

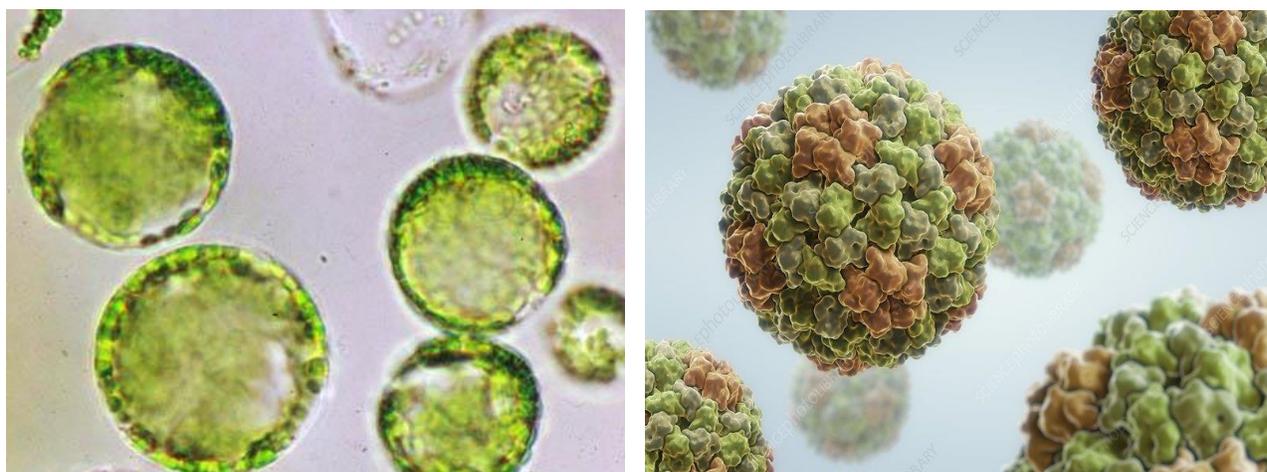
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Faculté des sciences
Département de Biologie

Polycopié de Cours de Master II en Biotechnologie Végétale : Multiplication *in vitro* des plantes

Présenté par Dr. **BENABDESSLEM Yasmina**



Université de Saida - Dr. Moulay Tahar

2020/2021

Préambule

Volume horaire global : 67 H30, travail personnel : 82H30

Prérequis : Ce polycopié de cours constitue un cadrage général, qui reprend des éléments acquis en licence, les complète et les développe.

Description du polycopié : Le présent document constitue un support de cours destiné aux étudiants de master II spécialité biotechnologie végétale. Il vise à leur transmettre les nouvelles méthodes biotechnologiques des cultures cellulaires et tissulaires *in vitro*, après avoir acquis les techniques de bases de la biotechnologie végétales. Le document s'adresse aussi à tous ceux qui souhaitent faire le point sur le sujet et se familiariser avec les nouvelles biotechnologies. Ce document est le compagnon dont l'étudiant a besoin pour comprendre la matière, assimiler le cours et réussir les examens. Il est subdivisé en deux grandes parties, d'une part : définitions, concepts et histoire de la biotechnologie, d'autre part : la culture *in vitro* des tissus / cellules végétales et applications biotechnologiques.

Objectifs pédagogiques du cours : Les étudiants par le biais de ce polycopié de cours vont pouvoir approfondir leurs connaissances en matière de techniques de la multiplication *in vitro* ainsi ils pourront s'imprégner des techniques fines employées dans ce domaine.

Evaluation : Examen final du cours théorique et évaluation continue par les comptes rendus des travaux pratiques.

Remerciements : Je présente mes vifs remerciements à Monsieur le Pr. HACHEM Kadda de l'université de Saida - Dr. Moulay Tahar, pour son concours à l'élaboration de ce travail.

Sommaire

Chapitre 1 : Définitions, concepts et histoire de la biotechnologie.....	1
I. Les Biotechnologies, notions de base et généralités :	1
1. Historique.....	1
II. Origine étymologique de la Biotechnologie.....	2
III. Principes de base et Concepts.....	2
1. Définitions des Biotechnologies	2
2. Définitions utilisées par les gouvernements et les organisations.....	3
• Canada:	3
• République fédérale d'Allemagne:	3
• France:.....	3
• Japon:	3
• Pays - Bas:.....	3
• La définition opérationnelle de la biotechnologie par la FDA.....	3
• La définition de l'OCDE en 2005 :	3
La biotechnologie un domaine multidisciplinaire	4
IV. Evolution et faits marquants des Biotechnologies.....	4
V. Exemples d'avènements importants en biotechnologie :	6
1 Enzymes de restriction (les ciseaux moléculaires).....	6
2 Le transfert de gènes par des techniques d'ADN recombinant (la transgénèse ou la création d'OGM).....	7
3 Les étapes de la transgénèse	8
4 Produits obtenus par les techniques de l'ADN recombinant :.....	9
4.1 Exemples de produits obtenus par les techniques de l'ADN recombinant :.....	9
VI. Les domaines d'applications des biotechnologies.....	10
1. Les domaines de la biotechnologie d'un point de vue horizontal	10
1.1. L'ADN recombinant et le génie génétique	10
1.2. Plantes et culture des tissus végétaux	11
1.3. Culture des cellules animales (des mammifères).....	11
1.4. Biocatalyseurs	12

2.	Les domaines de la biotechnologie d'un point de vue vertical	13
Chapitre 2 : La culture des tissus et cellules végétales <i>in vitro</i>		14
1.	Rappel sur les grandes étapes de l'avènement de la culture <i>in vitro</i>	14
•	La totipotence cellulaire :	14
•	L'aptitude à la dédifférenciation cellulaire (la plasticité morphogénétique des cellules végétales) :	14
•	Les premiers succès des cultures des tissus et cellules végétales	15
2.	Les applications de la culture <i>in vitro</i>	16
Chapitre 3 : Les différentes applications de la culture <i>in vitro</i>		19
I.	Les protoplastes et l'hybridation somatique	19
1.	La fusion spontanée	19
2.	Applications pratiques	23
2.1	Les différents hybrides somatiques	23
•	Fusion des noyaux et des cytoplastes	23
•	Fusion des cytoplastes seuls : les cybrides	24
3.	Une application de la fusion de protoplastes	25
•	Les méthodes employé pour la fusion des protoplastes	25
II.	Eradication des maladies virales par les méthodes biotechnologiques	27
1.	Les phytovirus	27
2.	L'éradication des virus	27
2.1	L'éradication des virus par thermothérapie et cryothérapie :	27
2.2	L'éradication des virus par culture <i>in vitro</i> des méristèmes (cellules embryonnaires)	30
3.	Mesure de l'efficacité de l'éradication virale par le test ELISA :	31
4.	Les risques liés à l'assainissement par culture <i>in vitro</i> de méristèmes	31
III.	Les haplométhodes :	33
1.	Le principe de l'haplodiploïdisation	33
•	Production de plantes mères	33
•	Obtention de la phase haploïde	33
•	Retour à l'état fertile diploïde	34
•	Sélection des lignées	34
•	Traitement à la colchicine	34
•	Déterminisme du niveau de ploïdie	34

IV. Les cultures <i>in vitro</i> à grande échelle (Les bioréacteurs)	35
1. Les bioréacteurs.....	35
2. Le procédé Rita®	35
• Principe de fonctionnement	36
• Installation du procédé Rita®	37
• Les principaux intérêts du procédé Rita®	38
• L'innovation du système :	38
• Résultats obtenus avec le procédé Rita® sur différentes espèces tropicales et avantages par rapport à la culture sur un milieu semi-solide	39
• Exemples de laboratoires pilotes	39
• Exemples d'application	40
V. La culture <i>in vitro</i> et la production des métabolites secondaires	42
1. La micropropagation des tissus végétaux	43
2. Intérêts des cultures <i>in vitro</i> en phytochimie.....	44
• Les facteurs biologiques	44
• Les facteurs chimiques	45
• Les facteurs physiques.....	46
OUVRAGES UTILISES.....	48

Chapitre 1 : Définitions, concepts et histoire de la biotechnologie

I. Les Biotechnologies, notions de base et généralités :

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. Actuellement la biotechnologie est considérée parmi les technologies les plus émergentes, en raison des grands progrès de la biologie moléculaire et du génie génétique ces dernières années.

Les biotechnologies sont, au même titre que la médecine, un des domaines d'application de la biologie fondamentale, c'est-à-dire de la connaissance des êtres vivants au plan structural et fonctionnel. Les progrès enregistrés au cours des dernières décennies, notamment grâce à l'exploitation des méthodes de la biologie dite « moléculaire », sont considérables. De même que leur effet commence de se faire sentir dans beaucoup de domaines médicaux, de même leur impact sur les biotechnologies traditionnelles devient sensible et ouvre de vastes perspectives. Ainsi, médecine et biotechnologies s'écartent-elles de plus en plus des voies empiriques à mesure que les connaissances fondamentales progressent.

1. Historique

Après la découverte de l'ADN en 1953, la recherche en biologie cellulaire et en pharmacochimie ont fait plusieurs bonds scientifiques, passant de la culture de cellules, à l'ingénierie cellulaire et des tissus vivants, sains ou cancéreux, avec la fusion cellulaire, l'invention de nouveaux vaccins, de stimulants immunitaires. La fécondation artificielle et la manipulation embryonnaire ont progressé de concert.

À la fin des années 1990, des sociétés spécialisées en biotechnologies apparaissent. L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) les définit comme des entreprises « engagées dans le domaine des biotechnologies du fait qu'elles utilisent au moins une technique de biotechnologie, pour produire des biens ou des services et/ou pour améliorer la recherche et développement en biotechnologies ». Ainsi sont nées des entreprises comme Amgen, Genentech, Decode Genetics, Genset, Transgene.

Dans les années 2000 à 2010, les micro-organismes (OGM) et des plantes (PGM), génétiquement modifiés et de nombreux enzymes sont de plus en plus utilisés dans de nombreux secteurs de l'économie ; dans la recherche, dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, dans certaines activités médicale ou de recyclage, d'élimination des déchets, de dépollution des sols ou de l'eau et de production d'énergie (méthanisation...).

Actuellement Les biotechnologies jouent un rôle important dans le secteur des industries de la santé, mais ont aussi un rôle émergent dans les secteurs de l'environnement, de l'agriculture, de l'agroalimentaire, ainsi que pour la mise au point de processus industriels innovants.

II. Origine étymologique de la Biotechnologie

La biotechnologie est un terme Composé de *technologie* et de *bio* pour biologie.

La biotechnologie, ou « technologie de bioconversion » résulte, comme son nom l'indique, d'un mariage entre la science des êtres vivants : la biologie et un ensemble de techniques nouvelles issues des différentes disciplines telles que la microbiologie, la biochimie, la biophysique, la génétique, la biologie moléculaire, le génie génétique et l'informatique...

Ainsi la biotechnologie est une science pluridisciplinaire par excellence, elle fait intervenir, avec la biologie fondamentale, différentes technologies innovantes issues d'une multitude de disciplines.

III. Principes de base et Concepts

Concepts de base :

Qu'entend-on par la biotechnologie ?

La raison d'être de cette question est que pour que la société décide de la gestion de la biotechnologie, il faut d'abord une compréhension commune de ce qu'elle est.

L'origine du terme "Biotechnologie" Selon Robert Bud, le terme «biotechnologie» a d'abord été utilisé par le hongrois Károly Ereky en 1919 pour décrire une technologie basée sur la conversion des matières premières en un produit plus utile, dans un livre intitulé « La biotechnologie de la viande, la production de graisse et de lait à grande échelle agricole ». Depuis sa création, la notion de la biotechnologie a été définie de diverses manières.

1. Définitions des Biotechnologies

- ❖ Ensemble des méthodes et techniques qui utilisent des organismes vivants ou leurs composants pour fabriquer ou modifier des produits, dans le but 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, 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.

2. Définitions utilisées par les gouvernements et les organisations

Ceci est une liste des définitions de la biotechnologie utilisées par les gouvernements et les organisations de divers pays dans les évaluations du domaine en développement dans leurs juridictions. La plupart de ces définitions englobent les biotechnologies anciennes et nouvelles.

- **Canada:** La biotechnologie est « l'application des organismes biologiques, des systèmes ou des processus pour les industries manufacturières ou de services ». La biotechnologie est « l'utilisation d'un processus biologique, que ce soit par l'intermédiaire de cellules microbiennes, végétales ou animales, ou de leurs constituants, pour fournir des biens et des services ».
- **République fédérale d'Allemagne:** « La biotechnologie traite de l'introduction de méthodes biologiques dans le cadre des processus techniques et de la production industrielle. Elle implique l'application de la microbiologie et de la biochimie avec la chimie technique et l'ingénierie des procédés »
- **France:** « La biotechnologie consiste en l'exploitation industrielle du potentiel des micro-organismes, des cellules animales et végétales et des fractions subcellulaires dérivées d'eux »
- **Japon:** La biotechnologie est « une technologie utilisant des phénomènes biologiques pour la copie et la fabrication de divers types de substances utiles »
- **Pays - Bas:** La biotechnologie est « la science des processus de production basés sur l'action des microorganismes et de leurs composants actifs et des processus de production impliquant l'utilisation de cellules et de tissus à partir d'organismes supérieurs. La technologie médicale, l'agriculture et l'élevage traditionnel ne sont généralement pas considérés comme des biotechnologies »
- **La définition opérationnelle de la biotechnologie par la FDA** (Food and Drug Administration) : « l'application des systèmes biologiques et des organismes aux processus techniques et industriels ».

Cette définition est nécessairement large. Elle prend à la fois les sciences « anciennes » et les « nouvelles » : les anciennes techniques de fabrication de fromages, de yogourt ou de vinaigre ainsi que les utilisations les plus avancées de la technologie de l'ADN recombinant. Elle prend en compte beaucoup d'applications, de la production d'enzymes pour des lessives, à la reproduction sélective des plantes et des animaux, au génie génétique de bactéries pour nettoyer des marées noires.

- **La définition de l'OCDE en 2005 :** « L'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à leurs composantes, produits et modélisations, pour modifier

des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services”. Cette définition de la biotechnologie comprend la liste suivante :

L'ADN / l'ARN

Les protéines et autres molécules

La culture *in-vitro* et l'ingénierie des cellules et des tissus

Les techniques de biotechnologie des procédés

Les vecteurs de gènes et d'ARN

La bioinformatique et la nanobiotechnologie, etc...

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, pour ne citer que quelques-uns. Chacun des domaines contributifs apporte son propre vocabulaire spécial et les normes de nomenclature et ces disciplines secondaires. Il est donc important de se familiariser avec la terminologie ainsi que les méthodes et techniques modernes de chaque discipline utilisée et pour cela, l'étudiant en biotechnologie est appelé à doubler d'effort pour une acquisition plus élargie des techniques et de terminologie dans les différentes disciplines qui constituent la biotechnologie.

IV. Evolution et faits marquants des Biotechnologies

L'avancée du front mouvant du savoir scientifique est toujours la résultante d'interactions entre progrès des méthodes et progrès des connaissances. Les avancées méthodologiques permettent de reculer les barrières opérationnelles qui limitent les explorations des chercheurs. Et c'est du résultat de ces dernières que dépend évidemment la conception de méthodes et de techniques nouvelles.

Dans notre description des bases fondamentales des biotechnologies, nous distinguerons deux aspects : les bases méthodologiques dont la plus spectaculaire est connue sous le nom de génie génétique en plus des découvertes cognitives dont nous donnerons une très brève synthèse des avènements les plus marquants des biotechnologies :

En 1953, James D. Watson et Francis Crick décrivent pour la première fois la structure hélicoïdale de l'acide désoxyribonucléique ou ADN par cristallographie aux rayons X.

1973 - Stanley Norman Cohen et Herbert Boyer effectuent la première expérience d'ADN recombinant réussie, en utilisant des gènes bactériens.

1975 - Méthode de production d'anticorps monoclonaux développée par Köhler et César Milstein.

1980 - Le brevet américain de clonage de gènes est attribué à Cohen et Boyer.

1982 – Humulin, l'insuline humaine de Genentech produite par des bactéries génétiquement modifiées pour le traitement du diabète, est la première drogue biotechnologique à être approuvée par la Food and Drug Administration.

1983 - La technique de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est conçue.

1990 - Le premier traitement de thérapie génique approuvé par le gouvernement fédéral est effectué avec succès chez une jeune fille qui souffrait d'un trouble immunitaire.

1994 - La Food and Drug Administration des États-Unis approuve le premier aliment génétiquement modifiée: la tomate «Flavr Savr».

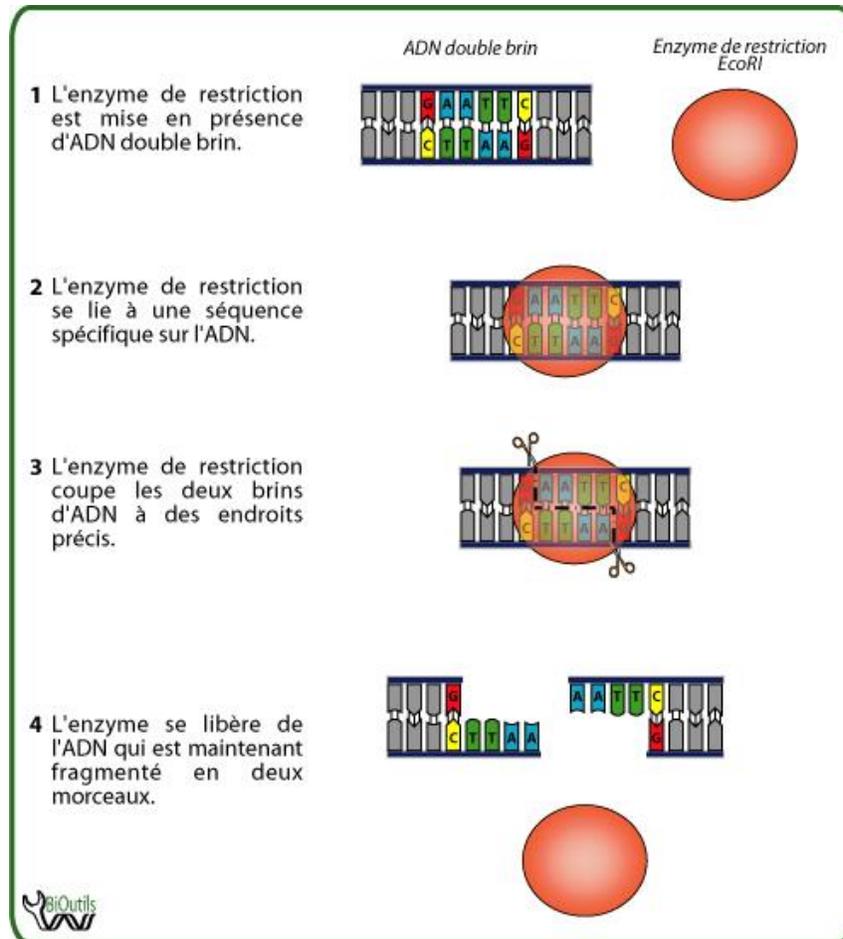
1997 - Les scientifiques britanniques, dirigés par Ian Wilmut du Roslin Institute, rapportent le clonage de Dolly le mouton en utilisant l'ADN de deux cellules de moutons adultes.

2002 - Le riz devient la première culture dont le génome est décodé.

2003 - Le projet du génome humain est complété, fournissant des informations sur les emplacements et les séquences des gènes humains sur les 46 chromosomes, en donnant des résultats importants sur l'ADN non codant humain.

V. Exemples d'avènements importants en biotechnologie :

1 Enzymes de restriction (les ciseaux moléculaires)



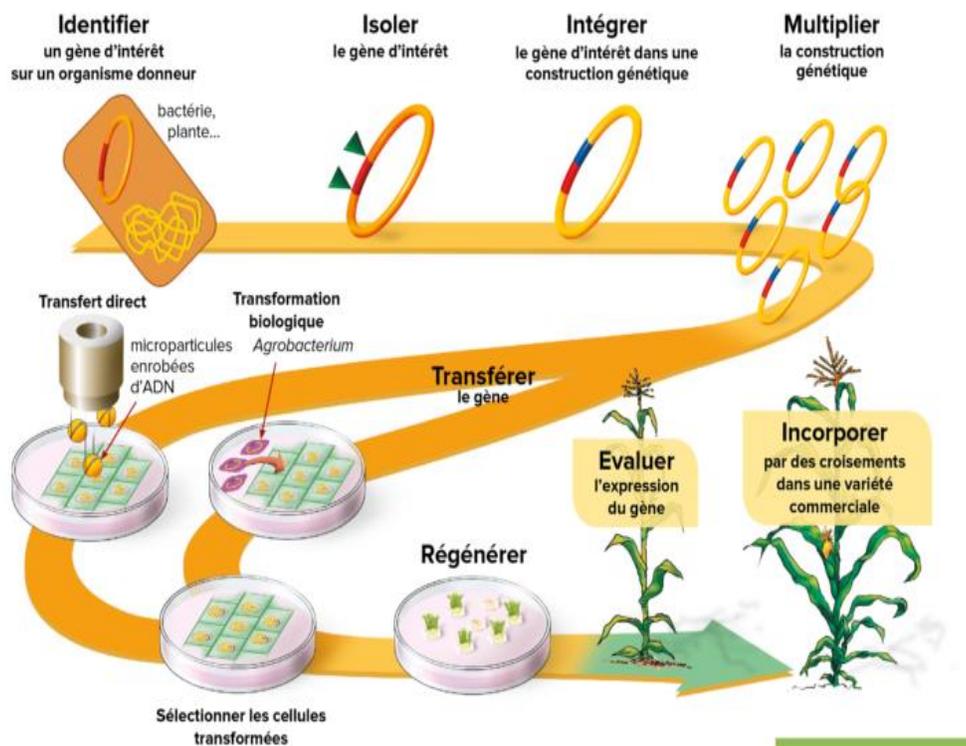
Comment les bactéries, dépourvues de système immunitaire, se défendent-elles contre les virus (appelés aussi phages) qui les infectent ?

En 1962 le Suisse Werner Arber, découvre que des enzymes bactériennes sont capables de couper l'ADN du phage au niveau de zones bien déterminées (différentes en fonction des enzymes), appelées sites de restriction, qui correspondent à de courtes séquences de 4 à 8 nucléotides. En 1970, l'Américain Hamilton O. Smith purifie la première enzyme de restriction à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*. L'année suivante, son compatriote Daniel Nathans l'utilise pour découper l'ADN du virus SV40. En faisant des différentes enzymes de restriction de véritables ciseaux moléculaires, qui permettent de couper l'ADN à volonté, ces trois chercheurs ont doté la biologie moléculaire d'un de ses outils les plus indispensables. Pour cette véritable invention du génie génétique, ils recevront, en 1978, le prix Nobel de physiologie ou médecine.

2 Le transfert de gènes par des techniques d'ADN recombinant (la transgénèse ou la création d'OGM)

Les 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. En revanche, la paroi pectocellulosique cellulaire rigide (absente des cellules animales) constitue un 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.

L'existence d'espèces végétales insensibles à cette bactérie a incité les chercheurs à mettre au point d'autres méthodes. Ainsi, actuellement deux techniques sont réalisées pour la transformation génétique des cellules végétales : l'une consistant à utiliser les propriétés des bactéries du sol du genre *Agrobacterium*, l'autre faisant intervenir des méthodes physiques ou chimiques qui permettent la pénétration de l'ADN directement dans les cellules végétales.



Les étapes de la transgénèse

3 Les étapes de la transgénèse

De manière simplifiée, on peut décrire les trois étapes de la transgénèse dans l'exemple des plants de tabac :

- Etape 1 : réalisation d'un gène artificiel (ou composite), construit en laboratoire et associant trois parties :
 - la séquence codante d'un gène bactérien (séquence codante de la néomycine phosphotransférase ou NPT qui confère la résistance à un antibiotique, la kanamycine).
 - un promoteur de l'ADN-T d'*Agrobacterium* .
 - un terminateur de ce même ADN-T. Les deux dernières parties constituent des parties du plasmide Ti de la bactérie et sont nécessaires pour pouvoir faire fonctionner le gène associé dans un environnement nouveau, la cellule végétale. Le gène ainsi construit est alors introduit dans un plasmide Ti "désarmé" (ne comportant plus de gènes tumoraux), lui-même réintroduit dans une bactérie *Agrobacterium*.
- Etape 2 : incubation de la bactérie modifiée avec des fragments découpés de feuille de tabac ; au niveau de la coupure, les cellules végétales sont blessées, ce qui stimule le système naturel de transfert de gènes d'*Agrobacterium*. Les fragments de feuilles sont ensuite incubés en présence de kanamycine et seules les cellules transformées proliféreront et donneront des cals.
- Etape 3 : culture de ces cals sur des milieux appropriés contenant des phytohormones, certaines des cellules donneront des embryons, qui se développeront ensuite pour régénérer des plantes entières (propriété de **totipotence** des cellules végétales somatiques).

Afin de vérifier que les plantes régénérées sont bien transformées, on sème leur graines (obtenues par autofécondation) qui, semées dans un milieu contenant de la kanamycine, donnent :

- Soit des plantes dépourvues de chloroplastes (la kanamycine interfère avec le développement des chloroplastes). Ces plantes sensibles sont blanches et leur développement est alors arrêté (photosynthèse impossible). Elles meurent.
- Soit des plantes chlorophylliennes normales. Dans ce cas, ces dernières sont résistantes à l'antibiotique, car elles fabriquent l'enzyme néomycine-phosphotransférase qui annule la toxicité de la kanamycine (processus de détoxification) et assure la mise en place de chloroplastes fonctionnels nécessaires à la poursuite du développement.

Statistiquement, 1/4 des plantes ne possèdent pas le gène de résistance ; c'est la proportion attendue pour un gène quelconque (lois de Mendel). Ce gène introduit se conduit comme n'importe quel autre gène : il fait alors partie du patrimoine génétique de la plante que l'on qualifiera de transgénique. Des analyses moléculaires au niveau de l'ADN sont aussi pratiquées pour vérifier le transfert du gène.

4 Produits obtenus par les techniques de l'ADN recombinant :

Les séquences d'ADN utilisées dans la construction de molécules d'ADN recombinant peuvent provenir de toutes les espèces. Par exemple, une séquence d'ADN de la plante peut être jointe à l'ADN bactérien ou encore une séquence d'ADN humain peut être jointe à l'ADN fongique. En outre, des séquences d'ADN qui ne se trouvent nulle part dans la nature peuvent être créées par les techniques de biologie moléculaire, et incorporés dans des molécules recombinantes. Grâce à la technologie de l'ADN recombinant et l'ADN synthétique, littéralement toute séquence d'ADN peut être créé et introduite dans une très large gamme d'organismes vivants.

Les protéines qui peuvent résulter de l'expression de l'ADN recombinant dans les cellules vivantes sont appelées protéines recombinantes. Lorsque l'ADN recombinant codant pour une protéine est introduite dans un organisme hôte, la protéine recombinante n'est pas nécessairement produite. L'expression de protéines étrangères nécessite l'utilisation de vecteurs d'expression spécialisés et nécessite souvent une importante restructuration par des séquences codantes étrangères.

4.1 Exemples de produits obtenus par les techniques de l'ADN recombinant :

- L'érythropoïétine (EPO) est produite maintenant par la technologie de l'ADN recombinant.
- Le facteur VIII anti-hémophilique et certains vaccins le sont également (vaccins contre l'hydatidose par exemple). De nombreuses autres protéines recombinantes telles que l'insuline, l'antithrombine III sont obtenues à l'aide de ce type d'ADN.

VI. Les domaines d'applications des biotechnologies

Les principaux domaines biotechnologiques :

La biotechnologie peut être examinée de deux façons différentes, d'un point de vue horizontal, qui distingue les techniques utilisées (dans les domaines de la biotechnologie) ou d'un point de vue

1. Les domaines de la biotechnologie d'un point de vue horizontal

Les domaines de la biotechnologie, suivant les techniques utilisées et d'un point de vue horizontal sont les suivants :

- l'ADN recombinant (génie génétique),
- la culture des tissus et cellules végétales,
- la culture des cellules animales (mammifère),
- les biocatalyseurs,
- le traitement et la réutilisation des produits résiduels via des méthodes biotechnologiques (biorémediation),
- les fermentations,
- l'obtention biotechnologique de combustible et de matière première organique comme alternative au pétrole,
- le génie des procédés biotechnologiques.

1.1. L'ADN recombinant et le génie génétique

La biologie moléculaire a permis la découverte la plus importante de la biotechnologie : il est aujourd'hui possible de séparer le gène responsable de la codification de la production de certaines substances, de le transférer dans un autre organisme-hôte et de produire ainsi certaines protéines utiles de manière plus efficace.

Grâce à ces progrès, la biotechnologie produit aujourd'hui à grande échelle des hormones, des vaccins, des facteurs de coagulation du sang et des enzymes. Par ailleurs, la production biotechnologique de protéines permet d'éviter les inconvénients de la production à partir d'organismes supérieurs :

- À la différence de la culture de microorganismes, la culture de cellules d'organismes supérieurs à grande échelle n'est pas pratique car leur croissance est lente et leur contamination, fréquente.
- Le coût d'une culture de cellules est bien plus élevé que celui d'une culture microbienne, qui a l'avantage, se reproduisent facilement et rapidement.

Ce domaine de la biotechnologie permet donc de produire de nouvelles protéines, par exemple des

enzymes qui seront utilisées comme biocatalyseurs. La capacité spécifique des biocatalyseurs est gouvernée par la structure moléculaire ; au moyen de la technique de l'ADN recombinant, il est possible de modifier de façon sélective les gènes qui codifient la synthèse cellulaire des enzymes. Par la suite, lors du transfert du nouvel ADN dans un microorganisme-hôte, on peut obtenir une nouvelle souche qui produira l'enzyme souhaitée.

1.2. Plantes et culture des tissus végétaux

Les plantes, en plus de leur rôle-clé dans la production d'aliments, sont une source importante de matières premières et de médicaments. En effet, rappelons que 25 % des médicaments actuels sont d'origine végétale. Cependant on peut considérer actuellement, que près de 60% des médicaments présents sur le marché sont issus ou dérivés de substances naturelles, généralement d'origine végétale.

D'autre part, la culture d'organismes végétaux unicellulaires (algues) pour la production de biomasse ou l'extraction de substances de métabolites secondaires est une pratique qui augmente de jour en jour, à mesure que se développe la biologie cellulaire et moléculaire.

Le clonage des plantes modifiées, via les techniques de *culture in vitro*, a déjà été expérimenté avec succès. Cette technologie permet de remédier aux carences, d'améliorer les espèces et de mettre en place une résistance aux différentes maladies (Bactériennes, fongiques, virales et parasitaires) de nombreuses espèces végétales.

Enfin, la transgénèse dans les plantes est également étudiée comme moyen de développer des variétés végétales pouvant servir de bio-usines et produire des substances d'intérêt médical, biomédical ou industriel en quantités faciles à isoler et à purifier.

1.3. Culture des cellules animales (des mammifères)

La première étude sur la fusion spontanée de deux cellules somatiques différentes pour former une hétérocaryote (un minimum de deux noyaux et un unique cytoplasme) a été publiée en 1960 par Barsky et ses collaborateurs français.

Les hétérocaryotes permettent d'obtenir l'expression des gènes des deux cellules parentales. En 1975, Kohler et Milstein ont appliqué cette propriété à leur célèbre synthèse d'anticorps monoclonaux, obtenus via la fusion de lymphocytes producteurs d'anticorps avec des cellules malignes de myélome, qui ont pour propriété une reproduction rapide. Ces cellules hybrides de myélome conservent cette propriété (la reproduction rapide) tout en exprimant des anticorps spécifiques.

Certaines protéines étant produites à partir des seules cultures de cellules de mammifère, cette culture des cellules à grande échelle est l'un des objectifs des biotechnologies. Les anticorps monoclonaux et l'interféron sont deux exemples de ce type de protéines, qui sont très importantes pour la préparation des produits thérapeutiques et les applications analytiques.

1.4. Biocatalyseurs

Les enzymes sont des catalyseurs naturels ; comme c'est le cas pour tous les processus naturels, elles sont très spécifiques et font preuve d'une efficacité thermodynamique. Utilisées depuis des siècles, en particulier dans le secteur de la production d'aliments, elles sont l'une des formes les plus anciennes de la biotechnologie.

L'utilisation d'enzymes (isolées ou en cellules mortes ou mourantes) est d'une grande importance non seulement dans l'industrie alimentaire mais également dans la production de substances chimiques, dans les systèmes analytiques et de diagnostic, dans le traitement des maladies et enfin, dans l'industrie émergente des technologies plus propres.

L'utilisation des enzymes dans tous ces domaines a été rendue possible grâce aux meilleures connaissances de la fonction des enzymes dans les systèmes métaboliques des êtres vivants, de la structure des enzymes et par-dessus tout grâce à la possibilité d'obtenir des enzymes de synthèse via la manipulation génétique des microorganismes (OGM). Ces facteurs ont fait que de nombreuses entreprises sont spécialisées dans la production à grande échelle d'enzymes d'origine microbienne.

2. Les domaines de la biotechnologie d'un point de vue vertical

Les domaines de la biotechnologie, d'un point de vue vertical, sont les suivants :

- Cette classification se concentre sur les secteurs d'application industrielle des biotechnologies

Tableau 1 : Principales applications de la biotechnologie utilisant le code des couleurs

Les différents domaines	Applications
Biotechnologie rouge	<ul style="list-style-type: none">-Traitements des maladies (techniques de diagnostic moléculaire, techniques thérapeutiques).-Production de vaccins, d'antibiotiques.-Industrie pharmaceutique et cosmétique
Biotechnologie verte	<ul style="list-style-type: none">-Production de variétés végétales modifiées (culture de cellules et de tissus et OGM).-Production de races animales modifiées (cultures de cellules et tissus).-Production de biofertilisants et de biopesticides- Industrie Agroalimentaire
Biotechnologie Jaune	<ul style="list-style-type: none">- Protection de la biodiversité- Gestion des déchets et dépollution (bioremédiation par les microorganismes et les plantes)
Biotechnologie blanche	<ul style="list-style-type: none">-Procédés industriels (conception et production de nouveaux matériaux à usage quotidien comme les bioplastiques, textiles ...) non polluants.-Développement de nouvelles sources d'énergie durables comme les biocarburants
Biotechnologie bleue	<ul style="list-style-type: none">-Exploitation des ressources maritimes pour créer de nouveaux produits.-Production de biomatériaux et agents pharmacologiques régénératifs.

Chapitre 2 : La culture des tissus et cellules végétales *in vitro*

1. Rappel sur les grandes étapes de l'avènement de la culture *in vitro*.

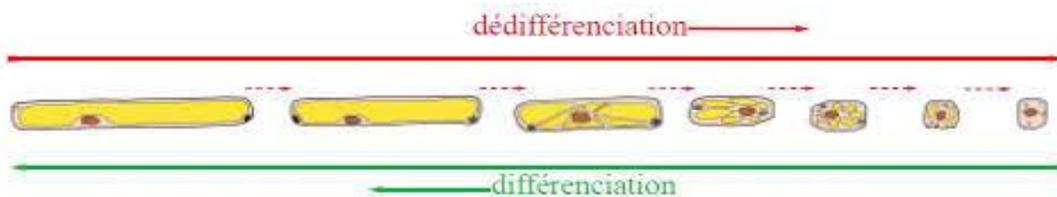
Gautheret est le premier à entrer dans l'histoire de la culture *in vitro* en 1939, il cultive pour la toute première fois des cellules isolées de carottes sur un milieu stérile et nutritif, qu'il réussit à faire vivre pendant quelques mois.

Les premières tentatives de culture d'organes vivants isolés à partir des animaux ont commencé dès 1870. Cependant ces essais peuvent être considérés comme des conservations d'organes (queues de têtards de grenouille).

- *La totipotence cellulaire :*

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 du clonage végétal (la micropropagation). 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".



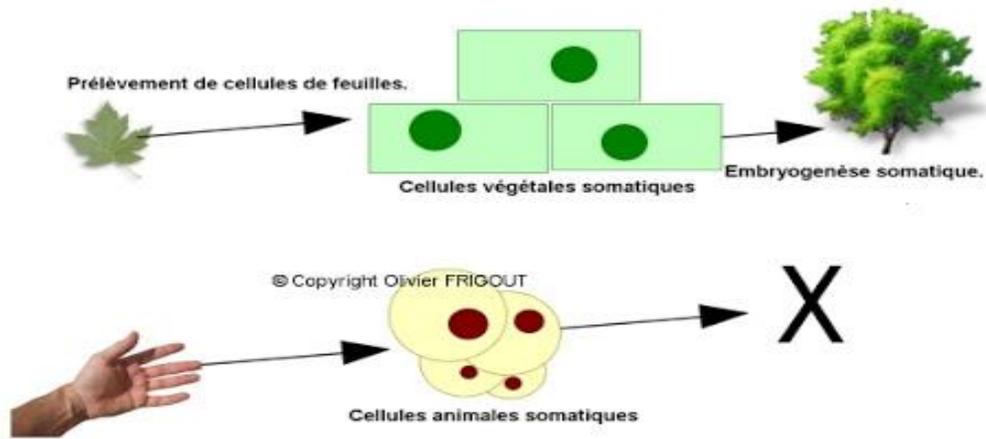
Théorie de la totipotence

- *L'aptitude à la dédifférenciation cellulaire (la plasticité morphogénétique des cellules végétales) :*

On observe les grandes cellules différenciées (dans les feuilles, tiges, pétales,...) perdre leurs vacuoles, leur noyau se diviser activement, et de nombreuses et très petites cellules méristématiques (embryonnaires) apparaître. C'est la dédifférenciation, une capacité unique aux cellules végétales.

Une cellule dédifférenciée peut alors évoluer dans toutes sortes de directions, à la manière d'un zygote. Le programme génétique de ces cellules néoformées (dédifférenciées) est très vaste (toutes les potentialités morphogénétiques sont possibles = Totipotence)

En biologie cellulaire et développementale, on appelle dédifférenciation le processus par lequel une cellule adulte déjà différenciée régresse à un stade indifférencié et est capable de générer de nouveaux types de cellules. Ce phénomène d'embryogenèse somatique est typique des tissus végétaux.



La plasticité morphogénétique des cellules végétales

Remarque :

Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales somatiques restent totipotentes. Cette caractéristique permet par embryogenèse somatique d'obtenir une plante adulte à partir d'une seule cellule (le clonage par excellence). La maîtrise de cette technique a été fondamentale dans le cadre de la mise au point d'organismes génétiquement modifiés ou OGM.

- *Les premiers succès des cultures des tissus et cellules végétales*

En 1934, WHITE 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 effet, en 1934, on découvre l'auxine (AIA) : il faut 100 kg de maïs immature pour obtenir 500 mg d'AIA. Cette substance naturelle (hormone de croissance) est principalement synthétisée dans les parties apicales et agit sur l'élongation des cellules donc sur la croissance des plantes.

En 1939, Gautheret obtient à partir d'un explant (un fragment de tissu), un amas de cellules dédifférenciées: un cal. On peut cultiver ce cal indéfiniment dans le temps. Avec lui démarre vraiment la culture *in vitro*, avec la notion de la dédifférenciation et la réorientation morphogénétique.



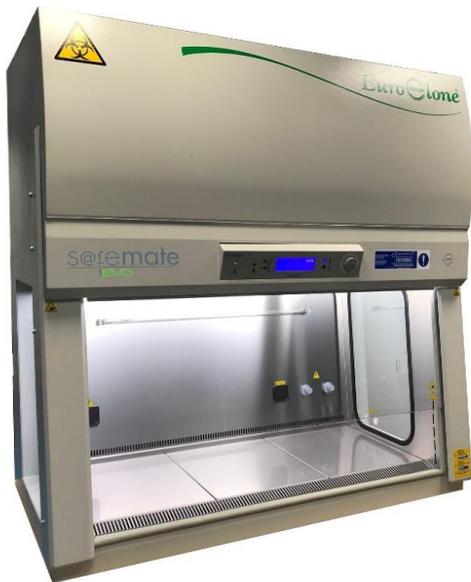
Mise en culture en boîtes Petri et obtention de cals

Un fragment de tissu (explant) mis en culture sur un milieu approprié. Quelques jours plus tard, on voit apparaître un amas plus ou moins vert : on a la formation d'un cal, cette structure résulte de la prolifération des cellules après dédifférenciation.

2. Les applications de la culture *in vitro*

Utiliser un fragment de plante pour reproduire un individu comme dans le bouturage, ou pour l'associer à une autre plante, comme dans la greffe, sont des biotechnologies anciennes. De ces techniques sont dérivées des méthodes plus fines (biotechnologiques), partant de fragments de plus en plus réduits, jusqu'à la cellule isolée ou le gamète.

Les biotechnologies végétales reposent principalement sur les cultures *in vitro*. Les premiers résultats intéressants de culture de tissus végétaux furent obtenus par Gautheret, Nobecourt et White en 1938. Elles se font au laboratoire, en conditions stériles (hotte à flux laminaire) et très contrôlées (chambres de culture), dans des flacons ou des tubes hermétiques, sur des milieux synthétiques semi-solides, solides ou liquides, contenant des éléments minéraux (macroéléments et microéléments), des sources énergétique (sucres), des substances de croissance (hormones) et des vitamines .



Hotte à flux laminaire



Chambre de culture

Les applications sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine de la production de nouvelles variétés commerciales que dans celui de la recherche fondamentale et appliquée, ou encore pour conserver la biodiversité (banques de gènes) ou sauvegarder des espèces menacées.

Les techniques de culture *in vitro* cherchent à contrôler les facteurs de l'environnement de l'explant (température, lumière, composition du milieu, combinaison hormonale...) afin de l'orienter vers un programme d'évolution morphogénétique (histogénétique ou organogénétique) déterminé.

Le choix de l'application dépend de plusieurs éléments parmi lesquels nous citons :

Premier élément : toutes les cellules du végétal n'ont pas les mêmes potentialités au cours du développement. Certaines se spécialisent et se différencient et perdent (temporairement) leur possibilité de se diviser. D'autres donnent des plages de cellules indifférenciées (cellules embryonnaires) qui forment les méristèmes et qui se divisent activement. Ce sont des zones à l'origine de **la croissance indéfinie** (en largeur ou en longueur) des plantes.

Deuxième élément : des régulateurs de croissance ont été identifiés. Ils affectent la vitesse de croissance des cellules et leurs degrés de différenciation, et sont impliqués dans les corrélations entre organes. La découverte de ces substances (auxines, gibbérellines, cytoquinines, acide abscissique, éthylène) a permis le développement des techniques de culture *in vitro*.

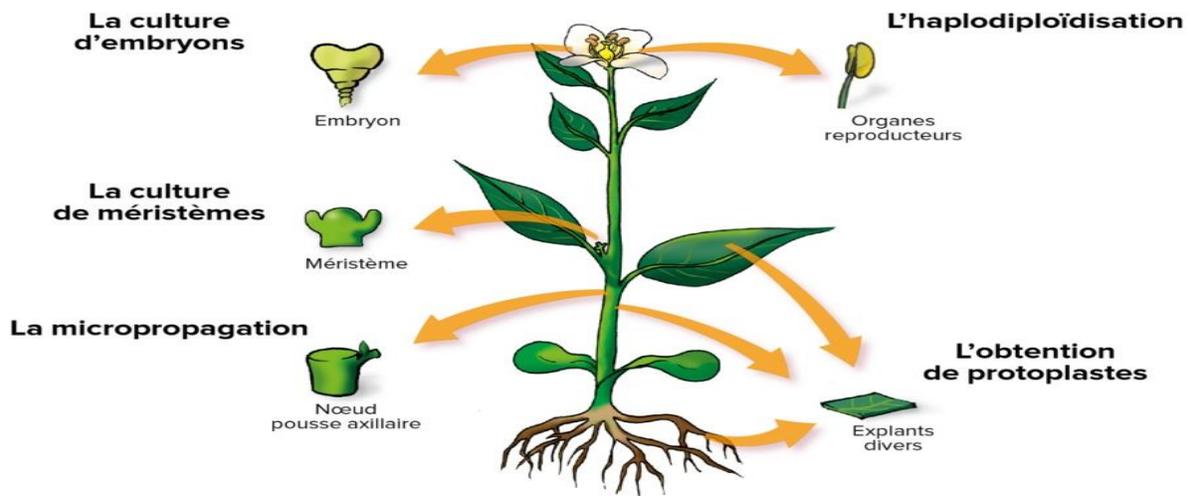
Autres facteurs : d'autres facteurs interviennent et notamment le choix de l'explant, dont dépend la totipotence des cellules prélevées. Les mécanismes de « vieillissement » sont dus à des modifications de la structure des méristèmes. Pour donner un exemple on peut citer l'aptitude au bouturage qui décroît lorsque l'âge de la plante augmente. Mais la perte liée à l'âge ne se retrouve pas de façon égale au niveau des différentes parties de la plante, la partie racinaire constituant

souvent le pôle de juvénilité de la plante. Idem pour la période de l'année dans laquelle on se situe : réapparition d'un fonctionnement de type juvénile au début de chaque poussée annuelle, ou même de chaque répétition. Ou encore « retour en arrière » lors de la floraison : c'est la régénération plus ou moins complète du potentiel morphogénétique initial, et celle-ci précède la différenciation des organes floraux.

On pourra donc intervenir sur la qualité de l'explant : en fonction de l'âge de la plante, en fonction de la période de prélèvement, en fonction de la nature de l'explant et des tissus qui le composent.

Remarque :

Le choix de l'explant est étroitement lié au type d'application biotechnologique envisagée.



Les applications de la culture *in vitro* et le choix de l'explant

Chapitre 3 : Les différentes applications de la culture *in vitro*

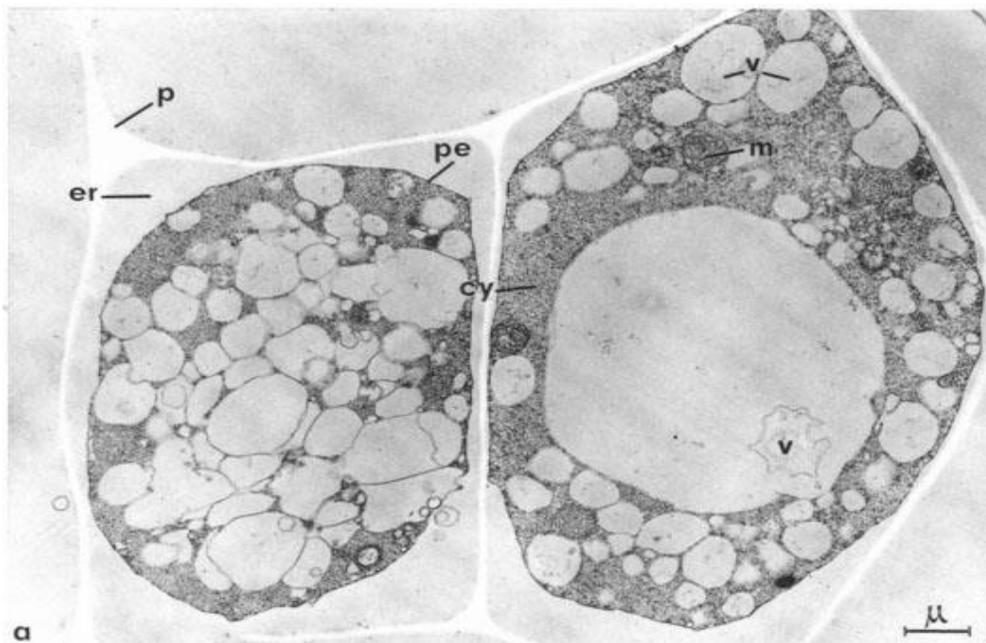
I. Les protoplastes et l'hybridation somatique

Au cours de la reproduction sexuée, les informations génétiques contenues dans le cytoplasme sont transmises par la mère. En revanche, la fusion de protoplastes conduit à une hybridation des noyaux, mais aussi à celle des cytoplasmes. Ceci est très intéressant pour le transfert et l'amélioration de caractères à hérédité cytoplasmique, comme la stérilité mâle. On parle d'hybridation somatique (car issue de cellules non reproductrices de la plante, Soma = corps).

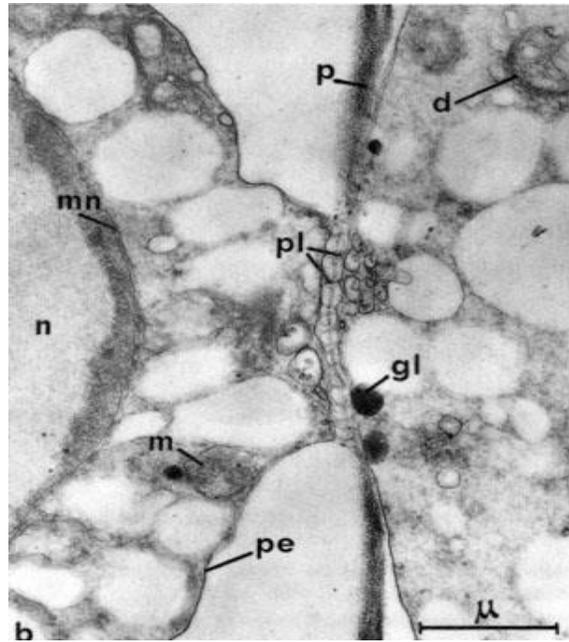
Les protoplastes sont des cellules chargées négativement néanmoins il est possible d'observer quelque fusions spontanées (environ 5%). La fusion est obtenue sous l'action d'agents chimiques (polyéthylène glycol et calcium) ou d'un choc électrique. L'étape suivante est la régénération de la paroi pectocellulosique 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.

1. La fusion spontanée

Dès que des protoplastes ont été isolés, la recherche s'est concentré sur l'obtention des fusions entre protoplastes. Des fusions spontanées ont été observées dans des populations de protoplastes justes après leur isolement. Pendant quelques temps on a pensé que ceci était une première étape vers une fusion dirigée. En fait il n'en était rien. 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.

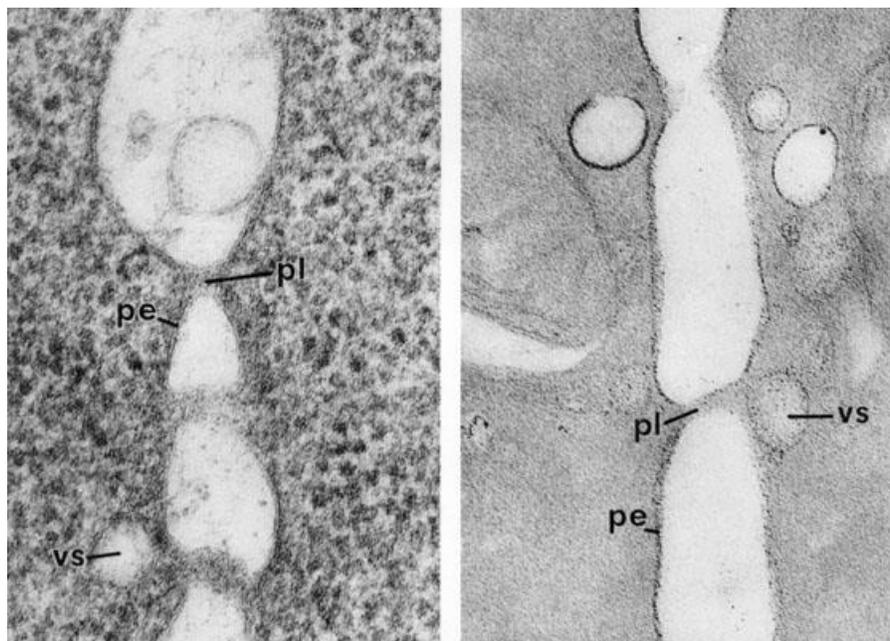


Deux cellules jointives (MET, contraste: acétate d'uranyle); la paroi n'est pas contrastée



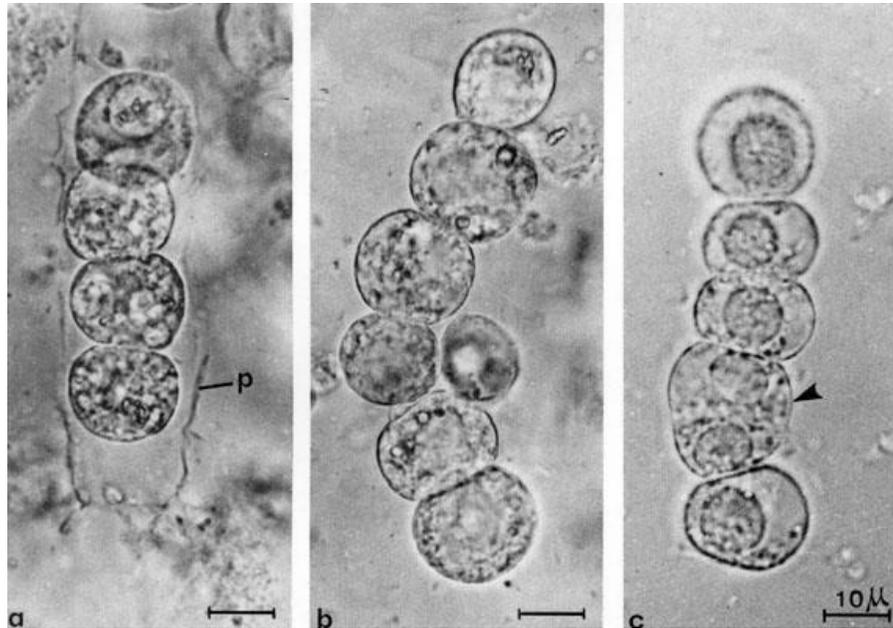
Deux cellules jointives (MET, contraste: test PATAg des polysaccharides); des plasmodesmes relient les deux cellules à travers la paroi bien contrastée.

Même après la digestion par les enzymes, ces cellules peuvent rester en contact à ce niveau. Elles peuvent rester solidaires par leurs plasmodesmes.



Clichés au MET: à gauche, acétate d'uranyle; à droite test des polysaccharides

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.

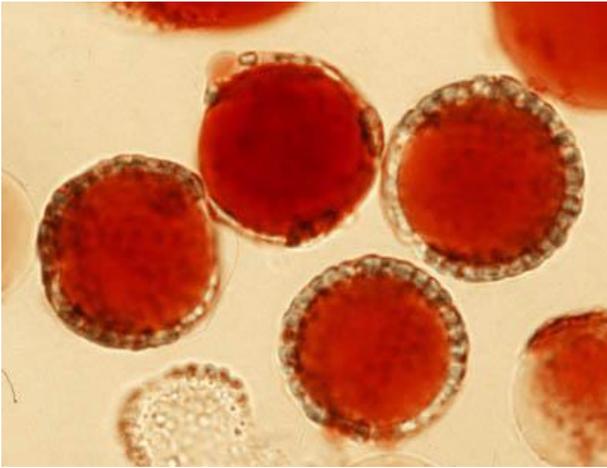


Un exemple de fusion spontanée par leurs plasmodesmes entre cellules méristématiques de racine d'oignon.

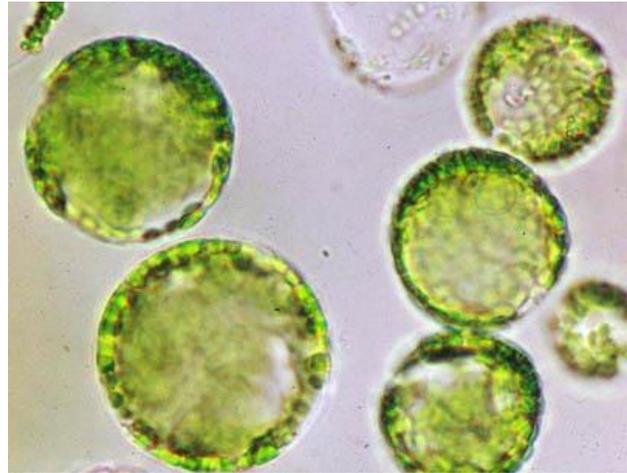
- a, isolement d'une file de cellule dans sa paroi commune
- b, file de cellules complètement isolée; la paroi a complètement disparu;
- c, fusion spontanée de deux cellules jointives (flèche).

Enfin, si l'on fait un mélange de deux populations de protoplastes, seuls les protoplastes de même origine fusionnent ce qui exclue des fusions interspécifiques spontanées

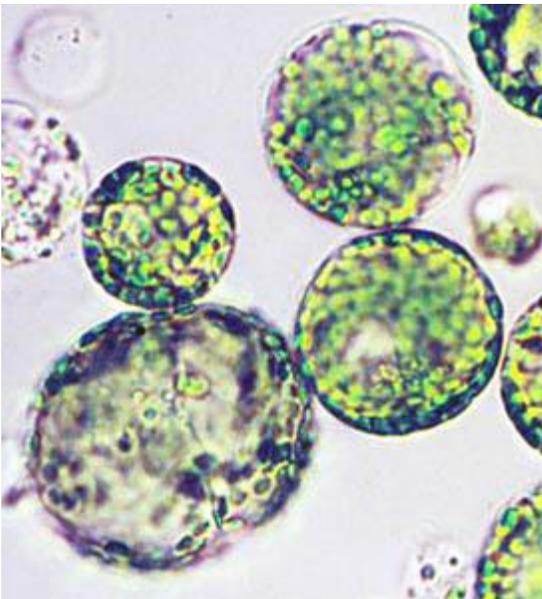
Expérience : Des protoplastes sont préparés enzymatiquement à partir d'une feuille de poireau. Une deuxième préparation est effectuée à partir d'une feuille de poireau colorée par le rouge neutre. Les protoplastes de cette deuxième préparation ont leur vacuole colorée en rouge. On mélange ces deux populations et on observe. Les fusions spontanées sont rares mais concernent toujours des protoplastes de la même origine



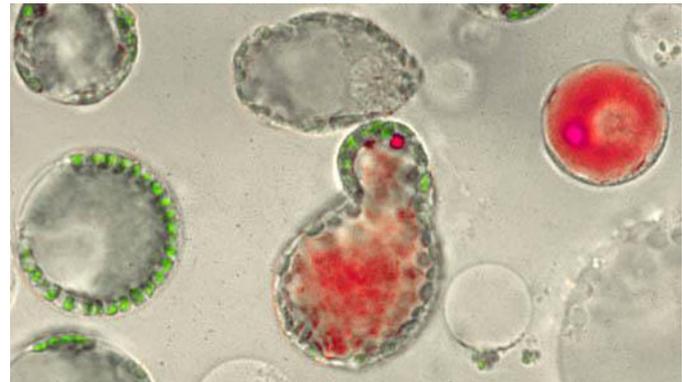
Protoplastes de poireau colorés par le rouge neutre



Protoplastes de poireau chlorophylliens



Dans le mélange de protoplastes, une fusion entre deux protoplastes non colorés



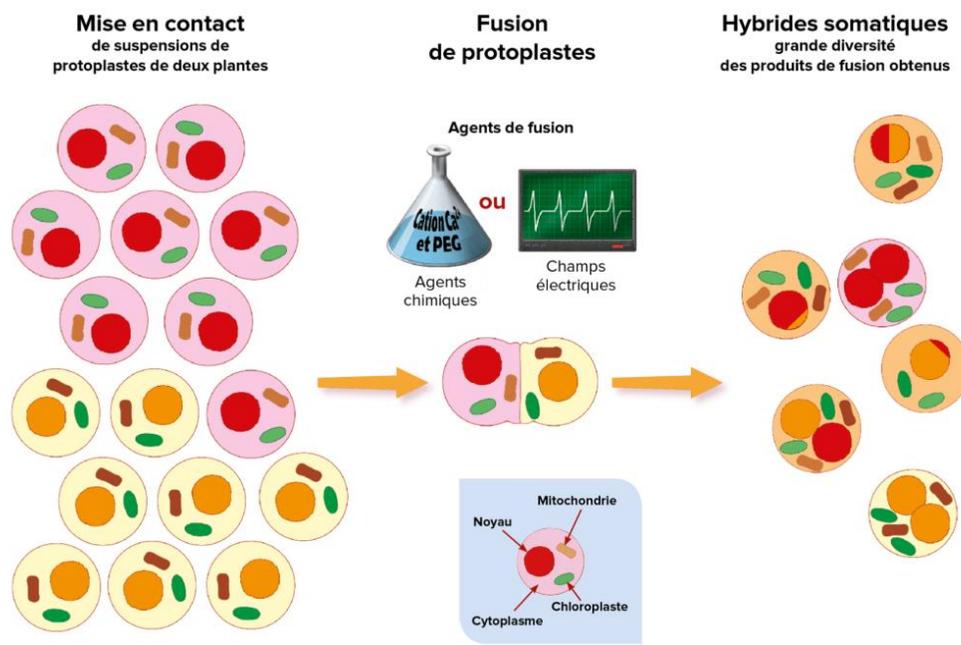
Dans le mélange de protoplastes, une fusion entre deux protoplastes colorés par le rouge neutre.

De nombreux chercheurs (Bourgin et coll., Withers et coll., Keller et coll.) ont analysé les conditions de fusion spontanée et conclu qu'il s'agissait d'une fusion par les plasmodesmes sans intérêt pour l'obtention d'hybrides.

2. Applications pratiques

La première démonstration de fusion entre des protoplastes différents remonte aux travaux de Melchers et al, en 1978. Il recherchait des tomates cultivables à basse température et réalisa, à cette fin, des hybrides entre la tomate et la pomme de terre par fusion de protoplastes : la pomate. Cette nouvelle espèce est malheureusement stérile ce qui a empêché son développement.

La pomme de terre cultivée, *Solanum tuberosum*, est une espèce chez laquelle l'introduction de caractères par fusion de protoplastes est facilement réalisable. Ainsi, à partir des espèces sauvages d'Amérique du Sud, notamment *Solanum brevidens*, on a pu introduire des gènes de résistance au virus de l'enroulement, aux virus Y et X, au mildiou et à la bactérie *Erwinia*.



L'hybridation somatique

2.1 Les différents hybrides somatiques

Lors de la fusion, tous les échanges sont possibles entre deux protoplastes. Il est ainsi possible d'obtenir des degrés de fusion très variables.

- *Fusion des noyaux et des cytoplasmes*

Lorsque la fusion des noyaux a lieu, il peut y avoir une recombinaison plus ou moins importante entre les chromosomes des deux parents. Ce phénomène peut être utilisé pour transférer des gènes nucléaires. On cherchera notamment à obtenir des hybrides somatiques asymétriques, où seuls quelques fragments d'ADN du parent donneur seront introduits dans l'espèce receveuse. En effet, les cas de fusion importante de génomes entre espèces conduisent à des plantes souvent stériles

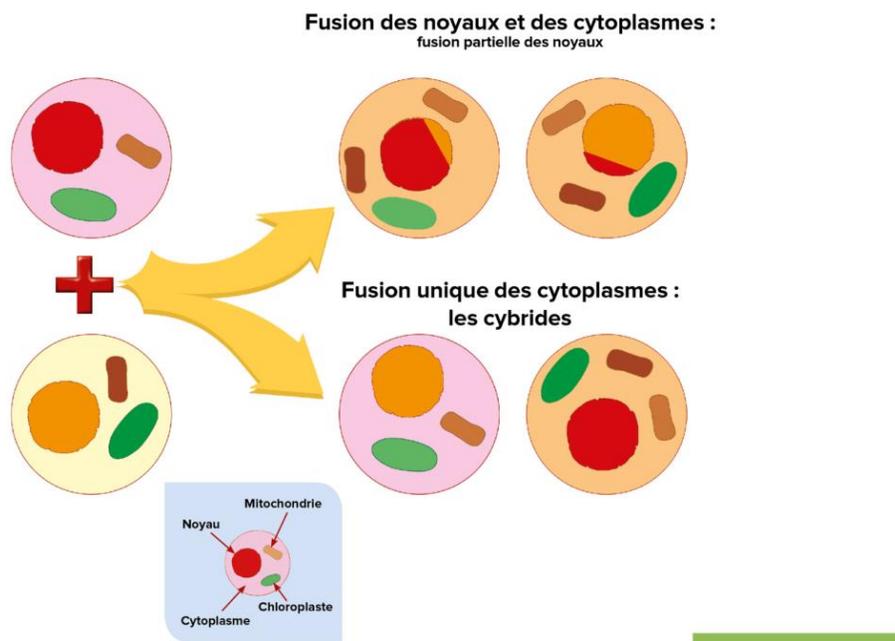
comme la tomate. Pour favoriser ce transfert partiel, l'ADN du parent donneur est partiellement fragmenté par irradiation ménagée des protoplastes (rayons X) avant la fusion.

- *Fusion des cytoplasmes seuls : les cybrides*

Très souvent, la fusion des noyaux n'a pas lieu et au cours des divisions successives, il ne subsistera que l'un des noyaux parentaux. Celui-ci sera associé à un cytoplasme composite ou recombiné. Il contient les organites cytoplasmiques de l'un et / ou de l'autre parent. On constate souvent une recombinaison des mitochondries. En revanche, les chloroplastes de l'un des deux parents sont souvent éliminés. Il y a alors modification des relations nucléocytoplasmiques.

L'obtention de ces cybrides peut être également provoquée. Dans ce cas des doses létales d'irradiation sont utilisées pour les cellules du parent donneur, afin d'inactiver complètement le noyau. Seuls seront transférés ses mitochondries et ses chloroplastes. Le parent receveur peut en plus être traité à l'iodoacétate, entraînant le blocage de ses organites. Ainsi, les cybrides issus de la fusion seront constitués du noyau du parent receveur et des organites du parent donneur.

Les caractères sous la dépendance de l'ADN mitochondrial ou chloroplastique ne sont pas à négliger. Ainsi, la stérilité mâle cytoplasmique est un caractère résultant de l'interaction noyau-mitochondrie.



Les différents hybrides somatiques

3. Une application de la fusion de protoplastes

Le colza *Brassica napus* est issu d'un croisement naturel entre la navette *B. campestris* et le chou *B. oleracea*. Des hybrides entre variétés de l'espèce *Brassica napus* présentent un fort hétérosis. Aussi, afin de contrôler les croisements pour l'obtention de semences de variétés hybrides, il est apparu nécessaire de modifier la biologie florale de cette espèce hermaphrodite en engageant des travaux sur la mise au point d'un système de stérilité mâle cytoplasmique qui conduise à des plantes uniquement femelles.

Chez une variété de radis japonais, le chercheur H. Ogura, en 1968, a découvert une stérilité mâle spontanée contrôlée par le cytoplasme qui, depuis, porte son nom. Les chercheurs ont alors supposé qu'une plante qui aurait le noyau, les chloroplastes du colza et les mitochondries du radis serait un colza mâle-stérile. Pour obtenir ce colza, des techniques de fusion de protoplastes ont été mises en œuvre. Ceci s'est déroulé en deux étapes :

Introduction dans le colza de la stérilité mâle du radis par voie sexuée. La stérilité mâle du radis, introduite au départ dans le chou, a été transférée ensuite dans le colza par une série de rétrocroisements. On disposait ainsi de colzas mâles-stériles, à cytoplasme de radis Ogura. Toutefois, ils présentaient des déficiences chlorophylliennes en raison de la présence de chloroplastes de radis peu fonctionnels dans ces colzas et une absence de nectaires nécessaires à une pollinisation réalisée presque exclusivement par les abeilles.

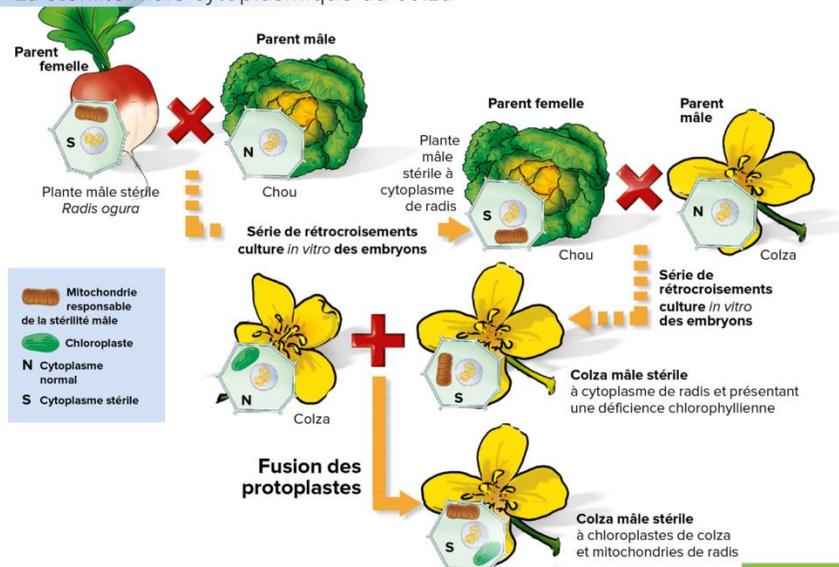
Fusion de protoplastes entre ces colzas mâles-stériles et des colzas normaux. Elle a été réalisée et a permis de sélectionner, parmi des plantes régénérées, celles qui ne montraient pas de déficience chlorophyllienne (elles possédaient des chloroplastes de colza) et une stérilité mâle cytoplasmique avec des fleurs nectarifères (elles possédaient des mitochondries recombinées entre radis et colza).

- *Les méthodes employé pour la fusion des protoplastes*

La fusion par des méthodes chimiques. On peut neutraliser la charge électrique des protoplastes par des cations Ca^{2+} et un pH élevé. Ensuite, on met les protoplastes en présence de polyéthylène glycol (PEG) qui provoque une forte agrégation des cellules et déstabilise la membrane plasmique. Après retour par dilution à des conditions initiales, les protoplastes fusionnent.

La fusion par des méthodes électriques. Cette technique, l'électrofusion, plus récente, utilise des champs électriques intenses et de courte durée, qui, en déstabilisant les membranes, entraînent la fusion des protoplastes.

La stérilité mâle cytoplasmique du colza



Une application de la fusion de protoplastes

II. Eradication des maladies virales par les méthodes biotechnologiques

1. *Les phytovirus*

Un phytovirus, ou virus de plantes, est un virus s'attaquant aux organismes végétaux. Ces virus ont la particularité de pénétrer la cellule végétale de leur hôte afin de détourner à leur profit les mécanismes de la cellule et leur permettre de se reproduire.

Cette multiplication virale finit par provoquer une modification métabolique ou la destruction de la cellule. La prolifération des virus à l'intérieur des tissus végétaux peut dans certains cas n'entraîner aucun symptôme visible dans un premier temps (phénomène de masquage), mais très souvent les attaques virales se manifestent par des symptômes tels que des mosaïques, des marbrures ou des fasciations.

Les souches de virus végétaux ont évolué indépendamment les unes des autres : comme la plupart des endoparasites, les virus se multiplient en vase clos dans leurs hôtes. L'évolution en parallèle des souches virales et des hôtes résistants (coévolution) est à l'origine d'une grande spécialisation des virus vis-à-vis de leur hôte. Des virus sont ainsi capables de n'attaquer qu'une seule espèce ou une seule famille de végétaux. Le virus de la mosaïque du tabac par exemple, est capable d'attaquer la plupart des plantes appartenant uniquement à la famille des Solanacées (tomate, tabac, aubergine...etc.)

2. *L'éradication des virus*

L'éradication des différents pathogènes, notamment les virus, est un enjeu important pour les plantes à multiplication végétative. La multiplication *in vitro* constitue un moyen efficace de produire des jeunes plants sains et vigoureux.

La qualité des jeunes plants est essentielle pour garantir la circulation de matériel végétal sain et assurer la conservation dans les banques de gènes.

2.1 *L'éradication des virus par thermothérapie et cryothérapie :*

- La thermothérapie :

Dans un certain nombre de cas, cette technique permet d'éliminer ou de réduire de façon importante la quantité de virus. Elle est couramment utilisée pour certains végétaux : ligneux, fruitiers ou à bulbes. Elle consiste à maintenir les plants (bulbes ou rameaux) à des températures élevées, de 35°C à plus de 50 °C (selon les espèces), pendant une durée suffisante pour éliminer les particules virales.

La résistance thermique des virus contenus dans un petit volume de liquide exposés pendant une très courte durée à des températures comprises entre 60°- 70°C et 100°C a été étudiée. La chaleur inactive rapidement les virus, dans différentes conditions et pour des virus (enveloppés et non-enveloppés).

- La cryothérapie :

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle approche, la cryothérapie, s'est développée. Elle consiste à congeler des tissus végétaux dans l'azote liquide à -196°C . Cette opération présente l'avantage d'être plus rapide, mais nécessite une très bonne maîtrise technique.

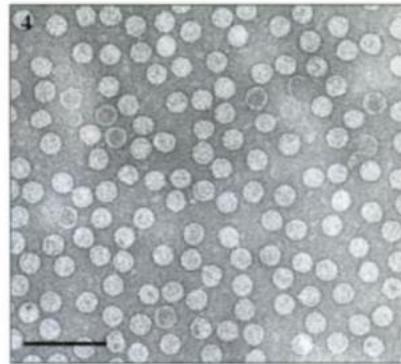
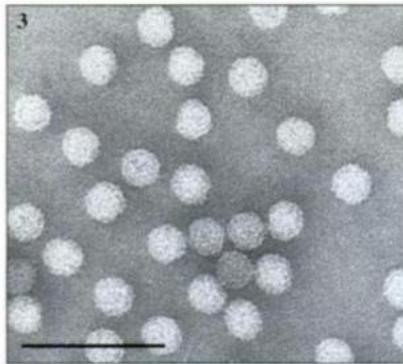
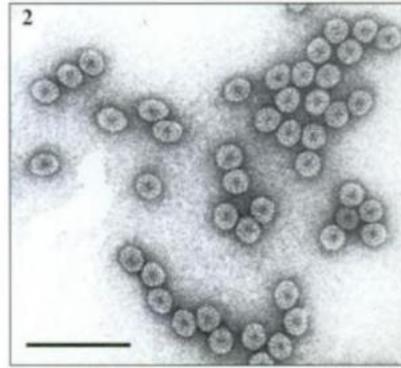
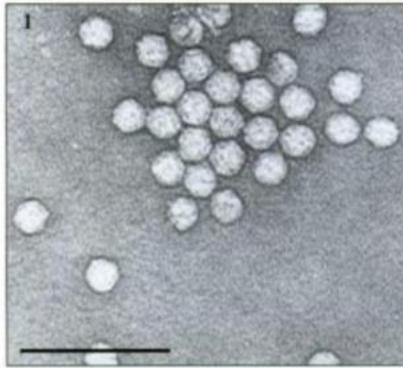
Que ce soit pour la thermothérapie ou la cryothérapie, il faut trouver le compromis entre élimination du virus et survie des tissus.

Les mécanismes mis en jeux par ces deux techniques sont en premier lieu liés à une action physique sur les particules virales, notamment des ruptures de liaisons chimiques nécessaires à leurs réplifications.



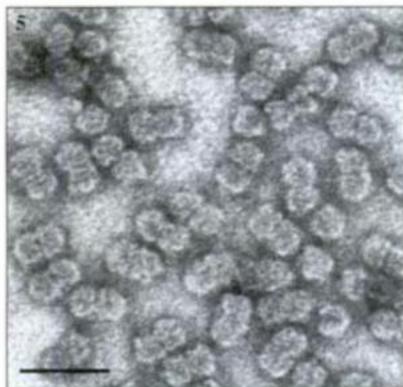
Particules isomériques

1. Polerovirus CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, *Luteoviridae*)
2. Cucumovirus CMV (*Cucumber mosaic virus*, *Bromoviridae*)
3. Tombusvirus PetAMV (*Petunia asteroid mosaic virus*, *Tombusviridae*)
4. Tymovirus MRMV (*Melon rugose mosaic virus*)



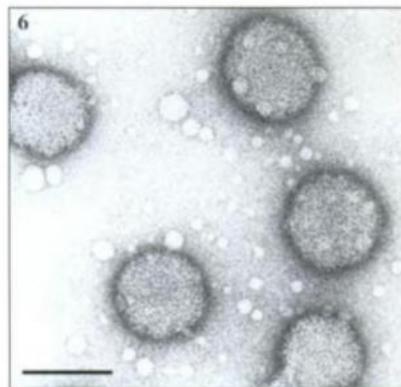
Particules géminées

5. Mastrevirus CpCDV (*Chickpea chlorotic dwarf virus*, *Geminiviridae*)



Particules à enveloppe

6. Tospovirus TSWV (*Tomato spotted wilt virus*, *Bunyaviridae*)



Particules virales purifiées, observées au microscope électronique en coloration négative (barre= 100 nm)

2.2 L'éradication des virus par culture *in vitro* des méristèmes (cellules embryonnaires)

La culture de méristèmes constitue la méthode la plus fréquemment utilisée, notamment dans le cadre de filières professionnelles de production de jeunes plants sains à partir de plantes virosées.

La technique consiste à prélever au scalpel, souvent à l'aide d'une loupe binoculaire placée sous hotte à flux laminaire, un très petit massif cellulaire au cœur du bourgeon ou du bulbe. Celui-ci est constitué du dôme méristématique et de deux à trois ébauches foliaires. On le place ensuite sur un milieu de culture pour une durée de quelques semaines, avec des repiquages successifs (des milieux à différentes combinaisons hormonales) afin de favoriser la croissance et la différenciation cellulaire. Une phase de thermothérapie peut être intégrée à ce stade sur les plants *in vitro*.



Prélèvement et culture des méristèmes

L'assainissement par culture de méristèmes repose sur une contamination plus lente des tissus les plus jeunes, impliquant une circulation lente (cellule à cellule) des particules virales.

Les raisons de cette absence des virus dans les cellules embryonnaires sont encore inexplicables. Mais on pense généralement que les cellules à forte activité mitotique (embryonnaires) possèderaient une certaine immunité, une compétition s'établirait par conséquent entre les cellules méristématiques et les virus pour l'utilisation des métabolites, cette compétition tournerait à l'avantage des cellules méristématiques.

Les études réalisées sur la thermothérapie semblent confirmer cette hypothèse car une augmentation de la température favoriserait la multiplication des cellules méristématiques tout en diminuant la vitesse de multiplication des particules virales.

Cependant, depuis quelques années, des arguments se multiplient en faveur d'un mécanisme épigénétique de défense de la plante, le *gene-silencing* (ou extinction de gènes). Ce mécanisme de protection des cellules méristématiques, qui agit au niveau des ARN messagers, serait renforcé par la thermothérapie.

3. Mesure de l'efficacité de l'éradication virale par le test ELISA :

L'efficacité de l'assainissement ne peut être contrôlée qu'individuellement lorsque le méristème s'est suffisamment développé pour donner plusieurs pousses feuillées. Il est alors possible de prélever des fragments de plant *in vitro* pour effectuer des tests de détection de l'agent pathogène recherché, par ELISA ou par marquage moléculaire.

La difficulté de la technique réside dans le fait qu'il faut trouver le compromis entre le taux de survie des méristèmes, qui décroît avec leur taille, et le taux de réussite de l'assainissement, qui augmente lorsque la taille du méristème décroît. Les taux de réussite dépendent également du taux d'infestation de la plante sur laquelle le méristème a été prélevé. A partir d'une plante contaminée, il n'est pas rare d'obtenir des taux de méristèmes assainis de l'ordre de 50%.



Détection précoce des virus par marquage moléculaire

4. Les risques liés à l'assainissement par culture *in vitro* de méristèmes

Plusieurs risques à utiliser le clonage ont été décrits depuis de nombreuses années. Pour certaines espèces, les causes sont identifiées, ce qui permet de mettre en place des mesures pour les maîtriser.

Le premier de ces risques est la non-conformité génétique : prélèvement sur une plante de départ non conforme ou multiplication intensive *in vitro* provoquant une mutation « somaclonale » (mutation génétique induite par la culture *in vitro* et apparaissant à des fréquences beaucoup plus élevées qu'en conditions classiques).

Le deuxième, découvert plus récemment, est épigénétique : les conditions de culture très différentes *in vitro* induisent une évolution de la régulation des gènes de la plante, aboutissant à des non-conformités dans le développement ultérieur de la plante. La réjuvenilisation est probablement une des manifestations de ce phénomène, induisant notamment des retards de floraison parfois préjudiciables à la qualité du produit.

Pour toute opération de micropropagation ou d'assainissement, il est donc obligatoire de prévoir une phase de validation du protocole en termes de conformité génétique des plants produits.

Remarque

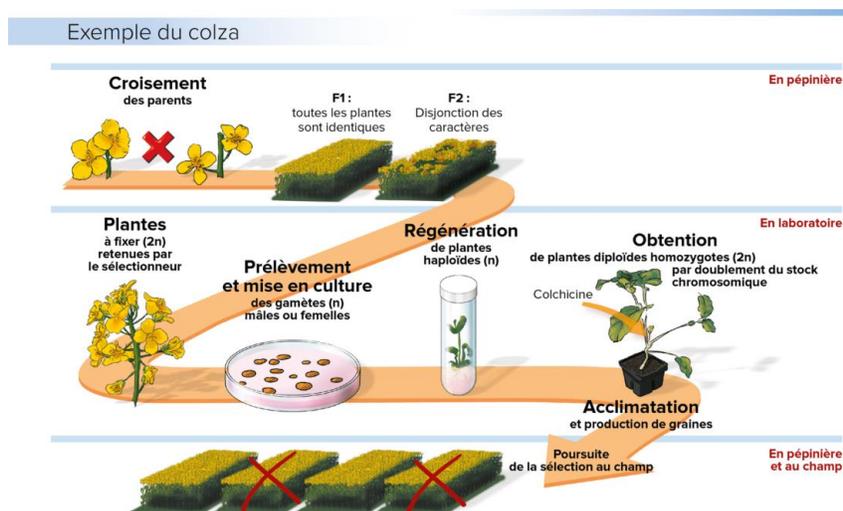
Toutes ces techniques d'assainissement nécessitent un savoir-faire important et des laboratoires bien équipés. Exemple des centres de recherches en biotechnologie qui disposent en plus du laboratoire de biologie cellulaire et culture in vitro, d'autres laboratoires entre autres : un laboratoire de biologie moléculaire, un laboratoire de phytopathologie et des salles équipées de hottes à flux laminaire ainsi que des chambres de cultures.



Chambres de cultures cellulaires.

III. Les haplométhodes :

1. Le principe de l'haplodiploïdisation



Le processus d'haplodiploïdisation comprend l'obtention de plantes haploïdes à partir des organes porteurs des cellules reproductrices, appelés gamétophyte mâle ou femelle, et le retour vers la phase diploïde.

- *Production de plantes mères*

Le sélectionneur effectue un croisement entre deux lignées parentales présentant des caractéristiques intéressantes et complémentaires. Ce croisement produira la génération F1. Ce sont les plantes mères pour l'obtention de la phase haploïde. A ce stade, toutes les plantes sont identiques. En revanche, sur ces plantes, la méiose à l'origine de la formation des gamètes permet la ségrégation des caractères, selon les lois de Mendel et les recombinaisons entre les chromosomes parentaux. Les individus F2 seront alors tous différents les uns des autres, c'est la disjonction des caractères. Pour faciliter le travail de sélection, l'haplodiploïdisation va permettre d'obtenir des plantes homozygotes.

- *Obtention de la phase haploïde*

Il s'agit de récupérer les cellules ayant subi la méiose avant la fécondation. C'est là que commence le travail de laboratoire. L'obtention des plantes haploïdes peut se faire par culture in vitro de cellules destinées à fournir les cellules reproductrices ou gamètes. S'il s'agit de gamètes mâles, on parle d'androgenèse. S'il s'agit de gamètes femelles, c'est la gynogenèse. Une autre méthode d'obtention d'haploïdes est l'induction d'haploïdes in situ. On peut obtenir des haploïdes après croisements entre espèces ou entre genres. Il y a fécondation, mais les chromosomes incompatibles du parent pollinisateur sont rejetés naturellement. On peut également provoquer une fécondation anormale à l'aide de pollen dénaturé. Dans ces trois cas,

on observe le développement d'un embryon haploïde. Une phase de sauvetage d'embryons in vitro est ensuite généralement nécessaire. Mis en culture sur des milieux particuliers, l'embryon haploïde va se développer, les tissus vont se différencier pour donner des plantes haploïdes.

- *Retour à l'état fertile diploïde*

Pour utiliser en sélection une plante régénérée par l'une de ces voies, il faut disposer de plantes fertiles et donc diploïdes. L'état haploïde étant instable, l'individu régénéré est parfois diploïde, on parle de doublement spontané du stock chromosomique. Pour le blé, on peut compter 20 à 25 % d'haploïdes doublés spontanément, 60 à 65 % chez l'orge. Sinon, on provoque artificiellement un doublement des chromosomes, le plus couramment par l'action d'un agent chimique, la colchicine. Les plantes obtenues sont des diploïdes homozygotes : elles possèdent deux copies identiques de chacun de leurs chromosomes et donc portent des paires de gènes ou allèles identiques, d'où leur grand intérêt.

- *Sélection des lignées*

Le matériel ainsi fixé est livré au sélectionneur. Le sélectionneur va alors trier les plantes en fonction des critères agronomiques et technologiques recherchés. La multiplication de ces plantes se fera par autofécondation : tous les descendants seront des copies identiques de leurs parents.

- *Traitement à la colchicine*

La colchicine bloque la mitose après la duplication des chromosomes et les cellules deviennent diploïdes. Le traitement à la colchicine peut se réaliser au stade plantule par trempage des racines ou injection dans les méristèmes. Les taux de doublement sont alors très variables. Actuellement, se développent des traitements in vitro au stade embryonnaire.

- *Déterminisme du niveau de ploïdie*

Une vérification de la ploïdie des plantes régénérées peut être effectuée précocement par cytométrie de flux. Une substance fluorescente se liant à l'ADN permet la coloration des cellules. La mesure de la densité de cette coloration permet de déterminer le niveau de ploïdie. Sinon, la constatation de la fertilité de la plante garantit qu'elle est effectivement diploïde.

IV. Les cultures *in vitro* à grande échelle (Les bioréacteurs)

1. Les bioréacteurs

Les cultures de cellules et de tissus végétaux sont considérées comme un outil puissant de propagation de cultures commercialement importantes et de production de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée. La culture à grande échelle de tissus végétaux différenciés (embryons somatiques, plantules, bulbilles, racines) et de tissus dédifférenciés (suspensions cellulaires et cals) peut être réalisée *in vitro* dans des milieux liquides, sous des conditions environnementales contrôlées dans des systèmes de bioréacteurs.

Le concept de base de cette approche est d'atteindre une production durable et économiquement viable de quantités maximales de biomasse végétale utilisées soit pour la propagation végétative ou encore pour l'extraction de métabolites intéressants.

Les bioréacteurs sont conçus pour la culture intensive en régulant plusieurs facteurs. Ils sont généralement constitués d'un récipient de culture et d'un système de contrôle automatisé ou semi automatisé. Le récipient de culture est conçu de manière à accueillir les cellules et les maintenir dans un environnement aseptique afin d'assurer leur croissance maximale tout en leur fournissant un microenvironnement optimale, les nutriments et les transferts de gaz nécessaires. Les conditions de culture (agitation, température, les concentrations en oxygène dissout et en dioxyde de carbone, la photopériode, le pH, la composition gazeuse et le niveau du milieu de culture) sont contrôlées.

Selon la nature de l'environnement dans le récipient de culture, les bioréacteurs peuvent être classés en 4 types : les bioréacteurs en phase liquide, les bioréacteurs en phase gazeuse, les bioréacteurs à immersion temporaire et les bioréacteurs hybrides.

Dans les bioréacteurs en phase liquide, les cultures sont complètement immergées et en continu dans le milieu de culture liquide. C'est le cas des cultures « traditionnelles » en Erlenmeyer. Ce type de bioréacteurs (y compris les bioréacteurs à agitation mécanique, pneumatique, hydraulique ou encore les bioréacteurs à membrane) est le plus étudié, révélant un potentiel illimité pour les cultures de tissus non différenciés. Par contre, il ne convient pas aux tissus différenciés : malformations, asphyxie et hyperhydricité. La morphologie complexe des tissus différenciés et des organes requiert des bioréacteurs capables de préserver l'intégrité physiologique des cultures. C'est ainsi que les 3 autres types de bioréacteurs furent créés.

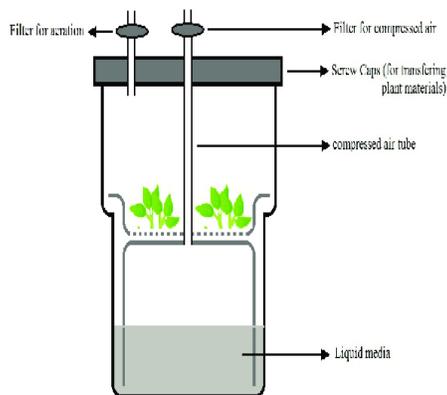
2. Le procédé Rita®

L'emploi du milieu liquide en culture *in vitro* peut s'avérer très avantageux du point de vue économique : réduction du travail manuel, changement de milieu plus aisé, économie en gélifiant, ainsi que la réduction notoire des contaminations. Les recherches induites par ces atouts ont conduit à la conception de différentes techniques et récipients de culture, plus ou moins complexes.

Une des façons les plus efficaces d'utiliser le milieu liquide, tout en contournant ses principaux inconvénients (asphyxie et hyperhydricité des tissus), est d'immerger les explants de façon transitoire plutôt que continuellement. Dans cet objectif et en souhaitant avant tout privilégier la souplesse d'utilisation, le laboratoire de culture *in vitro* de Biotrop (CIRAD1) a conçu un appareil petit, bon marché et d'un fonctionnement simple.

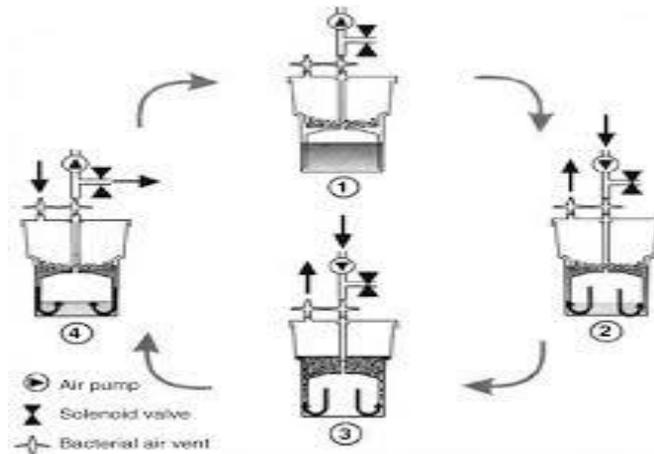
- *Principe de fonctionnement*

Le récipient utilisé pour les premières expériences est une unité de filtration autoclavable vendue dans le commerce. Elle a été modifiée en reliant les compartiments haut et bas au moyen d'un tube de verre. L'ensemble opère en sens inverse du fonctionnement usuel de l'unité de filtration : les plantes sont placées dans la partie haute et le milieu liquide dans la partie basse. Quand le compartiment inférieur est placé sous pression, à l'aide d'une pompe à air de laboratoire, le milieu est refoulé dans le compartiment haut à travers le tube de verre. Une simple prise électrique programmable contrôle la fréquence et la durée du fonctionnement de la pompe, et donc la fréquence et la durée des immersions. Quand la surpression cesse, le liquide redescend par gravité. Le courant d'air qui balaie le récipient pendant toute la durée de l'immersion permet un renouvellement de l'atmosphère interne du récipient. Tous les flux d'air sont stérilisés par des événements hydrophobes de 0,2 μm .



Le bioréacteur Rita® (récipient d'immersion temporaire)

Remarque : chaque appareil est isolé et peut être déplacé individuellement.



Fonctionnement du récipient d'immersion temporaire **Rita®**

Les différentes phases du récipient d'immersion temporaire **Rita®** :

Phase émergée. Cette phase est la plus longue

1. Les explants reposent sur un disque de mousse polyuréthane.

Phase immergée. Cette phase est très courte, de 1mn/Jour à 4 fois 15mn/Jour. Elle doit être ajustée expérimentalement.

2. Une surpression d'air stérile, appliquée en partie basse, élève le milieu nutritif dans la partie haute contenant les plantes.
3. L'air stérile brasse et aère le milieu. L'atmosphère est renouvelée.
4. L'alimentation en air est arrêtée. Les pressions s'équilibrent et le milieu redescend par gravité dans la partie basse. Les explants retiennent un film de milieu par capillarité.

- *Installation du procédé Rita®*

Alimentation en air : Pompe ou compresseur délivrant 1litre/mn/Rita® à 0.2bar. Stérilisation par un évent à l'entrée de chaque Rita®.

Automatisation : Un programmeur au pas d'une mn/jour, une rampe de distribution d'air équipée d'une électrovanne trois voies et de gicleurs.



Installation du procédé Rita®

- *Les principaux intérêts du procédé Rita®*

Diminution du coût de la main d'oeuvre par la simplicité de la manipulation des plantes et du milieu.

Meilleure nutrition : contact intime entre plante et milieu en phase immergée, et rétention par capillarité d'un film de milieu en phase émergée.

Très forte diminution des phénomènes d'asphyxie et de vitrification des tissus par rapport aux cultures en immersion permanente.

Renouvellement complet de l'atmosphère de culture à chaque immersion.

Division des tissus en culture pendant l'agitation due au bullage.

Contrôle des processus morphologiques par la modification de la fréquence et la durée d'immersion.

Protection de chaque appareil par les événements. Manipulation individuelle possible. Pas de risque d'extension des contaminations.

- *L'innovation du système :*

L'originalité du système, et donc son efficacité, réside surtout dans l'environnement physique des plantes. L'humidité relative, dans le compartiment contenant les plantes, est toujours proche de la saturation et ceci quels que soient le rythme et la durée d'immersion. Cet état est dû en particulier à

la rétention de milieu par capillarité à la surface des plantes et du récipient. La persistance d'un film capillaire de milieu, à la surface des tissus, rend possible la nutrition en dehors des périodes d'immersion, mais perturbe moins les échanges gazeux qu'une immersion totale. Elle explique l'absence de dommages sur les plantes, même avec des immersions très rares et brèves.

Le faible volume du récipient et le caractère hydrophobe des événements contribuent aussi à cette humidité relative constamment élevée.

Les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur du récipient, dont l'importance est bien connue en culture de tissus, ont essentiellement lieu pendant la phase d'immersion. Dans nos conditions expérimentales les plus fréquentes, les flux d'air appliqués assurent un renouvellement complet de l'atmosphère de culture après cinq minutes d'immersion.

- *Résultats obtenus avec le procédé Rita[®] sur différentes espèces tropicales et avantages par rapport à la culture sur un milieu semi-solide*

<u>Café :</u>	Microbouturage : même taux de multiplication en deux fois moins de temps. Embryogénèse : de la cellule embryogène à l'embryon germé le coût des manipulations est divisé par 10.
<u>Banane</u>	Développement et germination d'embryons somatiques : 700 à 1000 plantules prêtes à être sevrées par Rita [®] Prolifération de méristèmes : Taux de prolifération en 20 jours multiplié par 2.5
<u>Hévéa</u>	Développement d'embryons somatiques : 100 à 400 embryons par Rita [®] prêts à germer sur milieu gélifié.
<u>Pommes de terre</u>	Microtubérisation : en fonction des variétés jusqu'à 3 micro-tubercules par bouture simple nœud en 10 semaines. Plus de 50% des micro-tubercules pèsent plus de 0.5g.

- *Exemples de laboratoires pilotes*

Ouganda : Un laboratoire de production commerciale en caféiers et bananiers a été mis en place sur financement de l'union européenne. Deux chambre de culture sont équipées avec le système Rita[®] soit au total 1600 Rita[®]. La capacité de production set de 7 à 8 millions de plantules par ans

Costa Rica : Un projet d'amélioration de *Coffea arabica* est développé en Amérique Centrale, sous la direction de PROMECAFE, avec la participation du CATIE, de 5 pays centre-américains, de la République Dominicaine et de la Coopération Française (CIRAD, ORSTOM, MAE). Ce projet a pour but la création et diffusion massale de génotypes améliorés, multipliés grâce au système Rita[®]. La commercialisation des vitroplants a commencé apartir de 2002.

- *Exemples d'application*

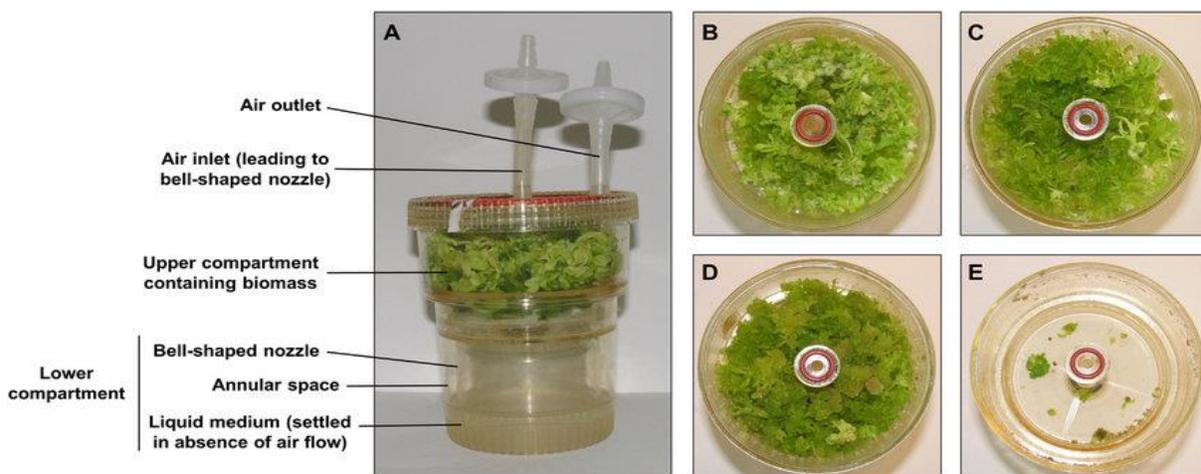
- Microbouturage du caféier

Le microbouturage du caféier (*Coffea arabica* ou *canephora*) est réalisé en induisant, par des cytokinines, le démarrage de bourgeons axillaires sur des nœuds orthotropes. La multiplication est assurée par subdivision des pousses orthotropes successivement obtenues. En milieu semi-solide, la multiplication est relativement lente : le coefficient de multiplication est de 6 à 7 tous les trois mois. En utilisant l'immersion temporaire, le même taux est obtenu en cinq semaines. Cet optimum a été atteint avec un rythme d'immersion de quatre fois 15 minutes par 24 h ; des fréquences et durées d'immersion plus faibles ne permettent pas d'atteindre une telle efficacité alors que des immersions plus importantes entraînent des anomalies provoquées par un excès d'eau dans les tissus.

Ce rendement permet d'envisager la micropropagation massive de *Coffea arabica* sous un jour totalement nouveau et, en particulier, de valoriser les nouveaux hybrides créés dans les programmes d'amélioration génétique, beaucoup plus rapidement que par la distribution de graines.

- Embryogenèse du caféier

L'embryogenèse somatique de *Coffea* sp. est maîtrisée depuis de nombreuses années. La friabilité du cal obtenu à partir de tissus foliaires permet son passage et son entretien en milieu liquide agité. Les embryons somatiques sont produits après transfert sur un milieu enrichi en cytokinines. Quels que soient les rythmes et les durées d'immersion, le système permet une obtention d'embryons beaucoup plus rapide qu'avec le milieu liquide agité. La qualité des embryons obtenus est bien meilleure. En particulier, ils poursuivent leur développement jusqu'à la germination *in vitro* et la taille de leurs cotylédons permet une bonne activité photosynthétique et un transfert direct en serre.



L'embryogenèse somatique de *Coffea arabica*

- Embryogenèse de l'hévéa

L'embryogenèse somatique d'*Hevea brasiliensis* est induite après callogenèse sur téguments internes de jeunes fruits. Le recours à l'immersion temporaire s'est avéré favorable dans les différentes étapes du processus.

Au cours de l'expression de l'embryogenèse somatique à partir de cal friable, des immersions d'une minute, deux fois par jour, ont permis une production d'embryons 15 fois plus nombreux qu'en milieu semi-solide et d'une qualité bien supérieure.

La maturation nécessaire au cours de la conversion en plantules est réalisée par des durées d'immersion particulièrement faibles : une minute par semaine. Ce rythme conduit en fait, comme *in vivo*, à une dessiccation très progressive des embryons qui permet d'optimiser les phases tardives de leur développement. Il en résulte une amélioration importante des taux de germination et de conversion.

La phase de germination proprement dite est facilitée, elle aussi, en immersion temporaire. Il est cependant nécessaire de revenir alors à des rythmes d'immersion plus élevés : quatre fois 15 minutes par jour. Comme pour le caféier, les plantules ont un aspect qui se rapproche de celui des plantules issues de graines par le développement des cotylédons, la qualité du système racinaire, et l'absence de vitrification.

- Micropropagation du bananier

Le bananier est la plante vivrière qui est la plus intensément multipliée, dans le monde, par des techniques *in vitro*. Le procédé classique fait appel à la prolifération de méristèmes. La comparaison de la prolifération en milieu semi-solide avec différents types de milieu liquide (immersion permanente avec ou sans bullage, immersion partielle, support de cellulose ou immersion temporaire) a montré que l'immersion temporaire donnait les meilleurs résultats, tant en termes de taux de prolifération que de gain de matière sèche.

Remarque

Les expériences brièvement décrites ici ne sont qu'une illustration. D'autres résultats satisfaisants peuvent être mentionnés, en particulier sur le palmier à huile (*Elaeis guineensis*), avec l'obtention, à partir de suspensions embryogènes, de plantules individualisées, ou sur le mandarinier (*Citrus deliciosa*), avec l'obtention d'embryons somatiques d'une morphologie proche de celle des embryons zygotiques.

De façon générale, le comportement des plantes paraît beaucoup plus proche du comportement «normal» (*ex vitro*) que du comportement perturbé, souvent rencontré en culture *in vitro*. L'absence de phénomènes d'hyperhydricité et de vitrification est particulièrement remarquable. Cet état s'explique par une mise à disposition des éléments nutritifs meilleure qu'en milieu semi-solide, le maintien dans une ambiance continuellement saturée en humidité et une perturbation minimale des échanges gazeux.

Le système décrit évite le recours à des bioréacteurs d'une technologie souvent complexe. Il est peu onéreux et d'un emploi à la fois simple et souple. Son intérêt peut être simplement illustré par

l'évolution de son utilisation au sein des différents laboratoires de culture in vitro. L'utilisation de ces bioréacteurs se généralise de plus en plus dans les centres de recherche fondamentale et appliquée (CIRAD et INRA).

V. La culture in vitro et la production des métabolites secondaires

Comme pour de nombreuses molécules naturelles à haute valeur ajoutée, l'accumulation limitée des alcaloïdes et des autres familles de métabolites secondaires dans les plantes restreint leur usage commercial. Dans de nombreux cas, la synthèse chimique n'est pas possible ou n'est pas économiquement rentable. D'où l'obtention de ces composés à haute valeur ajoutée par extraction à partir de plantes de cultures (cultures en champs ou en serre, cultures hydroponiques ou aéroponiques). Il arrive que les plantes de culture dépérissent suite à une contamination par des pathogènes. Différentes maladies causées par des pathogènes fongiques (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Botrytis*), des pathogènes viraux (virus de la mosaïque) et des pathogènes bactériens (*Serratia plymuthica*, *Stenotrophomonas maltophilia*) sont sources d'importantes pertes agricoles.

Les métabolites secondaires ne sont extraits et commercialisés qu'à l'échelle de 1 à 100 kg mais représentent un marché de plus d'un milliard de dollars/an (par exemple le Taxol®). Ces produits sont plutôt vulnérables aux fluctuations du climat et des pathogènes sur les cultures ou encore de la situation politique des pays producteurs. Les sources naturelles suffisent-elles pour la production à grande échelle d'alcaloïdes ? Prenons l'exemple de la galanthamine. Bien que sa synthèse chimique soit bien établie, une grande quantité de la galanthamine mise sur le marché provient de l'extraction de plantes cultivées, en particulier de diverses espèces de *Leucojum* et de *Narcissus*. En effet, la galanthamine renferme 3 carbones asymétriques et le respect de la configuration de ces 3 centres d'asymétrie, rend la synthèse chimique complexe, coûteuse et peu rentable (R<4%)

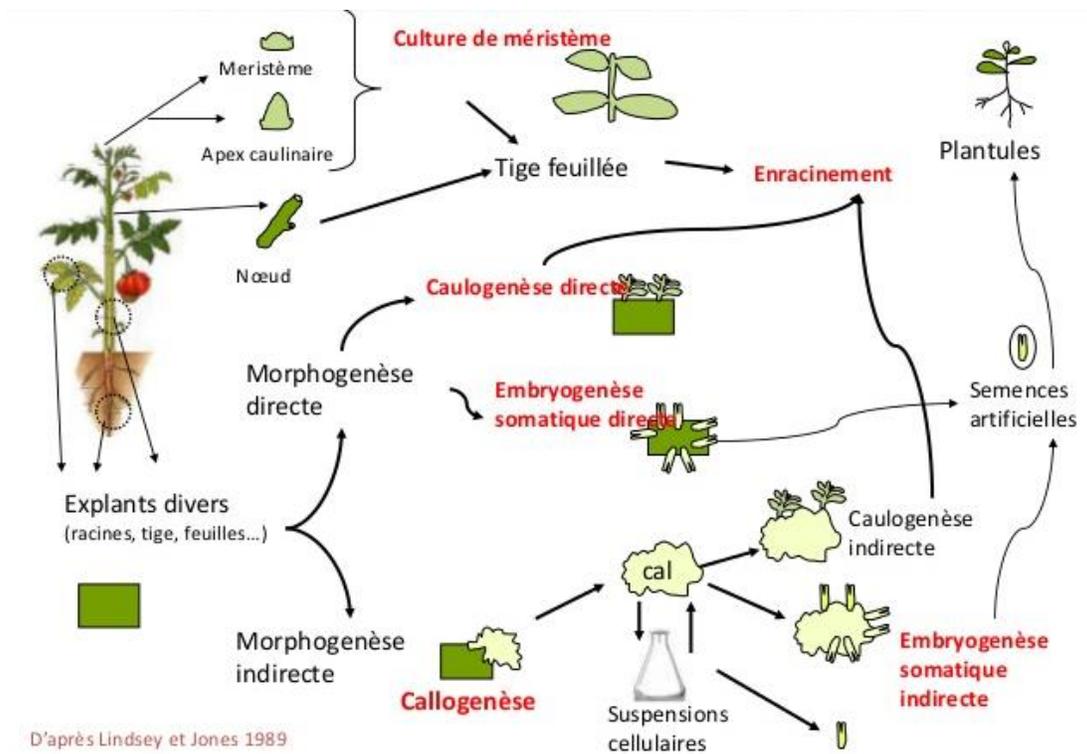
Les plantes de *L.aestivum* utilisées comme source de matière première renferme de la galanthamine à un taux moyen de 0.1% de matière sèche (MS). Sachant que la dose journalière de galanthamine prescrite varie de 30 à 50 mg en fonction du poids du patient, pour le traitement d'un million de patients, il faut 50 kg de galanthamine/jour soit 18000 kg /an. Ces besoins en galanthamine nécessitent la manipulation de 18 000 tonnes de bulbes/an⁷⁰. Notons aussi que 24 millions de personnes souffraient de la maladie d'Alzheimer en 2001, et que ce nombre ne cesse d'augmenter en raison de l'augmentation de l'espérance de vie⁷¹.

La production de métabolites secondaires par les plantes ne peut pas, à elle seule, pallier aux besoins sans cesse grandissants de l'industrie pharmaceutique. Les scientifiques doivent donc trouver une solution alternative pour obtenir ces composés à une échelle commerciale économiquement viable. Les cultures in vitro, représentent une alternative intéressante et attractive. Elles permettent de contrôler de nombreux paramètres contrairement à la culture en champs ou en serre. Les études du métabolisme secondaire des plantes deviennent facilitées et la mise au point de procédés industriels en bioréacteurs visant de hauts rendements en métabolites secondaires devient possible. La culture in vitro a été appliquée avec succès pour produire la shikonine, le seul métabolite commercialisé produit par des cultures cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon* et aussi pour produire le paclitaxel à partir de *Taxus baccata*. Cette méthode a connu

d'autres succès avec la production de saponosides à partir de cellules de *Panax ginseng*, de la berbérine à partir des cultures de *Coptis japonica*, de la sanguinarine à partir de cellules de *Papaver somniferum*, etc.

1. La micropropagation des tissus végétaux

Chez les végétaux, l'organogenèse est assurée par les méristèmes constitués de massifs de cellules non différenciées qui conservent la capacité de se diviser activement. Ce sont des cellules totipotentes qui édifient tous les organes (végétatifs et reproducteurs) ainsi que les tissus de soutien de la plante. Ces cellules subissent une différenciation dans le cadre d'une organogenèse. A l'inverse, les tissus spécialisés subissent une dédifférenciation pour produire de nouveaux massifs méristématiques. En pratique, pour l'établissement des cultures in vitro, les tissus méristématiques (ou les tissus différenciés) sont prélevés, après une étape de décontamination (et de dédifférenciation). Ils sont cultivés dans des conditions aseptiques sur des milieux synthétiques renfermant des régulateurs de croissance. Ces cellules peuvent, soit se développer d'une manière anarchique en formant des amas indifférenciés appelés cals, soit se développer en plantules viables par voie d'organogenèse directe. Les cals peuvent régénérer des tissus différenciés par voie d'organogenèse indirecte.



Principales méthodes de micropropagation

2. Intérêts des cultures in vitro en phytochimie

La culture in vitro a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares. Elle est utilisée pour une multiplication en masse des plantes génétiquement identiques. Nécessitant relativement peu d'espace et à coût réduit, elle peut être programmée indépendamment des saisons. Cette technique permet aussi la conservation du matériel génétique in vitro sur un espace réduit, l'obtention d'hybrides entre espèces incompatibles et l'obtention de plants haploïdes, d'où la possibilité par doublement chromosomique, d'une production de lignées pures homozygotes ou par mutagenèse, de la récupération de mutations récessives. Dans des conditions in vitro, on pourra produire des métabolites secondaires. La production de ces molécules peut être intensifiée sachant que les procédés de biosynthèses sont strictement contrôlés et optimisés. La culture in vitro permet aux plantes d'accumuler des alcaloïdes non synthétisés in vivo. Les plantes sont également une source d'enzymes qui peuvent être utilisées dans la voie chimique de synthèse rendant celle-ci moins compliquée. Les gènes codant pour ces enzymes peuvent être clonés et surexprimés dans des microorganismes afin de les traduire en quantités suffisantes pour faire la bioconversion des précurseurs en alcaloïdes biologiquement actifs.

- *Les facteurs biologiques*

- Le dépistage et la sélection des “meilleurs” individus

Les premiers efforts, dans le but d'améliorer la productivité des cultures in vitro, étaient dirigés vers le dépistage et la sélection des meilleurs individus producteurs d'alcaloïdes. Le problème, avec cette approche, est que les individus sélectionnés sont le plus souvent instables. D'après les études de Stanilova et al. menés en 2010, deux facteurs cruciaux pourraient expliquer ce phénomène : le cycle physiologique de la plante et son génotype. Même après huit ans, le cycle physiologique de la plante in situ a une influence non négligeable in vitro sur le taux de propagation des cultures et sur la dynamique de l'accumulation des alcaloïdes. Le génotype définit la capacité des cultures in vitro et in vivo à produire les alcaloïdes. La biosynthèse intensifiée d'un alcaloïde par rapport à l'autre ainsi que la localisation des alcaloïdes et leur accumulation dans les organes de la plante sont déterminés génétiquement. En revanche, leur teneur dans les tissus est influencée par les conditions environnementales : la température, la photopériode, la composition du milieu de culture, etc.

- Le degré de différenciation des cellules et types de tissus

Les suspensions cellulaires de plantes médicinales ont été considérées idéales pour la production in vitro et à grande échelle des métabolites secondaires intéressants. Ces cultures se développent plus rapidement que les tissus ou les organes et leur manipulation est beaucoup plus facile. Cependant, les rendements en métabolites recherchés sont très faibles, voire même non détectables. En fait, la capacité de biosynthèse diminuerait avec la différenciation des tissus et se perd avec les suspensions cellulaires. Les expériences réalisées avec les suspensions cellulaires de *L. aestivum* en sont la preuve (teneur en galanthamine d'environ 0.014 mg/g de MS dans les cals, V/S 0.1 mg/g de MS dans les bulbilles). Par définition, le métabolisme secondaire est une forme de différenciation. D'où l'approche logique de culture de tissus différenciés in vitro : bulbilles, plantules, et racines. En effet, ces cultures produisent souvent les mêmes alcaloïdes que les plantes

entières et avec une optimisation du milieu de culture, des taux plus élevés de galanthamine peuvent être obtenus. Il est à noter également que la concentration en alcaloïdes diffère entre bulbes, feuilles et racines *in vivo* comme *in vitro*. Ce qui détermine la capacité biosynthétique des différents organes *in vitro*. Les bulbes *in vivo* seraient plus riches en alcaloïdes que les feuilles durant toute l'année sauf durant la période allant de début mars jusqu'à la mi-avril. Les racines, quant à elle, n'en produisent pas. Une approche, qui a particulièrement soulevé beaucoup d'intérêt, est celle de la transformation des plantes par *Agrobacterium rhizogenes*. Ces bactéries telluriques sont capables d'infecter les cellules de la plante et provoquer l'apparition d'un chevelu racinaire au point d'infection par la bactérie. Diop et al., ont réussi à obtenir un chevelu racinaire de *L. aestivum* en infectant des feuilles et des racines isolées à partir de bulbilles par *A. rhizogenes*. Cependant, ces racines transgéniques ne produisaient pas de la galanthamine.

- *Les facteurs chimiques*

- Influence des constituants de base du milieu de culture

En 1962, Murashige et Skoog ont mis au point un milieu de culture standard adapté à la culture *in vitro* des plantes. Il est constitué de 38 macroéléments (NH₄NO₃, KNO₃, MgSO₄, KH₂PO₄), microéléments (H₃BO₄, MnSO₄, ZnSO₄, Na₂MoO₄, CuSO₄, CaCl₂), vitamines (inositol, acide nicotinique, pyridoxine, thiamine), fer chélaté, iodure de potassium, et de saccharose. Le milieu peut être liquide ou solidifié par l'ajout d'agar. Beaucoup de travaux rapportés dans la littérature visent l'optimisation de ce milieu de base en modifiant les différents nutriments afin d'améliorer non seulement la prolifération des cultures mais aussi la synthèse des alcaloïdes. Georgiev et al. ont réalisé un plan d'expérience en faisant varier les concentrations de NH₄⁺, NO₃⁻, KH₂PO₄ et de saccharose dans le milieu de culture MS de bulbilles de *L. aestivum*. Ils ont conclu que le taux de saccharose ainsi que le rapport C/N influencent la biosynthèse de la galanthamine. Ils ont élaboré ainsi un milieu MS modifié permettant une meilleure production de la biomasse et de la galanthamine. Le saccharose est la source de carbone la plus utilisée dans les milieux de culture de cellules et de tissus végétaux. Merillon et al. ont démontré que le taux de saccharose pourrait influencer le métabolisme secondaire. Plusieurs travaux menés sur différentes espèces d'Amaryllidaceae cultivées en milieu liquide et démontrant l'influence du taux de saccharose ont été rapportés. Selon Georgiev et al., 60 g de saccharose/L de milieu de culture entraîneraient une meilleure accumulation de galanthamine dans les bulbilles de *L. aestivum*. Et d'après les travaux de l'équipe de Sellès, 60, 90 et 180 g de saccharose/L de milieu ont conduit à la meilleure accumulation de galanthamine dans les bulbilles de *N. confusus*. La concentration de saccharose affecte aussi la morphologie des cultures ainsi que leur activité photosynthétique.

- Influence des régulateurs de croissance

Chez les végétaux, les processus de croissance et de développement sont contrôlés par des substances synthétisées par le végétal et efficaces à de très faibles doses. Il existe trois grandes classes de régulateurs de croissance (ou encore appelés phytorégulateurs) : les auxines, les gibbérellines et les cytokinines. Ces phytorégulateurs interviennent beaucoup dans la culture *in vitro*, soit directement, soit et surtout par leurs dérivés synthétiques qui ont une activité physiologique similaire. Les auxines, agissent sur l'élongation cellulaire et exercent une activité

rhizogène. Parmi les auxines le plus souvent employées, citons l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), l'acide 1-naphtalène acétique (ANA), et le picloram. Les cytokinines favorisent le développement des bourgeons. Les plus utilisées sont la zéatine, la kinétine, la méta-topoline, le thidiazuron, et la 6-benzylaminopurine (BAP).

- Influence des précurseurs de la voie de biosynthèse

L'utilisation d'un précurseur de la voie de biosynthèse a pour objectif de forcer la voie de biosynthèse en augmentant le flux global des précurseurs vers la molécule recherchée. Cet aspect a été étudié par El Tahchy en ajoutant la 4'-O-méthylnorbelladine (MN) deutérée dans le milieu de culture liquide de cals et de bulbilles de *L. aestivum*. Des études antérieures sont rapportées dans la littérature où d'autres précurseurs (caranine, tyrosine et phénylalanine) marqués au ¹⁴C ou au ³H3C ont été utilisés à la place de la MN deutérée pour l'étude de la voie de biosynthèse chez *N. pseudonarcissus* et *L. aestivum*. Le marquage au deutérium présente plusieurs avantages, il est couramment et simplement utilisé comme traceur isotopique stable et non radioactif. Sa présence peut être révélée par les méthodes de spectrométrie de masse. La MN deutérée, ajoutée dans le milieu de culture de bulbilles de *L. aestivum*, a été incorporée dans la voie de biosynthèse et métabolisée en trois types d'alcaloïdes d'Amoryllidaceae deutérés : galanthamine, lycorine, crinine, N-déméthylnarwedine, déméthylgalanthamine, narwedine, N-formylgalanthamine, anhydrolycorine, trisphaeridine et déméthylmaritidine. L'ajout du précurseur deutéré a surtout influencé la production d'alcaloïdes natifs par les bulbilles. La voie de biosynthèse de la galanthamine et celle de la lycorine ont été intensifiées. La concentration maximale de galanthamine (0,5 mg/g de MS v/s 0,01 mg/g de MS dans les échantillons témoins cultivés en l'absence de précurseur) et la concentration maximale de lycorine (0,2 mg/g MS v/s 0,04 mg/g MS dans les témoins) ont été obtenues après 15 jours de culture en présence de 0,10 g/L de précurseur dans le milieu de culture.

• *Les facteurs physiques*

La lumière

La lumière a un effet positif sur la croissance des cultures in vitro et sur la production de métabolites secondaires. Dans les cultures de tissus différenciés, la lumière transforme le métabolisme cellulaire hétérotrophe en un métabolisme mixotrophe. Elle stimule aussi la biosynthèse des acides aminés qui renferment un phénol (phénylalanine et tyrosine, les précurseurs directs des alcaloïdes) en induisant les enzymes de la voie métabolique du shikimate. Des études comparatives menées sur des bulbilles de *N. confusus* et *L. aestivum* cultivées à la lumière et à l'obscurité ont montré que le taux de croissance des cultures ainsi que la production de galanthamine étaient plus importants à la lumière qu'à l'obscurité (73,3 µg/g MS v/s 38,5 µg/g MS).

- Influence du type de milieux (milieux solides et milieux liquides)

Les nutriments ainsi que les régulateurs de croissance sont mieux puisés par les tissus végétaux en milieu liquide que sur un milieu solide. C'est pour cela d'ailleurs que le taux de croissance des cultures in vitro en milieu liquide est plus important qu'en milieu solide et que l'utilisation du

milieu liquide est considérée idéale pour l'augmentation de la biomasse. Cependant, le principal inconvénient des cultures liquides est le taux élevé d'anomalies physiologiques et la perte du matériel due à l'asphyxie ou à l'hyperhydricité. L'asphyxie et l'hyperhydricité sont des conditions physiologiques indésirables causées par la faible teneur en oxygène et le potentiel hydrique du milieu de culture. De plus, en milieu liquide et en présence d'une concentration élevée en cytokinines, les tissus végétaux sont très susceptibles à la vitrification. Cependant, le milieu solide présente un support aux tissus végétaux et, par la suite, conduit à une meilleure micropropagation avec un taux d'anomalies moins élevé. Le métabolisme secondaire est aussi affecté par ce facteur. En milieu liquide la production d'alcaloïdes ainsi que leur relargage dans le milieu de culture sont plus importants.

OUVRAGES UTILISES

- MOROT-GAUDRY J. F., PRAT R., BOHN-COURSEAU I., JULLIEN M. Biologie végétale : Croissance et développement, 2012, Ed. Dunod. 256 p.
- YVES DEMARLY, MONIQUE SIBI. Amélioration des plantes et biotechnologie.1996, Ed : John libbely eurotext, 77p
- FABIEN CEZARD. Biotechnologie en 26 fiches.2009, ed: Dunod. 106p
- CLAUDINE FRANCHE, EMILE DUHOUX. La transgénèse végétale, 2001, ed: Elsevier. 187p.
- YVES TOURTE. Génie génétique et biotechnologie, concepts, méthodes et applications agronomiques, 2002, Ed : 237p.
- JEAN PATRICK LAFON. CATHERINE THARAUD-PRAYER GILLES LEVY. Biologie des plantes cultivées, 1996, ed: Dunod, 229p.
- WINTER P.C., HICKEY G I. L'essentiel en génétique, 2000. ed : Derti. 399p.