

# La culture *in vitro*

## Exemples d'utilisation

Utiliser un fragment de plante pour reproduire un individu comme dans le bouturage, ou pour l'associer à une autre plante, comme dans la greffe, sont des biotechnologies anciennes. De ces techniques sont dérivées des méthodes plus fines, partant de fragments de plus en plus réduits, jusqu'à la cellule isolée ou le gamète.

Les biotechnologies végétales reposent principalement sur les cultures *in vitro*. Les premiers résultats intéressants de culture de tissus végétaux furent obtenus par Gautheret, Nobecourt et White en 1938. Elles se font hors sol, en conditions stériles et très contrôlées, dans des flacons ou tubes fermés, sur des milieux synthétiques solides ou liquides, contenant des sels minéraux, une source énergétique et des adjuvants.

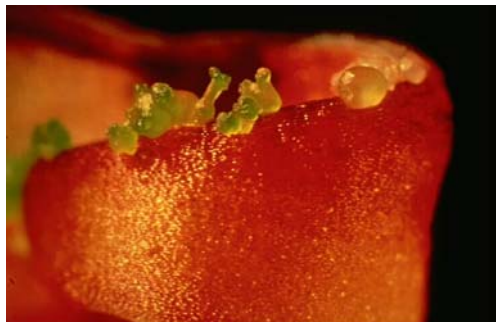
Les applications sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine de l'horticulture que dans celui de la recherche (notamment en amélioration des plantes), ou encore pour conserver la diversité variétale (Conservatoires) ou sauvegarder des espèces menacées.

Les techniques de culture *in vitro* cherchent à contrôler les facteurs de l'environnement (température, lumière, composition du milieu...) du fragment de plante mis en culture afin de l'orienter vers un programme d'évolution déterminé. Premier élément : toutes les cellules du végétal n'ont pas les mêmes potentialités au cours du développement. Certaines se spécialisent et se différencient et perdent leur possibilité de se diviser. D'autres forment des plages de cellules indifférenciées qui forment les méristèmes et qui se divisent activement. Ce sont des zones à l'origine de la croissance (en largeur ou en longueur) des plantes. Deuxième élément : des régulateurs de croissance ont été identifiés. Ils affectent la vitesse de croissance des cellules et leur différenciation, et sont impliqués dans les corrélations entre organes. La découverte de ces substances (auxines, gibbérellines, cytoquinines, acide abscissique, éthylène, oligosaccharines) a permis le développement des techniques de culture *in vitro*. D'autres facteurs interviennent et notamment le choix de l'explant, dont dépend la totipotence des cellules prélevées. Ces mécanismes de « vieillissement » sont dus à des modifications de la structure des méristèmes. Pour donner un exemple on peut citer l'aptitude au bouturage qui décroît lorsque l'âge des pieds-mères augmente. Mais la perte liée à l'âge ne se retrouve pas de façon égale au niveau des différentes parties de la plante, la partie racinaire de la plante constituant souvent le pôle de juvénilité de la plante. Idem pour la période de l'année dans laquelle on se situe : réapparition d'un fonctionnement de type juvénile au début de chaque poussée annuelle, ou même de chaque réitération. Ou encore « retour en arrière » lors de la floraison : c'est la régénération plus ou moins complète du potentiel morphogénétique initial, et celle-ci précède la différenciation des organes floraux. On pourra donc intervenir sur la qualité de l'explant : en fonction de l'âge du pied-mère, en fonction de l'époque de prélèvement, en fonction de sa localisation sur le pied-mère, en fonction aussi de sa taille et de sa nature.

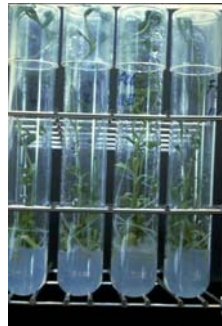
## Culture de méristèmes :

Dès 1952, Georges Morel de l'INRA de Versailles réussit à obtenir une plante entière à partir d'un méristème. Le méristème étant toujours indemne de virus, on peut obtenir des plantes saines à partir de plantes malades en le cultivant.

Cette technique est donc utilisée pour obtenir des plants sains à partir de plants virosés. Sur les pieds-mères choisis, on prélève des boutures à l'extrémité des rameaux. Sous une loupe binoculaire et sous hotte stérile, avec des outils stérilisés, la bouture est débarrassée de ses jeunes feuilles. Quand le méristème est visible, on élimine délicatement les dernières ébauches et on délimite un petit cube dont une des faces est constituée par le méristème (0,2 à 0,3 mm de côté) qui est prélevé et repiqué sur un milieu gélosé.



*méristèmes chez Kalanchoe. ©INRA, J Margarat*



*culture de méristème d'œillet. © INRA, A Poupet*

### **La micropropagation :**

Les plantes se multiplient par semis ou par multiplication végétative. Cette dernière est indispensable quand on veut conserver les caractères d'une variété donnée. C'est ce que l'on fait depuis des siècles quand on effectue des boutures, des greffes ou de la division de touffe. Mais le taux de multiplication que l'on peut obtenir par ces méthodes est souvent très faible. La multiplication végétative in vitro apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles, avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé.

Grâce à cette technique, on part d'une petite quantité de tissu au départ pour produire une infinité de plantes. La vitesse de multiplication est élevée, on propage des plantes identiques à celle du départ, on peut constituer des collections de pieds-mères, des banques de clones, faire de la sauvegarde d'espèces en voie d'extinction, programmer des cultures tout au long de l'année, éviter la dormance, conserver des plantes au froid.

Matériel végétal : plus l'explant est petit, moins il y a de risque de contamination. Un bourgeon terminal a un potentiel de croissance supérieur à un bourgeon axillaire. La saison la plus propice pour le prélèvement est celle qui suit la levée de dormance (période de croissance active).

Il y a 4 phases de cultures :

- Etablissement de la culture aseptique
- Multiplication : on cherche le maximum d'unités de propagation dans le minimum de temps. Le taux de multiplication moyen est de l'ordre de 200000/an à partir d'une bouture. Dans le milieu, il faut favoriser les cytokinines pour la multiplication cellulaire. La balance hormonale endogène de la plante mère est aussi important (choix de l'explant).
- Enracinement : étape la plus délicate. On cherche à différencier des initiaux racinaires et provoquer leur développement.
- Acclimatation en serre (10 à 60 jours). On cherche à maintenir une humidité très élevée au début. On réduit ensuite progressivement l'humidité ambiante.



*culture in vitro de mélèze*  
© INRA, D Cornu



*culture in vitro de vigne*  
© INRA, JL Gaignard



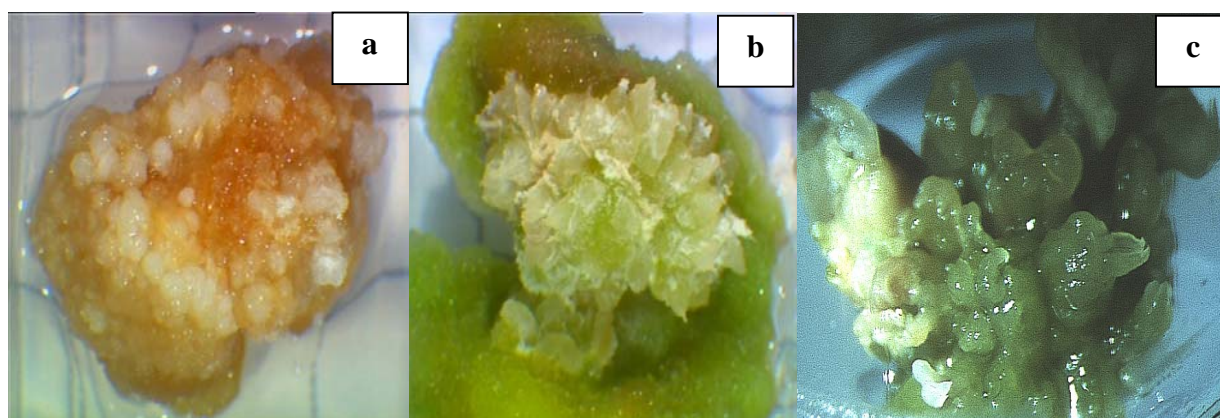
*microboutures d'un clone de noyer hybride*  
*en phase de multiplication.* © INRA, C Jouy-Allemand

### Régénération de plantes par organogenèse, embryogenèse ou culture de protoplastes

Cette approche des biotechnologies in vitro est certainement celle qui permet le plus d'avancées en terme de création de nouveautés génétiques et d'exploitation de ces stratégies dans le but pratique de la production de génotypes nouveaux d'intérêt agronomique. En effet, toutes les approches qui seront décrites ci-dessous passent à un moment ou autre de la méthodologie par une phase de régénération de plantes.

La régénération peut intervenir soit à partir de morceaux de la plante mère, donc tissus différenciés tels que des feuilles, tiges, nœuds, racines, hypocotyles (zone de la plantule située entre l'insertion des cotylédons et le début de la racine, reconnaissable par la présence des poils absorbants), etc, communément appelés « explants », soit à partir de masses de tissus non différenciés, appelées « cals ». Par ailleurs, elle peut se produire par organogenèse, embryogenèse ou culture de protoplastes.

Comme son nom l'indique, l'organogenèse consiste en la formation de novo d'organes ; souvent on utilise ce terme pour décrire la formation de bourgeons mais il s'applique aussi à des racines et même à des nodules vasculaires (espèce de structure plus ou moins arrondie constituée de faisceaux vasculaires disposés de façon concentrique ou spiralée mais qui rarement aboutit à la production d'un méristème).



*Réponses de régénération typiques à partir de divers explants de pois : a, embryogenèse sur un explant foliaire; b, organogenèse de bourgeons en bouquet très serré à partir d'un cal de cotylédon; c, un explant d'hypocotyle avec, simultanément, des réponses d'organogenèse et embryogenèse somatique.* © INRA Dijon, S Ochatt

En ce qui concerne l'embryogenèse somatique, la première remarque à faire porte sur son nom : on la dit somatique (du grec *somas* = corps) car elle se produit en absence de toute fécondation (ou méiose et recombinaison de l'ADN). Cependant, lors de leur développement, les embryons somatiques suivent les

mêmes étapes que ceux dans les graines obtenues après croisement sexué → globulaire (ronds), cordiforme (en forme de cœur), torpille (allongés avec croissance bipolaire) et cotylédonaire (les cotylédons sont visibles et l'embryon apte à germer pour donner une plantule), tel que détaillé dans la figure ci-dessous pour la luzerne.



Stades de développement successifs au cours de l'embryogenèse (de gauche à droite) : globulaire, cordiforme, torpille, cotylédonaire. © INRA Dijon, S Ochatt

Quelque soit la voie de régénération suivie par les explants, cals ou cellules (voir plus bas) il est essentiel de garantir la conformité des régénérants produits, notamment quand la stratégie d'étude comporte des variations induites et dirigées, où il est alors très important d'être sûr qu'aucune variation autre que celle voulue ne sera présente dans ces nouvelles plantes.

### Production de plantes haploïdes :

Cette technique présente un grand intérêt pour l'amélioration des plantes (permet d'accélérer les cycles de sélection).

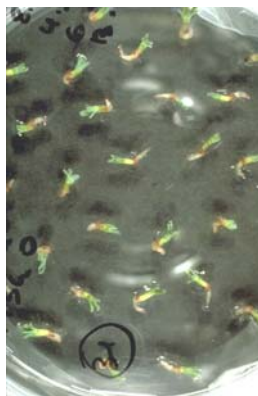
Pour l'androgenèse, on part d'anthères immatures. A partir des microspores, il peut y avoir apparition d'embryons directement ou après formation d'un cal haploïde.

Les facteurs ayant une influence sont la saison de prélèvement des anthères, l'état physiologique des plantes mères, le choix de l'inflorescence, le choix du stade morphologique de la fleur (en corrélation avec l'état de maturation des microspores). L'anthère est déposée sans filet (source d'embryon 2n) sur milieu liquide ou solide.

L'obtention de plantes diploïdes (haploïdes doublés) se fait par traitement à la colchicine. Il faut des milliers d'anthères pour avoir des plants haploïdes doublés intéressants. Le premier plant est souvent une chimère (le traitement est très destructeur et seules quelques cellules peuvent être doublées) que l'on fait fructifier pour obtenir des graines.

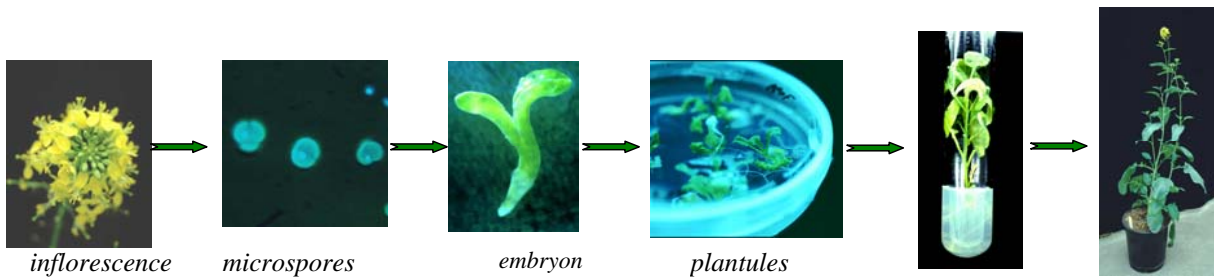


culture *in vitro* d'anthères d'aubergines  
© INRA, D Chambonnet



germination d'embryons somatiques de mélèze  
© INRA, MA Lelu





Exemple de la moutarde © INRA Dijon, E Lionneton

Une autre voie de production de plantes haploïdes est celle qui part des gamètes femelles (ovaires non fécondés), appelée alors gynogénèse. Dans cette approche, la régénération se fait uniquement par embryogénèse somatique, et les embryons haploïdes formés suivent les mêmes étapes de développement que ceux issus des microspores dans l'androgenèse.

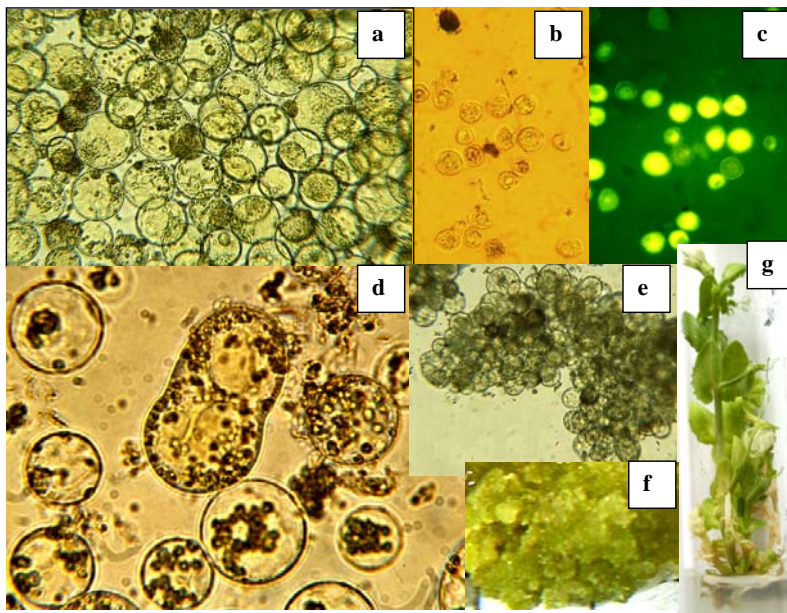
### Technologie des protoplastes : culture et fusion

Le terme protoplaste désigne une cellule végétale débarrassée de sa paroi : elle apparaît alors sous forme d'une cellule sphérique, limitée par sa membrane plasmique. L'intérêt de ces cellules réside dans le fait qu'il est possible de faire pénétrer dans la cellule des molécules diverses dont de l'ADN, des organites (chloroplaste, mitochondrie), des noyaux (fusion) et effectuer des manipulations génétiques. Toutes les espèces ne peuvent pas régénérer à partir de protoplastes et le rendement est faible (peut se faire par ex chez les rosacées, les composées, les légumineuses, les graminées, les crucifères...).

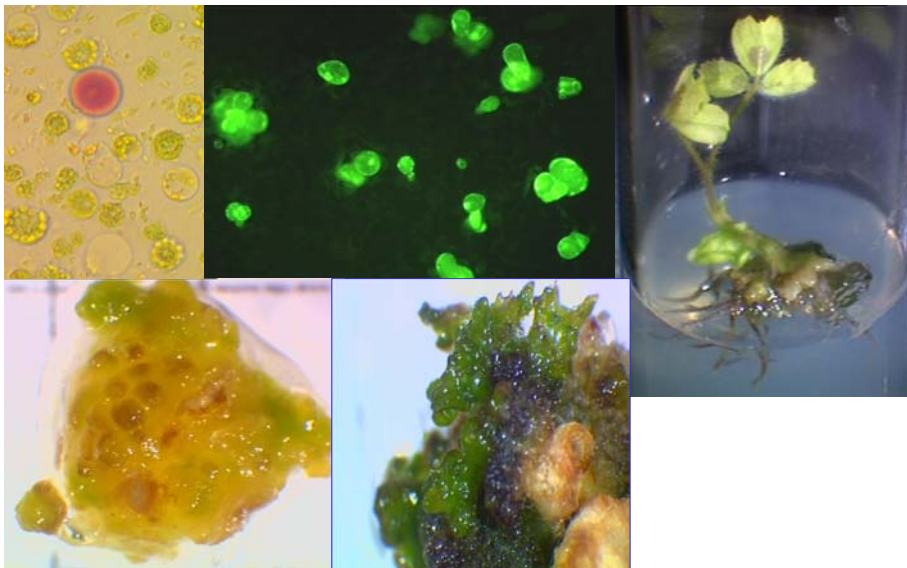
Par digestion enzymatique (cellulases, pectinases) on obtient le protoplaste sphérique en équilibre osmotique avec le milieu. Mis en culture sur milieu liquide, on observe les premières divisions. Plusieurs milieux sont nécessaires. Au trentième jour, des petits cals sont apparus. Vers 60 jours, apparition de bourgeons et le repiquage pour culture in vitro peut être fait.

La fusion de protoplastes offre de nombreuses possibilités pour le sélectionneur. On peut combiner 3 génomes différents : nucléaire, chloroplastique et mitochondrial. A partir de l'hétérocaryon (noyau mixte, du grec *karyon* = noyau) obtenu, plusieurs cas sont possibles : division des deux noyaux (chimères), un noyau se retrouve dans un cytoplasme étranger (cybride), les noyaux se sont mélangés par fusion (totale ou partielle) avec un cytoplasme combiné.

Le point le plus important à retenir dans le cadre de l'hybridation somatique est que, à la différence des hybridations sexuées, il n'y a pas ici de recombinaison des caractères : il s'agit d'un phénomène additif puisque les hybrides obtenus auront la somme des deux génomes parentaux et non un mélange de ceux-ci.



Séquence typique de régénération de plantes fertiles par organogénèse à partir de protoplastes chez le pois : a. protoplastes fraîchement isolés ; b-c, détermination de la viabilité des protoplastes par observation sous lumière directe (b) et sous UV après coloration avec un marqueur de vitalité (c) ; d. premières divisions cellulaires à partir des protoplastes cultivés ; e. microcal visible à l'œil nu (1 mm de diamètre) dérivé des protoplastes ; f. cal issu des protoplastes sur milieu de régénération ; g. plante fertile (notez la présence de fleurs et de gousses in vitro) dérivée des protoplastes cultivés. © INRA Dijon, S Ochatt



Séquence typique de régénération de plantes fertiles par embryogénèse à partir de protoplastes chez la luzerne modèle *Medicago truncatula* : protoplastes isolés, colonies cellulaires issues de protoplastes, cal dérivé de protoplastes avec formation précoce d'embryons somatiques, croissance des embryons formés, plantule dérivée de protoplastes. © INRA Dijon, S Ochatt

**Bibliographie** : Auge et al, « La culture in vitro et ses applications horticoles », 1989, Lavoisier, France  
 Ochatt et al in « Crops : growth, quality and biotechnology », 2005, WFL Publisher, Finland  
 Simonin G., INRA-Dijon : La culture in vitro. Dossier de synthèse. 2006.