

2^e CHAPITRE 2

Les cultures *in vitro* végétales



Dans les programmes classiques d'amélioration des plantes, pour créer une nouvelle variété il faut compter de 8 à 15 ans selon l'espèce. C'est très long, d'autant que les objectifs de sélection peuvent évoluer avec le temps: goût du consommateur, contraintes industrielles, etc.

Les techniques de culture *in vitro* sont des outils qui peuvent aider l'obtenteur de plantes à différents niveaux de son programme d'amélioration, notamment pour réduire les délais de mise sur le marché des nouveaux [cultivars](#), mais aussi pour assainir les variétés, les conserver et réduire les coûts de production.

UNE DEFINITION :un peu longue !!

Les cultures *in vitro* végétales sont des cultures d'explants de plantes, sur un milieu synthétique, dans des conditions stériles, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit.

Les explants peuvent être des parties d'organes ou des organes entiers, (tige, feuille, racine, fleurs, etc.), des tissus, des pièces florales, des graines ou des embryons, des bourgeons ou des [apex](#) ou des [méristèmes](#), des cellules somatiques ou sexuelles, des [protoplastes](#). Le choix de l'explant sera fonction de la [technique](#) utilisée, de l'objectif et de l'espèce travaillée.

Le milieu synthétique est adapté dans sa composition à la technique, l'explant, l'objectif et l'espèce, voire le [cultivar](#). Il est en général composé d'eau, de macro et de micro-éléments, (sels minéraux), de substances de croissance: [phytohormones](#) et vitamines, de sucre et d'un agent gélifiant pour les milieux solides. Le pH est ajusté le plus souvent entre 5 et 6. On modifie le milieu au cours des différentes étapes de production, on doit utiliser un milieu neuf toutes les 3 ou 4 semaines en général.



Les conditions stériles sont obtenues par une désinfection des explants, une stérilisation du milieu de culture et des flacons ou tubes de culture. Les différentes opérations de mise en culture sont réalisées dans un environnement stérile obtenu par une hotte à flux laminaire horizontale: de l'air stérile est propulsé vers le vitroculteur. Les conditions stériles sont primordiales à obtenir afin qu'aucun champignon ou bactérie ne vienne coloniser les milieux de culture, très favorables à leur prolifération, sous peine de nécrose de l'explant.



L'environnement contrôlé concerne notamment deux paramètres: la température de culture, et l'éclairage: intensité et longueur du jour. Ils sont obtenus artificiellement. Leurs valeurs dépendent de l'espèce travaillée ainsi que de la technique utilisée.

L'espace est réduit car les plantes sont miniaturisées, cultivées dans des récipients tenant sur des étagères éclairées, ce qui permet d'avoir la possibilité de replanter des hectares de terrain à partir de plants cultivés sur quelques mètres carrés. On peut également conserver d'innombrables variétés à l'abri des parasites et indéfiniment sur une petite surface au sol.

DES PROPRIETES : A savoir !

Les techniques de culture in vitro végétales utilisent la propriété de totipotence des cellules végétales mise en évidence en 1902 par Haberlandt : en théorie il est possible de régénérer une plante entière à partir de n'importe quelle cellule d'une plante donneuse. Cette propriété s'exprime dans la nature et est exploitée depuis la nuit des temps dans les phénomènes de bouturage, drageonnage, marcottage etc.

DESTECNIQUES : A connaître !

Les différentes techniques de culture in vitro végétales que nous utilisons au laboratoire sont:

La micro propagation,
La culture de méristèmes,
L'embryogenèse somatique,
L'haplo-diploïdisation par androgenèse ou gynogenèse,
La création de variants, le sauvetage d'embryons immatures issus de croisements interspécifiques par exemple.

D'autres techniques existent : la culture de cellules et la production de métabolites secondaires, la bio-encapsulation et la production de semences artificielles, la cryo-conservation à -196°C, la culture de protoplastes et la fusion somatique, la transformation génétique.

En général il y a 4 étapes de culture:

- la mise en place des cultures (la plus délicate et difficile) cf TP pluri M55
 - la multiplication
 - l'enracinement
 - le sevrage ou acclimatation

DES APPLICATIONS : A --- !

Aujourd'hui, de nombreuses espèces sont concernées par l'utilisation des cultures in vitro, tant au niveau de l'élaboration de nouvelles variétés qu'au niveau de la production des plants, et des centaines de millions de plantes in vitro sont acclimatées annuellement dans le monde. On estime à plus de 300 espèces de plantes qui sont multipliées in vitro de façon industrielle.

Certaines plantes vertes sont multipliées uniquement par in vitro. De nombreuses variétés de plantes horticoles et maraîchères de grand intérêt, anciennes ou nouvelles, ont été sauvées de la menace de disparition, car virosées, par culture de méristèmes. Aujourd'hui, la culture des orchidées s'est "démocratisée", grâce à la culture in vitro, on peut trouver dans le commerce des plantes carnivores protégées car elles sont multipliées in vitro.

On a créé des banques de conservation, par culture in vitro, des variétés anciennes et menacées de disparition. C'est un moyen de sauvegarder la diversité des espèces sauvages et les espèces rares ou difficiles à multiplier naturellement (peu de graines ou de rejets).

Enfin, les cultures in vitro permettent de mettre plus rapidement sur le marché les plants certifiés, ou encore d'assainir des collections.

I LA MICROPROPAGATION in vitro ou le CLONAGE végétal

Définition et technique

Les plantes se reproduisent par la voie sexuée via les graines, mais elles utilisent pour certaines aussi une autre voie, celle de la multiplication végétative. La particularité de cette reproduction est que les plantes filles qui en sont issues sont identiques génétiquement à la plante mère: c'est le clonage végétal ou multiplication conforme qui est exploitée depuis des siècles par les horticulteurs et jardiniers : bouturage, marcottage, greffage etc.

La micropropagation in vitro dérive de ce phénomène naturel. On cultive des explants végétaux stérilement, sur un milieu artificiel et dans un environnement contrôlé. Suite aux subcultures successives on obtient alors des plantes identiques à la plante de départ et que l'on peut multiplier à l'infini. On exploite ainsi la propriété de [totipotence](#) des cellules végétales.

Objectif

Il s'agit de produire en grande quantité des [cultivars](#) d'intérêt horticole, sylvicole, ou agronomique qui viennent d'être créés ou découverts ou qui ont toujours un intérêt. Il peut s'agir également de plantes difficiles à reproduire naturellement.

Avantages

Les plantes obtenues sont génétiquement identiques à la plante ou variété de départ

La puissance de multiplication du clonage in vitro permet une production d'un grand nombre de plantes génétiquement homogènes en un laps de temps court. En 1 an, on peut produire en théorie plus de 4 millions de plants d'œillets à partir d'un seul [apex](#), ou encore 50 000 plants de framboisiers alors que traditionnellement on en obtient 50.

Les plantes obtenues sont de qualité car en très bon état sanitaire, avec un enracinement régulier, des ramifications nombreuses, donc une vigueur accrue.

Le volume de plantes nécessaire à la mise sur le marché des nouvelles variétés est plus rapidement atteint.



La production de plantes in vitro permet de s'affranchir des saisons. Les cultures peuvent être ainsi programmées afin d'utiliser rationnellement les surfaces de serres.

La réduction du nombre de pieds mères nécessaire à la production de boutures permet un gain de place dans les serres d'où une économie d'énergie.

Pour les espèces fruitières ou ornementales, en multipliant in vitro, il est possible de s'affranchir des portes-greffes. Ainsi les arbres ou arbustes obtenus ne présenteront pas de problème de rejet de "sauvageon".

Le microbouturage permet de multiplier des espèces difficiles à reproduire naturellement telles les orchidées d'où une diminution du coût de production. En faisant germer les graines d'orchidées in vitro , la présence des champignons symbiotiques est inutile.

La culture in vitro permet de multiplier des plantes stériles

Il est possible de conserver des variétés anciennes à l'abri des parasites et pathogènes, dans un espace réduit dû à la miniaturisation des vitroplants: plus de 1 000 plants/m².

On peut reboiser très rapidement des plantations qui pourraient être ravagées par des parasites ou des catastrophes naturelles.

Les vitroplants sont très facilement transportables d'un pays à l'autre sans risques sanitaires

Inconvénients

Le coût du plant in vitro est plus élevé que celui d'une bouture obtenue classiquement, il demande une main-d'œuvre spécialisée qui représente environ 60% à 70 % du prix de revient car l'automatisation est limitée.

Applications

Des centaines de millions de plantes issues de microbouturage sont produites annuellement dans le monde, dans un nombre toujours grandissant d'espèces. Plus de 300 espèces seraient concernées par la multiplication in vitro à l'échelle industrielle.

II LA CULTURE de MERISTEMES ou l'élimination de virus

Définition

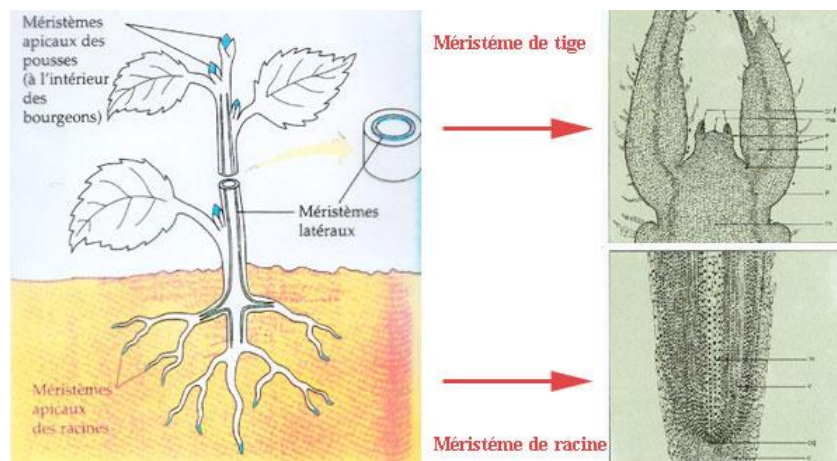
Les méristèmes sont des zones de cellules à divisions intenses, situés au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et à l'origine des tiges feuillées ou du système racinaire.

En 1950, les travaux de [Limasset et Cornuet](#) ont montré que les méristèmes étaient indemnes de virus.

Technique

La culture de méristème est une culture aseptique sur milieu artificiel du dôme apical sans ébauche foliaire. Il mesure 0,2 à 0,3 mm de côté et la dissection se fait sous loupe binoculaire. La technique peut être associée à de la thermothérapie: culture à température élevée, pour favoriser l'élimination des virus.

Remarque :



Remarque : Les plantes se développent grâce à des **méristèmes**, soit des petits groupes de cellules non différenciées qui se divisent. Dans le reste de la plante, les cellules se différencient en fonction de leur situation: cellules de surface (épiderme), cellules de remplissage (parenchyme), cellules conductrices de la sève (Phloème, Xylème), ... et cessent de se diviser

Ces **méristèmes** se trouvent dans les bourgeons, aux extrémités des racines et sur la longueur des tiges et des racines (méristèmes latéraux: ils induisent la croissance en épaisseur).

Les bourgeons axillaires : ce sont les bourgeons situés à la base des feuilles.

Le bourgeon terminal : il s'agit de celui situé au sommet de la plante. **Les bourgeons adventifs :** des cellules de la plante se différencient et forment un nouveau méristème qui va développer un bourgeon (bourgeon adventif) puis une tige, ou une racine. Ces tiges ou racines sont alors appelées tiges ou racines adventives.

Objectif

C'est la seule façon d'obtenir des plantes saines indemnes de virus.

Avantages

La culture de méristèmes permet le sauvetage des variétés menacées de disparition car très virosées. Elle concerne essentiellement les plantes à reproduction par voie végétative: bouturage, marcottage, etc. tels le Pelargonium, le dahlia, le chrysanthème, la pomme de terre, l'artichaut, le fraisier, framboisier, etc. car cette voie favorise la transmission des virus à la descendance.



Les plantes produites sont saines: sans virus, champignons et bactéries et répondent aux normes phytosanitaires d'échanges internationaux de plus en plus draconiennes.

Les plantes assainies ont une vigueur accrue, et des qualités de floraison et de fructification restaurées.

On obtient des variétés conformes à la variété d'origine et que l'on peut multiplier en grande quantité, la production est homogène.

Limites

Les plantes obtenues sont indemnes de virus mais ne sont pas devenues résistantes aux virus. Elles peuvent être recontaminées via des insectes si des mesures de prophylaxie ne sont pas prises.

Pour certaines variétés qui présentent des chimères: plantes panachées de Petunia ou de Pelargonium par exemple, par culture de méristèmes il est possible de ne pas retrouver à la régénération ce caractère horticole.

Applications

De nombreuses variétés de diverses espèces ont été sauvegardées grâce à cette technique: **pomme de terre** (Belle de Fontenay en 1954), dahlias, fraisiers, vigne, iris, framboisiers etc.

Récemment la Violette de Toulouse a été sauvée du déclin grâce à la culture de méristèmes qui a permis de régénérer des plantes sans virus.

Beaucoup de plantes horticoles de grande diffusion tels le Pelargonium, le chrysanthème etc. sont produites à partir de pieds mères qui ont été assainis par culture de méristèmes. Il en est de même pour des espèces maraîchères tel l'artichaut ou encore le fraisier.

III L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

Définition

L'embryogenèse somatique est une forme de multiplication végétative qui permet d'obtenir une multitude de plantules identiques génétiquement à la plante donneuse d'explants.

C'est l'obtention d'embryons à partir de cellules somatiques, c'est à dire non sexuelles.

Technique



De nombreuses divisions cellulaires sont rapidement provoquées à partir des tissus cultivés grâce à l'apport d'une forte dose d'[auxine](#). Un [cal](#) est alors obtenu, c'est à dire un amas de cellules indifférenciées, rejuvénilisées et qui pourront donner naissance à des embryons bipolaires qui vont se comporter comme des embryons zygotiques, (issus de la fécondation entre une cellule sexuelle femelle et une cellule sexuelle mâle).

Applications

L'embryogenèse somatique est une technique qui s'adapte bien à la production industrielle. Les embryons somatiques peuvent être initiés dans des bioréacteurs, afin soit de produire des semences artificielles en les encapsulant dans un gel nutritif, ou encore pour la synthèse de métabolites secondaires utilisés dans des médicaments, colorants, etc. Ce peut-être également un moyen de cloner des ligneux.

Un litre de milieu de culture contenu dans un fermenteur peut produire des milliers, voire des millions d'embryons somatiques.

C'est une technique qui s'applique bien au fenouil, au caféier, au citronnier, à la luzerne, à la [carotte](#), au pétunia, à l'aubergine, au cacaoyer, à l'hévéa, au palmier à huile, etc.

Avantages

Cette technique de multiplication s'adapte à l'automatisation, ce qui permet de réduire les coûts de production.

Le rendement en plantes produites est très élevé.

Les embryons obtenus sont d'origine unicellulaire, il n'y a donc pas de problème de [chimères](#)

L'embryogenèse somatique permet la [rejuvénation](#) des tissus ainsi qu'un accès aux transformations génétiques.

C'est un bon moyen pour produire des clones d'individus élites chez les ligneux.

Par contre

Le passage par [cal](#) peut amener des risques de dérive génétique, c'est à dire d'obtention de variants qui seraient différents de la plante de départ.

IV L'HAPLO-DIPLOIDISATION ou la création de lignées pures.

Les plantes haploïdes sont issues d'une cellule sexuelle mâle ou d'une cellule sexuelle femelle sans fécondation. Les plantes obtenues n'ont qu'un seul lot de chromosomes au lieu de 2 normalement, qui est doublé naturellement ou artificiellement afin qu'elles deviennent fertiles.

Elles peuvent être obtenues par [androgenèse](#), par [gynogenèse](#), par fécondation avec du pollen irradié ou par croisements interspécifiques.

Il existe dans la nature à des pourcentages très faibles des plantes haploïdes, non issues de fécondation normale.

=>L' ANDROGENESE ou les plantes "sans mère" !

Technique :

C'est la régénération de plantes entières à partir de culture de cellules sexuelles mâles: des grains de pollen immatures, soit par culture de pollen isolé, soit par culture d'[anthères](#).

Objectif :

Obtenir des plantes [haploïdes](#) doublées, (après doublement spontané ou artificiel par [colchicine](#)). Ainsi des lignées pures sont produites en quelques mois au lieu de 8 à 10 ans par technique classique d'autofécondations.

L'obtention de lignées pures est une étape presque toujours nécessaire des programmes d'amélioration des plantes.

Applications :

C'est une technique utilisée chez le blé, le riz, la pomme de terre, le tabac, le maïs, l'asperge, le piment, etc. et en routine chez le colza, l'orge et l'aubergine.

Le blé Florin a été la première variété issue d'androgenèse inscrite au catalogue français. Ce fut une première mondiale initiée par le laboratoire d'Amélioration des Plantes d'Orsay. Aujourd'hui de nombreux [cultivars](#) de diverses espèces et issus de ces techniques d'haplo-diploïdisation sont déposés chaque année.

Avantages :

Cette technique amène un important gain de temps, ce qui permet de mettre plus rapidement sur le marché de nouvelles variétés présentant des avantages pour l'agriculteur, l'industriel ou le consommateur. En effet une plante [homozygote](#) est directement obtenue, ce qui évite de faire une dizaine de générations d'autofécondations pour obtenir une lignée pure, état nécessaire aux programmes de sélection végétale.

Les plantes obtenues par cette technique sont totalement homozygotes, cela permet de dévoiler des caractères intéressants par l'expression des [allèles récessifs](#) habituellement cachés. Ces gènes pouvant être exploités éventuellement.

Des recombinants intéressants peuvent ainsi être détectés et exploités, une résistance à une maladie par exemple..

Limites

Le rendement, (nombre de plantes viables/100 anthères cultivées) est souvent dépendant du cultivar.

Certaines variétés de céréales produisent un grand nombre de plantes albinos, donc non viables.

V Présentation en image de la micropropagation et rappels sur la séquence faite en TP.

1 Définitions

Les cultures *in vitro* végétales sont des cultures d'**explants** de plantes, sur un **milieu synthétique**, dans des **conditions stériles**, dans un **environnement contrôlé** et dans un **espace réduit**

Explants: morceaux de la plante pouvant aller de l'ensemble de la partie aérienne à des cellules isolées en passant par des morceaux de feuilles, de racines, des graines et des bourgeons.

Milieu synthétique: il est en général composé des éléments suivants: eau, [sels minéraux](#) (macro et micro-éléments), [hormones végétales](#), vitamines, sucre, et pour les milieux solides: un agent gélifiant, le plus souvent de l'agar-agar. Ce milieu doit être adapté en fonction de l'espèce et du but recherché (multiplication, croissance, production de racines, etc).

Conditions stériles: le milieu de culture, riche en sucre, étant très propice au [développement de bactéries et de champignons](#), il est important de travailler avec du matériel stérilisé. Même les explants [doivent être désinfectés](#).

Ils sont plongés pendant quelques minutes à une demi heure, en fonction des explants, dans un mélange d'eau et de javel. Les manipulations se font sous une [hotte à flux laminaire horizontal](#) propulsant de l'air filtré vers le vitroculteur. Ainsi, l'air contaminé de la pièce ne pénètre pas sous la hotte.

Environnement contrôlé: ce contrôle concerne la température ainsi que l'intensité et la durée de l'éclairage.

Espace réduit: les plantes sont maintenues à une faible taille [dans des bocaux](#). Ceux-ci sont rangés sur des étagères dans des [chambres de culture](#) (= environnement contrôlé).

2 L'introduction d'explants en culture *in vitro*

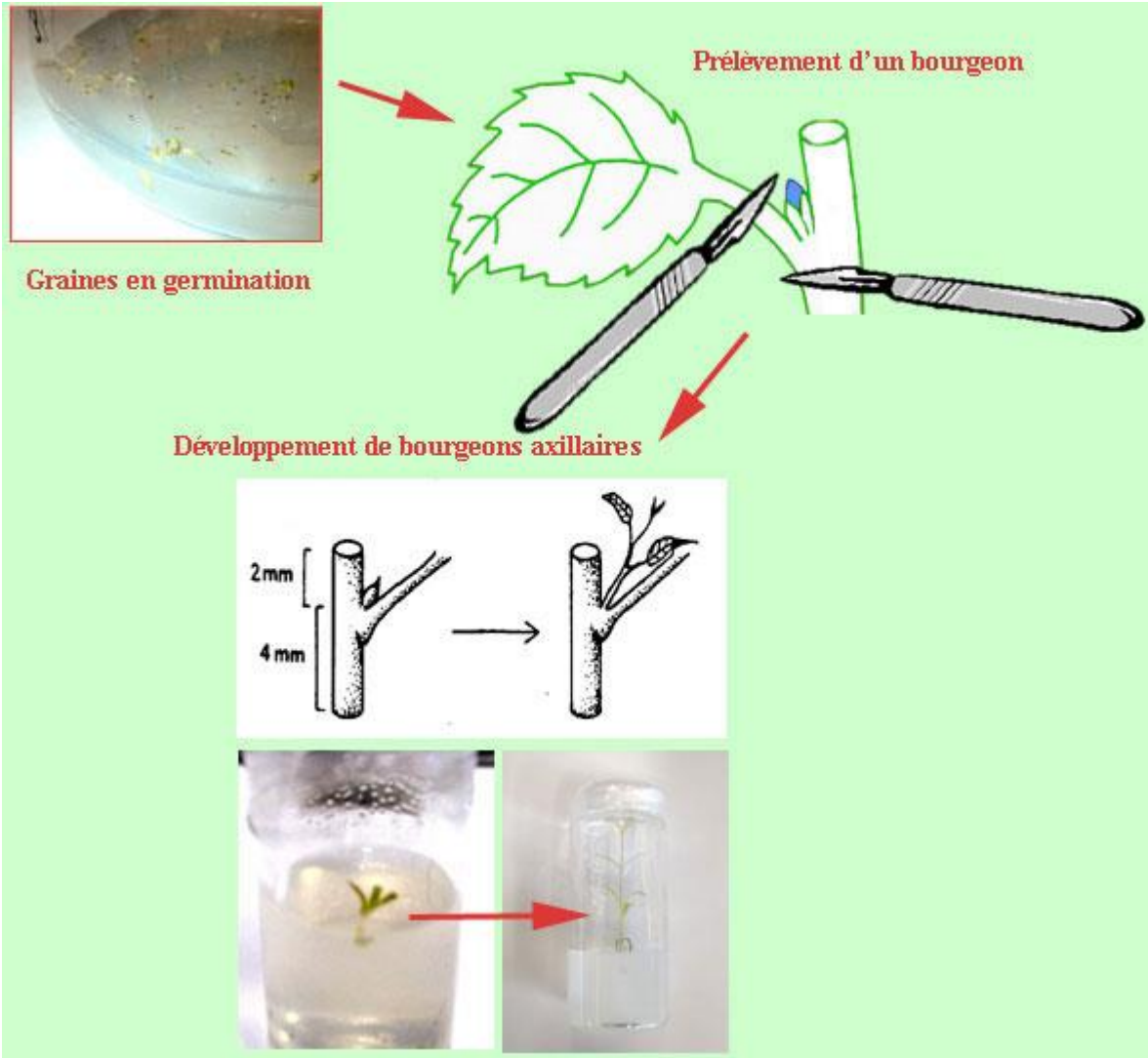


Les plantes, ou leurs graines, sont le support de bactéries et de champignons divers. Il faut, pour les cultiver dans un milieu stérile riche en sucre, les désinfecter en surface.

Des parties de la plante, ou des graines, sont plongées dans un mélange d'eau, de javel et d'une substance savonneuse pendant plusieurs dizaines de minutes.

Ensuite, on travaille stérilement, sous hotte à flux laminaire. Selon la plante, on découpe des morceaux de feuilles ([reproduction végétative](#), [bourgeonnement adventif](#)) ou des bourgeons axillaires et on les place dans des pots individuels, ou on sème des graines.



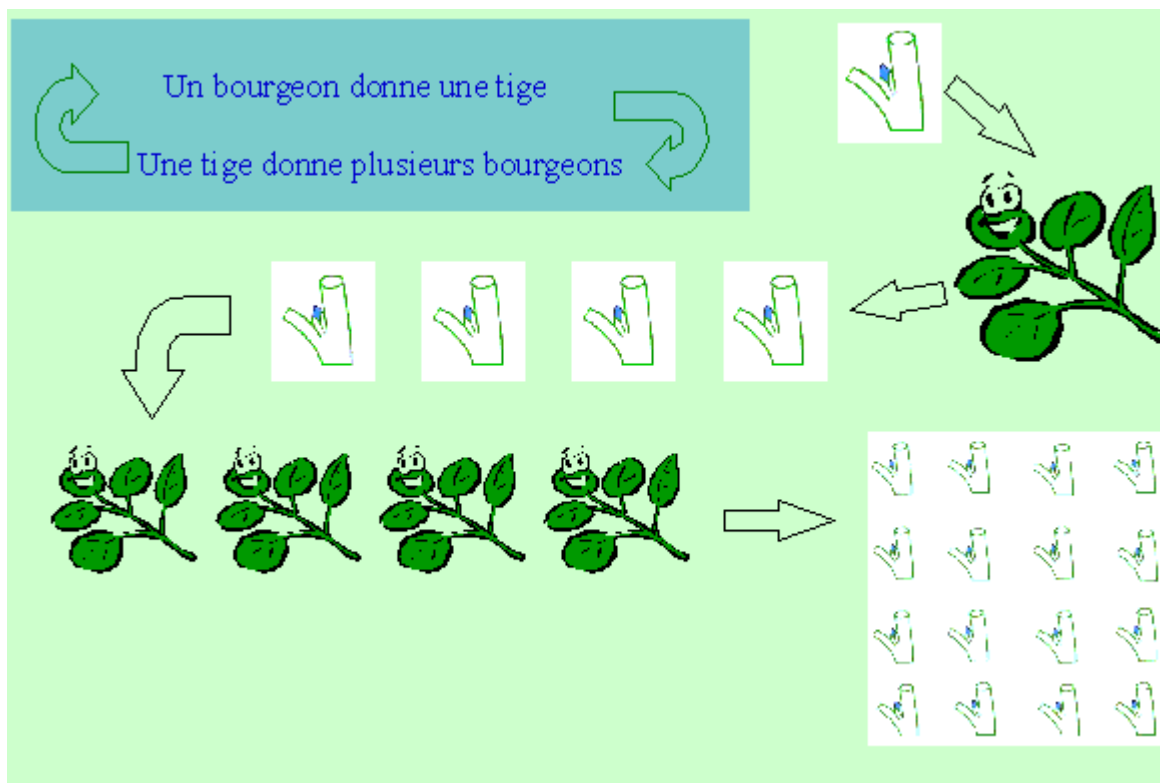


La multiplication

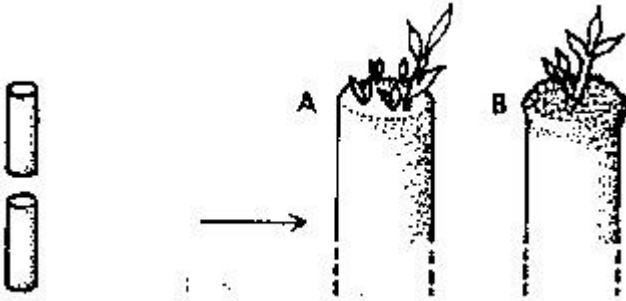
En culture *in vitro*, on multiplie les plantes par clonage d'elles-même. On peut ainsi obtenir un grand nombre d'individus identiques entre eux et à l'individu de départ. On utilise, pour ce faire, la capacité de reproduction végétative des plantes. Et pour contrôler cette [multiplication végétative](#), on utilise les [hormones végétales](#), particulièrement les [cytokinines](#).



Multiplication par bourgeonnement [axillaire](#).



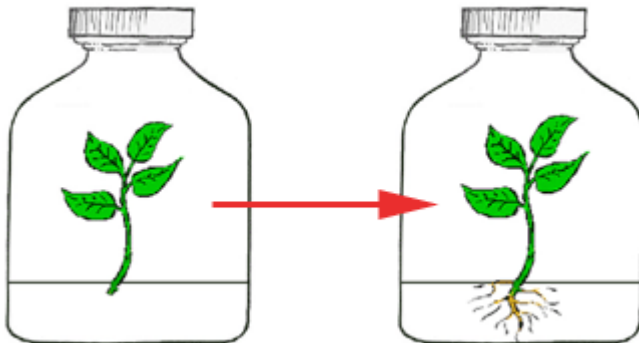
Multiplication par bourgeonnement [adventif](#).



4 La réintroduction des plantes en "milieu naturel"

L'enracinement

En culture *in vitro*, on multiplie des tiges feuillées. Pour obtenir des plantes complètes, il faut que ces tiges développent des racines. Cela s'obtient en transférant les tiges sur un milieu frais enrichi en auxines ([hormones végétales](#)).



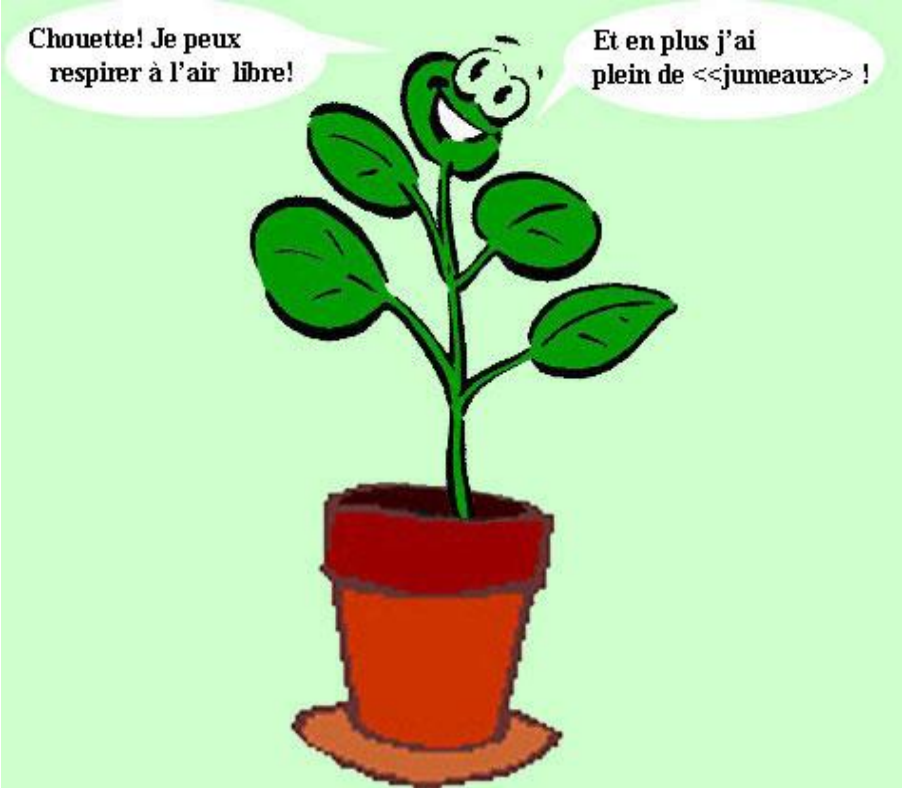
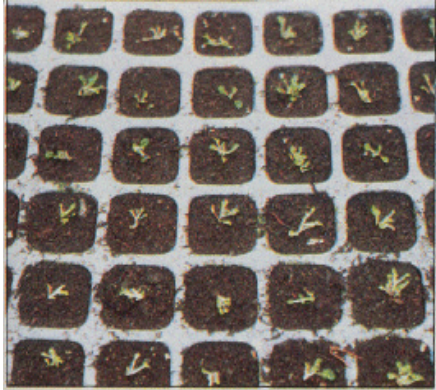
L'acclimatation

Lorsque les tiges sont enracinées, on peut acclimater les plantes, c. à d. les réhabituer à la vie à l'air libre.

On débarrasse les racines de la gélose dans laquelle elles ont poussé et on repique les plantes dans le substrat

adéquat (tourbe, terreau,...). Les plantes sont placées dans un milieu toujours confiné afin qu'elles s'adaptent

progressivement à de l'air plus sec, à des variations de luminosité et de température.



VI Les Avantages de la culture in vitro

L'assainissement des végétaux

La culture *in vitro* permet l'élimination des virus et des bactéries.
Exemple: le virus de la pomme de terre.

La multiplication de masse

Grâce à cette technique, on peut obtenir, rapidement et indépendamment des conditions climatiques, un grand nombre de plantes qui sont stockées dans un espace réduit.

L'accroissement de la diversité

Des plantes rares, en voie de disparition, peuvent être conservées et multipliées en culture *in vitro*. De même, des plantes qui font peu de semences et qui sont difficiles à bouturer et/ou à greffer bénéficient aussi de cette technique. On peut ainsi obtenir des rosiers ou des vignes sur leurs propres racines.

La multiplication de nouvelles espèces/variétés ou de plantes stériles:

- plantes résultant de croisement (hybrides) qui sont souvent stériles.
- plantes transgéniques
- plantes à fruits sans pépin
- plante présentant une caractéristique intéressante comme par exemple la couleur particulière de ses fleurs ---> nouveau cultivar.

La multiplication de plantes sélectionnées:

- Pour leur résistance aux maladies
- Pour leur production plus importante
- Pour leur tolérance à divers facteurs (sécheresse, excès d'eau, trop ou trop peu de sels, froid/chaud, herbicide)
- Pour leur vigueur

La sélection de plantes résistantes

On peut exercer une pression de sélection en cultivant les plantes sur des milieux contenant des concentrations croissantes en sels ou en herbicides. Les plus résistantes sont repiquées sur du milieu de plus en plus concentré.

On peut, par la même technique, sélectionner des plantes capables de vivre sur des milieux pauvres ou des plantes résistantes à certains pathogènes.

VII Les phytohormones ;

Les hormones végétales ou phytohormones sont impliquées à tous les stades de la vie d'une plante depuis la pollinisation provoquant la fécondation et le développement de l'embryon zygotique, tout au long du développement de celui-ci en plante adulte jusqu'au contrôle de la floraison, de la fructification et de la sénescence. Les mêmes phytohormones ne font pas que diriger les processus de croissance et de développement: elles sont pour cela obligatoirement impliquées dans des mécanismes spécifiques de division, d'élongation et de différenciation cellulaire, mais aussi nécessairement dans les métabolismes primaire et secondaire.

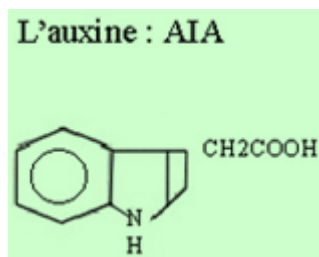
Les phytohormones sont d'une importance capitale dans le contrôle des cultures *in vitro* de cellules, tissus, organes ou plantes entières, c'est-à-dire dans l'orientation qu'on veut leur donner : maintien en vie, croissance, initiation d'une organogenèse spécifique (production d'organes tels que pousses feuillées, racines, embryons somatiques*), multiplication d'organes ou de plantules, etc... Elles sont également largement utilisées pour le contrôle de la production de métabolites secondaires d'intérêts divers.

Ici nous parlerons essentiellement de plantes entières, ou presque.

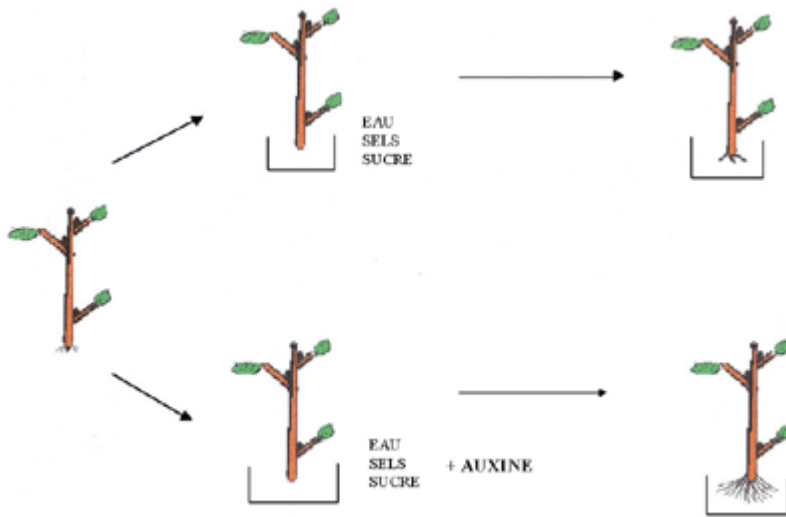
*non issus du développement d'une graine.

Quelques expériences simples expliquant le rôle des hormones végétales dans la plante

1 . les auxines



- Première expérience



On coupe la base racinaire de la plantule que l'on place dans un milieu contenant ou non de l'auxine.

En l'absence d'auxine, des racines adventives peuvent se développer.

C'est le principe du [bouturage](#).

Cependant en présence d'auxine, le développement de racines est beaucoup plus important.

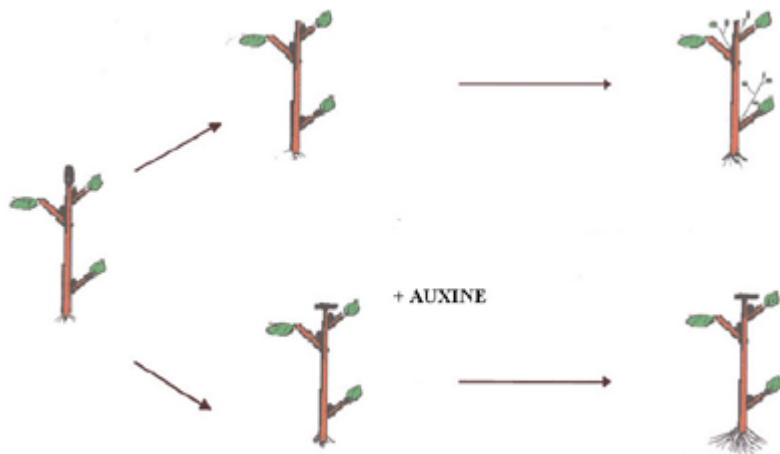
- Cette hormone favorise le développement racinaire.

Exemple



Influence stimulative de l'auxine sur la néoformation des racines chez le Houx. En haut, les témoins; en bas, les traités.

- Deuxième expérience: autre effet de l'auxine



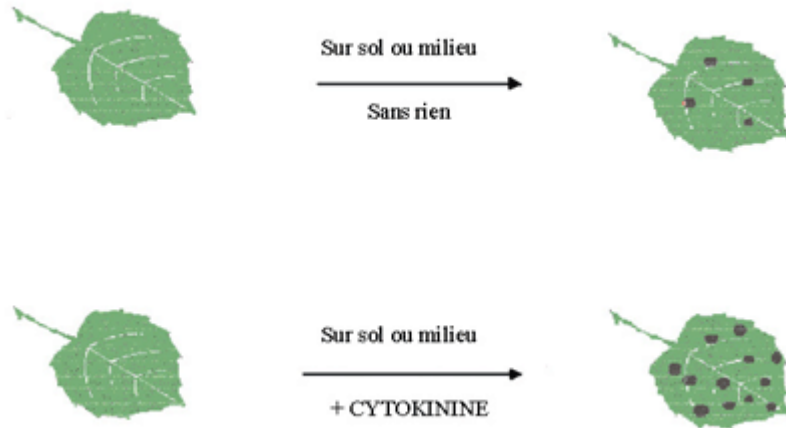
- Lorsqu'on coupe le [bourgeon terminal](#) d'une plantule, on constate le développement des [bourgeons axillaires](#) en rameaux latéraux.

- Si on remplace le bourgeon terminal par de l'ouate imbibée avec de l'auxine, on ne constate plus de développement des bourgeons axillaires.

- L'auxine remplace donc le bourgeon terminal.
- On peut en déduire que celle-ci est produite dans la partie terminale de la plante.

On parle de dominance apicale : la partie apicale (terminale) de la plante empêche le développement des bourgeons axillaires au profit de son développement propre.

2 . Les cytokinines

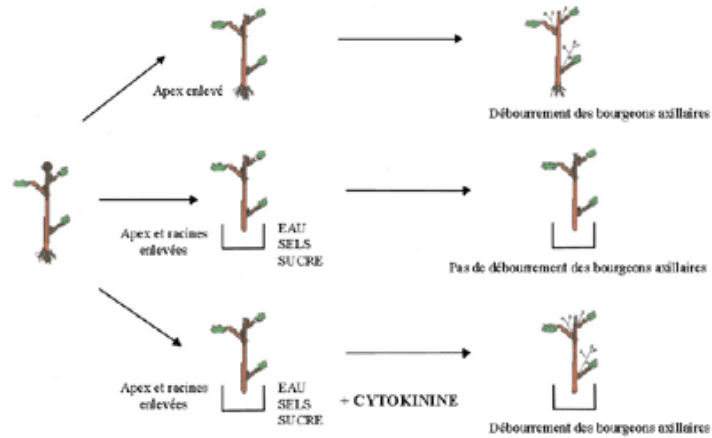


Si on prend une feuille de géranium et qu'on place celle-ci sur de la terre ou du milieu sans hormone, quelques [bourgeons adventifs](#) apparaissent.

Si on ajoute des cytokinines dans le milieu, on observe beaucoup plus de bourgeons.

- Les cytokinines favorisent le bourgeonnement adventif.

3 . Auxines et cytokinines



- en **haut**, on a donc supprimé la dominance apical en supprimant le [bourgeon terminal](#).
- au **centre**, on a coupé le bourgeon terminal et la base ou coiffe racinaire. On observe plus de développement des [bourgeons axillaires](#) sur l'explant.

Les racines sont donc nécessaires au débourrement (développement des bourgeons).

- par contre (en **bas**), si un explant identique est placé dans un milieu contenant des cytokinines, le développement des bourgeons se produit.

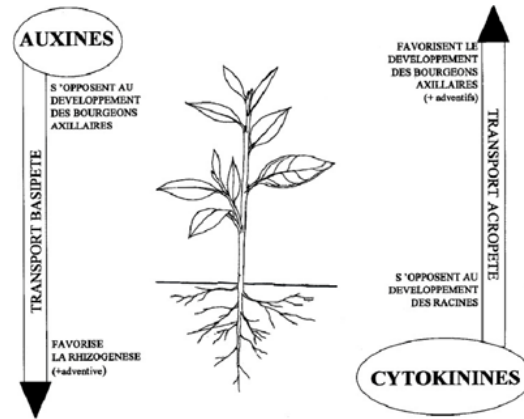
Les cytokinines remplacent donc les racines et on peut en déduire qu'elles sont produites dans les racines.

On constate aussi qu'il n'y a pas de développement racinaire en présence de cytokinines.

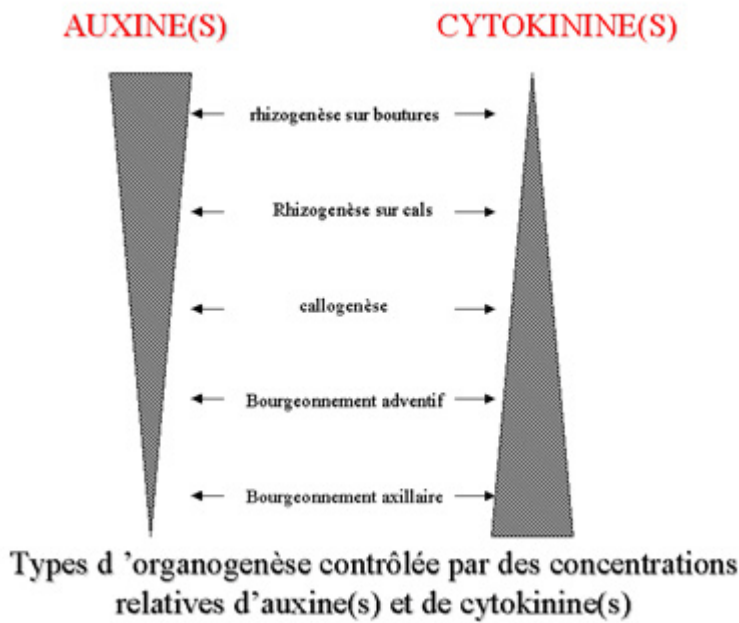
4. Récapitulatif

- Les auxines** :
- Elles sont produites dans la partie terminale de la plante.
 - Elles s'opposent au développement des [bourgeons axillaires](#).
 - Elles favorisent la rhizogenèse (développement des racines).

- Les cytokinines** :
- Elles sont produites au niveau des racines.
 - Elles s'opposent au développement des racines.
 - Elles favorisent le développement des bourgeons axillaires.



Utilisation des hormones en culture *in vitro*



- De fortes concentrations en **cytokinines** alliées à de faibles concentrations en **auxines**, nous permettent d'obtenir le **développement des bourgeons axillaires ou adventifs** et ainsi de **multiplier** les plantes.

- De fortes concentrations en **auxines** alliées ou non à de faibles concentrations en **cytokinines**, nous permettent d'obtenir **l'enracinement** des tiges feuillées.

- Si on **équilibre** les **concentrations** de ces deux hormones, on obtient un **cal**. Le cal est le résultat de la **prolifération anarchique** de cellules plus ou moins différenciées mais qui n'arrivent plus à s'organiser en tissus et organes distincts.

Si la connaissance du contenu en hormones introduites (ou quelques fois sécrétées par le matériel végétal) dans les milieux de culture est souvent d'une grande utilité, c'est surtout la nature et la quantité des phytohormones (et les rapports entre elles) naturellement métabolisées par les végétaux qui sont importantes pour une approche fondamentale des phénomènes, ce qui permettra ensuite de les contrôler et d'orienter leur contenu endogène.

Lexique :

A.D.N. : **Acide désoxyribonucléique** se présentant sous forme de deux chaînes polynucléotidiques appariées l'une à l'autre par des liaisons hydrogène, enroulées en spirale à l'aspect d'une double hélice, et renfermant dans sa séquence l'**information génétique**. C'est une macromolécule linéaire dont la sous-unité de base, un désoxyribonucléotide, contient le sucre désoxyribose. Les bases azotées sont la thymine qui se lie à l'adénine, et la guanine qui se lie à la cytosine.

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS : **Bactéries du sol** qui permettent d'introduire des gènes étrangers dans les végétaux par l'intermédiaire de leurs plasmides. On régénère ainsi des plantes **transgéniques**

ALBINOS : Plantes blanches car **dépourvues de pigments chlorophylliens** donc ne pouvant assurer la photosynthèse donc condamnées à la nécrose ou au parasitisme.

ALLELE: Un des deux gènes d'une même paire de **chromosomes** homologues, et pouvant être différents ou identiques. L'un est d'origine paternelle, l'autre maternelle. Leur expression concerne le même caractère **phénotypique**. C'est l'allèle dominant qui s'exprime. L'allèle **récessif** ne s'exprime pas mais peut être transmis à la descendance.

ANDROGENESE : Régénération de plantes par **culture de cellules sexuelles mâles**, grains de pollen isolés ou **anthères**, non matures. Les individus obtenus, **haploïdes**, expriment directement leur **génome** après doublement spontané de leur stock de chromosomes ou provoqué par de la **colchicine**. Les plantes obtenues sont parfaitement **homozygotes**, ce sont des lignées pures.

ANTHERE : Partie de l'**étamine** surmontant le filet et qui **renferme les grains de pollen**.

APEX : Sommet du bourgeon, à l'origine des organes, constitué du **méristème** entouré d'ébauches foliaires.

AUXINE : **Régulateur de croissance** synthétisé essentiellement dans les bourgeons des plantes supérieures. Les auxines ont un rôle dans la croissance, l'organogenèse, la différenciation cellulaire, la **rhizogenèse**. L'acide 3-indole acétique, (A.I.A.), est une auxine naturelle. L'A.N.A. (acide naphthalène acétique) est une auxine de synthèse, plus stable à la chaleur.

CAL : Amas de **cellules végétales indifférenciées**, en divisions, **totipotentes**, obtenues par culture *in vitro* ou naturellement suite à une blessure des tissus ou une infection. Des plantes entières peuvent être régénérées à partir des cals. Les cals peuvent être également à l'origine de suspensions cellulaires.

CHIMERE : Ensemble de deux lots cellulaires n'ayant pas le même patrimoine génétique. Les **plantes panachées** sont des plantes chimériques.

CHROMOSOME : Forme condensée de la molécule d' **A.D.N.** associée à des protéines (histones), contenu dans le noyau cellulaire et **support de l'hérédité**. Les chromosomes sont visibles lors de la division cellulaire (mitose).

COLCHICINE : **Alcaloïde antimitotique**. Au moment de la division cellulaire, les **chromosomes** dupliqués restent dans le même noyau au lieu de migrer, d'où le doublement du stock chromosomique. La colchicine est extraite de la colchique.

CROWN-GALL : **Tumeur des plantes** au niveau du collet ou des tiges provoquée par ***Agrobacterium tumefaciens***.

CULTIVAR : Variété cultivée, protégée et répertoriée dans des catalogues officiels.

CYTOKININES : **Substances de croissance** végétales élaborées essentiellement par les racines et les embryons. Elles peuvent induire des divisions cellulaires, la néoformation de bourgeons ainsi que des différenciations. La kinétine est une cytokinine naturelle.

DOMINANT : Se dit de l'un des deux **allèles** qui s'exprime dans le **phénotype**, et qui masque l'expression de l'allèle **récessif**.

EMBRYONS SOMATIQUES : Embryons bipolaires non zygotiques, c'est à dire non issus de la fusion de gamètes mâle et femelle, mais **issus d'une cellule somatique**: non germinale ou non sexuelle.

ETAMINE : **Pièce florale mâle** productrice du pollen composée de l'**anthère** et du filet.

EXPLANT : **Fragment de plante** mis en culture: cellule, **méristème**, **apex**, tissu, embryon, pièces florales, organes etc.

FUSION de PROTOPLASTES : Fusion ou hybridation de cellules débarrassées de leur paroi pecto-cellulosique.

GENOME : Ensemble du **patrimoine génétique** contenu dans chaque cellule de chaque organisme vivant

GENOTYPE : Ensemble de l'**information génétique** contenu dans les **chromosomes**.

HAPLOIDE : Les cellules non sexuelles sont diploïdes ou $2n$. Elles ont 2 lots de chromosomes qui peuvent s'apparier, l'un issu de la mère, l'autre venant du père. Une cellule haploïde **ne contient qu'un seul lot de chromosomes**: n . Un organisme haploïde est constitué de cellules haploïdes, il est stérile et doit être doublé pour être fertile. Son **phénotype** exprime son **génotype** c'est pourquoi il est intéressant, car des caractères habituellement cachés car **récessifs** peuvent alors s'exprimer et être exploités.

HOMOZYGOTE : Organisme qui a des **allèles** identiques aux deux **locis** homologues d'un lot de **chromosomes** diploïdes. Des plantes homozygotes pour tous leurs gènes sont des **lignées pures**.

HYBRIDATION SOMATIQUE : **Fusion provoquée de deux cellules somatiques**, (non sexuelles), et débarrassées de leur paroi pecto-cellulosique, (**protoplastes**). Cette technique permet les croisements interspécifiques, voire intergénériques.

I.N.R.A. : **I**nstitut **N**ational de la **R**echerche **A**gronomique.

KANAMYCINE : **Antibiotique** dont le gène de résistance peut servir de marqueur des cellules transformées.

LOCUS : **Localisation d'un gène** donné sur un **chromosome**.

MERISTEME : Amas de cellules indifférenciées qui se divisent activement, situées à l'**extrémité des bourgeons** ou des racines, à l'origine des organes. Les méristèmes sont **indemnes de virus**.

PARTHENOGENESE : Développement d'un fruit sans fécondation, donc **sans formation de pépins ou de graines**. La banane est un fruit parthénocarpique.

PHENOTYPE : Ensemble de l'expression des gènes **dominants** formant l'**apparence d'un individu**. C'est le résultat de l'interaction entre l'expression des gènes et l'environnement.

PROTOPLASTE : **Cellule végétale non sexuelle débarrassée de sa paroi** pecto-cellulosique, elle prend alors une forme sphérique. La fusion de protoplastes permettant la création d'hybrides somatiques.

PHYTOHORMONES : **Substances de croissances** produites par certaines cellules végétales, le plus souvent transportées en dehors du lieu de synthèse. Elles agissent à des doses infinitésimales et régulent certains processus physiologiques. Les principales hormones étant les **auxines**, les **cytokinines**, les gibbérellines, l'acide abscissique et l'éthylène.

RECESSIF : Se dit de l'un des deux **allèles** qui ne s'exprime pas dans le **phénotype**, car l'expression est masquée par celle de l'allèle dominant.

REJUVENATION : Phénomène de dédifférenciation cellulaire qui entraîne globalement l'**expression de caractères juvéniles**.

RHIZOGENESE : Formation de racines.

TOTIPOTENCE : Propriété qu'ont les cellules végétales de pouvoir se dédifférencier, c'est à dire de **régénérer une plante entière** si elles sont cultivées sur un milieu approprié.

TRANSGENIQUE : **Plante améliorée** et issue d'une cellule à laquelle a été ajouté un segment d' **A.D.N.** étranger par diverses techniques.

ESPECES FLORALES et ORNEMENTALES



LIS



GLAIEUL - gladiolus



ST PAULIA



CACTUS



COLEUS



HELLEBORE



PETUNIA



ANTHURIUM



ROSIER - rose tree



PELARGONIUM



PHANALEOPSIS



PHAIUS



CORDYLINE



CENTAUREA jacea



ANUBIA



DAHLIA



CROTON



MICROSORUM



CHRYSANTHEME



BANANIER

ESPECES SAUVAGES



FOUGERE- fern



ORME



CENTAUREE

germination de spores

ESPECES LIGNEUSES



LAGERSTROEMIA



RHODODENDRON



POMMIER -
apple tree



FUSAIN - spindle
tree



CAFEIER



ORME - elm

embryon
somatique

callogenèse

ESPECES POTAGERES



CAROTTE



POIREAU - leek

embryogenèse somatique

ESPECES de GRANDE CULTURE



BLE - wheat

androgenèse



BETTERAVE -beet



POMME de TERRE - potato

microtubérisation

HISTORIQUE des CULTURES *in vitro*

1902 **G.HABERLANDT**, un autrichien, énonce le concept de la totipotence cellulaire végétale. Il réussit à faire survivre *in vitro*, quelques mois, mais sans multiplication, de petits amas cellulaires.

1922 Aux Etats-Unis, **W.J. ROBBINS** et en Allemagne : **W. KOTTE**, obtiennent la **croissance de pointes de racines** pendant quelques mois seulement.

1926 **E. KUROSAWA** (Formose) découvre l'action de la gibbérelline sur la croissance, c'est la première fois qu'une substance hormonale est extraite d'une plante.

1934 **P.R. WHITE** (U.S.A.) réussit une **culture de racines** de tomates.

1935 Le Professeur **R.J. GAUTHERET**, en France, cultive et multiplie des cellules cambiales de saule en introduisant des auxines dans le milieu.

1936 **O.ORSOS** en Hongrie induit des cals et des organes à partir de tissus de tubercule de chou-navet. **F.G. GUSTAFSON** obtient avec un grand succès les premiers fruits parthénocarpiques, (tomate, raisin, figue), par application d'auxine sur des ovaires non fécondés.

1939 **R.J. GAUTHERET** réussit des **cultures indéfinies de tissus** végétaux normaux de carotte. Aujourd'hui la souche est toujours entretenue et les cellules continuent à proliférer. Les cultures de P.R. WHITE sur le tabac étaient quant à elles des tumeurs végétales et ne nécessitaient pas d'adjonction de phytohormones. Il faut citer également les travaux contemporains du français **P. NOBECOURT**, quatrième pionnier des cultures *in vitro* végétales, sur la carotte.

1941 **A.C. BRAUN** en étudiant les tumeurs végétales ou crown-gall, a amorcé les travaux qui ont conduit aux premières manipulations génétiques végétales.

1944 **R. BUVAT** par les techniques de culture de tissus met en évidence le phénomène de dédifférenciation: la

rejuvénation.

1946 **E. BALL** aux Etats-Unis obtient la régénération de plants de lupin et de capucine à partir d'apex de grande taille.

1949 **P. LIMASSET** et **P. CORNUET** notent l'absence de virus dans les méristèmes de tabacs virosés.

1952 Mettant à profit ces travaux, **G. MOREL** et **C. MARTIN** à l'I.N.R.A. de Versailles, régénèrent des **plantes entières saines** de dahlia, variété "*le Réve'*" indemnes 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.



culture cellulaire

1954 **W.H. MUIR** et col. obtiennent les premières **cultures de cellules isolées** à partir de cals friables cultivés en milieu liquide agité.

1955 **C.O. MILLER** et col. découvrent que les **cytokinines** induisent des divisions cellulaires dans des cultures de tissus de tabac.

1957 **F. SKOOG** et **C. MULLER** régénèrent des racines et des tiges à partir de **callus** sous influence d'**auxine** et de **cytokinine**.

1958 **F.C. STEWART** et **J. 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 T. **MURASHIGE** et **F. SKOOG** mettent au point pour des **cultures de tissus de tabac** le fameux milieu de culture M.S. utilisé largement en culture *in vitro*. Il s'agit d'un milieu contenant des éléments minéraux, des vitamines du groupe B, du sucre, auxine et cytokinine.

1964 **S. GUHA** et **S.C. MAHESHWARI**, en Inde, obtiennent des plantes **haploïdes** de *Datura innoxia* Mill. à partir de **culture d'anthères**.



protoplastes

1971 Au Japon, **I. TAKEBE** et col. régénèrent des plantes entières de *Nicotiana tabacum* à partir de **protoplastes**.

1972 **P.S. CARLSON** obtient le premier **hybride somatique** interspécifique par **fusion de protoplastes** entre différentes espèces de tabac.

W.R. SHARP obtient des plantes **haploïdes** de tomates par **culture de pollen isolé**.

1975 **K.K.PANDEY** utilise du **pollen irradié** de tabac pour réaliser des croisements interspécifiques.

1976 **L.H. SAN NOEUM** dans 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 **M. Van MONTAIGU** et col. créent en Belgique **les premières plantes transgéniques** transformées par **Agrobacterium tumefaciens**. Il s'agit d'un plan de tabac résistant à la **kanamycine**.

Depuis le début du XXème siècle avec les travaux d'Haberlandt, de nombreux chercheurs ont œuvré et continuent à travailler au cœur de leurs laboratoires afin d'améliorer les techniques mises au point par les pionniers dans les différentes techniques de cultures in vitro. L'objectif étant d'utiliser ces outils sur le plus grand nombre d'espèces possibles et avec le meilleur rendement, ceci à des fins d'amélioration des plantes au service de l'homme et de son environnement.

