

# Amélioration des plantes par les Biotechnologies

---

Principales  
techniques et  
applications

---

# Introduction

---

Les biotechnologies végétales sont des techniques de laboratoire qui permettent l'**optimisation** et la **diversification** des végétaux ou de leur composants.

Ces techniques reposent sur de la **biologie cellulaire**, de la **biologie moléculaire** et la **culture *in vitro***. L'exemple le plus connu est les OGM.

---

# Introduction

---

De nombreux chercheurs considèrent la biotechnologie végétale comme :

le perfectionnement des techniques  
d'amélioration génétique

qui ont commencé il y a des millions d'années avec la culture de plantes sauvages pour la consommation humaine.

---

# Introduction

---

Pour améliorer un caractère :

Il faut connaître les gènes, on parle de génomique.

Il faut introduire le caractère d'intérêt dans la plante, la régénérer et la multiplier, c'est la culture *in vitro*.

Cette régénération est basée sur la teneur en hormones du milieu et sur la totipotence.

---

# Introduction

---

En effet, à partir d'un morceau de la plante, on peut régénérer une plante entière.

Les cellules vont redevenir des cellules indifférenciées et c'est la composition du milieu qui va orienter les cellules vers la formation de tiges ou de racines.

L'organogenèse est la re-fabrication d'organes

On peut aussi réorienter les cellules vers la formation d'un embryon somatique (issu d'une cellule).

---

# Introduction

---

Le plus simple pour la culture *in vitro* est la graine.

Avec les morceaux de tissus on obtient des plantes diploïdes et avec des grains de pollen ou l'ovaire on obtient des plantes haploïdes.

La cellule la plus simple et la plus petite utilisée est le protoplaste. C'est une cellule sans paroi contenant les chloroplastes.

N'ayant pas de paroi la pénétration de l'ADN est facilitée.

---

# Culture de méristèmes

---

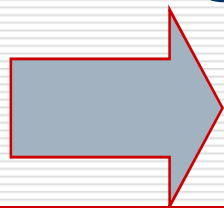
Assainissement de  
lignées

---

# Obtention de lignées saines

---

- Principe : les méristèmes sont indemnes de virus (travaux de P. Limasset)
- Culture de méristèmes
  - Quelques 1/10 mm
- Régénération de plantes saines



**Attention** : les lignées sont toujours sensibles à des infections ultérieures !!!

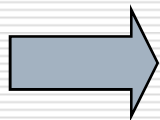
---



# Applications

---

- Espèces à reproduction végétative
  - pomme de terre, bananier, artichaut, fraisier...



Premiers succès dans les années 50

Service proposé par la plupart des sociétés de biotechnologies végétales

- Normes sanitaires internationales
-

# Micropropagation

---

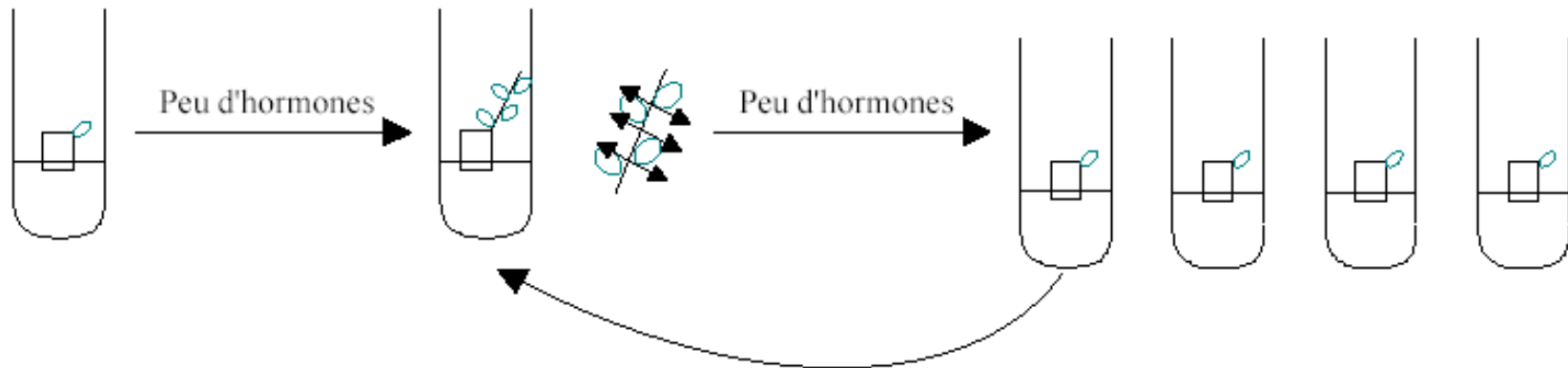
---

# Micropropagation

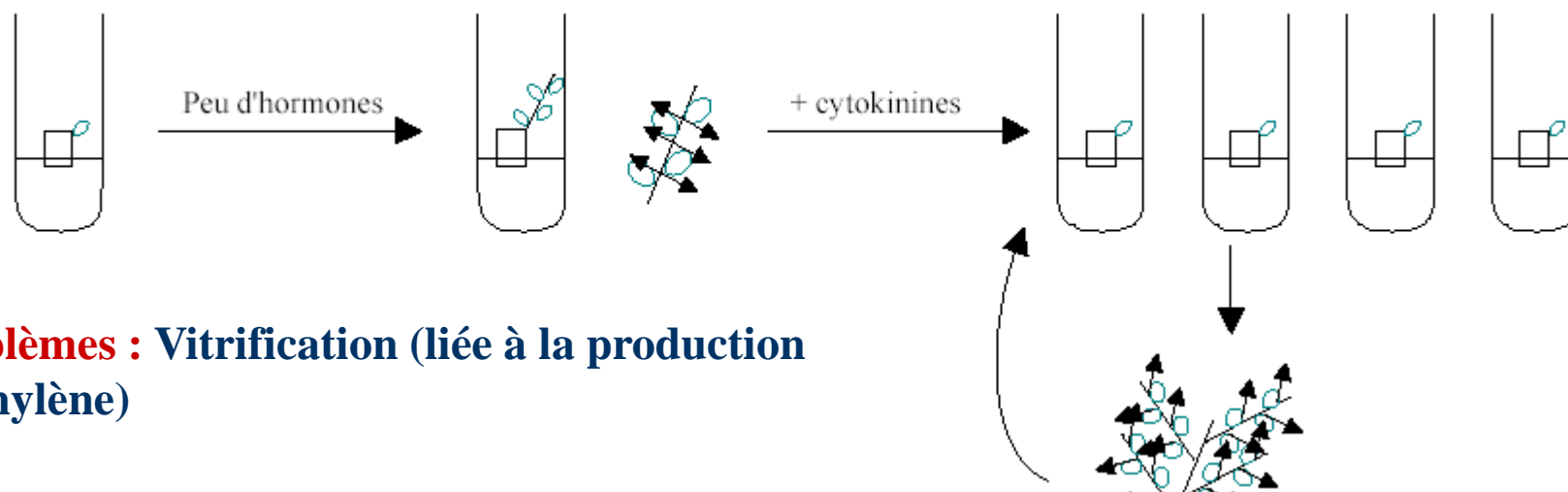
---

- Apex de tige ou bourgeons latéraux,
  - Procédure en trois étapes (Murashige, 1974)
    - I : établissement du tissu en conditions d'asepsie
    - II: multiplication de tiges feuillées
    - III: formation de racines et conditionnement de propagules avant transfert en serres
  - Clonage très fidèle et très efficace
    - 200 000 rosiers à partir d'un bourgeon
-

## Culture simple de nœuds : le bouturage *in vitro*



## Prolifération de pousses axillaires



**Problèmes :** Vitrification (liée à la production d'éthylène)

## Exemple de la pomme de terre : applications industrielles depuis près de 20 ans

---



# Applications

---

- Horticulture, Sylviculture, Agronomie
  
  - Les « grands succès » économiques
    - Banane
    - Orchidées
    - Pomme de Terre
  
  - Conservation de la biodiversité
    - plantes carnivores
    - Orchidées
-

# L'industrie de la micropropagation

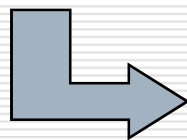
---

- ❑ Gain de place
  - ❑ Affranchissement des saisons
  - ❑ Rapidité
  - ❑ Qualité sanitaire et homogénéité
  - ❑ Pour certaines espèces : pas d'autres solutions
-

---

## Millions de plants par an issus de la micropropagation

	1980	1988	2001
Pays-Bas	7,4	61,5	
France	2,7	40,5	
Belgique			50



Facteur limitant : main d'œuvre

Délocalisations

---





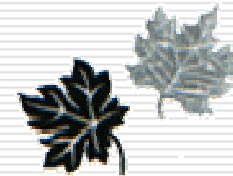
## Exemples

---

### Bioplant (Belgique)



### Propagation technology (UK)



## Exemples

---

### Vivai Battisitini (Italie)

20 hottes à flux laminaire

60 000m<sup>2</sup> de serres

3 chambres de culture

4 000 000 plants vendus chaque année

### Technivit (Bourges)



Multiplication

Assainissement

Création variétale

---

# Embryogenèse somatique

---

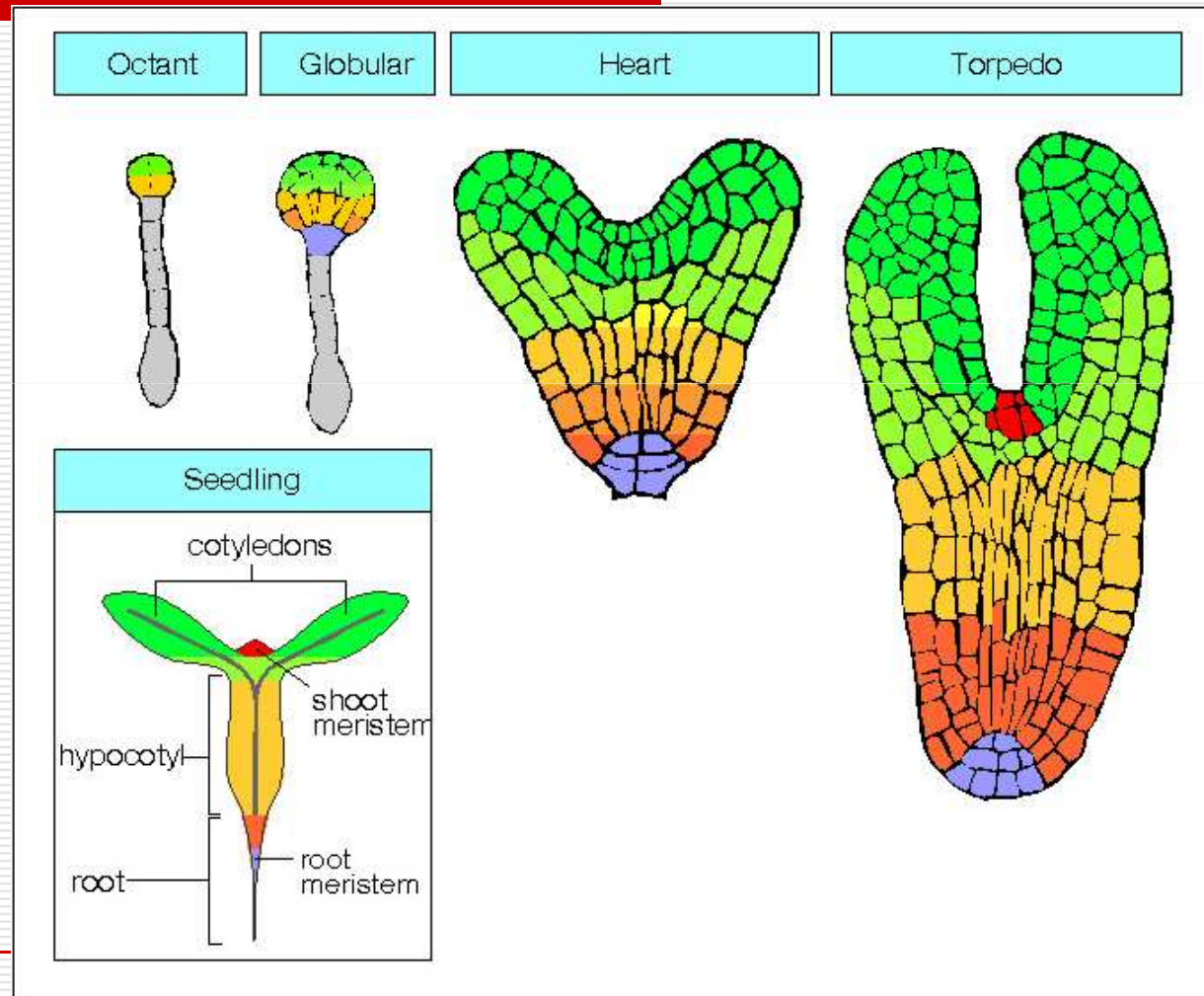
---

# Embryogenèse somatique

---

- Génération d'un embryon à partir d'un méristème, d'un cal ou de suspensions
-

## L'embryogenèse zygotique



Source : [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB\\_Ch07/fig7\\_5.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch07/fig7_5.jpg)

## Exemple : la luzerne

Pétioles de luzerne

Embryogenèse  
somatique

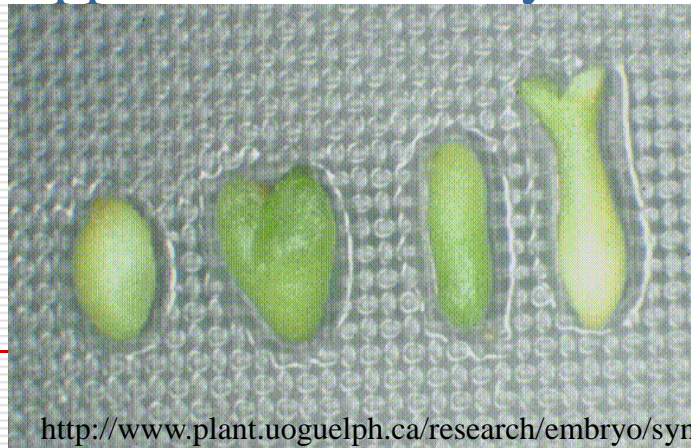
Mise en culture 2,4-D + kinétine  
25°C 3 semaines, photopériode 16h.

Masses de cal (origine cambium vasculaire) renfermant des  
cellules initiales d'embryons somatiques (origine épidermique)

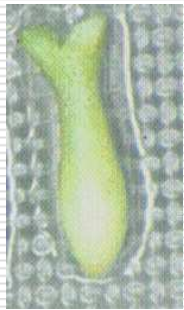
Dispersion en milieu liquide B5  
(2,4-D + kinétine) 7 jours

Tamisage : fraction 200-500 µm  
transférée sur milieu solide

Développement des embryons : 5-7 jours



<http://www.plant.uoguelph.ca/research/embryo/synseeds.htm>



Premier milieu de  
maturation  
(sucrose)

Second milieu  
de maturation  
(ABA, 3 jours)

Rinçage,  
déshydratation  
(15% H<sub>2</sub>O)

Conservation : 1 an

## **SELECTION *IN VITRO***

---

Choix des explants,  
éventuellement application  
d'un stress pour les rendre  
compétents

---



# Applications

---

Obtention de semences pour des variétés stériles (ex: pommes de terre polyploïdes, bananier...)

Semences « d'élite » pour des espèces allogames

Solution pour la conservation d'espèces tropicales dont les semences sont dites « récalcitrantes » à la déshydratation

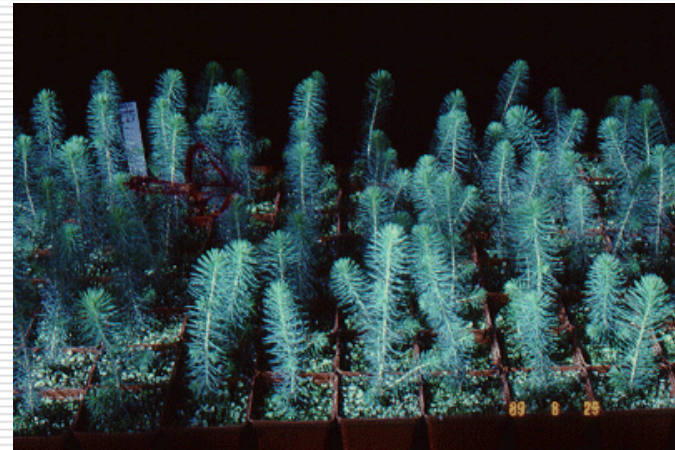
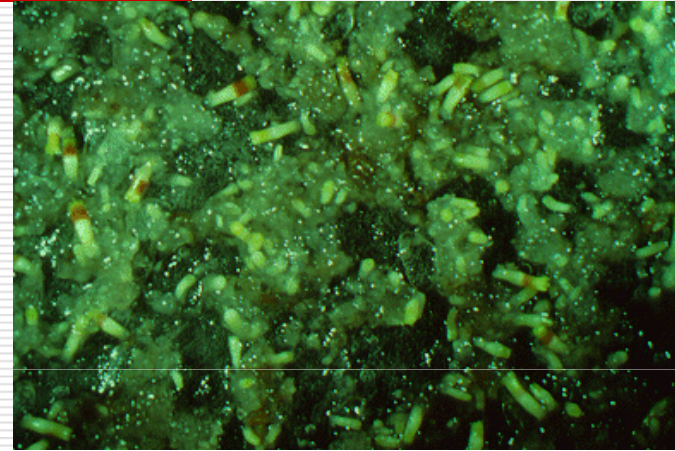
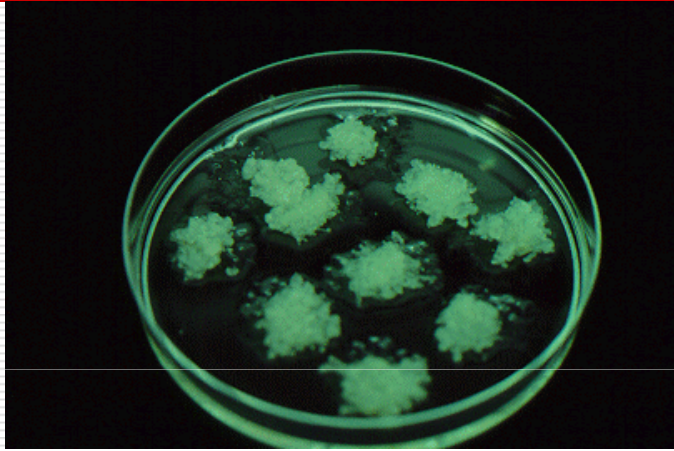
Obtention rapide de semences « d'élite » pour des espèces ligneuses

Possibilité de cultures en réacteurs : production de semences artificielles à grande échelle (gymnospermes)

---

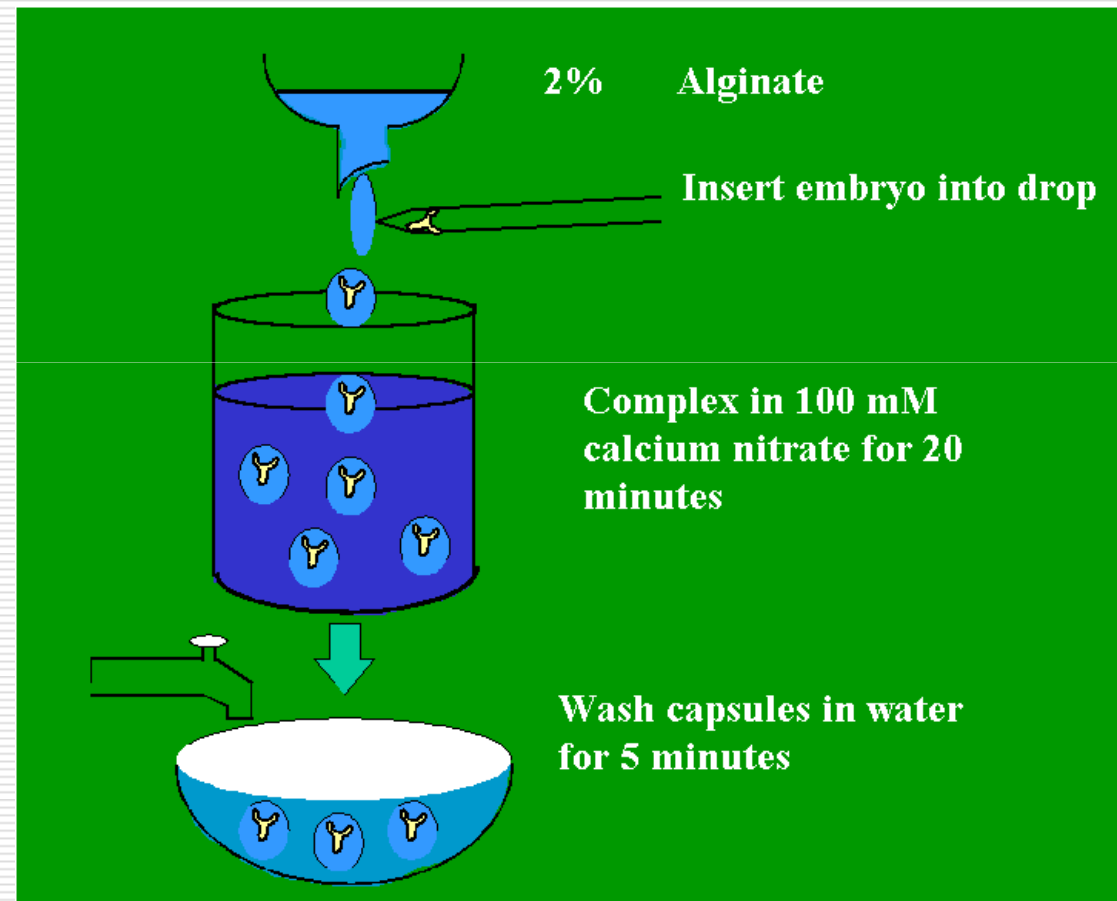
# Application aux ligneux

---



# Semences artificielles (synseeds)

---



## Semences artificielles (synseeds)

---



*Feijoa sellowiana*

---

# Vitrovariation

---

Non-conformité de  
la multiplication

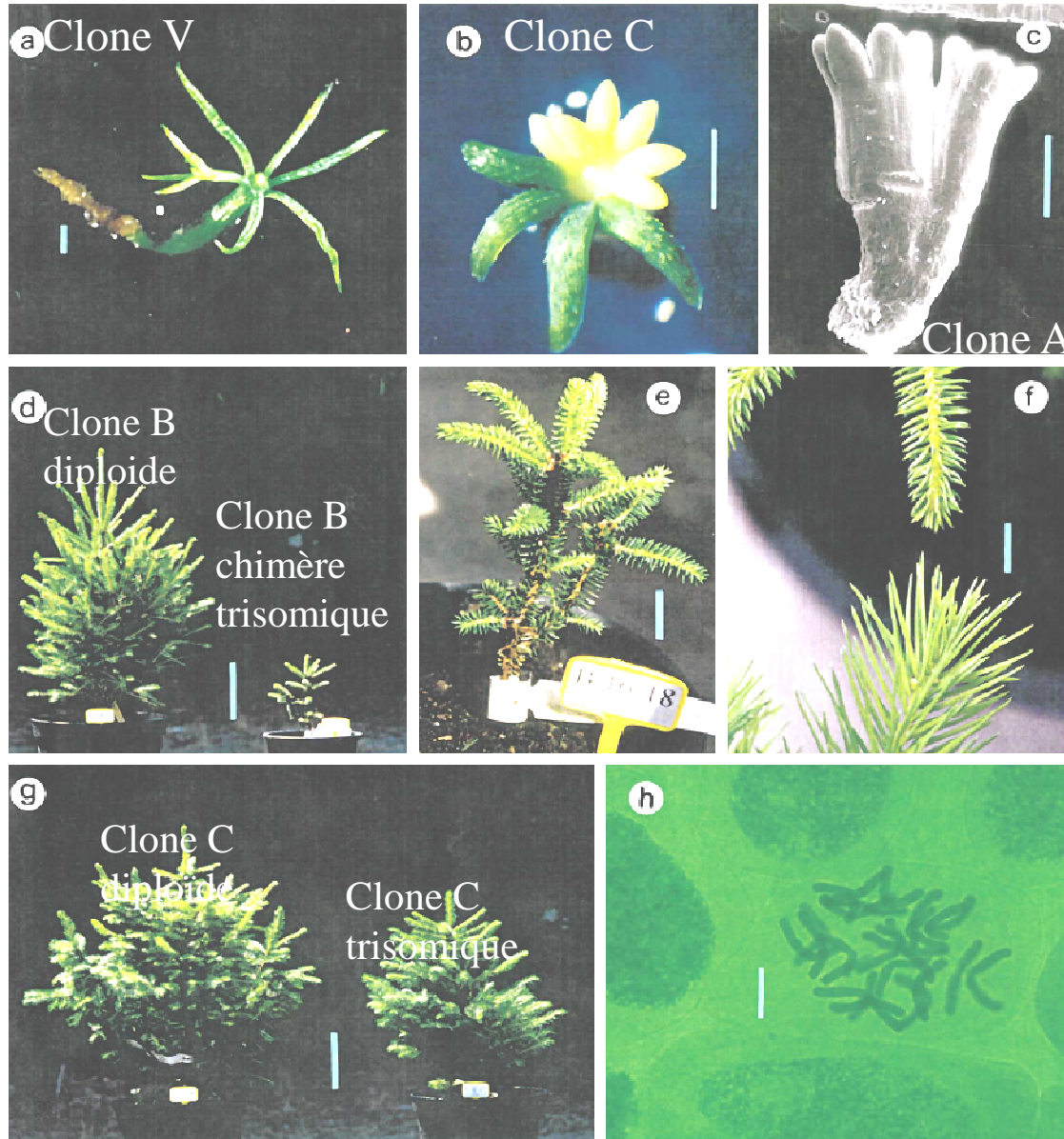
---

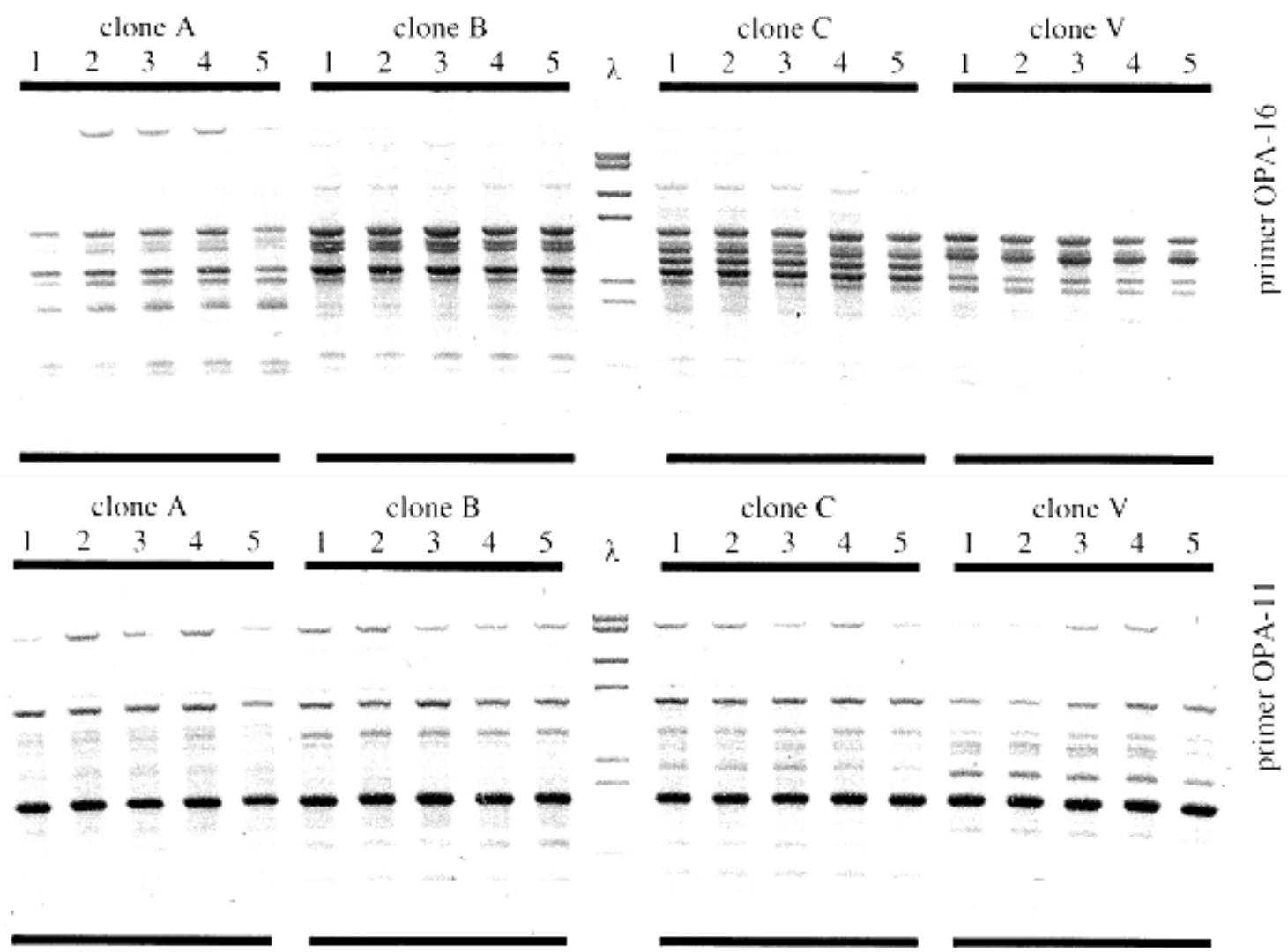
# La vitrovariation

---

- Les plantes régénérées à partir de cals, de protoplastes ou de feuilles ne sont pas toujours des clones parfaits:
    - instabilité chromosomique, aneuploïdies
    - différences morphologiques
-









# Utilisation de la vitrovariation

---

- Mise à profit de la variation somaclonale dans le cadre de programmes de sélection
    - Sélection de cals tolérants à des stress
  
  - Augmentation artificielle de la variabilité
    - Traitements chimiques
    - Radiations
-

# Création de variabilité

---

Mutagenèse

---

# Amélioration d'une plante ornementale : *le Caryopteris*

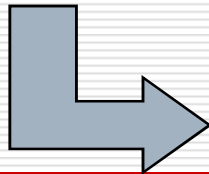


*Caryopteris x clandonensis* 'Inoveris' Heavenly Blue

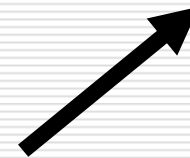


*Caryopteris x clandonensis* 'Inoveris' Grand Bleu®

Peu de variabilité dans les populations



Micropropagation et mutagenèse par irradiation



Vitropropagation  
(mise au point)



INRA/SAPHINOV. Diffusion SAPHO

Irradiation de bourgeons :  
rayons  $\gamma$  (avec la dose adéquate)

Régénération des  
plantules



Acclimatation,  
obtention de graines

Sélection des  
mutants

Semis et sélection sur la  
nouvelle génération

Acclimatation,  
croissance

Stabilité des caractères

Perte des  
caractères (????)

Commercialisation



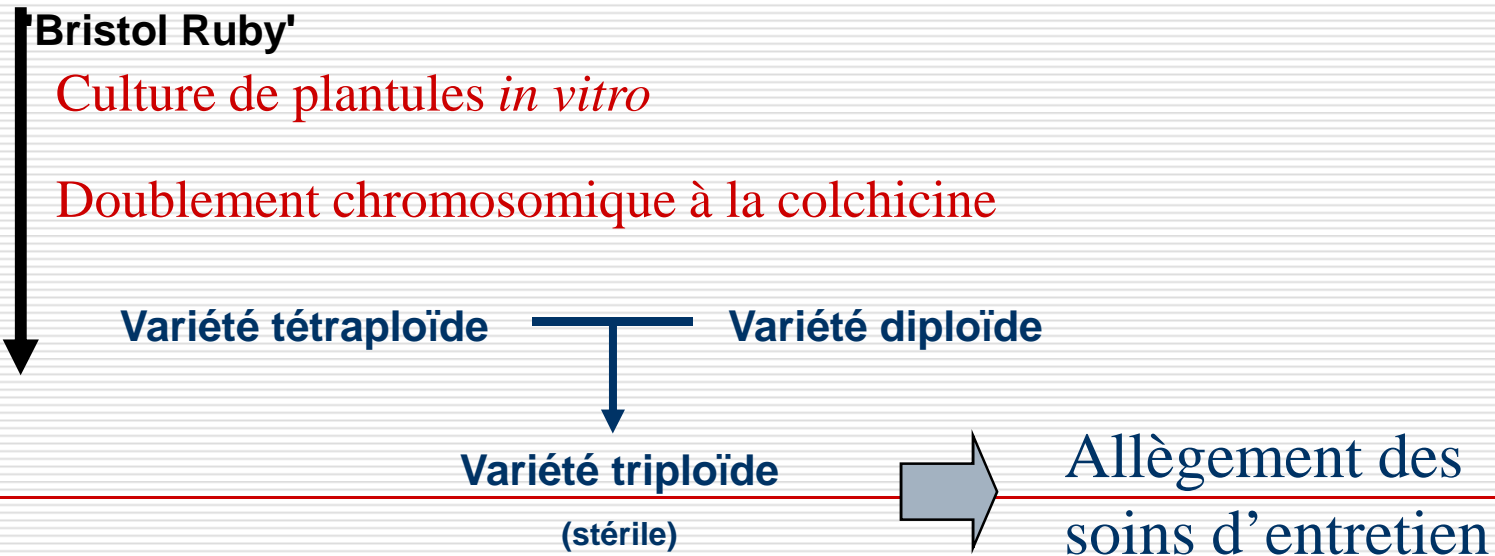
# Amélioration du *Weigela*



Micropropagation et mutagenèse par irradiation



'Courtadur' GRENADINE ®



# Apport des biotechnologies dans l'amélioration du Bananier

---

Variétés polyploïdes, stériles,  
fortement hétérozygotes

Multiplication végétative



L'amélioration  
génétique par  
croisement est  
impossible

Presque toutes les  
variétés de bananes et  
de plantain découlent  
de mutations  
spontanées

---

# Apport des biotechnologies dans l'amélioration du Bananier

---

Mutagenèse par irradiation de vitroplants de bananiers

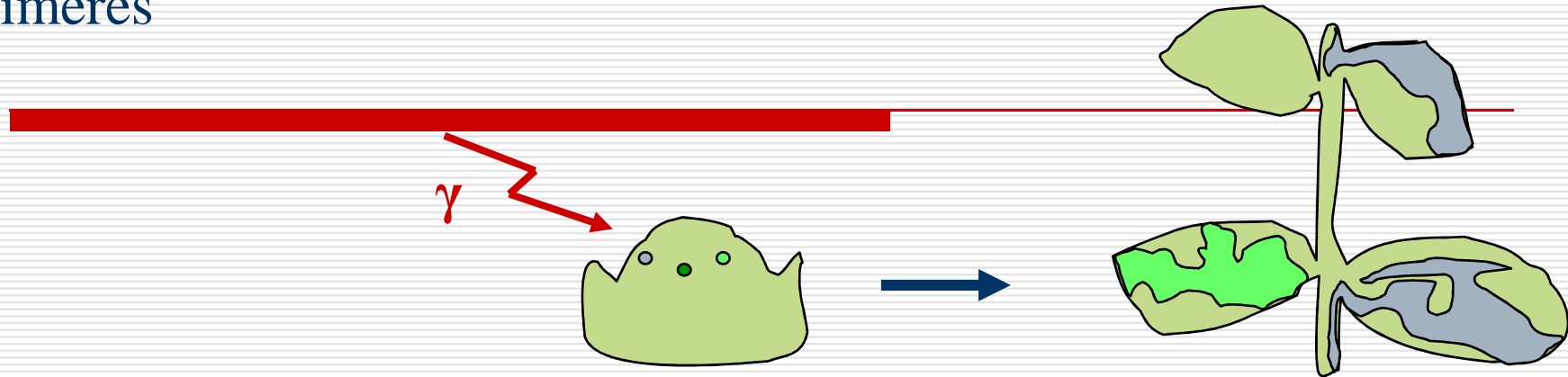
Sélection de mutants de petite taille, à fructification précoce

Possibilité de 4 récoltes tous les 2 ans (au lieu de 3)

Impact sur la vie économique locale.  
Forte demande de plants issus de vitroculture

---

**Problème** de l'irradiation de tissus méristématiques : obtentions de chimères

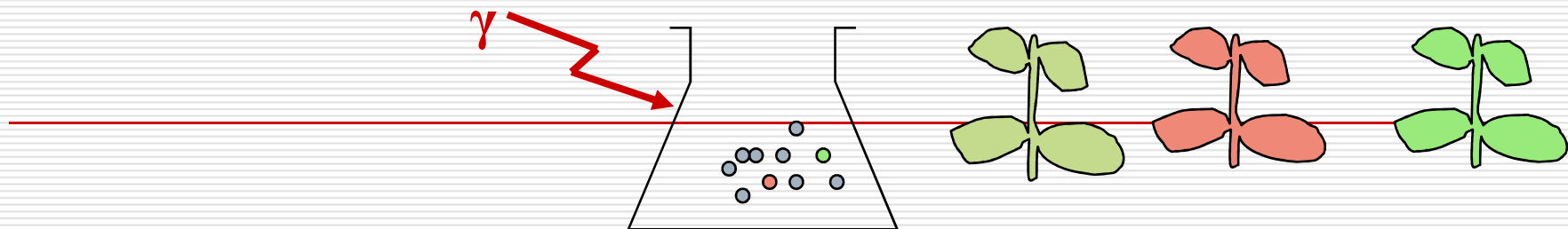


**Solution (chez le bananier):**

Embryogenèse à partir de suspensions cellulaires

Démonstration que les embryons somatiques sont issus de cellules uniques

Irradiation de suspensions de cellules embryogéniques





# Sauvetage d'embryon

---

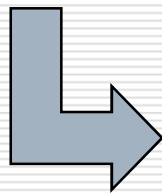
Culture  
d'embryons

---

# Incompatibilité du porte graine

---

- ❑ Les semences hybrides sont viables mais le développement ne peut se faire sur le pied mère
- ❑ Régénération de la plante par culture *in vitro* de l'embryon



Exemple de triticale (*Triticum* x *Secale*)

---

## Exemple de triticales (*Triticum x Secale*)

---

De même que le blé s'est constitué par l'association naturelle de plusieurs espèces de graminées sauvages, les hommes ont tenté d'associer les **qualités du blé** et la **rusticité du seigle** en croisant ces deux espèces cultivées, à la fin du 19<sup>e</sup> siècle.

---

## Exemple de triticales (*Triticum* x *Secale*)



**Blé**  
*Triticum*  
Génomes :  
**AA BB (DD)**

**X**



**Seigle**  
*Secale*  
Génome :  
**RR**



Nouvelle espèce  
**Triticale**  
*X. Triticosecale*  
Génomes :  
**AA BB RR**

## Exemple de triticale (*Triticum x Secale*)

---

D'abord plante de laboratoire, le triticale intéressa petit à petit les sélectionneurs puis les agriculteurs. Les efforts des uns et des autres, à travers le monde, en ont fait aujourd'hui une espèce cultivée un peu partout, de plus en plus connue et appréciée.

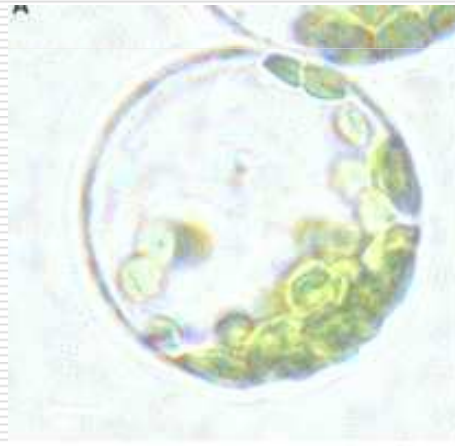
Le triticale est essentiellement utilisé pour l'alimentation animale (alimentation du bétail) mais aussi alimentation humaine (pain, biscuits, malt) et utilisation non alimentaire (bioénergie).

---

# Protoplastes

---

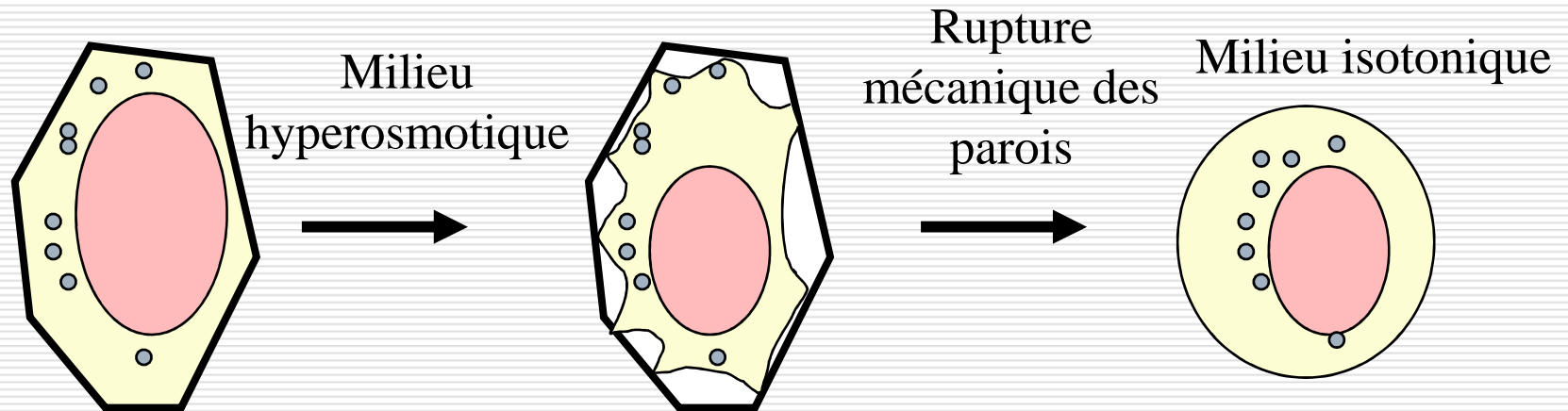
Cellule de plante, de bactérie ou de champignon débarrassée de sa paroi



# Isolement de protoplastes

---

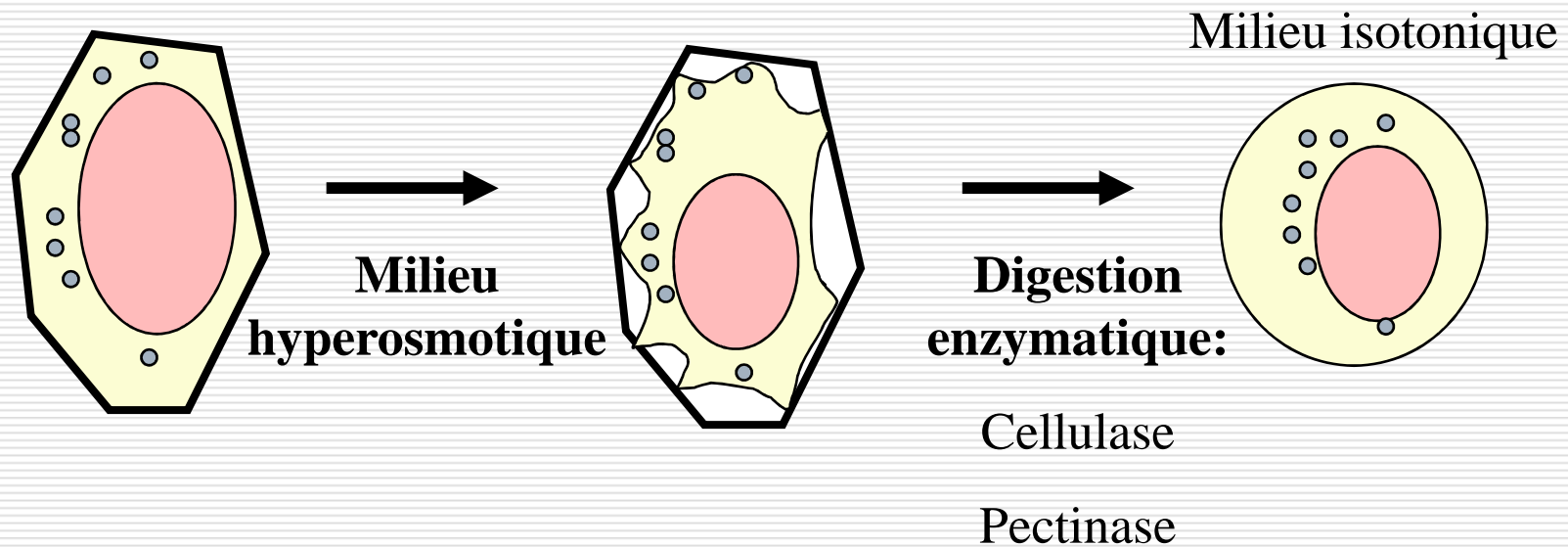
## Vieille école :



**Faible rendement**

---

# Isolement de protoplastes



Paroi primaire :

20-30% cellulose

70-80 % hémicellulose et pectine



# Isolement de protoplastes

---

Il faut les préparer et les conserver dans un **milieu hypertonique** qui plasmolyse les cellules et leur permet **de ne pas éclater** par entrée d'eau en l'absence de **paroi**.

---

# Purification de protoplastes

---

## Filtration

- Tamis successifs 100 à 30  $\mu\text{m}$

## Rinçages

## Flottement sur coussin de saccharose

- Saccharose 20%, 100g

## Contrôles

- Absence de paroi : Calcofluor White
  - Viabilité : Florescein Diacetate (FDA)
    - Théoriquement > 80 % viabilité
-

# Culture de protoplastes

---

- Couche mince, milieu liquide
  - Composition des milieux
    - Milieux MS (Murshige et Skoog), B5 (Gamborg)...
    - Maintenir un potentiel osmotique bas
      - Glucose 0,35 M
      - Glucose + mannitol
    - Doses élevées d'hormones
      - Deux auxine fortes (2,4-D + ANA) + cytokinine
  - Densité élevée de protoplastes (50 000 – 500 000/ ml)
  - Premiers temps à l'obscurité : éviter l'oxydation
-

# Intérêt des protoplastes

---

Comme elles n'ont plus de paroi, ces cellules se prêtent à divers types d'expérimentation (**introduction de matériel génétique étranger, fusion inter-spécifique, étude électro-physiologique de la membrane plasmique, etc.**)

---

# Intérêt des protoplastes

---

- ❑ Régénération de plantes à partir de cultures de protoplastes
  - ❑ Fusion de protoplastes
  - ❑ Etudes d'échanges de métabolites
  - ❑ Transformation génétique
  - ❑ Culture moléculaire
-

# Fusion de protoplastes

---



- **Fusion spontanée (soja, maïs)**
  - **Ca<sup>2+</sup> pH basique**
  - **PEG**
  - **Choc électrique**
-

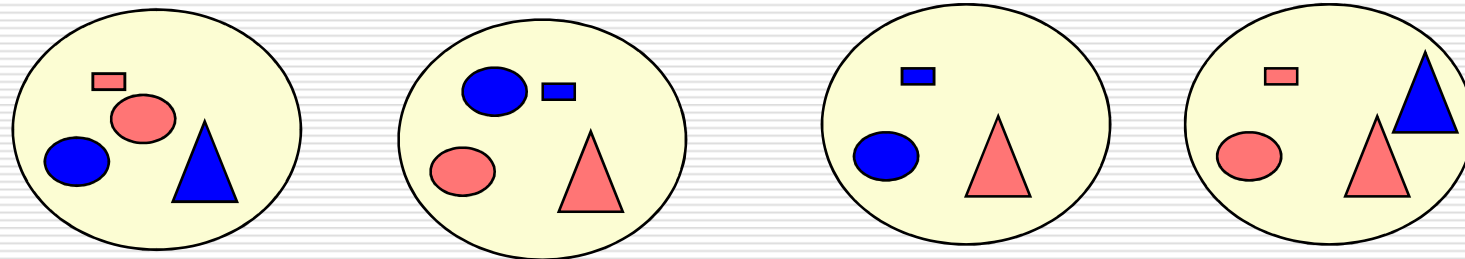
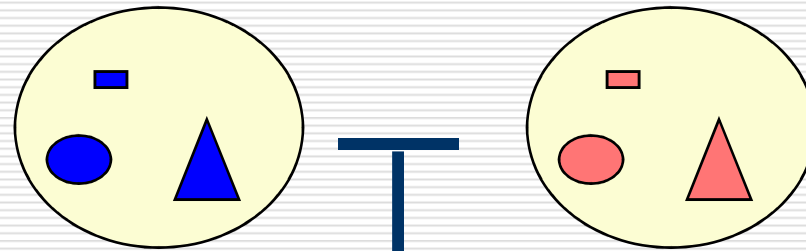
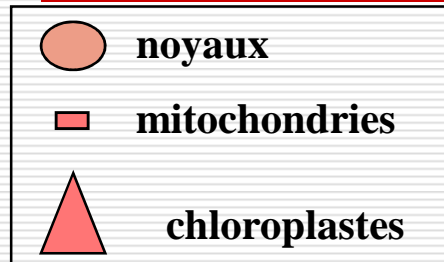
## Comment trier les hybrides ?

---

**Exemple : fusion entre un protoplaste de poireau et un protoplaste de choux rouge**



# Comment se répartit le matériel génétique ?



hybrides somatiques

Cybrides

(addition des noyaux)

(cytoplasmes hybrides)



# Application agronomique

*Solanum melongena*



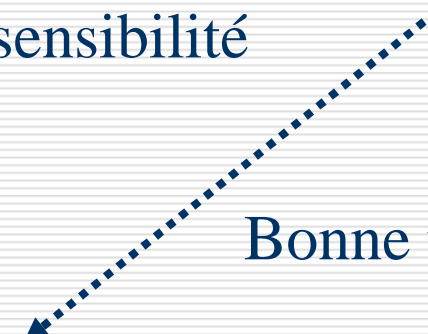
*Ralstonia solanacearum*

*Verticillium dahliae*



sensibilité

Bonne tolérance



*Solanum sysimbrifolium*



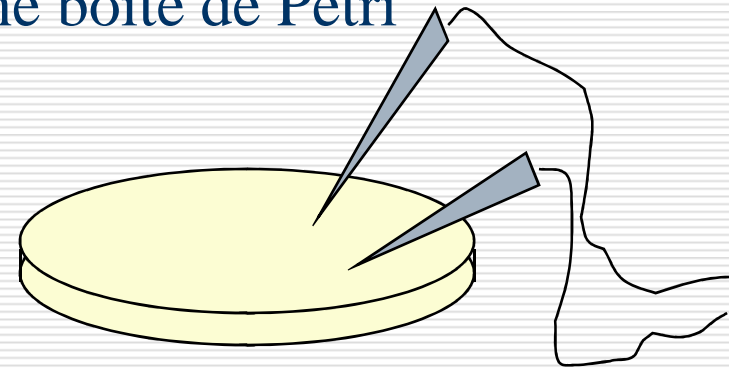
**Problème:  
fécondation croisée  
inefficace**

---

Confection de protoplastes à partir de 500 mg de feuilles de chaque espèce

Ajustement de la densité à  $3.5 \cdot 10^5$  / ml dans 0.5M mannitol + 0.5mM  $\text{CaCl}_2$

Mélanger les deux préparations dans une boîte de Pétri



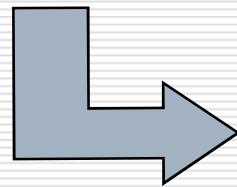
Alignement : courant alternatif 15s, 230,  $\text{V.cm}^{-1}$ , 1 MHz

---

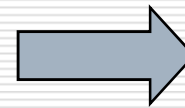
Fusion : courant continu 2\*45s 1200  $\text{V.cm}^{-1}$

Après le choc électrique :  
milieu de culture

- + 0.4 M de glucose
- + PEG 250 mg/l
- + hormones : 2,4-D, zeatine, NAA

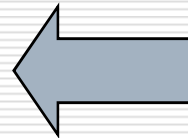


7 jours à l'obscurité  
15 jours à la lumière

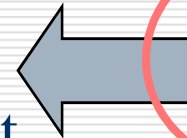


Milieu neuf :  
2,4-D + BAP

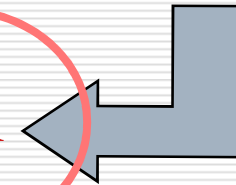
Milieu de  
multiplication  
sans hormones



Milieu de  
régénération de  
tiges : zéatine et  
IAA



Cal



22 plants régénérés

Sélection des hybrides (400)

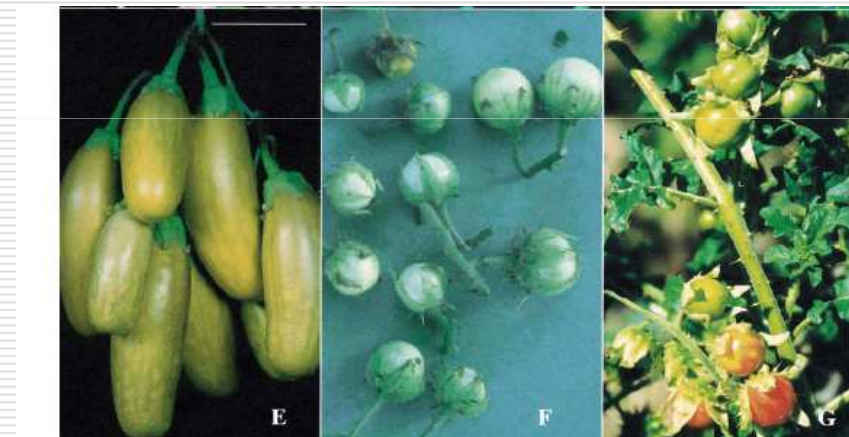
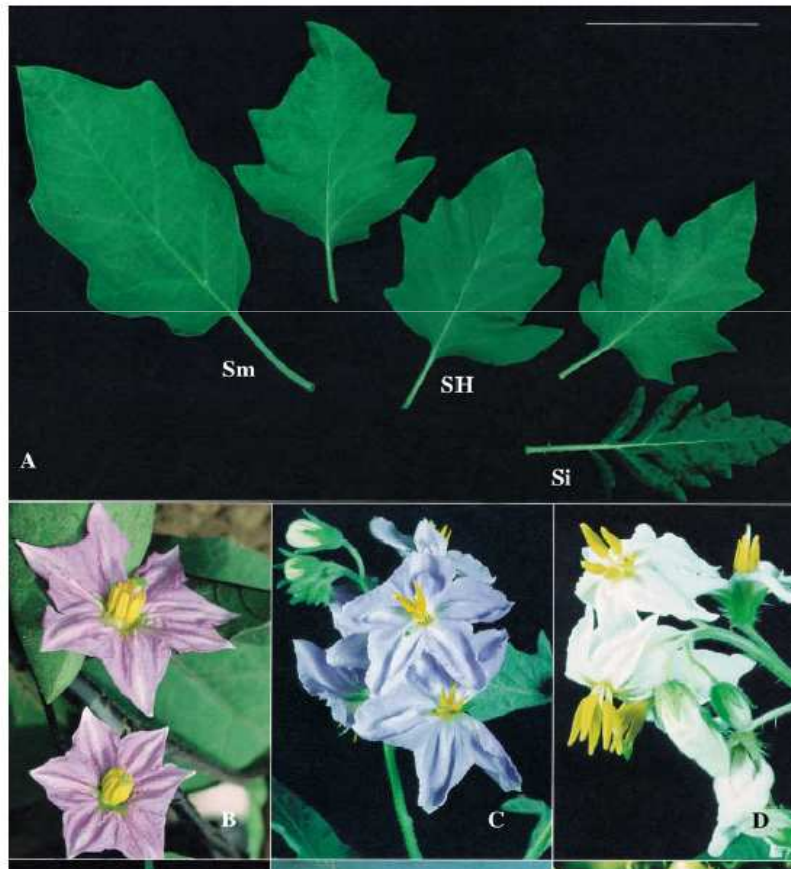
---

Comment être sûr qu'il s'agit  
d'hybrides ?

---

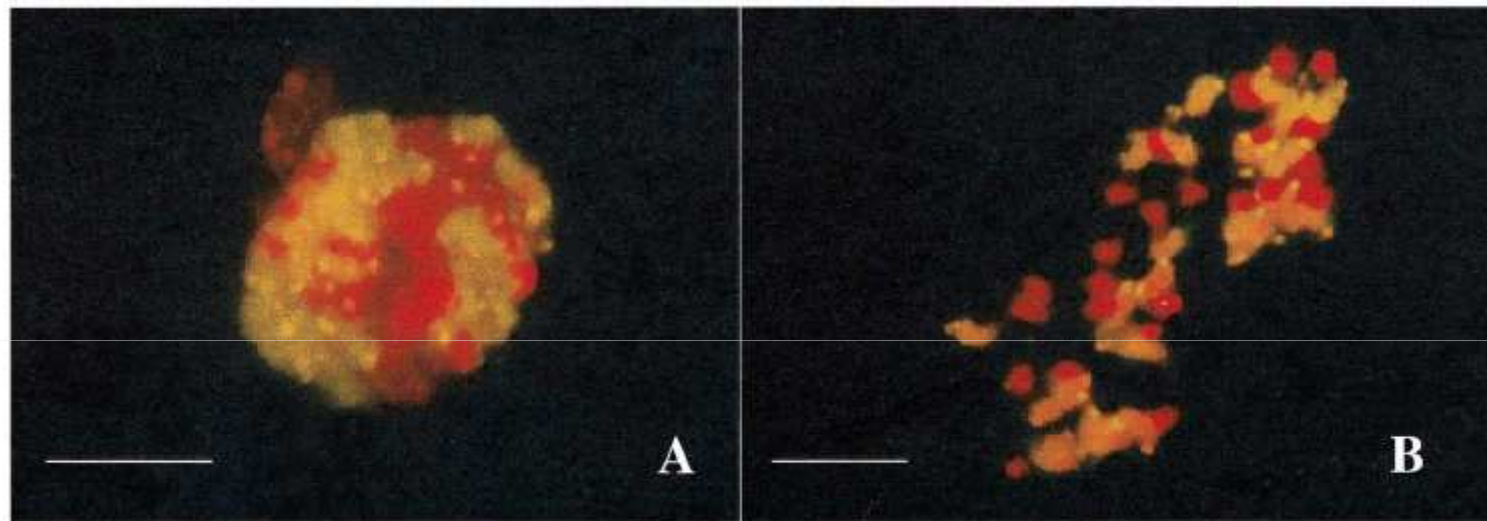
# Morphologie des hybrides

*C. Collonier et al. / Plant Science 164 (2003) 849–861*



## Dénombrement des chromosomes respectifs

---



**GISH : Genomic *In Situ* Hybridization**

**sonde : ADN de *S. sysimbrifolium* « coloré » à la fluoresceine**

**Contre coloration : iodure de propidium**

---

**—————→ 24 chromosomes de chaque**

# Origine des gDNA et cpDNA

RAPD pattern

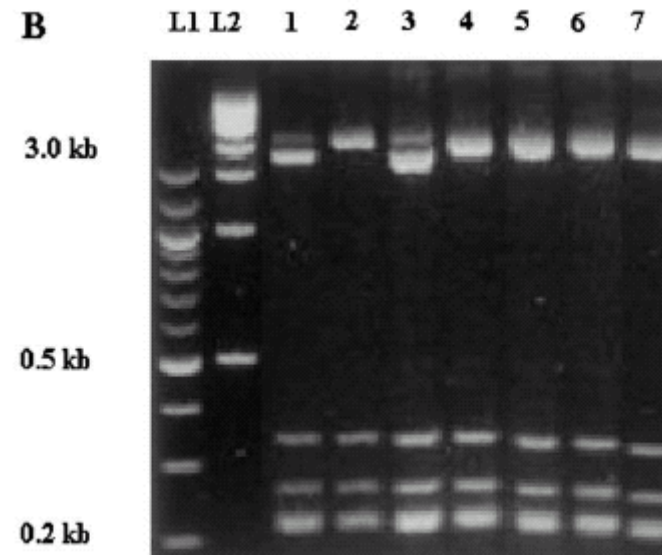
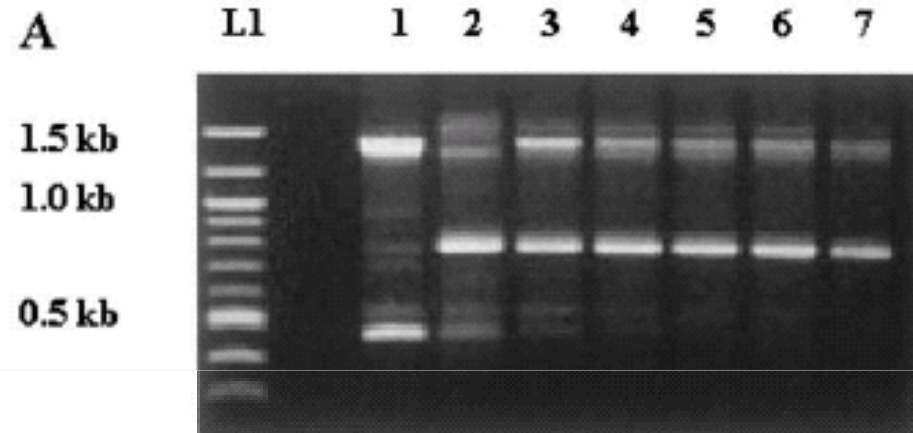


Les ADN génomiques sont tous les deux présents

CAPS pattern

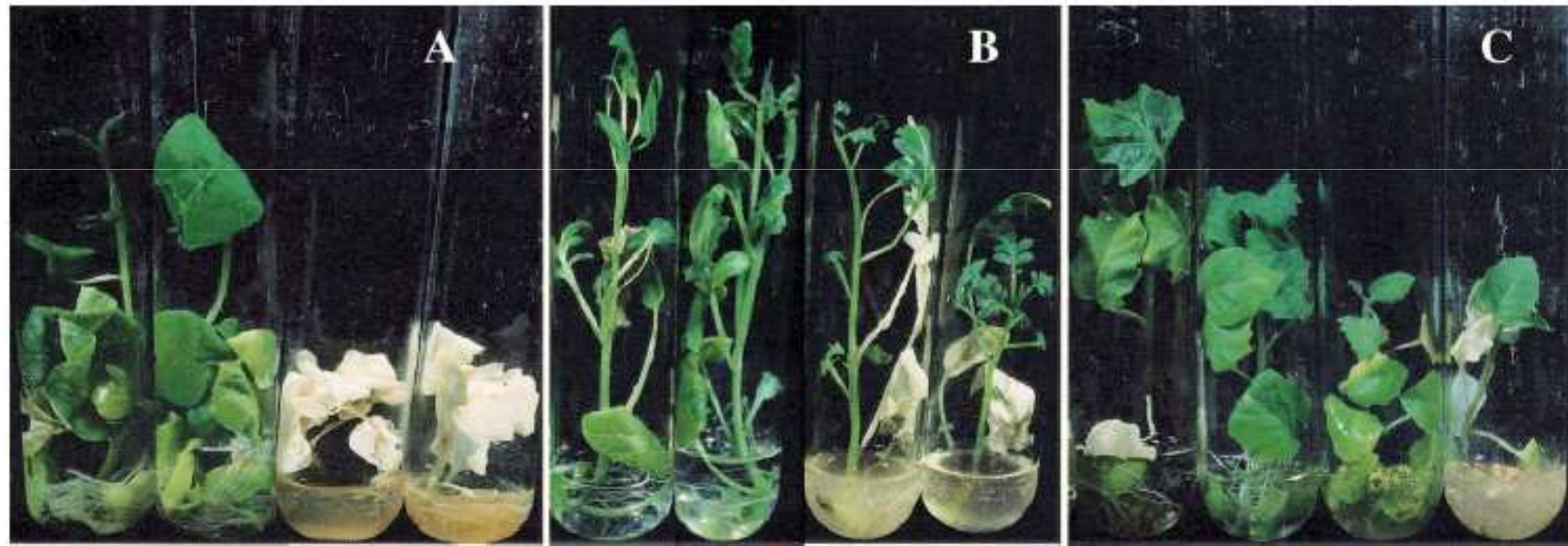


Les chloroplastes sont de *S. sysimbrifolium* !!





# Tolérance au flétrissement bactérien causé par *Ralstonia*



*S. melongena*

*S. sysimbrifolia*

Hybride



# Haplo-diploïdisation

La maîtrise de cette technique a fait de grands progrès, que ce soit par **croisements interspécifiques** (chez le blé, croisement blé x orge bulbeuse, blé x maïs), par **des génotypes inducteurs** (chez le maïs) ou par **la culture *in vitro* de microspores, d'anthers ou d'ovules.**

## **Des haploïdes : pourquoi faire ?**

---

Cette technique a l'avantage de:  
créer une nouvelle variabilité,  
faciliter les opérations d'évaluation,  
mais surtout de raccourcir la phase de  
consanguinisation à une seule  
génération.

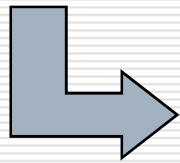
**Elle est donc utile lorsque le but de l'amélioration  
est la production de lignées pures.**

---

## Des haploïdes : pourquoi faire ?

---

- ❑ Recherche de mutations récessives
- ❑ Haplodiploïdisation : homozygotie 100%



**Des homozygotes : pourquoi faire ?**

Outil de sélection :

Espèces autogames, Espèces allogames

---

# Obtention de plants haploïdes

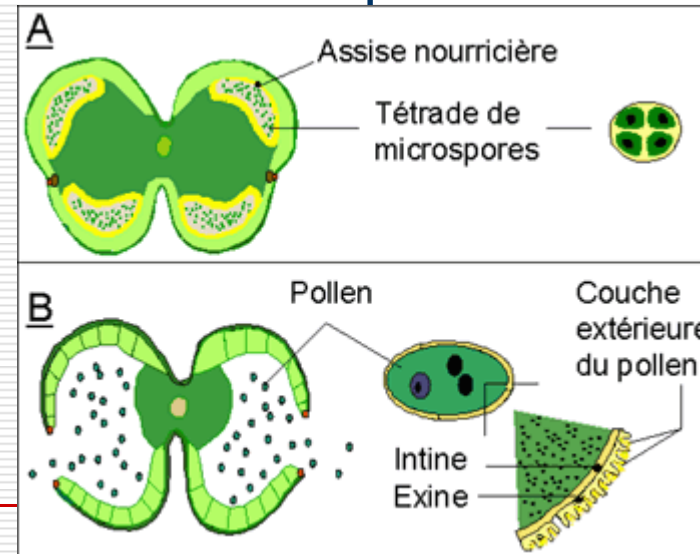
---

- Haploïdisation spontanée
    - Parthénogenèse (cellules sac embryonnaire)
  - Haploïdisation induite
    - Androgenèse *in vitro*
    - Gynogenèse *in vitro*
    - Parthénogenèse *in situ*
-

# Androgenèse

Limite : albinisme dans certains cas

- Développement sporophytique (haploïde) par culture des gamétophytes mâles
  - Cultures d'anthers ou de microspores isolées



Source : CNRC-IBP-Canada

# Gynogenèse

---

□ Développement sporophytique de gamétophytes femelles → obtention de plants haploïdes

- Culture *in vitro* d'ovaires ou d'ovules
  - Pollinisation croisée
  - Utilisation de pollen irradié
- } Parthénogenèse *in situ*
-

# Doublement des chromosomes

---

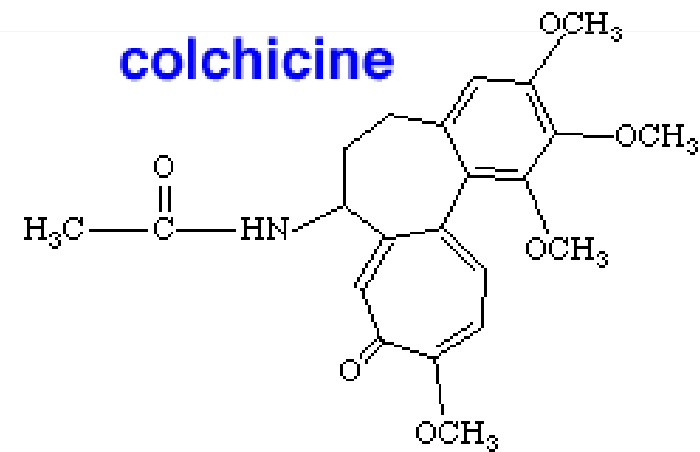
## □ Utilisation d'agents mitoclasiques

- Blocage de la polymérisation des microtubules

- Colchicine
- Oryzaline

## □ Contrôle de la ploïdie

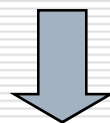
- Cytométrie en flux



# Obtention d'haploïdes de pommier

Le pommier : un matériel génétique difficile à étudier:

- Cycle reproductif lent (période juvénile 5-7 ans)
- Autostérilité



Impossible d'obtenir des lignées 100% homozygotes par la sélection classique



Obtention de lignées haploïdes

---

Doublement chromosomique



## Obtention des haploïdes

---

- ❑ Fécondation avec du pollen irradié
- ❑ Récolte des graines et semis
- ❑ Première étape : sélection des haploïdes



# Micropropagation des haploïdes

---

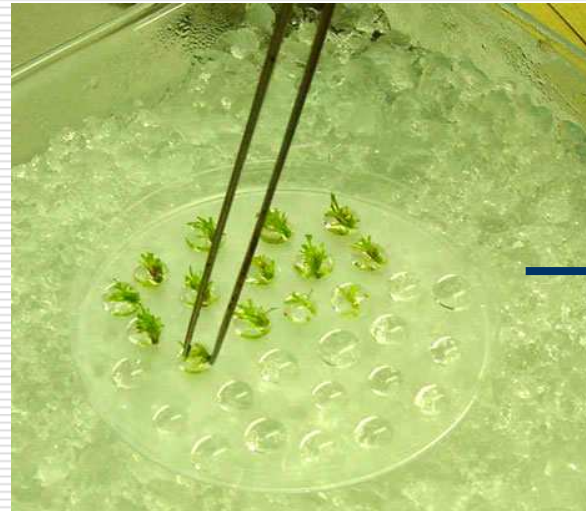
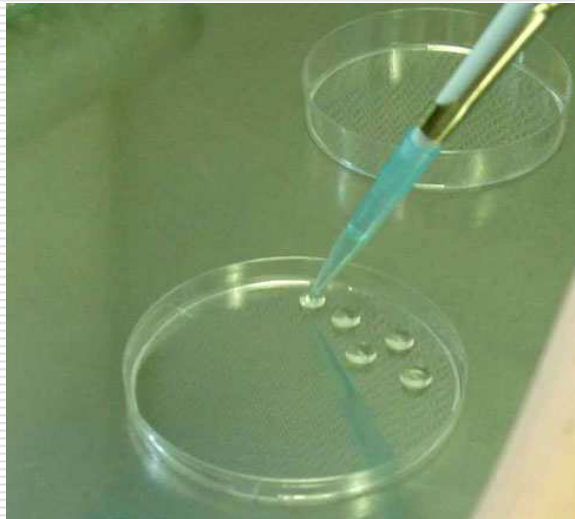
□ Mise en culture d'apex



□ Multiplication (repiquage toutes les 5 semaines)

---

# Doublement de chromosomes



Recouvrir avec du milieu contenant de l'oryzaline 15-50  $\mu\text{M}$

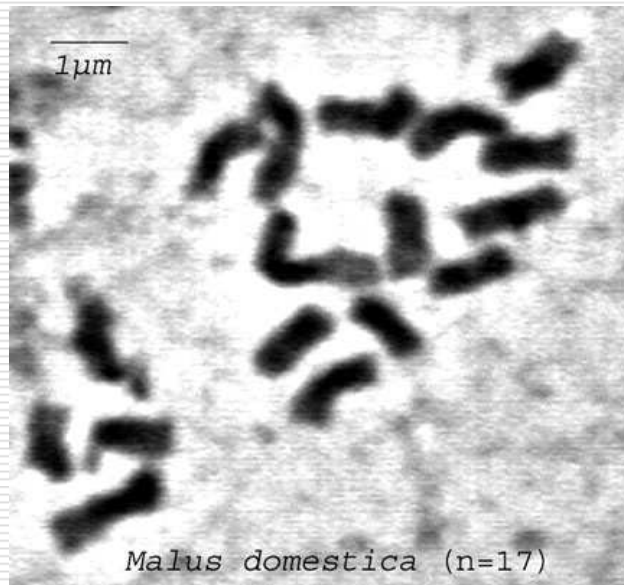
Incuber 2 heures à 2°C



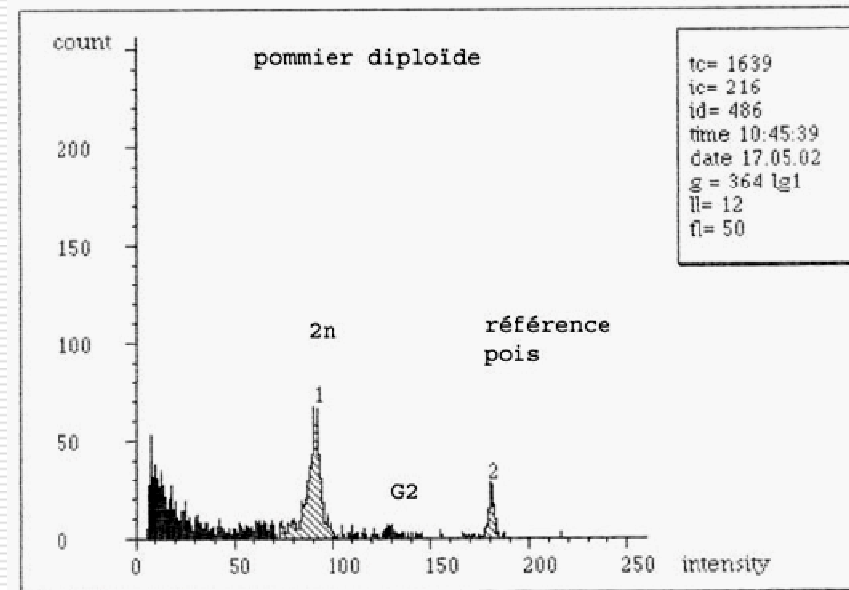
Cultiver 1 mois

# Contrôle de la ploïdie

---



**Comptage des chromosomes**



**Cytométrie en flux**

---

# Microgreffage et sortie d'*in vitro*

---



Humidité relative 80%

---

## Autres utilisation du doublement de chromosomes

- Obtention de lignées tétraploïdes
  - Robustesse
  - Stérilité → exemple du schéma de production de graines de pastèques triploïdes

