

# La culture *in vitro*

## Introduction

L'homme a de tout temps cherché à reproduire les plants les plus performants de façon à mieux se nourrir, ou encore en vue de sauvegarder son environnement. C'est ainsi que de nombreuses obtentions, clones et variétés ont vu le jour. Leur reproduction par voie sexuée donne souvent naissance à la création de types génétiques nouveaux par recombinaison des gènes lors de la fusion des gamètes. Au contraire la multiplication végétative faisant intervenir seulement le processus de mitose reproduira des individus conformes aux parents.

Les hormones végétales ou phytohormones sont impliquées à tous les stades de la vie d'une plante depuis la pollinisation provoquant la fécondation et le développement de l'embryon zygotique, tout au long du développement de celui-ci en plante adulte jusqu'au contrôle de la **floraison**, de la **fructification** et de la **sénescence**. Elles sont aussi impliquées dans la **division**, l'**élongation** et la **différenciation** cellulaires, mais aussi nécessairement dans les **métabolismes primaire** et **secondaire**.

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

## Buts de la culture *in vitro* :

- Gain de place
- Affranchissement des saisons
- Rapidité
- Qualité sanitaire et homogénéité
- Pour certaines espèces : pas d'autres solutions

## Dans le domaine pharmaceutique :

Plante entière → partie de la plante (**drogue**) → extrait → mélange de PA (principes actifs) → PA purifiés → dérivés obtenus par héli-synthèse.

Les constituants actifs purifiés peuvent être obtenus par des cultures végétales *in vitro*.

### A/ Concept de la micro propagation

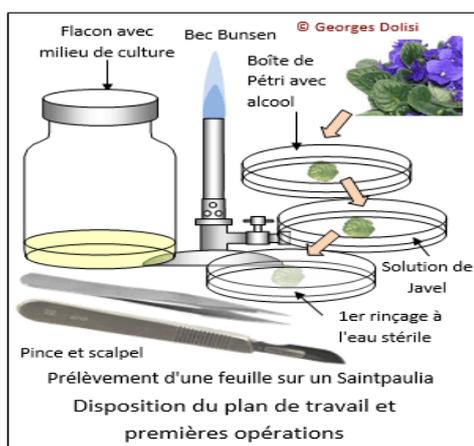
Chez les végétaux, l'introduction des techniques de multiplication *in vitro* ou « micro propagation » a permis d'obtenir à partir d'un fragment de plante placé en conditions plus ou moins aseptiques, la multiplication en plusieurs millions d'exemplaires de la plante mère. La multiplication *in vitro* trouve son fondement dans le concept de « **totipotence cellulaire** » : « *la cellule, unité morphologique et physiologique de l'être vivant, est capable d'autonomie. Elle possède toute l'information génétique nécessaire à régénérer la plante entière, à condition bien sur de créer les conditions favorables à ce développement* ».

Ce concept, énoncé dès 1902 par Haberlandt, et démontré par Steward et ses collaborateurs en 1958 qui ont créé les premiers « embryons artificiels » à partir de cellules de carotte.

### B/Les différentes étapes de la mise en place de cultures *in vitro*

#### • L'installation

C'est la phase qui consiste à désinfecter les boutures (racine, bourgeon, etc.) ou les graines afin de les rendre stériles, avant de les placer sur un milieu de culture approprié.



## **Etapas de l'installation**

Il existe une multitude de milieux de culture. Ceux-ci doivent fournir à la plante tous les éléments nutritifs dont elle a besoin. On distingue deux types de milieux, ceux ayant une consistance liquide et servant aux cultures de cellules, et ceux 'solides', servant aux cultures de tissus, bourgeons, racines ou cals (amas cellulaires).

- **La mise en culture**

En horticulture, on prélève un groupe de bourgeons (une tige), on le met à raciner, on le laisse grandir, et on peut reprendre un autre groupe de bourgeons et ainsi de suite.

- **Le sevrage (acclimatation)**

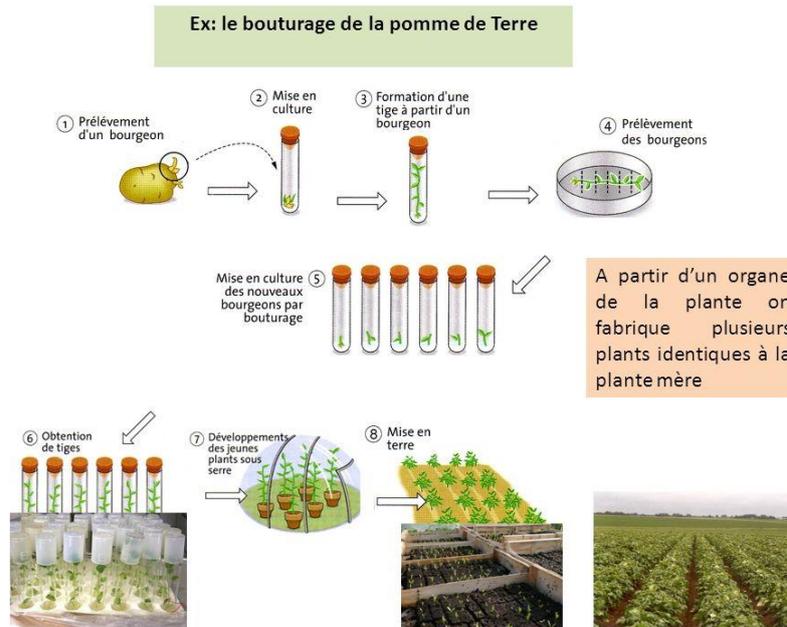
C'est la phase de croissance qui succède aux conditions *in vitro*. En général, après deux ou trois semaines, un système racinaire s'est développé et les premières feuilles neuves apparaissent.

C'est la mise en terre, le passage des conditions de laboratoire aux conditions de serre. Cette phase s'avère souvent critique, car les plantes en tubes ont perpétuellement leurs **stomates** ouverts, et ne savent plus les fermer. Même **les plantes succulentes** peuvent sécher si le changement d'environnement se fait trop brusquement.

Suite aux conditions créées *in vitro* (saturation en eau), les vitro-plants présentent de plus ou moins profondes modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques (épiderme peu ou pas couvert par des couches cireuses, densité des stomates modifiée, cellules palissadiques moins abondantes contenant moins de chloroplastes).

L'acclimatation consiste à maintenir un degré d'hygrométrie élevé, les feuilles de vitro-plants sont minces, elles devront être acclimatées sous ombrage artificiel, le substrat sera bien drainant et aéré, les températures de l'air et du substrat doivent être contrôlées. L'acclimatation peut être levée progressivement.

En prenant quelques précautions, le taux de survie peut atteindre les 100%.



### Différentes étapes de la culture *in vitro*

#### C/ Techniques de culture cellulaire

Plusieurs techniques de multiplication existent, chacune avec ses avantages et inconvénients.

##### **1/ Culture des méristèmes : culture d'apex**

Les méristèmes sont des **zones de cellules à divisions intenses**, situées au cœur des bourgeons et des extrémités de racines.

En 1950, les travaux de **Limasset** et **Cornuet** ont montré que les méristèmes étaient **indemnes de virus**.

La culture de méristème est une **culture aseptique** du **dôme apical** sans **ébauche foliaire** sur milieu artificiel. 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**.

La culture des méristèmes a permis la régénération d'un grand nombre d'espèces et l'élimination de beaucoup de viroses différentes, des champignons et des bactéries, même à partir de pieds mères malades ; pour cela on utilise soit l'apex caulinaire, soit l'apex racinaire.

##### **2/ L'embryogenèse somatique**

C'est une technique couramment utilisée en culture *in vitro*. Elle permet de générer un embryon à partir d'un cal ou de suspensions cellulaires. On part ici de **cellules somatiques** et non de cellules germinales.

### Les principales étapes

#### Étape 1

On induit de nombreuses divisions cellulaires à partir des tissus mis en culture. Le milieu est complétement par de fortes doses d'**auxine** (2,4D) et de cytokinines: les cellules prolifèrent et forment un **cal** cellulaire.

#### Étape 2

Le cal est transféré sur un *milieu d'induction* de l'embryogenèse. Ce milieu est seulement complétement en 2,4D. Le cal cellulaire devient alors embryogène. On peut ainsi découper ce cal en plusieurs morceaux pour augmenter la taille de la population végétale.

#### Étape 3

Le cal est transféré sur un *milieu d'expression* ou *milieu blanc*. Ce milieu ne contient aucune hormone et va permettre le développement des embryons.

#### Étape 4

Les embryons vont ensuite se développer, puis germer. On obtient des plantules somatiques au bout de quelques semaines, elles vont alors pouvoir être cultivées en sol pour finir leur croissance.

### 3 / Le sauvetage d'embryons

Les embryons obtenus **après la fécondation** peuvent être prélevés, mis en culture *in vitro* et donner un nouvel individu. Le sauvetage d'embryons consiste à prélever un embryon précocement, pour le cultiver *in vitro*, soit pour accélérer les cycles végétatifs, soit parce qu'il ne pourrait pas se développer dans les tissus maternels, par exemple lorsqu'il résulte d'un croisement interspécifique.

Cette technique est utilisée pour transférer des gènes à partir d'espèces **inter-incompatibles** dans le but d'améliorer :

- La résistance aux maladies, aux insectes et à certains herbicides.
- Certains caractères morphologiques.

Cette technique est appliquée selon 3 méthodes différentes :

- La culture d'embryons.
- La culture d'ovules.

○ La culture d'ovaires.

Dans le cas de la culture d'embryons proprement dite, les embryons doivent être cultivés quelques jours après la pollinisation. Avant l'excision, l'ovaire est stérilisé en surface et rincé. Ensuite les embryons sont excisés individuellement sous une loupe binoculaire et mis dans le milieu de culture liquide, dans des boîtes de Pétri. Le milieu de culture utilisé au départ est riche en saccharose. Au cours de son développement, l'embryon peut être repiqué sur des milieux moins riches en saccharose. Après une certaine durée, les embryons ont atteint le stade cotylédonaire. Pour la production de plantes, les embryons sont transférés sur un milieu solide contenant des sucres et des hormones de croissance.

Pour la culture d'ovules, elle peut se faire quelques jours après la pollinisation et ces derniers sont mis en culture, en milieu liquide, directement après avoir pratiqué l'incision.

Dans le cas de la culture d'ovaires **fécondés**, après désinfection, les ovaires sont déposés sur un milieu de culture à base de glucose et d'agar. Cette méthode demande moins de technicité que les deux précédentes, c'est pourquoi, elle est la plus utilisée.

#### **4/ Fusion des protoplastes**

**Définition de protoplaste** : cellule de plante, de bactérie ou de champignon débarrassée de sa paroi.

Lorsque des barrières d'**incompatibilité sexuelle** ne peuvent être surmontées par la culture d'embryons ou lorsque des organites cytoplasmiques jouent un rôle important dans l'expression d'un caractère, la fusion des protoplastes peut apparaître comme une technique disponible pour recombinaison des caractères génétiquement désirés. Pour cela il faut :

- Produire des protoplastes des 2 espèces à croiser (par éclatement de la paroi pectocellulosique)
- Traiter les protoplastes des deux espèces pour que les deux populations parentales ne puissent pas se diviser.
- Mélanger les deux populations.
- Appliquer un champ électrique afin de provoquer les fusions.

Les protoplastes peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu végétal, mais ce sont généralement les parenchymes des jeunes feuilles qui sont utilisés pour leur préparation.

### 5/ Haplo-diploïdisation

Elle consiste à obtenir le développement d'une plante, en dehors de la fécondation, à partir de cellules qui seront à l'origine soit des gamètes mâles ou femelles. La plante haploïde doublée (par application de la colchicine) obtenue est **homozygote** et par régime d'autofécondation donne naissance à une lignée pure.

L'haploïdisation par culture *in vitro* d'anthères (androgenèse) ou d'ovaires non fécondés (gynogenèse) conduit à l'obtention d'haploïdes artificiellement.

**Androgenèse** : l'androgenèse *in vitro* est le procédé le plus développé grâce à la simplicité des techniques de culture de tissus employées et les rendements satisfaisants des plantes haploïdes obtenues.

**Gynogenèse** : elle consiste à mettre en culture *in vitro* des ovaires ou des ovules **non pollinisés**, pour la production de plantes haploïdes.

### 6/ Transformation génétique

Cette technique permet non seulement l'isolement des gènes à partir d'un organisme puis les modifier de façon très précise, mais elle permet aussi de transférer ces gènes dans des cellules.

La technologie de transformation génétique conduit à l'obtention de plantes transgéniques ou **OGM** (Organismes Génétiquement Modifiés).

Une fois que le ou les gènes d'intérêt ont été isolés, ils sont introduits dans le génome d'un végétal non GM en utilisant, le plus souvent, des morceaux de feuilles appelés « explants ». C'est à partir de ces explants que la plante modifiée se développera.

L'introduction de gènes dans les explants s'effectue, le plus souvent, à l'aide de l'une des deux méthodes suivantes :

- **Transfert indirect à l'aide d'une bactérie**  
Les gènes d'intérêt sont transférés par l'action d'une bactérie, *Agrobacterium*

*tumefaciens*, qui les transporte vers l'ADN des cellules des explants. Cette bactérie du sol a la capacité naturelle de transférer une partie de son ADN aux cellules des plantes. La bactérie est mise en contact avec les explants pour transférer le gène d'intérêt. Cette méthode est la plus courante pour réaliser la transgénèse chez les végétaux.

▪ **Transfert direct à l'aide d'un canon à particules**

Les gènes d'intérêt sont préalablement fixés sur des microparticules de métaux inertes, comme l'or ou le platine. Par la suite, les microparticules sont projetées à haute vitesse sur les explants à l'aide d'un canon à particules.

Certaines des microparticules vont pénétrer dans les cellules, transportant avec elles l'ADN. Cet ADN doit ensuite atteindre le noyau et s'y intégrer.

fabrication d'une plante transgénique ( plante génétiquement modifiée -PGM-)

