

BIOTECHNOLOGIE APPLIQUÉE AUX PLANTES : LES CONTRAINTES D'AMONT ET D'AVAL

par

P. LEPOIVRE et J. SEMAL
Laboratoire de Pathologie végétale
Faculté des Sciences agronomiques
5800 Gembloux (Belgique)

Dans le domaine végétal, le terme de «biotechnologie» englobe un ensemble de techniques faisant appel à la culture en conditions aseptiques de cellules, de protoplastes, d'organes végétatifs ou d'organes reproducteurs (gamétophytes mâles ou femelles).

La biotechnologie végétale connaît dès à présent plusieurs types d'applications (SCRIBAN, 1988) :

- la multiplication végétative par développement de bourgeons axillaires ou la production d'embryons somatiques,
- la production de clones épurés d'agents pathogènes par culture de méristème,
- la création de nouveaux génotypes et la fixation de lignées par culture d'anthères, de microspores ou d'ovules,
- la production industrielle de substances à haute valeur ajoutée par culture de cellules végétales.

Les biotechnologies représentent une composante potentiellement importante de croissance pour l'agriculture, l'industrie, le secteur de la santé publique ainsi que pour les ressources énergétiques.

Dans les pays en voie de développement, l'accroissement de la production alimentaire et la fourniture d'énergie à bon marché pour les usages ménagers, constituent généralement des priorités essentielles de même que l'amélioration de la santé et de l'hygiène publique. Le Tiers-Monde offre dès lors, dans le secteur des biotechnologies, des applications potentielles qui pourraient contribuer à améliorer son agriculture et son industrie.

Face aux applications potentielles de la biotechnologie, les attitudes sont souvent divergentes et teintées d'émotivité. Certains scientifiques de pointe entretiennent un engouement fondé sur les réalisations scientifiques de haut vol que nous révélons quotidiennement la presse spécialisée et les médias. A l'autre extrémité de la palette, on observe un attentisme méfiant qui contribue à accroître le fossé technologique Nord-Sud.

Quel impact les biotechnologies auront-elles sur l'agriculture ? Il sera sans doute moins spectaculaire que dans le domaine biomédical et agroalimentaire. En effet, une chose est de faire produire, par des microorganismes modifiés, des molécules en milieux artificiels et contrôlés selon une technologie perfectionnée, mais c'en est une autre de réussir une culture végétale, car les systèmes de production agricole font partie intégrante du tissu social, économique, politique et technologique. On ne peut donc analyser la problématique des biotechnologies appliquées à l'agriculture sans considérer l'ensemble des filières de production.

Ainsi, en Afrique, la tâche des sélectionneurs de mil est rendue difficile parce que les qualités exigées par les paysans diffèrent d'un village à l'autre. La recherche peut développer des variétés de sorgho plus productives, mais si les nouvelles variétés exigent un temps de cuisson accru dans des régions où la corvée de bois prend un temps considérable, elles ne seront pas cultivées. Il paraît donc intéressant de faire l'inventaire des biotechnologies appliquées à l'agriculture, et de rechercher quels en sont les applications dans le contexte particuliers des PVD.

Plusieurs niveaux doivent être distingués en l'occurrence. Certaines méthodes dites « biotechnologiques » relèvent d'un savoir-faire traditionnel ou ont été mises en œuvre et transférées depuis près d'un demi-siècle : les pratiques culturales associant maïs et légumineuses en Amérique du Sud, la fertilisation des rizières par les cyanobactéries fixatrices d'azote associées à une fougère (l'*Azolla*), l'utilisation de *Rhizobium* pour enrober les graines de légumineuses. Ces pratiques sont largement répandues dans les régions tropicales ou subtropicales (PHAM, 1982).

La production de matériel sain

L'assainissement virologique des clones pour les cultures à propagation végétative constitue une des retombées les plus anciennes des cultures de tissus végétaux.

Dans un premier temps, la seule thérapie fut utilisée en vue de l'assainissement. Au début des années 60, on découvrit que le développement *in vitro*, sur un milieu adéquat, d'un dôme méristématique prélevé au niveau d'un bourgeon terminal d'une plante infectée par des virus ou des microorganismes, pouvait donner une plante assainie (KARTHA, 1986).

Ces techniques sont utilisées pour curer des espèces comme la patate douce, le manioc, la pomme de terre, de leurs différents agents pathogènes, dont certains sont d'extension récente via l'importation de nouvelles variétés.

La production de matériel exempt de viroïdes pose un problème particulier à cet égard, car la culture de méristèmes, combinée ou non à la thermothérapie, s'est avérée inefficace en la matière, les viroïdes étant abondamment représentés dans les tissus méristématiques et étant favorisés par les températures élevées. Cependant, le prélèvement d'apex méristématiques sur des plantes infectées de viroïdes, après une séjour à 5°C pendant plusieurs mois, permet d'obtenir du matériel assaini.

Après la phase d'assainissement, les clones sont multipliés en milieu contrôlé, soit par les voies traditionnelles, soit en faisant appel à une étape intermédiaire de propagation rapide sous forme de microplantules ou de microtubercules.

Comme de nombreux laboratoires locaux des pays en développement disposent des capacités techniques nécessaires, la mise en œuvre des filières de production de plants assainis pourrait permettre une économie de devises servant actuellement à l'importation des plants certifiés.

L'impact économique de l'assainissement phytosanitaire dépend des pertes directes occasionnées par l'agent pathogène éliminé, des interactions entre celui-ci et d'autres agents présents dans l'environnement naturel (les pommes de terre infectées par le virus X sont plus sensibles à *Verticillium dahliae*), des effets secondaires de l'éradication sur la physiologie de l'hôte, ainsi que de la réinfection des plantes assainies lorsqu'elles sont placées au champ. D'éventuels effets de protection croisée doivent également être pris en compte : des plantes infectées par des souches virales peu ou pas pathogènes peuvent être protégées contre la surinfection par des souches plus pathogènes apparentées. Les plantes assainies pourraient dès lors être infectées au champ par des agents ne s'exprimant pas chez les plantes infectées d'origine ; c'est ainsi qu'au Japon, le développement brutal des mosaïques virales chez la pomme de terre coïncide avec l'élimination du virus X.

Dès lors, les paramètres épidémiologiques de la réinfection des plantes assainies sont importants à considérer pour évaluer le bénéfice de l'assainisse-

ment. On tiendra compte du caractère annuel ou pérenne de la culture, de la nature des vecteurs et de la dynamique de leur population, des mesures de protection mises en œuvre (coût des interventions phytosanitaires, culturales ou chimiques), ainsi que des caractéristiques des souches de l'agent pathogène susceptibles de réinfecter le matériel assaini (EBBELS, 1988).

Dans un pays comme la Grande-Bretagne, la pratique de l'assainissement est analysée comme le serait un autre intrant et sa rentabilité dépendra de la productivité des étapes d'aval. Au sein de la Communauté Européenne, il s'agit par ailleurs moins d'une révolution technologique que d'une évolution dans la continuité. La législation en vigueur y définit les qualités sanitaires auxquelles doivent satisfaire les plants de base et les plants certifiés, précise les règles techniques de leur production, permet la délivrance de certificats phytosanitaires par les services officiels. La multiplication clonale par culture de tissus est venue dès lors se greffer sur les filières préexistantes bien établies.

Le coût élevé de la micropropagation *in vitro* chez la pomme de terre exclut que les microtubercules puissent remplacer entièrement la filière classique de multiplication et couvrir la demande en semences pour les champs de production. L'opération possède une rentabilité économique adéquate parce qu'elle s'intègre dans une filière existante dans le cadre d'une agriculture intensive permettant aux plantes assainies d'exprimer pleinement leur potentiel de production. Par ailleurs, une filière de multiplication au champ, organisée dans un cadre légal de production est motivante, puisque le respect des règles de protection est sanctionné par la délivrance d'un certificat qui entraîne une plus value de la production. Le rapport coût/bénéfice de l'opération sera donc apprécié dans chaque situation concrète sur base des capacités de prise en charge des intrants et de l'état des filières de valorisation des produits. Si la filière d'aval fait défaut, la rentabilité de l'opération risque d'être compromise, même si la maîtrise des étapes de micropropagation *in vitro* est assurée.

Patate douce en Chine

Dans certains cas, les niveaux de productivité des cultures traditionnelles sont insuffisants pour rentabiliser les filières d'assainissement et de multiplication. Cette situation prévalait autrefois dans les cultures de patate douce de la région de Guangdong (Chine).

La patate douce y était cultivée pour l'alimentation humaine et animale. La consommation humaine intérieure tend actuellement à diminuer, suite aux

modifications des exigences alimentaires, mais représente encore 30% de la production.

Les variétés chinoises traditionnelles de patates douces, bien qu'étant virosées, ne montrent pas de symptôme au champ. La sélection avait été délibérément dirigée vers l'obtention de variétés tolérantes. Bien que consommant peu d'intrants (pas d'engrais minéraux, aucune protection phytosanitaire), une telle culture donne des rendements élevés : la production moyenne est de 18-20 t/ha tandis que dans les conditions de culture plus intensive, elle s'élève à 75 t/ha, pour atteindre 135 t/ha en stations expérimentales.

Dans ce contexte, les responsables chinois excluaient un assainissement virologique qui leur paraissait non rentable ou même potentiellement dangereux. L'intensification de la culture, actuellement en voie de réalisation, modifie complètement les données du problème et permet d'envisager de supporter le coût d'une filière de production de plants sains, sous le couvert d'une protection phytosanitaire adéquate.

Les variétés performantes de patate douce (sur le plan du rendement ou de la qualité) introduites à partir des Philippines ou de Taïwan, sont appelées à remplacer les variétés traditionnelles. Ces nouvelles variétés se montrent toutefois très sensibles aux viroses : dans les essais comparatifs réalisés dans les parcelles de l'Institut de la Patate douce à Guangdong, les plantes présentent d'importants symptômes viraux (éclaircissement des nervures, taches chlorotiques, gaufrage du limbe). On rencontre également de nombreuses plantes infectées dans la collection des clones sauvages ou cultivés, introduits des USA, d'Afrique ou d'Asie. Les scientifiques locaux ignorent encore l'identité du (des) virus présent(s), leur épidémiologie, la nature de leurs vecteurs entomologiques et leur incidence sur le rendement. Des aleurodes sont visibles dans les champs de production mais on n'y observe pas de pucerons.

Depuis environ deux ans, un petit laboratoire de culture *in vitro* permettant de réaliser des cultures de méristèmes et d'assurer une micropropagation *in vitro* des principaux clones de patate douce est fonctionnel à Guangdong. Ce laboratoire est équipé de matériel chinois, les flux laminaires étant fabriqués à Shanghai.

Parallèlement, le Laboratoire de Pathologie végétale de la Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique) développe des recherches en vue de l'identification des virus en cause et de la mise au point des techniques de diagnostic utilisables en Chine.

Palmier à huile

Le palmier à huile (*Elaeis guineensis*), cultivé en Côte-d'Ivoire, présente un rendement élevé : on obtient couramment 4 à 5 t d'huile/ha dans les régions écologiquement et climatiquement favorables, tandis que les variétés sélectionnées peuvent atteindre de 6 à 7 t/ha. Les pieds sont exploités pendant 25 ans (soit 30 ans après la germination, eu égard à l'existence d'une phase juvénile de 5 ans) ; ensuite l'exploitation n'est plus rentable, car l'arbre a dépassé la hauteur qui permet la récolte avec un outil emmanché.

Les schémas de sélection actuellement pratiqués par l'IRHO en Côte-d'Ivoire visent à exploiter un effet d'hétérosis en croisant des arbres d'origine non apparentées ayant les caractéristiques favorables complémentaires (rendement, fluidité de l'huile, faible croissance en hauteur, résistance aux maladies).

La descendance des croisements entre individus hétérozygotes présente cependant une variabilité importante. La vulgarisation des clones obtenus à partir des meilleurs génotypes présenterait en l'occurrence un intérêt évident et le clonage par voie asexuée des individus performants issus de tels croisements permettrait la vulgarisation des clones avec 15 ans d'avance sur un matériel de même performance, obtenu exclusivement par voie sexuée.

Dès 1970, l'IRHO s'est associé à l'ORSTOM pour mettre au point une technique de multiplication végétative du palmier à huile par culture *in vitro*. Comme cette espèce ne possède qu'un seul bourgeon végétatif (l'apex), on ne peut utiliser les techniques classiques telles que le bouturage, le greffage ou le marcottage pour sa propagation.

La culture *in vitro* de palmier à huile en Côte-d'Ivoire pose des problèmes d'ordre technique : le laboratoire pilote de la Station de La Mé a dû être organisé pour prendre en compte les risques de contamination spécifiques des régions tropicales humides, plus importants que sous un climat tempéré.

Actuellement, 40 clones/an sont propagés en culture *in vitro* avec une production annuelle de 50.000 vitroplants.

La conformité des plants produits par embryogenèse somatique est de grande importance chez le palmier, mais longue à tester s'agissant d'une plante pérenne.

Les explants initiaux sont constitués de fragments de jeunes feuilles prélevées avant leur déhiscence. Ce matériel ne nécessite pas une désinfection poussée et est particulièrement abondant, puisqu'on peut prélever 2000 explants sur un arbre sans affecter la survie de celui-ci. Les cals primaires

apparaissent sur les vaisseaux des explants 2-3 mois après leur dépôt sur milieu contenant de l'auxine. Les cals sont repiqués, ils donnent après 2 mois des embryoides sur des milieux contenant de l'auxine, une cytokinine et du charbon actif qui évoluent après 4 mois en plantules, lesquelles sont transférées en pépinière avec un taux de reprise de près de 90%.

Les premiers plants de palmier à huile produits par une autre technique d'embryogenèse, mise au point par la Société Unilever, ont présenté des taux importants de variations somaclonales. Les résultats obtenus actuellement par l'IRHO semblent plus favorables ; sur près de 70 clones observés, 50 ont été multipliés de manière conforme via l'embryogenèse. Chez les 20 autres clones, on observe un petit nombre d'individus présentant soit des modifications permanentes (irréversibles et héréditaires) soit des modifications transitoires. Ce matériel est actuellement observé au champ.

Le prix de vente des vitroplants est estimé entre 5 à 10 fois celui des semences, mais ce surcoût est couvert en 3 ans par une amélioration de 20% de la production en conditions écologiques moyennes.

Le procédé de multiplication ORSTOM-IRHO a été breveté dans plusieurs pays ; toutefois cette protection semble illusoire à cause des nombreuses variantes que l'on peut apporter à la technique. Le maintien d'une avance technologique offre de meilleures garanties en la matière, elle postule que les recherches soient poursuivies afin de conserver en permanence l'avantage acquis au départ.

En ce qui concerne la vulgarisation du procédé, l'ORSTOM s'est trouvé face à la concurrence d'Unilever. La politique adoptée par cette société en Malaisie et en Grande-Bretagne consiste à garder l'exclusivité de la production dans les laboratoires qu'elle contrôle. L'ORSTOM et l'IRHO, pour leur part, ont recherché des accords avec les milieux professionnels prévoyant un transfert de savoir-faire avec clauses d'exclusivité et de secret, compensées par une redevance sur les plantules produites par le procédé. Chaque utilisateur reste propriétaire de ses clones et peut négocier leur utilisation.

Un accord a été conclu entre l'ORSTOM et la «Federal Land Development Authority» de Malaisie, Société d'État regroupant 350.000 ha de plantations de palmier à huile appartenant à près de 80.000 planteurs. Une unité de production avec une capacité annuelle de 10 millions de plantes, a été créée à Kuala Lumpur. Une autre unité est opérationnelle depuis 1983 en Indonésie, tandis que des accords similaires ont été négociés en Amérique du Sud et en Extrême Orient (LIJORET, 1982).

La conservation des collections végétales

La micropropagation est bien adaptée au maintien ou à la constitution de collections d'espèces végétales traditionnellement multipliées par voie végétative.

La totalité de la collection mondiale des génotypes de pomme de terre et espèces voisines a été mise en culture *in vitro* par le «Centro Internacional de la papa» (CIP). Le manioc, la patate douce, l'igname sont traités de la même façon par l'IITA et le CIP. L'IITA a mis au point une technique de microtubérisation de l'igname qui est utilisée dans les échanges internationaux. Une technique de micropropagation est également utilisée par l'INIBAP pour les échanges internationaux de clones de bananier, les pays occidentaux (France, Belgique) servant en l'occurrence de centre de transit phytosanitaire. La constitution de ces centres de conservation des germoplasmes est particulièrement importante, car les variétés à fort rendement remplacent de plus en plus les variétés traditionnelles, ce qui risque d'entraîner une perte irréversible des ressources génétiques disponibles.

A Guangdong, près de 700 clones d'*Ipomoea batatas* sont conservés, parmi lesquels 500 ont déjà été évalués pour leurs qualités agronomiques. La conservation s'effectue classiquement au champ par bouturages successifs (3/an) tandis que les racines tubéreuses sont également conservées pour se prémunir contre les accidents culturels qui peuvent survenir au champ. On observe cependant des variations génétiques chez les plantes issues de racines tubéreuses ce qui requiert un contrôle particulièrement soigné. L'entretien d'une telle collection sous sa forme traditionnelle exige beaucoup de travail et les responsables chinois envisagent le recours aux techniques de culture *in vitro* pour en poursuivre la réalisation.

L'apport des cultures de tissus en amélioration des plantes

L'accroissement du rendement des cultures au cours des trente dernières années a été obtenu d'une part grâce à l'évolution des techniques culturales (utilisation des engrais, protection phytosanitaire) et, d'autre part, aux progrès de la génétique et de l'amélioration des plantes (KNOPF, 1986).

Dans le contexte d'une agriculture de subsistance, les variétés résistantes aux agents pathogènes constituent souvent le moyen de lutte le plus adéquat pour régulariser la production.

Les variétés actuellement sur le marché représentent l'aboutissement de travaux d'amélioration conduits par les sélectionneurs depuis un siècle. Les

progrès les plus visibles se rapportent à l'accroissement du potentiel de production, à la qualité supérieure des produits (en vue de répondre aux exigences des utilisateurs) et à une plus grande résistance aux facteurs de stress (BUDDENHAGEN, 1983). Les méthodes classiques de l'amélioration végétale se sont appuyées essentiellement sur la variabilité génétique engendrée par l'hybridation. Les programmes d'hybridation sont traditionnellement suivis par la mise en œuvre d'une phase de sélection au champ des plantes présentant les caractères désirés. Cette méthode dite «classique» est à l'origine du développement de nombreuses variétés de plantes cultivées.

Malgré son efficacité, elle présente des défauts, en particulier la longueur du processus (une variété de blé n'est commercialisée qu'après 8 à 10 ans de sélection), tandis que la reproduction sexuée impose des barrières dans le choix du matériel, eu égard aux cas d'incompatibilité qui limitent les possibilités de croisement.

Les développements récents des cultures de tissus et de la biologie moléculaire permettent de lever ces obstacles et d'ouvrir de nouvelles perspectives dans la création d'une variabilité génétique somaclonale. Les résultats obtenus à ce jour mettent clairement en évidence la puissance de la variation somaclonale. Les caractéristiques des nouvelles lignées sont proches de la variété parentale, ce qui permet de conserver les principales qualités agronomiques du génotype d'origine (rusticité, adaptation aux conditions pédologiques, climatiques, locales) tout en améliorant des défauts, notamment la sensibilité aux maladies.

Les techniques de culture d'haploïdes par androgenèse ou gymogenèse peuvent accélérer l'étape de sélection et de stabilisation ; elles postulent une maîtrise délicate de la mise en cultures d'anthers, de la callogenèse et de la régénération des cals haploïdes.

Enfin, l'insertion et l'expression de gènes déterminés dans un génome de plante constituent l'une des retombées importantes de l'ingénierie génétique. Dans le domaine particulier de la production végétale, cette méthodologie s'est avérée fructueuse pour intégrer des caractères de résistance aux insectes phytophages et aux virus.

Conclusions

L'expression «révolution verte» a été utilisée pour désigner l'ensemble des efforts mis en œuvre dans les années soixante pour accroître la production agricole dans les pays en développement surtout pour ce qui concerne le blé et le riz.

La «seconde révolution» actuellement en cours se fonde sur les biotechnologies. A cet égard, les pays en développement n'ont pas les mêmes intérêts ni les mêmes besoins que les pays industrialisés. Certes, il existe une unité de la science. Mais le simple transfert des technologies qu'elle génère ne serait pas adéquat : les exemples illustrés ont montré que ce qui est un avantage pour l'un pourrait être un inconvénient pour l'autre, s'il n'était assorti de mécanismes d'adaptation prenant en compte les contingences locales.

Ces considérations nous amènent à formuler trois réflexions :

1. La première réflexion, qui n'est pas propre au PVD amène à constater que la biologie et la technologie ne peuvent résoudre des problèmes politiques ou sociaux. Si la science et la technique proposent, l'organisation économique et sociale dispose.
2. Si la première révolution verte visait à représenter un ensemble d'opérations mises en œuvre par le secteur public, la seconde «révolution biotechnologique» est en grande partie assurée par le secteur privé. Dès lors, les résultats de la recherche n'appartiennent plus au patrimoine commun et ne sont plus accessibles librement. Ceci concerne tant les germoplasmes, que les lignées végétales aux propriétés spécifiques, ainsi que les innovations techniques. Les Universités et Centres publics de recherche des pays industrialisés n'ont plus le monopole de la conception et de la recherche de pointe. Dans les PVD, l'absence de laboratoires opérationnels ne fera encore qu'accroître le fossé technologique entre le Nord et le Sud.

Les exemples présentés au cours de cet exposé montrent que de petites unités performantes peuvent se mettre en place dans les PVD. Mais, eu égard aux difficultés de la matière traitée, on ne s'étonnera pas de la nécessité d'une collaboration internationale pour les résoudre. Dans le cas de la multiplication du palmier à huile, par exemple, on peut penser que les scientifiques Ivoiriens seront rapidement à même de poursuivre les recherches en cours sous l'égide de l'ORSTOM.

3. Lors d'un Symposium sur la biotechnologie dans le Tiers-Monde, qui s'est tenu aux Pays-Bas en 1982, le problème de la formation en biotechnologie à l'intention des ressortissants du Tiers-Monde a été longuement examiné, en raison du déséquilibre très important entre le nombre de chercheurs en biotechnologie entre pays industrialisés et pays en développement (pour 23.000 chercheurs comptabilisés aux États-Unis en 1985, on en comptait 1.900 en Amérique Latine et 400 en Afrique).

Bien que ne disposant pas de données actualisées à cet égard, ce problème reste d'actualité et préoccupant. Si l'on n'y prend garde, la biotechnologie peut

contribuer à renforcer la dépendance technique des pays en voie de développement vis-à-vis des pays industrialisés.

Pour pallier cette carence, des programmes de formation spécifique en biotechnologie destinés à des scientifiques du Tiers-Monde devraient être développés sous des formes appropriées, allant de sessions de 2 ou 3 mois pour acquérir les notions de base jusqu'à des stages d'un an ou plus pour participer personnellement à un projet de recherche-développement.

RÉFÉRENCES

- BUDDENHAGEN, I. W. (1983). Breeding strategies for stress and disease resistance in developing countries. *Ann. Rev. Phytopathol.* **21** : 385-409.
- EBBELS, D. L. (1988). The costs and benefits of seed potato classification. In : Control of plant disease : costs and benefits. B. C. Clifford and E. Lester (Eds). Blackwell Scientific Publications, pp. 115-122.
- KARTHA, K. K. (1986). Production and indexing of disease free plants. In : Plant tissue culture and its agricultural applications. L. Withers and P. Alderson (Eds) ; Butterworths, London, pp. 219-238.
- KNOPF, U. C. (1986). Le génie génétique au service de la production des plantes cultivées. *Revue Suisse Agric.* **18** (1) : 26-36.
- LIORET, C. (1982). Des palmiers éprouvée par millions. *La Recherche* **135**, 926-928.
- PHAM, K. (1922). L'Azolla pinnata, plante miracle des rizières du Viet-nam. *Biofutur* **1** : 11-13.
- SCRIBAN, R. (1988). Biotechnologie. Lavoisier Technique et Documentation. Paris, 506 pp.