

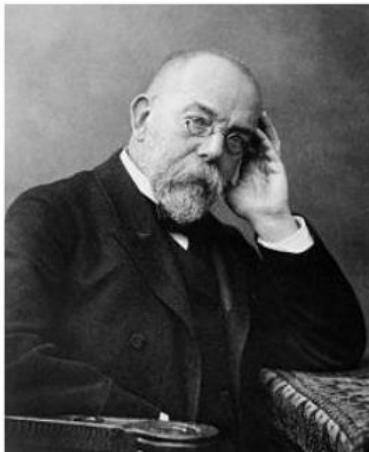
CHAPITRE I. DÉFINITIONS ET IMPORTANCE

Historique

Au 19^{ème} siècle, les travaux des trois savants: Louis Pasteur; Robert Koch et Grégor Mendel posent les bases de la biotechnologie moderne. Louis Pasteur et Robert Koch développent la bactériologie et les concepts de maladie microbienne, d'immunité et de vaccination. Johann Grégor Mendel décrit les lois qui régissent la transmission des caractères biologiques entre les générations (lois de l'hérédité).



Louis Pasteur



Robert Koch

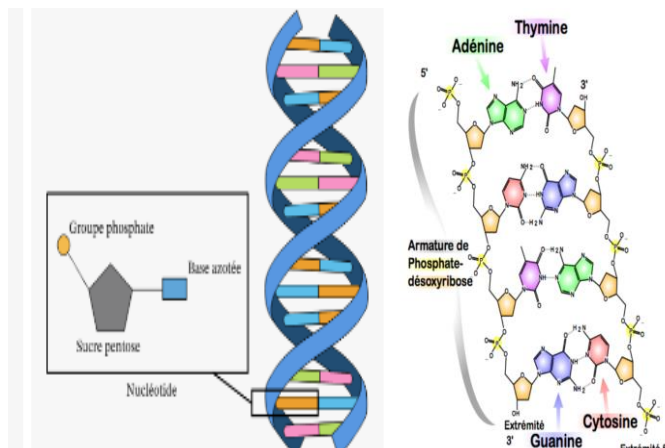


Johann Grégor Mendel

La seconde moitié du 20^{-ème} siècle connaît une véritable accélération de la connaissance du vivant grâce aux progrès de la science et aux avancées technologiques. En 1944, le microbiologiste américain Oswald Avery démontre que l'ADN est le support de l'hérédité. En 1953, James Watson et Francis Crick poursuivent les travaux d'Avery : ils découvrent la structure de l'ADN, ce qui rend possible la manipulation directe des caractéristiques génétiques.



James Watson et Francis Crick



La structure de l'ADN

Les techniques d'insertion de gènes « étrangers » dans le patrimoine génétique des bactéries ont d'abord été développées dans les années 1970. Ces développements marquèrent une étape décisive dans la révolution de la biotechnologie. Le premier produit issu de la biotechnologie moderne fut l'insuline recombinante, une protéine produite par le pancréas et utilisée par le corps pour réguler la

concentration de glucose dans le sang. Les patients diabétiques ne pouvant plus produire leur propre insuline. En 1978, le gène de l'insuline humaine est transféré dans la bactérie *Escherichia coli*, dans le laboratoire d'Herbert Boyer à l'Université de Californie à San Francisco. Depuis le milieu des années 1990, le domaine de la transgénèse est le plus médiatisé et toujours en expansion. Mais des progrès sont attendus dans les domaines des nanotechnologies et de la bio-informatique.

Biotechnologie : Origine étymologique du mot

Qu'est ce que la Biotechnologie ?

La biotechnologie est une science multidisciplinaire qui associe les potentialités d'une entité vivante ou une partie de cette entité à différentes techniques et procédés dans un but économique. Actuellement la biotechnologie est considérée parmi les technologies les plus émergentes, en raison des grands progrès de la biologie moléculaire ces dernières années.

Le mot biotechnologie est formé de deux termes :

- Bio dont l'origine grec est Bios ce qui signifie la vie. Ce terme a évolué au mot Biologie au début du XIXème siècle.
- Technologie venant du grec Technologia.

Ce mot est apparu dans les textes français en 1656 pour désigner « l'étude des techniques, des outils, des machines et des matériaux » Selon Robert Bud, le terme «biotechnologie» a été utilisé par l'hongrois Károly Ereky en 1919 pour décrire une technologie basée sur la conversion des matières premières organiques en un produit plus utile dans un livre intitulé «La biotechnologie de la viande, la graisse et la production de lait dans une agriculture à grande échelle». Depuis son apparition, la notion de la biotechnologie a été définie de diverses manières

Définitions

- ❑ Ensemble des méthodes et techniques qui utilisent des organismes vivants ou leurs composants pour fabriquer ou modifier des produits, dans le but est d'améliorer des végétaux ou des animaux, ou pour développer des micro-organismes destinés à des applications spécifiques.
- ❑ Toute technique utilisant des êtres vivants (micro-organismes, animaux, végétaux), généralement après modification de leurs caractéristiques génétiques, pour la fabrication industrielle de composés biologiques, de substances ou de biomatériaux (médicaments, matières premières industrielles) ou pour l'amélioration de la production agricole (plantes et animaux transgéniques [organismes génétiquement modifiés = OGM]).L'industrie biotechnologique agit en employant ces techniques, notamment dans les domaines agricole et agroalimentaire, dans la chimie et dans l'industrie pharmaceutique.
- ❑ La biotechnologie recouvre les techniques visant l'exploitation des micro-organismes, des cellules végétales et animales et de leurs constituants, tout en utilisant des processus biologiques à des fins industrielles.

- ❑ La biotechnologie est une science multidisciplinaire qui associe les potentialités d'une entité vivante ou une partie de cette entité à différentes techniques et procédés. Les biotechnologies englobent les deux domaines de recherche : la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Elles concernent différents secteurs et industries : médicales, agronomiques, pharmaceutiques, agroalimentaires et écologiques.

La biotechnologie un domaine multidisciplinaire

La biotechnologie est un domaine clairement multidisciplinaire impliquant la biochimie, la biologie moléculaire, la génétique, l'immunologie, la microbiologie, la pharmacologie, la fermentation, l'agriculture, etc. Chacun des domaines contributifs apporte son propre vocabulaire spécial et les normes de nomenclature et les difficultés considérables de communication sont le résultat.

La biotechnologie peut être examinée de deux façons différentes : d'un point de vue horizontal, qui distingue les techniques utilisées ou d'un point de vue vertical, qui se concentre sur les secteurs d'application industrielle.

Les applications de la biotechnologie sont très diverses et leurs avantages sont tellement évidents que les industries les intègrent actuellement dans leurs processus de production d'une manière ou d'une autre. Voici quelques-uns des secteurs ayant implanté des procédés biotechnologiques dans leur production :

• agriculture, • élevage, • aquaculture, • sylviculture, • pharmacie, • diagnostic, • chimie fine, • chimie médico-légale, • alimentation, • savons et lessives, • textile, • papier, • biorémédiation. La biotechnologie a permis à ces secteurs :

- ✓ D'élaborer des produits nouveaux ou meilleurs,
- ✓ D'économiser du temps et de l'énergie,
- ✓ D'être plus respectueux de l'environnement.

Certains industriels et certains laboratoires ont proposé de classer les biotechnologies en « catégories colorées » :

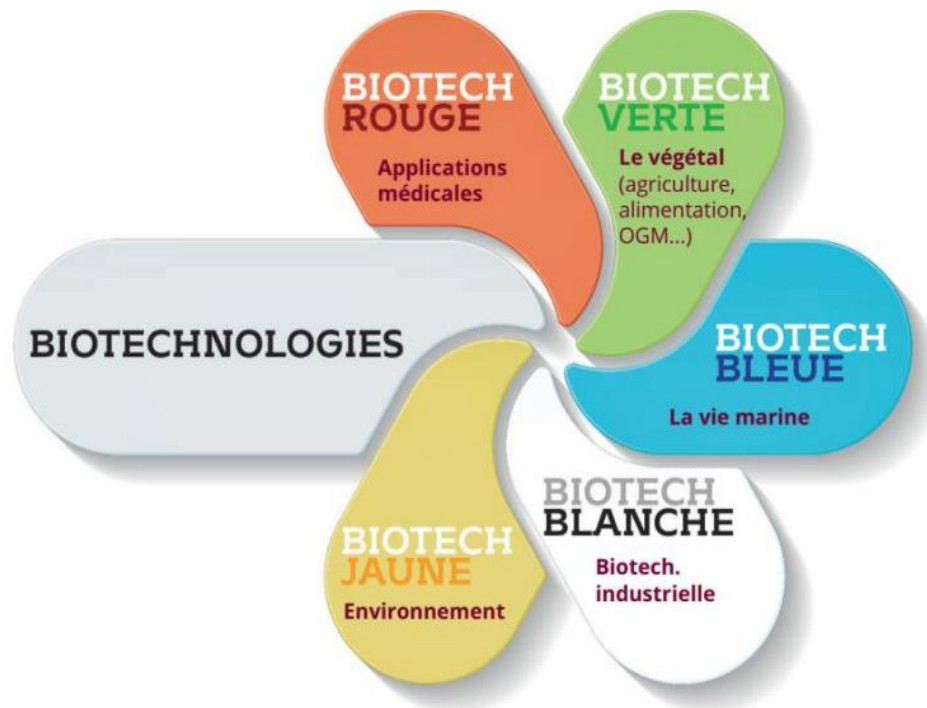


Figure. Principales applications de la biotechnologie utilisant le code des couleurs

Définition des biotechnologies végétales

Ensemble de techniques qui font appel à la culture in vitro et à la biologie moléculaire (BM) et qui ont pour but de s'affranchir des limitations liées à la reproduction sexuée : il s'agit de techniques de Laboratoire qui mettent en jeu la culture in vitro.

Ceci est lié à une propriété fondamentale qu'ont les cellules végétales: **la totipotence cellulaire** Concept énoncé par Haberlandt en 1902 Vérifié plus tard par la découverte des hormones végétales. C'est la capacité de certaines cellules ou groupes de cellules prélevées sur un organe quelconque de plantes, de régénérer un individu complet et normalement constitué, au travers d'un processus de :-Dédifférenciation-Multiplication-Différenciation cellulaire Chez les végétaux , toutes les cellules sont totipotentes. Chez les mammifères, l'ovocyte et chaque cellule fille (blastomère) de l'embryon pendant les toutes premières divisions cellulaires sont les seules vraies cellules totipotentes fécondées

Objectifs des biotechnologies végétales (ou vertes)

- ✓ Créer des nouvelles variétés de plantes : Adaptées aux besoins de l'agriculteur, mieux adaptées aux techniques culturales, aux conditions climatiques, plus résistantes aux maladies, une meilleure efficacité racinaire, meilleur rendement...
- ✓ Adaptées aux besoins du consommateur (homme, animal), avec de fortes teneurs en protéines ou en métabolites spécialisés, homogènes d'un point de vue qualité, présentant une aptitude à l'alimentation humaine ou animale...
- ✓ Adaptées aux utilisations non alimentaires Alicaments, produisant des molécules thérapeutiques, produisant des matières renouvelables pour la chimie, piégeant dans le sol des polluants comme les métaux lourds

CHAPITRE II. LA MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE TRADITIONNELLE

Définition

La multiplication végétative ou reproduction asexuée est un mode de reproduction qui ne fait intervenir qu'un organe de l'appareil végétatif.

La multiplication végétative consiste donc à reproduire une plante à partir d'un organe de l'appareil végétatif, elle peut être faite :

- A partir des tiges aériennes (ex : le manioc)
- A partir des feuilles (ex : le géranium)
- A partir des bourgeons (ex : le dahlia)
- A partir des racines (ex : le dahlia)

- A partir des tiges souterraines (ex : les pommes de terre)

B- LES DIFFÉRENTES FORMES :

Il y a deux formes de multiplication végétative :

- La multiplication végétative naturelle
- La multiplication végétative artificielle

1- La multiplication végétative naturelle :

C'est la multiplication normale des plantes dites à rhizomes ; à tubercules ; à stolons.

2- La multiplication végétative artificielle :

Dans cette forme de multiplication l'homme intervient ; on distingue trois types : LE BOUTURAGE, LE MARCOTTAGE, LE GREFFAGE.

C- MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE ARTIFICIELLE :

1- LE BOUTURAGE :

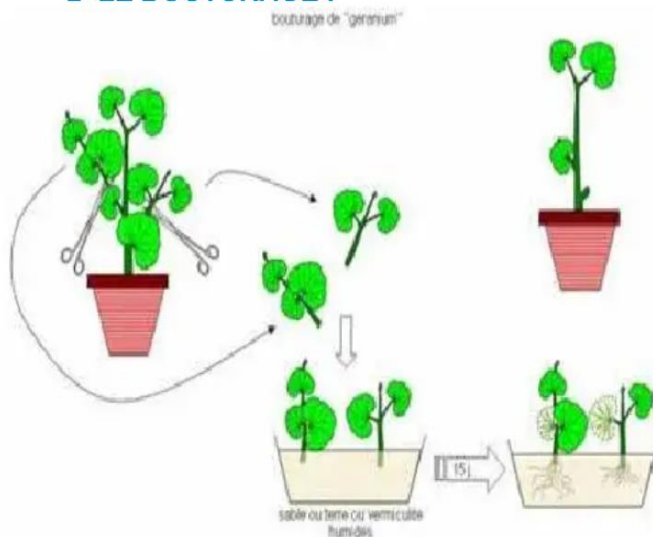


Figure. Le bouturage

1.1- Définition :

Le bouturage consiste à détacher et à isoler de la plante mère, un fragment d'organe végétatif (bouture) et à le mettre en terre sans racine au bout de quelque temps il y a apparition des racines :

1.2- Pratique du bouturage :

On prépare des boutures de 15 à 20 cm, ayant au moins 4 à 6 nœuds avec des bons bourgeons. On les mets à terre avec une bonne orientation et en prendras soin de ne jamais enfoncez que les 2/3 inférieurs de la bouture.

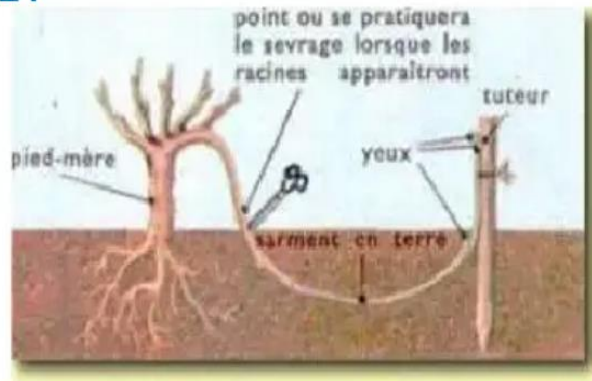
1.3- Condition de réussite du bouturage :

- Afin d'assurer la réussite des boutures ; il faut :
- les maintenir dans une terre fraîche
- les soustraire à une transpiration exagérée
- les boutures doivent porter peu de feuilles
- les boutures doivent présenter une section bien nette afin de faciliter la cicatrisation
- les boutures ne doivent être ni trop de jeunes ni trop vieille
- planter les boutures dans un sol bien aéré

1.4- Intérêt :

Le bouturage est une méthode simple et pratique facile à réaliser. Le bouturage donne des plantes identiques à la plante mère.

2- LE MARCOTTAGE :



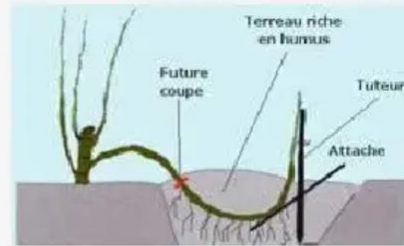
2.1 : Définition :

Le marcottage consiste à recourber dans un sol humide ou à introduire dans un pot fondu latéralement une partie d'un rameau sans le détacher de la tige mère : le rameau ainsi préparé est un marcottage. Ainsi, le marcottage consiste à faire développer des racines sur des tiges dressés ou rampantes sous quelques centimètres de terre.

2.2- Les différentes sortes de marcottage :

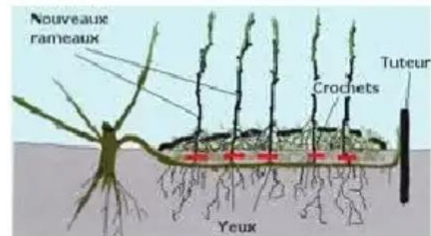
a) Marcottage par couchage ou en archet :

On courbe un rameau et on en terre au niveau de la courbe incisée longitudinalement et maintenue par un étrier.



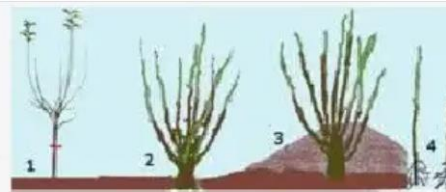
b) Marcottage en pot, marcottage en l'air ou marcottage aérien :

On place un cornet rempli de terre autour d'un rameau portant une incise annulaire.



c) Marcottage en cépée ou en butte :

On butte le pied mère élagué et incisé transversalement pour freiner la sève.



Remarque : On appelle SEVRAGE ; la séparation de la jeune plante (marcottage) ; munie de racines suffisamment développées avec la plante mère.

UTILISATION DES DIFFERENTES SORTES DE MARCOTTAGE :

- Le marcottage par couchage : utilisé pour les plantes flexibles
- Le marcottage aérien : Pratiqué sur les plantes à tiges rigides
- Le marcottage par le buttage : utilisé pour renouveler les vieux arbres fruitiers pour obtenir plusieurs plantes de remplacement.

2.3- Condition de réussite du marcottage :

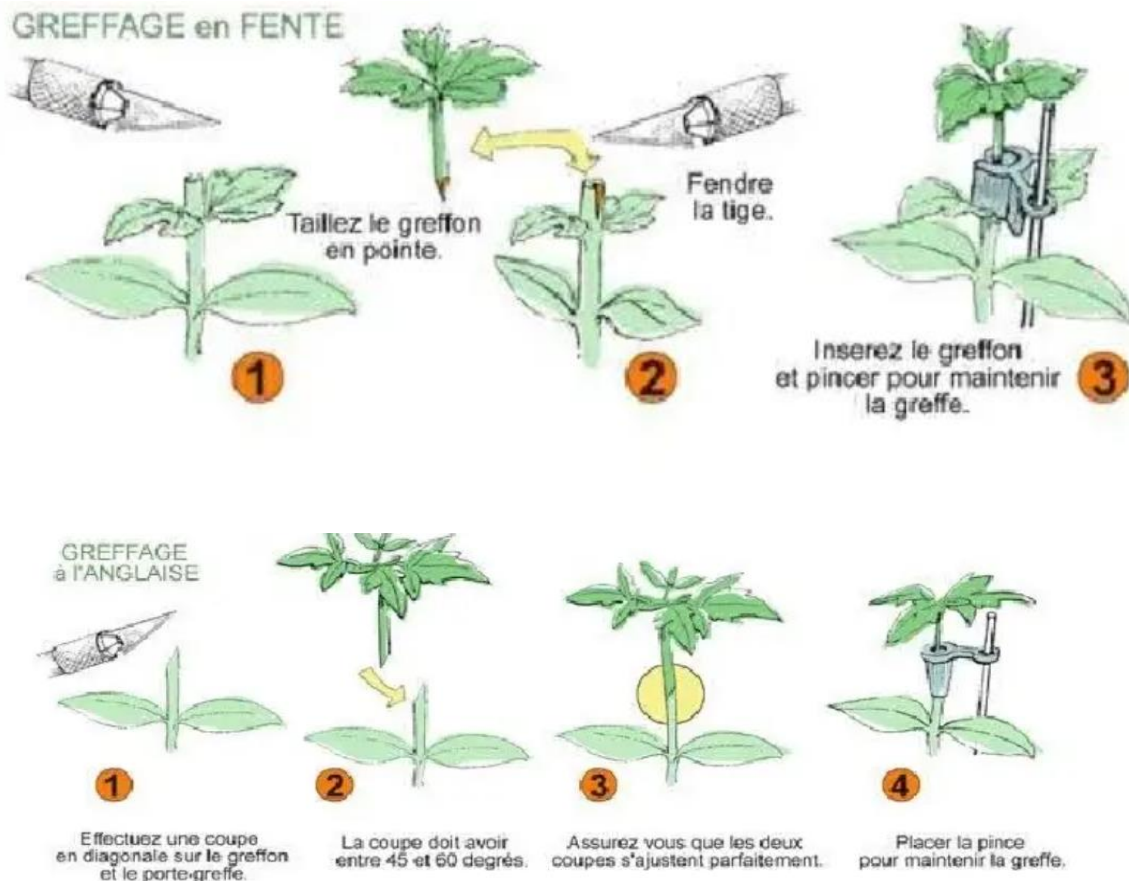
Afin d'assurer la réussite du marcottage il faut :

- Une présence d'humidité
- Prendre de rameau avec des bons bourgeons
- Immobiliser le rameau à marcotter avant l'apparition de nouvelles pousses

- Pratiquer délicatement le sevrage
- Transplanter la marcotte dans un sol humide.

3- LE GREFFAGE :





3.1- Définition :

Le greffage consiste à assurer la soudure d'un organe végétatif appelé GREFFON. Sur une autre plante enracinée appelée : PORTE GREFFE OU SUJET.

Si la greffe est bien faite ; le sujet nourrit le greffon comme s'il s'agissait de ses propres branches.

3.2- Différents types de greffage :

A/ LE GREFFAGE EN FENTE : ce procédé consiste à fendre la tige et à y renforcer le greffon taillé en biseau.

B/ LE GREFFAGE EN FENTE ANGLAISE

C/ LE GREFFAGE EN COURONNE : Les greffons sont placés entre l'écorce et les bois du porte greffe.

D/ LE GREFFAGE EN ECUSSON : les greffons est un écuissions constitue d'un bourgeon ou d'un œil accompagné d'écorce ou de tissus conducteur. La porte greffe incisé en T reçoit le greffon.

3.3- Conditions de réussite du greffage :

Afin d'assurer la réussite du greffage ; il faut que :

- le greffon appartient à une même espèce ou à une même famille.
- le porte greffon soit bien enracinée
- le greffon possède des bourgeons
- le porte greffon et le greffon soient bien fixés entre eux, pour cela ; on utilise du goudron ou du mastic pour favoriser la fixation
- le greffon soit bien ligaturé sur la porte greffe à l'aide de ficelle.

INTÉRÊTS DU GREFFAGE :

- Le greffage permet d'adapter une plante étrangère aux conditions climatiques d'un pays.
- La floraison et la fructification du greffon sont plus rapides parce que le greffon profite de la vigueur et la résistance de la porte greffe.

Chapitre III. La multiplication végétative in vitro

La multiplication végétative in vitro ou micropropagation est un mode de reproduction asexuée artificielle et présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites « conventionnelles » de propagation. Cette Technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles la semence sont rares, ou présentant des difficultés de germination et /ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées. De même plusieurs autres techniques, toutes dérivées de la culture in vitro, ont un rôle important à jouer dans l'amélioration des performances agronomiques ou horticoles des plantes cultivées. La micropropagation est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (plant), l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère. Les plants reproduits ne sont pas seulement conformes mais présentent aussi une grande uniformité. Par ailleurs, l'usage de cette technique nécessite peu d'espace et peut-être programmé indépendamment des saisons. La technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes.

La culture in vitro : définition et historique

Culture in vitro : plantes entières ou fragments de plantes (explants) placés hors de leur environnement naturel en conditions stériles sur milieu nutritif (matériel de laboratoire originellement en verre). Dès 1902, haberland, un biologiste allemand, observe les potentialités naturelles de la multiplication végétative (bouturage). Suite à ces travaux, il énonce le premier grand principe qui ouvrira la voie de la micropropagation des végétaux. Il s'agit du principe de la totipotence cellulaire « toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue ». En 1934, réussit la culture de racines de tomate sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux, un extrait de levure et du sucre et une hormone végétale, la seule connue à l'époque : l'auxine. En 1939, Gautheret obtient à partir de tissu carotte, un amas de cellules dédifférenciées : un cal. On peut cultiver ce cal indéfiniment dans le temps. Avec lui démarre vraiment la culture in vitro (« dans du verre ») En 1962, Murashige et Skoog étudient la multiplication végétative du tabac et mettent au point le premier milieu de base pour la culture in vitro. Ce milieu contient des sels minéraux, des vitamines du groupe B, des sucres, des auxines et cytokinines.

Des applications de la culture *in vitro*

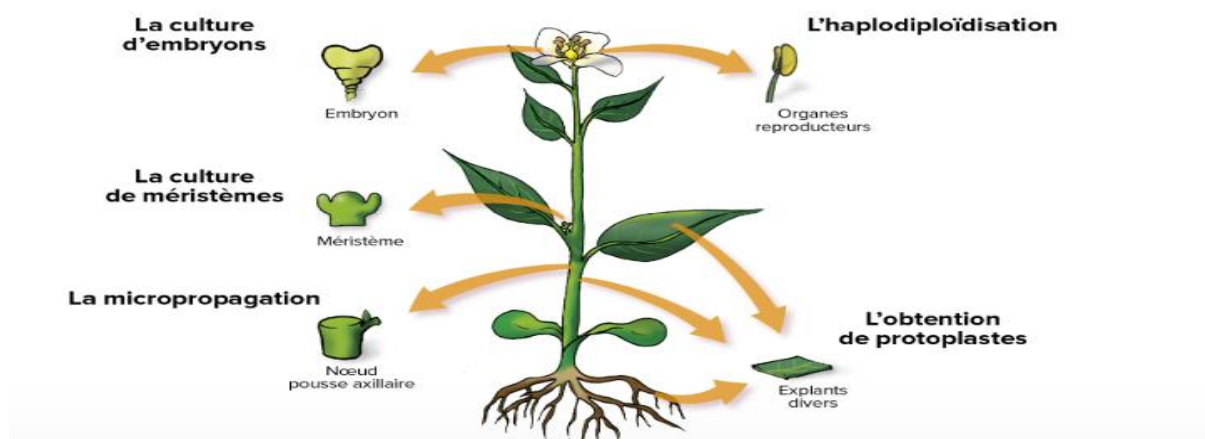


Figure. Les applications de la culture *in vitro*

L'organogenèse

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de méristèmes nouveaux. En partant d'un explant, elle aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (**caulogenèse**) et de racine (**rhizogenèse**).

La caulogenèse

La caulogenèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal. - Les bourgeons terminaux dérivent de la gemmule de l'embryon. - Les bourgeons axillaires sont produits généralement par les deux ou trois assises cellulaires superficielles de la tige. - Les bourgeons adventifs sont formés en des endroits inhabituels. Ils sont formés à partir d'organes différenciés de la plante (entre nœuds, tubercules, racines...). - Les bourgeons néoformés *in vitro* peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur un cal, ils peuvent être considérés comme un cas particulier de bourgeons adventifs.

Origine des bourgeons

Les études cytologiques, conduites dans le but de déterminer l'origine des bourgeons néoformés à partir d'un fragment d'organe contenant divers tissus montrent souvent que l'aptitude à la caulogenèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus telle que : le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien. L'intensité de cette néoformation est nettement dépendante de la nature des tissus contenus dans l'explant. Elle est maximale pour les tissus cambiaux, élevée pour les tissus du phloème et du xylème, très faible ou nulle pour le parenchyme cortical ou modulaire. Chez les conifères, comme le pin, les premières divisions périclinales apparaissent dans les couches subépidermiques du mésophylle, l'origine des pousses caulinaires paraît être unicellulaire. Par contre chez les Angiospermes, l'origine peut être pluricellulaire, des méristèmes peuvent se former à partir de cellules épidermiques ou encore à partir de tissus palissadiques, du mésophylle spongieux ou de la gaine perivasculaire des explants cultivés. Régulation hormonale de la caulogénèse Le déclenchement ou stimulation du bourgeonnement en culture *in vitro*, souvent observée, résulte de l'emploi de cytokinine, éventuellement associées aux auxines. A la suite des observations sur la moelle de tabac

(Skoog et Miller, 1956 ; Skoog, 1971), souvent confirmées chez d'autres, il est généralement admis que les bourgeons à partir d'une cal sont sous le contrôle des interactions entre cytokinines et auxines. Le rapport auxine / cytokinine détermine le devenir des tissus en culture, Notion de balance hormonale :

- ❑ Auxine seule → survie
- ❑ Auxine majoritaire → Rhizogenèse
- ❑ Cytokinine majoritaire → Caulogénèse
- ❑ Equilibre entre les deux → Callogénèse

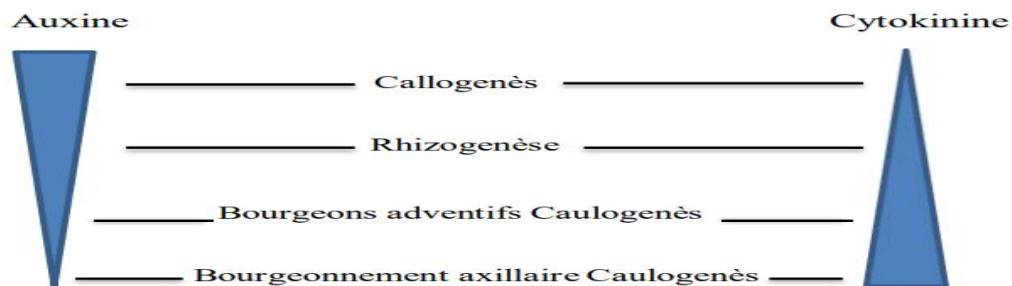


Figure. Type d'organogénèse contrôlée par les concentrations relatives d'auxines et de cytokinines.

Caulogénèse (formation de tiges / bourgeons)

- Principe : Avec un rapport cytokinine > auxine, induction de méristèmes caulinaires.
- Étapes conceptuelles : induction par cytokinines, formation de bourgeons, croissance en tiges et feuilles.
- Facteurs critiques : ratio hormones, photopériode.
- Applications : micropropagation horticole.
- Limites : hyperhydricité, callus non organogènes.

La rhizogenèse

La rhizogenèse désigne la néoformation et la croissance de racine. Les méristèmes de racines se répartissent en plusieurs catégories selon leurs origines. - Les racines latérales se forment de manière spontanée sur la racine principale dans les conditions naturelles. - Les racines adventives sont produites par des organes divers, soit spontanément, soit accidentellement à la suite d'une blessure ou d'une manière provoquée, dans les conditions du bouturage et du marcottage. Les racines néoformées, au sein d'une cal, en culture in-vitro, peuvent être considérées comme un cas particulier de méristèmes adventifs. Origine des racines néoformées La rhizogenèse est un phénomène complexe, il comporte différentes phases : la dédifférenciation, formation d'amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines. L'origine des cellules impliquées dans la cicatrisation dépend de

l'espèce. Mais dans tous les cas, c'est l'assise génératrice libéro- ligneuse (cambium) qui donne, des tissus de bonne aptitude callogène. Le cal est formée essentiellement de cellules de type méristématique secondaire, qui incorporent certaines cellules voisines parenchymateuses. Les cellules méristématiques se différencient par la suite et s'organisent pour donner naissance à une nouvelle racine.

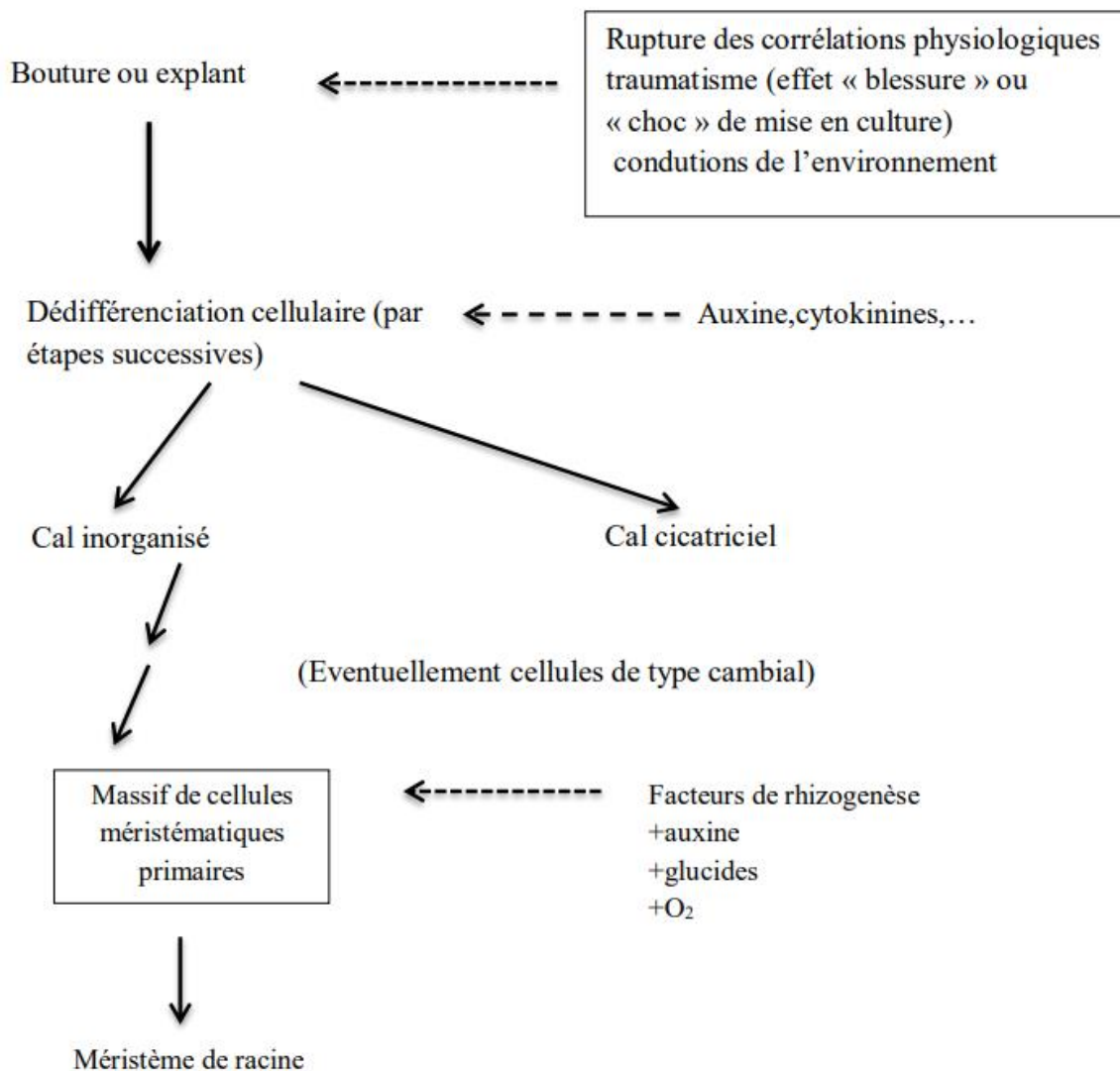


Figure. Schéma simplifié de la rhizogenèse.

Effet des facteurs environnementaux sur la rhizogenèse

L'oxygénation du milieu a toujours été considérée comme favorable à l'enracinement. Le choix du substrat est guidé par la double nécessité d'assurer à la fois humidification et drainage. Une température élevée (20 à 25°C) favorise la rhizogenèse d'où l'intérêt de chauffer les bacs à bouturage. Le pH optimal dépend de l'espèce. On sait depuis longtemps que certaines plantes sont acidophiles (Azalées,...) à l'inverse, des boutures de *Coleus* supportent une gamme étendue de pH

Un éclairage d'appoint favorise l'enracinement de boutures feuillées dans certains exemples, sans que l'on sache bien s'il s'agit là d'un effet photosynthétique ou d'une action sur la synthèse de régulateurs de croissance endogènes, par l'intermédiaire du photopériodisme. L'arrosage par « mist » ou brouillard artificiel donne souvent d'excellents résultats, en particulier avec les boutures herbacées. Le « mist » a plusieurs effets : réduction des pertes d'eau, diminution de la température au niveau du feuillage, réduction de l'évapotranspiration. Permet en même temps de conserver sur la bouture une plus grande surface foliaire, entraînant une meilleure assimilation chlorophyllienne. Facteurs propres à l'explant Les facteurs génétiques jouent certainement un rôle déterminant. Dans une même espèce certains cultivars s'enracinent aisément, d'autres difficilement. Les réserves apportées par la bouture (en particulier les glucides) favorisent la rhizogénèse. L'âge de la plante-mère est un facteur bien connu. Les boutures issues de végétaux jeunes ont généralement une meilleure aptitude à la formation des racines que celles qui proviennent de plantes âgées. Chez les végétaux ligneux, il est fréquent que l'enracinement des boutures ne soit possible qu'à partir de jeunes plantes issues de semis. Des gradients d'aptitude à la rhizogénèse ont souvent été observés en fonction de la situation de la bouture sur la plante. Il est fréquent que des rameaux axillaires prélevés près de la base de l'axe caulinaire présentent une bonne aptitude à la rhizogénèse. Chez beaucoup de plantes herbacées les boutures possédant un bourgeon végétatif prélevées sur une tige florifère ne s'enracinent que si elles proviennent de la partie basale de la plante la plus éloignée des régions florifère (exemple : Betterave). Mais il n'existe aucune règle précise concernant ces gradients.

Rhizogénèse (induction de racines adventives)

- Principe : À partir d'un explant, l'équilibre hormonal est orienté vers l'auxine → formation de racines adventives.
- Étapes conceptuelles : préparation de l'explant, induction par auxines, différenciation racinaire, acclimatation.
- Facteurs critiques : rapport auxine/cytokinine élevé, lumière faible à modérée, substrat peu salin.
- Applications : clonage de cultivars élités (banane, eucalyptus).
- Limites : racines fragiles in vitro, mortalité élevée à l'acclimatation.

Culture des méristèmes (assainissement viral)

Les méristèmes sont des zones de cellules à divisions intenses, situés au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et à l'origine des tiges feuillées ou du système racinaire. En 1950, les travaux de Limasset et Cornuet ont montré que les méristèmes étaient indemnes de virus. Cette technique est la

seule qui permet d'obtenir des plantes saines indemnes de virus. Elle concerne principalement les plantes à reproduction par voie végétative : bouturage, marcottage... comme la pomme de terre, le fraisier, le framboisier... Elle a des avantages qui la rendent de plus en plus importante à titre d'exemple : le sauvetage de variétés menacées de disparition car elles sont virosées, mais elle a aussi des limites ; les plantes obtenues sont indemnes de virus mais elles n'y sont pas devenues résistantes, elles peuvent être contaminées par des insectes, et c'est possible qu'à la régénération on ne trouve pas le caractère horticole chez certaines espèces comme les plantes de Pelargonium.

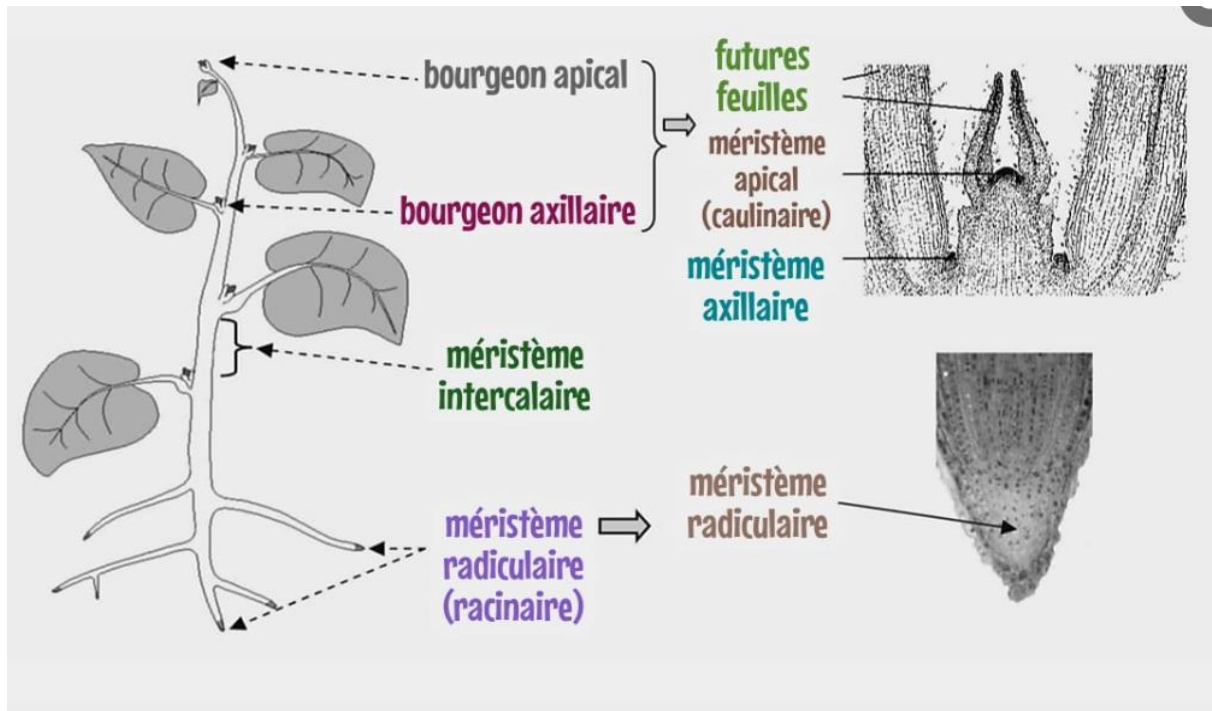


Figure. Méristème de tige et de racine

2- Type de méristèmes

On distingue deux types de méristèmes, selon leur origine :

❑ Méristème primaire

Ils permettent la croissance en longueur sont situés à l'apex des racines et dans les bourgeons apicaux à l'extrémité des tiges et des rameaux (méristèmes apicaux), dans les bourgeons.-axillaires à l'aisselle des feuilles.-(méristèmes axillaires), et dans les entre-nœuds (méristèmes intercalaires).

❑ Méristème secondaire

-Permettrait la croissance de la tige.

-Principale est le cambium.

Dans les tiges, ce tissu est situé entre le Xylème primaire à différenciation centrifuge dans

la tige et centripète dans la racine d'une part, et d'autre part le phloème primaire, à

différenciation centrifuge. Il va ainsi créer des tissus conducteurs secondaires ; les cellules qui le constituent effectuent des divisions radiales.

Technique

- ❑ 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 de la thérapie : culture à température élevée, pour favoriser l'élimination des virus. C'est la seule façon d'obtenir des plantes saines indemnes de virus. Son champ d'application s'est un peu étendu puisqu'elle sert également dans certains cas de point de départ pour une micropropagation.

Le protocole utilisé consiste :

- ❑ Choisir une plante puis choisir dessus un rameau. Après désinfection ou non (suivant les espèces) du rameau de départ, le prélèvement se fait sous une loupe binoculaire, sous hotte stérile ou paillasse désinfectée. - Le fragment de rameau est débarrassé de ses feuilles, puis les ébauches foliaires sont éliminées.
- ❑ Quand le méristème apparaît, on ôte délicatement les dernières ébauches foliaires, puis l'on découpe un minuscule cube dont les faces sont tangentes au méristème ; une dernière section transversale permet de le détacher. Il est aussitôt placé dans un tube à hémolyse, sur milieu gélosé. Toutes ces opérations doivent être conduites rapidement afin d'éviter le dessèchement du méristème et limiter les risques de contamination.
- ❑ La lumière n'est pas strictement indispensable pour une bonne croissance des méristèmes mais sa présence donne de meilleurs résultats. Un régime de 16 heures de jour, pour 8 heures de nuit, est souvent adopté bien qu'un éclairage en continu soit possible.
- ❑ L'humidité relative doit être proche de la saturation. Les tubes étant en général fermés pour des raisons sanitaires. On arrive très facilement à ce résultat sans problème.
- ❑ La température doit être impérativement contrôlée, d'où l'utilisation d'une chambre de culture en moyenne entre 22 et 25°C.

Culture des méristèmes (assainissement viral)

- ❑ - Principe : Les méristèmes apicaux sont souvent indemnes de virus → production de plants sains.
- ❑ - Étapes : isolement microscopique, culture stérile, croissance en plantule.
- ❑ - Facteurs critiques : stérilité absolue.
- ❑ - Applications : pomme de terre, patate douce, bananier.
- ❑ - Limites : taux de survie faible.

Embryogenèse somatique

Définition

Classiquement, l'embryon est défini comme étant une plante se trouvant au stade initial de son développement. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire (munie de deux méristèmes : l'un caulinaire et l'autre racinaire) qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante. Habituellement, l'embryon s'édifie à partir d'une cellule initiale, le zygote, formé lors de la reproduction sexuée (embryon zygotique). Cependant, d'autres types d'embryons peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte, embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique et qui sont appelés "embryons somatiques". Parfois, chez certaines espèces, ils résultent d'une embryogenèse somatique naturelle qualifiée d'apomixie. Dans certains cas en effet, les anthérozoïdes, l'oosphère, voire d'autres cellules gamétophytiques peuvent engendrer des embryons parthénogénétiques. Dans d'autres cas, certaines cellules sporophytiques localisées au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier le nucelle, fournissent naturellement des embryons apoméiotiques appelés aussi "embryons nucellaires". Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les Citrus. Toutefois, cette appellation est essentiellement appliquée aux embryons obtenus à partir de culture de tissus *in-vitro* du sporophyte

Comme pour l'organogenèse, l'**embryogenèse somatique** utilise un **explant sans bourgeon**, sauf qu'en embryogenèse, on n'induit pas la formation d'un bourgeon mais d'un **embryon**, accompagné par la production d'un cal. Il s'agit d'embryons somatiques (qui peuvent donner des graines artificielles), situation proche d'un embryon zygotique provenant d'un croisement et donnant des graines naturelles. Les stades de développement embryonnaire : 'globulaire', 'zygote', 'cœur', 'torpedo'. Un embryon présente deux pôles (bipolaire) qui contiennent des méristèmes caulinaires (aériens) et racinaires.

De ce fait, **un bourgeon contient 1 méristème et un embryon contient 2 méristèmes**. Etant donné que les embryons possèdent les deux types de méristèmes, il devient facile à faire de la maturation et germination des embryons et passer de suite à l'acclimatation (sans étape d'enracinement).

Origine et développement des embryons somatiques

Les données cytologiques montrent que les embryons somatiques ont pour origine des cellules particulières; dites embryogènes. Elles présentent des caractères de cellules méristématiques primaires: petites tailles, cytoplasme dense, gros noyaux aux nucléoles proéminents et petites vacuoles. Elles fixent de manière intense les colorants ce qui les rend aisément repérables en cytologie. Ainsi, on distingue deux voies pour l'embryogenèse somatique:

La première est l'embryogenèse directe où les embryons sont initiés à partir de tissus en absence de prolifération de cal. Ceci se produit à partir des cellules pré-embryogéniques déterminées (P.E.D.C) ou les cellules sont déjà engagées dans un développement embryogène et elles ont besoins seulement d'être libérées. Elles semblent préexister dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes.

La seconde est l'embryogenèse somatique indirecte, pour laquelle une prolifération cellulaire est requise. On note, ainsi, l'existence de cellules initiatrices qui sont déjà différenciées mais dépourvues de capacité embryogènes. Ils les nomment des cellules pré-embryogènes indéterminées (PEIC). Les cellules embryogènes apparaissent tardivement au sein du cal produit par la réactivation mitotique des cellules différenciées et/ou la prolifération des cambiums obtenus à partir d'explants de type racines, tige ou de feuille. Leurs multiplications aboutissent à la formation de groupes de cellules embryogènes "nodules méristématiques" dispersés, parmi les autres cellules du cal et qui sont généralement de type parenchymateux. A la suite de leur repiquage sur des milieux dépourvus d'auxines, ces nodules évoluent en des embryons somatiques comme c'est le cas chez la carotte.

Les embryons somatiques connaissent les mêmes stades de développement morphologiques que traversent habituellement les embryons zygotiques à savoir : stade globulaire, cordiforme, torpille et cotylédonaire. Ils ont une structure chromosomique souvent semblable à celle de la plante- mère dont ils sont issus. Le critère qui permet de reconnaître un embryon somatique est certainement sa structure bipolaire, qui développe précocement et simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire.

Intérêt de l'embryogenèse somatique Comparativement aux autres voies de multiplication végétative *in-vitro*, l'embryogenèse somatique se montre plus séduisante en termes de performance et d'efficacité. En effet, la maîtrise de la production d'embryons, chez certaines espèces, via les suspensions cellulaires permet d'obtenir des milliers d'embryons par litre de milieu de culture et par conséquent la régénération de milliers de plants. L'embryogenèse somatique permet aussi en un temps très court de produire des plantes entières sans passer par les contraintes que connaît habituellement l'organogenèse (phase de caulogenèse et de rhizogenèse)

La voie de l'embryogenèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la longueur des cycles d'amélioration comme par exemple, le temps nécessaire à la valorisation du matériel sélectionné âgé ou juvénile ou la production de parents hybrides nécessaires à la diffusion de nouvelles variétés. De telles applications ont été réalisées chez plusieurs espèces comme le café, la luzerne, *Asparagus officinalis*, le palmier dattier et le palmier à huile.

Les différentes étapes de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique implique une série de transformations commençant par (A) des cellules somatiques différenciées et vacuolées de cals, qui deviennent (B) des cellules indifférenciées embryogènes, chacune se développant en (C) un proembryon, puis (D) un embryon au stade globulaire, (E) au stade cordiforme, au stade torpille, pour finalement donner (G) une plantule à deux semaines et (H) à quatre semaines. (I) Les plantules sont ensuite transplantées en terreau et acclimatées en serre

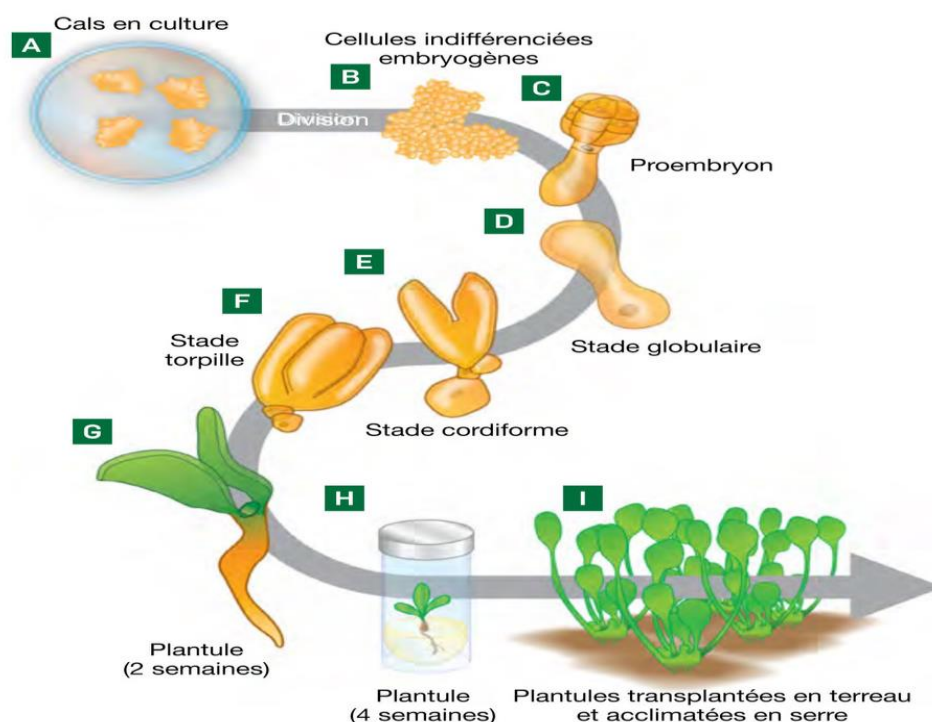


Figure. Étapes de l'embryogenèse somatique

Embryogenèse somatique

- ❑ Principe : Reprogrammation de cellules somatiques en embryons comparables aux zygotes.
- ❑ Étapes : induction, organisation embryonnaire, maturation, germination.
- ❑ Facteurs critiques : explants jeunes, milieux enrichis, stress osmotique.
- ❑ Applications : cacao, café, palmier à huile.
- ❑ Limites : variabilité somaclonale, faible taux de conversion.

Culture des protoplastes

La fusion de protoplaste ou hybridation somatique consiste à fusionner le contenu de deux cellules somatiques d'espèces différentes ; elle permet d'obtenir des recombinaisons génétiques nouvelles irréalisables par reproduction sexuées : des recombinaisons nucléaires mais aussi des recombinaisons cytoplasmiques (chloroplastiques et mitochondriales).

Un protoplaste est une cellule végétale débarrassée artificiellement de sa paroi squelettique (pectocellulosique), ayant une forme sphérique et qui est capable, dans certaines conditions de croître et de se diviser. Ces cellules offrent un système cellulaire approprié pour l'application de plusieurs manipulations génétiques (la fusion somatique, la transformation génétique ...ect.).

Isolement de protoplastes

- ❑ **Plasmolyse:** La cellule végétale est fortement turgescente, ceci est dû à la présence de solutés et de sels minéraux à l'intérieur de la cellule qui sont à l'origine de l'existence d'un potentiel osmotique provoquant alors l'entrée d'eau dans la cellule. Ce potentiel osmotique est équilibré par la pression exercée par la paroi.

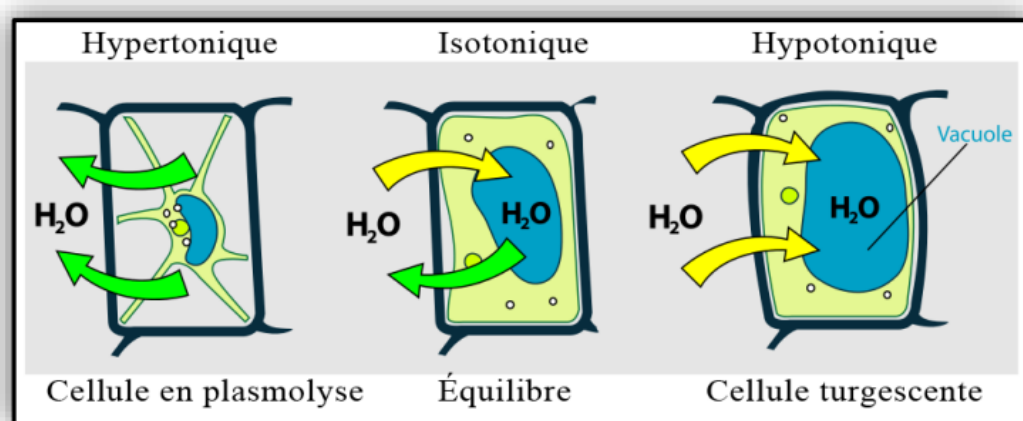


Figure. Cellule végétale et osmose

- ❑ Lorsqu'on place la cellule végétale dans une solution hypertonique (solution concentrée en solutés), l'équilibre hydrique est perturbé. La membrane plasmique hémiperméable favorise donc la diffusion de l'eau vers l'extérieur de la cellule végétale ce qui provoque la diminution du volume du protoplasme (régression vacuolaire et déshydratation du cytoplasme). Et donc la membrane plasmique se décolle de la paroi cellulaire et l'ensemble du protoplasme prend une forme arrondie et est appelé protoplaste « in situ ».
- ❑ En effet, la plasmolyse permet de :
 - ❑ • Détacher le protoplaste de la paroi cellulaire.
 - ❑ • Diminuer la tension de surface des protoplastes évitant ainsi leur éclatement.
- ❑ Les agents plasmolysants les plus utilisés sont : les oses-alcools (le mannitol, le sorbitol) et les sels minéraux (NaCl, KCl).

Dégradation de la paroi

- Méthode mécanique:** La technique mécanique d'isolement des protoplastes est réalisée sur des tissus végétaux à cellules allongées seulement. En effectuant des coupes perpendiculaires à la longueur sur des tissus plasmolysés. Cette méthode a été largement utilisée dans les années 1970 du fait qu'elle est naturelle et peu coûteuse. Actuellement, son utilisation est moins fréquente par rapport à la méthode enzymatique.

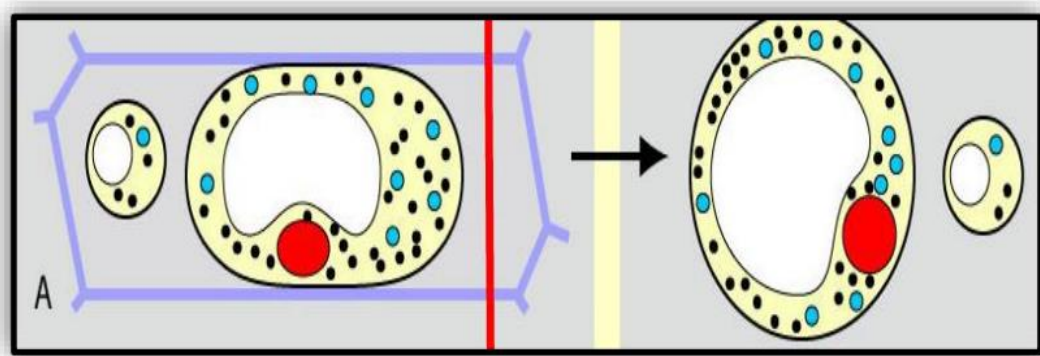
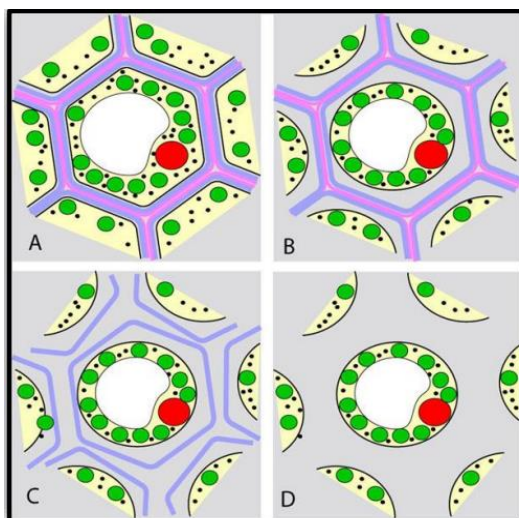


Figure. Technique mécanique d'isolement de protoplastes

Isolement enzymatique des protoplastes

- La technique est simple dans sa conception mais demande une grande maîtrise de l'aseptie et des milieux d'incubation. Si l'isolement mécanique ne pouvait se réaliser qu'à partir de cellules allongées, la technique enzymatique peut se réaliser à priori à partir de n'importe quel type de cellules. C'est pourquoi, ce sont très souvent des cellules de parenchyme chlorophyllien qui ont été choisies



- Tissu chlorophyllien (lamelle moyenne en rose, paroi cellulosique en bleu)
- Plasmolyse des cellules : les protoplastes *in situ* se séparent de leurs parois
- Digestion de la lamelle moyenne par des pectinases : les cellules se séparent
- Digestion de la paroi cellulosique par des cellulases : les protoplastes sont libres dans le milieu.

Figure. Représentation schématique de l'isolement de protoplastes par digestion enzymatique

Méthodes de Fusion des protoplastes

Les protoplastes se repoussent mutuellement en vue des charges négatives présentes à la surface de leurs membranes plasmiques. Donc la fusion cellulaire doit être induite.

Méthode de fusion chimique

Il s'agit d'une méthode simple, efficace et qui nécessite l'utilisation des agents chimiques comme : Le polyéthylène-glycol (PEG) qui est une substance non ionisante provoquant l'accolement des protoplastes suite la neutralisation des charges négatives présentes à la surface de la membrane conduisant alors à un contact membranaire intime, suivie de fusion de protoplastes, qui se produit au cours du rinçage. Le taux de fusion est relativement élevé en utilisant des solutions de rinçage contenant une forte concentration des ions calcium (Ca^{2+}) et un pH élevé. Le polyéthylène-glycol induit des fusions cellulaires d'une manière non spécifique causant la formation de cellules multi-nuclées suite à la fusion de plusieurs protoplastes. D'autres produits peuvent être utilisés pour provoquer la fusion des protoplastes, comme les nitrates de sodium (NaNO_3) ; cependant ils présentent des taux de fusion très faibles par rapport au PEG.

Méthode de fusion électrique ou électrofusion

L'utilisation de cette méthode a commencé durant les années 1980, elle est très efficace et peut induire la fusion cellulaire avec une fréquence élevée (jusqu'à 100%). Elle consiste à soumettre les protoplastes à un champ électrique de haute fréquence, qui a la propriété de les aligner en chapelets entre les deux électrodes, puis de produire la fusion par une décharge électrique (200 V) pendant un très court instant (une microseconde) ce qui provoque des ruptures de membranes et la fusion au niveau des points de contact entre protoplastes. Cette technique est préférée en termes de maintenance de la viabilité des protoplastes et de la réduction des dommages membranaires, déformation et rupture générale des protoplastes ainsi que la fusion d'organites. La fusion se produit d'une manière aléatoire. Si on considère que le mélange contient en quantité égale deux espèces différentes A et B, on doit observer $\frac{1}{4}$ d'autofusion AA, $\frac{1}{2}$ d'hétérofusion AB et $\frac{1}{4}$ d'autofusion BB. L'étape suivante est la régénération de la paroi pectocellulosique et ainsi les protoplastes redeviennent des cellules. Leur division aboutit ensuite à la formation de microcals puis de cals. Enfin, la différenciation des tissus est induite par ajout d'hormones (auxine et cytokinine) pour reformer une plante entière. Les travaux de sélection commencent sur la descendance de l'hybride somatique.

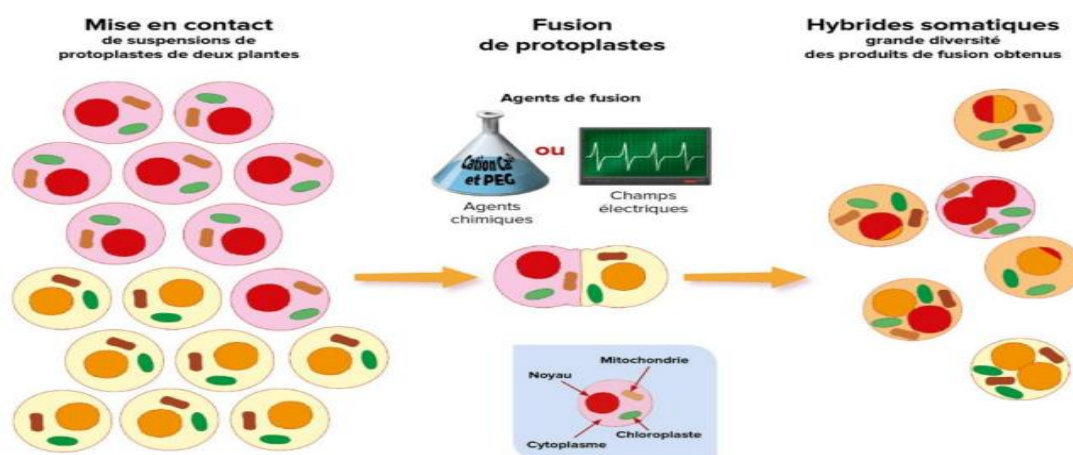


Figure. Hybridation somatique

Fusion spontanée des protoplastes

La première étape a consisté à démontrer que les fusions observées se réalisaient bien entre des protoplastes d'origines différentes et non entre protoplastes de même origine. Pour cela il est nécessaire de recourir à des protoplastes facilement reconnaissables. Certains ont utilisé des protoplastes venant d'organes différents (à vacuoles colorées ou non) ou ont utilisé comme Keller des techniques qui permettent de différencier les noyaux.

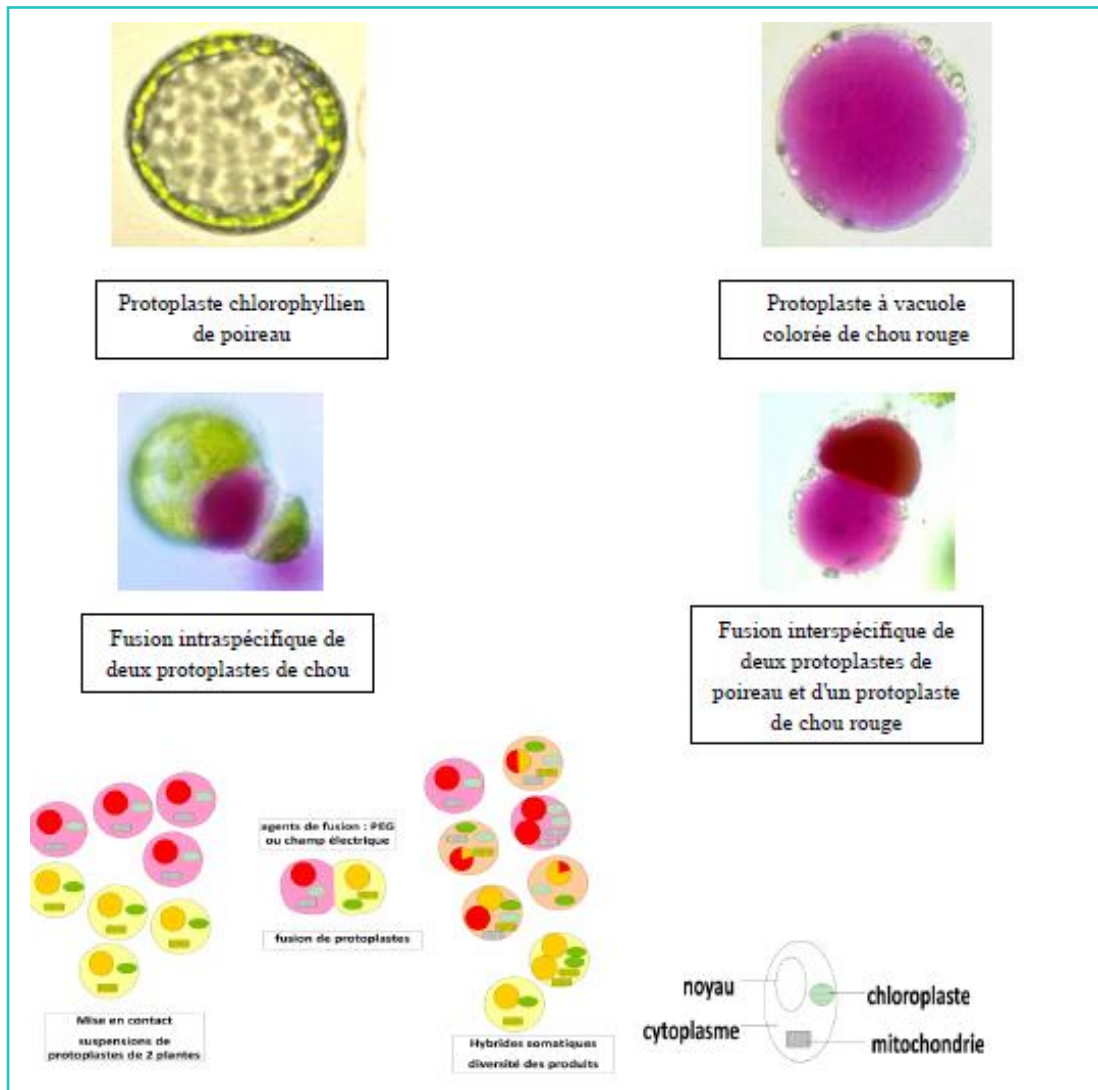


Figure. Fusion des protoplastes

Dès que des protoplastes ont été isolés, les chercheurs ont cherché à obtenir des fusions entre protoplastes. Des fusions spontanées ont été observées dans des populations de protoplastes juste après leur isolement. Pendant quelques temps on a pensé que ceci était une première étape vers une fusion dirigée.

Lors de la division cellulaire, la nouvelle paroi (phragmoplaste) qui sépare les deux cellules filles permet des communications intercellulaires par des plasmodesmes et au moment de la

plasmolyse, certaines cellules peuvent rester attachées par ces structures et communiquer entre elles. Ceci peut être mis en évidence en réalisant des protoplastes à partir de méristèmes de racine. Ce sont des files cellulaires sans paroi qui sont isolées et en fonction des pressions, certaines d'entre elles fusionnent par élargissement des plasmodesmes qui ne sont plus dans une paroi rigide.

Introduction de matériel génétique

Lorsqu'on provoque la fusion de protoplastes d'origines différentes, la première étape est la fusion des membranes plasmiques et par voie de conséquence, des cytoplasmes. Dans le cas recherché pour l'hybridation somatique, on obtient une cellule hybride contenant à la fois les gènes nucléaires et les organites cytoplasmiques des deux partenaires. Pour que le résultat soit concluant, il faut que les noyaux fusionnent et que le noyau hybride (contenant les chromosomes des deux partenaires) se divise et que ceci soit conservé au cours de la formation d'un cal puis d'une plante. Ce cas est assez rare et n'a pas donné de résultats très généraux.

Bien souvent, un des noyaux est éliminé mais les constituants cytoplasmiques des deux partenaires sont conservés. La plante régénérée appelée "cybride" sera conforme sur le plan nucléaire à l'un des deux "parents" mais elle contiendra les organites cytoplasmiques des deux "parents". Ceci pourrait paraître à priori un résultat médiocre mais en fait, on sait que mitochondries et chloroplastes possèdent des gènes intéressants.

En effet, au cours de l'hybridation par la reproduction sexuée d'une plante Angiosperme, le gamète mâle véhiculé par le pollen n'apporte que son génome nucléaire alors que le gamète femelle apporte à la fois son génome nucléaire et les génomes mitochondriaux et chloroplastique. On parle alors d'hérédité maternelle. C'est le cas très général aussi bien chez les plantes que chez les animaux, espèce humaine comprise.

De nombreuses résistances d'origine chloroplastique ou mitochondriale, sont difficilement transférables par la voie sexuée. Ainsi, l'hybridation somatique a permis de transférer des résistances d'une espèce sauvage à une espèce cultivée

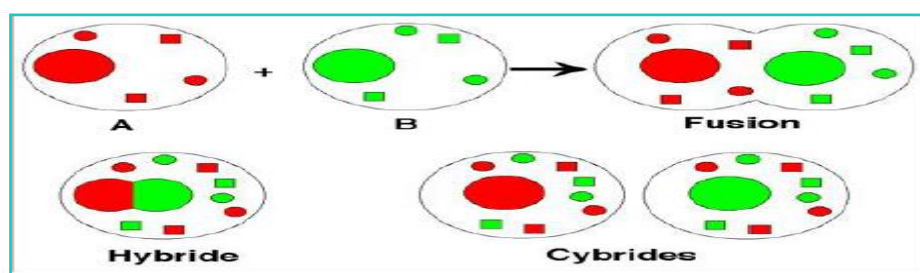
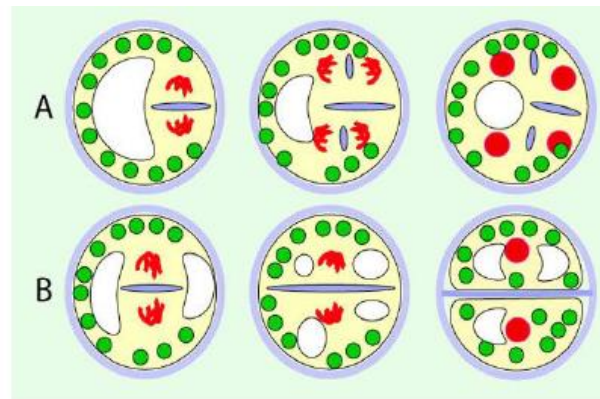


Figure. Fusion de protoplastes entre deux espèces A et B

La fusion nucléaire complète produit un hybride somatique (AB). L'élimination d'un noyau permet l'obtention d'un cybride contenant un noyau A ou B et les mitochondries et chloroplastes A et B. La production de cybrides peut être obtenue par la fusion de protoplastes mais aussi plus directement par l'introduction de chloroplastes. L'introduction de modifications génétiques dans le patrimoine d'une plante (fabrication d'OGM) a été réalisée par l'utilisation de plasmides modifiés de certaines bactéries comme (*Agrobacterium tumefaciens*). Cette bactérie est responsable du Crown-gall, une tumeur cancéreuse qui se développe au niveau des blessures chez certaines plantes. C'est un plasmide de cette bactérie qui entre dans les cellules de la plante, s'intègre à son génome et provoque la cancérisation. On peut modifier ce plasmide en enlevant les gènes responsables de la cancérisation et en ajoutant des gènes intéressants. L'infection sera alors sans danger mais permettra le transfert des gènes choisis. Cette méthode a permis de créer de nombreux OGM. La première étape est l'identification d'un caractère que l'on veut introduire dans la plante, comme par exemple des caractères de qualité nutritionnelle, la résistance à certains insectes, à certaines maladies, à des herbicides, etc. puis d'isoler le gène correspondant. Ce gène sélectionné peut provenir de tout organisme vivant, plante, 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 intéressant. La construction est ensuite multipliée afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN pour son introduction dans les cellules végétales que l'on veut transformer. Cependant, toutes les plantes ne sont pas sensibles à l'*Agrobacterium*. Dans ce cas, c'est en utilisant des protoplastes que l'on a pu transférer des gènes étrangers. Il est possible de transférer des gènes par l'utilisation d'un canon à particules qui projette dans les cellules des microparticules enrobées d'ADN soit en fragilisant la membrane du protoplaste chimiquement ou par l'utilisation d'un champ électrique. Les techniques appliquées aux protoplastes végétaux sont applicables uniquement aux espèces dont on maîtrise la mise en culture et la régénération des plantes à partir des protoplastes. C'est grâce à ces techniques sur la transformation des protoplastes que des céréales de grande culture, monocotylédones, insensibles à *Agrobacterium*, telles que le riz, le maïs ou l'orge ont été transformées pour la première fois. Effectivement, ces plantes étaient réputées insensibles à *Agrobacterium*.

Division de cellules issues de protoplastes

Lorsque la paroi n'est pas suffisamment construite, il arrive que des divisions nucléaires se produisent. En l'absence de cadre rigide le phragmoplaste se forme mal et on obtient parfois des protoplastes plurinucléés dans le cytoplasme desquels on trouve des fragments de paroi.



A- La division est incomplète au niveau du phragmoplaste. On obtient un protoplaste plurinucléé.
B- La nouvelle paroi issue du phragmoplaste se soude à la paroi externe. On obtient deux cellules.

Figure. Division cellulaire issue de protoplastes

Régénération des plantes

Très vite après avoir obtenu les premières divisions, on note l'apparition des cals importants puis en suivant les conditions de milieu déjà connues pour la culture de cellules isolées, on peut obtenir la régénération de plantes entières

Culture des protoplastes

- ❑ Principe : Cellules sans paroi obtenues par digestion enzymatique.
- ❑ Étapes : isolement, digestion enzymatique, culture en suspension, régénération.
- ❑ Applications : fusion somatique, transformation génétique.
- ❑ Limites : fragilité, faible régénération.

Création de plantes génétiquement modifiées (PGM)

Les techniques du génie génétique ont pour but de transférer un gène intéressant d'un « donneur » appartenant à n'importe quelle espèce (espèce végétale différente, espèce animale, espèce bactérienne) dans l'information génétique d'une espèce végétale réceptrice qui ne le possède pas. Le végétal ainsi transformé est appelé plante « transgénique »

Étapes de la transgénèse

❑ Repérage et isolement du gène d'intérêt chez le donneur

Le donneur intéressant possédant le caractère recherché étant identifié, il faut extraire son information génétique et la découper en fragments. Les techniques d'isolement utilisent des enzymes (endonucléases de restriction) capables de découper l'ADN des chromosomes à des endroits bien précis. Des techniques de purification très complexes permettent d'extraire

uniquement le gène intéressant (sondes moléculaires).

❑ Clonage du gène

Le gène isolé doit être multiplié en grande quantité par le biais d'une bactérie (bactérie de clonage). Chez les bactéries, en plus du chromosome circulaire normal, existent des sortes de minichromosomes, petites molécules d'ADN circulaire appelées plasmides. On peut couper ces plasmides par des enzymes de restriction et insérer le gène isolé dans le plasmide qui devient un plasmide recombiné. Les bactéries (*E. Coli* les plus souvent utilisées) contenant le plasmide recombiné sont cultivées ; en se multipliant elles multiplient le gène sélectionné (clonage jusqu'à plusieurs millions d'exemplaires) (fig.). Là encore, des techniques de purification complexes permettent d'isoler les bactéries transformées.

❑ Transfert du gène

Le gène est introduit dans la plante receveuse par un vecteur biologique ou par une technologie d'insertion directe.

✓ Transfert biologique

La bactérie de clonage n'est pas apte à transférer directement le gène dans la plante ; un vecteur est indispensable. Les vecteurs les plus courants utilisés sont des bactéries parasites des plantes du genre *Agrobacterium* : *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*. *A. tumefaciens* est une bactérie du sol qui provoque une tumeur au collet, le crown-gall ; *A. rhizogenes* est une autre espèce parasite qui provoque un développement pathologique de formations racinaires : hairyroot. Ces agents pathogènes parasitent les plantes d'une manière curieuse, en insérant une partie de leur ADN (T-DNA) dans les chromosomes de la plante. Cet ADN « parasite » est porté par un plasmide de l'*Agrobacterium* ; plasmide Ti d'*A. tumefaciens*. Lorsque le T-DNA est incorporé au génome de la cellule végétale, il fonctionne, conférant à la cellule le caractère tumoral et la propriété de synthétiser des opines. Les opines produites par les cellules tumorales de la plante sont utilisées par les bactéries pathogènes pour proliférer. Il est possible de recombiner le plasmide Ti d'*agrobactérium*, c'est-à-dire d'introduire dans la région du T-DNA le gène intéressant qui vient d'être cloné. L'*Agrobacterium*, naturellement, introduira dans l'ADN de la plante le gène d'intérêt (le transfert peut être réalisé sur des protoplastes, des cultures de tissu ou d'organe ou une plante entière). On utilise pour le transfert des souches d'*Agrobacterium* « désarmées » chez lesquelles le fragment du T-DNA ne comporte plus de gènes tumoraux.

✓ Transfert direct

Les monocotylédones étant de façon générale résistantes au crown-gall, d'autres technologies sont utilisées : le gène par exemple peut être injecté dans les cellules de la plante réceptrice en culture à l'aide d'un canon à particules ou dans des protoplastes par utilisation de chocs électriques (électroporation). Le pourcentage de réussite est faible ; cependant grâce à ces techniques, les céréales de grande culture telles que maïs, orge, blé, riz ont été transformées pour la première fois.

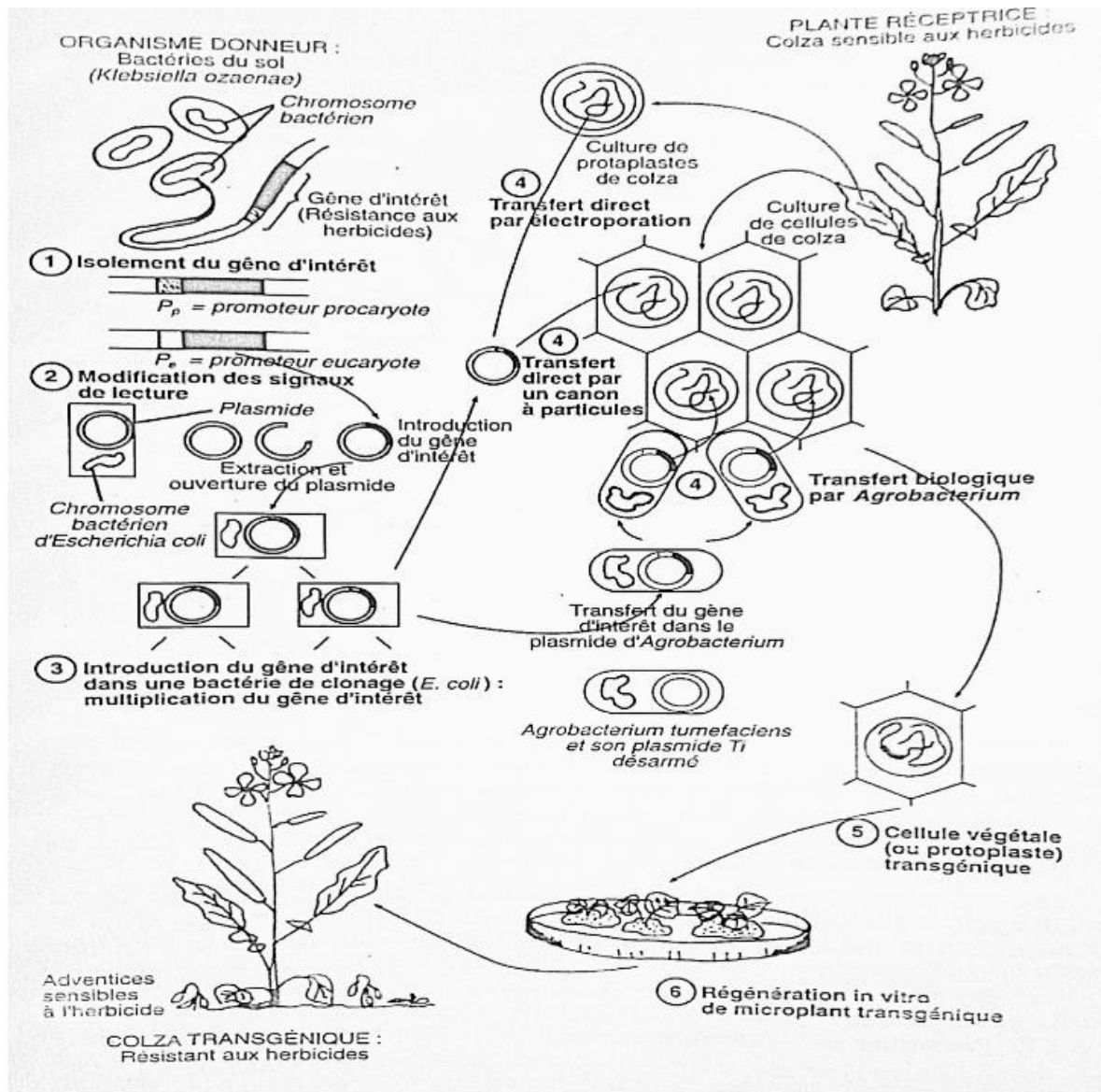


Figure. Les différentes étapes de la transformation génétique.

Accompagnement du gène

Le gène transféré, pour pouvoir s'exprimer dans la plante doit être accompagné d'un système de régulation : en amont un promoteur (qui assure l'initiation de la lecture) et en aval un terminateur (qui assure la fin de lecture). Le gène est aussi très souvent accompagné d'un gène marqueur de façon à pouvoir détecter les cellules transgéniques en les cultivant sur un milieu discriminant (par exemple un gène de résistance à un antibiotique).

Régénération de la plante transgénique

La régénération d'une plante entière à partir des cellules transformées n'est pas aisée : on se heurte souvent à un faible taux de régénération (surtout chez les monocotylédones). Par la suite le sélectionneur devra vérifier que le gène s'exprime et se transmet à la descendance.

Intérêt agronomique

Depuis plus de dix ans les principaux caractères introduits par transgénèse concernent les résistances aux herbicides (49 %), la stérilité mâle (18 %) et la résistance aux insectes (13 %). Ces résultats ont été principalement obtenus sur maïs (28 %), colza (28 %) et tabac (16 %). Pour chaque plante transgénique soumise à autorisation de mise sur le marché mission évalue les risques de toxicité, les risques alimentaires, allergiques, écologiques et économiques.

Création de plantes génétiquement modifiées (PGM)

- ❑ Techniques : *Agrobacterium tumefaciens*, biolistique, CRISPR-Cas9.
- ❑ Applications : résistance aux maladies, tolérance à la sécheresse, biofortification.
- ❑ Risques : flux de gènes vers espèces sauvages, acceptabilité sociale.

Création de lignées mâles stériles (CMS)

La stérilité mâle génique, naturelle, monogénique ($ms//ms$) est utilisée rarement (chez certaines espèces florales). Récessive, elle doit être associée à un gène marqueur, par exemple l'hypocotyle vert chez la tomate ; elle reste souvent inexploitable car s'accompagne de déficience ;

La stérilité nucléo-cytoplasmique (ou cytoplasmique)

est utilisée fréquemment (maïs, luzerne, betterave, carotte, oignon). Elle est engendrée par une interaction entre les gènes nucléaires et le cytoplasme (mitochondrie). Elle se manifeste quand un gène de stérilité récessif est à l'état homozygote ($ms//ms$) dans un cytoplasme « stérilisant » (S) que l'on oppose au cytoplasme « normal » (N). Les lignées femelles, A mâle-stériles, sont obtenues après quatre à cinq ans, en introduisant par rétrocroisement le génotype de la lignée femelle dans un cytoplasme S mâle-stérile, le donneur étant le plus souvent très éloigné. L'hérédité du cytoplasme S étant maternelle, l'hybride F1 ($A \text{ } \varnothing \times B \text{ } \sigma$) peut être selon son génotype mâle fertile ($S \text{ } ms//MS$) ou non ($S \text{ } ms//ms$). La fertilité de l'hybride peut alors être restaurée, dans le cas de la production grainière, en utilisant une lignée mâle B restauratrice de la fertilité ($MS//MS$). Une autre difficulté réside dans la multiplication de la lignée femelle A mâle stérile (sauf, bien sûr, si elle peut être multipliée végétativement), son autofécondation étant impossible. La technique consiste à croiser la lignée A ($S \text{ } ms//ms$) avec un « mainteneur » : ($N \text{ } ms//ms$), c'est-à-dire sa version mâle isogénique mais à cytoplasme normal ($S \text{ } ms//ms \times N \text{ } ms//ms \rightarrow S \text{ } ms//ms$).

Exemple de tournesol

Création de la lignée mâle stérile

Une source de stérilité mâle a été découverte pour le tournesol. Cette stérilité est apportée par le cytoplasme d'une plante mâle stérile et transmise automatiquement à sa descendance par le cytoplasme de ses ovules. La lignée mâle fertile de bonne qualité agronomique B, est convertie en son

homologue mâle stérile nommée A, par une succession de rétrocroisements avec la plante mâle stérile découverte.

Production de l'hybride

L'hybride est obtenu par croisement de la lignée mâle stérile A avec une lignée restauratrice de fertilité R. Cette lignée apporte le gène dominant (R) qui annule l'effet stérilisant du cytoplasme S de la lignée A. Elle permet ainsi la pollinisation et par conséquent la production de graines sur les plantes hybrides de tournesol.

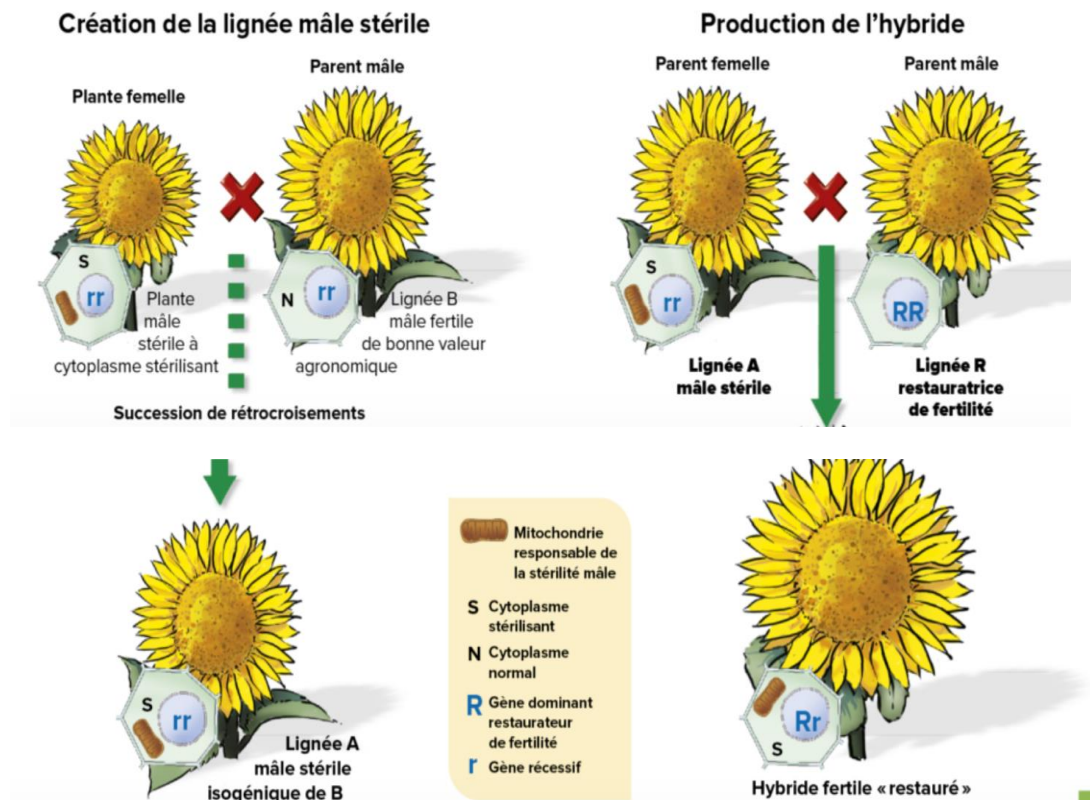


Figure. La stérilité mâle cytoplasmique

Création de lignées mâles stériles (CMS)

- ❑ Principe : Mutation cytoplasmique causant l'absence de pollen fertile.
- ❑ -Applications : production d'hybrides sans castration manuelle (maïs, sorgho).
- ❑ Limites : nécessité de lignées mainteneuses et restauratrices.

Le rétrocroisement

Lorsque le gène recherché, trouvé chez un géniteur « parent donneur » dégradant sur le plan agronomique, est à introduire dans le génotype d'un parent « receveur » de bonne valeur agronomique, la méthode de rétrocroisement (back-cross ou introgression) permet d'éliminer progressivement tous les gènes de géniteur, sauf le gène intéressant. Cette méthode est très utilisée pour introduire des caractères à hérédité simple dans un génotype déjà amélioré (gène de résistance, gène de stérilité mâle, gène qui gouverne la teneur en un constituant biochimique). Prenons l'exemple où le gène *I* de résistance au *Fusarium* du parent donneur, *Lycopersicon pimpinellifolium*, est introduit dans le *Boninellifolium*, est introduit dans le génotype d'une variété de tomate améliorée (Marmande par exemple), mais sensible (*i/i*) au *Fusarium*. L'hybride F1, hétérozygote résistant issu du premier croisement (*i/i* x *I/I*) contient 50 % des gènes du receveur. Ce F1 est recroisé (premier recroisement ou BC1 avec le parent receveur (*i/i*): la descendance F2 contient 50 % d'homozygotes sensibles (*i/i*) éliminés après inoculation artificielle du *Fusarium* et 50 % d'hétérozygotes résistants (*I/i*) chez lesquels la proportion en allèles du parent receveur est augmentée à 75 % (50 + 30). Ce taux passe à 87,5 % (50 + 72), 93,75 %, 96,8 % au cours de recroisements successifs, BC2, BC3, BC4. L'autofécondation des plantes résistantes (*I/i*) X (*I/i*) entraîne la disjonction des caractères (25 % *i/i* + 50 % *I/i* + 25 % *I/I*) et permet d'isoler des lignées résistantes II comptant des individus de contenu génétique quasi identique au parent receveur de bonne qualité agronomique. Cette méthode permet de cumuler successivement dans une bonne variété commerciale plusieurs gènes de résistance monogénique, par exemple dans la tomate Roma, les gènes VFN de résistance à la Verticilliose, à la Fusariose et aux Nématodes à galles

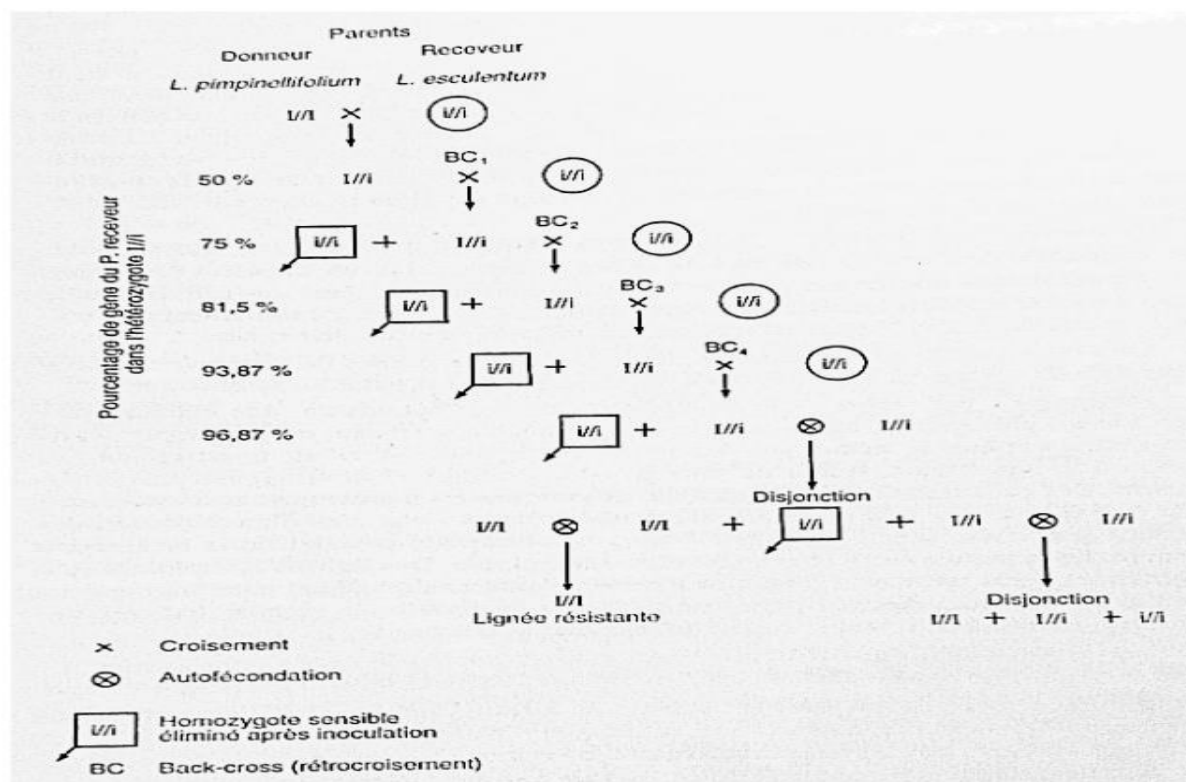


Figure. Méthode de rétrocroisement

Polyplœidisation et hybridations somatiques

Poly = plusieurs plœidie = nbre de chromosomes : donc polyplœidisation = évènement qui augmente le nombre de chromosome

Une espèce polyplœide se caractérise par la possession de plus de deux jeux complets de chromosomes. Ceux-ci peuvent avoir pour origine la même espèce (autopolyplœide) ou des espèces différentes (allopolyplœide).

La polyplœidie est un phénomène récurrent chez les végétaux et plus particulièrement chez les Angiospermes. Elle a été décrite aussi chez différents organismes eucaryotes comme les champignons et les levures. Cependant, ce phénomène est rare chez les animaux (A l'exception des poissons et des amphibiens). La polyplœidie joue un rôle fondamental dans l'évolution des plantes. En effet, elle est considérée comme un facteur majeur de spécialisation, de diversification et d'adaptation écologique des plantes. Elle est exploitée en amélioration génétique des plantes pour exprimer des critères agronomiques particuliers. Au cours de leur cycle de reproduction sexuée, les espèces passent d'un stade haploïde (n chromosomes) à un stade diploïde ($2n$ chromosomes). Cependant, dans le cas d'une espèce polyplœide, le nombre de chromosomes est supérieur à 2 ($3n$ triploïdie ; $4n$ tétraploïdie, $6n$ hexaploïdie, ...). Donc le terme de polyplœide qualifie les individus ou les cellules qui présentent plus de deux lots de chromosomes.

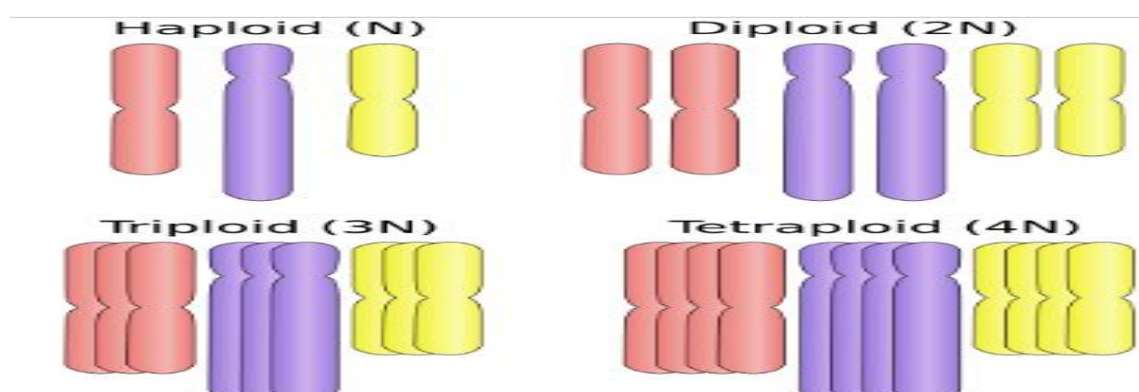
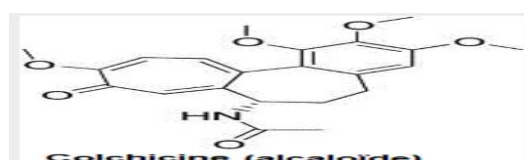


Figure. Représentation de configurations chromosomiques haploïde, diploïde, triploïde et tétraploïde. Les configurations triploïde et tétraploïde sont des cas particuliers de polyplœides.

La polyplœidie peut apparaître spontanément suite à des altérations au cours de la mitose (réplication d'ADN sans séparation des cellules filles). D'autres mécanismes, comme la production de gamètes diploïdes résultant d'une méiose anormale, peuvent également être à l'origine d'espèces polyplœides. Depuis le XX^{ème} siècle, des substances chimiques comme la colchicine ont été utilisées pour provoquer la polyplœidie. Il s'agit d'un **alcaloïde tricyclique** et toxique, extrait à partir des plantes du genre *Colchicum*. Cette molécule bloque la division cellulaire à la métaphase, elle se fixe sur les microtubules cellulaires (tubuline) empêchant ainsi la formation des fibres fusoriales (fuseau achromatique) et la séparation des chromosomes accolés au niveau de la plaque équatoriale.



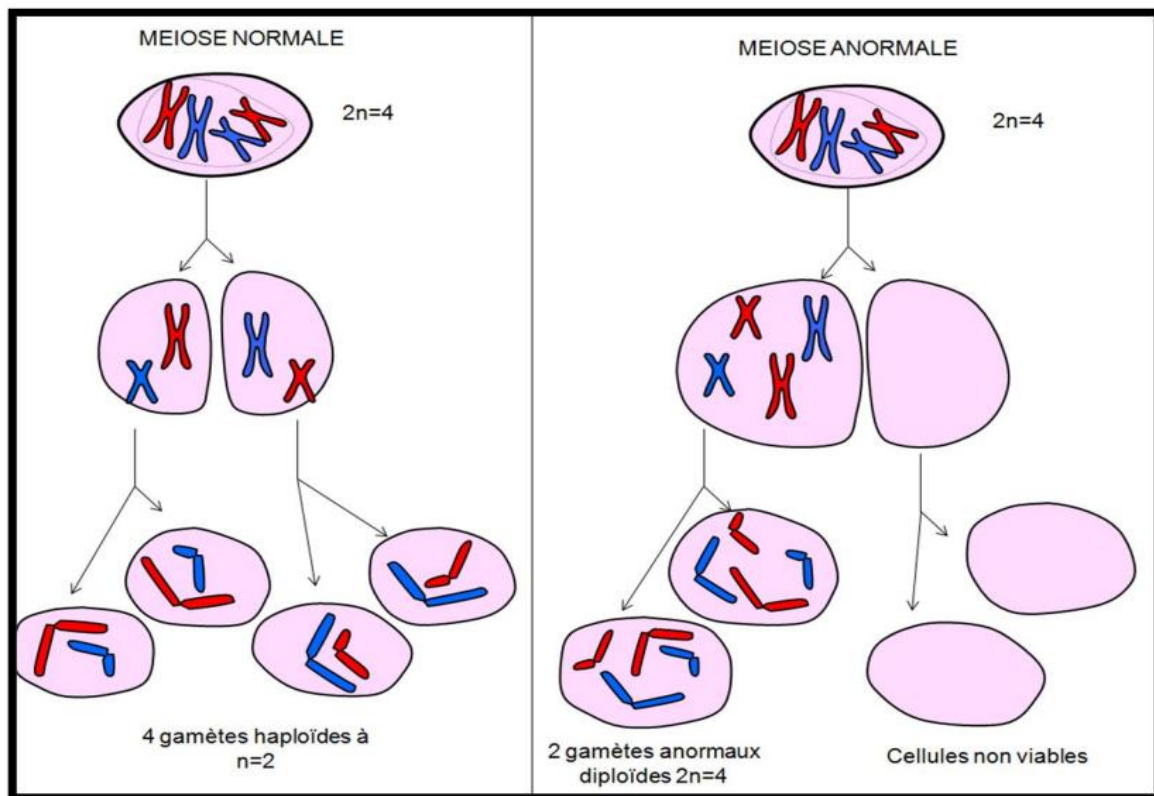


Figure. Meiose normale/Meiose anormale

Les différents types de polyplôïdes

Les autopolyploïdes: obtenus lorsque le même lot chromosomique est répété plusieurs fois, suite à des mitoses inachevées dans un individu (la même espèce). Les espèces polyplôïdes sont très courantes chez les plantes, incluant le **blé** (tendre et dur), la **pomme de terre**, le **soja**, le **bananier** et le **caféier**, ainsi que chez certains animaux comme des **salamandres**, des **grenouilles** et des **écrevisses**, où des exemples notables incluent le rat Vizcacha roux. La polyplôïdie, qui implique d'avoir plus de deux jeux de chromosomes, est un moteur clé de l'évolution et de la domestication, souvent exploitée pour améliorer les cultures ou les traits ornementaux (taille des fleurs, absence de pépins)

- **Pomme de terre** (*Solanum tuberosum*) : Tétraploïde (4 jeux de chromosomes).
- **Bananier** (*Musa*) : Triploïde (3 jeux), ce qui explique l'absence de pépins.
- **Caféier** (*Coffea arabica*) : Tétraploïde.
- **Soja, coton, colza, fraisier, canne à sucre.**
- **Plantes ornementales** : Iris (tétraploïdes) et Rhododendrons

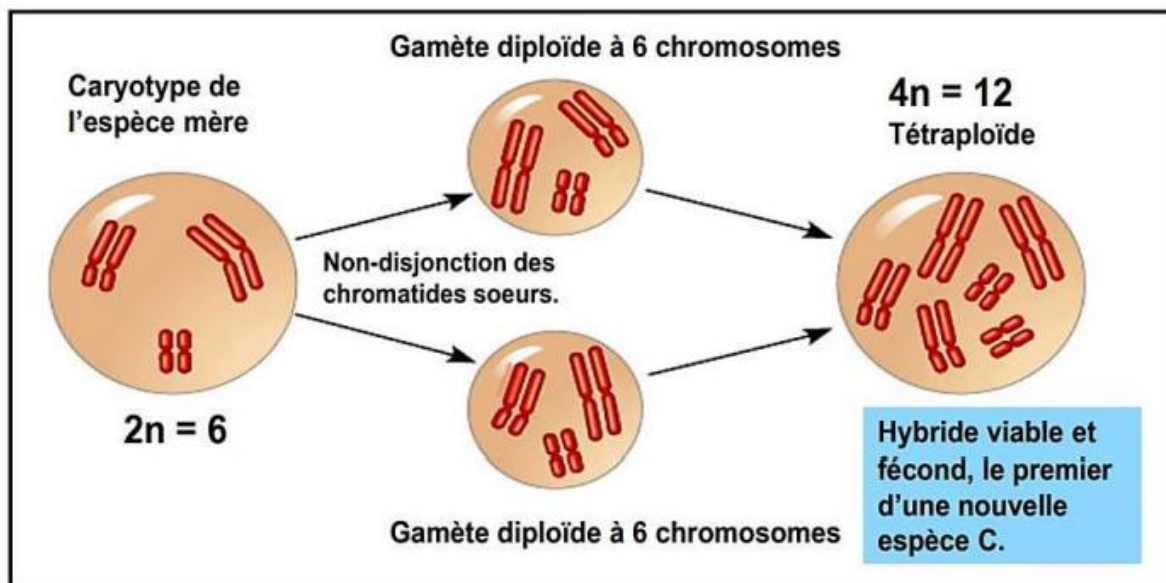


Figure. Autopolyploïdie

Les allopolyploïdes est un phénomène biologique où un organisme possède plusieurs jeux de chromosomes provenant de **deux espèces ou plus** différentes, résultant d'une hybridation interspécifique suivie souvent d'un doublement du nombre de chromosomes, rendant l'hybride stérile mais fertile. C'est un moteur clé de la spéciation chez les plantes, créant de nouvelles espèces stables comme le blé ([*Triticum aestivum*](#)).

Mécanisme

- **Hybridation** : Croisement entre deux espèces proches (ex: espèces AA et BB).
- **Stérilité** : L'hybride initial (AB) est souvent stérile car ses chromosomes non homologues ne s'apparient pas lors de la méiose.
- **Doublement** : Un événement spontané double les jeux chromosomiques (de AB à AABB), créant des paires régulières, ce qui restaure la fertilité et la stabilité génétique.

Exemples

- **Blé tendre** ([*Triticum aestivum*](#)) : Allohexaploïde issu de trois espèces ancestrales.
- **Triticale** : Hybride blé-seigle créé par l'homme, allopolyploïde.
- **Xenopus laevis** (crapaud africain) : Exemple animal, allotétraploïde

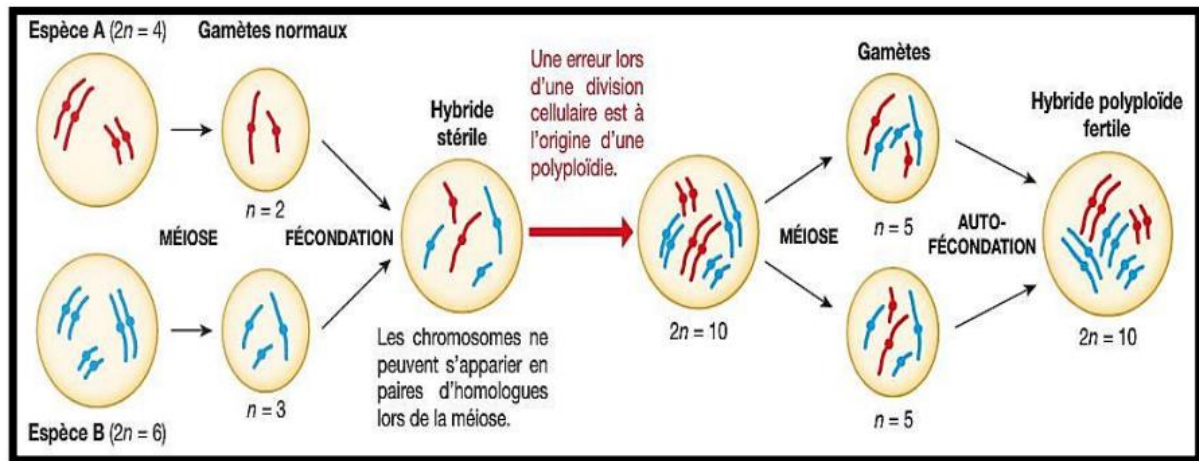


Figure. Allopolyploidie

Lors d'une hybridation, le descendant hérite de chaque parent, d'un lot de chromosomes qui ne trouvent pas leur homologue : la méiose est donc impossible car l'appariement est impossible. Cet individu hybride est alors stérile. Parfois dans une cellule germinale (à l'origine des gamètes), une méiose débute : les chromosomes sont doublés. Mais si la division ne s'effectue pas car le fuseau méiotique ne se forme pas (accident), les chromosomes néoformés ne sont pas séparés : il y a eu doublement accidentel de chromosome. Si plus tard une méiose reprend dans cette même cellule, comme chaque chromosome possède un double, la division sera possible et la fertilité sera rétablie. Pour que cet événement soit à l'origine de l'apparition d'une nouvelle espèce par autopolyploïdisation, il doit obligatoirement y avoir une autofécondation car les gamètes ayant subi une méiose anormale à l'origine d'un doublement les chromosomes ne seront pas compatibles avec les gamètes d'individus de la même espèce n'ayant pas subi de méiose anormale. En réalisant une autofécondation on réunit des gamètes dont le nombre de chromosomes a doublé, créant ainsi une cellule-oeuf au caryotype doublé.

Polyplôïdisation

- ❑ Principe : Doublement du génome (auto/allopolyploïdie),
- ❑ Applications : création de nouvelles espèces cultivées, amélioration des caractères.
- ❑ Limites : instabilité génétique, fertilité réduite.

Une mutation est une modification de l'information génétique contenue dans l'ADN. Elle affecte la séquence par le remplacement d'un ou plusieurs nucléotides, l'insertion ou la délétion de quelques nucléotides. Elle peut être due à l'instabilité du génome, à des erreurs de copie ou de réparation lors de la multiplication des cellules ou de la reproduction sexuée, à des coupures de l'ADN, à des conditions environnementales ou à l'action ciblée du sélectionneur.

Les mutations sont la source de la variabilité dans une même espèce

Les mutations spontanées

Les mutations spontanées sont rares (10^{-6} , 10^{-7} par gène et par génération) mais néanmoins significatives. La plupart sont neutres (n'influencent pas la valeur sélective), les moins favorables sont éliminées par la sélection naturelle. Les agriculteurs et les sélectionneurs qui ont choisi depuis des siècles de façon plus ou moins empirique les plantes les plus intéressantes ont souvent choisi en fait des plantes mutantes.

Les mutations provoquées

L'utilisation d'agents mutagènes physique (rayons ionisants : rayons X ; rayons gamma neutrons) ou chimiques (MSE: méthanes sulfonate d'éthyle), permet d'augmenter la fréquence des mutations jusqu'à 1% (contre 10^{-5} ou 10^{-6} pour la mutagène naturelle). Le traitement mutagène est appliqué à des gamètes (pollen) ou à des méristèmes (graines, bourgeons, tubercules). Se pose ensuite la difficulté du criblage, car en aucun cas la mutation n'est dirigée et elle reste aléatoire. Dans le cas le plus favorable où la mutation touche un caractère dominant porté par un gamète le tri peut être envisageable dans sa descendance directe ; mais s'il est récessif: il ne sera dévoilé qu'après ségrégation dans les générations suivantes. Le bilan des mutations provoquées est plutôt décevant car elles font souvent apparaître des caractères déficients (stérilité, nanisme, défaut de pigmentation). Mais elles ont aussi été couronnées de succès (mutants de poivrons mâles stériles. Gène muté «u» chez la tomate qui assure son murissement uniforme en empêchant la rétention de chlorophylle au collet des fruits mûrs, mutants résistants...).

Mécanisme de la mutagenèse

En provoquant des mutations sur des plantes, les sélectionneurs obtiennent et étudient de grandes collections de génotypes, différant pour certains caractères comme les résistances aux herbicides, aux pathogènes, les qualités gustatives ou nutritionnelles...La compilation et l'analyse complexes de l'ensemble des informations pour tous les mutants d'une même variété, permettent de comprendre de mieux en mieux les mécanismes impliqués dans le développement et la physiologie des plantes. Généralement, les sélectionneurs s'intéressent à une fonction donnée (agronomique comme la résistance à des facteurs abiotiques, de qualité du produit...) et après une mutagenèse induite sur une collection, cherchent des phénotypes mutants pour lesquels la fonction est perturbée. Ils peuvent ainsi remonter aux gènes impliqués. Il est également possible de partir de la séquence connue d'un gène dont on recherche ou veut modifier la fonction. Dans ce cas, les sélectionneurs provoquent puis recherchent des mutations, spécifiquement sur ce gène, et observent le phénotype des plantes obtenues afin de vérifier l'impact des mutations sur la fonction. Ils utilisent le TILLING.

TILLING : Identification à haut débit de mutation ponctuelle

TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) est une technique permettant de caractériser et d'utiliser la diversité génétique en identifiant des mutations induites localement dans le génome. Elle consiste à provoquer des mutations aléatoires (chimiques) sur un gène étudié (séquence connue, fonction non connue mais soupçonnée). Des enzymes capables de reconnaître spécifiquement des défauts d'appariement et de couper le gène étudié à certains endroits bien précis permettent d'isoler des plantes mutantes potentiellement intéressantes. Les chercheurs peuvent alors étudier le phénotype de chaque plante mutante et confirmer ou déterminer ainsi la fonction du gène.

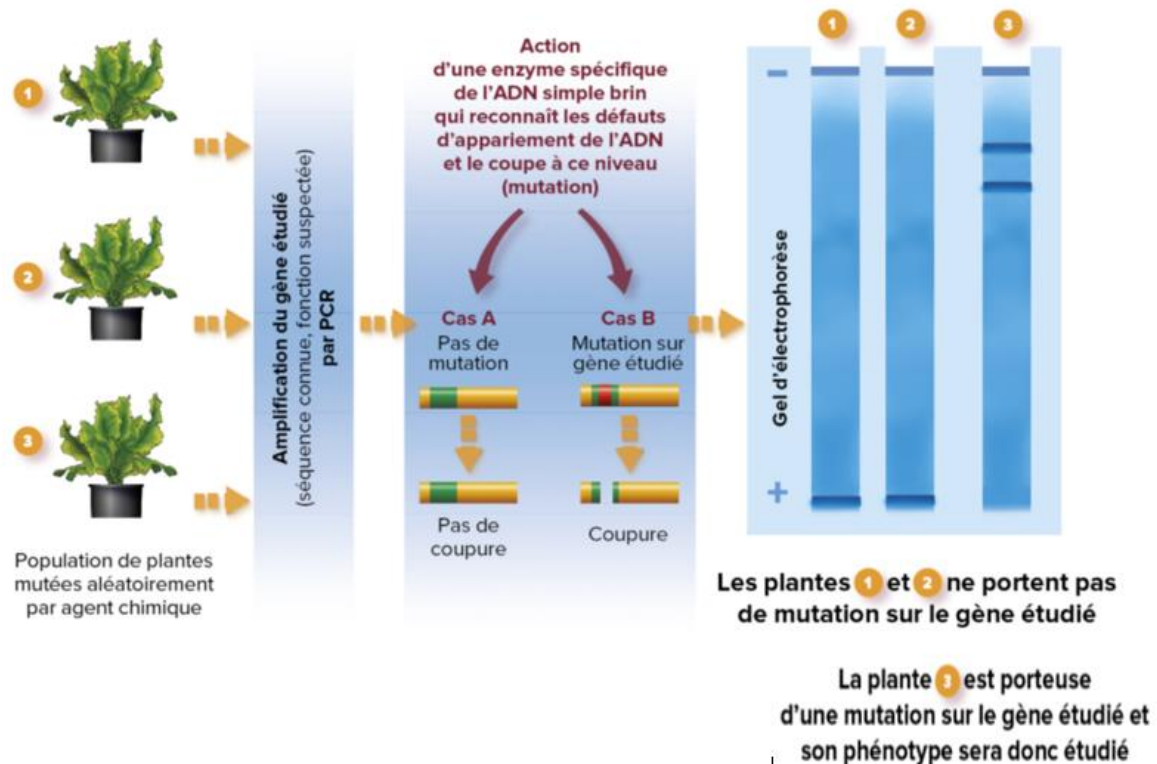


Figure. **TILLING : Identification a haut débit de mutation ponctuelle**

La mutagenèse dirigée par utilisation d'oligonucléotides

Des modifications du génome ou de son expression peuvent être provoquées de manière extrêmement spécifique et précise par l'utilisation d'oligonucléotides ou de protéines de synthèse. Les oligonucléotides de synthèse (petits morceaux d'ADN) permettent de cibler des gènes d'intérêt pour les modifier ou les inactiver. Ils correspondent à des segments de séquence de gènes que l'on veut étudier, mais qui diffèrent par un nucléotide. Introduit dans la cellule, cet oligonucléotide peut s'associer à l'ADN de la plante. Le mécanisme endogène de réparation va alors repérer le nucléotide différent et provoquer une mutation sur l'ADN de la plante. L'oligonucléotide, qui est rapidement dégradé dans les cellules, n'est jamais intégré dans le génome de la plante.

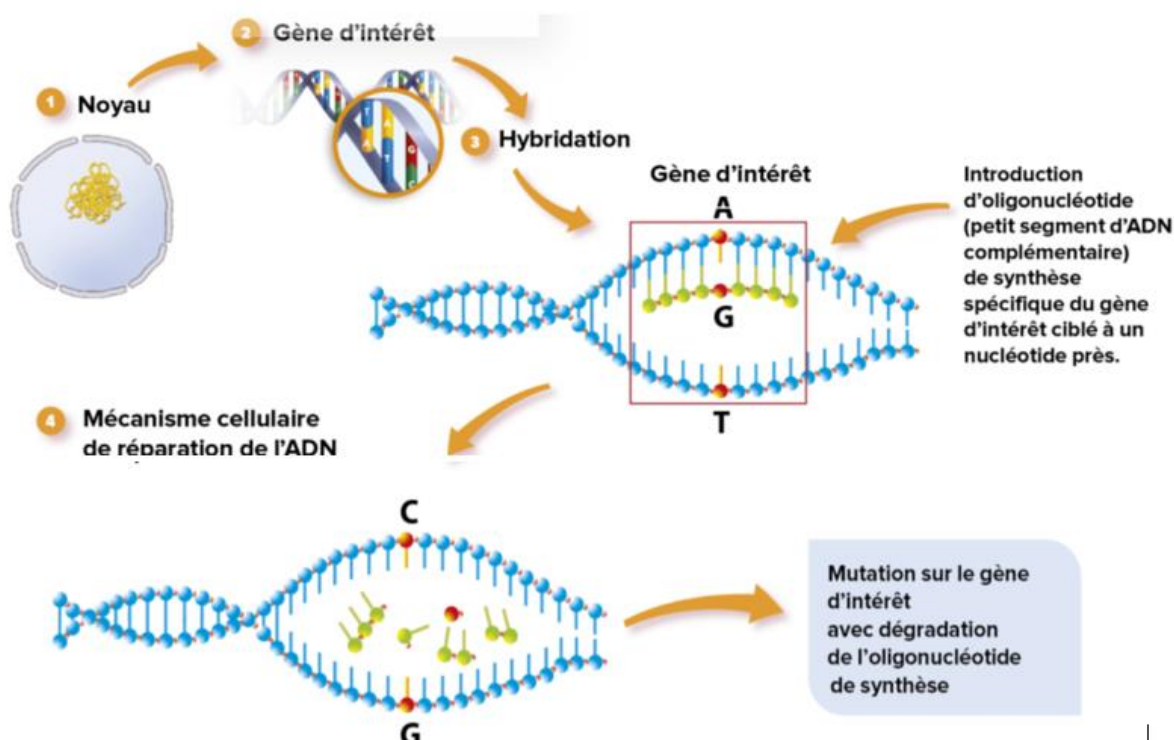


Figure. La mutagenèse dirigée par utilisation d'oligonucléotides

La mutagenèse dirigée par utilisation de nucléases

D'autres outils permettent d'induire des mutagenèses dirigées. Il s'agit de protéines de synthèse qui comportent une nucléase, c'est-à-dire une enzyme qui coupe les doubles brins d'ADN. Parmi ces outils, on distingue, les nucléases à doigt de zinc, les méganucléases, les TALENs et les CRISPR-Cas9. Les **nucléases à doigt de zinc** sont des protéines fabriquées artificiellement, capables de détecter des segments d'ADN déterminés et de les couper. Elles se caractérisent par la présence d'un ion de Zinc qui donne une forme tridimensionnelle particulière en ciseaux. Elles comprennent un domaine de liaison à l'ADN spécifique (qui reconnaît une séquence spécifique d'ADN) et un domaine catalytique non spécifique (qui induit la coupure du double brin d'ADN). Elles agissent en se liant spécifiquement à la une séquence d'ADN. Ces nucléases à doigt de zinc entraînent l'insertion ou la délétion ciblée d'un nucléotide, avec éventuellement pour conséquence l'apparition ou la disparition d'un caractère. D'autres types de nucléases peuvent être utilisées (**méganucléases, TALENs**) qui toutes utilisent le principe de reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN et la capacité de le couper. Les nucléases les plus récemment utilisées, les **CRISPR-Cas9** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), sont des endonucléases possédant un domaine qui se lie spécifiquement à un ARN guide d'environ 20 nucléotides. Cet ARN guide est complémentaire de la séquence cible de l'ADN et en s'hybridant spécifiquement avec elle, positionne la nucléase CRISPR-Cas9. Il en résulte un positionnement très précis de la nucléase qui coupe l'ADN à l'endroit souhaité. Ces nucléases peuvent être aussi utilisées en transgénèse pour couper l'ADN et permettre l'introduction d'un gène. nucléotide, avec éventuellement pour conséquence l'apparition ou la disparition d'un caractère. D'autres types de nucléases peuvent être utilisées (**méganucléases, TALENs**) qui toutes utilisent le principe de reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN et la capacité de le couper. Les nucléases les plus récemment utilisées, les **CRISPR-Cas9** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), sont des endonucléases possédant un domaine qui se lie spécifiquement à un ARN guide d'environ 20 nucléotides. Cet ARN guide est complémentaire de la séquence cible de l'ADN et en s'hybridant spécifiquement avec elle, positionne la nucléase CRISPR-Cas9. Il en résulte un

positionnement très précis de la nucléase qui coupe l'ADN à l'endroit souhaité. Ces nucléases peuvent être aussi utilisées en transgénèse pour couper l'ADN et permettre l'introduction d'un gène.

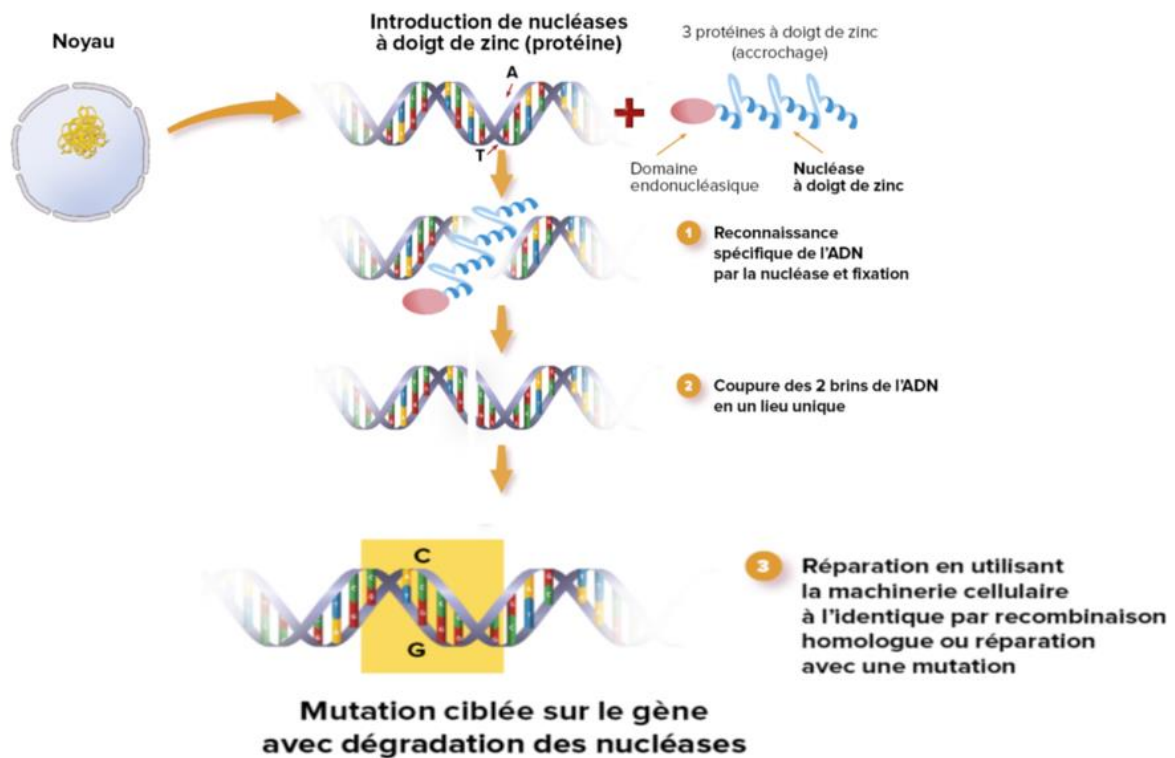


Figure. La mutagenèse dirigée par utilisation de nucléases

Mutagenèse et agents mutagènes

- ❑ Principe : Exposition du matériel végétal à des agents mutagènes.
- ❑ Agents : UV, rayons gamma, EMS.
- ❑ Applications : sélection de mutants utiles (riz nain, orge).
- ❑ Limites : mutations aléatoires, souvent délétères.