

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

POLYCOPIE DU COUR

« Biotechnologie végétale »

DESTINE AUX ETUDIANTS DE Première ANNEE MASTER EN
BIOTECHNOLOGIE VEGETALE

Réalisée par Dr. Himour Sara

2024/2025

Sommaire

Préfaces

I. Introduction	1
1. Définitions de la biotechnologie	1
2. Aspects historiques du développement des cultures <i>in vitro</i>	1
3. Les différents domaines d'application de la biotechnologie	3
II. Fondements de la culture <i>in vitro</i> et multiplications des plantes	3
1. Modalités de la multiplication végétative	3
2. Définition de totipotence	4
3. Pourquoi les cellules végétales sont totipotentes ?	4
4. Etapes liées à la totipotence	5
5. Limites de la totipotence : impossibilité technique	5
6. Quels sont les mécanismes sous-jacents à la totipotence ?	5
III. Phénomènes physiologiques liés à la réalisation de culture <i>in vitro</i>	6
1. Explant	6
2. Stérilisation	6
2.1. Solutions stérilisantes	6
2.2. Stérilisation de la hotte	7
2.3. Stérilisation des végétaux	7
2.4. Conditions et difficultés de l'asepsie	8
2.5. Infections et quelques-unes de leurs causes :	8
3. Environnement	9
3.1. Lumière	9
3.2. Température	9
3.3. Hygrométrie	10
IV. Besoins nutritifs des tissus et cellule cultivés en conditions aseptiques	10

1. Constituants des milieux nutritifs.....	10
1.1. Sels minéraux Les besoins des plantes en éléments nutritifs :	10
1.2. Rôles des éléments minéraux :	11
2. Régulateurs de croissance.....	13
2.1. L'auxine.....	14
2.2. Les cytokinines.....	15
2.3. Les gibbérellines.....	16
2.4. Balance hormonale et réponse physiologique.....	17
3. Vitamines.....	17
4. Sucres.....	17
5. Géloses.....	18
5.1. Agar-agar.....	18
5.2. Gels synthétiques (Substituts d'agar).....	19
6. Composés organiques divers.....	19
7. Produits antibiotiques ou antiseptiques.....	20
V. Technologie de la culture <i>in vitro</i>	20
1. Culture de méristèmes.....	21
2. Micropropagation.....	25
3. Embryogénèse somatique.....	31
4. Haplo/diploïdisation : Androgenèse, Gynogenèse.....	34
5. Sauvetage d'embryon.....	36
6. Culture des protoplastes.....	37
VI. Avantage et inconvénients de la culture <i>in vitro</i>	44
1. Avantage.....	44
2. Inconvénients.....	44
VII. Aspect génétique : conformité du matériel reproduit <i>in vitro</i>	45

I. Introduction

1. Définitions de la biotechnologie

Utilisation des techniques de fermentation et dérivées Production industrielle de biens et de services par des procédés faisant appel à des organismes biologiques, et fondée sur des expertises dans les domaines de la microbiologie, la biochimie et l'ingénierie chimique

C'est l'utilisation des techniques de l'ADN recombinant pour la production de protéines recombinantes ou l'amélioration de certains caractères chez des organismes génétiquement modifiés dans une optique de production. La biotechnologie est une technologie basée sur la biologie, plus particulièrement dans le contexte de l'agriculture, de la science des aliments et de la médecine.

2. Aspects historiques du développement des cultures *in vitro*

1934 : Identification de l'acide indole acétique (IAA) par Kogl

1934 : Gautheret échoue dans la culture de cambium de ligneux

1935 : White réussit la culture de racines de tomates

1939 : Gautheret cultive du cambium de carotte et de tabac (utilisation d'auxine)

1941 : le lait de coco dans la composition du milieu de culture *in vitro* de *Datura*

1943-1950 : Travaux sur l'agent bactérien de la galle du collet

1949 : Culture *in vitro* de fruits (Nitsch)

1951 : Culture d'ovaires (Nitsch)

1951 : Contrôle chimique de la croissance et de la formation d'organes (Skoog)

1952 : Microbouturage

1952 : Culture d'embryons de *Dahlia* 1953: Cal haploïde à partir de pollen

1954 : Cal à partir d'une cellule unique (Muir)

1955 : Identification de la kinétine (une cytokinine)

1956 : brevet sur la production de substances à partir de cultures de tissus végétaux (*Phaseolus*) par Routien JB et Nickell LG

1956 : premières cultures de suspensions cellulaires

1957: Skoog et Miller établissent le cadre théorique de l'influence de la balance hormonale auxine/cytokinine sur l'organogenèse

1957: culture d'anthères excisées

1958: cultures d'ovules de pavot

1958 : embryogenèse somatique

1960 : préparation de protoplastes par digestion enzymatique

1964 : génération artificielle d'individus haploïdes de *Datura*

1965 : Vasil et Hildebrandt régénèrent un plant de tabac à partir d'une cellule isolée

1970 : Fusion de protoplastes

1977 : Réacteur de 20 000 L pour la culture de tabac

1978 : production à l'échelle industrielle de shikonine rendue possible par la sélection de lignées cellulaires fortement productrices (Tabata M)

1979 : Utilisation de l'inclusion de cellules dans des billes d'alginate pour la biotransformation

1982 : transformation de protoplastes par de l'ADN nu

1983 : Mitsui Petrochemicals produit de la shikonine avec des réacteurs de cellules *Lithospermum*

1984 : Transformation de protoplastes de tabac et régénération d'un plant transformé (Paszowsky)

1984 : Agrotransformation de disques foliaires (Horsch)

1984 : Electroporation

1987 : Canon à particules

1991 : cryopreservation de lignées cellulaires de *Catharantus*

1994 : Premier OGM végétal commercialisé : La variété de tomates Flavr Savr inventée et commercialisée par la société CALGENE (échec commercial)

1996 : Premier maïs transgénique commercialisé aux USA

3. Les différents domaines d'application de la biotechnologie

- Biotechnologie jaune

- Protection de l'environnement
- Traitement et élimination de pollution.

- Biotechnologie verte

Utilisation des plantes et des cellules pour la production et la transformation des produits alimentaires, des biomatériaux et de l'énergie (jatropha)

- Biotechnologie bleue

Développent des produits en liaison avec la biodiversité marine : santé, cosmétique, aquaculture, agro-alimentaire.

- Biotechnologie blanche

II. Fondements de la culture in vitro et multiplications des plantes

Tous les êtres vivants ont un caractère commun celui de pouvoir se reproduire. Divers processus ont été développés mais, malgré leur diversité, ils peuvent être regroupés en deux grands types ;

- le premier est la reproduction sexuée, faisant intervenir des structures reproductrices particulières,
- le second type est la reproduction asexuée, ou multiplication végétative par laquelle un organisme est capable d'en générer un autre sans intervention de structures reproductrices spécifiques

1. Modalités de la multiplication végétative

Est un processus de reproduction qui permet d'obtenir un individu génétiquement identique à l'original, sans passer, bien entendu, par la reproduction sexuée. Elle permet une reproduction fidèle de l'appareil végétatif, d'où son nom (Figure 1).

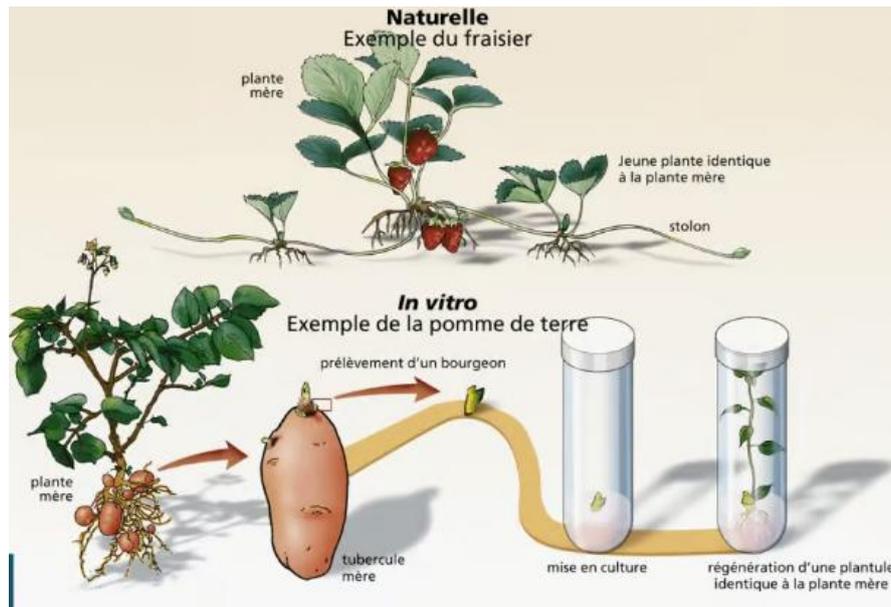


Figure 1 : Modalités de multiplication végétative

Certains végétaux se multiplient naturellement sans passer par la reproduction sexuée. Un nouvel individu se forme à partir d'un organe de la plante "mère" par les drageons, rejets, bulbilles, tubercules et les bulbes et la multiplication végétative artificielle est assurée par l'homme comme le bouturage et griffages et marcottage et la culture in vitro

La multiplication végétative est due aux plusieurs phénomènes spécifiques pour les végétaux comme la totipotence et la dédifférenciation.

2. Définition de totipotence

Chez les plantes, la totipotence peut se définir comme la propriété qu'ont certaines cellules de pouvoir régénérer un individu lorsqu'elles sont placées dans des conditions appropriées, en passant éventuellement par une étape de dédifférenciation.

3. Pourquoi les cellules végétales sont totipotentes ?

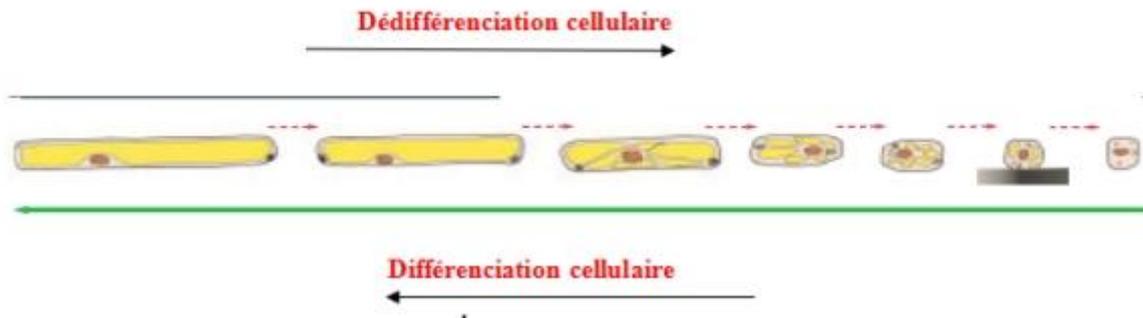
Arguments classiques :

- Petit nombre de types cellulaires
- Seulement 3 ou 4 types d'organes fondamentaux (racine, tige, feuilles) dont les fleurs, épines, fruits et tubercules sont des dérivés
- Grande plasticité génomique : la croissance peut rester presque normale malgré de profonds remaniements chromosomiques

4. Etapes liées à la totipotence

➤ Etape 1 :

- Cellules différenciées : dédifférenciation nécessaire → Cellules souches méristématiques



- Etape 2 : mise en route de l'activité mitotique utilisation de substances de croissance
- Etape 3 : autonomie de la croissance tissulaire vis-à-vis des substances de croissance exogènes

5. Limites de la totipotence : impossibilité technique

- Différenciation irréversible.
- En fonction de la méthode de préparation des protoplastes, récalcitrance à la régénération.
- Pour beaucoup d'espèces d'intérêt agronomique, les protoplastes ne sont pas totipotents (récalcitrants) ex : *Vitis vinifera*.
- Variation somaclonale: Les plantes régénérées présentent souvent des problèmes (Aneuploïdies, délétions chromosomiques).
- Modification du caractère juvénile (Impact sur la fertilité).

6. Quels sont les mécanismes sous-jacents à la totipotence ?

Arguments classiques rendant compte de la totipotence des cellules végétales.

Développements récents

- Le fonctionnement des méristèmes : un domaine de recherche très actif
- Notion de cellule souche
- Notion de niche de cellule souche

III. Phénomènes physiologiques liés à la réalisation de culture in vitro

1. Explant

Un « explant » est le matériel végétal de base qui servira à produire des clones végétaux à partir d'une « plante-mère » ou éventuellement secondairement des greffons.

Ce sont des parties d'organes ou un organe entier, tissus, pièces florales, graines ou embryons, bourgeons ou apex ou méristèmes, cellules somatiques ou sexuelles, protoplastes

2. Stérilisation

2.1. Solutions stérilisantes

Afin d'obtenir une culture aseptique, les tissus végétaux à mettre en culture doivent être « stérilisés » en surface, c'est-à-dire débarrassés des bactéries ou spores de champignon (moisissures) qui adhèrent à leur surface. Il s'agit de la partie la plus difficile de l'établissement d'une culture *in vitro*. Le défi est de désinfecter le végétal sans compromettre sa survie.

Il faut d'abord savoir que :

- Le degré d'infection des tissus en surface est très variable ;
- Les parties aériennes sont généralement les moins infectées ;
- Il est préférable d'utiliser les nouvelles pousses car elles sont relativement plus propres que les plus âgées ;
- Les plantes provenant de la serre sont souvent plus propres que celles qui viennent du champ ;
- Plus l'explant est petit, plus les chances de contamination sont faibles ; mais plus l'explant est gros, plus les chances de reprise sont grandes;
- La concentration la plus faible de solution de javel qui assure l'asepsie, devrait être celle qu'on utilise, puisque le matériel végétal peut être brûlé si la concentration est trop forte.

Les explants sont le plus souvent désinfectés par immersion dans une solution de javel commerciale (hypochlorite de sodium NaCl) dont la teneur varie selon la marque de

commerce entre 4 et 6 %. La concentration finale de la solution de javel se situe généralement à 0.5%.

D'autres produits peuvent être utilisés :

- Alcool éthylique ou isopropylique 70 % (trempage 20 secondes, utilisé comme agent mouillant)
- Hypochlorite de calcium 0.8 % (produit très intéressant car il pénètre très peu les tissus mais difficile à trouver et long à préparer)
- Chlorure mercurique $HgCl_2$ 0.01 % (poison violent !) (doit être utilisé sous une hotte chimique, très difficile à éliminer de la surface des végétaux) À déconseiller,

2.2. Stérilisation de la hotte

La hotte à flux laminaire doit être préparée de préférence 30 minutes avant son utilisation. Vaporisation à l'alcool 70% de l'intérieur des parois verticales (à l'exclusion du filtre) et la surface de travail ;

- Vaporiser à l'alcool 70% tous le matériel et les instruments nécessaires

2.3. Stérilisation des végétaux

S'il s'agit d'une espèce pubescente : tremper les explants dans l'éthanol 70 % pendant 20 secondes (l'alcool agira ici comme agent mouillant); de l'alcool, transférer directement les explants dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.5% à laquelle on a ajouté quelques gouttes de Tween-20 ou de savon.

Les explants devront rester dans cette solution (en agitation ou en rotation) pendant 5, 10, 12 ou 15 minutes selon les recommandations.

On stérilise tous les instruments par trempage dans l'alcool 96% puis passage à la flamme. Les instruments ainsi stérilisés reposent sur une scopule (support métallique) qui a préalablement été flambée à ses deux extrémités. Les instruments sont toujours doublés pour permettre le refroidissement de l'un tandis que l'autre est en usage. Un instrument chaud peut endommager les tissus vivants.

Le récipient contenant les explants est ensuite amené sous la hotte après avoir été vaporisé à l'alcool 70%.

- En évitant toute contamination, les explants sont transférés dans un premier pot d'eau stérile pour une durée de 5 minutes ; puis dans un deuxième et un troisième pot d'eau stérile pour une durée de 5 minutes chacun.
- Après le troisième et dernier rinçage en eau stérile, les explants sont transférés un à la fois sur une surface de travail stérile (pétri ou autre), découpé de la façon décrite (apex de tige, noeud,...)
- Transfert de l'explant sur la gélose :
- À l'aide de la pince, on dépose l'explant sur le milieu en prenant le minimum de temps; la rapidité est une des conditions de la réussite des cultures

On veillera à changer la surface de travail stérile (pétri ou autre) tous les 3 ou 4 explants environ et à stériliser les instruments encore plus fréquemment.

2.4. Conditions et difficultés de l'asepsie

La technique de culture *in vitro* exige beaucoup de soin pour le maintien de la culture en condition d'asepsie. Pour quiconque entreprend ses premières expérimentations, plusieurs gestes et précautions semblent superflus. Mais il faut toujours se rappeler que les microorganismes sont partout (spores de champignon, bactéries). Il ne suffit pas d'instruments ou d'une surface de travail propres, mais bien stériles sans quoi un seul micro-organisme en contact avec la gélose finira par envahir le milieu entraînant la mort du plant. Ainsi, il vaut mieux au début respecter le maximum de règles, quitte à les simplifier par la suite selon son expérience personnelle.

2.5. Infections et quelques-unes de leurs causes :

Lorsque l'on a des cultures infectées, cela peut provenir de différentes causes. Dès l'apparition des symptômes, on regarde d'abord s'il s'agit d'un champignon (moisissure) ou d'une bactérie. S'il s'agit d'un champignon, on voit un développement mycélien qui a une texture feutrée, souvent blanche ou grisâtre. Si le feutrage est vert, il s'agit sans doute du *Penicillium*. Si le feutrage présente des petits grains noirs (fructifications), il peut s'agir du *Rhizopus nigricans* qui se multiplie très vite et qu'il faut détruire à l'autoclave sans tarder. S'il s'agit d'une bactérie, on voit alors un voile d'aspect laiteux, développé à l'intérieur du milieu et à la surface. Ce voile est quelquefois coloré (rose, jaune, orangé ...). On regardera ensuite si l'infection part de la zone de contact entre les tissus et le milieu, et si oui, ce sont les tissus eux-mêmes qui sont la source de l'infection. Si l'infection part d'un point quelconque du

milieu, la source de l'infection peut être soit l'air, soit une mauvaise stérilisation du milieu, soit une infection de l'air ambiant par l'intermédiaire de l'eau de condensation au niveau du couvercle. Dans certains cas, rares heureusement, des spores de certaines bactéries peuvent résister à l'autoclave; il faudra alors stériliser la verrerie à l'eau de Javel. Lorsque l'on voit un développement de mycélium de *Penicillium*, cela provient de l'air et indique une mauvaise manipulation. Les exemples de mauvaises manipulations sont nombreux : bavardage pendant le travail sous la hotte à flux laminaire, contact des tissus végétaux avec des doigts, mauvaise stérilisation des instruments qui portent alors les micro-organismes de l'explant infecté sur les autres.

En cours de culture, on peut ne voir apparaître aucune trace de voile bactérien, alors que les bactéries sont présentes dans les tissus. Dans ce cas, le milieu de culture utilisé ne permet pas le développement de la bactérie; toutefois, on peut permettre son expression en ajoutant de la peptone à 2 g/L dans le milieu (la peptone est un constituant classique des milieux de culture des bactéries). On fera ensuite le tri en éliminant les tubes infectés, et on obtiendra ainsi une collection de tissus indemnes de bactéries

3. Environnement

3.1. Lumière

Besoin de lumière Chez les plantes cultivées in vitro, la photosynthèse n'est pas une activité nécessaire puisque l'énergie est fournie par les glucides du milieu. Cependant, même réduite la photosynthèse persiste dans les tissus. De plus la lumière est indispensable au déclenchement et au bon déroulement de certains processus morphogénétiques : nécessité de jours longs pour obtenir des boutons floraux par ex. La puissance lumineuse à fournir dépend de la durée de l'éclairement et de la qualité spectrale de la lumière reçue par la culture. On exprime l'intensité lumineuse en $W.m^{-2}$, intensité mesurée au niveau de la culture. On obtient généralement 100 à 150 $W.m^{-2}$ pour des tubes fluorescents placés à 20cm au-dessus des récipients de culture.

3.2. Température

La température est généralement réglée à 20/25°C en continu. Il ne faut pas négliger que la température dans les flacons de cultures peut être supérieure de 2 à 4°C à la température de la pièce à cause de l'éclairage.

3.3. Hygrométrie

Elle doit atteindre les 100% d'humidité relative dans les flacons. Cependant, il faut veiller à ne pas noyer les explants par un excès de condensation à la surface du milieu.

IV. Besoins nutritifs des tissus et cellule cultivés en conditions aseptiques

1. Constituants des milieux nutritifs

Un milieu de culture est constitué principalement d'eau, de sels minéraux (macroéléments, micro-éléments, fer), d'éléments organiques (vitamines, sucre, parfois des acides aminés, etc.) de «phytohormones » ou de régulateurs de croissance. Cette solution aqueuse est souvent solidifiée au moyen d'agar (substance extraite des algues marines que l'on appelle *agar-agar* ou *gélose*). La gélose est facilement dissoute à 100°C, on doit donc atteindre le point d'ébullition afin de l'incorporer au milieu de manière uniforme, c'est pourquoi l'on parle de la « cuisson » des milieux.

Certains composés comme les micro-éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe), certaines vitamines et régulateurs de croissance sont requis en si petite quantité qu'il est impossible de les peser. On doit donc les concentrer préalablement sous forme de solutions-mères. Par la suite, on pourra puiser à même ces solutions-mères la quantité requise d'agent actif pour chacune des formulations de milieu recommandé.

Comme il peut être long et fastidieux de peser les produits nécessaires à chaque fois que l'on fait un milieu, on utilise couramment des solutions où tous les ingrédients sont incorporés.

1.1. Sels minéraux Les besoins des plantes en éléments nutritifs :

A- Eléments indispensables à la vie des plantes :

L'analyse des plantes montre qu'elles contiennent, à des proportions différentes, onze éléments en grandes quantités (N, Ca, C, Cl, H, Mg, O, P, K, Na, S) et 18 éléments en quantités réduites (Aluminium, Arsenic, Bore, Brome, Cobalt, Cuivre, Etain, Fer, Fluor, Iode, Manganèse, Molybdène, Nickel, Plomb, Silicium, Titane, Vanadium et Zinc). Parmi ces 29 éléments seulement 13 sont indispensables, à savoir :

- 3 éléments organiques : C, H et O. En moyenne, le carbone représente 44 %, l'oxygène 44 % et l'hydrogène 6 %, soit au total 94 % de la matière sèche d'un végétal, avec une variabilité de 90 à 95 %. Malgré l'importance quantitative et qualitative de ces éléments majeurs organiques, on ne les apporte pas dans une fumure. Les plantes les

incorporent dans leurs tissus végétatifs par l'intermédiaire des processus de photosynthèse.

- 6 éléments minéraux majeurs : N, Ca, Mg, P, K et S. Il y a une grande variabilité dans les teneurs de ces éléments dans les tissus foliaires selon les espèces, variétés et conditions du milieu de culture. Il y a dominance surtout de N et de K. A titre indicatif, les feuilles de la pomme de terre contiennent 2 à 2,5 % de N ; 1 à 3 % de K ; 1,5 à 2,5 % de Ca ; 0,5 % de Mg; 0,2 % de P et moins de 0,1 % de S.
- et 7 éléments minéraux mineurs : Fe, B, Mn, Zn, Cu, Cl et Mo. Les valeurs habituellement relevées dans les analyses de végétaux sont les suivantes : Fer : 40-250 ppm (MS). Bore : 10-500 ppm. Manganèse : 15-400 ppm. Zinc : 5-200 ppm. Cuivre : 5-30 ppm. Chlore : 5-20 ppm et Molybdène : moins de 1 ppm.
- Les 13 éléments minéraux N, K, Ca, Mg, P, S, Fe, B, Mn, Zn, Cu, Cl et Mo sont appelés éléments nécessaires. Les plantes peuvent contenir d'autres éléments (Na, Co...) qui jouent des rôles bénéfiques dans leur croissance et dans la qualité de leurs produits sans qu'ils soient indispensables; on les appelle éléments accessoires . La plante puise C sous-forme de CO₂ dans l'air, H et O à partir de l'eau du sol et les autres éléments minéraux sous-forme d'ions qui se trouvent dans la solution de sol. Cette solution de sol (appelée facteur d'intensité) est alimentée par solubilisation, par les réserves de la phase solide du sol (appelées facteur de capacité).

1.2. Rôles des éléments minéraux :

A- L'azote :

L'azote joue un rôle primordial dans le métabolisme des *vitro* plantes. En effet, c'est le constituant numéro un des protéines qui sont les composés fondamentaux de la matière vivante.

B- Le potassium :

Cet élément est très mobile dans la plante et est rapidement distribué dans les différents organes du végétal. Le potassium joue un rôle fondamental dans l'absorption des cations, dans l'accumulation des hydrates des protéines, l'organisation de la cellule, le maintien de la turgescence de la cellule et la régulation de l'économie de l'eau des plantes (régulation des stomates).

C- Le phosphore :

Cet élément joue les rôles suivants : transfert d'énergie (ATP), transmission des caractères héréditaires (acides nucléiques), photosynthèse et dégradation des glucides.

D- Le calcium :

C'est un constituant de près de 50 % des cendres de la plante entière et essentiellement des parois cellulaires. Il joue un rôle dans la neutralisation des acides organiques.

E- Le magnésium :

C'est un constituant de la chlorophylle et, par conséquent, il joue un rôle important sur la photosynthèse. Le magnésium active près de 300 processus enzymatiques et en particulier celui lié au métabolisme des hydrates de carbone .. Il agit sur la stabilité de la membrane cellulaire, sur la régulation du transport ionique interne, favorise la synthèse des protéines, des sucres et des lipides, régularise la réduction des nitrates et influence l'absorption et la translocation des phosphates.

F- Le soufre :

C'est un constituant des acides aminés. Il joue un rôle fondamental dans le métabolisme des vitamines.

G- Les éléments mineurs :

Ces éléments jouent un rôle déterminant dans le métabolisme de la plante, essentiellement dans les réactions enzymatiques. Leurs rôles spécifiques se présentent comme suit :

* Le bore : + Il intervient au niveau du métabolisme et du transport des glucides.

+ Il participe à la synthèse des protéines.

+ Il a un rôle fondamental dans la résistance des parois cellulaires.

* Le cuivre : + Stimulation de la croissance.

+ Renforcement des parois cellulaires.

+ Catalyseur de la formation d'hormones de croissance.

+ Rôle essentiel dans la nitrification.

* Le fer : + Elément essentiel dans la formation de la chlorophylle.

- + Rôle dans le transport d'oxygène (respiration).
- + Catalyseur de plusieurs enzymes .
- * Le manganèse :
 - + Synthèse de la chlorophylle ..
 - + Activateur de la nitrate réductase .
- * Le molybdène :
 - + Action essentielle dans l'assimilation de l'azote .

Les besoins nutritifs des plantes en culture *in vitro* concernent d'abord les sels minéraux. Le praticien doit avant toute chose recréer pour la plante un milieu de vie comparable au sol dont elle sera maintenant dépourvue. Tous les éléments essentiels à sa croissance doivent donc être incorporés au milieu sans quoi une carence minérale peut survenir. De plus, le choix des différents sels devra respecter un équilibre ionique afin de favoriser une croissance harmonieuse sans créer d'inhibition. Les besoins des cultures de tissus en éléments minéraux ont été étudiés par différents auteurs et le fruit de leurs recherches a donné lieu à différentes compositions minérales toujours utilisées aujourd'hui. Ces formulations portent souvent le nom de leurs auteurs tels que GAMBORG (Canada), GAUTHERET (France), HELLER (France), MURASHIGE et SKOOG (Etats-Unis), WHITE (Etats-Unis), MOREL (France), etc. La composition du milieu de culture Murashige et Skoog est sans doute la plus utilisée car elle convient à un très grand nombre de plantes de familles botaniques différentes. Ce milieu est très riche en sels minéraux et il convient souvent de le diluer de moitié ou plus afin d'éviter des effets osmotiques inhibiteurs, particulièrement chez les espèces à croissance très lente.

2. Régulateurs de croissance

On les appelle aussi « phytohormones » ou « hormones végétales », mais considérant qu'il s'agit variablement de produits de synthèse ou de produits synthétiques, il est préférable d'utiliser le terme "régulateurs de croissance". Ces substances sont utilisées à des doses très faibles (0.01mg/l à 10 mg/l) et nécessitent le plus souvent d'être pesées sur une balance de précision à 0.0001g. Il est toutefois possible de fabriquer des solutions-mères à partir de masses s'élevant à 100 mg et d'opérer par la suite une série de dilutions. Les trois principaux groupes de régulateurs de croissance d'usage fréquent sont les AUXINES, les CYTOKININES et les GIBBERELLINES. Le choix du ou des régulateurs utilisés ainsi que

leur quantité est généralement guidé par la littérature. Si l'espèce végétale convoitée ne figure pas parmi vos lectures et qu'aucun milieu de culture ne semble disponible à titre de référence, une première expérience pourrait être tentée en utilisant un milieu de culture réputé convenable pour une espèce voisine ou pour une plante d'un même genre ou même d'une même famille botanique.

2.1. L'auxine

Est la première hormone à être découverte dans les plantes et un des premiers agents, sur une longue liste, de signalisation chimique qui régleme le développement des plantes. La forme d'auxine la plus courante survenant naturellement est – l'indole 3 -acétique (IAA).

Rôles *in vitro* :

- Favorise la croissance de cals (amas de cellules indifférenciées)
- Favorise le développement de bourgeons adventifs
- Favorise l'enracinement.

➤ Acide indole-3-acétique (A.I.A.) :

- Substance naturelle pouvant être obtenue par synthèse chimique ;
- Auxine relativement faible ;
- Se dégrade rapidement à la lumière (oxydation);
- Conservée préférentiellement dans un contenant ambré (obscurité) au réfrigérateur (4-5°C). Se conserve 7 jours dans ces conditions ;
- Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96o).

➤ Acide naphthalène acétique (ANA) :

- Substance de synthèse stable en solution et à la chaleur (autoclave);
- Auxine forte et très stable ;
- Souvent utilisée pour favoriser la rhizogénèse (initiation des racines);
- Conservée au réfrigérateur ou au congélateur ; Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96o).

➤ Acide indole-butyrique (A.I.B.) :

- Substance de synthèse relativement stable ;

- Auxine relativement faible ;
- Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96o).

➤ **Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) :**

- Substance de synthèse stable à la chaleur (autoclave);
- Largement utilisée comme herbicide ;
- Auxine très forte et dont le niveau toxique est atteint très rapidement ;
- Utilisée pour la production de cals surtout ;
- Peu soluble dans l'eau. Dissoudre dans l'éthanol. Chauffer légèrement. Diluer progressivement avec de l'eau ;
- Conservée à l'obscurité au réfrigérateur ou au congélateur.

2.2. Les cytokinines

Les cytokinines ont été découvertes lors de la recherche de facteurs qui stimulent la division des cellules végétales. Depuis leur découverte, les cytokinines ont montré qu'elles pouvaient avoir des effets sur beaucoup d'autres processus physiologiques et de développement, y compris la sénescence des feuilles, la mobilisation de la nutrition, la dominance apicale, la formation et l'activité de méristème apical, le développement floral, la rupture de la dormance des bourgeons, et la germination des graines.

Bien que les cytokinines régulent de nombreux processus cellulaires, le contrôle de la division cellulaire est central dans la croissance des plantes et leur développement et est considéré comme diagnostique pour cette classe de régulateurs de croissance des plantes

Rôles *in vitro* :

- Stimule les divisions cellulaires ;
- Régularise la morphogénèse (acquisition de la forme) ;
- Stimule la croissance des bourgeons axillaires ;
- Contribue au renouvellement de la chlorophylle.

Toutes les cytokinines sont peu solubles dans l'eau et doivent être préalablement dissoutes dans quelques gouttes de NaOH 1N ou de HCl 1N. Elles sont dégradées par la

lumière et doivent être conservées au réfrigérateur à l'obscurité. Elles sont stables en solutions aqueuses et à la chaleur (autoclave).

➤ **Zéatine :**

- Substance naturelle.

➤ **Isopenthényladédine (2-i-P) :**

- Substance naturelle;
- Cytokinine relativement faible.

➤ **Kinétine :**

- Substance de synthèse.

➤ **6-benzylaminopurine (BAP) et benzyladénine (BA) :**

- Substance de synthèse;
- Largement utilisé en raison de sa grande activité et de son faible coût.

2.3. Les gibbérellines

Elles appartiennent à la famille des terpènes (hydrocarbures aromatiques naturels qui interviennent dans la composition des essences), elles possèdent 20 atomes de carbone. Actuellement, on en connaît plus de 70 représentées par les abréviations suivantes : GA1, GA2, GA3, etc....La plus utilisée et la plus commercialisée est l'acide gibbérellique GA3 produite par le genre *Fusarium*.

Rôles *in vitro* :

- Favorise le grandissement cellulaire;
- Favorise l'allongement des entre-noeuds;
- Lève la dormance des graines.

Seul l'**acide gibbérellique A3 (Ga3)** est utilisé.

- Vérifier sa concentration sur l'étiquette ;
- Substance de synthèse peu stable en solution aqueuse;
- Devrait être préparée juste au moment de l'utilisation;
- Pourrait être conservée dans l'alcool (éthanol ou méthanol 96o) au réfrigérateur.

2.4. Balance hormonale et réponse physiologique

Le schéma ci-dessous représente les niveaux relatifs d'une auxine et d'une cytokinine nécessaire afin d'obtenir différentes réponses morphogéniques



Figure 3: Balance hormonal

3. Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques reconnues pour stimuler la croissance.

Elles sont particulièrement utiles en micropropagation lorsqu'un fragment seulement de la plante est utilisé pour générer la culture de plantes entières. On comprendra que dans ces circonstances, la synthèse endogène (par le tissu végétal lui-même) de vitamines risque d'être insuffisante et que le milieu devra y suppléer en conséquence.

Les vitamines les plus fréquemment utilisées sont la thiamine HCL, la pyridoxine, la biotine, le pantothenate de calcium et le myo-inositol (le myo-inositol est parfois considéré comme un sucre). Les concentrations sont souvent faibles et il sera alors nécessaire de fabriquer des solutions-mères. La conservation de ces solutions-mères pourra se faire au congélateur en contenants de plastique ou distribuées dans des cubes à glaçon par petits volumes (exemple 10 ml), puis démoulés une fois gelés et rangés dans des sacs à congélation. Une fois la solution sortie et décongelée, elle devra être utilisée dans les 2 à 4 semaines qui suivent.

4. Sucres

Les tissus végétaux en culture *in vitro* sont très peu performants au niveau photosynthétique. Ils produisent de la chlorophylle comme des tissus normaux, mais leur faible capacité à produire des sucres par photosynthèse est sans doute due à la faible concentration en gaz carbonique (CO₂) des contenants. Ainsi doit-on ajouter au milieu de

culture des glucides sous forme de saccharose (sucrose) afin que la plante les utilise comme source d'énergie à défaut d'en produire elle-même. En général, la concentration prescrite est de 30 g au litre. Le passage à l'autoclave provoque une altération des sucres par hydrolyse (glucose-fructose) mais cette modification ne semble pas nuire à la croissance.

5. Géloses

La gélose (ou agar) ajoutée au milieu nutritif permet l'obtention d'un milieu semi-solide ou solide dans lequel les explants peuvent être repiqués et supportés. En l'absence de gélose, les milieux liquides doivent être agités (sur de plaque rotative à raison d'une ou deux tours minute) afin de permettre l'incorporation de l'oxygène nécessaire à leur survie, on évite ainsi leur asphyxie. La gélose a l'avantage de retenir très peu les ions mais en contrepartie il fournit un milieu de vie pauvre en oxygène lorsqu'elle est utilisée à forte concentration. Une variation de la concentration en gélose (entre 6 et 10 g/litre), a aussi pour effet de modifier l'équilibre osmotique du milieu créant parfois des problèmes de vitrification. La qualité d'un milieu gélosé est donc dépendante d'une part de sa fermeté, indispensable au support des plantes, et d'autre part de sa souplesse, qui facilite la diffusion des éléments nutritifs. La concentration utilisée varie selon le niveau de pureté de la gélose et l'objectif de la culture.

5.1. Agar-agar

Il s'agit d'une substance naturelle extraite de différentes espèces d'algues marines. On la classe parmi les sucres parce qu'elle est identifiée comme un polysaccharide (donc un glucide).

Elle se dissout dans l'eau entre 90 et 100°C. En refroidissant, elle demeure à l'état liquide jusque vers 55°C et elle se solidifie en un gel relativement clair à l'environ de 40°C. Le milieu gélosé ne peut être porté à ébullition une seconde fois car cette sur-cuisson entraînerait une dégradation de l'agar qui perdrait alors ses propriétés. De plus, la solidification du milieu gélosé peut être compromise si le pH de la solution a été ajusté sous les 4.8. En effet, il semble qu'à des pH aussi bas (plantes acidophiles), l'agar perd de ses propriétés au moment de l'autoclavage.

À la sortie de l'autoclave, la gélification se fait normalement en 2 à 3 heures, selon le volume de milieu par contenant. L'agar vendu commercialement contient malgré tout des impuretés (des ions sulfates, calcium, magnésium, fer, etc.). C'est pourquoi son prix varie en fonction de la purification du produit. La mention « purifié » est d'une qualité suffisante à l'exercice de cette technique.

5.2. Gels synthétiques (Substituts d'agar)

Il existe présentement sur le marché, de nouveaux produits permettant de solidifier les milieux de culture. Par exemple, le Gelrite ou Phytigel dont plusieurs auteurs font mention est dérivé d'une bactérie (*Pseudomonas sp.*). Il s'agit d'un sucre complexe hautement raffiné. Leur utilisation est intéressante. Elle permet de réaliser un milieu d'une clarté cristalline, et des quantités avoisinant 2 g/litre permettent d'obtenir une gélification équivalente à l'agar traditionnel à 7 g/litre. Son prix de revient est le double de celui de l'agar mais compte tenu qu'on en utilise seulement le tiers de la quantité de l'agar conventionnel, son utilisation demeure intéressante

Charbon activé Le charbon activé est fréquemment utilisé au stade de l'enracinement (stade III). Plusieurs praticiens utilisent ce produit tout au cours des stades I, II et III. Le charbon activé est une substance adsorbante qui permet la neutralisation de produits toxiques exsudés dans le milieu par la plante. Il peut s'agir plus couramment de substances phénoliques naturellement produites lors de la taille ou la découpe de certaines plantes, comme les ligneuses par exemple. En contexte normal, ces substances sont lentement lessivées des plaies par les pluies ou autrement. Ces substances phénoliques apparaissent après oxydation de précurseurs présents au site de la plaie et joue le rôle d'antiseptique (toxique pour les micro-organismes). Il s'agit en quelque sorte d'une défense naturelle des plantes.

Cependant, en culture *in vitro* ces plantes émettent ces substances toxiques dans un milieu fermé. On remarque la présence de ces phénols à la base des plantules où elles s'accumulent dans la gélose formant une zone nébuleuse noirâtre. Selon certaines expériences, le charbon activé a été tout désigné pour neutraliser l'effet inhibiteur et toxique de ces substances phénoliques dans le milieu en cours de culture. Entre autre application, le charbon activé serait bénéfique lors de l'enracinement. À cette étape, la réalisation d'un milieu opaque et sombre grâce à l'ajout du charbon activé aurait pour effet d'imiter ces conditions présentes dans le sol où évoluent normalement les racines.

6. Composés organiques divers

Les **acides aminés** (constituants des protéines) et les **extraits de protéines** (exemple l'hydrolysate de caséine) sont occasionnellement ajoutés au milieu de culture dans le but de favoriser l'organogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux organes (bourgeons, racines...). L'acide aminé le plus couramment utilisé est la Glycine (C₂H₅O₂) notamment

retrouvée dans les composants organiques du milieu MS. Les **acides organiques** comme le citrate et le malate sont parfois ajoutés au milieu de culture.

7. Produits antibiotiques ou antiseptiques

Les produits antibiotiques ajoutés au milieu comme la tétracycline, streptomycine, polymyxine-B, etc. sont souvent utilisés en combinaison afin de lutter contre des bactéries endogènes des plantes. Il arrive occasionnellement que certaines plantes (les plantes ligneuses plus spécialement) contiennent des bactéries qui s'échappent dans le milieu nutritif, et se développent en colonies suffisamment importantes pour compromettre la culture. Les produits antibiotiques ajoutés au milieu comme la tétracycline, streptomycine, polymyxine-B, etc. sont souvent utilisés en combinaison afin de lutter contre ces bactéries endogènes des plantes (à l'intérieur de la plante). Mais ces produits antibiotiques sont coûteux et sont souvent contournés par les bactéries qui leur deviennent résistantes.

V. Technologie de la culture in vitro.

Principales méthodes utilisées en culture *in vitro*

Le schème ci-dessous montre les différentes méthodes utilisées en culture *in vitro* à savoir :

- Culture de méristème
- Micropropagation
- Embryogénèse somatique
- Sauvetage d'embryon
- Culture des protoplastes
- Haplo/diploïdisation

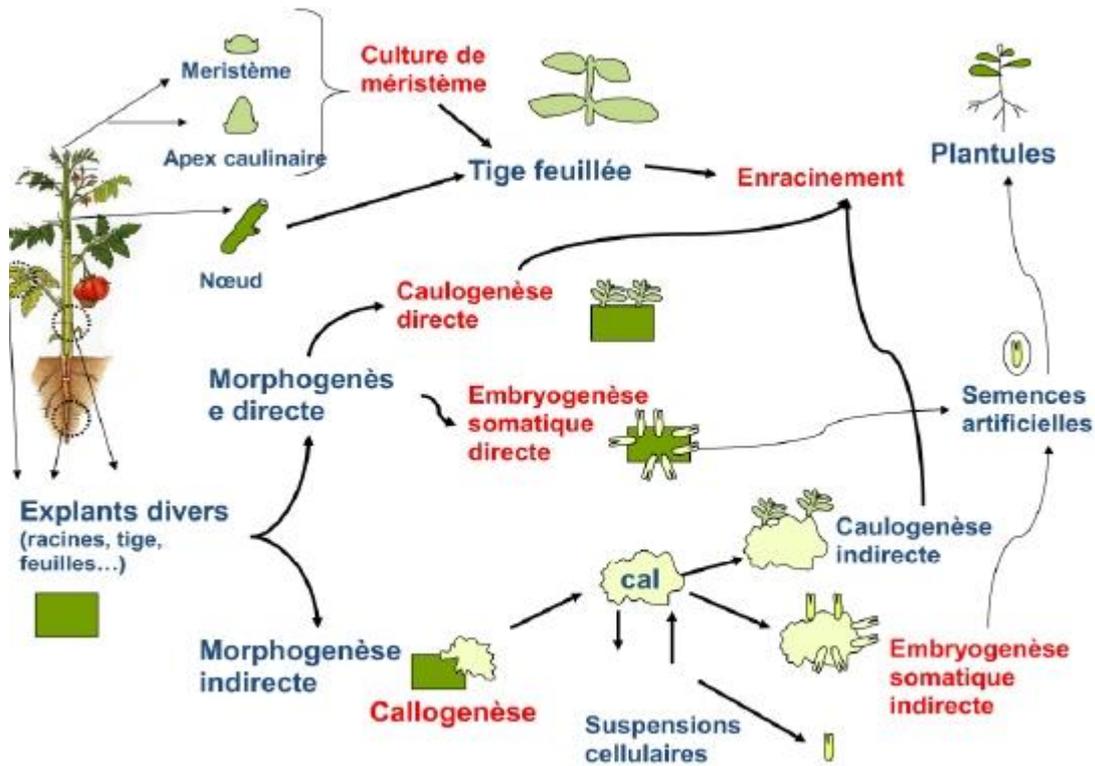


Figure 4 : Principales méthodes utilisées en culture *in vitro*

1. Culture de méristèmes

A- Définition de méristème

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'organogénèse permettent la reconstitution de plantes entières. Les termes « méristème » et « apex » doivent être utilisés en fonction de la taille de l'inoculum et du type de tissu que l'on considère.

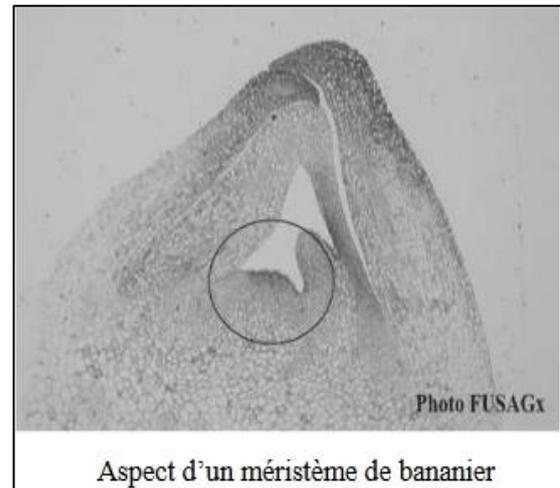


Figure 5: Aspect de méristèmes

Anatomiquement, le méristème est formé par des cellules non différenciées de caractères embryonnaires : le dôme. La taille de ce dernier ne dépasse pas 0,1 mm. Par contre, l'apex

méristématique fait référence au dôme additionné de quelques ébauches de feuilles de taille variable

Les études de Limasset et Cornuet réalisées en 1949 à partir des plants infectés de tabac ont montrées que le nomines et indemnes de virus en particulier. Les variétés obtenues par cette voie in vitro peuvent être contrôlées par des tests sérologiques afin d'assurer la qualité de leur état sanitaire.

B- Types de méristèmes

On distingue deux types de méristèmes, suivant leur origine :

➤ Méristème primaire

Ils permettent la croissance en longueur sont situés à l'apex des racines et dans les bourgeons apicaux à l'extrémité des tiges et des rameaux (méristèmes apicaux), dans les bourgeons.

- axillaires à l'aisselle des feuilles.
- (méristèmes axillaires), et dans les entre-nœuds (méristèmes intercalaires).

➤ Méristème secondaire

- Permettrait la croissance de la tige.
- Principale est le cambium.

Dans les tiges, ce tissu est situé entre le Xylème primaire à différenciation centrifuge dans la tige et centripète dans la racine d'une part, et d'autre part le phloème primaire, à différenciation centrifuge. Il va ainsi créer des tissus conducteurs secondaires ; les cellules qui le constituent effectuent des divisions radiales.

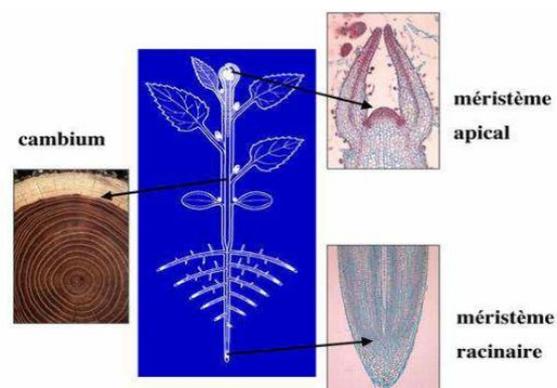


Figure 6: Types des méristèmes

C- 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. C'est la seule façon d'obtenir des plantes saines indemnes de virus. Son champ d'application s'est un peu étendu puisqu'elle sert également dans certains cas de point de départ pour une micropropagation.

Le protocole utilisé est le suivant :

- Choisir une plante puis choisir dessus un rameau. Après désinfection ou non (suivant les espèces) du rameau de départ, le prélèvement se fait sous une loupe binoculaire, sous hotte stérile ou paillasse désinfectée. - Le fragment de rameau est débarrassé de ses feuilles, puis les ébauches foliaires sont éliminées.
- Quand le méristème apparaît, on ôte délicatement les dernières ébauches foliaires, puis l'on découpe un minuscule cube dont les faces sont tangentes au méristème ; une dernière section transversale permet de le détacher. Il est aussitôt placé dans un tube à hémolyse, sur milieu gélosé. Toutes ces opérations doivent être conduites rapidement afin d'éviter le dessèchement du méristème et limiter les risques de contamination.
- La lumière n'est pas strictement indispensable pour une bonne croissance des méristèmes mais sa présence donne de meilleurs résultats. Un régime de 16 heures de jour, pour 8 heures de nuit, est souvent adopté bien qu'un éclairage en continu soit possible.
- L'humidité relative doit être proche de la saturation. Les tubes étant en général fermés pour des raisons sanitaires. On arrive très facilement à ce résultat sans problème.
- La température doit être impérativement contrôlée, d'où l'utilisation d'une chambre de culture en moyenne entre 22 et 25°C.

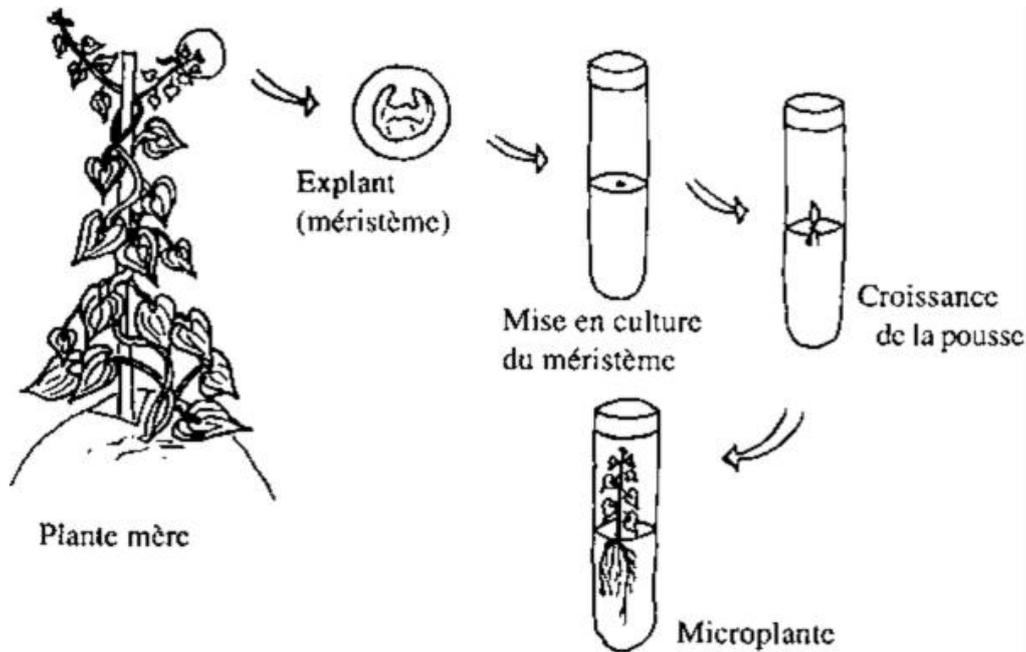


Figure 7: Etapes de la culture de méristèmes

D- Taux de réussite : Il est très variable et le taux de régénération varie de 0 à 80%, les causes de cette variation sont très diverses. -Facteurs techniques : Les méristèmes étant de très petite taille (de l'ordre de 1/10 de mm), il arrive très souvent que des tissus voisins soient prélevés en même temps.

E- Facteurs physiologiques Le stade d'évolution de la plantes a une grande importance. En général, le taux de réussite est supérieur pour les espèces herbacées. Les chances de régénération sont également plus importantes quand le prélèvement se fait sur une plante en pleine croissance. Les ligneux posent un problème plus délicat. Le méristème prélevé sur une plante en croissance a parfois tendance à brunir et à se nécroser sur le milieu de culture. En revanche, les prélèvements de méristèmes sur des bourgeons au repos, mais dormance levée, donnent de meilleurs résultats en culture mais le taux de régénération est plus faible.

F- Facteurs pathologiques

Le taux de régénération est en relation directe avec le statut viral. Certains virus s'éliminent facilement, d'autres plus difficilement. Dans le cas de réussite nulle, on peut associer la thérapie et la culture de méristème. On place la plante à régénérer à la température d'élimination du virus pendant le temps voulu, puis on pratique un prélèvement de méristème sur cette plante.

Comme le taux de régénération n'est pas garanti, il est impératif de vérifier l'état sanitaire de la plante obtenue. Ces contrôles sont faits avec des techniques d'indexage. Il faut

pratiquer trois indexages pour avoir l'assurance d'une régénération totale. Il est également important de vérifier la conformité génétique de la plante obtenue. Ce contrôle visuel doit établir qu'aucune mutation n'a eu lieu. Il est à remarquer que les premiers stades de croissance d'un méristème sont semblables à ceux d'une plantule issue de semis, ce qui semble mettre en évidence le phénomène de rajeunissement.

G- Avantages de la culture

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

H- Limites de la culture : 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 Pétunia ou de Pélargonium par exemple, par culture de méristèmes il est possible de ne pas retrouver à la régénération ce caractère horticole.

2. Micropropagation

A- Voies de micropropagation

La multiplication végétative par culture *in-vitro* ou micropropagation présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites " conventionnelles "de propagation. Cette technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares,

ou présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées.

De même plusieurs autres techniques, toutes dérivées de la culture *in vitro*, ont un rôle important à jouer dans l'amélioration des performances agronomiques ou horticoles des plantes cultivées. La micropropagation est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (plant), l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère. Les plants reproduits ne sont pas seulement conformes mais présentent aussi une grande uniformité.

Par ailleurs, l'usage de cette technique nécessite peu d'espace et peu être programmé indépendamment des saisons. La technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes.

Les techniques de micropropagation empruntent essentiellement deux voies : L'une qui utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires) potentiellement capable de donner suite, au développement normal, d'un individu est appelée microbouturage cette technique est souvent appelée "multiplication conforme" car elle part de méristème préexistant dans les quels, les cellules sont génétiquement très stables, l'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tige, puis son enracinement. L'autre voie, utilise toute sorte de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, cotylédons...etc) pour aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines, c'est l'organogenèse, soit de structures ressemblant aux embryons zygotiques, c'est l'embryogenèse somatique.

B- Les phases de la micropropagation

B-1- Stade 0 : Conditionnement du plant mère

Dans la description de cette technique on passe souvent sous silence le stade 0 qui contribue pourtant pour beaucoup au succès des stades suivants. Ce stade 0 réfère au conditionnement du plant mère. En effet, le plant mère devrait être dépourvu de carences minérales et en pleine turgescence donc sans stress hydrique important. Au mieux et dans presque tous les cas, le plant devrait être en croissance active, donc mis en culture en dehors de sa période de dormance. Ceci limite dans le calendrier de production, les dates préférables de mises en culture pour le stade d'initiation. Mais, une fois *in vitro*, ces plants pourront être multipliés à l'année longue. Aussi les plants mère choisis le seront en fonction de leur état

sanitaire. Des plants infestés d'insectes peuvent apporter des problèmes de taille à toute une chambre de culture. A titre d'exemple, les oeufs de thrips qui se logent dans les interstices des bourgeons résisteront à la stérilisation de surface des apex. Par la suite, des conditions favorables permettront leur éclosion. Les larves et les adultes particulièrement se déplaceront d'un tube à l'autre en quête de nourriture. Ces insectes sont suffisamment petits pour se glisser sous les bouchons et pénétrer dans les tubes. On peut soupçonner leur visite lorsque des moisissures envahissent les contenants longtemps après la mise en culture.

B-2. Stade 1 : Établissement d'une culture aseptique : Durée 6 à 8 semaines

La littérature fournie souvent les premières informations essentielles au départ d'une culture. On trouve dans les livres ou revues spécialisés le détail des formulations (recettes) de milieux nutritifs convenant à de très nombreuses espèces végétales. Généralement les auteurs précisent aussi le protocole de désinfection de surface des explants ainsi qu'une description de l'explant mis en culture. Ce stade est de première importance puisqu'il comporte de nombreux facteurs critiques :

- Le choix du plant mère;
- Le choix du fragment végétal à mettre en culture;
- Une stérilisation de surface adéquate garantissant la survie de l'explant tout en assurant l'asepsie;
- La découpe de l'explant et sa position sur la gélose;
- Le choix du milieu de culture qu'il est parfois nécessaire d'ajuster légèrement par la suite suivant la réponse de l'explant;
- La qualité du travail en asepsie de la technicienne ou du technicien.

Dans plus de 50 % des cas, les premiers essais de mise en culture sont très satisfaisants et demandent très peu ou pas d'ajustements. Pour certains autres cas, la difficulté réside dans la désinfection des végétaux, pour d'autres dans l'ajustement de l'équilibre hormonal.

Mais selon tous les auteurs, théoriquement tous les végétaux quels que soient leur espèce ou leur cultivar, peuvent être cultivés *in vitro*.

Les explants les plus aptes à entreprendre une multiplication sont généralement riches en bourgeons ou en zones méristématiques potentielles. Ils varient selon les espèces :

- Les feuilles (ex. Ficus, Saintpaulia, Bégonia...);
- Les tiges (asperge, colza...);
- Les bourgeons (fraisier, vigne, lilas, bleuet...);
- Inflorescences (chou-fleur, gerbera, hosta, poireau ...).

La multiplication à partir de la croissance de bourgeons axillaires offre les meilleures chances de conserver les caractéristiques de l'espèce ou de la variété. En effet, cette technique ne fait qu'accélérer le fonctionnement normal des méristèmes de bourgeons déjà présents sur la plante. Par contre, on diminue les chances d'une stabilité génétique en provoquant l'apparition de bourgeons nouveaux (la plupart du temps à partir d'une cal, en des endroits inhabituels tels les feuilles, les tiges, les racines).

B-3. Stade 2 : La multiplication des tiges : Durée 4 à 5 semaines.

Cette étape s'effectue au repiquage des plantules obtenues au stade précédent. On veut ici accroître le nombre de plants d'un facteur de 4 à 5 à chaque cycle chez les ligneux, et d'un facteur de 4 à 12 chez les herbacées.

Le milieu nutritif utilisé est souvent identique à celui du premier, bien qu'une différence parfois mineure s'observe dans la balance hormonale (équilibre auxine-cytokinine). Au stade de la multiplication, les cytokinines sont généralement présentes en plus grande concentration dans le milieu que les auxines. Ceci s'explique d'un point de vue physiologique par le fait que les cytokinines s'opposent à la dominance apicale donc stimulent la croissance de nouvelles tiges. Encore une fois, la littérature fournie généralement les informations nécessaires nous permettant de fixer notre choix sur une formulation appropriée.

La vitesse de croissance des plantes *in vitro* se module à celle *in situ*. Si l'espèce mise en culture est à croissance lente, on peut s'attendre à observer une croissance lente dans les tubes.

B-4. Stade 3 : La rhizogénèse (enracinement) : Durée 2 à 4 semaines

Cette étape se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de la multiplication. Il arrive parfois que des espèces présentent un système racinaire plus ou moins développé au stade de la multiplication. Dans ce cas, il serait avantageux de faire des essais pour le passage immédiat en acclimatation. On économise ainsi temps et argent s'il nous est possible de passer outre cette étape (ex. Bégonia, Saintpaulia, fougère). Toutefois, si ce stade s'avère nécessaire, le milieu de culture varie quelque peu des milieux

précédents. Les sels minéraux et les vitamines demeurent généralement les mêmes. Mais dans le cas du rosier par exemple, on suggère de diminuer la concentration des sels minéraux de moitié.

La différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines. Des tiges très feuillées et bien pourvues de bourgeons s'enracineront assez facilement dans un milieu dépourvu de régulateurs de croissance. Les jeunes feuilles et les bourgeons sont des sites naturels de production d'auxine et à l'image des boutures traditionnelles, ces jeunes plantules sauront s'enraciner d'elles-mêmes. Par contre, certaines espèces exigent l'apport d'auxines afin de stimuler l'initiation de leurs racines. Cette auxine est souvent fournie sous forme d'AIA.

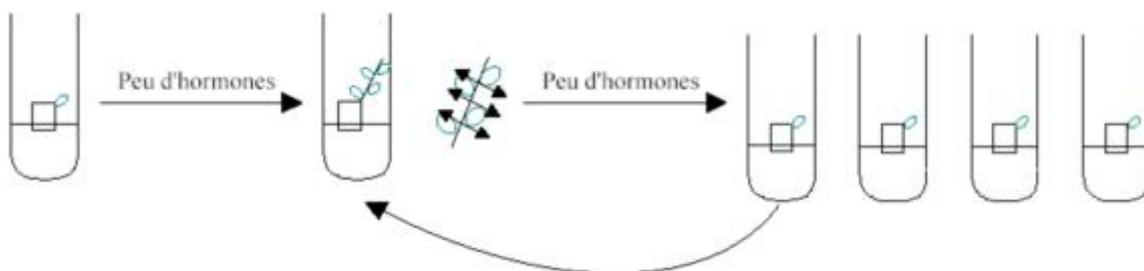
B-5. Stade 4 : L'acclimatation : Durée 3 à 4 semaines

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à adapter progressivement les microplantules aux conditions qui prévalent dans la serre ou à l'extérieur. Après avoir éliminé la gélose de la base des plants, ils sont transférés dans un substrat horticole. Les parties aériennes sont ensuite recouvertes de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine les 100 % d'humidité relative. Les stomates de ces jeunes feuilles cultivées *in vitro* demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de transpiration de manière continue

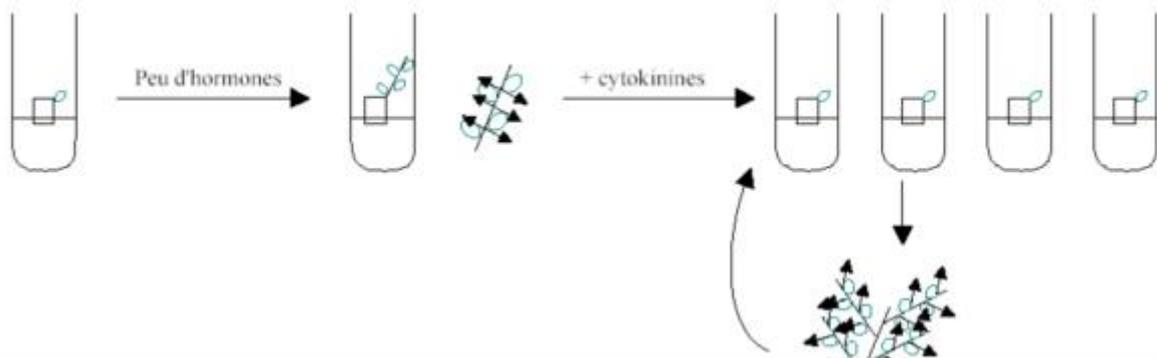
Les risques de dessèchement sont très élevés. Aussi doit-on attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement.

C- Technique

➤ Culture simple de noeuds : le bouturage *in vitro*



➤ Prolifération de pousses axillaires



D- 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'oeillets 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 porte-greffes. Ainsi les arbres ou arbustes obtenus ne présenteront pas de problème de rejet de "sauvageon".
- Le micro bouturage 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.

- 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.

3. Embryogénèse somatique

A- Définition

Classiquement, l'embryon est défini comme étant une plante se trouvant au stade initial de son développement. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire (munie de deux méristèmes : l'un caulinaire et l'autre racinaire) qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante. Habituellement, l'embryon s'édifie à partir d'une cellule initiale, le zygote, formé lors de la reproduction sexuée (embryon zygotique). Cependant, d'autres types d'embryons peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte, embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique et qui sont appelés "embryons somatiques». Parfois, chez certaines espèces, ils résultent d'une embryogenèse somatique naturelle qualifiée d'apomixie. Dans certains cas en effet, les anthérozoïdes, l'oosphère, voire d'autres cellules gamétophytiques peuvent engendrer des embryons parthénogénétiques. Dans d'autres cas, certaines cellules sporophytiques localisées au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier le nucelle, fournissent naturellement des embryons apoméiotiques appelés aussi "embryons nucellaires. Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les Citrus. Toutefois, cette appellation est essentiellement appliquée aux embryons obtenus à partir de culture de tissus *in-vitro* du sporophyte

B- Origine et développement des embryons somatiques

Les données cytologiques montrent que les embryons somatiques ont pour origine des cellules particulières ; dites embryogènes. Elles présentent des caractères de cellules méristématiques primaires : petites tailles, cytoplasme dense, gros noyaux aux nucléoles proéminents et petites vacuoles. Elles fixent de manière intense les colorants ce qui les rend aisément repérables en cytologie. Ainsi, on distingue deux voies pour l'embryogenèse somatique :

La première est l'embryogenèse directe où les embryons sont initiés à partir de tissus en absence de prolifération de cal. Ceci se produit à partir des cellules pré-embryogéniques

déterminées (P.E.D.C) ou les cellules sont déjà engagées dans un développement embryogène et ils ont besoins seulement d'être libérées. Elle semblent préexister dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes.

La seconde est l'embryogenèse somatique indirecte, pour la quelle une prolifération cellulaire est requise. On note, ainsi, l'existence de cellules initiatrices qui sont déjà différenciées mais dépourvues de capacité embryogènes. Ils les nomment des cellules pré-embryogènes indéterminées (PEIC). Les cellules embryogènes apparaissent tardivement au sein du cal produit par la réactivation mitotique des cellules différenciées et/ou la prolifération des cambiums obtenus à partir d'explants de type racines, tige ou de feuille. Leurs multiplications aboutit à la formation de groupes de cellules embryogènes "nodules méristématiques" dispersés, parmi les autres cellules du cal et qui sont généralement de type parenchymateux. A la suite de leur repiquage sur des milieux dépourvus d'auxines, ces nodules évoluent en des embryons somatiques comme c'est le cas chez la carotte.

Les embryons somatiques connaissent les mêmes stades de développement morphologiques que traversent habituellement les embryons zygotiques à savoir : stade globulaire, cordiforme, torpille et cotylédonaire. Ils ont une structure chromosomique souvent semblable à celle de la plante- mère dont ils sont issus. Le critère qui permet de reconnaître un embryon somatique est certainement sa structure bipolaire, qui développe précocement et simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire.

C. Intérêt de l'embryogenèse somatique

Comparativement aux autres voies de multiplication végétative *in-vitro*, l'embryogenèse somatique se montre plus séduisante en termes de performance et d'efficacité. En effet, la maîtrise de la production d'embryons, chez certaines espèces, via les suspensions cellulaires permet d'obtenir des milliers d'embryons par litre de milieu de culture et par conséquent la régénération de milliers de plants. L'embryogenèse somatique permet aussi en un temps très court de produire des plantes entières sans passer par les contraintes que connaît habituellement l'organogenèse (phase de caulogenèse et de rhizogenèse)

La voie de l'embryogenèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la longueur des cycles d'amélioration comme par exemple, le temps nécessaire à la valorisation du matériel sélectionné âgé ou juvénile ou la production de parents hybrides nécessaires à la diffusion de

nouvelles variétés. De telles applications ont été réalisées chez plusieurs espèces comme le café, la luzerne, *Asparagus officinalis*, le palmier dattier et le palmier à huile.

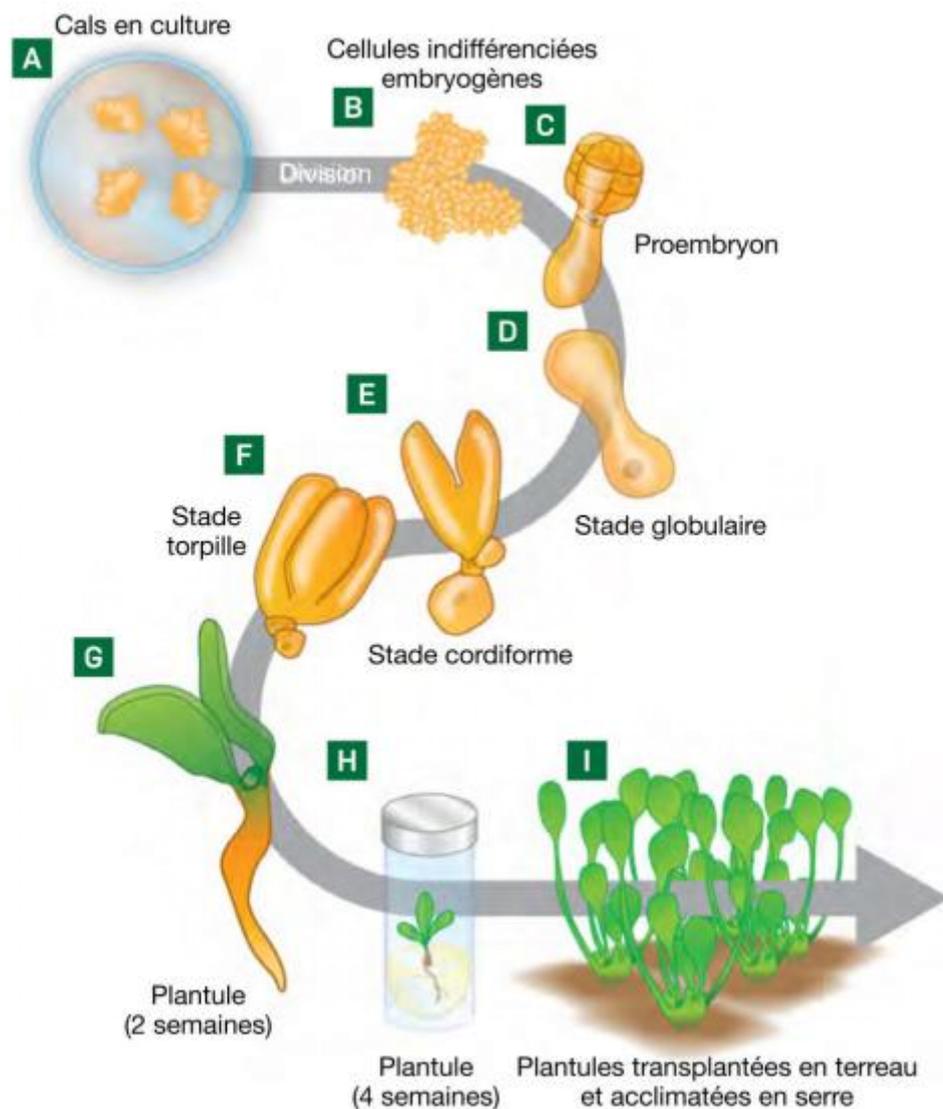


Figure 8:Étapes de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique implique une série de transformations commençant par (A) des cellules somatiques différenciées et vacuolées de cals, qui deviennent (B) des cellules indifférenciées embryogènes, chacune se développant en (C) un proembryon, puis (D) un embryon au stade globulaire, (E) au stade cordiforme, au stade torpille, pour finalement donner (G) une plantule à deux semaines et (H) à quatre semaines. (I) Les plantules sont ensuite transplantées en terreau et acclimatées en serre.

➤ **Avantages et inconvénients de la technique**

La technique de l'embryogenèse somatique présente des avantages et des inconvénients selon le matériel végétal qu'on a. Parmi ces avantages on cite :

- C'est la méthode la plus courte.
- Elle offre la chance d'avoir facilement des vitroplants par la diversité du matériel végétal utilisé.
- Elle permet d'avoir un nombre très élevé de plants grâce au grand nombre d'embryons somatiques obtenus.
- Elle est essentielle pour les technologies nouvelles d'hybridation et de sélection de variétés résistantes.

Les inconvénients de cette technique sont :

- L'embryogenèse somatique présente le grand risque d'avoir des variations somaclonales et des mutations.
- Elle présente le problème de non synchronisation du développement des embryons somatiques.
- Limites des techniques de clonage à grande échelle et difficultés du passage de l'embryon somatique à la plantule

4. Haplo/diploïdisation : Androgenèse, Gynogenèse

Le processus d'haplodiploïdisation comprend l'obtention de plantes haploïdes à partir des organes porteurs des cellules reproductrices, appelés gamétophyte mâle ou femelle, et le retour vers la phase diploïde.

A- Production de plantes mères

Le sélectionneur effectue un croisement entre deux lignées parentales présentant des caractéristiques intéressantes et complémentaires. Ce croisement produira la génération F1. Ce sont les plantes mères pour l'obtention de la phase haploïde. A ce stade, toutes les plantes sont identiques. En revanche, sur ces plantes, la méiose à l'origine de la formation des gamètes permet la ségrégation des caractères, selon les lois de Mendel et les recombinaisons entre les chromosomes parentaux. Les individus F2 seront alors tous différents les uns des

autres, c'est la disjonction des caractères. Pour faciliter le travail de sélection, l'haplodiploïdisation va permettre d'obtenir des plantes homozygotes.

B-Obtention de la phase haploïde

Il s'agit de récupérer les cellules ayant subi la méiose avant la fécondation. C'est là que commence le travail de laboratoire. L'obtention des plantes haploïdes peut se faire par culture *in vitro* de cellules destinées à fournir les cellules reproductrices ou gamètes. S'il s'agit de gamètes mâles, on parle d'androgenèse. S'il s'agit de gamètes femelles, c'est la gynogenèse.

C- Retour à l'état fertile diploïde

Pour utiliser en sélection une plante régénérée par l'une de ces voies, il faut disposer de plantes fertiles et donc diploïdes. L'état haploïde étant instable, l'individu régénéré est parfois diploïde, on parle de doublement spontané du stock chromosomique. Pour le blé, on peut compter 20 à 25 % d'haploïdes doublés spontanément, 60 à 65 % chez l'orge. Sinon, on provoque artificiellement un doublement des chromosomes, le plus couramment par l'action d'un agent chimique, la colchicine. Les plantes obtenues sont des diploïdes homozygotes : elles possèdent deux copies identiques de chacun de leurs chromosomes et donc portent des paires de gènes ou allèles identiques, d'où leur grand intérêt.

D- Sélection des lignées

Le matériel ainsi fixé est livré au sélectionneur. Le sélectionneur va alors trier les plantes en fonction des critères agronomiques et technologiques recherchés. La multiplication de ces plantes se fera par autofécondation : tous les descendants seront des copies identiques de leurs parents.

E- Traitement à la colchicine

La colchicine bloque la mitose après la duplication des chromosomes et les cellules deviennent diploïdes. Le traitement à la colchicine peut se réaliser au stade plantule par trempage des racines ou injection dans les méristèmes. Les taux de doublement sont alors très variables. Actuellement, se développent des traitements *in vitro* au stade embryonnaire.

F- Déterminisme du niveau de ploïdie

Une vérification de la ploïdie des plantes régénérées peut être effectuée précocement par cytométrie de flux. Une substance fluorescente se liant à l'ADN permet la coloration des cellules. La mesure de la densité de cette coloration permet de déterminer le niveau de ploïdie. Sinon, la constatation de la fertilité de la plante garantit qu'elle est effectivement diploïde.

5. Sauvetage d'embryon

A- technique

L'avortement d'embryons issus de croisements interspécifiques est attribué à un développement retardé de l'albumen, par incompatibilité entre les tissus embryonnaires et maternels. La récupération de l'embryon doit être effectuée avant son avortement, entre 4 et 16 jours après la fécondation, selon les espèces. Il est souvent nécessaire de réaliser ce prélèvement sous une loupe binoculaire. C'est pourquoi on cherche à retarder cette opération pour disposer de matériel végétal plus facilement manipulable

Les graines immatures sont désinfectées en surface et après dissection, les embryons sont transférés sur un milieu de culture solide approprié. Après deux semaines, les embryons ont généralement atteint le stade cotylédonaire. Le transfert sur un milieu riche en hormones de croissance permet la production de plantes.

B- Le sauvetage d'embryons interspécifiques.

Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique après fécondation un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif. Cette technique de culture *in vitro*

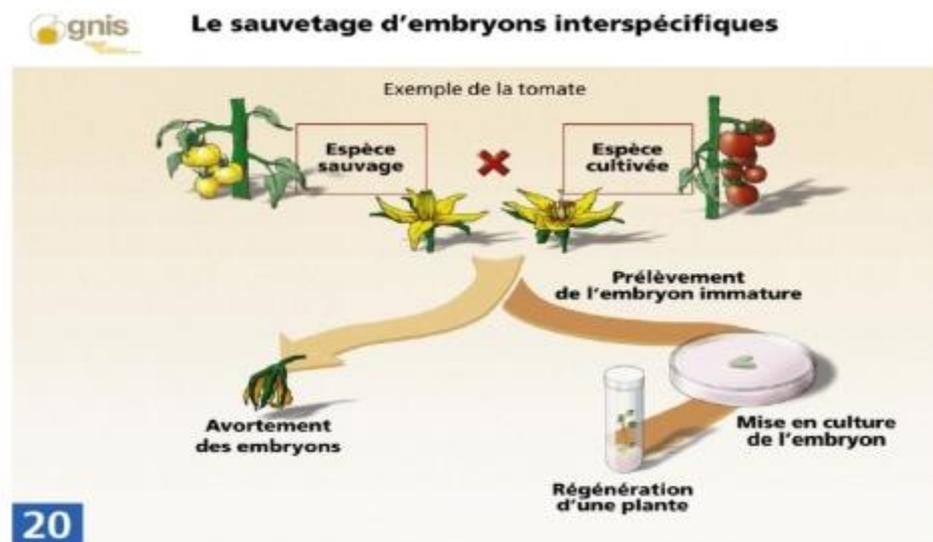


Figure 9: Sauvetage d'embryons interspécifiques

Est appelée sauvetage d'embryons interspécifiques La tomate cultivée, *Lycopersicon esculentum*, du fait de son autogamie, possède une variabilité génétique faible. En revanche, les tomates sauvages possèdent de nombreux gènes de résistance aux maladies notamment

l'espèce *Lycopersicon peruvianum*. Les barrières d'incompatibilité avec les espèces sauvages génétiquement les plus éloignées de la tomate cultivée ne peuvent être contournées que grâce au sauvetage d'embryons

6. Culture des protoplastes

A- Définition

Les protoplastes sont des cellules de plante, de bactérie ou de champignon débarrassées de sa paroi



Figure10 : protoplaste

B- Isolement de protoplastes

B-1- Isolement mécanique de protoplastes

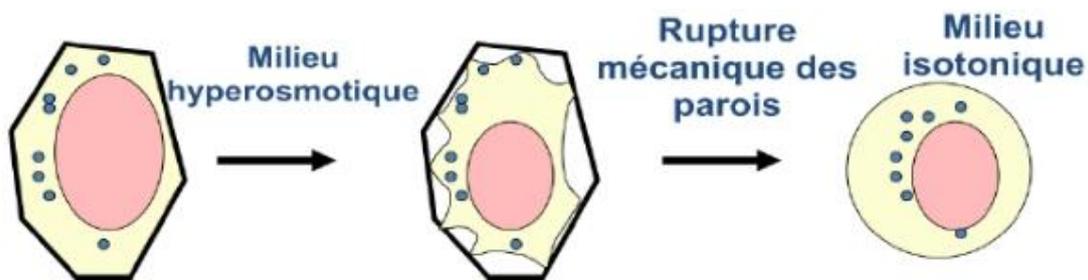


Figure 11 : Isolement de protoplastes

En sectionnant des tissus plasmolysés, on observe des cellules sphériques sans paroi. Libérées dans le milieu. Cette méthode mécanique a été reprise dans les années 70 de manière plus intensive mais ce sont les digestions enzymatiques de la paroi qui ont prévalu. Cependant, l'isolement mécanique a permis de soulever certains problèmes. En particulier, l'isolement mécanique, en se passant de toute action enzymatique pouvait sembler plus naturel. En effet, les premiers mélanges enzymatiques utilisés étaient complexes et pouvaient contenir des impuretés préjudiciables à l'intégrité de la cellule. La technique "mécanique" d'isolement de protoplastes s'adresse à des tissus à cellules allongées et consiste à effectuer

des coupes perpendiculairement à la longueur. Si on sectionne des cellules en milieu hypotonique, la cellule meurt et la plupart des organites se désagrègent. En maintenant les tissus dans des conditions isotoniques bien précises, on peut récupérer des organites intacts. C'est ainsi que l'on peut obtenir des préparations homogènes de mitochondries ou de chloroplastes. Si on augmente la pression osmotique du milieu, on obtient la plasmolyse des cellules et une séparation physique de la membrane plasmique et de la paroi. On observe alors des protoplastes "*in situ*". Lorsqu'on sectionne transversalement le tissu, deux situations sont possibles :

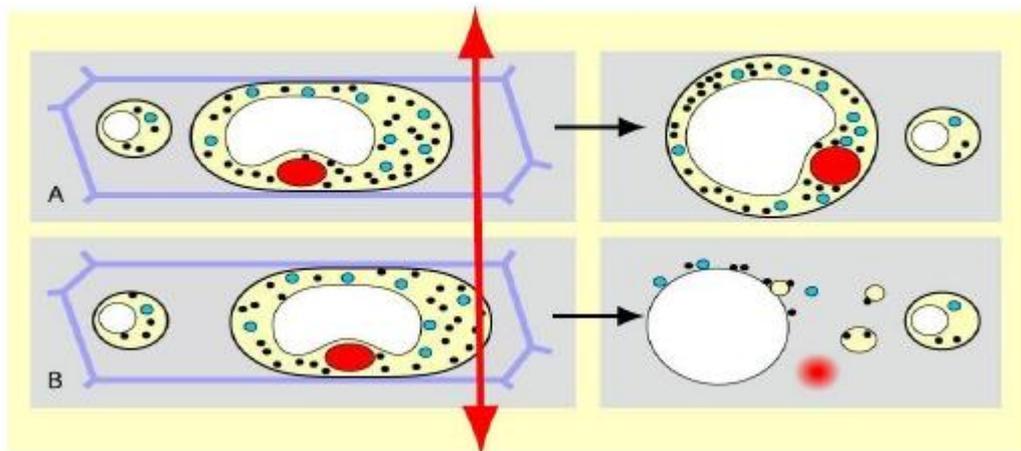


Figure 12: La section des protoplastes

A- La section passe par l'espace de rétraction. Le protoplasme intact peut sortir du cadre pariétal ainsi que divers subprotoplastes.

B- La section lèse le protoplasme. Seuls des subprotoplastes et des vacuoles sont libérés.

Une section transversale (flèche rouge) est effectuée sur un tissu à cellules allongées.

L'expression peut se réaliser sur feuilles d'élodée du Canada qui ont l'avantage d'être très simples à observer "*in vivo*":

Trois étapes de la sortie d'un protoplasme d'élodée du Canada après section de sa paroi.

La section n'a pas ouvert complètement la paroi et le protoplasme sort progressivement dans le milieu

B-2- Isolement enzymatique des protoplastes

La technique est simple dans sa conception mais demande une grande maîtrise de l'aseptie et des milieux d'incubation. Si l'isolement mécanique ne pouvait se réaliser qu'à partir de cellules allongées, la technique enzymatique peut se réaliser à priori à partir de n'importe

quel type de cellules. C'est pourquoi, ce sont très souvent des cellules de parenchyme chlorophyllien qui ont été choisies.

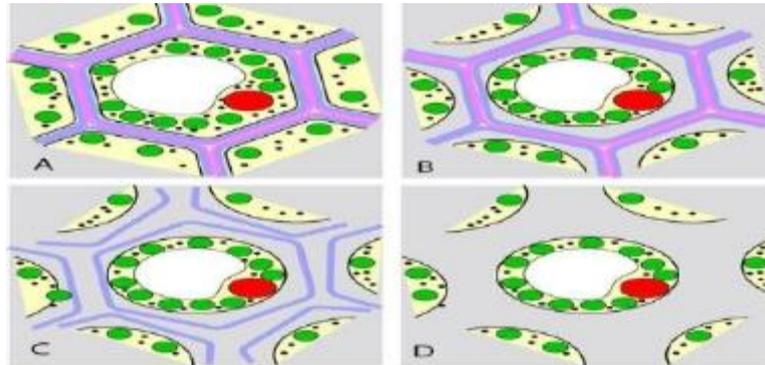


Figure13: Isolement enzymatique des protoplastes

Représentation schématique de l'isolement de protoplastes par digestion enzymatique

A-tissu chlorophyllien (lamelle moyenne en rose, paroi cellulosique en bleu);

B-plasmolyse des cellules: les protoplastes *in situ* se séparent de leur paroi;

C-digestion de la lamelle moyenne par des pectinases: les cellules se séparent;

D-digestion de la paroi cellulosique par des cellulases: les protoplastes sont libres dans le milieu.

C- La fusion des protoplastes

C-1- La fusion intra et interspécifique de protoplastes en utilisant du PEG

Pour obtenir des fusions dirigées (inter-spécifiques ou inter-génériques), il a été nécessaire de mettre au point des produits qui favorisent une fragilisation contrôlée de la membrane plasmique ou qui permettent l'accolement de plusieurs membranes.

Une première approche a été réalisée par l'emploi de sels (NO_3Na) mais les résultats les plus remarquables ont été réalisés en utilisant du PEG (Poly Ethylène Glycol).

La première étape a consisté à démontrer que les fusions observées se réalisaient bien entre des protoplastes d'origines différentes et non entre protoplastes de même origine. Pour cela il est nécessaire de recourir à des protoplastes facilement reconnaissables. Certains ont utilisé des protoplastes venant d'organes différents (à vacuoles colorées ou non) ou ont utilisé comme Keller des techniques qui permettent de différencier les noyaux.

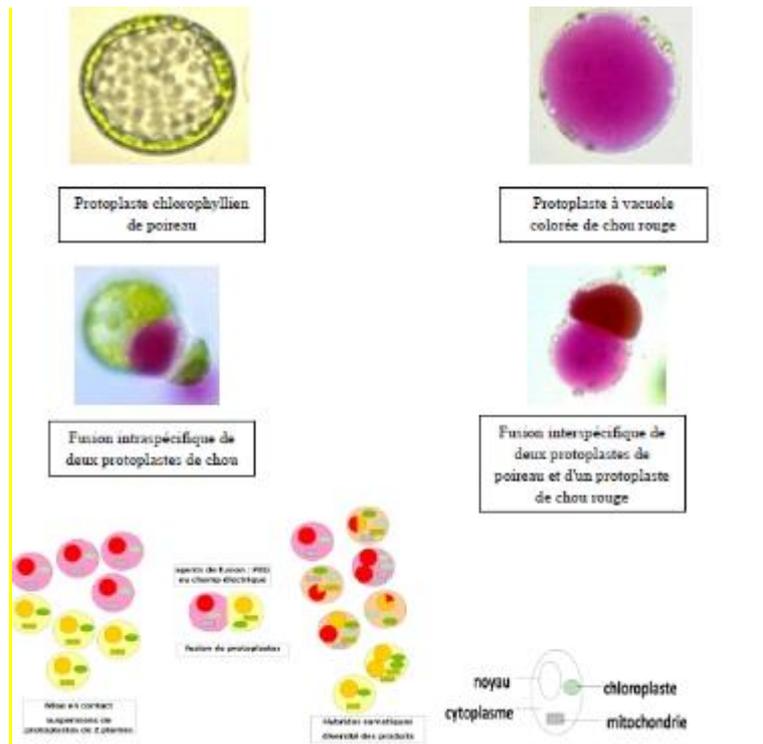


Figure 14: Fusion des protoplastes

C-2- Fusion spontanée des protoplastes

Dès que des protoplastes ont été isolés, les chercheurs ont cherché à obtenir des fusions entre protoplastes. Des fusions spontanées ont été observées dans des populations de protoplastes juste après leur isolement. Pendant quelques temps on a pensé que ceci était une première étape vers une fusion dirigée.

Lors de la division cellulaire, la nouvelle paroi (phragmoplaste) qui sépare les deux cellules filles permet des communications intercellulaires par des plasmodesmes et au moment de la plasmolyse, certaines cellules peuvent rester attachées par ces structures et communiquer entre elles. Ceci peut être mis en évidence en réalisant des protoplastes à partir de méristèmes de racine. Ce sont des files cellulaires sans paroi qui sont isolées et en fonction des pressions, certaines d'entre elles fusionnent par élargissement des plasmodesmes qui ne sont plus dans une paroi rigide

D-Introduction de matériel génétique

Lorsqu'on provoque la fusion de protoplastes d'origines différentes, la première étape est la fusion des membranes plasmiques et par voie de conséquence, des cytoplasmes. Dans le cas recherché pour l'hybridation somatique, on obtient une cellule hybride contenant à la fois les gènes nucléaires et les organites cytoplasmiques des deux partenaires. Pour que le résultat

soit concluant, il faut que les noyaux fusionnent et que le noyau hybride (contenant les chromosomes des deux partenaires) se divise et que ceci soit conservé au cours de la formation d'une callus puis d'une plante. Ce cas est assez rare et n'a pas donné de résultats très généraux.

Bien souvent, un des noyaux est éliminé mais les constituants cytoplasmiques des deux partenaires sont conservés. La plante régénérée appelée "cybride" sera conforme sur le plan nucléaire à l'un des deux "parents" mais elle contiendra les organites cytoplasmiques des deux "parents". Ceci pouvait paraître a priori un résultat médiocre mais en fait, on sait que mitochondries et chloroplastes possèdent des gènes intéressants.

En effet, au cours de l'hybridation par la reproduction sexuée d'une plante Angiosperme, le gamète mâle véhiculé par le pollen n'apporte que son génome nucléaire alors que le gamète femelle apporte à la fois son génome nucléaire et les génomes mitochondriaux et chloroplastique. On parle alors d'hérédité maternelle. C'est le cas très général aussi bien chez les plantes que chez les animaux, espèce humaine comprise.

De nombreuses résistances d'origine chloroplastique ou mitochondriale, sont difficilement transférables par la voie sexuée. Ainsi, l'hybridation somatique a permis de transférer des résistances d'une espèce sauvage à une espèce cultivée

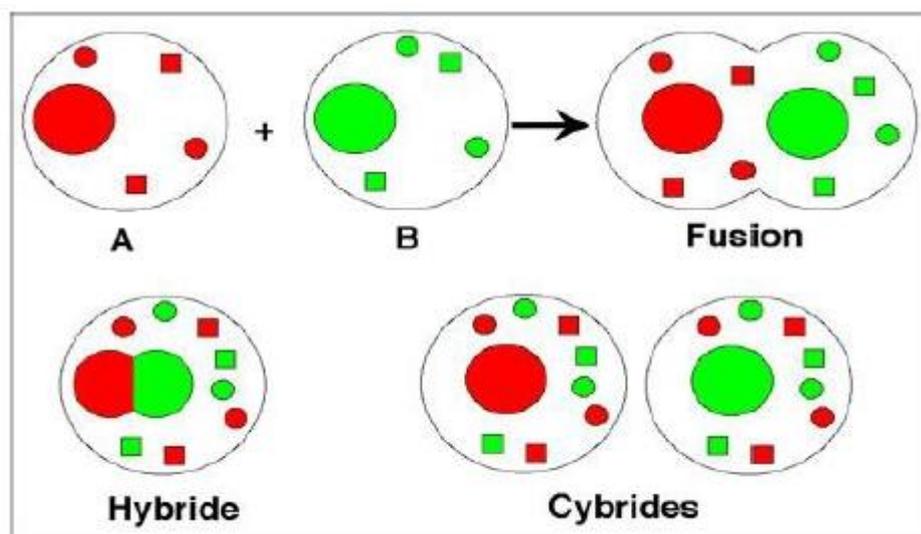


Figure 15: Fusion de protoplastes de deux espèces A et B.

La fusion nucléaire complète produit un hybride somatique (AB).

L'élimination d'un noyau permet l'obtention d'un cybride contenant un noyau A ou B et les mitochondries et chloroplastes A et B.

La production de cybrides peut être obtenue par la fusion de protoplastes mais aussi plus directement par l'introduction de chloroplastes.

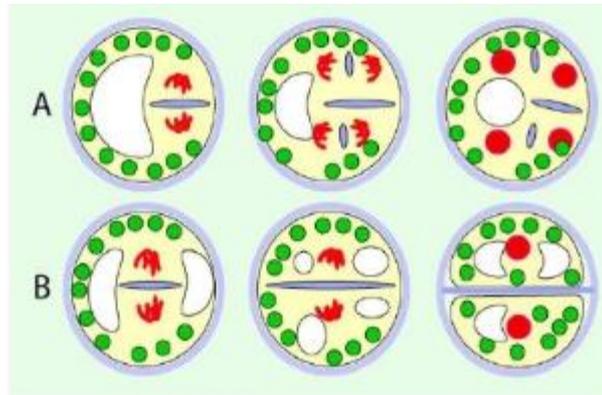
L'introduction de modifications génétiques dans le patrimoine d'une plante (fabrication d'OGM) a été réalisée par l'utilisation de plasmides modifiés de certaines bactéries comme *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie est responsable du Crown-gall, une tumeur cancéreuse qui se développe au niveau des blessures chez certaines plantes. C'est un plasmide de cette bactérie qui entre dans les cellules de la plante, s'intègre à son génome et provoque la cancérisation. On peut modifier ce plasmide en enlevant les gènes responsables de la cancérisation et en ajoutant des gènes intéressants. L'infection sera alors sans danger mais permettra le transfert des gènes choisis. Cette méthode a permis de créer de nombreux OGM.

La première étape est l'identification d'un caractère que l'on veut introduire dans la plante, comme par exemple des caractères de qualité nutritionnelle, la résistance à certains insectes, à certaines maladies, à des herbicides, etc. puis d'isoler le gène correspondant. Ce gène sélectionné peut provenir de tout organisme vivant, plante, animal ou bactérie puisque le code génétique est universel. Il doit ensuite être isolé de l'organisme donneur. Il est intégré dans une construction génétique associant souvent un gène marqueur. Ce gène marqueur permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le gène intéressant. La construction est ensuite multipliée afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN pour son introduction dans les cellules végétales que l'on veut transformer.

Cependant, toutes les plantes ne sont pas sensibles à l'*Agrobacterium*. Dans ce cas, c'est en utilisant des protoplastes que l'on a pu transférer des gènes étrangers. Il est possible de transférer des gènes par l'utilisation d'un canon à particules qui projette dans les cellules des microparticules enrobées d'ADN soit en fragilisant la membrane du protoplaste chimiquement ou par l'utilisation d'un champ électrique. Les techniques appliquées aux protoplastes végétaux sont applicables uniquement aux espèces dont on maîtrise la mise en culture et la régénération des plantes à partir des protoplastes. C'est grâce à ces techniques sur la transformation des protoplastes que des céréales de grande culture, monocotylédones, insensibles à *Agrobacterium*, telles que le riz, le maïs ou l'orge ont été transformées pour la première fois. Effectivement, ces plantes étaient réputées insensibles à *Agrobacterium*.

E- Division de cellules issues de protoplastes

Lorsque la paroi n'est pas suffisamment construite, il arrive que des divisions nucléaires se produisent. En l'absence de cadre rigide le phragmoplaste se forme mal et on obtient parfois des protoplastes plurinucléés dans le cytoplasme desquels on trouve des fragments de paroi.

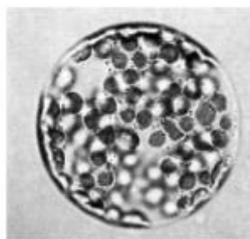


A- La division est incomplète au niveau du phragmoplaste. On obtient un protoplaste plurinucléé.
B- La nouvelle paroi issue du phragmoplaste se soude à la paroi externe. On obtient deux cellules.

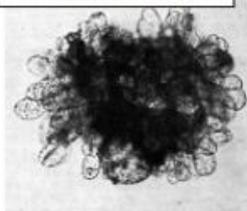
Figure 17: Division de cellules issues de protoplastes

F- Régénération des plantes

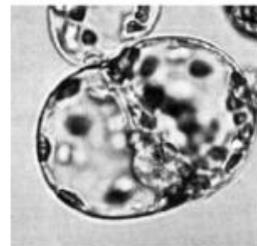
Très vite après avoir obtenu les premières divisions, on note l'apparition des cals importants puis en suivant les conditions de milieu déjà connues pour la culture de cellules isolées, on peut obtenir la régénération de plantes entières.



Protoplaste isolé



Cal en culture



Première division



Plante régénérée

G- Intérêts des protoplastes

- Transformation génétique
- Régénération de plantes à partir de cultures de protoplastes
- Etudes d'échanges de métabolites
- Fusion de protoplastes

VI. Avantage et inconvénients de la culture *in vitro*

1. Avantage

- L'obtention de clones sélectionnés pour leur vigueur, leur caractères intéressants ;
- L'assainissement des végétaux (plantes sans virus) ;
- La production rapide et en masse, à n'importe quel moment de l'année ;
- Le raccourcissement des cycles de développement ;
- La diminution des coûts de production et des dépenses énergétiques
- La production de substances biochimiques intéressantes pour l'industrie, les secteurs alimentaires et pharmaceutiques.

2. Inconvénients

- La vitrification : malformations dues à un déséquilibre hormonal
- La perte de caractères intéressants : la production répétée
- Problèmes inhérents à la technique : l'asepsie des explants : la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, endogène
- L'acclimatation : la plante est à l'abri des stress.
- L'apparition d'anomalies génétiques (certains cas d'hyperfloraison, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux) : c'est la variation somaclonale. Bactéries moisissure.

VII. Aspect génétique : conformité du matériel reproduit in vitro

La *culture in vitro de tissus végétaux est à l'origine de variations somaclonales* au sein des plantes néoformées après passage par un stade cal. Ces variations font l'objet d'études en vue de leur utilisation pour l'amélioration des plantes.

Les variations somaclonales sont de deux types :

- Variations épigénétiques
- Variations somaclonales et gamétoclonales

Variations épigénétiques :

Les variations épigénétiques sont dues à l'environnement physico chimique de la culture *in vitro* comme une composition du milieu devenue mal adaptée avec l'allongement du temps de culture entraînant :

- L'épuisement de certains éléments, acidité, pression osmotique etc...
- La compétition entre les structures tissulaires ou les plantules dans un espace devenu trop réduit.

Les variations épigénétiques disparaissent en général après le repiquage ou après le sevrage. Même si elles persistent, elles **ne se transmettront pas** à la descendance.

- Variations somaclonales ou gamétoclonales:

Les variations somaclonales sont des variations **stables** et sont **transmises à la descendance** par croisement et par culture *in vitro*.

Les **variations gamétoclonales** sont observées dans les cultures visant l'haplodiploïdisation.

Les variations somaclonales sont des modifications qui touchent le génome nucléaire ou cytoplasmique par :

- Mutations ponctuelles.
- Modifications de séquences : délétions, additions ou inversions de séquences nucléotidiques.
- Polyploïdie
- Aneuploïdie (l'aneuploïdie concerne les cellules qui ne possède pas le nombre normal de chromosomes qui n'est pas un multiple du nombre haploïde)

La fréquence des variations somaclonales dépend de plusieurs facteurs dont les principaux sont :

- Le génotype
- La technique de culture et l'explant utilisé.
- La composition du milieu de culture.
- La durée de la culture

Avantages et inconvénients des variations somaclonales

Avantages des variations somaclonales:

Les variations somaclonales peuvent être intéressantes pour enrichir la base génétique de la plante. En effet, certains variants sont résistants à des stress comme la salinité, la sécheresse ou certains pathogènes.

L'application de **pressions de sélection** permet de sélectionner ces variants somaclonaux.

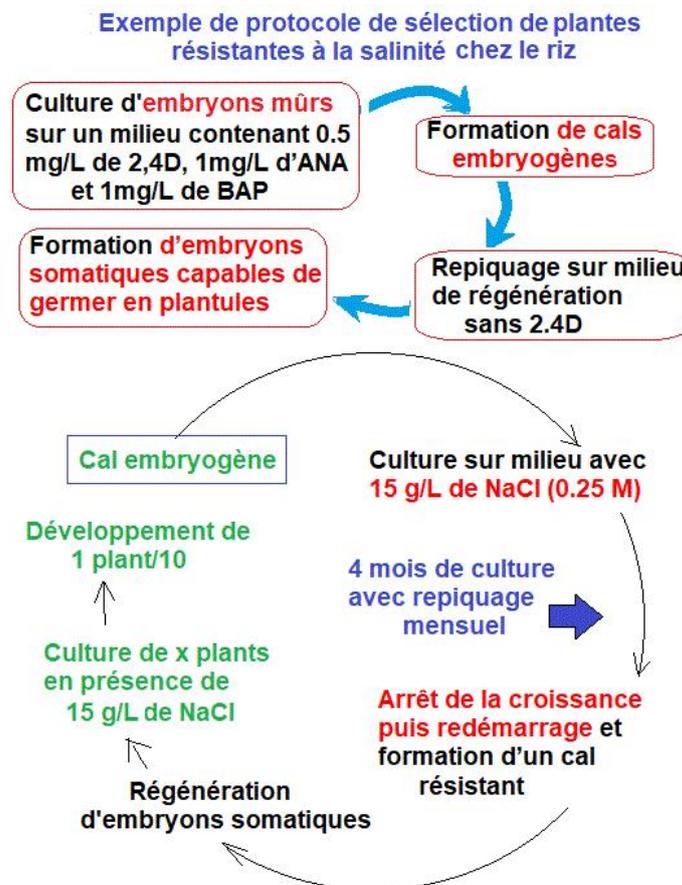


Figure 18 : la variation somaclonales

Inconvénients des variations somaclonales:

- Introduction de caractéristiques indésirables dans les plantes.

Les variants peuvent être produits de manière aléatoire et peuvent donc être génétiquement instables.

Cela nécessite plusieurs séries d'essais sur le terrain.

- Les variantes développées par variation somaclonale peuvent avoir un effet pléiotropique (touchant plusieurs caractères).

- Les variations somaclonales ne sont pas utilisées pour les caractères agronomiques complexes, tels que le rendement et la qualité des plantes.

Références bibliographique

Sites Internet

1- INRA. Institut National de la Recherche Agronomique.[En ligne]. Disponiblesur : <http://www.inra.fr/internet/Directions/DIC/presinra/SAQfiches/invitro.htm>

2- Technivit Laboratoire. Les Culture in vitro végétales.[en ligne]. Diponible sur : <http://technivit.pagesperso-orange.fr/civ.htm>.

3- D. Cornu - M . Boulay. La multiplication végétative techniques horticoles et Culture in vitro. [En ligne].

http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/25750/RFF_1986_S_60.pdf?sequence=1.

4- <http://pdf.usaid.ov/pdf-docs/pnacn153.pdf>

5- <http://pdf.semanticscholar.org/664b/d7a053069c4e2903a915f03ffade01f30b.pdf>

6-[http://archive.unu.edu/unupress/sapmle-chapters/médical boîte chromo gy.pdf](http://archive.unu.edu/unupress/sapmle-chapters/médical%20boîte%20chromo%20gy.pdf)

7- <http://www.wtec.org/.../IWGN.Research.directions/chapter08.pdf>

8- <http://www.eolss.net/sample-chapters/C17/E6-58-05-00.pdf>

9- <http://scs.illinois.edu/~zhaogrp/puplications/HZ8.pdf>

10- <http://libary.umac.mo/ebooks/b28045907.pdf>

/

11- Directive pour la Production Intégrée. Principes et Directives Techniques, 3ème édition

12- Bulletin de l'OILB/WPRS 2004 (http://www.iobc-wprs.org/ip_ipm/index.html)