN-Protoplaste à un choc électrique pendant une fraction de seconde. La membrane plasmique se trouve ainsi perméabiliser, ce qui permet l'intégration de l'ADN dans les cellules.

II- Domaines d'application de la transgénèse

Les applications de la transgénèse peuvent être regroupées en cinq grands domaines : l'environnement, l'agronomie, l'alimentation, la santé et l'industrie.

1- L'agronomie

De nombreux travaux de transgénèse concernent l'introduction de gènes de résistance aux herbicides ou aux insectes et dans une moindre mesure à certains virus et maladies. Associées à un usage raisonné de pesticides et d'herbicides, ces plantes transgéniques vont améliorer l'efficacité de l'agriculture tout en respectant encore mieux l'environnement.

2- L'alimentation

Il s'agit de modifier la composition d'une plante afin de lui apporter des avantages nutritionnels et gustatifs ou de lui conférer de nouvelles caractéristiques qui permettent de diversifier les débouchés. En alimentation, la transgénèse permet d'améliorer les qualités nutritionnelles, d'accélérer la maturation des fruits et la transformation agro-alimentaire.

3- L'industrie

Les biotechnologies ont garantis de nombreuses perspectives dans les domaines de l'industrie comme par exemple les pâtes à papier, les huiles industrielles et les colorants. Dans le domaine des pâtes à papier, de nombreux travaux conduits par la recherche française ont permis de connaitre les gènes impliqués dans la synthèse des lignines et de développer des variétés de peupliers transgéniques chez lesquels le taux de lignine est fortement réduit. Ceci facilite le blanchissement de la pâte à papier et donc réduit l'impact sur l'environnement.

4- La santé

Génétiquement modifiées, des plantes de tabac, de maïs ou de pomme de terre peuvent produire des molécules thérapeutiques ou des vaccins. Le grand avantage de la production de ces molécules est l'absence de risques de contamination par des virus pathogènes pour l'homme.

Des chercheurs américains travaillent à la mise au point d'une banane vaccin pour l'homme, prévenant les cas de gastro-entérites provoquées par la bactérie *E.coli*. Il serait alors envisageable de vacciner à faible coût les populations de pays en voie de développement, les plus touchées par ces diarrhées d'origine bactérienne.

D'autres travaux sont actuellement en cours pour faire produire des protéines ou des glycoprotéines à usage thérapeutique à partir de soja, de tabac de pomme de terre, de riz, de colza ect.

5- L'environnement

Le recours à des variétés transgéniques permet une moindre utilisation des insecticides et des herbicides et ouvre le champ de la recherche sur les pratiques culturales simplifiées. La transgénèse offre aujourd'hui un outil supplémentaire aux agriculteurs pour limiter les traitements chimiques et protéger les récoltes contre les insectes et les maladies et ainsi réduire les pertes. Jusqu'à présent, pour toutes les variétés mises sur le marché, les gènes introduits proviennent de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (d'où l'abréviation Bt donnée aux plantes de

ce type). Cette bactérie est bien connue depuis longtemps pour ses propriétés insecticides et largement utilisé en agriculture biologique.