

Chapitre II : Multiplication végétative *in vitro*

La multiplication végétative *in vitro* ou **micropropagation** est un mode de reproduction asexuée artificielle et présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites « conventionnelles » de propagation. Cette Technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles la semence 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 peut-être programmé indépendamment des saisons. La technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes.

I. Culture *in vitro* définition et historique

Culture *in vitro* : plantes entières ou fragments de plantes (explants) placés hors de leur environnement naturel en conditions stériles sur milieu nutritif (matériel de laboratoire originellement en verre).

Dès 1902, haberland, un biologiste allemand, observe les potentialités naturelles de la multiplication végétative (bouturage). suite à ces travaux, il énonce le premier grand principe qui ouvrira la voie de la micropropagation des végétaux. Il s'agit du principe de **la totipotence cellulaire** « toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue ».

En 1934, réussit la culture de racines de tomate sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux, un extrait de levure et du sucre et une hormone végétale, la seule connue à l'époque : **l'auxine**.

En 1939, Gautheret obtient à partir de tissu carotte, un amas de cellules dédifférenciées : **Un cal**. On peut cultiver ce cal indéfiniment dans le temps. Avec lui démarre vraiment la **culture *in vitro*** (« dans du verre »).

En 1962, Murashige et Skoog étudient la multiplication végétative du tabac et mettent au point le premier **milieu de base** pour la culture in vitro. Ce milieu contient des sels minéraux, des vitamines du groupe B, des sucres, des auxines et cytokinines.

Tableau 1 : composition de deux milieu de culture usuels : MS (Murashige et Skoog,) et B5 (Gamborg, Miller et Ojimak)

	MS	B ₅
Macroéléments	Mg/l	Mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	2500
KNO ₃	1900	150
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	134
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250
KH ₂ PO ₄	170	150
Micro-éléments	Mg/l	Mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2
H ₃ BO ₃	6.2	3
KI	0.83	0.75
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0125
Fe - EDTA	Mg/l	Mg/l
Na ₂ -EDTA	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8
Substances organiques	Mg/100ml	Mg/100ml
Glycine	0.2	1
Acide Nicotiniq	0.5	1
Pyridoxine.HCl	0.5	10
Thiamine HCl	0.1	100
Myo-inositol	100	1
Saccharose	30000mg	30000mg
Agar	08 g/l	08g/l
pH	5.7	5.5

Tableau 2 : Type de régulateurs de croissance et leur solubilité.

Les régulateurs	Les solvants
Auxine (AIA)	Et OH ou NaOH
Cytokinine (Kinitine)	1N NaOH
Gibbérelline (GA ₃)	Et OH

II. Organogenèse

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de méristèmes nouveaux. En partant d'un explant, elle aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (caulogenèse) et de racine (rhizogenèse).

Caulogenèse

II.1.1. Définition

La caulogenèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal.

- Les bourgeons terminaux dérivent de la gemmule de l'embryon.
- Les bourgeons axillaires sont produits généralement par les deux ou trois assises cellulaires superficielles de la tige.
- Les bourgeons adventifs sont formés en des endroits inhabituels. Ils sont formés à partir d'organes différenciés de la plante (entre nœuds, tubercules, racines...).
- Les bourgeons néoformés in-vitro peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur un cal, ils peuvent être considérés comme un cas particulier de bourgeons adventifs.

Origine des bourgeons

Les études cytologiques, conduites dans le but de déterminer l'origine des bourgeons néoformés à partir d'un fragment d'organe contenant divers tissus montrent souvent que l'aptitude à la caulogenèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus telle que : le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien.

L'intensité de cette néoformation est nettement dépendante de la nature des tissus contenus dans l'explant. Elle est maximale pour les tissus cambiaux, élevée pour les tissus du phloème et du xylème, très faible ou nulle pour le parenchyme cortical ou modulaire.

Chez les conifères, comme le pin, les premières divisions périclines apparaissent dans les couches subépidermiques du mésophylle, l'origine des pousses caulinaires paraît être unicellulaire. Par contre chez les Angiospermes, l'origine peut être pluricellulaire, des méristèmes peuvent se

former à partir de cellules épidermique ou encore à partir de tissus palissadiques, du mésophylle spongieux ou de la gaine perivasculaire des explants cultivés.

Régulation hormonale de la caulogénèse

Le déclenchement ou stimulation du bourgeonnement en culture in vitro, souvent observée, résulte de l'emploi de cytokinine, éventuellement associées aux auxines.

A la suite des observations sur la moelle de tabac (Skoog et Miller ,1956 ; Skoog, 1971), souvent confirmées chez d'autre, il est généralement admis que les bourgeons à partir d'une cal est sous le contrôle des interactions entre cytokinines et auxines.

Le rapport auxine /cytokinine détermine le devenir des tissus en culture, Notion de balance hormonale : Auxine seule _____ survie

Auxine majoritaire _____ Rhizogénèse

Cytokinine majoritaire _____ Caulogénèse

Equilibre entre les deux _____ Callogénèse

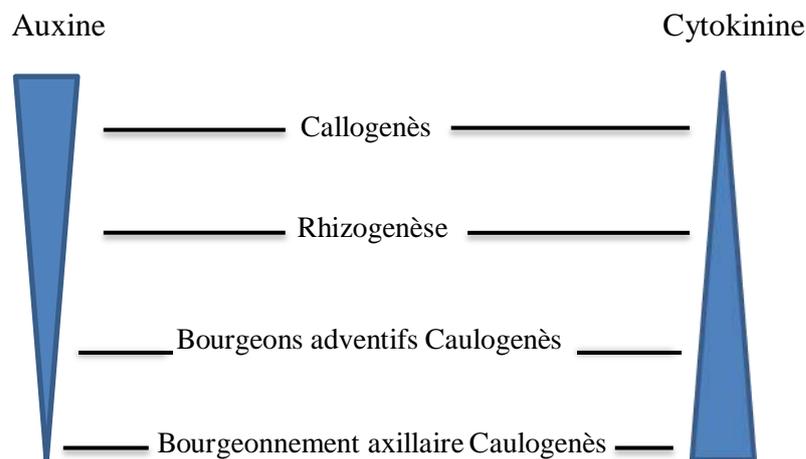


Figure 21:Type d'organogénèse contrôlée par les concentrations relatives d'auxines et de cytokinines.

Rhizogénèse

II.2.1.Définition

La rhizogénèse désigne la néoformation et la croissance de racine. Les méristèmes de racines se répartissent en plusieurs catégories selon leurs origines.

- **Les racines latérales** se forment de manière spontanée sur la racine principale dans les conditions naturelles.
- **Les racines adventives** sont produites par des organes divers, soit spontanément, soit accidentellement à la suite d'une blessure ou d'une manière provoquée, dans les conditions du bouturage et du marcottage.

- **Les racines néoformées**, au sein d'une cal, en culture in-vitro, peuvent être considérées comme un cas particulier de méristèmes adventifs.

Origine des racines néoformées

La rhizogenèse est un phénomène complexe, il comporte différentes phases : la dédifférenciation, formation d'amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines.

L'origine des cellules impliquées dans la cicatrisation dépend de l'espèce. Mais dans tous les cas, c'est l'assise génératrice libéro- ligneuse (cambium) qui donne, des tissus de bonne aptitude callogène.

Le cal est formée essentiellement de cellules de type méristématique secondaire, qui incorporent certaines cellules voisines parenchymateuses. Les cellules méristématiques se différencient par la suite et s'organisent pour donner naissance à une nouvelle racine.

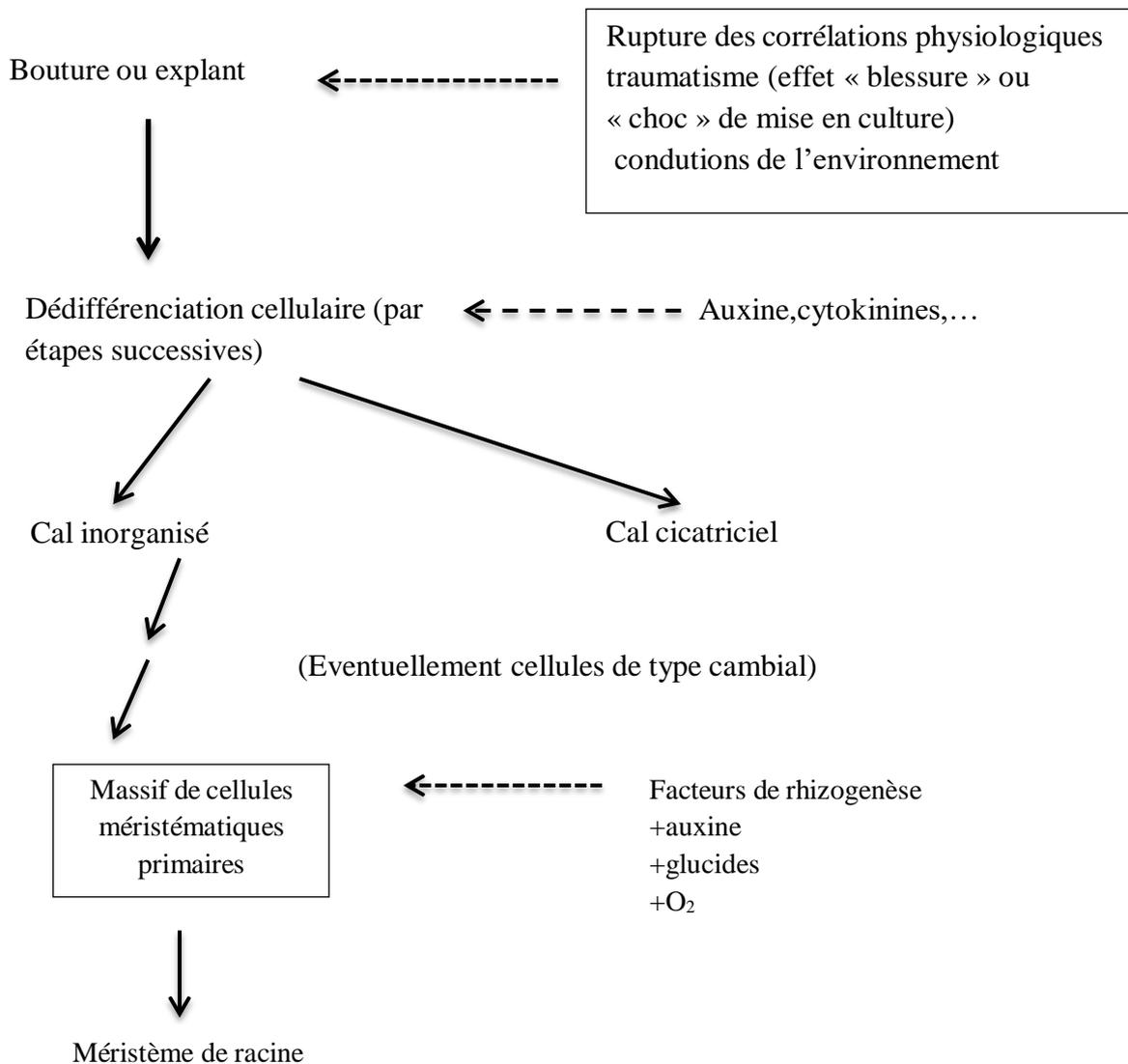


Figure 22 : Schéma simplifié de la rhizogenèse.

Facteurs de l'environnement sur la rhizogenèse

L'oxygénation du milieu a toujours été considérée comme favorable à l'enracinement. Le choix du substrat est guidé par la double nécessité d'assurer à la fois humidification et drainage.

Une température élevée (20 à 25°C) favorise la rhizogenèse .d'où l'intérêt de chauffer les bacs à bouturage.

Le pH optimal dépend de l'espèce. On sait depuis longtemps que certaines plantes sont acidophiles (Azalées,...).a l'inverse, des boutures de *Coleus* supportent une gamme étendue de pH.

Un éclaircissement d'appoint favorise l'enracinement de boutures feuillées dans certains exemples, sans que l'on sache bien s'il s'agit là d'un effet photosynthétique ou d'une action sur la synthèse de régulateurs de croissance endogènes, par l'intermédiaire du photopériodisme.

L'arrosage par « *mist* » ou brouillard artificiel donne souvent d'excellents résultats, en particulier avec les boutures herbacées. Le « *mist* » a plusieurs effets : réduction des pertes d'eau, diminution de la température au niveau u feuillage, réduction de l'évapotranspiration. Permet en même temps de conserver sur la bouture une plus grande surface foliaire, entraînant une meilleure assimilation chlorophyllienne.

Facteurs propres à l'explant

Les facteurs génétiques jouent certainement un rôle déterminant. Dans une même espèce certains cultivars s'enracinent aisément, d'autres difficilement.

Les réserves apportées par la bouture (en particulier les glucides) favorisent la rhizogénèse.

L'âge de la plante-mère est un facteur bien connu. Les boutures issues de végétaux jeunes ont généralement une meilleure aptitude à la formation des racines que celles qui provient de plantes âgées. Chez les végétaux ligneux, il est fréquent que l'enracinement des boutures ne soit possible qu'à partir de jeunes plantes issues de semis.

Des gradients d'aptitude à la rhizogénèse ont souvent été observés en fonction de la situation de la bouture sur la plante. Il est fréquent que des rameaux axillaires prélevés près de la base de l'axe caulinaire présentent une bonne aptitude à la rhizogénèse. Chez beaucoup de plantes herbacées les boutures possédant un bourgeon végétatif prélevées sur une tige florifère ne s'enracinent que si elles proviennent de la partie basale de la plante la plus éloignée des régions florifère (exemple : Betterave). Mais il n'existe aucune règle précise concernant ces gradients.

III. Conditions techniques de la culture des *in vitro*

La technique de culture *in vitro* d'organes ou de tissus de végétaux supérieurs peut être considérée comme une extension des méthodes de la microbiologie.

La culture *in vitro* doit être aseptique, ce qui implique la stérilisation de conditions permettant le maintien des cultures à l'abri des contaminations microbiennes ou fongiques.

La culture *in vitro* pose en outre le problème de l'environnement climatique des chambres de culture : hygrométrie, température, intensité de la lumière, photopériode.

Un problème essentiel est celui du choix de la composition du milieu de culture : support liquide ou gélose, macro et micro- éléments minéraux, adjonction de composés organiques divers, combinaisons de régulateurs de croissance.

L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et régénérer un nouvel individu. Pour cela, il doit y trouver tout ce que la plante fournit en conditions naturelles (**Fig.23**).

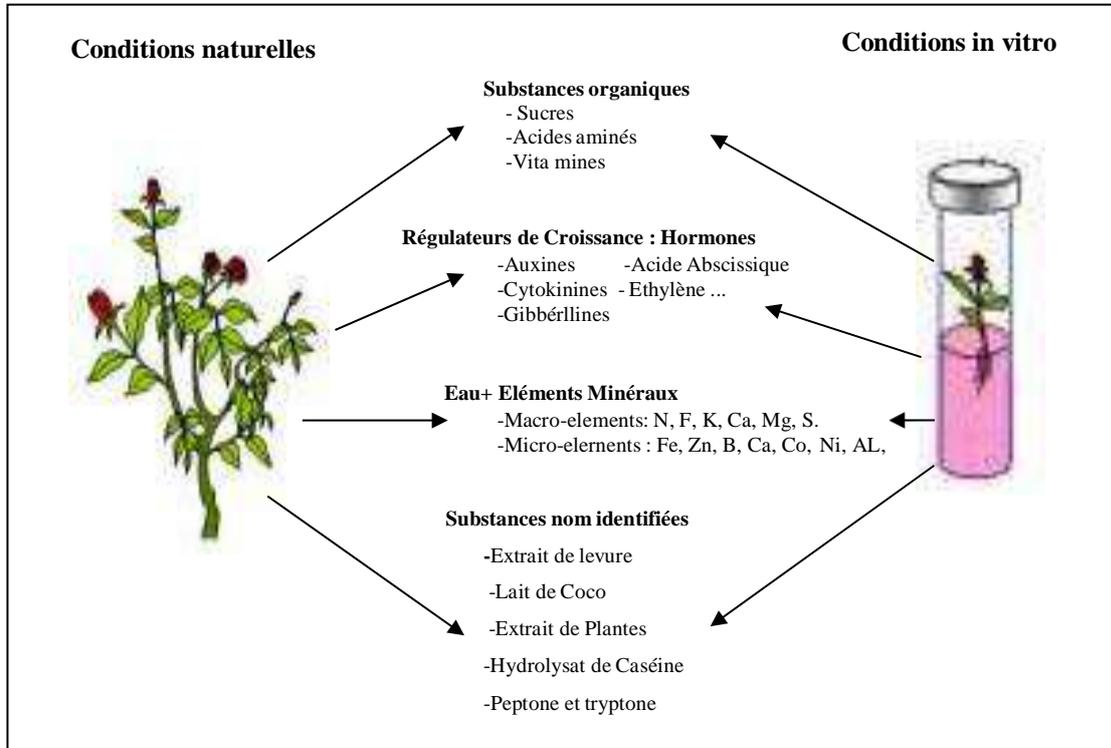


Figure 23 : Milieu de culture.

Réipients

Les cultures sur milieu solidifié par la gélose sont souvent réalisées dans des tubes de verre mais également dans d'autres récipients très divers : fioles cylindriques (dites d'Erlenmeyer) ou cylindro-coniques, boîtes de Pétri, bouteilles, bocaux à conserve,...

Les dimensions des récipients sont essentiellement fonction de la taille et du nombre des explants. Par exemple, les méristèmes ou les apex de tige sont généralementensemencés initialement dans de petits tubes. Ultérieurement, lors des transplantations successives ils peuvent être placés dans les tubes de plus grandes dimensions. La croissance des touffes de bourgeons sur milieux additionnés de cytokinine est souvent entretenue dans des récipients de grandes dimensions ; fioles coniques ou bocaux.

L'expérience des cultures de cellules séparées montre qu'il est nécessaire d'accompagner les cellules de tissus servant de nourrices ou bien d'ensemencer la surface du milieu avec une

quantité suffisante de cellules. Il est donc essentiel de bien ajuster la quantité du milieu aux dimensions des tissus.

Asepsie

Conditions de l'asepsie

Le repiquage aseptique de matériel non contaminé n'exige qu'un minimum de précaution. Par contre, lors de l'ensemencement de l'explant initial la réalisation de l'asepsie demeure l'une des difficultés majeures de la culture in vitro.

L'asepsie ne présente pas de difficultés particulières lorsque le végétal est peu contaminé et que les tissus de l'explant sont bien protégés. C'est souvent le cas de l'ensemencement de méristèmes ou d'apex de tige naturellement protégés par les ébauches foliaires.

La verrerie est stérilisée par la chaleur humide à l'autoclave (Par exemple à 120°C pendant 45 mm). Les instruments de grandes dimensions (pinces, scalpels,...), sont flambés à l'aide d'un bec Méker après trempage dans l'alcool. Les instruments de petite taille (aiguilles, lames de rasoir,...) sont généralement stérilisés par trempage dans l'alcool suivi de rinçage à l'eau stérile.

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage (par exemple à 110°C pendant 20mm). L'un des graves inconvénients de l'autoclavage est de décomposer et d'inactiver, au moins partiellement, certains composés instables à la chaleur (vitamines,).

Il peut être indispensable, lorsqu'il ne s'agit pas de repiquages de routine mais d'expériences rigoureuses, de stériliser à part les substances instables à la chaleur microfiltration et de les ajouter au milieu de base après passage à l'autoclave.

Stérilisation du matériel végétal

La désinfection de matériel contaminé par des bactéries du sol est toujours difficile et aléatoire. Mieux vaut opérer dans des conditions aseptiques ou limiter les contaminations, chaque fois que possible. Par exemple, dans le cas des racines tubérisées de chicorée, de Betterave, de Carotte, provenant directement du champ, la réalisation de culture aseptique est souvent très difficile. Mais nous avons constaté que le séjour préalable des racines dans la vermiculite, substrat défavorable à la prolifération des microorganismes, permettait de disposer de matériel relativement sain que l'on pouvait alors stériliser par les méthodes habituelles.

Pour les graines à la culture des tissus consiste à immerger les explants pendant quelques instants dans de l'alcool puis dans une solution d'hypochlorite de calcium et de les rincer plusieurs fois dans l'eau stérile.

Dans des cas difficiles, l'utilisation de chlorure mercurique (Hg Cl₂ à 0,25‰. pendant 6 heures ou à 0.5‰ pendant 1 à 3 h) nous a souvent donné de meilleurs résultats que l'hypochlorite de calcium ou de sodium.

L'immersion du matériel végétal dans une solution d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine à 1 mg/1 en association) pendant 2 heures après traitement par l'hypochlorite a présenté parfois une certaine efficacité mais avec des- résultats inconstants.

Milieu de culture

III.3.1.Support

✓ Gélose

Le succès et le développement des cultures in vitro ont été liés à l'utilisation de la gélose (ou agar) qui permet de solidifier le milieu.

La gélose présente cependant des inconvénients. Le principal est de fournir une aération in suffisante, inhibant alors la croissance de certains tissus. La composition de l'agar est d'autre part variable et mal définie. Il est d'ailleurs possible que la gélose puisse apporter des éléments organiques ou minéraux peut- être favorables à la croissance, en micro-éléments.

✓ Milieu minéral

Parmi les éléments nécessaires à la vie de la plante on distingue généralement les macroéléments et les micro-éléments.

Le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, constituent près de 95% de la matière sèche, et les six autres macroéléments indispensables sont : l'azote, le phosphore, le soufre, le potassium, le magnésium et le calcium. Les trois premiers sont des constituants fondamentaux des tissus végétaux (protéines, acides nucléiques...). Les trois derniers interviennent en particulier dans le maintien de l'équilibre entre cations et anions dans la plante.

Les micro-éléments jouent un rôle essentiel dans les mécanismes enzymatiques comme activateurs ou constituants de coenzymes. Les principaux d'être eux sont le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse, le molybdène, le bore.

✓ Composés organiques divers

III 3.3.1. Sucres

Les tissus en culture in vitro sont largement hétérotrophes au carbone en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc généralement indispensable d'ajouter des glucides au milieu de culture. Les deux sucres le plus généralement utilisés sont : le glucose, et le saccharose.

La concentration optimale en sucres pour la croissance de souches tissulaires n'est pas toujours facile à déterminer, la concentration optimale de saccharose varie de 2 à 8 % selon que la croissance est évaluée.

III 3.3.2. Vitamines

Divers vitamines favorisent la croissance des tissus en culture ; et il n'est pas exclu que le manque de certaines d'entre elles puisse être un facteur limitant de phénomènes d'organogenèse.

III 3.3.3. Acides aminés et extraits protéiques divers

Des mélanges d'acides aminés paraissent ainsi présenter des effets de synergie, stimulants fortement la prolifération des cals et l'organogenèse dans divers exemples donc l'effet de l'apport d'acides aminés paraissent très variables selon l'espèce et le type de morphogenèse étudié.

Régulateurs de croissance

Leur influence sur les divisions cellulaires et sur le développement des tissus s'exerce à des concentrations très précises, la moindre variation (de l'ordre de 10^{-2} mg/L) pouvant modifier les résultats I obtenus. Ces substances se répartissent en cinq groupes : auxines, cytokinines, gibbérellines, acide abscissique et éthylène (fig. 2.8). Les cellules répondent généralement à des combinaisons d'au moins deux de ces hormones et le développement du tissu est fonction du rapport de concentration entre elles. Parmi les **auxines**, l'acide B-indolylacétique (AIA) est la seule substance naturelle utilisée ; elle peut être favorablement remplacée par des auxines de synthèse comme l'acide indolylbutyrique (AIB), l'acide naphtylacétique (ANA) et l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) efficace par sa puissance callogène, mais toxique à des concentrations élevées. Les **cytokinines** ont des actions différentes selon les concentrations auxquelles elles sont employées et leur efficacité est variable selon le matériel (maintien en survie, stimulation des divisions, différenciation cellulaire). Les plus fréquemment utilisées sont les kinétines (ou 6-furfurylaminopurine), la benzyladénine (BA = 6-benzylaminopurine), qui sont obtenues par synthèse, et la zéatine et l'isopentényladénine (2iP), qui sont des substances naturelles. Les **gibbérellines** sont nombreuses : la gibbérelline A₃ (GA₃) est la plus couramment employée. Seule, elle est peu efficace, mais exerce un effet synergique avec les auxines et les cytokinines ; elle est souvent utilisée avec l'auxine pour accélérer la croissance des organes déjà formés. Enfin des **substances naturelles** complexes, de composition mal définie comme l'extrait de levure, l'hydrolysate de caséine, le lait de Coco, des jus de fruits divers, sont généralement ajoutées au milieu de culture. Le lait de Coco - très couramment employé - est un mélange de vitamines, d'acides aminés, de divers glucides et de régulateurs de croissance. En association avec le 2,4-D, il s'est révélé particulièrement efficace pour l'établissement de souches tissulaires à partir de matériels récalcitrants.

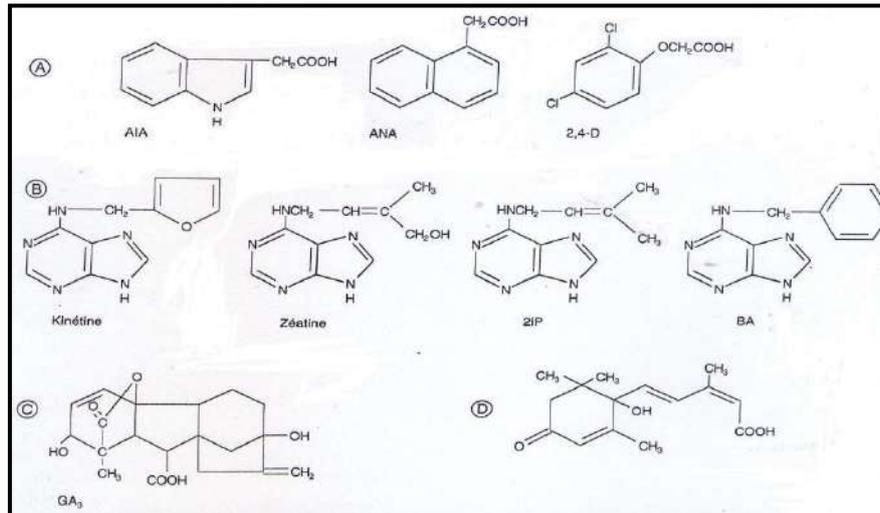


Figure 24 : Structure chimique de quelques régulateurs de croissance utilisés en culture in vitro.

A) Les trois principales auxines : AIA = acide β -indolylacétique ; ANA = acide naphtylacétique ; 2,4-D = acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ; B) Quelques cytokinines : kinétine = 6-furfurylamino purine ; zéatine ; 2iP = 2-isopentényladénine et BA, benzyladénine = 6-benzylaminopurine ; C) une gibbérelline : GA₃, l'acide gibbérellique ; D) L'acide abscissique.

Chambre de culture

Les principaux facteurs physiques de l'environnement climatique des cultures in vitro sont : l'état hygrométrique, la température, la lumière.

Etat hygrométrique

Généralement, l'obturation des récipients de culture assure une humidification suffisante de l'atmosphère ambiante. Il n'est pas alors nécessaire de prévoir de dispositifs permettant le contrôle de l'hygrométrie dans la chambre de culture elle-même.

Température

La température de beaucoup de chambres à cultures est constante, de l'ordre de 22 à 25°C, elle peut être plus élevée pour les plantes tropicales (27° à 28°C) ou plus basse pour certaines espèces (18° à 20°C).

Lumière

Intensité de l'éclairement

L'éclairement des chambres à cultures est généralement fourni par des tubes fluorescents. Le déclenchement des phénomènes d'organogenèse (Rhizogenèse, Caulogenèse) est généralement observé avec des éclaircements (2000 à 5000 Lux), parfois plus faibles.

Photopériode

On utilise des photopériodes longues égales à 16 h pour assurer la croissance des cals ou l'organogénèse.

Acclimatation

Après la phase de multiplication, l'utilisation d'un milieu de culture de composition différente a permis l'initiation de racines.

Les plantes, qui étaient dans des pots stériles, sont maintenant repiquées en milieu naturel

: en serre, sur un terreau riche en tourbe et une humidité importante.