

#### 1-Objectifs des biotechnologies végétales (ou vertes)

## Créer des nouvelles variétés de plantes:

## Adaptées <u>aux besoins de l'agriculteur</u>:

-mieux adaptées aux techniques culturales, aux conditions climatiques, plus résistantes aux maladies, une meilleure efficacité racinaire, meilleur rendement...

#### Adaptées <u>aux besoins du consommateur</u> (homme, animal):

-avec de fortes teneurs en protéines ou en métabolites spécialisés, homogènes d'un point de vue qualité, présentant une aptitude à l'alimentation humaine ou animale...

Alicaments

#### Adaptées <u>aux utilisations non alimentaires</u>:

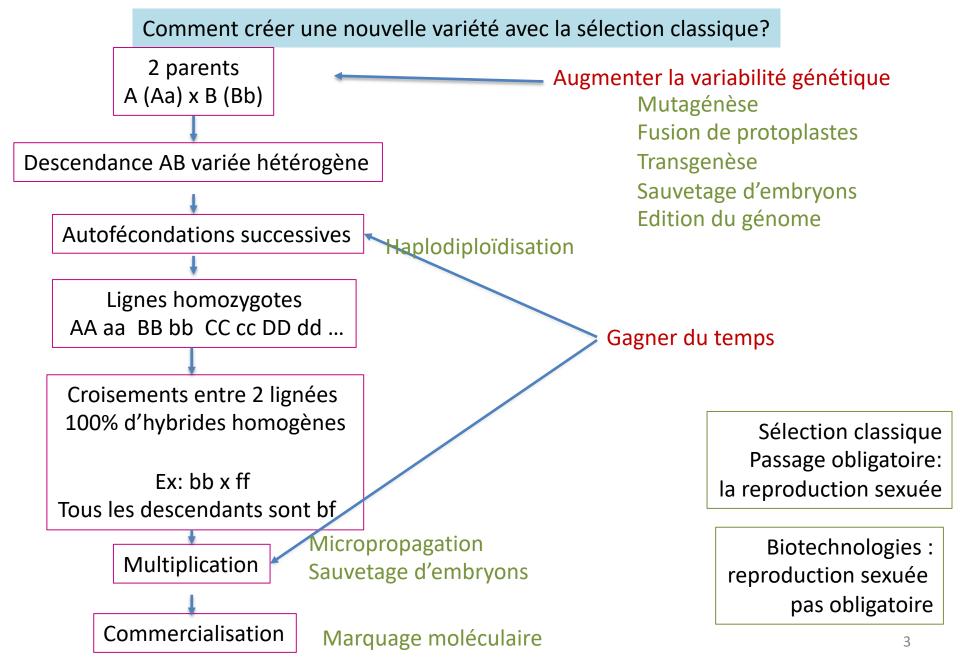
-produisant des molécules thérapeutiques, produisant des matières renouvelables pour la chimie, piégeant dans le sol des polluants comme les métaux lourds...

#### Produire des métabolites

Métabolites spécialisés d'origine végétale ou autre Intérêt en pharmacologie, cosmétique, agroalimentaire, biocontrôle..

On n'a pas attendu les biotech pour créer de nouvelles variétés de plantes!

Avant on faisait de la sélection classique et encore avant de la sélection massale (jusqu'en 1863)



Du croisement initial à la commercialisation de la variété: 12 à 17 ans sont nécessaires

## Objectifs des biotechnologies végétales

Définition des biotechnologies végétales

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

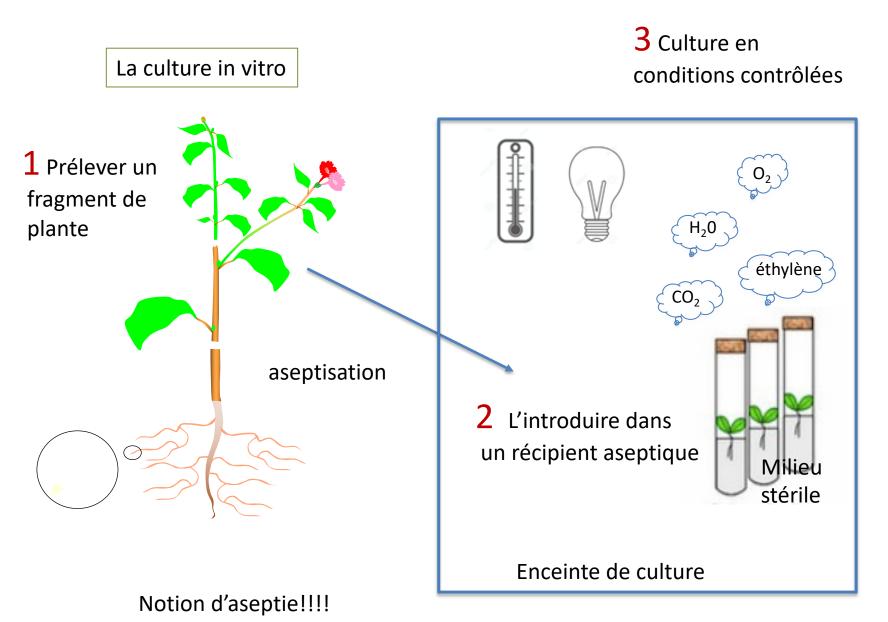
Ceci est lié à une propriété fondamentale qu'ont les cellules végétales: la totipotence cellulaire

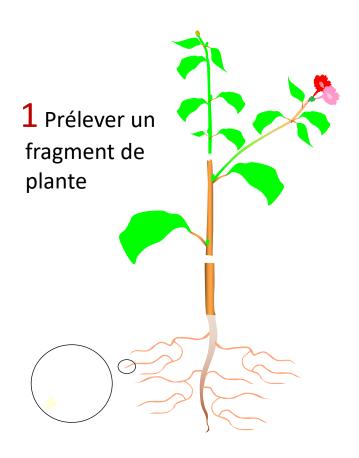
Concept énoncé par Haberlandt en 1902 Vérifié plus tard par la découverte des hormones végétales

C'est la capacité de certaines cellules ou groupes de cellules prélevées sur un organe quelconque de plantes, de régénérer un individu complet et normalement constitué, au travers d'un processus de :

- -Dédifférenciation
- -Multiplication
- -Différenciation cellulaire

Chez les végétaux, toutes les cellules sont totipotentes. Chez les mammifères, l'<u>ovocyte</u> fécondé et chaque cellule fille (blastomère) de l'embryon pendant les toutes premières divisions cellulaires sont les seules vraies cellules totipotentes





N'importe quel fragment de plante= explant

Plantes de serre ou du milieu naturel

#### Aseptisation

Utiliser des solutions désinfectantes

Eau de javel = hypochlorite de Na: 2 à 12%

Hypochlorite de Ca: 50 à 100g/L

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 10 à 30 %

Ethanol 70%

Chlorure mercurique 0,1%

••••

Concentration/Durée d'action

Des prétraitemetns des plantes mères peuvent être envisagés (fongicide...)

## Méthodologies générales: 1- prélever un fragment de plante

#### Petite histoire de la culture in vitro

1902, Haberlandt, chercheur allemand, énonce le concept de la totipotence cellulaire végétale.

Il réussit à faire survivre in vitro, quelques mois, de petits amas cellulaires (poils staminaux ou glanduleux ou des fragments d'épiderme) mais sans multiplication.

1932, White (U.S.A.), réussit une culture de racines de tomates.

1934, Gautheret, en France, cultive et multiplie des cellules cambiales de saule en introduisant des auxines dans le milieu.

1939, Gautheret réussit des cultures indéfinies de tissus de carotte.

1944, Buvat par les techniques de culture de tissus met en évidence le phénomène de dédifférenciation: la rejuvénation.

1949, Limasset et Cornuet notent l'absence de virus dans les méristèmes de tabacs virosés.

1952, Mettant à profit les travaux précédents, Morel et Martin à l'I.N.R.A. de Versailles, régénèrent des plantes entières saines de Dahlia, variété «le Rêve» indemne de virus à partir de culture de méristèmes de plants infectés par trois virus différents. De la même manière ils sauveront la variété de pomme de terre "la Belle de Fontenay" en 1954.

1954, Muir obtient les premières cultures de cellules isolées à partir de cals friables, cultivées en milieu liquide agité.

1957, Skoog et Muller régénèrent des racines et des tiges à partir de cals sous l'influence de l'auxine et de cytokinine.

1958, Stewart et Reinert obtiennent des embryons somatiques de carottes à partir de culture de racines

et mettent ainsi en évidence le principe de totipotence cellulaire énoncé par Haberlandt en 1902.

1962, Murashige et Skoog mettent au point pour des cultures de tissus de tabac le fameux milieu de culture M.S. utilisé largement en culture *in vitro*.

1964, Guha et Maheshwari, en Inde, obtiennent des plantes haploïdes de Datura innoxia Mill. à partir de culture d'anthères.

1971, Au Japon, Takebe régénère des plantes entières de *Nicotiana tabacum* à partir de protoplastes.

1972, Carlson obtient le premier hybride somatique interspécifique par fusion de protoplastes entre différentes espèces de tabac..

1976, San Noeumdans (l'équipe du Pr. Demarly à Orsay) réussit la première culture d'ovaires d'orge non fécondés.

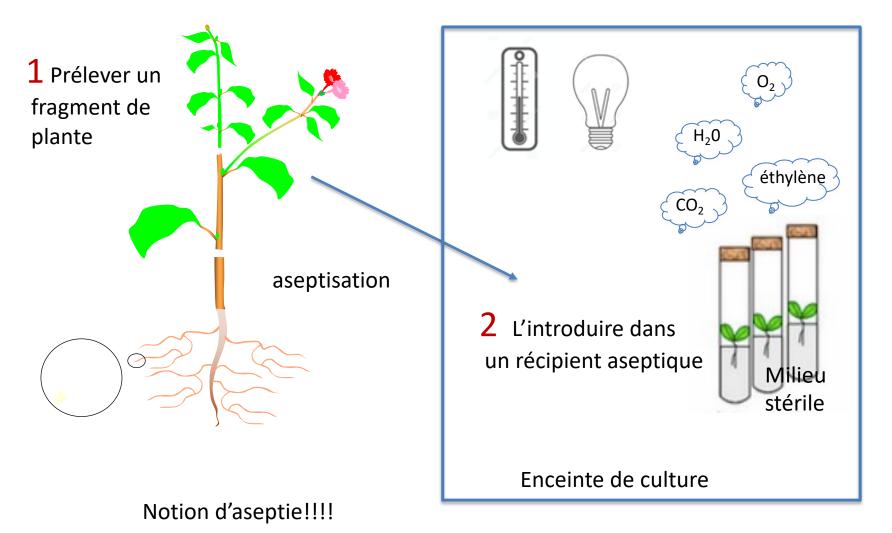
Cette même année, Seibert réussit à initier des pousses d'œillets à partir d'apex conservés à -196°C.

C'est le début de la cryoconservation pouvant être utilisée pour la constitution de banques de gènes.

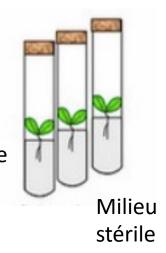
1983, Van Montaigu crée en Belgique les premières plantes transgéniques transformées par Agrobacterium tumefaciens.

La culture in vitro

3 Culture en conditions contrôlées



2 L'introduire dans un récipient aseptique



Récipients adaptés à la taille des explants et leur sa façon de se développer



Autoclavables ou jetables

Autoclavage Matériel 134°C pdt 35 min Milieux 121°C pdt 20 min ou 115°C pdt 25min

#### Milieux de culture

- -Eau
- -éléments minéraux (macro, micro et Fer-Edta)
- -vitamines
- -source de carbone (saccharose)

#### +Hormones

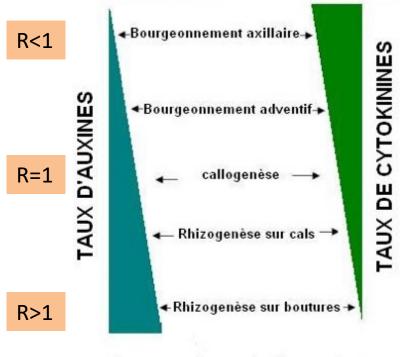
- -Auxines: AIA; ANA; 2,4-D;
- -Cytokinines: BA ou BAP; Kin; TDZ;
- -Gibbérellines: AG<sub>3</sub>

#### Milieux

- -liquides
- -solides : ajout d'un agent gélifiant

Ex: Agar,

## Rapport Auxine/Cytokinine



Organogenèses modulées par des taux relatifs d'auxines et de cytokinines

Stérilisation des milieux : -par autoclavage (121°C pdt 20min ou 115°C pdt 25min)

-par filtration (0,2µm) pour les éléments thermolabiles

#### Eléments minéraux

<u>Les macroéléments minéraux:</u> N, P, K, Ca, Mg, S Fournis sous forme de sels

N: nitrate  $NO_3^-$  et ammonium  $NH_4^+$   $NH_4NO_3$  Dans le nombreuses molécules ADN, hormones, alcaloïdes...

P: phosphate PO<sub>3</sub>- Dans l'ATP

K: sous forme d'ions libres et mobiles K+ dans la plante Rôle osmotique

Ca: dans les parois et les membranes Perméabilité membranaire

Mg: sous forme de MgCl<sub>2</sub> Activateur enzymatique

S: sous forme d'ions sulfate  $SO_4$  Dans les protéines

<u>Les microéléments minéraux</u>: Zn, B, Mn, Cu, Co, Fournis sous forme de sels Ni, AL, Mo, Rôles variés CuSO<sub>4</sub> par ex

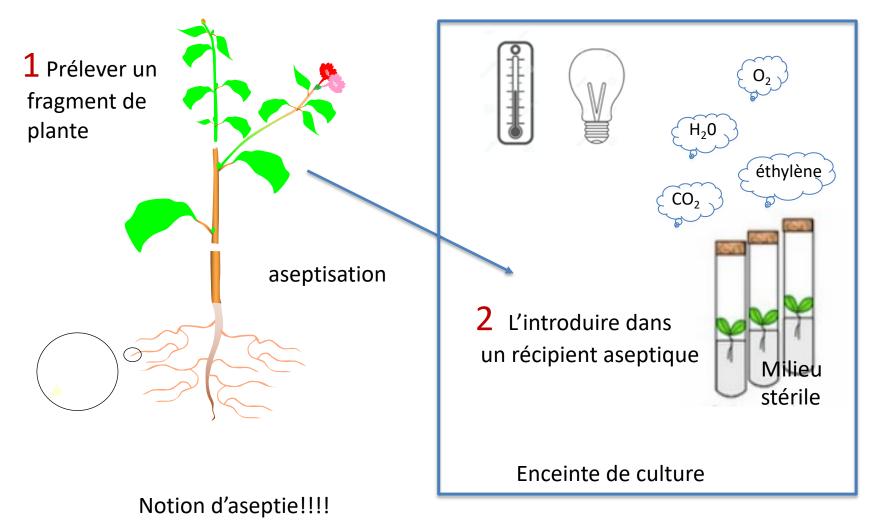
<u>Le Fer</u>: non assimilé par les plantes sous forme de sel fourni sous forme chélatée (par un agent chélateur : l'EDTA)

Transfert d'électrons

Milieux de Murashige et Skoog (1962) : milieu MS de Gamborg (19): milieu B5

La culture in vitro

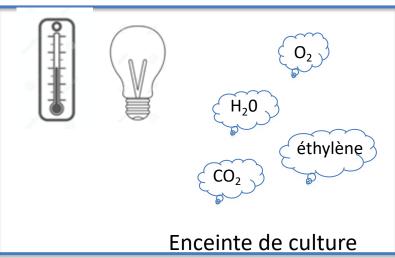
3 Culture en conditions contrôlées



Le transfert de l'explant végétal dans le récipient aseptique qui renferme le milieu de culture stérile se fait sous hotte à flux laminaire



# 3 Culture en conditions contrôlées



#### <u>Lumière:</u>

Photopériode

Qualité de la lumière

(bleu caulogenèse, rouge rhizogenèse)

Energie

<u>Température</u>

Thermopériode

#### Echanges gazeux

Dépendent de la taille récipient et du mode de capuchonnage

#### 3- Les technologies de clonage

#### a- La micropropagation

Permet de multiplier les plantes rapidement en grande quantité = clonage

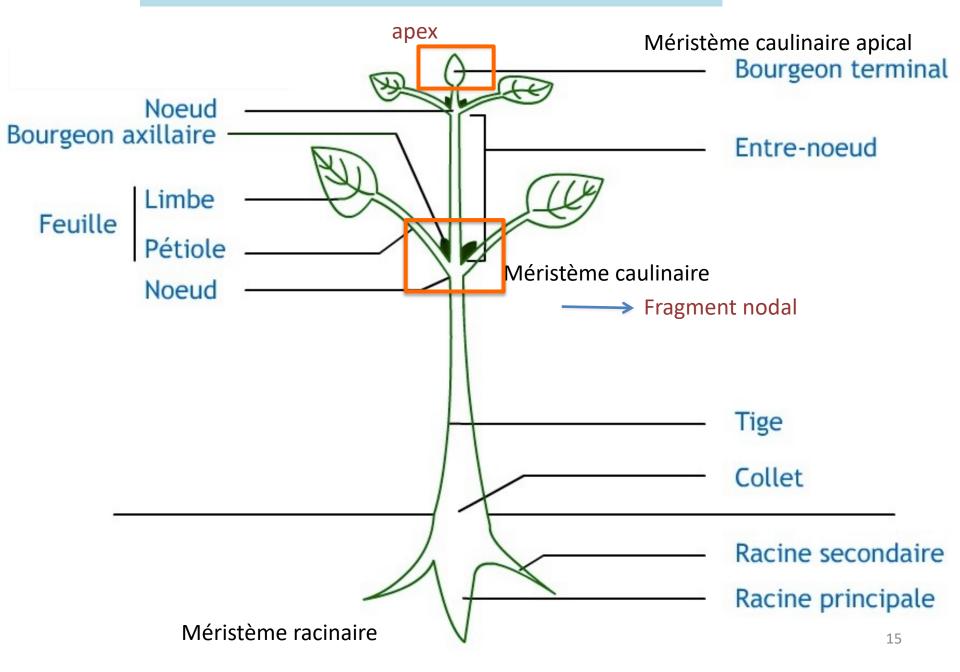


- Nécessite 4 étapes: 1- Phase initiale (prélèvement de l'explant et mise en CIV)
  - 2- Phase de multiplication (obtention de nombreux bourgeons)
    Milieu avec A/C < 1
  - 3- Phase de développement (enracinement des bourgeons)
    Transfert sur milieu avec A/C > 1
  - 4- Phase d'acclimatation (sortie des plantes d'in vitro)

#### 2 stratégies différentes:

Explants avec ou explants sans méristèmes Dépend de l'espèce végétale

#### La micropropagation: à partir d'explants avec méristèmes



#### Culture de fragments nodaux



Cela peut concerner les plantes pour lesquelles il y a une dominance apicale (due aux auxines endogènes)

Comme il y a dominance apicale, l'enracinement est simultané,

Milieu sans hormones ou avec un peu de BAP (cytoK)

C'est le bourgeon axillaire qui se développe et qui donne une tigelle

En TP: cactus, menthe, stévia, p de t

Ex: Pomme de terre

#### Division de touffe

## Pour les plantes qui n'ont pas de dominance apicale

Phase de multiplication

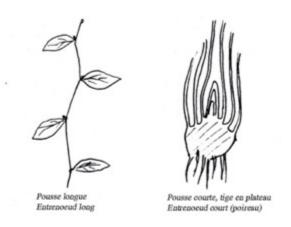


Milieu + Cytokinines

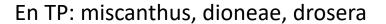
Phase de développement



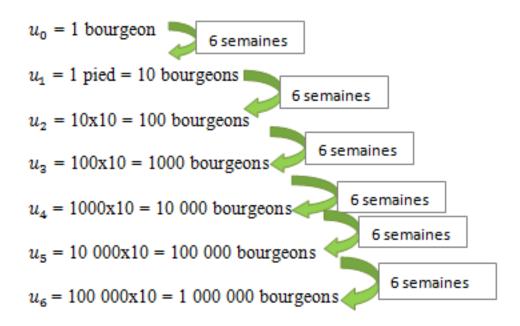
Milieu + Auxines







#### Multiplication des plantes rapidement et en grande quantité= micropropagation

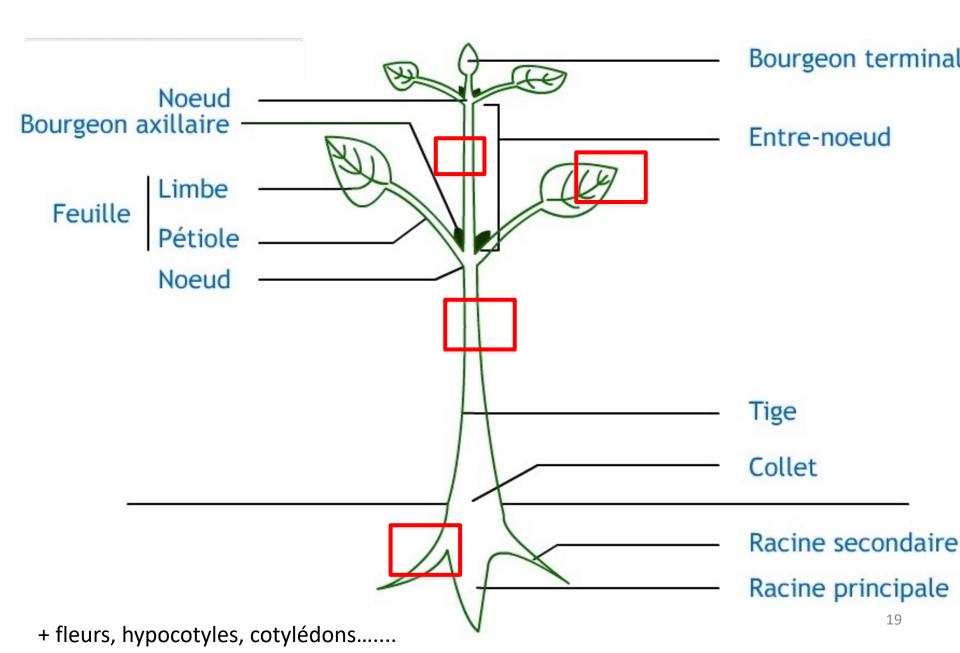


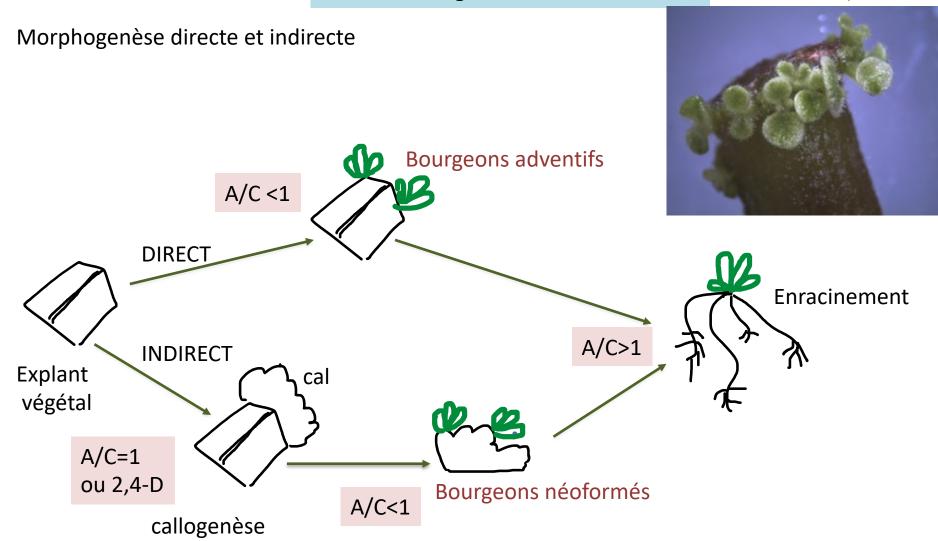
St paulia

Bourgeonnement axillaire



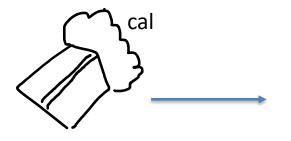
## La micropropagation: à partir d'explants sans méristèmes





Dépend des milieux et des espèces

## Les suspensions cellulaires



Milieu liquide Agitation

2,4-D



Cals houblon





Suspension cellulaire Chicorée

Régénération possible à partir de cellules cultivées en suspension Multiplication abondante

## Avantages / Inconvénients

## Explants avec méristèmes / Explants sans méristèmes

Dépend du nb de méristèmes (cas du palmier)

Multiplication limitée

Pas de risque de dérive génétique

Multiplication conforme

Nb d'explants infini

Multiplication infinie

Risque de variabilité génétique qui augmente avec les phases de multiplication cellulaire (callogenèse)

Possibilité de multiplication non conforme

### Les technologies de clonage

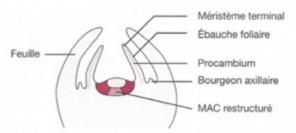
#### b- culture de méristèmes

Permet: -Elimination des virus

-Multiplication des plantes

-Rejuvénilisation (plantes ligneuses )

-Multiplication des plantes récalcitrantes (orchidées)



Film sur You Tube: la guérison des plantes par la culture de méristèmes

https://youtu.be/zb05RDMP0Tg

Version anglaise: Production of healthy plant materials by shoot tip meristem culture

https://youtu.be/cD9CFtpLL2s





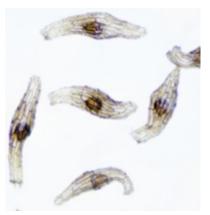
Méristème caulinaires



#### Cas des orchidées



### Plantes difficiles à multiplier

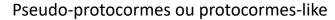


graines

La mise en culture d'un méristème conduit à la formation d'un pseudoprotocorme

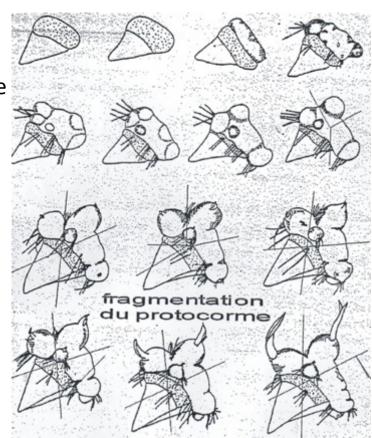
Capacité de multiplication très grande (infinie)

Chaque protocorme est capable de donner un plante





vitroplant



Cas des ligneux

Ce sont des plantes dont la plupart des tissus sont lignifiés (tiges, pétioles) par la lignine qui transforme les tissus en bois

Les arbres sont des plantes récalcitrantes Difficiles à cultiver à cause de la lignine



Dissection des bourgeons et mise en culture sur milieu adapté Cela conduit au développement de jeunes pousses herbacées

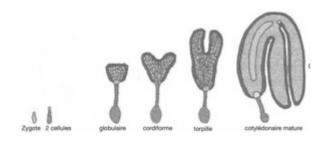
Phénomène de rajeunissement ou rejuvénilisation



#### Les technologies de clonage

#### c - L'embryogenèse somatique

Capacité des cellules végétales cultivées in vitro de générer des embryons à la place des bourgeons

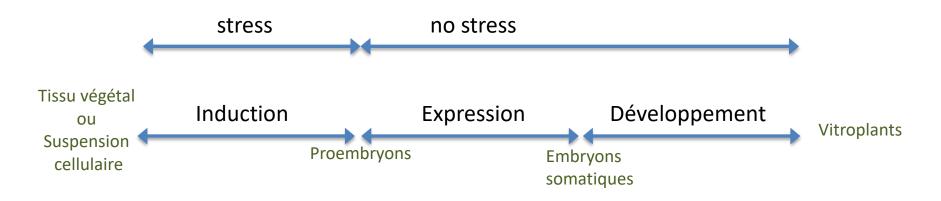


Les embryons somatiques sont morphologiquement identiques aux embryons zygotiques

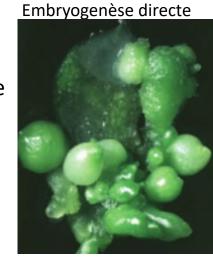
Découvert chez la carotte sauvage en 1958 par Reinert et Steward

Embryogenèse zygotique

Nécessité d'un stress pour induire les embryons somatiques: auxinique, thermique, mécanique....



L'embryogenèse somatique Peut être directe ou indirecte



Cal embryogène



Embryogenèse indirecte



Production en masse



Culture en bioréacteurs



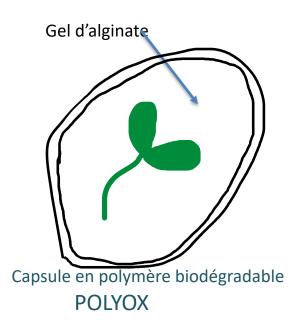
On peut à partir de suspensions cellulaires produire de très grandes quantités d'embryons somatiques

Carotte	15L	600000 à 8 millions d'ES/L
Café	5L	490000 ES/L
Céleri	30L	80000 ES/L

Une mécanisation de la production et culture des embryons somatiques est possible

#### Semences artificielles





Les embryons sont particulièrement bien adaptés à la création de semences artificielles Gain de place, homogénéité, clones

Leur induction est abondante, leur développement est synchronisé et homogène le développement est plus rapide (méristèmes caulinaires et racinaires présents dès le début )

Pb: Difficulté à contrôler la dormance et la germination des embryons Différences physiologiques entre les ES et les EZ

Beaucoup d'hormones et phase de multiplication : pb de conformité?

#### Acclimatation

Le succès ultime de la civ dépend de la capacité à transférer les plantes in vivo (à grande échelle)

In vitro = micro-environnement différent du milieu naturel

In vitro
Humidité relative 100%
Environnement stérile
Substrat gélosé

In vivo Humidité relative 60% Microorganismes en quantité Terre +/- légère

Amener progressivement à une atmosphère moins humide (brumisation en serre, miniserres...)

Laver les plantes (surtout les racines) à l'eau pour éliminer le milieu de culture

Utiliser un substrat adapté, léger (tourbe par ex)

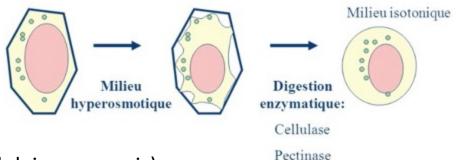
TP: amener une ou 2 petites bouteilles pour transfert de plantes à récupérer (cactus, saint paulia, menthe, stévia, dionées...)

#### c – la fusio de protoplastes

Les protoplastes = Cellules sans paroi

Les parois empêchent la fusion cellulaire ou l'introduction de matériel étranger (ADN, RNP)

Obtention par macération de tissus végétaux dans solution enzymatique hyper-osmotique Enzymes : pectinase, cellulase Agent osmotique: sucre-alcool (mannitol)



N'importe quel tissu végétal (suspensions cellulaires compris), jeune ou avec capacité de régénération, stérile

Nécessité d'enlever l'épiderme des tissus végétaux pour faire pénétrer les enzymes

Après macération dans solution enzymatique, filtration et centrifugations pour éliminer les enzymes et ensuite mise en culture

#### Culture des protoplastes







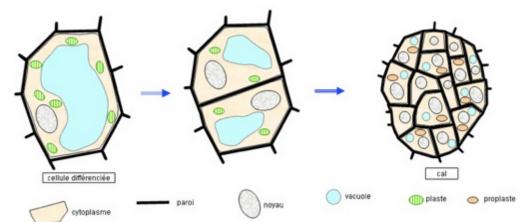
Milieu favorisant la callogenèse Donc équilibre A/C

Culture en milieu liquide

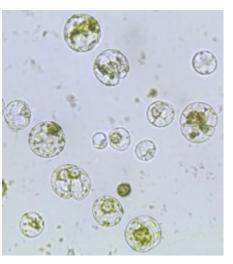
Culture en milieu semi-liquide : protoplastes incorporés dans un gel d'alginate puis alginate placé dans du milieu liquide

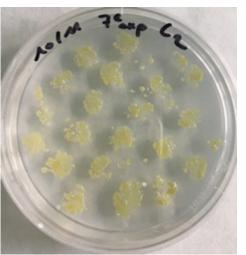
Culture nourricière culture en bicouche: pour les protoplastes récalcitrants une couche de cellules à forte capacité de division recouverte par une culture de protoplastes et séparées par une membrane

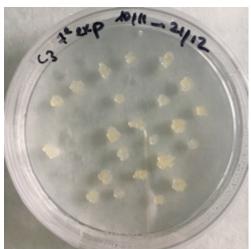
Cela conduit à l'obtention de micro et mini-cals

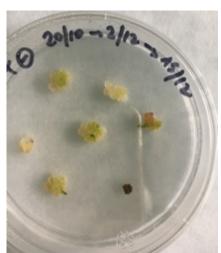


## Culture de protoplastes













Les protoplastes présentent plusieurs propriétés: ils sont cultivés en grand nombre ils sont doués de totipotence cellulaire ils n'ont pas de paroi

Cela permet: micropropagation, mutagenèse, fusion de protoplastes, transfection, CRISPR<sup>32</sup>

#### La fusion de protoplastes

Protoplastes = cellules chargées négativement donc se repoussent

Conséquence: provoquer l'accolement des protoplastes avant la fusion

Deux phases: accolement et fusion

#### Deux méthodes:

chimique

PEG 4000 30%

Substance tensioactive

<u>électrique</u>

Courant alternatif 0,5 à 1,5 MHz

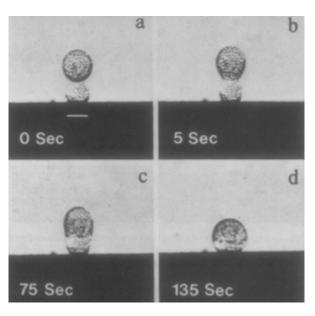
Neutralisation des charges négatives

CaCl2 pH élevé

Courant continu: choc électrique 1 à 3KV qq µs

Formation de pores transmembranaires (nb et taille)

La fusion conduit à la formation d'hétérocaryons



#### Devenir des hétérocaryons?

#### Comparaison Zygotes / Hétérocaryons

#### **Zygote**

Ségrégation des caractères nucléaires ½ M + ½ P

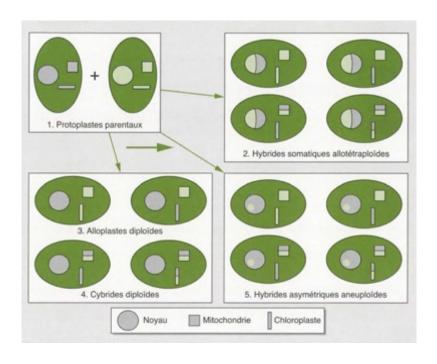
Transmission maternelle des mitochondries et des chloroplastes

M

#### <u>Hétérocaryon</u>

Renfermes les deux génomes parentaux M + P

Addition des organites Cytoplasmiques M + P



L'hétérocaryon est plus riche (2N+2m+2c), génétiquement parlant, que le zygote (1N+1m+1c)

Comment évolue-t-il ensuite quand on le met en culture?

Cela dépend des 2 espèces que l'on fusionne

Au fur et à mesure des divisions, il va y avoir élimination de matériel génétique

Si les 2 espèces
fusionnées
sont proches

Les noyaux fusionnent
2n+2n =4n
Hybrides somatiques

Les mitochondries fusionnent

Création variétale

S

Un des deux types chloroplastiques est éliminé

Ex: agrumes

Si les 2 espèces fusionnées sont plus éloignées

Les noyaux fusionnent puis élimination de x chromosomes d'un parent : spontanément ou de manière provoquée

2n + y chr

Hybrides asymétriques

idem

Introgresser des caractères ponctuels d'espèces sauvages

Ex: résistances aux maladies Solanacées, Brassicacées

Si les 2 espèces fusionnées sont très éloignées

Les noyaux ne fusionnent pas 2n

Cybrides

idem

Transférer des caractères cytoplasmiques

Ex: male stérilité cytoplasmique, résistance à des herbicides

## **Applications**

Création variétale chez les citrus Hybrides <u>somatiques</u>

Citron, pamplemousse, orange etc

facteurs qui limitent la reproduction sexuée : polyembryonie, stérilités femelles...



Transferts de résistance à des virus chez la pomme de terre PVY

Fusion asymétrique Solanum tuberosum + Solanum brevidens
Irradiation (gamma) des protoplastes de S brevidens
2 à 17 des 24 chromosomes de S. b. sont éliminés





Transfert de la résistance à l'atrazine (herbicide) chez le colza cybridisation Fusion avec une navette canadienne

Induction de la stérilité male cytoplasmique chez la chicorée

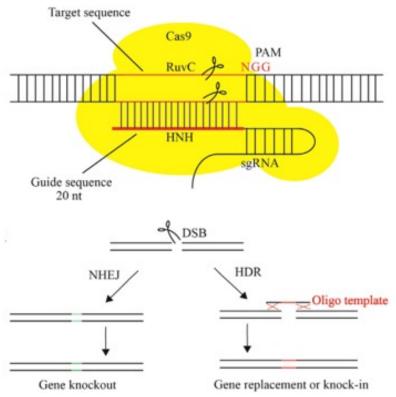
cybridisation

Fusion tournesol + chicorée





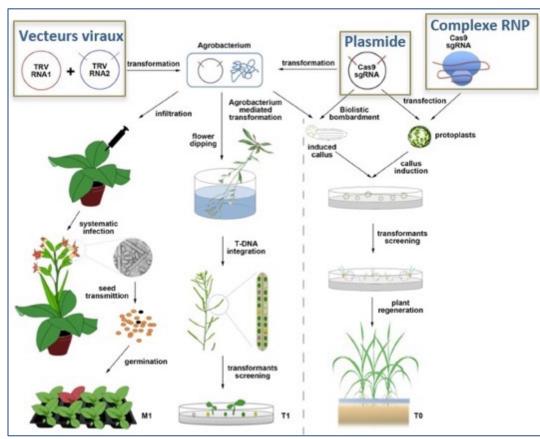
## d- mutagénèse ciblée (Edition du génome)



Intégration dans le génome ou expression transitoire

Utilisation des protoplastes: Intéressant car pas d'intégration dans le génome

#### CRISPR/Cas9



## La cour de justice de l'Union européenne se prononce sur les nouvelles méthodes de sélection



La directive OGM réglemente la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Le 25 juillet 2018, la cour de justice de l'Union européenne a statué sous quelles conditions, les plantes obtenues à l'aide de nouvelles méthodes de sélection relèvent du droit du génie génétique.

Image: H. Flannery

Selon les directives OGM (2001/18/CE), un organisme est un organisme génétiquement modifié (OGM) si son matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement. Toutefois, une annexe aux directives exempte les organismes mutagènes des directives OGM.

"Mutagenèse" désigne les procédés permettant d'altérer le matériel génétique d'une espèce sans qu'aucun ADN étranger ne soit inséré. La cour de justice européenne a maintenant statué que les nouvelles méthodes de sélection telles que l'édition du génome (par exemple à l'aide du système CRISPR/Cas9) ne relèvent pas de cette exception. Les plantes produites par ce procédé sont donc considérées comme des organismes génétiquement modifiés et entrent donc dans le domaine d'application des directives sur les OGM.

Mais.....

#### NBT= CRISPR/Cas9

## NBT= New breeding techniques = nouvelles techniques de sélection

« LES NBT NE SONT PAS DES OGM »

15 janvier 2021

Dans un entretien accordé le 7 janvier à Agra presse, Les Marchés et <u>Réussir.fr</u>, le ministre de l'Agriculture prend position en faveur des nouvelles biotechnologies de sélection variétale (NBT) et d'un nouveau cadre réglementaire adapté.

« Les NBT, ce ne sont pas des OGM, estime Julien Denormandie. Ce sont des technologies qui permettent d'accélérer la sélection végétale. Cette technologie permet de faire apparaître plus tôt une variété qui aurait pu apparaître naturellement à un moment donné, et c'est très bien. C'est très différent d'un OGM, qui est d'abord une plante - et non une technique - obtenue en allant chercher un gène d'une espèce pour la transférer dans une autre, ce qui n'arrive pas dans la nature. »

Le ministre de l'Agriculture se dit en attente de la proposition que doit rendre en mai la Commission européenne, à la demande des États membres, sur l'opportunité de révision la réglementation couvrant les NBT, aujourd'hui soumises à la réglementation OGM pour celles apparues après 2001.

« Il faut que les NBT aient une réglementation conforme à ce qu'elles sont, et pas à ce à quoi on voudrait les associer », plaide Julien Denormandie. « Aujourd'hui, le cadre juridique européen n'est plus compatible avec le cadre scientifique. Nous attendons un rapport de la Commission européenne pour mettre en concorde les deux cadres. »

Mathieu ROBERT (AGRA Presse