

# Culture in vitro des Végétaux

Les premières tentatives de culture in vitro datent de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. A l'époque l'un des principaux problèmes est la destruction des plantes par les virus.

Ce n'est qu'en 1950 que l'on découvre que les **méristèmes** sont indemnes de virus. Utilisant cette propriété, on met en culture in vitro des méristèmes de dahlia, de pomme de terre.... Depuis, la culture de méristèmes a été appliquée à la plupart des espèces végétales.

## **1. Bases biologiques de la culture in vitro**

### 1.1. Croissance des végétaux

#### a) la multiplication

La croissance des plantes se fait en plusieurs étapes qui permettent le développement d'une graine en une plante capable de se reproduire.

Pour cela, il faut d'abord une prolifération cellulaire par mitose qui se réalise au niveau de tissus spécialisés : les méristèmes (= zone de prolifération cellulaire).

Ils sont situés :

- méristèmes primaires: apex des racines, extrémité des tiges, bourgeons apicaux,
- méristèmes secondaires: dans les tissus plus anciens responsables de l'épaississement des tissus.

Une fois la croissance réalisée, il y a différenciation de cellules qui serviront les unes à la circulation des sèves (phloème, xylème), les autres à la photosynthèse (feuilles), à la nutrition (racines). C'est donc un phénomène complexe qui dépend de facteurs externes et internes.

#### b) les substances de croissance

Le développement végétal est régulé par des facteurs de croissance qui, par leur action à distance du lieu de production sont appelés **PHYTOHORMONES**. Ces substances peuvent agir en synergie ou en antagonisme. Les principales hormones végétales sont :

- les **auxines** : cf. cours sur les hormones.
- les **gibbérellines** : elles sont constituées par un ensemble de composés dérivés des terpènes.

Elles activent l'allongement des entre-nœuds par élongation et prolifération cellulaire.

Elles favorisent la croissance des feuilles et lèvent la dormance.

- les **cytokinines** : elles dérivent de l'adénine et sont synthétisées par l'apex et les racines.

Elles favorisent les divisions cellulaires.

- autres hormones : cf doc. sur les hormones.

#### c) effets biologiques des doses hormones

Au cours des cultures in vitro, deux hormones sont utilisées : l'auxine et la BAP (cytokinine).

- si auxine / BAP  $\approx 1$  : croissance importante du cal cellulaire.
- si auxine / BAP  $\gg 1$  : croissance plutôt des racines.
- si auxine / BAP  $\ll 1$  : croissance plutôt des bourgeons et des feuilles.

### 1.2. Application à la culture in vitro

#### a) micropropagation ou multiplication végétative

C'est une culture de méristèmes situés au niveau des tiges, des racines de fragments de feuilles, ... etc. La multiplication se produit et il y a DEDIFFERENCIATION des cellules : les cellules redeviennent totipotentes et régèneront une plante entière.

Chronologie de la méthode :

- 1) mise en culture de l'explant.
- 2) formation d'un cal (= amas de cellules dédifférenciées en division),
- 3) multiplication avec apparition de bourgeon.
- 4) chaque bourgeon est repiqué sur un milieu de propagation.
- 5) les bourgeons redonnent des plantes.

Cette méthode présente les avantages suivant :

- taux de multiplication très élevé,
- possibilité de propagation de plantes réfractaires au bouturage,
- multiplication durant toute l'année,
- obtention de plants dépourvus de virus,
- constitution de collection de pieds mères.

Quelques limites sont à signaler : risque de mutation au stade de formation du cal, difficulté ou impossibilité de mettre au point un milieu de culture adapté aux plantes à multiplier.

La micropropagation connaît beaucoup d'applications :

- production à grande échelle de plante pour les fleuristes (Saint Paulia, Phylodendron, rosier nain, Chrysanthème),
- culture d'arbres précieux (noyer, merisier) ou de reboisement (pin),
- culture de plantes ayant des propriétés pharmacologiques (production de médicaments).

### b) embryogenèse ou culture d'embryons

Chronologie de la méthode :

- 1) mise en culture d'un organe et obtention d'un cal.
- 2) dissociation des cellules du cal en une suspension cellulaire.

Dans certaines conditions les cellules redonnent des cals avec un méristème caulinaire et un méristème racinaire appelés embryon somatiques.

### c) haplométhode

Cette méthode consiste à mettre en culture des gamètes mâles ou femelles afin d'obtenir une plante à génome haploïde. Puis ces plantes sont traitées chimiquement afin de récupérer la diploïdie. On fabrique ainsi des plante homozygotes. Ce procédé est intéressant pour l'amélioration des espèces et des variétés.

### d) culture de protoplaste

Un protoplaste est par définition une cellule végétale ayant perdu sa paroi et donc de forme sphérique. Il cultive en milieu liquide.

La culture de protoplastes permet d'introduire facilement de nouveaux gènes dans le génome de la plante. On obtient des plantes transformées.

## **2. Aspect technique de la culture végétale**

Quelque soit la technique, la culture in vitro requiert des conditions de culture précises.

### *2.1. Milieu de culture*

Il existe pour chaque espèce végétale 3 milieux :

- un milieu d'activation,
- un milieu de multiplication,
- un milieu d'enracinement.

Tous ces milieux sont constitués de sels minéraux, de substances organiques de phytohormones et d'extraits naturels ( lait de coco, jus de fruit, hydrolysât de caséine).

Pour la plupart des plantes supérieures les sels minéraux sont de 2 types :

- les macro éléments (N, P, K, S, Mg et Ca),
- les micro éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe). Ces derniers n'en sont pas moins indispensables, c'est par exemple le cas de fer sans lequel on n'obtient pas de croissance.

De nombreuses formulations ont été proposées et les plus utilisées sont celles de MURASHIGE et SKOOG, GAMBORG, KNOP, WHITE et GAUTHERET (cf tableau 1).

L'équilibre minéral mis au point en 1962 par MURASHIGE et SKOOG est largement répandu. Défini pour des travaux sur la croissance de cals de tabac, il donne de bons résultats pour beaucoup de cultures mais il n'est pas universel.

## 2.2. Environnement

### a) 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'éclairage 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.

### b) rôle de la température

La température est généralement régulée 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.

### c) 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.

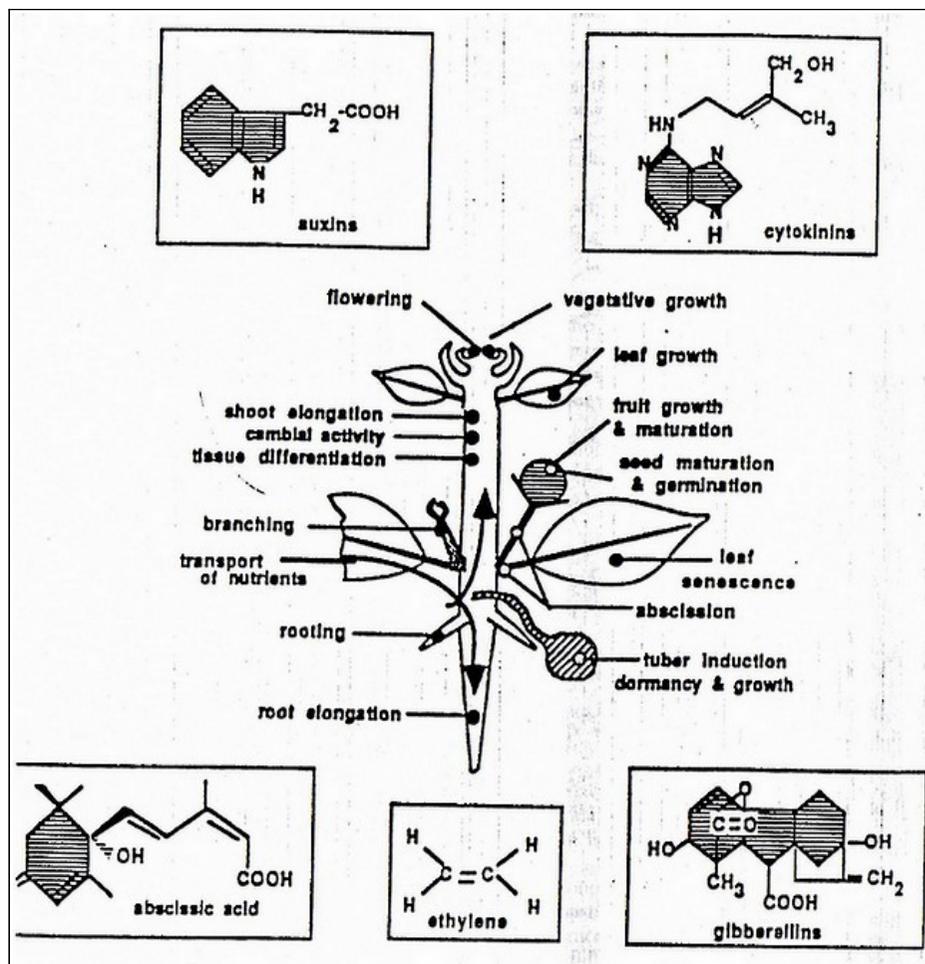
### d) stérilité

Le propre de la culture végétale est qu'il s'écoule un laps de temps important entre les repiquages (jusqu'à 3 mois). Comme les milieux sont riches et les conditions de cultures chaudes et humides, toutes les conditions d'un développement bactérien ou fongique sont réunies. Les causes d'infection sont nombreuses. Il faut donc manipuler dans des conditions d'asepsie rigoureuses :

- matériels passés à l'alcool ou flambés,
- désinfection des plantes à la Javel puis rinçage à l'eau distillée avant l'extraction de l'explant.

MILIEUX	MS	GAMBORG	GAUTHERET	HELLER	MONNIER	WHITE	KNOP
Micro éléments mg/l							
KNO3	1900	2500	125	-	1900	80	250
NH4NO3	1650	-	-	-	825	-	-
MgSO4, 7 H2O	370	250	125	250	370	720	250
CaCl2, 2H2O	440	150	-	75	880	-	-
KH2PO4	170	-	125	-	170	-	250
Ca(NO3)2, 4H2O	-	-	500	-	-	300	1000
NaH2PO4, H2O	-	150	-	125	-	16,5	-
(NH4)2SO4	-	134	-	-	-	-	-
KCl	-	-	-	750	350	65	NITSCH
Micro éléments							
Mn SO4 4H2O	22,3	10	3	0,1	33,6	7	3
ZnSO4, 7H2O	8,6	2	0,18	1	21	3	0,5
H3BO3	6,2	3	0,05	1	12,4	1,5	0,5
KI	0,83	0,75	0,5	0,01	1,66	0,75	0,5
Na2MoO4, 2H2O	0,25	0,25	-	-	0,5	-	0,025
CuSO4, 5H2O	0,025	0,025	0,05	0,05	0,05	-	0,025
CoCl2, 6H2O	0,025	0,025	0,05	-	0,05	-	-
Ni SO4	-	-	-	0,05	-	-	-
Ni Cl2 6H2O	-	-	-	0,03	-	-	-
Al Cl3	-	-	0,01	-	-	-	-
Be SO4	-	-	-	-	-	-	-
Ti (SO4) 3	-	-	0,2	-	-	-	-
FeSO4 7H2O	27,9	27,9	-	-	14,9	-	-
Na2 EDTA	37,2	37,2	-	-	11,1	-	-
Fe Cl3	-	-	-	1	-	2,5	-
Fe2 (SO4)3	-	50	-	-	-	-	10
Fe citrate	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 1 : COMPOSITIONS DE MILIEUX DEFINIS SELON LEURS AUTEURS mg/l  
MS : MURASHIGUE et SKOOG



Les cinq familles d'hormones végétales

Fiche d'identification de :

Nom: Acide 3-indolylacétique

Surnoms: ac. indoleacétique, AIA, IAA

Famille: AUXINES

Parents:

ac. naphthalèneacétique (ANA)

ac. 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)

Date de naissance:

1935-1935

Lieux de synthèse:

zones apicales des tiges,  
jeunes feuilles et fruits,  
embryons

Gamme d'activité:

$10^{-9}$  à  $10^{-5}$  M

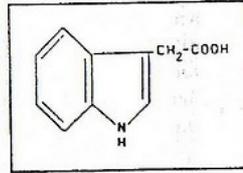
Métabolisme:

Synthèse à partir du tryptophane

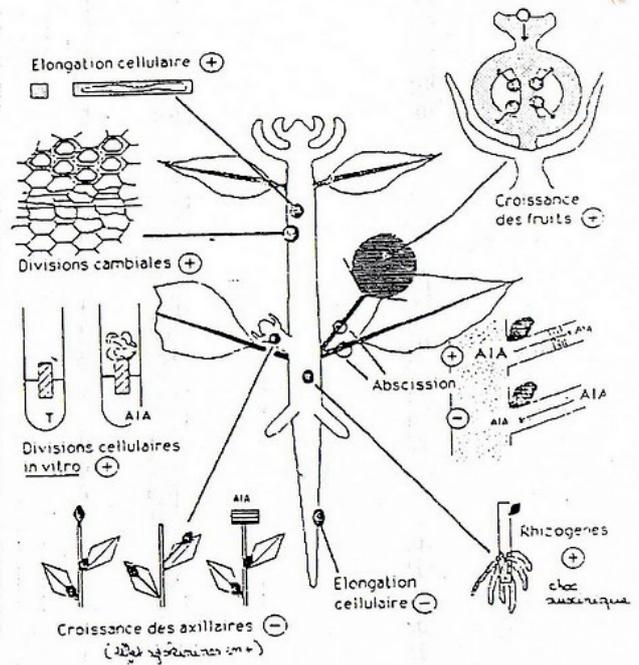
Métabolisation par dégradation oxydative et conjugaison

Principales propriétés:

- stimulation d'élongation cellulaire
- régulation de la division et de la différenciation cellulaire
- messager des réponses géotropiques et phototropiques
- régulation de la dominance apicale
- régulation de l'abscission
- stimulation de la rhizogenèse adventive



Auxines et Développement des Plantes



Fiche d'identification de :

Nom: Ethylène

Surnoms:

Famille:

Parents: Ethéphon ( molécule de synthèse libérant spontanément l'éthylène )

Date de naissance:

1934

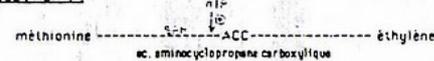
Lieux de synthèse:

apparemment capacité de  
synthèse présente dans de  
nombreux organes et tissus

Gamme d'activité:

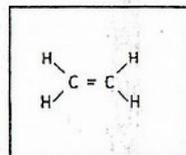
0,01 à 10 ppm ( dans l'atmosphère )

Métabolisme:



Principales propriétés:

- perturbation de l'élongation cellulaire ( expansion radiale )
- perturbations des réponses géotropiques ( épinesse foliaire )
- accélération de la sénescence foliaire et de la maturation des fruit.
- stimulation de l'abscission



Ethylène et Développement des Plantes

