

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département des ressources forestières



MÉMOIRE

Présenté par

M^{elle} Djali Moufida

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER En Foresterie
Option : Écologie, Gestion et Conservation de la Biodiversité

Thème

**Rôle des biotechnologies dans la conservation des ressources
phytogénétiques**

Soutenu en Juin 2021, devant le jury composé de :

Président	M. BENSENANE Bachir	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur	M. BENMAHIOUL Benamar	Prof	Université de Tlemcen
Examineur	M. KHOLKHAL Djamel	MAA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2020/2021

Dédicace

A mon très cher papa...aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur tout l'amour, le respect, l'attachement et la reconnaissance que je te porte. Tu m'as enseigné la droiture, le respect et la conscience du devoir. Puisse Dieu, le tout puissant, te procurer santé, bonheur et longue vie...

A ma très chère maman...a la plus merveilleuse des mères, j'espère réaliser, en ce jour, l'un de tes rêves...aucun mot ne saurait exprimer mon respect ma considération et l'amour que je te porte...puisse Dieu, le tout puissant, te donner santé, bonheur et longue vie...

A mes frères ; Wissem Tayeb et Mahfodh, et a toute la famille Djali et Bouhcida

A mon encadreur Mr. Benmahioul Benamar Je prie Allah, tout puissant de lui donner longue vie, santé et bonheur.

A mes chères amies ; Sihem, Amira, Amel, Fatima, Ahlem, Ilhem, Chayma et Imen

A tous ceux qui me sont chers, sans oublier toutes les connaissances et tous les tous les condisciples de mes collègues.

Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier ALLAH le tout puissant qui m'a donné le courage, la volonté et la patience jusqu'à la fin de réaliser ce modeste mémoire de
Master

Ma première gratitude s'adresse au professeur BENMAHIOUL Benamar, Professeur au département des Ressources Forestières de l'Université de Tlemcen c'est sous sa direction que ce travail a été reconnaissance pour ses encouragement, ses conseils, ses recommandations, le temps qu'il m'a consacré et sa
bienveillance.

Mes vifs remerciements à **Mr. Bensenene Bachir** de l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de faire partie du jury.

J'adresse ma gratitude également à **Mr. Kholkhal Djamel**, Maître assistant classe A au département des Ressources Forestières de l'Université de Tlemcen d'avoir
accepté de faire partie du jury.

Mes sincères remerciements sont adressés également à tous les enseignants du département des Ressources Forestières de l'Université Abou Bakr Belkaid –
Tlemcen, qui ont contribué à ma formation.

Un très grand merci à mes chers parents, à mes chers frères, mes sœurs, mes voisins, à tous mes amis et collègues de l'Université de Tlemcen pour leurs
soutiens et leurs encouragements.

En fin, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

المخلص

إن حماية التنوع البيولوجي أمر مهم لضمان استمرارية الموارد الوراثية النباتية وقدرتها على الصمود واستدامتها والتكنولوجيا الأحيائية أداة قوية ليس فقط لتحسين إنتاجية الأنواع النباتية ولكن أيضا لتحسين نظمها الدفاعية ضد مسببات الأمراض ومقاومتها للعوامل المناخية الصعبة.

سنحاول أن نقدم في مذكرة الماستر هذه، التطبيقات المختلفة للتكنولوجيا الحيوية النباتية والفوائد التي يمكن أن نستمدتها من استخدام هذه التقنيات خاصة لحماية الأنظمة الإيكولوجية الهشة والحفاظ على التراث الوراثي.

الكلمات المفتاحية : التكنولوجيا الحيوية النباتية، الموارد الوراثية النباتية، التنوع البيولوجي، التراث الوراثي، الزراعة في المختبر ، الحفظ في الموقع وخارج الموقع، الحفظ بالتبريد

Résumé

Rôle des biotechnologiques dans la conservation des ressources phytogénétiques

Il est important de sauvegarder la biodiversité pour pouvoir assurer la viabilité, la résilience et la durabilité des ressources phytogénétiques.

Les biotechnologies constituent un outil puissant non seulement pour améliorer la productivité des espèces végétales mais également pour améliorer leurs

systèmes de défense contre les agents pathogènes et leur résistance contre les facteurs climatiques défavorables.

Nous tenterons de présenter dans ce mémoire de Master, les différentes applications de la biotechnologie végétale et les bénéfices que nous pouvons tirer de l'utilisation de ces techniques particulièrement pour la protection des écosystèmes fragiles et la préservation du patrimoine génétique.

Mots clés : Biotechnologie végétale, ressources phytogénétiques, Biodiversité, Patrimoine génétique, cultures *in vitro*, conservations *in situ* et *ex situ*, Cryoconservation.

Abstract

Role of biotechnology in the conservation of plant genetic resources

It is important to safeguard biodiversity to ensure the viability, resilience, and sustainability of plant genetic resources.

Biotechnologies are a powerful tool not only for improving the productivity of plant species but also for improving their defense systems against pathogens and their resistance to unfavorable climatic factors.

In this Master's thesis, we will attempt to present the various applications of plant biotechnology and the benefits that we can derive from the use of these techniques, particularly for the protection of fragile ecosystems and the preservation of genetic heritage.

Keywords: Plant biotechnology, Plant genetic resources, Biodiversity, Genetic heritage, *in vitro* cultures, *in situ* and *ex situ* conservation, Cryoconservation.

Liste des abréviations

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- FAO : Food and Agriculture organization, Organization des nations unis pour l'Alimentation et l'Agriculture
- OGM : Organisme Génétiquement Modifié
- CBD : Convention o Biological Diversity, convention sur la diversité biologique
- AGM : Arbres Génétiquement Modifiés
- PGM : Plante Génétiquement Modifié
- UNEP : United Nations Environment Programme, Programme des Nations Unis pour l'Environnement
- IPGRI : International Plant Genetic Ressources Institute, l'Institut International des Ressources Phytogénétique
- UICN : Union International pour la Conservation de la Nature
- WWF : World Wide Fund for nature (Fond Mondial pour la nature)
- BGCS : Botanic Gardin Conservation Strategy, Strategie de Conservation des Jardin Botaniques
- ES : Embryogénèse somatique
- GM : Génétiquement modifié
- MAS : Sélection Assisté par Marqueur
- m/an : Mètre par an
- ILSI : International Life Science Institute, Institut International de Science de la Vie
- IgE : Immunoglobuline E
- pH : Potentiel Hydrogène
- °C : Degré Celsius
- % : Pourcentage
- INRA : Institut National de Recherche Agronomique
- XXIe : 21^{ème}

Liste des tableaux

Tableau 1. Les cinq premiers groupes semenciers mondiaux relatifs aux biotechnologies en 1999	9
Tableau 2. Surface des principales cultures transgéniques et non transgéniques dans le monde (en million d'hectare)	9
Tableau 3. Les sessions de la commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture de FAO	12
Tableau 4. Hypothèses émises pour retarder la résistance des insectes (Debuissy et Clément, 2002)	34
Tableau 5. Les risques des OGM (Debuissy et Clément, 2002)	35

Liste des figures

Figure 1. Les étapes de la technique de culture <i>in vitro</i> .	5
Figure 2. La technique de cryoconservation	20
Figure 3. Enracinement ex vitro et acclimation des microplants de <i>Pistacia vera L.</i> (Benmahioul, 2009)	1
Figure 4. Les étapes de la micropropagation (Aryal, 2019)	26
Figure 5. Techniques de production d'arbres améliorés (Tremblay et al., 2011)	29

Résumé	I
Liste des abréviations	III
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	IV
Introduction générale	1
Chapitre1. Les biotechnologies végétales : définition, historique et applications	3
1.1 . Qu’entendons-nous par biotechnologies vertes ?	3
1.2 Aperçu historique de la biotechnologie végétale	3
1.3 . Principales applications de la biotechnologie végétale	4
1.3.1 . Applications en agriculture	4
1.3.2 Application en foresterie	6
1.3.3 Application en horticulture	7
1.3.4 Autres applications	8
Chapitre2 . Les biotechnologies végétales et la conservation des ressources phylogénétiques	10
2.1 Les ressources phylogénétiques	10
2.2 Gestion et conservation des ressources phylogénétiques	12
2.2.1 Conservation <i>in situ</i>	13
2.2.2 Conservation <i>ex situ</i>	15
2.3. Les biotechnologies végétales au service de la biodiversité	19
2.3 . La cryoconservation	20
Chapitre3. Les Biotechnologies végétales appliquées aux ligneux	22
3.1 Les méthodes de propagation végétative <i>in vitro</i>	22
3.1.1 Micropropagation	23
3.1.2 . Cryoconservation et stockage <i>in vitro</i>	26
3.1.3 . La sélection <i>in vitro</i> .	27
3.2 Les arbres génétiquement modifiés (AGM)	27
3.3 . Les génétiques moléculaires	29

chapitre4 Enjeux entourant l'utilisation des biotechnologies végétales	31
4.1 Des risques sanitaires croissants	31
4.2 La résistance aux herbicides	32
4.3 Résistance aux insectes et aux agents pathogènes	33
Conclusion générale et recommandations	36
Références bibliographiques	38

Introduction générale

L'homme a domestiqué les plantes et a toujours œuvré pour les rendre indépendantes des contraintes naturelles, il n'a cessé de les améliorer pour en tirer au mieux son profit (Serghini, 2006). Les scientifiques ont très vite compris qu'il serait intéressant de pouvoir intervenir pour en modifier tel ou tel élément (Conseil économique et social, 1999). Dans l'amélioration continue des plantes, les biotechnologies jouent un rôle central, elles ont permis, entre autre de franchir les barrières génétiques et mieux exploiter les ressources végétales (Serghini, 2006).

La population mondiale augmente et les besoins alimentaires augmentent avec elle, ce qui oblige les scientifiques de trouver des nouvelles méthodes qui assurent non seulement la sécurité alimentaire mais également la protection des biens écologiques et la conservation de la biodiversité.

Il apparaît clairement que les biotechnologies peuvent contribuer à relever ces défis. Elles peuvent surmonter les problèmes de production difficiles ou réfractaires aux méthodes classiques de sélection. Elles peuvent accélérer les programmes de sélection classiques et fournir aux agriculteurs du matériel végétal exempt de maladies.

Les biotechnologies peuvent créer de nouvelles variétés résistantes aux ravageurs et aux maladies, éliminer le recours aux produits chimiques toxiques pour l'environnement et la santé humaine et fournir des outils de diagnostic et des vaccins pouvant contribuer à lutter contre des maladies animales dévastatrices. Elles peuvent aussi améliorer la qualité nutritionnelle de produits alimentaires de base et créer de nouveaux produits destinés aux utilisations industrielles et sanitaires (FAO, 2004).

Grâce aux biotechnologies végétales, les chercheurs disposent de divers outils pour comprendre et manipuler les caractères génétiques d'organismes utilisés en agriculture: plantes cultivées, animaux d'élevage, ressources forestières et halieutiques. Elles sont beaucoup plus vastes que le génie génétique,

puisqu'elles englobent la génomique et la bioinformatique, la sélection assistée par des marqueurs, la micropropagation, la culture de tissus, le clonage, l'insémination artificielle, le transfert d'embryons notamment.

Sous les effets conjugués de l'exploitation incontrôlée des ressources phylogénétiques et des contraintes naturelles, on assiste à une régression alarmante et à une érosion génétique de ces ressources. Les biotechnologies peuvent jouer un rôle capital dans la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité.

Dans ce modeste mémoire, nous présentons une synthèse bibliographique sur le rôle des biotechnologies végétales dans l'amélioration génétique des plantes et la conservation des ressources phylogénétiques.

Le manuscrit est structuré en quatre chapitres : Le premier donne une définition des biotechnologies végétales, leur historique et leurs applications. Le second chapitre décrit comment les biotechnologies interviennent dans la préservation de la biodiversité. Les Biotechnologies végétales appliquées aux ligneux et les enjeux entourant l'utilisation des biotechnologies végétales sont résumés respectivement dans le troisième et le quatrième chapitre. Le mémoire se termine par une conclusion générale et des recommandation

chapitre1. Les biotechnologies végétales : définition, historique et applications

1.1 . Qu’entendons-nous par biotechnologies vertes ?

On entend généralement par biotechnologie « toute application technologique qui utilise des systèmes biologiques, des organismes vivants ou des dérivés de ceux-ci pour réaliser ou modifier des produits ou des procédés à usage spécifique » (FAO, 1993). Elle se définit aussi comme “toute technique qui utilise des organismes vivants afin de constituer ou de transformer un produit, d'améliorer des plantes ou des animaux, ou encore de faire la synthèse de micro-organismes en vue d'utilisations spécifiques”. Elles couvrent diverses technologies telles que la manipulation et le transfert de gènes, le typage de l'ADN et le clonage de gènes végétaux et animaux (le conseiller pour et la technologie, 2006).

Les biotechnologies représentent une composante potentiellement importante de croissance pour l'agriculture, l'industrie, le secteur de la santé publique ainsi que des ressources énergétiques des pays en développement (Sasson, 1988). Elles apparaissent comme des technologies de pointe exploitant de processus cellulaires ou moléculaires par créer des produits et des services. La transgénèse consiste à transférer une partie du patrimoine génétique d'un organisme à un organisme d'une espèce différente. Le caractère universel du code génétique facilite de tels transferts (Léveque et Mounolou, 2008).

Dans le cadre de l'amélioration des plantes, les biotechnologies constituent une forme consciente de la sélection génétique opérée par la Nature et une forme avancée de la sélection végétale opérée par l'Homme depuis les débuts de l'agriculture.

La biotechnologie végétale est l'ensemble de pratiques faisant appel aux cultures *in vitro* de plantes et/ou aux techniques de biologie moléculaire dans les domaines de l'agronomie, l'industrie et la recherche fondamentale.

1.2 . Aperçu historique de la biotechnologie végétale

Même si le terme a été fondé en 1913 par Ereky, les biotechnologies prises dans le sens de l'utilisation de la matière vivante pour la production de biens et de services, ne datent pas de cette époque. Hormis la dimension de "contrôle" qui est récente, les biotechnologies sont beaucoup plus anciennes et datent des débuts de l'humanité avec la fabrication du pain, des fromages et de boissons alcoolisées (Coutouly, 2008).

L'essor de la biologie moléculaire, symbolisé par la découverte de la double hélice de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en 1953, et celui des biotechnologies qui l'a suivi, date de moins d'un demi-siècle.

D'après Hberlandt (1854-1945), l'historique de la biotechnologie végétale est :

- ✓ 1952 : microbouturage
- ✓ 1952 : Sauvetage d'embryons de Dahlia virosés
- ✓ 1953 : cal haploïde à partir de pollen
- ✓ 1954 : cal à partir d'une cellule unique (Muir)
- ✓ 1955 : Identification de la kinétine (une cytokinine)
- ✓ 1957 : Skoog et Miller établissent le cadre théorique de l'influence de la balance hormonale auxine/cytokinine sur l'organogenèse
- ✓ 1958 : embryogenèse somatique
- ✓ 1967 : Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir de cultures d'étamines (Bourgin & Nitsch)
- ✓ 1984 : Régénération de tissus transformés exprimant un gène de résistance à un antibiotique (Horsch et al. (Monsanto) dans le journal SCIENCE, quasi-simultanément aux travaux de De Block et al. (Université de Gent) dans EMBO)
- ✓ 1994 : Premier OGM végétal commercialisé : La variété de tomates Flavr Savr inventée et commercialisée par la société CALGENE (échec commercial)

1.3 . Principales applications de la biotechnologie végétale

Deux domaines dominant aujourd'hui le champ des biotechnologies appliquées : celui de la santé humaine d'une part, celui de l'agriculture et de l'élevage d'autre part. Ils ne sont pas les seuls : les biotechnologies sont mises en œuvre pour la production de certaines substances destinées à l'industrie chimique ou à l'industrie alimentaire ; et, parmi les domaines d'avenir, leur contribution à la protection de l'environnement, notamment à la « bioremédiation » et au traitement des déchets, s'avère dès maintenant prometteuse (conseil économique et social, 1999).

D'après Scrune (1988), la biotechnologie végétale connaît dès à présent plusieurs types d'applications :

- ✓ 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.

Nous citons ci-dessous les grandes applications des biotechnologies végétales :

1.3.1 . Applications en agriculture

L'intégration de la biotechnologie dans le domaine de l'agriculture permet de mieux utiliser des ressources limitées, d'augmenter la production et de réduire l'utilisation de pesticides et d'insecticides sur les cultures. La biotechnologie agricole est un domaine des sciences agricoles qui utilise des outils de biologie cellulaire et moléculaire pour améliorer la constitution génétique et la gestion agronomique des cultures et des animaux.

Les deux principaux axes d'application des biotechnologies modernes à l'agriculture concernent la multiplication et la sélection des plantes et la création de nouvelles variétés de plantes.

a) - La multiplication et la sélection des plantes

Le facteur temps constitue une limitation importante pour le travail des sélectionneurs. Il faut en effet de cinq à quinze ans selon les espèces pour qu'une variété nouvelle soit mise sur le marché. Durée pouvant encore être plus importante pour les plantes ligneuses. Une des préoccupations essentielles du sélectionneur est donc de raccourcir la durée des cycles de sélection et de diminuer le temps nécessaire à la fixation et à la multiplication des géotypes intéressants.

Les techniques de multiplication végétatives *in vitro* mise au point pour les pommes de terre et les orchidées ont été généralisées à de nombreuses espèces d'intérêt horticole et agricole : elles permettent d'accroître d'une manière considérable le taux de multiplication par unité de temps et donc diminuer les coûts de production.

La technique d'haplodiploïdisation utilisée dans les programmes de sélection permettent de fixer très rapidement des lignées (parents d'hybride) alors qu'il faut par les méthodes classique sept à huit générations pour obtenir ce résultat.

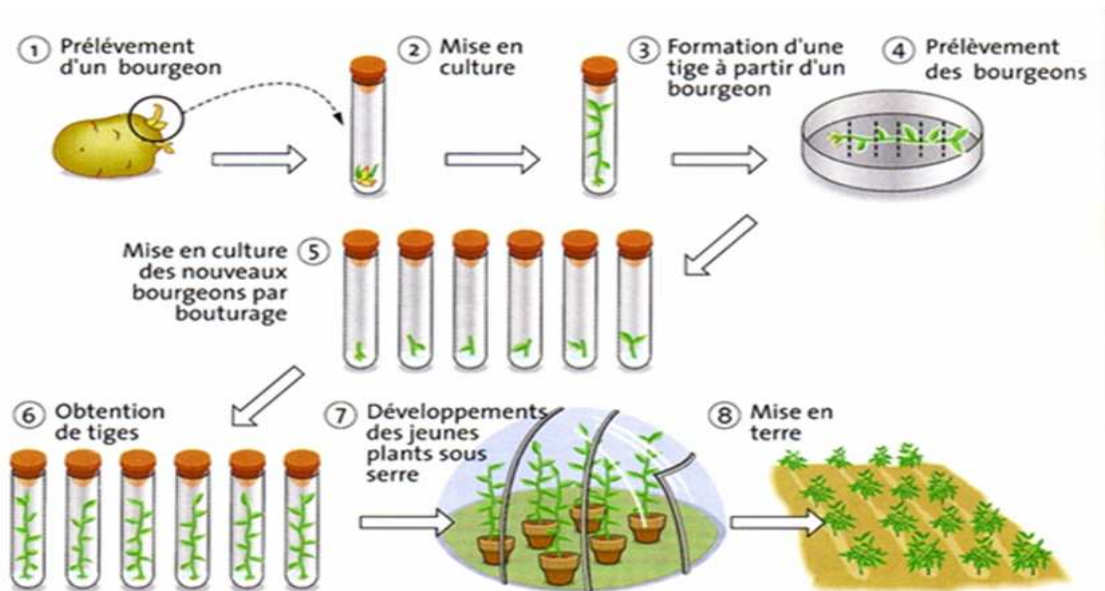


Figure 1. Les étapes de la technique de culture *in vitro*¹.

¹ <http://tpe-micropropagation-pomme-de-terre.e-monsite.com/pages/protocole-et-mise-en-culture.html>

b)- La création de nouvelles variétés de plantes

La création de nouvelles variétés de plantes par transgénèse vise à obtenir :

- Des plantes résistantes aux conditions d'environnement ;
- Des plantes résistantes aux parasites ;
- Une amélioration des qualités technologiques.

Aujourd'hui, plus de 68 millions d'hectares sont cultivés avec des plantes transgéniques, 2 millions seulement en 1996 (Serghini, 2006). C'est le soja qui vient en-tête des plantes transgéniques avec un taux de 61%, suivi du maïs (23%) et du coton (11%); 73% des OGM sont transformés pour une tolérance à un herbicide (Serghini,2006). Les pays qui utilisent le plus des OGM au niveau de leur agriculture sont par ordre d'importance, les Etats-Unis d'Amérique, l'Argentine, le Brésil et la Chine. Le blé, le riz et le maïs assurent 40% de l'alimentation mondiale (Serghini, 2006). L'amélioration des céréales fait appel à une large gamme de technologies impliquant le croisement interspécifique et inter générique (+/- sauvetage d'embryons), la fusion de chloroplastes, les variations somaclonales, les marqueurs moléculaires en plus de la cartographie et le séquençage. Le colza est sans aucun doute la plante industrielle qui a bénéficié le plus des biotechnologies végétales. Il est intéressant pour son usage alimentaire par la production d'huile et de tourteau pour l'alimentation du bétail et comme engrais mais aussi par ses débauchés non alimentaires liés à production de biocarburants, la production de lubrifiants et d'alcool (Serghini,2006).

De nos jours, les biotechnologies végétales connaissent un essor considérable. L'embryogenèse somatique et les semences artificielles ont marqué un progrès incontestable pour l'agriculture. Les plantes de demain ne seront probablement pas très différentes de celles d'aujourd'hui et s'ajusteront mieux à la production intensive et à l'industrialisation.

Les biotechnologies futures s'orienteront plus vers la compréhension des stades de développement des plantes, le contrôle de la floraison et de l'appareil de fructification (précocité de fructification, apyrénie, etc.). La maîtrise des mécanismes de l'assimilation chlorophyllienne aura un impact fort sur le rendement. C'est au niveau des génopôles que la recherche à moyen terme trouvera son épanouissement. L'agriculture sera plus engagée dans les premiers stades de développement des plantes.

1.3.2 . Application en foresterie

La biotechnologie forestière a été le témoin de nombreux progrès durant la dernière décennie, et il est probable que cela continuera à une allure encore plus rapide dans l'avenir. Il sera alors difficile de savoir qu'attendre de la biotechnologie. Néanmoins, il est important que nous continuions d'évaluer les principes de base de la gestion génétique forestière qui devraient être considérés, sans prendre en compte les options que les technologies offriront aux aménagistes forestiers.

Alors que le débat sur la biotechnologie en agriculture continuera d'être très instructif pour la foresterie, plusieurs enjeux en foresterie sont toutefois différents et nécessiteront une attention spéciale.

La biotechnologie peut être décrite comme "toute application technologique qui utilise des systèmes biologiques, des organismes vivants, ou dérivés, afin de faire ou de modifier des produits ou des processus en vue d'une utilisation spécifique » (CBD, 2000). Elle peut englober une large variété de techniques, mais les trois domaines principaux en foresterie qui seront probablement importants sont:

- L'utilisation de méthodes de propagation végétative ;
- L'utilisation de marqueurs génétiques moléculaires ;
- La production d'arbres génétiquement modifiés (AGM).

1.3.3 . Application en horticulture

L'horticulture est un domaine de savoir au carrefour de la biologie et de l'agriculture. Elle désigne l'ensemble des activités en rapport avec la culture du jardin. Cette discipline est plus complexe qu'il n'y paraît et elle se subdivise en plusieurs sous branches, à savoir l'horticulture des légumes, celle des fruits et enfin celle des plantes et des fleurs (proche de la botanique). Contrairement aux industries agroalimentaires basées sur l'exploitation intensive des terres, l'horticulture se préoccupe des aliments autant que de la préservation de l'environnement et de l'écologie.

Il s'agit de sept secteurs pour l'horticulture parmi lesquelles il y'a l'horticulture maraîchère, on trouve pour ce secteur les plantes génétiquement modifiées « PGM »

La transgénèse, qui sert à l'élaboration des plantes génétiquement modifiées (PGM), n'est à ce titre qu'une biotechnologie végétale parmi d'autres. A ce jour, 28 pays cultivent des PGM à grande échelle au totale de 17 millions d'agriculteurs qui exploitent des PGM à travers le monde, sur une surface de 181,5 millions d'hectares, soit 13% des terres arables de la planète et quatre plantes modifiées génétiquement sont actuellement exploitées à grande échelle dont 3 sont concernées par l'horticulture maraîchère : le soja (50% des cultures de PGM), le maïs (31%), et le colza (6%) (Bouzou et Marques, 2015).

Pour l'horticulture fruitière et comme plante tropicale, l'ananas, originaire du bassin amazonien avec plus de 600 génotypes est multiplié par culture in vitro (Serghini, 2006). L'assainissement et la reproduction de ses géniteurs sont réalisés dans les pays méditerranéens où les parasites habituels de cette plante sont absents.

Le cocotier, cultivé sur 10 millions d'hectares dans 90 pays situés dans les zones intertropicales humides avec une croissance en hauteur qui avoisine 1,5 m/an est multiplié par pollinisation assistée où un hectare d'arbres est capable de produire 15 000 semences/an destinées aux germeaux (Serghni, 2006). Sa multiplication par culture in vitro est pratiquée à partir de bourgeons axillaires.

La canne à sucre quant à elle, s'apprête bien à la culture in vitro et représente un des meilleurs exemples de vitrothèques : ses apex enrobés dans l'alginate sont cryoconservés à -196°C pour constituer des banques de vitroplants (Serghini, 2006).

1.3.4 Autres applications

a)- L'élevage

Les applications des techniques modernes des biotechnologies sont encore beaucoup plus restreintes dans ce domaine que dans celui des végétaux. En très grande partie il ne s'agit encore ici que de perspective. D'après Chevallier (1990), les techniques de la biologie cellulaire et moléculaire seront utilisées pour :

- Protéger les animaux contre les maladies ;
- Les sélectionner et contrôler la reproduction ;
- Modifier leurs caractéristiques génétiques par transgénèse.

b)- L'industrie agro-alimentaire

On peut penser que ce secteur industriel sera celui qui drainera à moyen terme la plus grosse part des innovations technologiques. Cependant, malgré l'imminence prévue des applications, les biotechnologies ne sont encore à quelques exceptions près qu'un potentiel.

Tous les stades de ces industries sont concernés :

- L'amélioration de la matière première agricole
- L'amélioration des procédés de transformation
- L'amélioration des produits finals

c)- Les débouchés non alimentaires des produits agricoles

L'amidon, composant majeur du blé et maïs et ses dérivés entre déjà dans la composition de plus de 500 produits : en chimie, pharmacie, papeterie, etc. (Chevallier, 1990). Le problème dans ce domaine est celui de la rentabilité financière non encore résolue. Mais les biotechnologies permettant d'adapter les semences à la valorisation industrielle des plantes il sera sans doute possible de gagner les quelques pourcents nécessaire en « préparant » la semence c'est-à-dire en créant des plantes génétiquement préparées à leur transformation en usine.

Les applications des biotechnologies modernes sont donc potentiellement très importantes. Nous devons maintenant nous interroger sur les conséquences de leur prévisible développement.

Ci-dessous, les tableaux 1 et 2 qui représentent les premiers groupes semenciers, la surface et le pourcentage des cultures transgéniques.

Tableau 1. Les cinq premiers groupes semenciers mondiaux relatifs aux biotechnologies en 1999

<i>Firmes</i>	<i>Pays du siège social</i>	<i>Chiffre d'affaire (en million d'euros)</i>	<i>Principales semences</i>
Pioneer Hi-Breed	Etats-Unis	1680	Mais, oléagineux, luzerne, céréales
Monsanto	Etats-Unis	1120	Mais, oléagineux, coton, potagère
Novartis Seeds	Suisse	840	Mais, oléagineux, céréales, betteraves, potagères et fleurs
Groupe Limagrain	France	800	Mais, oléagineux, céréales, potagères et fleurs
Serminis vegetable seeds	Mexique	470	Potagères et fleurs

Source : Institut national agronomique Paris-Grignon, 2001

Tableau 2. Surface des principales cultures transgéniques et non transgéniques dans le monde (en million d'hectare)

<i>Espèces</i>	<i>Surface OGM</i>	<i>Surface non OGM</i>	<i>Total par espèce</i>
Soja	25.8	46.2	72
Mais	10.3	129.7	140
coton	5.3	28.7	34
colza	2.8	22.2	25
Total des surfaces	44.2	226.8	271

Source : Clive, 2000

chapitre2 . Les biotechnologies végétales et la conservation des ressources phylogénétiques

La vie de l'homme dépend de la biodiversité au sens général et spécifiquement aux ressources phylogénétiques. Ces dernières décennies on assiste à une érosion de la biodiversité et à une dégradation alarmante de l'environnement. Les changements climatiques et les risques associés à ces phénomènes conduisent à la disparition de certaines espèces et exposent d'autres aux risques d'extinction. Pour cela, l'homme a intégré les techniques biotechnologiques dans les programmes d'amélioration génétiques des plantes et la gestion durable des écosystèmes.

Qu'entend-on par ressources phylogénétiques ? et comment les biotechnologies interviennent dans la préservation de la biodiversité ?

2.1 . Les ressources phylogénétiques

Le terme "Ressources phylogénétiques" s'applique à toutes les plantes cultivées ou spontanées des zones agro-sylvo-pastorales présentant un intérêt agronomique, économique ou écologique, soit parce que ces espèces, variétés ou écotypes sont devenues rares ou en voie de disparition soient qu'elles présentent un intérêt ou un caractère stratégique pour le pays comme les céréales, les légumineuses alimentaires, les plantes fourragères et certaines plantes industrielles, médicinales et aromatiques (Bouattoura ,1988). Selon la FAO (1983), les ressources phylogénétiques jouent un rôle de plus en plus important dans la sécurité alimentaire et le développement économique au niveau mondial. Elles permettent à l'agriculture de faire face aux changements, qu'ils soient environnementaux ou socio-économiques. Elles font partie intégrante de la biodiversité agricole dans la mesure où elles sont cruciales pour intensifier une production agricole durable et pour assurer la subsistance d'une grande partie des femmes et des hommes qui dépendent de l'agriculture.

La diversité phylogénétique peut aussi offrir des caractères susceptibles d'aider à relever des défis futurs, tels que la nécessité d'adapter les cultures à l'évolution des conditions climatiques ou à l'apparition de foyers de maladies². Cependant, elle est menacée « d'érosion génétique », un terme inventé par les scientifiques pour désigner la perte de gènes individuels et de combinaisons de gènes, tels que ceux que l'on retrouve dans des variétés traditionnelles adaptées aux conditions locales³. D'après la FAO¹, la principale cause de l'érosion génétique est le remplacement de variétés locales par des variétés modernes. De plus, l'introduction de variétés commerciales dans les systèmes agricoles

² <http://www.fao.org/cgrfa/topics/plants/fr/>

³ http://www.fao.org/newsroom/fr/focus/2004/51102/article_51107fr.html

traditionnels aboutit dans bien des cas à une réduction du nombre des variétés cultivées. Parmi les autres causes d'érosion génétique figurent l'apparition de nouveaux ravageurs, de nouvelles plantes adventices et de nouvelles maladies, la dégradation de l'environnement, l'urbanisation et le défrichage par la déforestation et les feux de brousse.

Depuis sa création en 1983, la Commission de la FAO sur les ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture⁴ contribue à coordonner et à orienter une série d'initiatives internationales fondamentales dont l'objectif est de faire davantage connaître le problème qu'est l'érosion des ressources phytogénétiques. Elle a été le fer de lance d'une action publique concertée destinée à promouvoir la conservation. Les thèmes et les objectifs des deux sessions de la commission sont résumés dans le tableau 3.

En s'appuyant sur le plan d'action mondial, la commission a poursuivi ses travaux sur deux autres initiatives novatrices:

- Le traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture ;
- Le fonds fiduciaire mondial pour la diversité des cultures.

La Commission, le Traité et le Fonds contribuent de manière différente mais complémentaire à la conservation et à l'utilisation durable des ressources phytogénétiques.

⁴ <http://www.fao.org/agriculture/crops/plan-thematique-du-site/theme/seeds-pgr/gbs/fr/>

Tableau 3. Les sessions de la commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture de FAO

Sessions de la commission de FAO	1ere session 1996	2ème session 2009
Thème	L'état des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde	2ème rapport sur l'état des ressources phylogénétiques
L'objectif	1ère évaluation mondial exhaustive de la situation en matière de conservation et utilisation des ressources phylogénétiques Les participants ont aussi adopté le Plan d'action mondial pour la conservation et l'utilisation durable des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture.	Décrit les principaux changements qui se sont produits entre 1996, date de publication du <i>Premier Rapport</i> , et 2009. (Analyse de la situation et de l'évolution de l'utilisation des ressources phylogénétiques, gestion <i>in situ</i> et de leur conservation <i>ex situ</i>) Porte sur l'état actuel des programmes mis en œuvre, les besoins en matière de formation et les lois applicables au niveau national. Le Deuxième Rapport a servi de base à l'élaboration du deuxième Plan d'action mondial pour les ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, que le Conseil de la FAO a adopté en 2011

De par son immensité, le territoire algérien couvre des zones de climat très variées. Couvert de montagnes, de plateau et de plaines, sillonné de multiples cours d'eau, parsemé de lacs, tapissé de steppe, de désert et de forêts, ses conditions naturelles favorisent le peuplement et la reproduction de végétaux dont un grand nombre d'espèces rares et précieuses.

L'Algérie est l'un des pays les plus riches en ressources végétales. En effet, on ne compte pas moins de 3 200 espèces, réparties dans trois grandes formations végétales : la forêt, la steppe et la végétation. La richesse de la flore algérienne est incontestable, elle recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques (FAO, 2012)

2.2 . Gestion et conservation des ressources phylogénétiques

Le développement des connaissances, la gestion et la conservation des ressources phylogénétiques sont indispensables pour continuer à disposer pour l'avenir d'une base génétique large, condition nécessaire pour une résilience

renforcée des systèmes de production, permise grâce à l'innovation dans le matériel végétal mis à disposition des agriculteurs.

La gestion et la conservation des ressources phylogénétiques sont le résultat de :

- Plans d'urbanisation et de défrichement anarchique qui détruisent l'habitat et perturbent les écosystèmes en général ;
- Mécanisation agricole et l'utilisation incontrôlée de pesticides.
- Le remplacement souvent impartial et sans phase préliminaire d'expérimentation des anciennes variétés bien adaptées aux conditions de milieu Local et de bonne qualités par des variétés introduites plus exigeantes pour Les techniques culturales (préparation du sol et contrôle des mauvaises herbes et fertilisation).
- La collecte incontrôlée et non réglementée de matériel végétal par des institutions étrangères & des fins de valorisation et d'utilisation par Le développement de L'agriculture de Leurs pays (céréales, plantes fourragères, industrielles, espèces fruitières, etc.) (Bouattoura, 1988).

La préservation des ressources n'est pas une fin en soi, mais le moyen d'assurer que les ressources génétiques animales et végétales restent à la disposition des générations actuelles et futures. Après avoir identifié et caractérisé ces ressources, on peut adopter, pour les préserver, soit l'approche *in situ*, soit l'approche *ex situ*. Dans l'approche *in situ*, on laisse les plantes et les animaux dans leurs habitats d'origine. A l'inverse, les méthodes de préservation *ex situ* maintiennent les organismes hors de leurs habitats originaux, à l'aide d'équipements tels que des banques génétiques, des cultures cellulaires, des jardins botaniques ou des parcs zoologiques.

2.2.1 Conservation in situ

La conservation *in situ* est la conservation des écosystèmes, des habitats naturels, le maintien et la reconstitution de populations viables d'espèces dans leur milieu naturel et, dans le cas des espèces domestiquées et cultivées, dans le milieu où se sont développés leurs caractères distinctifs » (Convention sur la diversité biologique, UNEP 1992)

La conservation *in situ* couvre un continuum d'espèces sauvages, adventices et cultivées. L'Union internationale pour la conservation de la nature, allant des aires complètement protégées, où l'intervention humaine est limitée le plus possible aux zones aménagées ou destinées à des usages multiples.

➤ Les avantages de la conservation in situ

- La conservation *in situ* est dynamique ;
- Les processus évolutifs se poursuivent et l'interaction entre les différentes espèces peut être observée ;
- C'est une méthode utile pour conserver les espèces aussi bien sauvages que cultivées, à graines orthodoxes aussi bien que récalcitrantes ;

- La plupart des aires protégées sont facilement accessibles pour des études sur l'évolution et la génétique (Maxted et al., 1997).

➤ Les inconvénients de la conservation in situ

- Les réserves génétiques peuvent ne pas être accessibles pour les besoins des programmes d'amélioration génétique, et si la gestion n'est pas optimale, la caractérisation et l'évaluation seront limitées ;
- Les réserves sont vulnérables aux catastrophes d'origine naturelle et anthropique. Seule une quantité restreinte de diversité biologique peut être conservée en raison des limites de taille qui s'imposent aux réserves. Cette restriction touche particulièrement les essences forestières à faible densité (Maxted et al., 1997) ;
- Le coût et la viabilité des réserves peuvent aussi constituer un inconvénient. En outre, les stratégies de gestion appropriées sont mal comprises et les méthodes de conservation ne sont pas encore tout à fait au point.
- L'évolution des systèmes agricoles peut représenter une menace sérieuse pour la conservation de certains matériels ; par exemple les agriculteurs peuvent décider d'abattre les arbres pour uniformiser leurs champs.

➤ Techniques de la gestion de conservation in situ

a)- Les banques de gènes au champ

Les espèces végétales qui ne donnent pas facilement de graines, ou dont les graines ne supportent pas la congélation, sont habituellement conservées sous forme de plantes sur pied. De nombreuses espèces cultivées qui sont importantes pour les pays tropicaux se reproduisent par voie végétative (patate douce, manioc, igname) et sont aussi conservées dans des jardins botaniques, des arboretums, ou des stations de recherche. C'est également sous cette forme que l'on conserve le matériel génétique de diverses espèces telles l'hévéa, le cocotier, le manioc, ainsi que le bananier et le caféier.

b)- La conservation «à la ferme »

L'objectif est de préserver les nombreuses variétés locales de plantes cultivées ou d'animaux domestiques qui ont été patiemment sélectionnées par les agriculteurs sur des critères d'adaptation aux conditions locales ou d'usages spécifiques. Dans de nombreux pays les agriculteurs pratiquent à la ferme la conservation de la diversité génétique en entretenant des races traditionnelles (Maxted et al. 1997).

La conservation *in situ* des ressources génétiques des plantes sauvages apparentées aux plantes cultivées nécessite une approche spécifique car la plupart des aires protégées ont été établies pour entretenir un paysage renommé, ou pour sauver un mammifère ou un oiseau rare, mais rarement pour conserver une plante sauvage. En outre, beaucoup de ces variétés sauvages ne sont présentes que dans des zones assez limitées. Il en résulte que les zones naturelles protégées déjà existantes ne sont pas toutes aptes à la constitution de

réserves génétiques de plantes sauvages apparentées et que des réserves spécialisées sont souvent nécessaires. Il semble logique d'accorder la priorité aux espèces qui ne peuvent être conservées facilement *ex situ* telles l'hévéa en Amazonie, le cacao et l'arachide en Amérique latine, le caféier en Afrique, les agrumes en Asie, etc. (Lévêque et Mounolou, 2008).

2.2.2 Conservation ex situ

La conservation *ex situ* est la conservation d'éléments de la diversité biologique en dehors de leur milieu naturel (Convention sur la diversité biologique, UNEP 1992). Les banques de gènes en sont un exemple.

Dans le cadre de cette stratégie, on peut distinguer les techniques suivantes :

- La conservation de graines
- La conservation en champ
- La conservation *in vitro*
- La conservation de pollen
- La conservation d'ADN
- La conservation dans les jardins botaniques

➤ Conservation de graines

La conservation des graines est la technique la plus utilisée pour les plantes agricoles (FortLloyd et Jackson, 1986 ; Roberts, 1991). Elle devient aussi de plus en plus importante pour les essences forestières.

Dans ce processus de conservation, il est nécessaire d'abaisser le taux d'humidité des graines (à 3 -7%) et de les conserver à faible température (de préférence -18°C ou moins) (Roberts, 1975 ; Ng et Ng, 1991 ; FAO/IPGRI, 1994).

La méthode de conservation des graines est généralement appliquée aux espèces dites à graines orthodoxes, c'est-à-dire aux espèces qui peuvent être traitées de façon indiquée ci-dessus sans perdre leur viabilité.

a)- Avantages de la conservation des graines

- La conservation des graines est une technique efficace et reproductible.
- Dans le cas des espèces orthodoxes, elle convient généralement pour la conservation fiable à court, moyen et/ ou long terme.
- Pour la production de plants ou de les conserver en vue d'un usage ultérieur (Okafor et Lamb, 1994).
- Les frais d'entretien sont relativement faibles une fois que le matériel a été conservé. Il est ainsi possible de conserver une importante diversité pour chaque espèce visée (Roberts, 1991 ; Withers, 1993 ; Maxted et al., 1997).

b)- Inconvénients de la conservation des graines

- Il n'est pas possible d'utiliser cette technique pour les espèces dites à graines récalcitrantes, telles que *Azadirachta indica*, *Vitellaria paradoxa*, et *Sclerocarya*

birrea (Gaméné, 1996), car la graine perd sa viabilité durant le processus de conservation et/ou pendant le stockage ultérieur (Benmahioul et al., 2015).

- La conservation à long terme des graines est aussi problématique, car beaucoup d'arbres ont une longue phase juvénile et ne produisent pas de graines pendant plusieurs années (Engelmann, 1994).
- Pendant la conservation, les processus évolutifs cessent, de sorte que le matériel génétique ne s'adapte plus aux changements de l'environnement. En outre, un seul taxon par accession peut être conservé, et les espèces associées ne peuvent pas être conservées ensemble.
- Il faut savoir que ce sont des gènes que l'on conserve et non des génotypes (Roberts, 1991 ; Withers, 1993 ; Maxted et al., 1997)

➤ Collections en champ

Une collection en champ est une collection de génotypes d'espèces conservée en champ. Le matériel, récolté dans la zone cible, est transféré dans un second site. Cette méthode répond en outre aux exigences de la conservation de clones (Maxted et al., 1997).

Les collections en champ jouent un rôle de premier plan dans la conservation de nombreuses espèces tropicales, qui ont généralement des graines récalcitrantes. Les espèces à graines orthodoxes peuvent être conservées dans des collections en champ, qui permettent de disposer du temps nécessaire à la croissance de la plante (Maxted et al., 1997)

Les collections en champ sont utilisées principalement pour la conservation de génotypes spécifiques d'espèces orthodoxes. Les parcs à clones de conservation ont évidemment un rôle de conservation de clones.

Cependant, pour les raisons d'économie, ils sont bien souvent limités en extension et en nombre de clones. Ce rôle peut être réalisé partiellement par la conservation *in situ* des arbres et *ex situ* par les vergers à graines évolutifs (Maxted et al., 1997)

➤ Conservation *in vitro*

La conservation *in vitro* consiste à conserver des explants dans un environnement stérile, indemne d'organismes pathogènes. L'utilisation des techniques de culture *in vitro* est d'un grand intérêt pour conserver :

- 1) les ressources génétiques d'espèces à` semences récalcitrantes et propagées végétativement ;
- 2) les produits de la biotechnologie (génotypes élite, lignées cellulaires productrices de métabolites, matériel génétiquement modifié) ;
- 3) les espèces rares et menacées (Engleman, 2009).

Au cours des 30 dernières années, les techniques de culture *in vitro* se sont largement développées et elles ont été appliquées à plus de 1000 espèces différentes (George, 1993a, b). Les techniques de cultures de tissus sont d'un grand intérêt pour la collecte, la multiplication et la conservation du matériel génétique (Engelmann, 1991).

Les systèmes de culture de tissus permettent de propager le matériel végétal avec des taux de multiplication élevés, dans un environnement aseptique (Benmahioul et al., 2012). Des plantes exemptes de virus peuvent être obtenues par culture de méristèmes en combinaison avec la thermothérapie, ce qui permet la production de stocks exempts de virus et simplifie les procédures de quarantaine pour l'échange international de matériel génétique. La miniaturisation des explants permet de réduire l'espace nécessaire pour la conservation, et, par conséquent, de réduire les coûts de main-d'œuvre pour l'entretien des collections de matériel génétique. Différentes techniques de conservation *in vitro* sont utilisées selon la durée de stockage recherchée (Engelmann, 1991 ; Krishnapillay et Engelmann, 1996). Pour le stockage à court et moyen terme, on utilise les techniques de conservation en croissance ralentie. Pour la conservation à long terme, la cryoconservation, c'est à dire le stockage à température ultrabasse, généralement celle de l'azote liquide (-196°C), est la seule méthode utilisable.

➤ Conservation de pollen

La conservation du pollen est couramment utilisée pour la pollinisation contrôlée des géotypes à floraison asynchrone. En revanche, cette méthode n'est pas actuellement mise à profit pour la conservation des ressources phytogénétiques (Withers, 1993 ; Hoekstra, 1995). Cela s'explique par la durée de vie relativement courte du pollen par rapport à celle des graines, la complexité des méthodes utilisées pour tester la viabilité, la connaissance limitée de la capacité de survie et de fécondation du pollen cryoconservé, et l'incapacité des grains de pollen à produire des plantes entières dans la nature (Hoekstra, 1995).

Le pollen conservé sert à la pollinisation et/ou à la recherche. En outre, il pourrait être utilisé pour la production d'haploïdes doublés, qui sont importants pour les programmes d'amélioration génétique.

La conservation de pollen vivant peut se faire à très basses températures (-30°C, -75°C, -196°C) moyennant des techniques adéquates, faisant appel par exemple à l'azote liquide. La durée de conservation dans ces conditions est probablement de plusieurs dizaines d'années. Cette conservation est pratiquée dans le cadre de la gestion du pollen des vergers à graines et des croisements contrôlés (Hoekstra, 1995). Différentes méthodes ont été mises au point pour le stockage du pollen. Le pollen tolérant à la déshydratation, qui est séché, ne survit guère plus d'une année dans cet état à la température ambiante (Hoekstra, 1995). Pour le stocker plus longtemps, il faut réfrigérer l'échantillon ou le conserver dans une atmosphère pauvre en oxygène. Lorsque le matériel

est réfrigéré, il faut aussi abaisser son taux d'humidité à moins de 20% (Hoekstra, 1995). La conservation dans des solvants organiques est une autre option riche en promesses. Pour la conservation à très long terme, les techniques de la cryoconservation s'imposent (Frankel et al., 1995 ; Hoerkstra, 1995 ; Benmahiou et al., 2015). Comme dans le cas des graines, il n'est pas possible d'abaisser le taux d'humidité de certains pollens, dit récalcitrant, sans qu'ils perdent leur viabilité. Les espèces à graines récalcitrantes ne sont pas nécessairement à pollen récalcitrant et vice versa (Hoekstra, 1995).

➤ La conservation d'ADN

Les banques d'ADN ou génothèques, qui abritent des échantillons d'ADN extraits de matériel végétal, pourraient offrir une nouvelle option pour la conservation du matériel génétique (Adams et Adams, 1992 ; Frankel et al., 1995). En général, une banque d'ADN comprend trois sortes de collections d'ADN individuels clonés. Les échantillons d'ADN génomique total consistent en DNA extrait du matériel végétal et conservé sous cette forme. Les génothèques se composent de fragment de DNA conditionnés dans un vecteur de clonage. Elles ont pour objet de représenter l'ensemble du génome du matériel végétal considéré dans les divers vecteurs de clonage. Un échantillon de fragments d'ADN individuels clonés consiste en vecteurs de clonage contenant tous le même fragment d'ADN de l'hôte (Frankel et al., 1995).

L'ADN ainsi conservé peut être utilisé pour la phylogénétique moléculaire ou la systématique des taxons existants ou disparus ; la production de composés secondaires précédemment caractérisés dans les cultures de cellules transgéniques ; la production de plantes transgénique au moyen de gènes provenant de familles de gènes ; l'expression et l'étude *in vitro* de la structure et de la fonction des enzymes et la création de sondes génomiques à l'usage des laboratoires de recherche (Adams, 1994). Toutefois, des procédures et des stratégies doivent être mises au point afin de permettre l'utilisation optimale du matériel stocké pour la conservation du matériel génétique (Withers, 1993 ; Maxted et al., 1997).

➤ Les jardins botaniques

Il existe dans le monde environ 1 500 jardins botaniques et arboretums (WWF-UICN –BGCS, 1989). A l'origine, les jardins botaniques servaient à exposer un grand nombre d'espèces différentes et exotiques. Ils n'avaient pas pour but d'exposer ou de conserver la diversité génétique. Toutefois, la stratégie de conservation botanique (WWF-UICN –BGCS, 1989) souligne que les jardins botaniques pourraient contribuer davantage à la stratégie mondiale de conservation en préservant la diversité phylogénétique et en aidant à assurer l'utilisation durable des espèces végétales et des environnements qui les abritent. Les jardins botaniques sont aussi importants pour la formation et la sensibilisation du public.

Ces deux approches ne sont pas incompatibles: elles peuvent se compléter, ce qui atténue les inconvénients de l'une ou l'autre méthode. Si l'on excepte un petit nombre de variétés ou d'espèces qui sont largement utilisées, particulièrement dans les pays développés, l'expérience prouve que c'est seulement en variant les stratégies de préservation que l'on pourra assurer le maintien de la diversité (FAO, 1993).

2.3. Les biotechnologies végétales au service de la biodiversité

Certaines biotechnologies contribuent déjà à la conservation de ressources génétiques animales et végétales; ce sont notamment (FAO, 1993):

- Les nouvelles techniques de collecte et de conservation des gènes (sous forme de semences ou de culture tissulaire);
- Les techniques de détection et d'élimination des maladies dans les collections des banques génétiques;
- Les techniques d'identification des gènes utiles;
- Les techniques améliorées de conservation à long terme;
- Les techniques de distribution du plasma germinatif aux utilisateurs, dont la sécurité et l'efficacité ont été renforcées.

Prenons l'exemple de la culture tissulaire. Cette technique, qui consiste à faire pousser des fragments de tissu ou de cellules détachées dans une culture, fournit un moyen rapide et efficace de prélever de nombreuses boutures sur une plante unique. Très souvent, il est possible de régénérer des plantes entières à partir d'une cellule unique, car chaque cellule contient toute l'information génétique nécessaire. Ainsi, à partir d'un prélèvement sain on peut obtenir, en grand nombre, des copies qui seront génétiquement identiques. C'est ce qu'on appelle le clonage ou la micropropagation des plantes (FAO, 1993).

Dans les banques de gènes, la culture tissulaire est maintenant utilisée de façon habituelle afin de préserver l'information génétique relative aux plantes dont les graines sont difficiles à conserver, aux plantes stériles, ou à celles dont les graines ont du mal à germer. Les cellules de plantes que l'on conserve, en milieu de croissance dans une éprouvette, remplacent alors les graines ou les plants. Parmi les plantes que l'on conserve de cette manière, on peut citer la patate, la banane et la banane plantain, la pomme, le cacao et de nombreux fruits tropicaux (FAO, 1993).

La mutagenèse dirigée et le remplacement d'un allèle par un autre peuvent aussi permettre de créer rapidement de nouvelles variétés apportant un progrès sur différents caractères agronomiques comme la résistance à différents bioagresseurs, la tolérance à la sécheresse, la valorisation de la fumure azotée, les qualités technologiques ou alimentaires des produits (Gallais, 2020). Il en résulterait une plus grande diversité des variétés cultivées. Un exemple

particulier : par le transfert à la vigne des résistances à l'oïdium et au mildiou, ces techniques, par leur précision, permettraient de conserver les qualités œnologiques des cépages, alors qu'elles seraient remises en cause par les méthodes d'amélioration conventionnelles faisant appel à la voie sexuée (Gallais, 2020). Ce qui est une forme de contribution au maintien d'une biodiversité (Gallais, 2020).

2.3 . La cryoconservation

La cryoconservation est la conservation de matériel génétique à une température extrêmement basse (habituellement dans de l'azote liquide à -196 °C), à laquelle toute activité biologique est suspendue. C'est une solution économique qui permet une conservation durable, réduit le risque de perte, nécessite peu d'espace et un entretien minimal et qui permet de garder du matériel génétique d'espèces éteintes ou autres à des fins d'améliorations génétiques futures (FAO, 2011). (Figure 2).



Figure 2. La technique de cryoconservation

Il est important de signaler que la cryoconservation est la seule technique disponible à l'heure actuelle permettant la conservation économique et en sécurité des ressources génétiques du matériel végétal dont la conservation pose des problèmes (Engleman, 2009). Certains matériels, comme les semences orthodoxes ou les bourgeons dormants, présentent des processus naturels de déshydratation et peuvent être cryoconservés sans aucun prétraitement. Cependant, la plupart des systèmes expérimentaux employés en cryoconservation (bourgeons, embryons, suspensions ou cals) contiennent des quantités d'eau intracellulaire élevées et sont donc extrêmement sensibles à la congélation puisqu'ils ne sont pas naturellement tolérants à la déshydratation (Benmahioul et al., 2015). D'après les mêmes auteurs, les cellules doivent être déshydratées artificiellement pour les protéger des dégâts causés par la

cristallisation de l'eau intracellulaire pour former de la glace. Les techniques employées et les mécanismes physiques sur lesquels elles reposent sont différents dans les techniques de cryoconservation classiques et nouvelles (Withers et Engelmann, 1998). Les techniques classiques sont basées sur la déshydratation pendant la congélation, alors que les nouvelles techniques sont basées sur la vitrification. La vitrification peut être définie comme la transition de l'eau directement de la phase liquide en une phase amorphe ou verre, en évitant la formation de glace cristalline dommageable pour l'intégrité cellulaire (Engelmann, 2010). Les techniques de cryoconservation classiques ont été appliquées avec succès aux systèmes indifférenciés comme les suspensions cellulaires et les cals (Withers et Engelmann, 1998).

Sept différentes techniques basées sur la vitrification ont été mises au point : encapsulation-déshydratation, vitrification, encapsulation-vitrification, déshydratation, préculture, préculture-déshydratation, congélation et gouttes et vitrification en gouttes (Engelmann, 2004 ; Gonzalez-Arno et Engelmann, 2006 ; Sakai et Engelmann, 2007). Ces nouvelles techniques ont été utilisées pour la cryoconservation de bourgeons et d'embryons de nombreuses espèces végétales d'origine tropicale et tempérée (Engelmann et Takagi, 2000 ; Reed, 2008).

Bien que leur utilisation en routine soit encore limitée, il existe un nombre croissant d'exemples pour lesquels la cryoconservation est employée à grande échelle avec différents types de matériels qui sont, ou non, tolérants à la dessiccation, qui comprennent des semences d'espèces orthodoxes ou récalcitrantes, des bourgeons dormants, du pollen, des produits des biotechnologies et des bourgeons prélevés sur des vitroplants (Engelmann, 2009).

La cryoconservation peut présenter des avantages pratiques, même pour les espèces végétales pour lesquelles d'autres possibilités de conservation existent. Une étude récente comparant le coût respectif de la conservation sur champ d'un grand fonds d'espèces de café, d'une part, et de l'établissement d'une cryo-collection de graines de café au Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), d'autre part, montre que la deuxième solution a un coût par élément inférieur à celui de la conservation dans des banques de gènes sur le terrain et que ce coût baisse même à mesure qu'augmente le nombre d'éléments de la collection conservée par cryogénéisation (FAO, 2011)

chapitre3 . Les Biotechnologies végétales appliquées aux ligneux

La biotechnologie forestière a été le témoin de nombreux progrès durant la dernière décennie, et il est probable que cela continuera à une allure encore plus rapide dans l'avenir. Il sera alors difficile de savoir qu'attendre de la biotechnologie. Néanmoins, il est important que nous continuions d'évaluer les principes de base de la gestion génétique forestière qui devraient être considérés, sans prendre en compte les options que les technologies offriront aux aménagistes forestiers (FAO, 2002).

D'après Pilate et al. (2002), l'amélioration génétique des arbres forestiers est confrontée à quatre contraintes majeures :

- * les principaux caractères cibles de la sélection (vitesse de croissance, qualité du bois, rectitude du tronc, résistance aux stress biotiques et abiotiques) ne peuvent être évalués que tardivement, généralement après 10 ans ;
- * la longueur des générations liée à la floraison tardive des espèces forestières contraint le sélectionneur à attendre l'âge de la maturité sexuelle pour recombinaison des meilleurs génotypes par croisements contrôlés ;
- * les caractères cibles sont souvent complexes, polygéniques, et faiblement héréditaires, car ils sont soumis à de forts effets du milieu environnant ;
- * la relation souvent inverse existant entre la maturation des arbres et leur aptitude à la propagation végétative limite la diffusion rapide de nouvelles variétés.

Elle peut englober une large variété de techniques, mais les trois domaines principaux en foresterie qui seront probablement importants sont : l'utilisation de méthodes de propagation végétative, l'utilisation de marqueurs génétiques moléculaires et la production d'arbres génétiquement modifiés (FAO, 2002).

3.1 Les méthodes de propagation végétative *in vitro*

La propagation végétative comprend une large gamme de techniques impliquant la manipulation de tissu végétal (par exemple des sections de tiges, feuilles, racines, semences ou même des cultures cellulaires) qui permettent la «re-propagation » végétative complète de la plante entière, c'est-à-dire la production de « variétés » clonales ou de lignées (FAO, 2002).

Actuellement, les ligneux fruitiers et ornementaux sont essentiellement propagés par voie végétative. Toutefois, la multiplication végétative des arbres

forestiers reste relativement limitée. Elle concerne essentiellement le Peuplier, les Eucalyptus, le Merisier, l'Épicéa et certains Pins (Pilate et al, 2002).

Les biotechnologies spécifiques liées à la propagation végétative en foresterie sont incluses dans les trois catégories principales de micropropagation, de cryoconservation et stockage *in vitro*, et de sélection *in vitro*.

3.1.1 Micropropagation

La micropropagation est le développement de lignées clonales à partir de petits échantillons de tissus tels que les bourgeons, racines ou les embryons extraits de semences. Ce dernier cas, l'embryogenèse somatique (ES), sera probablement la technologie de propagation la plus prometteuse pour le stockage à long terme et la production à grande échelle d'arbres à partir de lignées clonales sélectionnées, particulièrement pour les espèces de conifères (FAO,2002). L'ES peut être particulièrement utile une fois que la valeur génétique des clones a été déterminée grâce à un essai de terrain. Toutefois, les coûts de développement de telles technologies avancées de culture tissulaire sont élevés en comparaison avec ceux de technologies plus simples.

Les techniques de micropropagation sont de trois types basés sur le mode de propagation:

Premièrement, la propagation à partir de pousses avec de la cytokinine comme la benzyladenine ou la kinétine (Benmahioul et al., 2016);

Deuxièmement, différenciation multiple de pousse du tissu dédifférenciant, du calus, avec un acide acétique indole comme auxine;

Et enfin, la différenciation de l'embryon de la cal.

Les deux premières méthodes ont besoin du processus d'enracinement avec un acide indole acétique de type auxine et avec de l'acide naphthalèneacétique par la suite, dans les cas difficiles, un enracinement *ex vitro* est préconisé (Figure 3) (Benmahioul et al., 2012). De nos jours, la méthode de propagation à partir des pousses est la plus préférée, car ces deux dernières méthodes présentent la possibilité d'une variation génétique due à la phase dédifférenciée, la cal (Aryal, 2019).

➤ Applications et avantages de la micropropagation

Les tissus végétaux en petites quantités sont suffisants pour la production de millions de clones en un an en utilisant la micropropagation (Benmahioul, 2015). Il faudrait beaucoup de temps pour produire un nombre égal de plantes en utilisant des méthodes conventionnelles.

La technique de micropropagation offre une bonne alternative pour les espèces végétales qui présentent une résistance aux pratiques de propagation en vrac conventionnelles.

Une autre méthode de multiplication végétative pour la multiplication de masse est proposée par micropropagation. Les plantes en grand nombre peuvent être produites en peu de temps. Toute variété particulière peut être produite en grande quantité et le temps nécessaire pour développer de nouvelles variétés est réduit de 50%. De grandes quantités de plantes peuvent être maintenues dans de petits espaces. Cela aide à sauver les espèces en voie de disparition et le stockage du matériel génétique (Benmahioul, 2015).

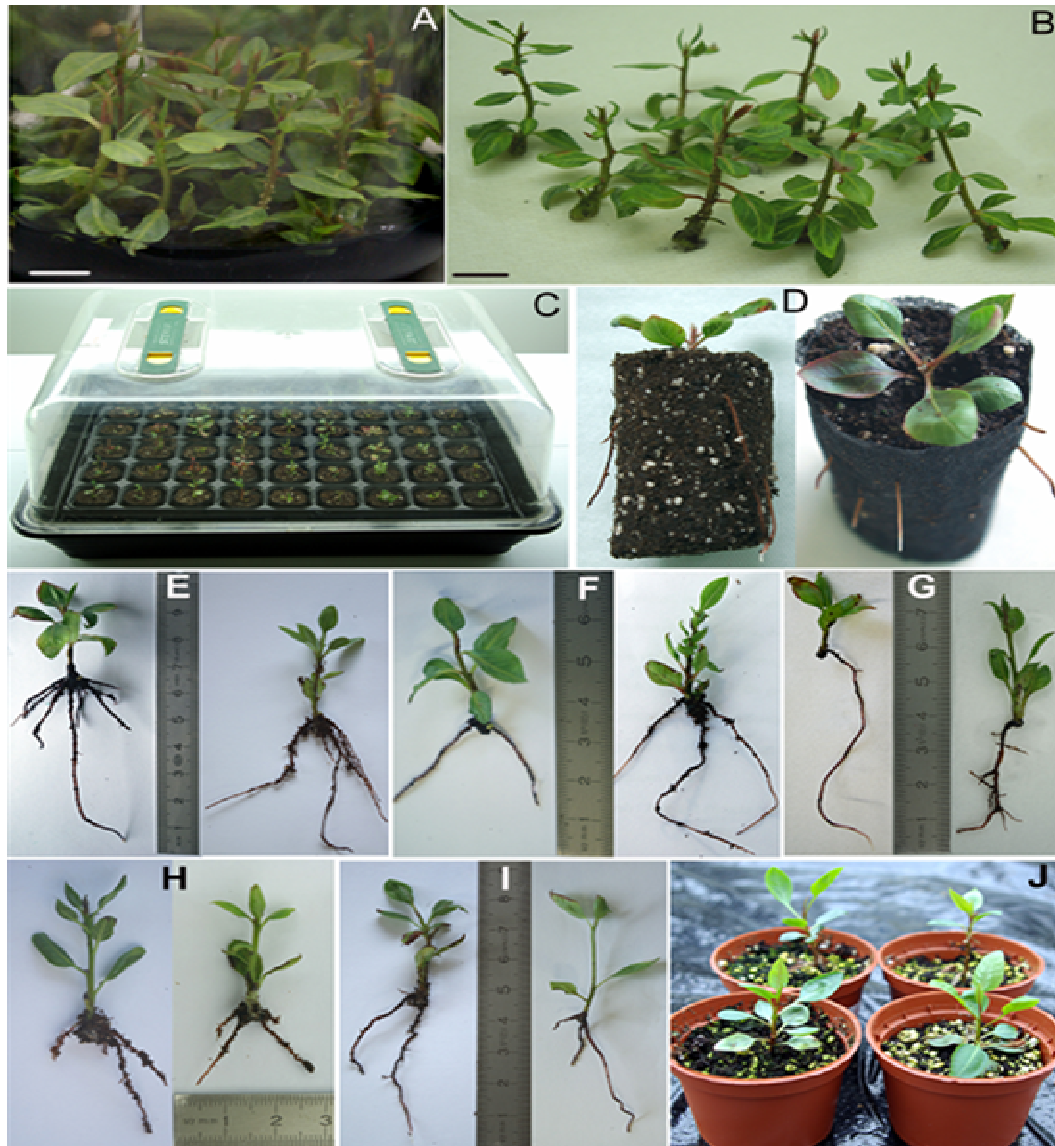


Figure 3. Enracinement ex vitro et acclimation des microplants de *Pistacia vera* L. (Benmahioul, 2009)

Préparation des vitroplants à l'enracinement *ex vitro*. Noter le bon aspect qualitatif des pousses feuillées après un passage de 30 jours sur un milieu dépourvu d'hormone et supplémenté de 2 g l⁻¹ de charbon actif (A-B). Microboutures repiquées dans des mottes Fertiss et placées dans une mini serre (C). Formation de racines adventives après 2 à 3 semaines de la mise en culture (D). Microplants enracinés *ex vitro* après 6 semaines de culture : Rhizopon (E), Rootone (F), Témoins (G). Enracinement *ex vitro* de pousses feuillées issues de méta-Topoline (H) et de benzylaminopurine (I) après un traitement auxinique par Rhizopon. Reprise de la croissance des microplants après 2 mois de transfert en serre (J). (Barre = 1cm.)

La méthode de micropropagation produit des plantes exemptes de maladies. Par conséquent, les variétés exemptes de maladies sont obtenues grâce à cette technique en utilisant la culture de pointe méristème.

La prolifération des stocks *in vitro* peut se faire à tout moment de l'année. En outre, une pépinière peut produire des espèces de fruits, d'ornements et d'arbres tout au long de l'année. Un rendement accru des plantes et une vigueur accrue chez les espèces de floriculture sont obtenus.

Un échange international rapide de matériel végétal sans risque d'introduction de maladies est assuré. Le temps requis pour la quarantaine est réduit par cette méthode.

La technique de micropropagation est également utile pour la production de semences dans certaines cultures, car l'exigence d'une conservation génétique élevée est importante pour la production de semences.

La micropropagation présentant divers avantages par rapport aux méthodes de multiplication conventionnelles, cette méthode offre une meilleure portée et un meilleur avenir pour la production d'importants produits phytopharmaceutiques à base de plantes (Aryal,2019).

Indépendamment de la disponibilité des plantes, la micropropagation offre une approche alternative lucrative aux méthodes conventionnelles dans la production de quantités contrôlées de produits biochimiques. Par conséquent, des efforts intenses et continus dans ce domaine dirigeront la production contrôlée et réussie de produits chimiques végétaux précieux, spécifiques et pourtant non découverts (Aryal, 2019).

Selon le même auteur La micropropagation est un processus compliqué qui implique principalement 3 étapes (I, II et III). Certains auteurs ajoutent deux étapes supplémentaires (étapes 0 et IV) pour une représentation plus complète de la micropropagation. (Figure 4) .

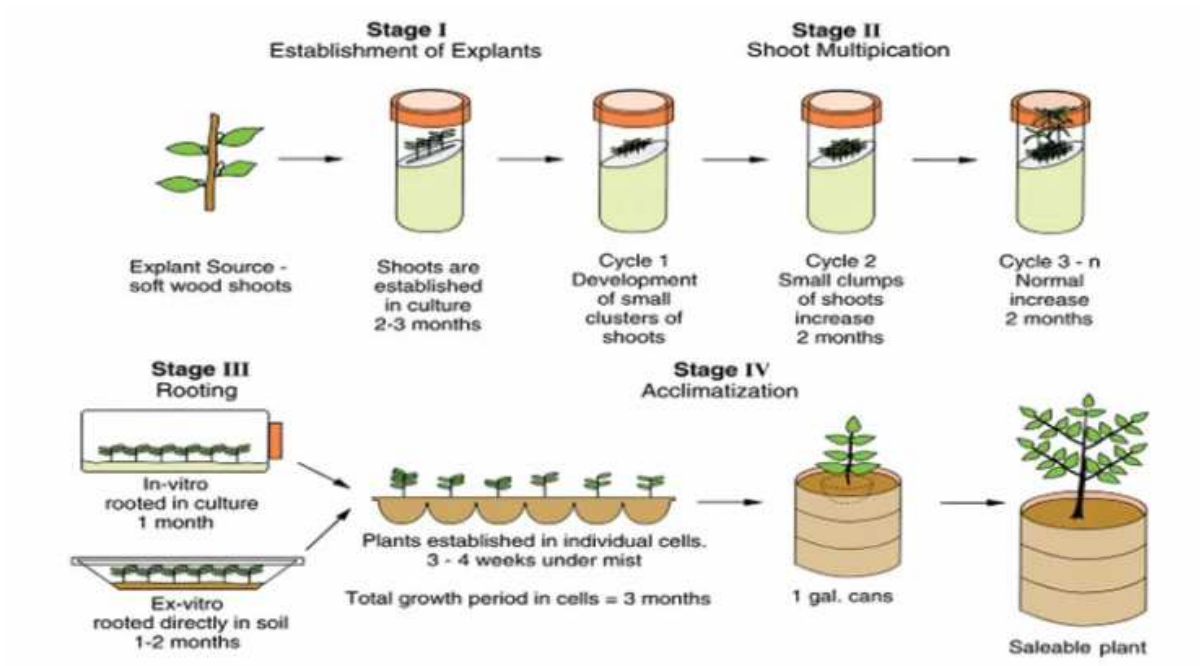


Figure 4. Les étapes de la micropropagation (Aryal, 2019)

Étape I : À ce stade, l'initiation et l'établissement d'une culture dans un milieu approprié sont réalisés. La sélection d'explants appropriés est importante. Les explants les plus couramment utilisés sont les organes, les pointes de pousse et les bourgeons axillaires. L'explant choisi est stérilisé en surface et lavé avant utilisation. **Étape II :** C'est à ce stade que l'activité majeure de la micropropagation se produit dans un milieu de culture défini. La phase II implique principalement la multiplication des pousses ou la formation rapide d'embryons à partir de l'explant. Une chambre de croissance fixée à 20–24 °C est utilisée, avec une intensité lumineuse de 2000 à 4000 lux et une période d'éclairage d'environ 16 heures. **Étape III :** Cette étape implique le transfert des pousses vers un milieu pour un développement rapide en racines. Parfois, les pousses sont directement plantées dans le sol pour développer des racines. L'enracinement in vitro des pousses est préférable tout en manipulant simultanément un grand nombre d'espèces. **Étape IV :** Cette étape implique l'établissement de plantules dans le sol. Cela se fait en transférant les plantules de la phase III du laboratoire vers l'environnement de la serre. Pour certaines espèces végétales, le stade III est ignoré et les pousses non enracinées du stade II sont plantées dans des pots ou dans le mélange de compost approprié.

3.1.2 . Cryoconservation et stockage in vitro

Pour de nombreuses espèces végétales, les graines, dites orthodoxes, représentent le moyen de stockage habituel. Par contre, les semences, dites récalcitrantes, d'autres espèces ne supportent ni la déshydratation, ni l'abaissement de température généralement utilisée dans les techniques de conservation. Parmi ces espèces dont les graines ont une durée de vie qui ne peut excéder quelques mois, on trouve des représentants de groupes très divers (fruitiers, plantes stimulantes, plantes à huiles végétales, épices, plantes forestières, horticoles, médicinales, etc.) dont beaucoup ont une grande importance économique (Roberts et King, 1980). Les semences d'une troisième catégorie de plantes sont dites intermédiaires. Ces semences peuvent être déshydratées jusqu'à des teneurs en eau relativement réduites, mais elles sont sensibles aux basses températures. Par comparaison avec des semences récalcitrantes, leur durée de stockage peut être prolongée, mais il est impossible d'obtenir une conservation à long terme, comme avec les semences orthodoxes

(Engelmann et dussert, 2000). Cette catégorie de semences inclue des plantes d'intérêt économique telles que le pistachier, le caféier et le palmier à huile (Engelmann et Dussert, 2000). La conservation de ce matériel peut être envisagée, non plus sous forme de graine entière, mais d'embryon excisé (Benmahioul et al., 2015), à condition que la technique de culture *in vitro* de l'embryon soit déjà au point pour l'espèce considérée.

Avec cette technique, de petits échantillons de tissus sont maintenus à des températures très froides pour garder leur condition physiologique actuelle. Par conséquent, l'évaluation de génotypes pour la production consécutive efficace de matériel végétal est généralement un des objectifs principaux de cryoconservation (par exemple, dans le stockage de l'ES). Alors que la technologie est utile et nécessaire pour de nombreuses applications en foresterie clonale, elle peut également avoir des applications dans des programmes pour les espèces de semences récalcitrantes, où le stockage de base de semences est un problème majeur (Engelmann, 1997).

3.1.3 . La sélection *in vitro*.

Cette technique implique la sélection d'un trait, par exemple la tolérance au sel, à une étape précoce dans la phase de micropropagation (Benmahioul et al., 2009). Bien que la sélection *in vitro* ait été utilisée à certains degrés pour des plantes de culture, les tentatives pour les arbres forestiers ont été limitées à la sélection de traits génétiquement modifiées (GM) exprimés dans les arbres (c'est-à-dire, des techniques de sélection *in vitro* constituent des nécessités de base dans le processus de sélection pour des lignées clonales GM transformées avec succès). D'autres traits, par conséquent, peuvent être recombinaisonnés avec des critères de sélection *in vitro* nécessaires pour la sélection GM (par exemple, la tolérance au mercure des peupliers jaunes (Rugh et al., 1998), qui pourrait être utilisée pour identifier des lignées clonales utiles à des fins de phyto-remédiation (Guller et al., 2001).

3.2 Les arbres génétiquement modifiés (AGM)

Les arbres sont fréquemment sujets à des maladies, comme les autres plantes. Il est souhaitable d'améliorer la production des divers produits provenant des arbres : matériaux de construction, énergie, carburants, huiles, fibres, etc. Il est également important de pouvoir disposer d'arbres adaptés à des biotopes divers, en particulier en ces temps où le climat se modifie (Houdebine, 2012).

Les arbres génétiquement modifiés, pour qu'ils aient une valeur économique, doivent offrir des caractéristiques uniques qui ne peuvent pas être délivrées économiquement à travers des programmes d'amélioration conventionnelle, et qui sont capables de compenser les coûts du développement de la technologie (FAO,2002) Les traits jusqu'à présent pris en compte dans une modification génétique potentielle d'arbres forestiers sont la résistance aux herbicides, la floraison réduite ou stérilité, la résistance aux insectes et la composition chimique du bois. Bien que les programmes conventionnels d'amélioration

Chapitre 3 les biotechnologies végétales appliquées aux ligneux

d'arbres aient été capables de changer la résistance aux insectes et la qualité du bois, ils présentent néanmoins des possibilités limitées d'incorporation de traits tels que la résistance aux herbicides, les changements spécifiques dans la composition chimique du bois ou la floraison réduite (FAO,2002). Selon (FAO,2002) aussi, Avec les technologies de modification génétique, ces possibilités sont probablement à notre portée.

D'après (Tremblay et al., 2011), il existe différentes méthodes de production d'arbres améliorés :

- Sexuée : Fécondation et formation d'un embryon (cycle naturel) ;
- Asexuée : pas de fécondation, multiplication végétative (bouturage ou embryogenèse somatique) ;
 - ✓ Embryogenèse somatique :
 - Capacité de multiplication limitée ;
 - Conservation à très long terme dans l'azote liquide (banque de tissu)
 - Automatisation du procédé
 - ✓ Bouturage
 - Capacité limitée de multiplication,
 - Pas de conservation à long terme
 - Efficace et rapide

Ces deux techniques sont complémentaires et n'impliquent aucune manipulation génétique (Figure 5).

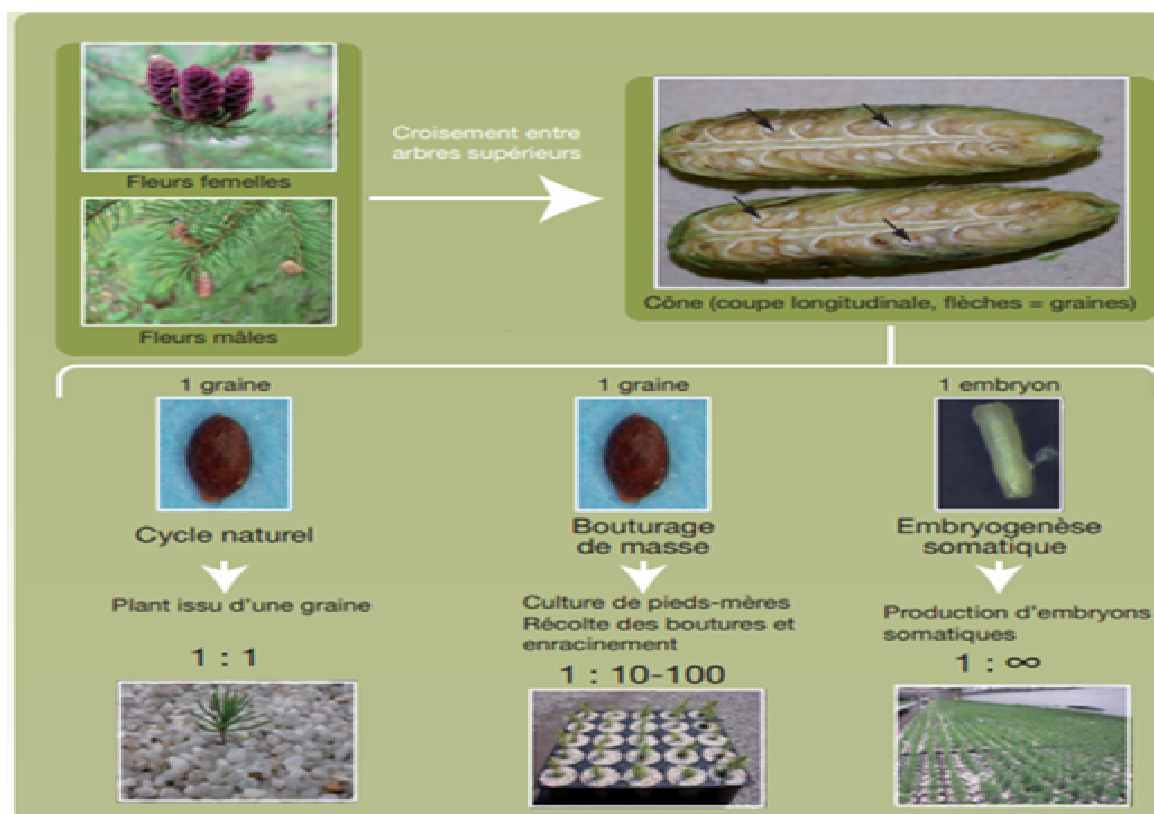


Figure 5. Techniques de production d'arbres améliorés (Tremblay et al., 2011)

3.3 . Les génétiques moléculaires

Les marqueurs génétiques sont essentiellement des séquences d'ADN qui sont indicatrices d'un ancêtre (origine) commun. Le défi des généticiens est alors de chercher les relations entre ces marqueurs et les caractéristiques des arbres issus de pedigrees ou de populations spécifiques (FAO, 2002)

Avec des interprétations correctes, les marqueurs génétiques sont sans commune mesure pour examiner les modèles de variation génétique entre et au sein des populations, pour évaluer les niveaux de croisements éloignés et consanguins, et pour l'identification génétique ou « prise d'empreinte génétique » de variétés ou de pedigrees (FAO, 2002).

Les données des marqueurs génétiques peuvent aussi être utilisées pour aider à la sélection précoce de meilleurs génotypes, plutôt que d'attendre que l'arbre exprime le trait longtemps après. Toutefois, la sélection assistée avec des marqueurs (sélection par marqueur assisté MAS) est encore appliquée de façon routinière dans les programmes d'amélioration des arbres, principalement du fait de contraintes économiques, c'est-à-dire les gains génétiques supplémentaires ne sont généralement pas assez grands pour compenser les coûts d'application de la technologie (FAO, 2002). Il est alors probable que la MAS ne sera uniquement appliquée que pour quelques d'espèces et situations,

Chapitre 3 les biotechnologies végétales appliquées aux ligneux

par exemple pour quelques-uns des principaux pins utilisés commercialement par exemple (Frewen et al., 2000) et des espèces d'*Eucalyptus*. Par conséquent, les marqueurs moléculaires constituent un outil d'information et ils sont utilisés pour situer l'ADN/gènes qui peuvent être intéressants pour la transformation génétique, ou des informations sur la structure des populations, systèmes d'accouplement et confirmation du pedigree (FAO, 2002).

chapitre4 . Enjeux entourant l'utilisation des biotechnologies végétales

En conférant à un organisme des caractères ou traits nouveaux, on a la possibilité d'augmenter la productivité agricole ou encore d'améliorer la qualité, la valeur nutritionnelle et la facilité de transformation des produits alimentaires, ce qui peut contribuer directement à promouvoir le développement humain, notamment sur le plan sanitaire (OMS, 2005).

Les caractères nouveaux dont sont porteurs les organismes génétiquement modifiés (OGM) peuvent toutefois présenter des risques directs pour la santé humaine et le développement. Beaucoup, mais pas la totalité des gènes et traits phénotypiques dont sont porteurs les OGM agricoles sont d'un genre nouveau et on ignore s'ils peuvent être utilisés sans risque dans l'alimentation. Au niveau international, des accords ont été conclus et des normes établies pour répondre à ces préoccupations (OMS, 2005).

4.1 .Des risques sanitaires croissants

L'utilisation des OGM engendre de nombreuses polémiques qui opposent les scientifiques mais aussi les groupes « pour » ou « contre » les OGM. Certains prônent les bienfaits des biotechnologies pour l'environnement, la santé, l'économie et les problèmes de manque de ressources alimentaires pour le futur avec l'expansion de la population, tandis que d'autres dénoncent le manque de connaissances scientifiques sur les effets à long terme de l'utilisation des OGM autant pour la santé humaine, que pour l'environnement et la société (Debuissy et Clément, 2002)

Les technologies utilisées pour transférer les gènes dans le génome d'une plante forment en fait une technique dans laquelle l'empirisme tient une part encore importante. Nous ne connaissons pas véritablement la manière dont les choses se déroulent au cœur du génome lors de la transgénèse. En fait, le processus lui-même reste encore aujourd'hui une "boîte noire" (Bellais, 1999). Le même auteur signale que les gènes réellement transférés se présentent comme une "pochette surprise", comportant bien sûr le(s) gène(s) désiré(s) mais aussi d'autres gènes qui ne sont pas forcément connus et dont les généticiens n'ont pas connaissance lors de la transgénèse.

Il existe de ce fait un risque non négligeable, mais encore incontrôlable, que la transgénèse rende possible le transfert de gènes non souhaités. La présence de ces gènes dans les plantes transgéniques est problématique, car ces gènes peuvent provoquer des effets secondaires imprévus et nuisibles pour les utilisateurs. Par exemple, les plantes transgéniques peuvent susciter une

allergénicité pour des plantes qui ne présentaient pas ce problème avant leur modification génétique (Bellais, 1999).

En 1996, l'International Food Biotechnology Council et l'Allergy and Immunology Institute de l'Institut international des sciences de la vie (ILSI) ont élaboré un arbre décisionnel pour déterminer l'allergénicité des aliments (Metcalf et al., 1996). Cette stratégie se base principalement sur :

- La source du matériel génétique transféré (cette source contient-elle des allergènes connus);
- L'homologie de séquence génique de la protéine nouvelle avec celle des allergènes connus (la séquence d'acides aminés de nombreux allergènes est connue);
- L'immunoréactivité de la protéine nouvellement introduite : réactivité avec les IgE sériques d'individus allergiques connus, si la protéine est dérivée d'une source allergisante connue ou présentant une homologie de séquence génique avec un allergène connu;
- L'effet du pH ou de la digestion : la plupart des allergènes sont résistants à l'acidité gastrique et aux protéases digestives;
- La stabilité à la chaleur ou au traitement : les allergènes labiles contenus dans les aliments qui sont mangés cuits ou soumis à un autre traitement avant consommation sont moins susceptibles de poser des problèmes (FAO,2000).

Le danger peut parfois être encore plus grand. La modification du génome d'une plante se fait par un transfert d'ADN ; or les généticiens connaissent seulement la fonction d'une infime partie du génome. Une grande part de l'ADN apparaît comme inactive, mais elle peut être activée par l'adjonction de nouveaux gènes. Comme le souligne l'INRA (1998), "une modification du métabolisme de l'OGM [organisme génétiquement modifié], induite par la propriété nouvelle, pourrait provoquer la présence de substances toxiques"

Les conséquences des manipulations transgéniques posent donc des enjeux de santé publique.

4.2 La résistance aux herbicides

Le rendement des cultures est affecté par les adventices ou mauvaises herbes. Les agriculteurs ont alors recours à des herbicides sélectifs pour éliminer les plantes indésirables. Mais, toutes les cultures ne sont pas aptes à supporter l'apport d'herbicides sans qu'il y ait un impact sur les récoltes. C'est pourquoi

des recherches ont été effectuées pour isoler le gène de résistance à un herbicide donné et le transférer aux plantes de cultures (Debuissy et Clément, 2002)

La résistance à un herbicide traduit la capacité qu'a un peuplement de mauvaises herbes de survivre à un traitement herbicide qui, sous des conditions d'utilisation normales, réussirait à le maîtriser efficacement. La résistance aux herbicides est un exemple d'évolution à un rythme accéléré et illustre le principe de la « loi du plus fort ». Les mauvaises herbes résistantes aux herbicides sont normalement très rares dans un peuplement. Le fait d'appliquer le même herbicide, dans le même champ, année après année, conduit à une sélection qui ne laisse que des plants résistants (Hugh, 2016).

L'augmentation de l'épandage des herbicides depuis que 71 % des plantes transgéniques ont acquis ces produits, tels que le glyphosate et le glufosinate, n'est pas sans poser des problèmes à l'environnement. Il était prôné par les firmes que le glyphosate (sécrété par les OGM Round up) était biodégradable et respectueux de l'environnement, alors que la réalité est tout autre (Séralini, 2000).

La résistance aux herbicides des peupliers est probablement la technologie de modification génétique la mieux développée pour les arbres forestiers (FAO, 2002). Le premier problème concernant les plantes génétiquement modifiées pour la résistance aux herbicides, est la preuve que les mauvaises herbes développent également une résistance. Le risque peut être moins important de façon substantielle en foresterie qu'en agriculture, car les herbicides ne sont seulement appliqués que durant une courte période et les applications sont moins nombreuses du fait que le contrôle total des mauvaises herbes n'est pas nécessaire dans les plantations forestières. L'introduction de la résistance aux herbicides avec la technologie de modification génétique est peut-être une des plus applicables aux arbres; toutefois, elle est possible pour quelques espèces bien développées seulement et dans certaines situations, telles que dans des exploitations intensives de fibres de peupliers (FAO, 2002).

4.3 Résistance aux insectes et aux agents pathogènes

Le développement de résistants génétiquement modifiés aux insectes est maintenant commun, mais il crée également quelques-unes des questions écologiques les plus complexes. La première question est celle de la toxicité possible des composants produits dans les plantes génétiquement modifiées pour la résistance aux insectes quand elles sont cultivées spécifiquement pour la consommation humaine, ou en foresterie sur des animaux non ciblés (FAO, 2002). Deuxièmement, il existe des préoccupations écologiques en ce qui concerne les croisements possibles avec des parents sauvages ainsi que l'évolution de la résistance dans les populations de nuisibles. De plus, la longue période nécessaire à la génération de la plupart des espèces d'arbres permet à

de nombreuses générations de populations d'insectes de provoquer un mécanisme nouveau de résistance simple gène (FAO, 2002).

Cinq insectes ont acquis, au champ, une résistance à l'une des protéines insecticides de la famille Cry. Les plantes génétiquement modifiées (PGM) concernées sont des maïs et des cotons, cultivées en Afrique du Sud, en Inde, ou aux Etats-Unis (Meunier, 2013).

L'apparition de telles résistances est, le fruit d'une exposition accrue des insectes cibles aux cultures de PGM censées les tuer (Tableau 4). Les insectes sont porteurs de gène(s) impliqué(s) dans l'activité des toxines Bt. Au sein d'une population, certains individus peuvent être porteurs d'une forme (appelée allèle) de ces gènes qui confère une résistance à ces toxines (Meunier, 2013).

Or, « avant que les populations d'insectes ne soient exposées aux protéines Bt, les allèles conférant une résistance sont rares » au sein d'une population. Mais, à force d'être exposés à une protéine insecticide Cry, la sélection naturelle conduira l'allèle conférant une résistance à être présent chez un nombre de plus en plus grand d'individus, les autres étant éliminés (Meunier, 2013). Selon le même auteur, le jour où 50% d'entre eux sont porteurs de ce(s) gène(s), la population d'insectes sera considérée comme devenue résistante.

Tableau 4. Hypothèses émises pour retarder la résistance des insectes (Debuissy et Clément, 2002)

Création des plantes exprimant plusieurs toxines de la bactérie	Création des zones de refuge
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conférer un spectre d'activité plus large ; ▪ Il faudrait aussi faire en sorte que l'OGM sécrète l'insecticide seulement quand ce dernier est attaqué par le ou les insectes, en rajoutant certaines séquences géniques spécifiques. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Des plantes qui ne sécrèteraient pas d'insecticide afin que les insectes non résistants puissent se développer sans subir de sélection ; ▪ Ralentissement l'effet de transmission de résistance ; ▪ L'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) recommande une stratégie de gestion de la résistance pour le maïs Bt et la culture de pomme de terre Bt.

Le tableau suivant résume les trois types de risques des OGM.

Tableau 5. Les risques des OGM (Debuissy et Clément, 2002)

<i>Les risques à la santé humaine</i>	<i>Les risques environnementaux</i>	<i>Les risques Economique</i>
<p>Risques toxiques qui sont liées à la nature des produits, la modification des métabolismes et l'augmentation du taux de pathogènes sur les plantes génétiquement modifiées (Kahn et al., 1997) ;</p> <p>Risques allergiques, le type le plus courant d'allergie alimentaire est induit par des anticorps constitués d'une immunoglobuline E (IgE) spécifique à l'antigène ;</p> <p>Les allergies alimentaires induites par les IgE affectent 2,5 % de la population (Anderson, 1996).</p>	<p>La prolifération dans l'écosystème d'espèces végétales transgéniques ;</p> <p>L'effet sur l'équilibre des populations d'insectes domestiques et sauvages ;</p> <p>Les effets sur l'environnement de l'augmentation de l'épandage des herbicides ;</p> <p>Le transfert horizontal d'ADN notamment aux bactéries du sol (Khan et al., 1997).</p>	<p>La crainte et l'incertitude de la population et/ou de certains pays face aux OGM et à leurs produits dérivés ;</p> <p>Risques liés à la culture sur de grandes surfaces des plantes transgéniques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - La perte d'efficacité des herbicides totaux ; - Les plantes productrices de toxines insecticides peuvent favoriser également l'émergence de populations d'insectes résistants.

Tous les OGM ne sont pas créés égaux. Les deux traits actuellement sur le marché des biotechnologies sont la résistance aux herbicides et la résistance aux insectes. Ces traits sont de toute évidence fort différents, mais le gros du rapport les met sous la même étiquette « plantes OGM » (Benbrook, 2011).

Conclusion générale et recommandations

Les biotechnologies végétales fournissent toute une gamme d'outils qui améliorent notre compréhension des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture et, partant, leur gestion. Ces outils contribuent déjà aux programmes de sélection et de conservation en facilitant le diagnostic, le traitement et la prévention des maladies des plantes et des animaux mais lors de l'application de ces techniques, il faut exploiter rationnellement les ressources phytogénétiques pour ne pas engendrer des dégâts ou des pertes de biodiversité.

Les végétaux sont modifiés génétiquement afin de résister aux stress biotiques et abiotique, tels que les agents pathogènes, la sécheresse, mais aussi pour résister aux stress humains, tels que l'épandage des herbicides et les méthodes d'exploitation et de transport.

L'objectif principal de ce mémoire de master est de faire une synthèse bibliographique sur les biotechnologies végétales et leurs méthodes d'application dans les programmes d'amélioration génétique des plantes et la conservation des ressources phytogénétiques.

De cette analyse bibliographique, il ressort que, les techniques biotechnologiques appliquées aux végétaux ont une grande importance dans l'amélioration efficace et rapide des plantes, dans la protection des cultures et la préservation de l'environnement. Les biotechnologies offrent des outils importants pour le diagnostic phytosanitaire des maladies parasitaires. Elles permettent de créer plus rapidement qu'avec les méthodes conventionnelles, des variétés rustiques, résistantes à des maladies, et demandant moins d'intrants ou les valorisant mieux. Ces techniques modernes proposent des solutions à deux problèmes, en modifiant génétiquement les plantes, il est possible d'améliorer les qualités agronomiques des plantes et d'accroître leur résistance aux maladies et aux insectes. Cette révolution comporte donc deux avantages, les plantes améliorées génétiquement possèdent une résistance naturelle ce qui réduit spontanément les pertes, et il n'est plus nécessaire d'utiliser des quantités aussi importantes de traitements chimiques, ce qui réduit les pollutions résiduelles. Toutefois, il est indispensable

d'évaluer l'importance des risques éventuels des biotechnologies pour l'environnement. C'est ainsi qu'il faudrait considérablement intensifier l'étude des effets que peuvent avoir sur l'environnement les techniques de génie génétique et la dissémination d'organismes génétiquement modifiés.

La science ne peut pas déclarer une technologie, qu'elle soit, totalement exempte de risques. Les cultures issues du génie génétique peuvent réduire certains risques pour l'environnement liés à l'agriculture conventionnelle; toutefois, elles introduiront aussi de nouveaux défis, qu'il faudra affronter. C'est à la société qu'il appartiendra de déterminer dans quelles circonstances le génie génétique présente la sécurité voulue (FAO, 2004).

Les biotechnologies telles la cryoconservation, la production de semences artificielles, l'embryogenèse somatique et d'autres formes de cultures *in vitro* de cellules ou de tissus végétaux, sont aussi largement employées pour la conservation des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans les pays en voie de développement. Selon la FAO⁵, les facteurs clés de la réussite des biotechnologies agricoles dans les pays en voie de développement reposent sur : le développement de politiques appropriées, le renforcement de la recherche et des institutions de vulgarisation et l'amélioration des capacités scientifiques et techniques.

Les biotechnologies sont une véritable fenêtre d'opportunité pour contribuer à rendre les ressources naturelles plus durables. Les évolutions technologiques en cours permettent d'espérer que dans les années à venir une vague d'innovations variétales aidera l'agriculture à relever le triple défi du XXI^e siècle : produire plus, respecter l'environnement et s'adapter au changement climatique (Ricroch, 2017). Il faut cependant être conscient que la bonne utilisation de ces technologies dans les programmes d'amélioration génétique des plantes passe par une gestion raisonnée et une meilleure connaissance des ressources phytogénétiques disponibles.

⁵ <http://www.fao.org/biotech/sectoral-overviews/biotech-crops/fr/>

Références bibliographiques

1. Akim, L.G., Argyropoulos, D.S., Jouanin, L., Leple, J.C., Pilate, G., Pollet, B. & Lapierre, C., 2001. Quantitative P-31 NMR spectroscopy of lignins from transgenic poplars. *Holzforschung*. 55:386-390.
2. AsantOwsus.R., 1999. An overview of GM technology in the forest sector. A scoping study for WWF-UK (International Conservation Programme) & WWF International (Forest for Life Program).34 p. disponible sur: www.panda.org/forests4life/
3. Bellais.R.,1999. la révolution biotechnologique quand le débat éthique masque les enjeux économique et industriel. Univ. Litt-cote d'opale. Lab.RII. N12.38p
4. Benbrook.CM., 2001.Troubled times amid commercial success for Roundup Ready soybeans: glyphosate efficacy is slipping and unstable transgene expression erodes plant defenses and yields. AgBioTech InfoNet, Technical Paper No 4, <http://www.biotech-info.net/troubledtimes.html>.
5. Benmahioul B., 2009. Amélioration de la micropropagation *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.) en vue de l'extension des vergers en Algérie. Thèse de Doctorat en Biotechnologie végétale, USTO – Oran, 129p + annexes. http://www.univ-usto.dz/theses_en_ligne/doc_num.php?explnum_id=2299
6. Benmahioul B., 2015. La culture *in vitro* des tissus végétaux. Principes et Techniques. *Presses Académiques Francophones*, 76p. (www.presses-academiques.com)
7. Benmahioul B., Dorion N., Kaid-Harche M., Daguin F., 2012. Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 108 : 353–358 (www.springerlink.com/content/h46408038q264130/)
8. Benmahioul B., Kaid-Harche M., Daguin F., 2015. Cryopreservation of *Pistacia vera* embryonic axes. *J. FOR. SCI.*, 61(4): 182-187 (<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/150166.pdf>)
9. Benmahioul B., Kaid-Harche M., Daguin F., 2016. *In vitro* regeneration of *Pistacia vera* from nodal explants. *J. FOR. SCI.*, 62(5): 198-203 (<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/185153.pdf>)
10. Bérenger. E., 2000.Les AGM : un nouveau risque pour les forêts. Dossier “Les forêts ont-elles besoin des biotechnologies ? ”. *Biofutur*, n° 199, p :19-21.
11. Bouattoura.N.,1988. Les ressources phytogénétiques : importances, préservation, utilisation, programme en cours., *Ann.Inst.Nat.Agro.El-Harrach*, vol :12(1), p :43-69
12. Bouzou.N et Marques.C.,2015. Les biotechnologies végétales : éléments incontournable du nouveau cycle de croissance.42p

13. Brookes.M., 1998. Running Wild. New Scientist, 31 Octobre.
14. Burdon, R.D, 1994. The role of biotechnology in forest tree breeding. Forest Genetic Resources, 22: 2-5. FAO, Rome.
15. Burdon, R.D., 1999. Risk-management issues for genetically engineered forest trees. New Zealand Journal of Forest Research, 29:375-390.
16. Burke, S.W., 2001. Responding to new trees and to the issues at hand: The institute of forest biotechnology. In: Proc. of the First Symposium on Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations. S.H. Strauss and H.D. Bradshaw, eds. College of Forestry, Oregon State University. pp. 62-69. [www.fsl.orst.edu/tgerc/iufro2001/eprocd.pdf]
17. Burke.D., 1998.Why All The Fuss About Genetically Modified Food?. British Medical Journal, vol.316
18. CBD., 2000. Cartagena Protocol on Biosafety. Convention on Biological Diversity. Disponible sur Internet à <http://www.biodiv.org/biosafe/Protocol/Protocol.html>
19. Charrier A.,1989. Approche internationale de la conservation des ressources phylogénétiques. Les nouvelles technologies : quels impacts sur l'agriculture et l'agro-alimentaire ?. In: Économie rurale. N°192-193, pp. 131- 133
20. Chevallier.D.M.,1990. Rapport sur les applications de biotechnologie à l'agriculture et l'industrie agro-alimentaire. Agr.Brevets.Bio.Env. Centre génétique. 117p
21. Cornu D., Leplé J.-C., Pilate G. Aura-t-il bientôt des forêts transgéniques ? In : Organismes génétiquement modifiés à l'INRA : Environnement, Agriculture et Alimentation
22. De Vienne. D., 1998.Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Versailles: INRA Éditions.200 p.
23. DiFazio, S.P., Leonardi, S., Cheng, S. & Strauss, S.H. 1999. Assessing potential risks of transgene escape from fiber plantations. In: Proc. of Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops, 72: 171-176.
24. Disponible sur Internet à: http://www.ucalgary.ca/~wleiss/news/trouble_with_science.htm
25. Engelmann.F,2010., Conservation des ressources génétiques du palmier dattier, IRD Éditions p :161-174 [Biotechnologies du palmier dattier - Conservation des ressources génétiques du palmier dattier - IRD Éditions \(openedition.org\)](http://www.ird.fr/publications/biotechnologies-du-palmier-dattier-conservation-des-ressources-genetiques-du-palmier-dattier-ird-editions)
26. Engelmann.F., 2004 – Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40 : 427-433.

- 27.Engelmann.F., 2009 – Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. *Acta Hortic.*, 812 : 63-82.
- 28.Engelmann.F., TAKAGI H., 2000 – *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm Current Research Progress and Applications*, JIRCAS, Tsukuba/IPGRI, Rome.
- 29.FAO ,2011. Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture sur la situation et évolution des biotechnologies appliquées à la conservation et à l'utilisation des ressources génétiques et questions pertinentes pour leur développement futur. 3^{ème} session ordinaire. Rome, juillet 17p
- 30.FAO,1993.valorisation la diversité de la nature “biotechnologie et biodiversité” VALORISONS LA DIVERSITÉ DE LA NATURE (fao.org)
31. FAO,2002. Le rôle et les implications de la biotechnologie en foresterie. Bri. For. Ser.N204 (52) :52-62
- 32.FAO.,2012. L'état des ressources génétiques forestières mondiales. Rapport national Algérie. Rome : FAO. Consulté le 03 juin 2021 accessible sur le site <http://www.fao.org/3/i3825e/i3825e0.pdf>
- 33.french-Constant, R. & Bowen, D., 1999. Photorhabus toxins: novel biological insecticides. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 284-288.
- 34.Forest Stewardship Council (FSC)., 1999.Principles and criteria for forest stewardship. Internet document (<http://www.fsc-uk.demon.co.uk/PrinciplesCriteria.html>)
- 35.Frewen, B.E., Chen, T.H.H., Howe, G., Davis, J., Rohde, A., Boerjan, W., & Bradshaw, H.D. Jr., 2000. QTL and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics*, 154: 837-845.
- 36.Gallais.A,2020. Biotechnologie végétale et biodiversité. *Rev. Science et pseudo-science*. N331
- 37.GONZALEZ-ARNAO M. T., ENGELMANN F., 2006 – Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique : review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27: 155-168.
- 38.Guller, G., Komives, T. & Rennenberg, H. 2001. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *Journal of Experimental Botany*.
- 39.Hakman. I. Fowke.L, Arnold S. Von ., Eriksson .T.,1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science*, 38, p: 53-59.
- 40.Institut national de la recherche agronomique.,1998. Les Organismes Génétiquement Modifiés, Panorama et contribution de l'INRA

41. Lapiere, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Lepage, J.C., Boerjan, W., Ferret, V., De Nadai, V. & Jouanin, L.,1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology*, 119: 153-162.
42. Le Conseiller pour la Science et la Technologie.,2006. Les biotechnologies vertes.8p. Microsoft Word - SMMO6_076.doc (gouv.qc.ca)
43. Leiss, W., 1999. The trouble with science: public controversy over genetically-modified foods. Presented at the Eastern Regional Meetings of the Canadian Society of Plant Physiologists, Kingston, Ontario, Canada, 12 December 1999.
44. Lepage.J.-C., Pilate.G., Jouanin.L.,1999. Transgenic poplar trees (*Populus* species). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* / Y.P.S. Bajaj Ed. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo : Springer-Verlag, p: 221-244 (vol. 44).
45. Lepoivre.P.,1998. les biotechnologies végétales appropriées dans le contexte du dialogue Nord-Sud. *Biotechnol.Agron.Soc.Environ.*3(1), 42-48
46. Lévêque.C, et Mounolou.J,2008., *BIODIVERSITE dynamique biologique et conservation.*, 2eme édition DUNOD, paris. P : 12
47. Meilan.R., Han.K.-H., Ma.C., Eaton.J.A., Hoiene.E.A., Stanton.B.J., Crockett.R.P., Taylor.M.L., James.R.R., Skinner.J.S., Jouanin.L., Pilate.G., Strauss.S.H., 2002.The CP4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup herbicide in field-grown hybrid poplars.*Canadian Journal of Forest Research*, vol. 32,p :967-976.
48. Merkle, S.A. & Dean, J.F.D. 2000. Forest biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 298-302.
49. OECD. 2000. Biotechnology regulatory developments in OECD member countries. Organisation for Economic Co-operation and Development (Internet document (<http://www.oecd.org/ehs/country.htm>))
50. OMS,2005. Biotechnologie alimentaire moderne et santé. [5 \(who.int\)](http://www.who.int)
51. Pâques.M., Bercetche.J.1995. Multiplication végétative : micropropagation - embryogénèse somatique.P. Boxus Ed.Rennes : CNED-Aupelf-Uref, p :117-179.
52. Pâques.M., et Bercetche. J.,1998. Procédé de rajeunissement des gymnospermes par embryogénèse somatique.PCT/FR98/03381,.
53. Pâques.M., et Bercetche.J.,1995. Multiplication végétative : micropropagation - embryogénèse somatique / P. Boxus Ed..— Rennes : CNED-Aupelf-Uref,. — pp. 117-179.

54. Pilate.G, paques.M, leplé.J, et plomion.C, 2002., les biotechnologies chez les arbres forestiers. Rev.For.Fr.Liv. v :2, 20p
55. Pilate.G., Guiney.E., Holt.K., Petit-conil.M., Lapierre.C., Leplé.J.-C., Pollet .B., Mila.I., Webster.E.A., Marstorp.H.G., Hopkins.D.W., Jouanin.L., Boerjan.W., Schuch.W., Cornu.D., Hlpin.C.,2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. Nature Biotechnology, vol. 20, p: 607-612.
56. Pilate.G., LepléJ.-C., Cornu.D., Lelu.M.-A.,1999. Transformation in larch (*Larix* species). In : Biotechnology in Agriculture and Forestry / Y.P.S. Bajaj Ed. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo : Springer-Verlag, p: 125-141. Plomion.C., 1996. La Sélection assistée par marqueurs chez les arbres forestiers. Informations Forêt, n° 83, fiche n° 8536,.
57. Pilate.G.,1999. Transformation des végétaux par *Agrobacterium tumefaciens*. In : Principes des techniques de biologie moléculaire / D. Tagu Ed.— Paris : INRA Éditions, pp. 77-80.
58. Plomion.C., Durel.C.-E., VerhaegenD.,1996. Utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers : exemple du Pin maritime et de l'Eucalyptus. — Annales des Sciences forestières, vol. 53, n° 8, p : 819-848.
59. REED B.M., 2008 – *Plant Cryopreservation – A Practical Guide*. New York : Springer.
60. Roberds, J.H. & Bishir, J. 1997. Risk analysis in clonal forestry. Canadian Journal of Forest Research, 27: 425-432.
61. Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B. & Merkle, S.A. 1998. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. Nature Biotechnology, 10: 925-928.
62. Sakai.A., et Engelmann.F.,2007.vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification : a review. Cryoletters, 28 :151-172
63. Santos, M. de Miranda & Lewontin, R.C. 1997. Genetics, plant breeding and patents: conceptual contractictions and practical problems in protecting biological innovations. IPGRI Plant Genetic Resources Newsletter, 112:1-8.
64. Smith.R.D., 1999. Successful Rejuvenation of Radiata pine. — 25th Southern forest tree improvement conference, IUFRO Working Party 2.02.20, New Orleans, Louisiana, USA, p. 21.
65. Strauss, S.H. & H.D. Bradshaw. 2001. Tree biotechnology in the new millennium: International symposium on ecological and societal aspect of transgenic plantations. Oregon State University. (<http://www.fsl.orst.edu/tgerc/iufro2001/eprocd.htm>)

66. Tree Genetic Engineering Research Cooperative (TGERC). 1999. TGERC highlights of 1998-1999. Document Internet (<http://www.fsl.orst.edu/tgerc/1998-99.htm>)
67. Withers, L.A., et Engelmann, F., 1998. In vitro conservation of plant genetic resources. In: Altman A, ed. Biotechnology in agriculture. New York, Marcel Dekker Inc : 57-88
68. Yifan, H. & Jianjun, H. 2001. Field evaluation of insect-resistant transgenic *Populus nigra* trees. In: Proc. of the First Symposium on Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations. S.H. Strauss & H.D. Bradshaw, eds. College of Forestry, Oregon State University. (<http://www.fsl.orst.edu/tgerc/iufro2001/abstract.htm>)