

Les cultures *in vitro* des tissus végétaux

(Résumé des chapitres 1, 2 et 3)

Qu'entendons nous par "CULTURE *IN VITRO*" ?

La culture *in vitro* permet d'utiliser toutes les potentialités régénératrices d'une plante : "toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue".

Les cultures *in vitro* faisant intervenir :

- 1- l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants)
- 2- des conditions de culture parfaitement Contrôlées (température, lumière et surtout *milieux de culture*).

Principales application de la culture *in vitro*

- Meilleur contrôle des agents pathogènes
- Production de jeunes plants clonés et de qualité;
- Rapidité accrue de la mise en marche de nouvelles variétés;
- Conservation des RG pour les espèces à multiplication végétative;

Le Milieu de culture

➤ **Composition chimique :**

- Les sels minéraux : les macroéléments (N, P, K, Ca, Mg et S) et les oligoéléments (Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co et Mo)
- Les substances organiques : sucres (La saccharose est le sucre employé universellement, Viennent ensuite par ordre d'importance le glucose, le maltose, le raffinose, le fructose, le galactose, le mannose et le lactose. La concentration employée pour le saccharose est de 20 à 45 g/l.), Vitamines (Thiamine, acide nicotinique, méso-inositol, Riboflavine, Vit. B6, Vit E, etc.), acides aminés (glutamine, asparagine, etc.) ; Les régulateurs de croissance (Auxines comme l'Acide Indole-3- Acétique, l'Acide Naphtalène acétique, le 2,4D: Acide 2,4 Dichlorophenoxyacétique, les Cytokinines comme la Zéatine, la Kinétine, la BAP: 6-benzylaminopurine et les Gibbérellines, la GA3 la plus utilisée)
 - Les produits naturels : lait de coco par exemple

➤ **Qualité physique :**

Milieu liquide/ Milieu solide, Choix du gélifiant et de la quantité (agar-agar, agarose,...), pH

Comment choisir le milieu de culture adéquat

Les paramètres nutritionnels pour choisir un milieu:

- *- Richesse en Azote, en potassium et calcium de la solution minérale adoptée.
- *- Équilibre en l'azote nitrique et l'azote ammoniacal : NO₃⁻/NH₄⁺.
- *- Pression osmotique de la solution minérale qu'on appelle aussi concentration ionique totale.

LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE LA CULTURE *IN VITRO*

Les techniques de culture *in vitro* utilisent la propriété de **Totipotence** des cellules végétales mise en évidence en 1902 par Haberlandt : « **toute cellule vivante, quelque soit sa spécialisation, possède l'information génétique nécessaire pour reconstituer toutes les parties d'un végétal.** »

*Les cultures *in vitro* peuvent être initiées à partir de presque toutes les parties de la plante (figure).

*La source originale du matériel végétal peut déterminer le succès de la mise en place de la culture : **Utiliser des plantes saines et vigoureuses comme source d'explants.**

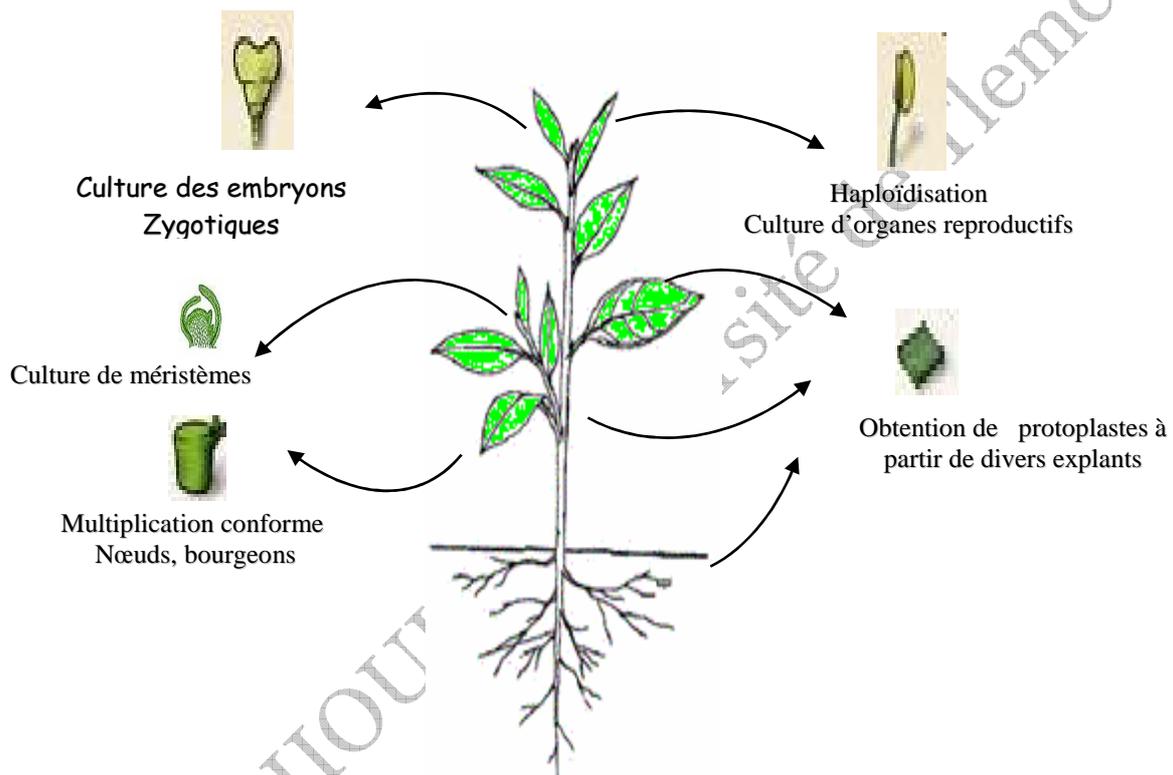


Figure 1 - les différentes techniques de culture *in vitro*

On distingue généralement deux voies de multiplication : conforme et non-conforme :

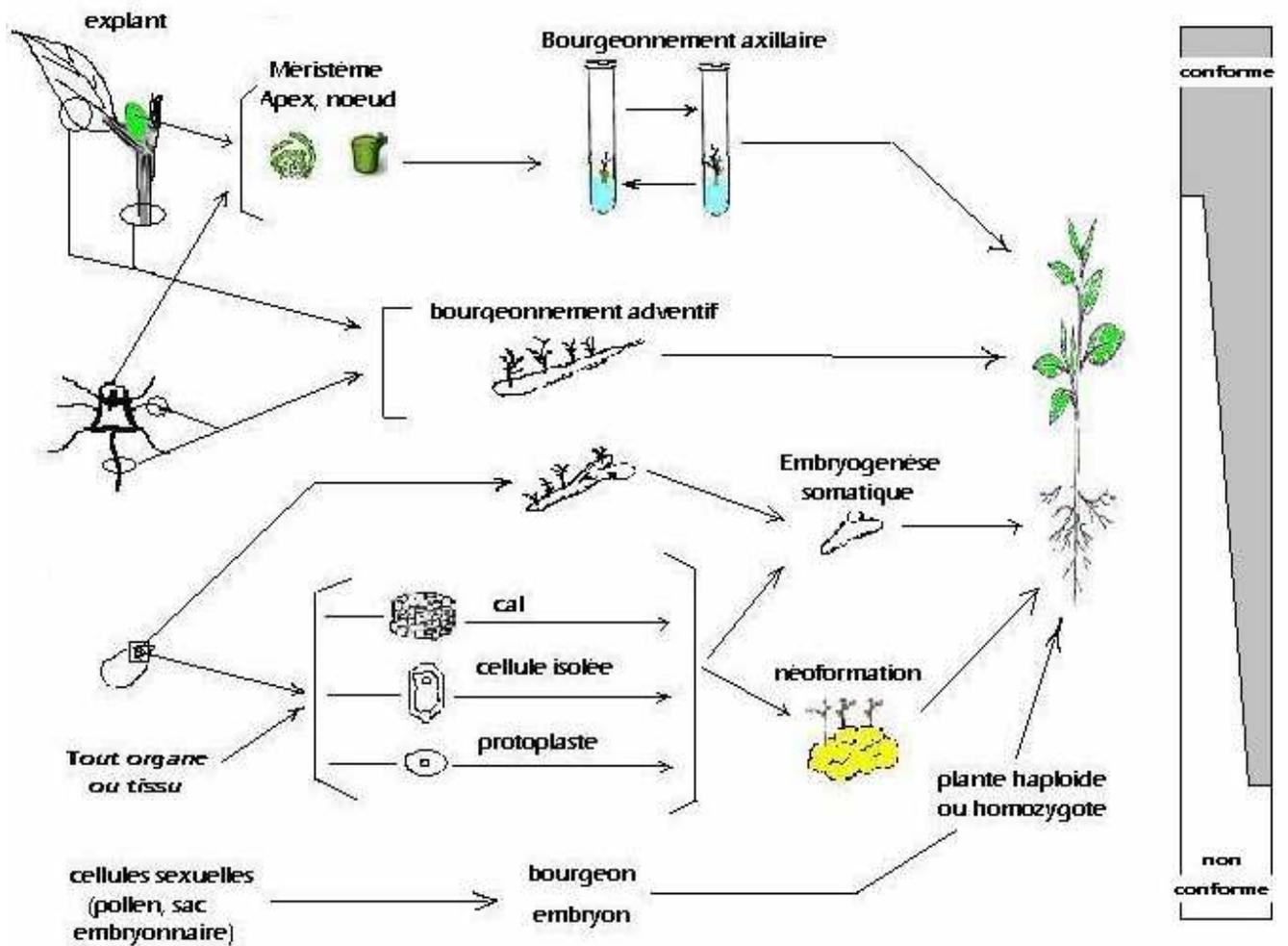


Schéma de la multiplication végétative *in vitro* par bourgeoisement axillaire :

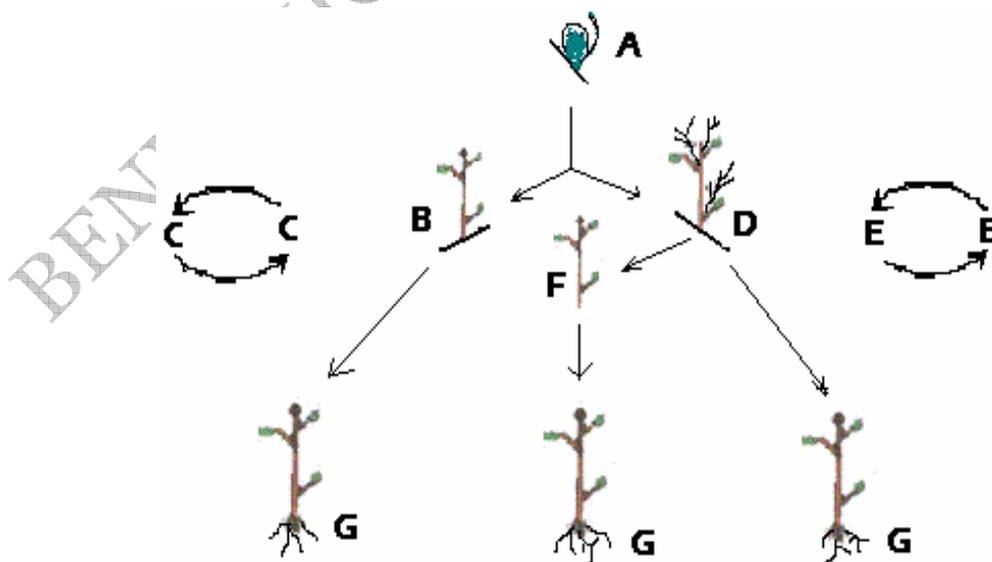
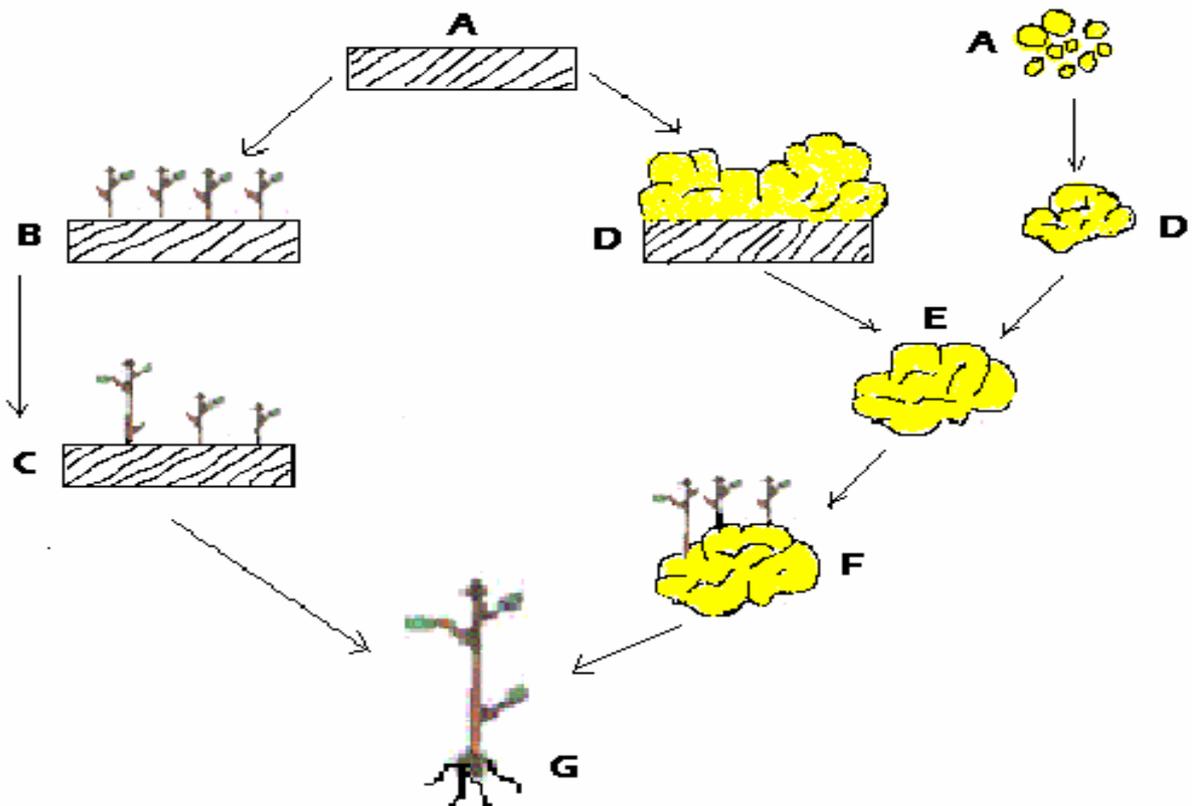


Schéma de la multiplication végétative *in vitro* par bourgeonnement adventif :



MICROPROPAGATION

Intérêt de la Technique

- *- **l'homogénéité génétique des plantes produites** : les microboutures obtenues sont des copies conformes, semblables à la plante mère.
 - *- **la production rapide et en masse**, à n'importe quel moment de l'année. Grâce à son **coefficient de multiplication élevé**, la micropropagation réduit considérablement les investissements par rapport aux techniques conventionnelles.
 - *- Elle permet de **réduire également les espaces de serre** nécessaires au stockage des plants.
- D'un autre côté, le microbouturage permet de **stocker en banque de gènes** le matériel génétique et de relancer la culture quand cela est nécessaire.

Principales phases de la micropropagation

La micropropagation *in vitro* peut suivre 3 ou 4 étapes essentielles :

1- Établissement de la culture

- **le choix du matériel végétal à mettre en culture** : sa nature (bourgeons, noeuds,.); **son âge et sa physiologie**, sont autant de paramètres importants qui conditionnent la réussite de la culture.

- **l'âge de la plante mère** sur laquelle on va prélever l'organe à cultiver (surtout chez les essences ligneuses), a une grande importance.

Après le choix du matériel végétal à mettre en culture (nature d'organe, sain et juvénile), ainsi **l'époque de son prélèvement**, vient une autre étape importante avant sa mise en culture. Il s'agit de **la phase de préparation des organes ou tissus : la désinfection**.

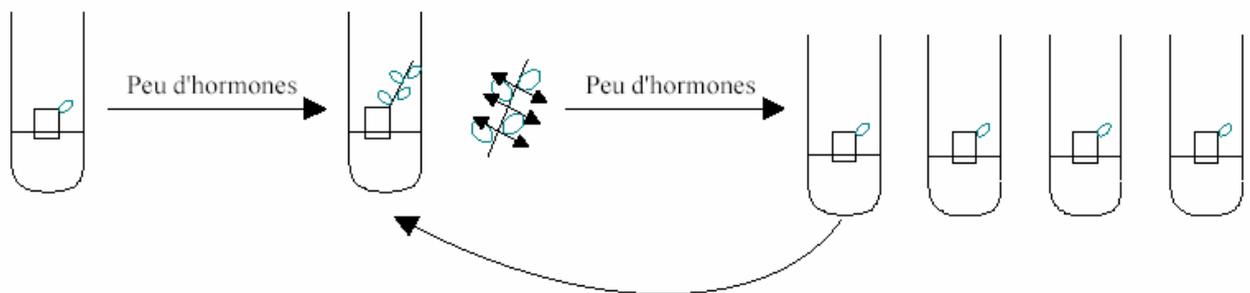
En plus du problème de réactivité qui détermine la réussite de la micropropagation chez la plupart des essences végétales, **le problème de contaminations** reste un facteur limitant notamment chez les espèces ligneuses

2- phase de multiplication

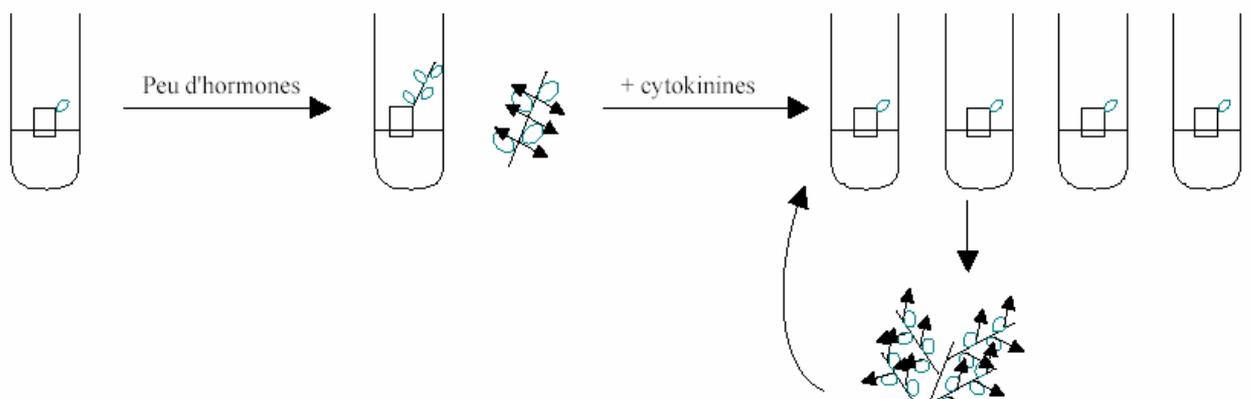
Cette étape est nécessaire pour que l'explant initial qui a donné un ou deux bourgeons soit multiplié en grand nombre. Cette multiplication se fait le plus souvent par **bourgeonnement axillaire**.

Cette étape nous permet de **multiplier de façon intense** le matériel de départ (diminuer le coût de la culture), de **travailler toute l'année** en conditions totalement artificielles, sans oublier la possibilité de **stocker au froid le matériel végétal** en constituant une **banque de gènes**.

Culture simple de nœuds : le bouturage *in vitro*



Prolifération de pousses axillaires



3- phase d'élongation ou d'allongement

- Cette phase est très importante pour faciliter la dernière étape d'enracinement. Elle peut être dans certains cas facultative et ça dépend de l'espèce végétale qu'on cherche à multiplier.
- En règle général, un milieu de culture équilibré et enrichie en gibbérelline est indispensable pour la transformation des microboutures et leur allongement

4- phase d'enracinement (Rhizogenèse)

- La rhizogenèse est parfois facilement obtenue sur un **milieu d'induction racinaire en ajoutant des auxines**. Les plus utilisées sont : AIB AIA ANA seules ou en mélange.
- Après l'induction, ces microboutures sont transférées sur un nouveau milieu pauvre ou dilué et sans aucun régulateur de croissance : c'est **l'expression racinaire**.

Chez certaines plantes, cette **phase est très délicate**. C'est le cas de la plupart des **essences ligneuses**.

Acclimatation

La dernière étape consiste à adapter progressivement les microplants aux conditions auxquelles ils seront exposés à l'extérieur : c'est le **stade de l'acclimatation**.

Après leur transfert dans un substrat horticole, les parties aériennes sont recouvertes d'une bâche en plastique pour maintenir une atmosphère saturée en eau, afin d'éviter une déshydratation trop rapide. Cette bâche est enlevée progressivement après deux à trois semaines.

Applications

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

CULTURE DES MÉRISTÈMES

Les méristèmes sont des petits massifs de cellules indifférenciées, qui conservent la capacité de se diviser. Lorsqu'ils sont mis en culture, leur capacité de prolifération et leur potentialité d'organogenèse permettent la reconstitution de plantes entières.

Les études de Limasset et Cornuet réalisées en 1949 à partir des plants infectés de tabac ont montrées que le nombre de particules virales décroît

régulièrement des parties anciennement formées vers les parties apicales : **les feuilles contenues dans le bourgeon apical renferment 150 fois moins de virus que les feuilles moyennes.**

La culture de méristèmes a été utilisée avec succès pour l'assainissement de plantes telles que la pomme de terre, la vigne, la tomate et autres ... Donc, il est indispensable de recourir à **la culture de méristèmes pour produire des plantes saines et indemnes de virus en particulier.**

Intérêt de la technique

La propagation par méristème se réalise le plus souvent pour :

- l'étude du fonctionnement du méristème;
- La reconstitution de clones sains à partir des plantes mères contaminées;
- La propagation végétative avec un coefficient multiplicatif très élevé;
- Le rajeunissement des espèces végétales et l'obtention des plants plus vigoureux.

On s'oriente vers la culture de méristèmes dans les cas suivants :

- pour les espèces végétales à propagation végétative, la probabilité d'infection de la plante mère virosée à sa descendance est très grande.
- pour les espèces végétales multipliées par semis où le pourcentage de transmission des virus par semences est élevé

Culture d'embryons zygotiques

Intérêt de la technique

Le **sauvetage** et le développement **d'embryons peu viables** dans des conditions naturelles, issus par exemple de certains croisements interspécifiques.

Le sauvetage d'embryons consiste à prélever un embryon précocement (immature), pour le cultiver *in vitro*. Il permet de raccourcir la durée du cycle végétatif (de l'embryon à la floraison) et de réduire fortement les phénomènes de dormance.

D'un autre côté, la culture d'embryons permet une **multiplication rapide des croisements contrôlés**. La pollinisation artificielle (contrôlée) est une voie longue et coûteuse ; elle ne donne qu'un nombre limité de semences. Par la culture d'embryons, on peut améliorer et augmenter les résultats de cette fécondation en multipliant les graines obtenues

HAPLOÏDISATION

1- Qu'est-ce que l'haploïdisation ?

- Les plantes haploïdes sont issues de la culture des organes reproducteurs mâles ou femelles immatures, voire même de cellules sexuelles (pollen, ovules) sans fécondation.

- **Les plantes obtenues n'ont qu'un seul lot de chromosomes** au lieu de 2 normalement, qui est doublé généralement par voie artificielle (par des substances chimiques telles que la colchicine par exemple) afin qu'elles deviennent fertiles.

2- Les étapes de l'haplodiploïdisation

Elle se réalise en deux étapes principales qui sont :

*- le prélèvement des organes reproducteurs (gamètes mâles ou femelles), haploïdes après méiose, qui sont ensuite placés en culture *in vitro* afin de permettre une réorientation des cellules vers des potentialités embryogènes.

*- le doublement du stock chromosomique en vue d'aboutir à une lignée homozygote (dont tous les gamètes porteront les mêmes gènes).

Les plantes haploïdes (possédant un seul jeu de chromosomes) peuvent être obtenues par techniques : l'**androgenèse** et la **gynogenèse**. Elles sont des lignées pures, (ont la même information sur les deux chromosomes), elles sont donc homozygotes.

3- Techniques d'obtention des haploïdes

3. 1- Androgenèse (= Plante sans mère)

- Cette méthode est réalisée à partir de culture des cellules sexuelles mâles : les anthères ou les grains de pollen isolés

- les plantes obtenues par cette technique sont totalement **homozygotes**, ce qui évite de faire une dizaine de générations d'autofécondations pour obtenir une **lignée pure** (état nécessaire aux programmes de sélection et amélioration végétale).

2- gynogenèse (= Plante sans père)

- C'est la régénération de plantes entières à partir de la **culture des ovules ou des ovaires non fécondés**, le plus souvent immatures, sur un milieu artificiel.

- On obtient des **plantules haploïdes**, ayant un seul stock chromosomique.

- Après **doublement de ce stock de chromosomes artificiellement** par l'introduction d'une substance chimique : **la colchicine**, on obtient des **lignées pures** produites en quelques dizaines de semaines au lieu de 8 ou 10 ans par les modes classique d'autofécondations.

CULTURE DES PROTOPLASTES ET HYBRIDATION SOMATIQUE

- Les **protoplastes** sont des **cellules végétales débarrassées de leur paroi pectocellulosique**. Ils peuvent être obtenus à partir d'explants divers (de préférence des limbes de jeunes feuilles) par digestion des parois à l'aide de mélanges enzymatiques.
- **L'absence de paroi permet d'induire des fusions entre protoplastes** appartenant à des espèces différentes sexuellement incompatibles.
- Cette **hybridation somatique permet la création de nouvelles variétés**, notamment des hybrides interspécifiques qui ne peuvent être obtenus par fécondation. Citons à titre d'exemple, la Pomate qui résulte d'une hybridation somatique entre la pomme de terre et de la tomate

Intérêt de la technique

- L'importance de la technique réside essentiellement dans **l'amélioration génétique** des espèces végétale et la **création de nouvelles variétés**.
- Cette méthode permet **l'obtention des individus très résistants** à certains produits ou **toxines** et ouvre une voie très intéressante pour la recherche de variétés résistantes aux maladies.
- Exemple du Tabac : les protoplastes ont été mis en contact avec la méthionine sulfoximine (*Toxine bactérienne sécrétée par Pseudomonas tabaci, responsable de la maladie du feu bactérien chez le tabac*). Les plastes résistants ont été cultivés sur un milieu approprié. Les plantes régénérées étaient résistantes à cette bactériose (AUGE et *al.*, 1984).

Isolement, fusion et de culture de protoplastes

- Deux méthodes : **mécanique** et **enzymatique**. *Enzymatique est plus utilisée.*
- La paroi cellulaire est composée de cellulose, de l'hémicellulose et de pectine. Donc, **le procédé le plus efficace** pour libérer les protoplastes est celui qui consiste à **employer deux enzymes** en même temps : **cellulase et pectinase**. La première substance enzymatique dégrade la paroi cellulaire par contre la seconde dégrade la couche intermédiaire.
- Les **enzymes sont préparées au moment de l'emploi** et additionnées au milieu minéral dont la **pression osmotique doit être élevée** pour éviter l'éclatement de ces protoplastes. Pour cela, **on ajoute divers sucres** comme le saccharose, le glucose, le mannitol... etc.
- Certains tissus exigent l'utilisation d'enzymes supplémentaires comme la glusulase, zymoliase,..
- L'agent de condensation le plus utilisé est le **Polyéthylène Glycol (PEG)**, avec une **efficacité de 100 %**.
- Cependant, certains chercheurs, signalent **l'effet toxique du PEG** sur les protoplastes. Le taux de mortalité chez les protoplastes de luzerne après traitement par cet agent est de 50 % (TEOULE et DEMARLY, 1988). Ce taux de mortalité est beaucoup plus important chez les protoplastes de tournesol.

- En effet, la transformation par PEG conduit à une mortalité de 60 à 80 % (KIRCHES *et al.*, 1991 ; LAPARRA et HAHNE, 1995). C'est pour cette raison qu'**actuellement les fusions sont induites dans un champ électrique discontinu** (WATTS et KING, 1984).
- Globalement, les besoins nutritifs des protoplastes sont très semblables à ceux des autres tissus végétaux. De plus, l'**absence de la paroi cellulaire facilite absorption** et l'assimilation des **éléments nutritifs** du milieu de culture.
- Une **concentration élevée de source carbonée** ainsi la présence d'une auxine (notamment le **2,4 D**) sont très **favorables** pour l'induction de la **calogénèse** et l'**embryogénèse**.

Embryogénèse somatique

- Génération d'un embryon à partir d'un méristème, d'un cal ou de suspensions
 - L'embryogénèse somatique est provoqué à partir de plusieurs tissus végétaux (tissus de racine, de tige, de pétioles, de feuilles,...). Cependant, les tissus provenant d'embryons sont les plus réactifs (Photo) (MARGARA, 1982).
- L'embryogénèse somatique présente plusieurs avantages par rapport à la micropropagation conventionnelle :
- Les taux de multiplication sont généralement importants et chez certaines espèces, **les embryons peuvent être encapsulés et traités comme des graines artificielles**.
 - **Des plantes complètes sont obtenues directement suite au processus de germination**. Les manipulations sont donc simplifiées par rapport à la micropropagation traditionnelle qui nécessite plusieurs milieux différents pour le développement des tiges et des racines et l'obtention de plantules complètes.

Lectures conseillées

Gérard Coutouly Les biotechnologies : la part industrielle

Disponible à l'adresse <http://www.crdp-strasbourg.fr/sciences/biotech/pdf/c.pdf>
Document de synthèse de 80 pages sur les biotechnologies en général, avec des aspects de définition et d'histoire

Biotechnologies végétales : ensemble de documents émis par le groupement national interprofessionnel des semences sur le site <http://www.gnis-pedagogie.org/pages/classbio/intro.htm>