

Chapitre IV : Techniques de multiplication in vitro

* Définitions

a) **La biotechnologie** est ensemble de techniques biologiques appliquées pour la production de la biomasse à partir de cellules animales ou végétales.

b) **Les biotechnologies végétales** sont des biotechnologies –techniques industrielles- où le matériel végétal constitue la matière première.

c) Les biotechnologies végétales utilisent la culture **des tissus végétaux afin d'améliorer la production agricole ou industrielle**. Elles permettent **l'amélioration et la production des plantes**.

Les principaux buts des biotechnologies végétales sont :

- ✓ **La multiplication massive** de plantes **saines** et/ ou **hybrides** avec éventuellement une production **commerciale**.
- ✓ **la création de nouveaux génotypes** par:
 - ✚ Sélection de **variants somaclonaux** ou gamétoclonaux intéressants présentant des caractères de résistance aux stress biotiques ou abiotiques).
 - ✚ **Haplométhodes**
 - (gamètes) ✚ **fusion de**
 - protoplastes**
 - ✚ **transformation génétique**
- ✓ Utilisation des cellules végétales pour la production **massive de molécules** à forte valeur ajoutée métabolites secondaires : **médicaments, biocarburants (alcool canne à sucre).....**

I. Culture de tissus et régénération d'organes

Dans une culture de tissus, les étapes conduisant à la régénération d'organes sont comparables à celles observées lors du bouturage. Une phase de dédifférenciation et de reprise d'activité mitotique précède la phase organogène ; celle-ci se réalise soit par la mise en place immédiate d'un programme conduisant à la morphogenèse directe de tiges ou de racines (**Fig. 25**), soit par la formation d'un massif cellulaire inorganisé, **le cal**, au sein duquel la compétence organogène apparaît plus tardivement (**Fig. 30**).

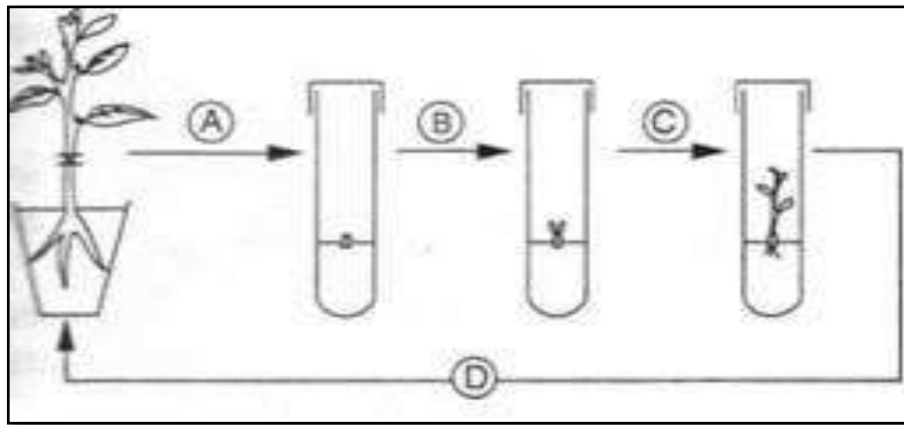


Figure. 25 : Multiplication végétative par régénération de tiges et de racines sur des explants.

A) Mise en culture de l'explant primaire ; B) Néof ormation de bourgeons qui se développent en tige sur milieu où le rapport cytokinine/auxine est élevé ; C) Régénération de racines après repiquage sur un milieu de rapport cytokinine/auxine faible ; D) Acclimatation au sol et transplantation en pot.

Néof ormation directe de tiges et de racines adventives

A partir de fragments de plantes qui ne possèdent pas de méristèmes, les méthodes de culture *in vitro* permettent de diriger la morphogenèse de tiges et de racines, en utilisant deux types de régulateurs, les auxines et les cytokinines. L'équilibre relatif de ces substances dans le milieu, ou **balance hormonale**, est spécifique du type d'organe à induire. Si le rapport des concentrations molaires cytokinine/auxine est supérieur à 1, c'est la néof ormation de bourgeons qui est généralement induite

La néof ormation de bourgeons commence par la reprise d'activité mitotique dans des cellules différenciées qui, se recloisonnant, constituent des massifs méristématiques ; au sein de ces derniers, l'orientation des divisions permet l'organisation de méristèmes caulinaires (**Fig. 26**).

Le développement de ces bourgeons entraîne la formation de pousses feuillées. On peut alors repiquer les fragments porteurs de tiges néof ormées sur un nouveau milieu dans lequel la balance cytokinine /auxine est en faveur de l'auxine, pour assurer l'enracinement.

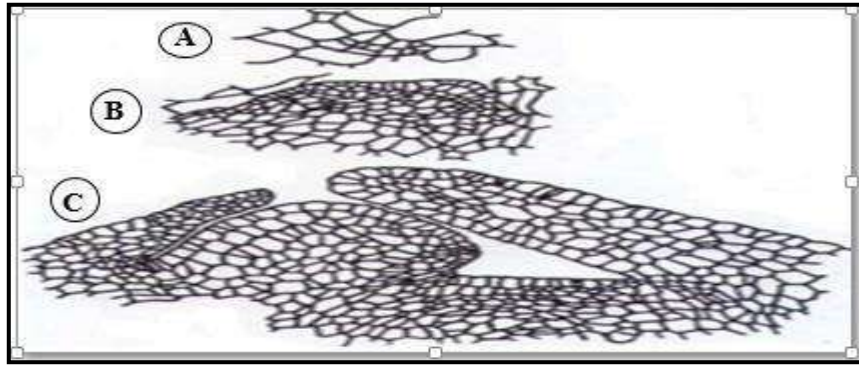


Figure 26 : Néof ormation d'un bourgeon dans un explant de tubercule de Chicorée.

A) Reclouonnements précoces de cellules parenchymateuses ; B) Organisation d'un méristème caulinaire à la suite de mitoses orientées ; l'assise épidermique est différenciée ; C) Coupe longitudinale d'un méristème complètement formé avec ébauches foliaires.

La néof ormation des racines adventives est souvent réalisée en présence d'AIA. Comme pour les bourgeons adventifs, elle nécessite une réactivation mitotique qui aboutit à l'organisation d'un méristème radicaire typique (**Fig. 27**). Formées indépendamment, racine et jeune tige ne sont pas forcément dans le prolongement l'une de l'autre, néanmoins les jeunes plantules comportant les deux organes peuvent être acclimatées progressivement au milieu naturel, donnant de nouvelles plantes (**Fig. 25D**).

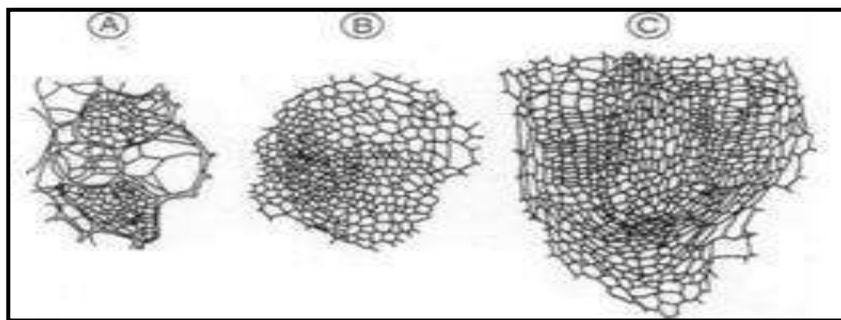


Figure 27 : Néof ormation d'un méristème radicaire dans un fragment de tubercule de Carotte.

A) Activation mitotique dans les cellules du parenchyme ; B et C) Deux stades de l'organisation d'un méristème radicaire ; B : Début de positionnement des cellules en files longitudinales et en assises concentriques ; C : Méristème complètement constitué.

La culture *in vitro* d'explants végétaux exploite donc des potentialités morphogènes masquées au cours du développement du végétal ; de nouveaux méristèmes sont formés à partir de cellules différenciées, sous *l'influence des régulateurs de croissance*. Le programme qui se

met en place consiste d'abord en une **dédifférenciation**, qui conduit les cellules quiescentes à retrouver une capacité mitotique ensuite en une organisation spécifique perceptible rapidement dans **l'orientation des plans de division**.

Formation de cal, organogénèse différée embryogénèse somatique

Dans certains cas, la culture d'un explant conduit d'abord à la formation d'un **cal (Fig. 28)**. **L'induction callogène** nécessite une dédifférenciation, qui permet à des cellules spécialisées d'être redéterminées et d'acquérir une capacité à la multiplication active aboutissant à la formation d'un tissu tumoral, le cal (**Fig. 29**). Tous les types d'organes (racines, tiges, feuilles, fleurs) peuvent être utilisés comme matériel de départ mais si la différenciation est difficile à obtenir, on choisit des embryons ou des fragments de jeunes germinations. L'apport exogène de régulateurs consiste généralement en une combinaison de 2,4-D et de kinétine. Le cal est un tissu à croissance rapide, facile à cultiver, à partir duquel deux voies d'évolution sont possibles (**Fig. 30**) :

- soit **l'entretien** par fractionnement en éléments plus petits, repiqués sur un nouveau milieu solide (**Fig.30 A**). Les conditions d'accroissement du cal sont identiques à celles de l'initiation ; seules les concentrations en auxine et cytokinine sont plus faibles. Une accoutumance au milieu peut en effet avoir lieu et le cal peut même perdre ses besoins en auxine et cytokinine à la suite des repiquages successifs (on parle alors de souche anergiée).

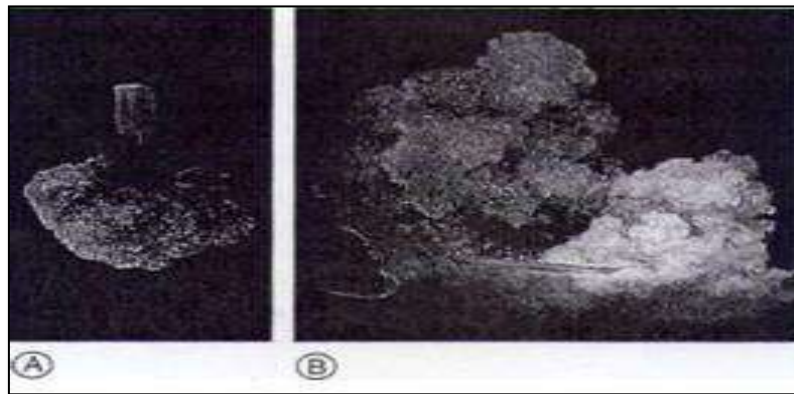


Figure 28 : Formation d'un cal sur un fragment de tige cultivé in vitro.

A) Cal sur un fragment de tige de Fenouil (culture à la lumière en présence d'AIB à une concentration de 1 mg/L) ; **B)** Culture du cal en présence de lumière et de 2,4-D à la concentration de 1 mg/L : le tissu primitif, à gauche, a donné naissance à une colonie embryogène blanche.

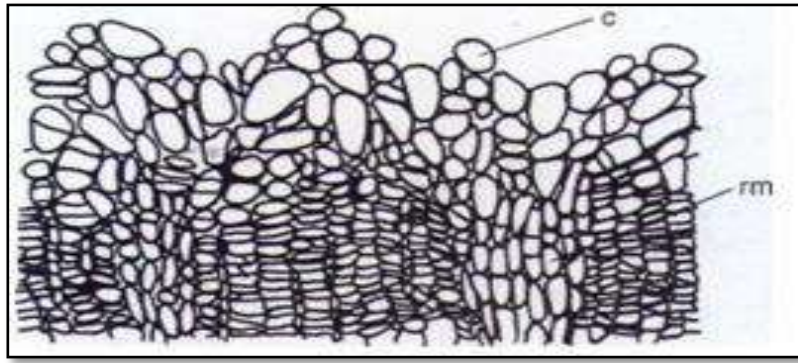


Figure 29 : Schéma de la structure histologique d'une cal formée sur un tissu cambial d'Erable en culture.

rm) Les rayons médullaires, c) ont proliféré pour donner les cellules parenchymateuses constituant le cal,

- soit la **multiplication végétative par néoformation d'organes ou d'embryons**

(**Fig.30B**). L'organogenèse peut en effet s'établir secondairement à partir du cal, par suite de la mise en place d'un programme de morphogenèse dans les cellules qui se sont activement divisées. Des méristèmes sont alors initiés sur un milieu solide approprié et se développent selon une séquence déjà évoquée précédemment lors de la régénération directe d'organes à partir d'explants (**Fig. 22 B, 4, 5, 6**). Enfin, dans certaines conditions, on peut obtenir par culture de fragments de cal des amas pluricellulaires au sein desquels les divisions orientées provoquent l'apparition d'une polarité précoce comparable à celle, typique, des embryons zygotiques, amas qui se développent par la suite en plantules (voir frontispice 2 et **Fig. 30 B, 7, 8**) : ce sont des **embryons somatiques** car ils se forment en dehors de tout phénomène sexué.

Les facteurs qui influencent les variations de compétence morphogène d'un cal sont très complexes. La nature et l'état physiologique de l'explant sont importants ; la balance hormonale est essentielle par son influence sur l'expression d'un programme organogénétique ou embryogénétique.

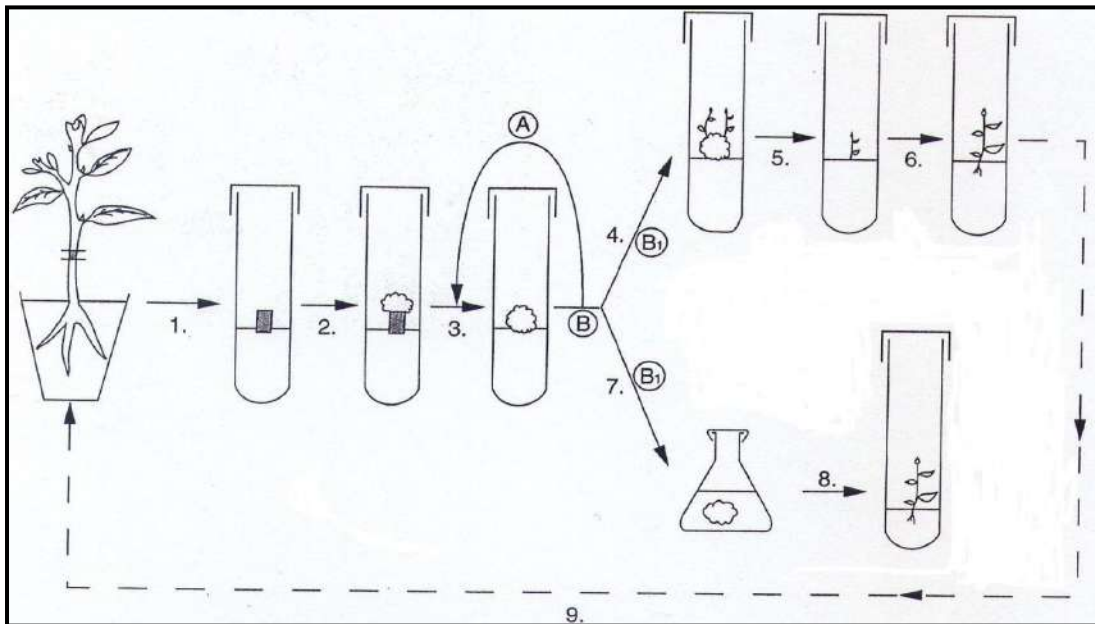


Figure 30 : Différentes voies évolutives dans la culture d'un cal.

Dans une culture d'explant sur milieu solide en présence d'auxines (2 -4 D), après les phases d'induction et d'accroissement du cal à partir de l'explant primaire (1, 2, 3), plusieurs possibilités sont offertes selon les buts poursuivis :

A) Entretien du cal par repiquages successifs sur milieu à teneur réduite en régulateurs de croissance.

B) Multiplication végétative à partir du cal soit par induction de bourgeons dans un milieu solide riche en cytokinines (4), croissance des tiges (5) et enracinement en présence d'auxines (6) (voie B₁), soit par culture du cal en milieu liquide agité (7), formation d'embryons somatiques qui se développent en plantules (8) (voie B₂). Quelle que soit la voie empruntée, les plantules obtenues peuvent être transplantées en pots, puis au sol (9, flèche pointillée). Les organismes régénérés à partir d'un cal ne sont pas toujours conformes à la plante mère : ce sont des vitrovariants. Il est donc nécessaire de contrôler la qualité génétique des plantes obtenues.

II. Culture de méristèmes et de bourgeons

L'excision des méristèmes caulinaires suivie de leur mise en culture *in vitro* aboutit à la régénération de plantes. Parfois, selon l'espèce considérée et les conditions de milieu, le méristème excisé engendre même plusieurs méristèmes adventifs qui peuvent être à leur tour remis en culture, ce qui augmente considérablement le pouvoir de multiplication.

On peut prélever le dôme apical seul, le dôme apical accompagné de quelques primordiums ou d'ébauches (**Fig.31**) ou l'apex entier. L'explant est alors déposé sur un milieu de culture solide (**Fig. 32A**). Les régulateurs de croissance fournis sont les cytokinines et parfois les auxines quand la taille du méristème est réduite, pour permettre une réactivation de l'explant. Dans les conditions optimales, la reprise d'activité des méristèmes se fait pratiquement sans phase de latence ; après quelques dizaines de jours, une plantule se développe ; on peut alors la bouturer sur un nouveau milieu pour l'enraciner (**Fig 32 B, C**).

Les cytokinines peuvent aussi favoriser le développement de nombreux bourgeons axillaires qui sont alors repiqués individuellement sur des milieux d'enracinement

(**Fig.32 F, G**) : les tiges s'allongent tout en formant des racines. Dans les deux cas, on peut faire des microboutures de ces jeunes plantes en les fractionnant en explants constitués d'un nœud : on appelle ce procédé de culture des bourgeons axillaires la **culture nodale** (**Fig. 32 E**). A un stade donné du développement de la tige, déterminé par le nombre d'entre-nœuds formés, les plantules enracinées peuvent être acclimatées progressivement au sol (**Fig. 32 D**). Ce procédé permet donc un véritable clonage d'individus performants : il constitue la **micropropagation** sensu stricto.

La réussite des cultures de méristèmes dépend beaucoup des facteurs génétiques propres à la plante : on constate que quelques familles montrent une forte capacité de régénération (Solanacées, Rosacées, Caryophyllacées). Elle tient aussi à l'état physiologique de la plante mère ; elle est plus importante lorsque les méristèmes sont prélevés sur des plantes jeunes, en croissance active.

Les applications de la culture de méristèmes et de bourgeons concernent :

- ✚ **La régénération de plantes saines** à partir de plantes atteintes par des agents pathogènes.



Figure 31 : Méristème d'Œillet avec deux ébauches foliaires, préparé pour la mise en culture (Gr.x65).

Les maladies à virus sont en effet responsables de pertes considérables pour certaines cultures, et, malgré les progrès des connaissances en virologie, on ne possède pas encore de méthodes de lutte efficaces contre ces parasites. L'éradication des virus par la culture de méristèmes, associée parfois à un traitement préalable par la chaleur pour augmenter les chances d'élimination, a été réalisée chez de très de méristèmes, associée parfois à un traitement préalable par la chaleur pour augmenter les chances d'élimination, a été réalisée chez de très nombreuses espèces herbacées (Pomme de terre, Trèfle, Tabac, Œillet, Iris, Chrysanthème) et ligneuses (Cerisier, Pommier, Framboisier, Groseiller, Forsythia et Vigne).

- **la micropropagation de masse et le clonage des individus.** En effet, dans de bonnes conditions de culture, on obtient à partir d'un méristème des millions de copies végétatives du donneur, les **vitroplants**, dans lesquels est conservée la conformité variétale du végétal. La micropropagation est ainsi devenue l'outil puissant de la biotechnologie du clonage de l'individu. A partir d'un seul bourgeon, on peut obtenir par exemple 200 000 à 400 000 Rosiers en une seule année, alors que la méthode classique de greffage ne donne que 30 à 50 descendants en deux ans. Les plantes obtenues sont plus vigoureuses et plus productives. La culture in vitro est désormais passée au stade industriel, mais ces applications ont devancé l'analyse approfondie et la compréhension des phénomènes d'organogénèse.

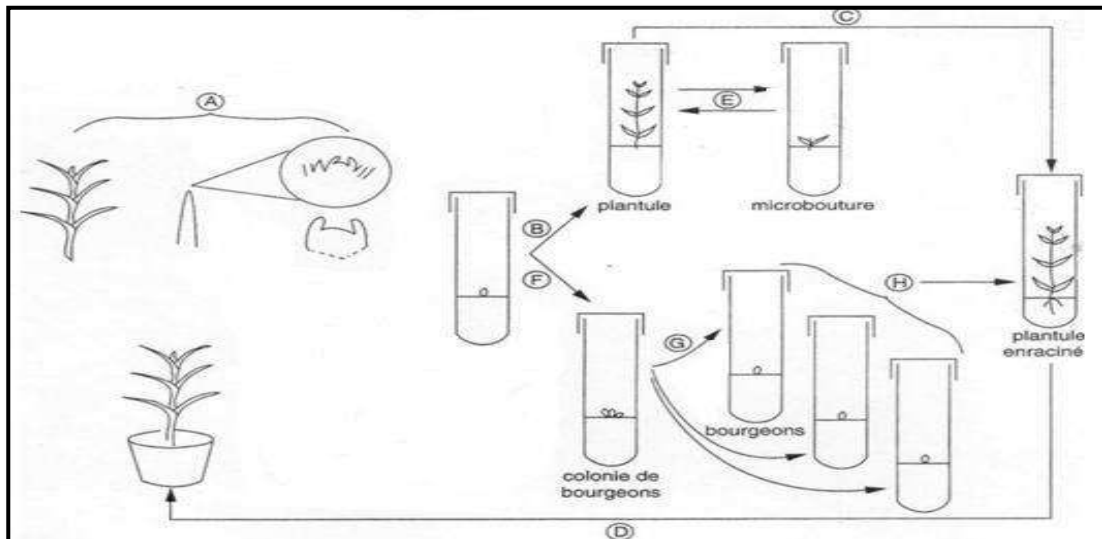


Figure 32 : Culture de méristèmes : différentes phases de la micropropagation.

- A)** Prélèvement, dissection et mise en culture sur un milieu d'isolement additionné de régulateurs de croissance (cytokinines, auxines) qui favorisent la reprise de l'organogenèse ; **B)** Développement du seul bourgeon terminal en plantule ; **C)** Enracinement de la plantule ; **D)** Transplantation en pot en atmosphère humide ; **E)** Multiplication possible des vitroplants par cultures de microboutures (culture nodale) sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance ; **F)** Développement de plusieurs bourgeons axillaires du méristème sous l'influence des cytokinines ; **G)** Repiquage de ces bourgeons isolés sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance (autre possibilité de micropropagation avant transplantation ; stockage par cryoconservation ou conservation en chambre froide) ; **H)** Développement des plantules et enracinement avant transplantation en pot (**D**).

L'obtention de clones intéressants (plantes saines, résistantes à certains agents pathogènes ou à des stress de l'environnement - gel, sécheresse -, plantes aux qualités horticoles ou agronomiques commercialement avantageuses), l'amélioration des procédés de stockage en chambre froide (très efficaces pour la conservation de ces variétés en véritables banques qui occupent un espace relativement restreint), une production homogène et rapide à n'importe quel moment de l'année, un taux de multiplication élevé sont des avantages qui ont conduit au développement de la micropropagation par les professionnels de l'agriculture et de l'horticulture (exemples de l'Asperge, du Kiwi, etc.).

III. Culture d'embryons

Dans la graine, l'embryon zygotique, issu de la fécondation, est un ensemble pluricellulaire résultant du développement de l'œuf et possédant une organisation bipolaire à deux méristèmes, racinaire et caulinaire.

En culture *in vitro*, des ensembles pluricellulaires bipolaires aptes à régénérer des plantules peuvent se former en dehors de tout phénomène sexué : ce sont les **embryons somatiques**. La compétence embryogénie peut apparaître à la surface ou à l'intérieur de cals de différents tissus, dans des cultures de cellules isolées, de protoplastes, d'anthers ou de boutons floraux, ou encore dans la culture d'ovaires ou d'ovules. En fonction de son origine, l'embryon obtenu peut donner une plante diploïde ou haploïde.

Androgenèse et plantes haploïdes

Dans le cas de l'androgenèse (formation d'embryons somatiques par culture d'anthers ou de pollen ; **Fig 33**), le grain de pollen - normalement destiné à former un noyau reproducteur et un noyau végétatif - subit une réorientation. Dans la microspore, la première mitose pollinique peut donner naissance à deux cellules identiques (**Fig.34, II**) ou bien comme dans les microspores normales à un noyau végétatif et un noyau reproducteur (**Fig. 34, I**), la réorientation étant alors le résultat d'une reprise de l'activité mitotique par l'un seulement de ces noyaux. C'est donc une cellule unique qui est à l'origine de l'embryon androgénétique ; celui-ci passe par les mêmes stades d'évolution que l'embryon zygotique.

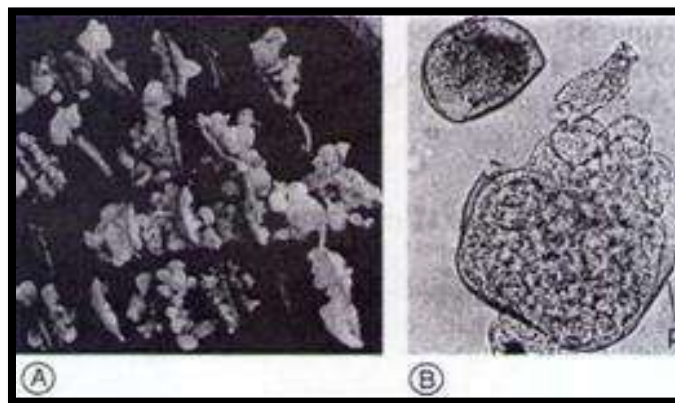


Figure 33 : Androgenèse chez le Maïs.

A) Anthères cultivées 30 jours sur milieu d'induction ; noter le développement des amas de proembryons. B) Proembryon androgénétique de 10 jours, encore entouré de la paroi pollinique, p (Gr. x 280).

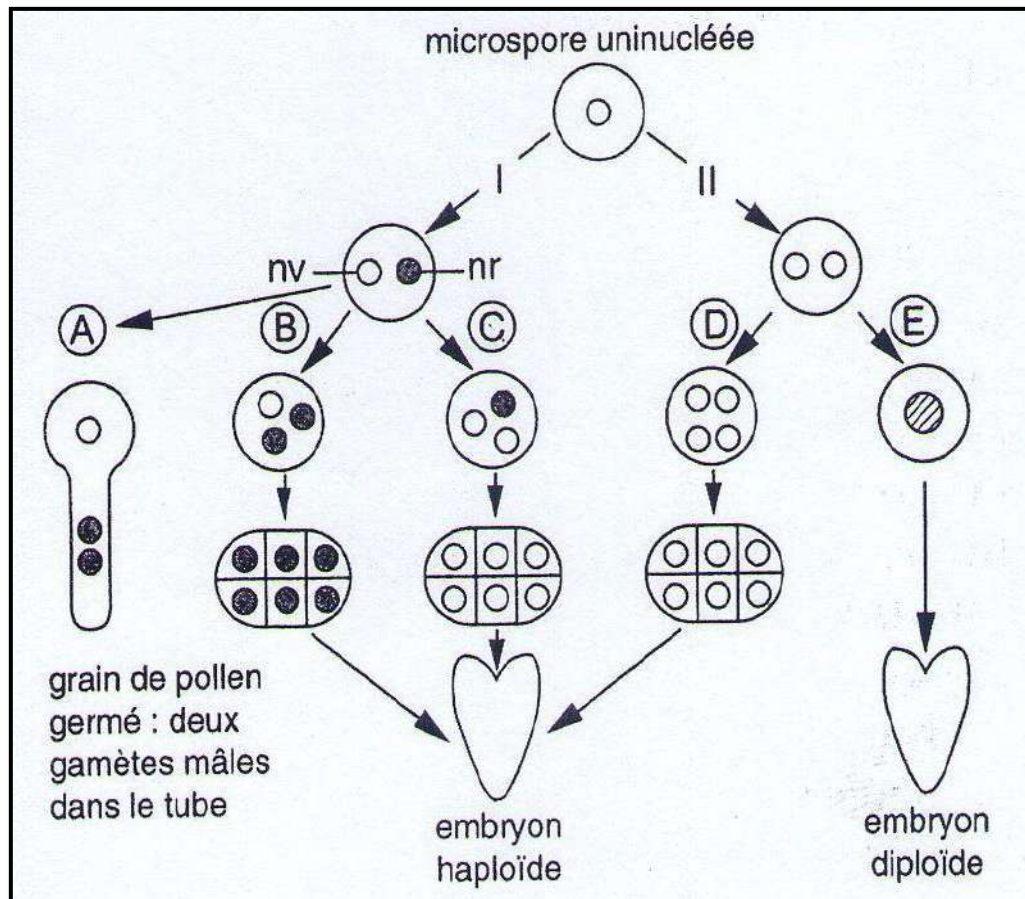


Figure 34 : Développement d'une microspore uninucléée :
Différentes voies possible in vivo (A) et in vitro (B-E).

I- La première mitose pollinique engendre deux noyaux différenciés : un noyau reproducteur, nr, et un noyau végétatif, nv. **A)** Lors de la germination normale in vivo, le noyau reproducteur subit une mitose dans le tube donnant deux gamètes mâles. **B-C)** In vitro, l'induction androgénétique conduit à la division du seul noyau reproducteur (**B**) ou du seul noyau végétatif (**C**) ; -les mitoses suivantes de ces noyaux aboutissent à la formation d'embryons haploïdes (les noyaux qui n'ont pas subi la seconde division dégèrent).

II- Dans certains cas, en culture in vitro, la première mitose de la microspore peut engendrer deux noyaux identiques : s'ils restent distincts et s'ils continuent à se diviser, on obtient un embryon androgénétique haploïde (**D**), mais s'ils fusionnent, c'est un embryon androgénétique diploïde (**E**) qui se forme.

Les **plantes haploïdes** sont viables, mais stériles ; elles sont toutefois intéressantes, car les mutations récessives y sont immédiatement discernables. Par action de la colchicine, on peut obtenir des diploïdes homozygotes et fertiles, les **haploïdes doublés**. Ces plantes sont très utilisées en sélection, car l'homozygotie est ainsi réalisée très rapidement contrairement à celle résultant d'autopollinisations *qui* nécessitent plusieurs générations. *C'est donc un avantage*

considérable pour les recherches en génétique et en amélioration des plantes. Par ailleurs, au cours de l'androgénèse, des fusions nucléaires précoces et des endoréplifications peuvent se produire aboutissant à la formation de plantes diploïdes parfaitement homozygotes (fig. 26 E), et la polyploïdie n'est pas rare.

Gynogenèse

Dans ce cas, les plantes haploïdes sont obtenues par développement des cellules du sac embryonnaire. Contrairement à l'androgénèse - qui nécessite un retour du pollen à l'état embryonnaire - la gynogenèse ne fait qu'induire, sous des modalités différentes, un phénomène naturel, oosphère et noyaux polaires étant programmés pour se diviser. Une induction inconnue déclenche le développement parthénogénétique d'une ou plusieurs cellules du sac embryonnaire (oosphère, antipodes ou synergides). Il se forme alors des embryons haploïdes ; le rendement est là encore peu élevé. Notons toutefois que cette technique est actuellement restreinte à un petit nombre d'espèces.

D'autres cas d'embryogenèse somatique concernent le développement d'embryons diploïdes dans des cultures de cellules issues de l'appareil reproducteur femelle (ovule, nucelle, de génotype identique à la plante mère), ou de l'embryon lui-même (seul ou accompagné du suspenseur et de génotype zygotique).

La culture *in vitro* d'embryons présente plusieurs intérêts exploités en agronomie. Tout d'abord, elle permet de « sauver » les embryons zygotiques immatures issus d'hybridations interspécifiques et qui normalement ne sont pas viables ; ensuite, elle accélère la vitesse de sélection en permettant un raccourcissement de la durée du cycle végétatif (l'étape de maturation de la graine est omise, l'intervalle entre générations est réduit, la dormance est levée). Ceci permet d'obtenir un démarrage homogène du cycle végétatif au sein d'une population puisqu'on peut en contrôler le développement. Enfin, cette culture ouvre une voie nouvelle, celle des semences artificielles.

Semences artificielles

Ce sont des embryons somatiques **enrobés** d'un polymère synthétique. La première étape de la production de ces semences consiste en une multiplication cellulaire réalisée en cytotacteur (bioréacteur) à partir de cals dissociés ou de protoplasmes. Parmi les amas pluricellulaires, les proembryons sont alors séparés par filtration puis repiqués dans un milieu de différenciation. Un contrôle du synchronisme de leur développement est nécessaire pour

obtenir une population d'embryons qui soient tous au même stade. Les embryons, une fois différenciés, sont enrobés dans un gel hydraté (alginate par exemple **Fig .35**) qui assure une protection mécanique mais aussi sanitaire car on peut y adjoindre des bactéricides ou des fongicides ; on y ajoute aussi les substances nutritives nécessaires lors de la germination ; l'ensemble est entouré par un tégument artificiel. Placé en conditions favorables, cet embryon encapsulé germe rapidement (**Fig .35A**). Cependant, des traitements chimiques ou physiques sont généralement appliqués pour retarder la germination jusqu'au moment du semis. La cryoconservation ou congélation dans l'azote liquide peut constituer un moyen idéal de conservation si elle n'empêche pas la germination de ces embryons (**Fig. 35 B**).

Ces semences artificielles sont à l'origine d'une biotechnologie en plein essor en raison de leur intérêt économique potentiel pour la propagation en masse de plantes génétiquement identiques, cependant quelques verrous technologiques et leurs coûts limitent encore l'application industrielle de ces « semences du futur ».

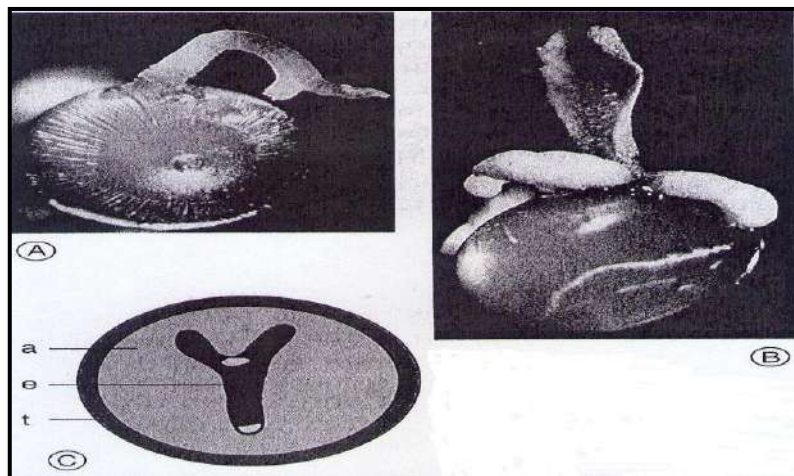


Figure 35 : Semences artificielles.

- A)** Germination d'un embryon somatique de Carotte enrobé dans l'alginate (Gr. x 7,5).
B) Germination d'un embryon somatique de Poirier après traitement par l'azote liquide, réchauffement et culture de 30 jours sur un milieu gélose (Gr. x 7,5).
c) Schéma montrant la constitution d'une semence artificielle, **a**, albumen artificiel composé d'alginate de sodium enrichi d'éléments nutritifs et de régulateurs de croissance ; **e**, embryon somatique ; **t**, tégument artificiel (alginate de calcium).

IV. Culture de protoplastes et hybridation somatique

IV1. Isolement et culture des protoplastes

Ces cellules végétales dépourvues de paroi peuvent être obtenues soit à partir d'organes de plantes (**Fig. 36**), soit à partir de suspensions cellulaires (**Fig. 37**). La suppression de la paroi et le maintien en vie des cellules nues ne peut se faire que si le milieu extérieur est hypertonique par rapport au milieu vacuolaire afin d'éviter une entrée d'eau qui conduirait à leur éclatement. Les substances employées pour réaliser la plasmolyse ne doivent pas être toxiques ni métabolisables ; on utilise généralement du sorbitol ou du mannitol. La paroi est éliminée par des traitements enzymatiques qui hydrolysent les liaisons glycosuriques des Polysaccharides pariétaux : solutions mixtes de cellulases, d'hémicelluloses et/ou de pectinases. Après quelques heures de macération, les enzymes sont éliminés par lavage et les protoplastes sphériques sont récupérés par filtration ou légère centrifugation et placés dans un milieu hypertonique. Des tests de viabilité permettent de vérifier qu'ils sont métaboliquement actifs : ils sont, en particulier, capables de reformer une paroi au bout de quelques heures.

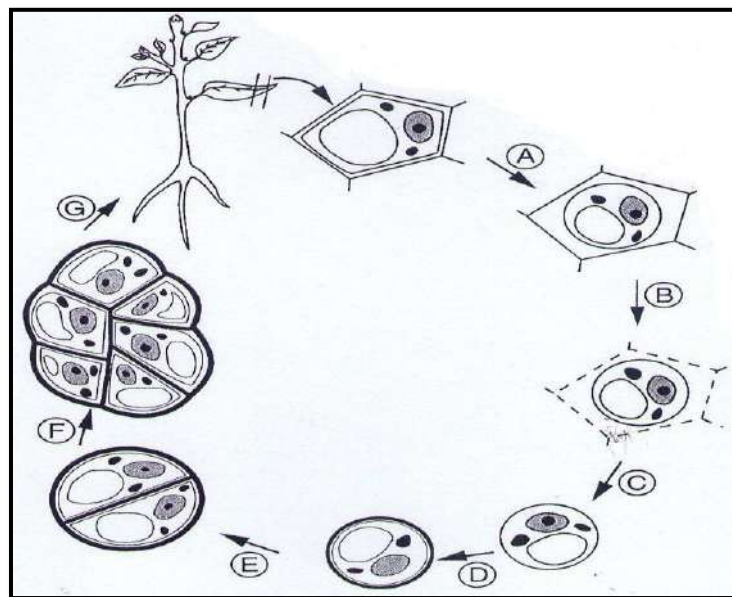


Figure 36 : Isolement et culture de protoplastes.

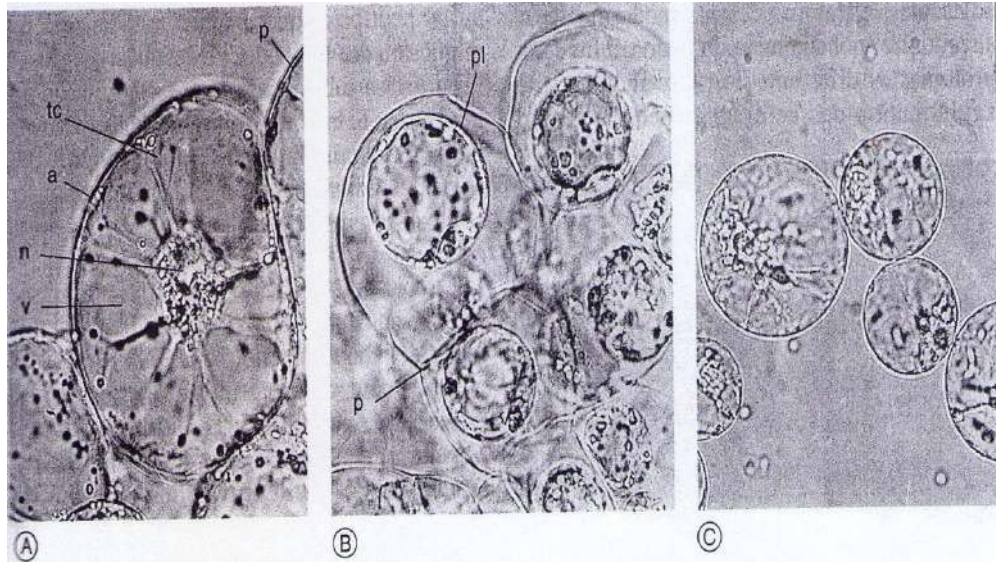


Figure 37 : Isolement de protoplastes à partir de suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*.

A) Cellules d'un microcal ; **B)** Cellules plasmolysées par du sorbitol 1M, encore associées par leur paroi, p ; **C)** Protoplastes isolés après digestion enzymatique des parois (Gr. x 850). a, amyloplaste ; n, noyau, p, paroi ; si plasmalemme ; tc, tractus cytoplasmique ; v, vacuole.

Les exigences nutritionnelles des protoplastes nécessitent une composition minérale adaptée, notamment pour le calcium qui joue un rôle important par son influence sur les divisions. Des artifices sont nécessaires pour conserver ces cellules végétales sans parois : contrôle très précis des propriétés osmotiques, du milieu, revêtement par un gel d'agarose qui les fixe et les protège (leur observation est facilitée, des micro-injections sont réalisables et le clonage et la sélection sont rendus possibles).

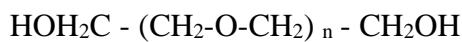
L'induction des premières divisions est conditionnée par la concentration des protoplastes dans l'inoculum de départ (de l'ordre de 10^5 cellules/mL) et par la présence simultanée d'auxines et de cytokinines : les premières mitoses se produisent au bout de quelques jours après que la paroi ait été régénérée. Après une ou deux semaines, les billes ou les disques d'agarose contenant les amas pluricellulaires sont transférés en milieu d'osmolarité plus faible et de composition hormonale différente. Les colonies peuvent alors former des microcals et des cals capables de régénérer une plante entière par néoformation d'organes ou par embryogenèse somatique. Le processus est particulièrement bien maîtrisé chez les Solanacées. Quand les microcals sont étalés sur un milieu ne contenant qu'une cytokinine, on observe très rapidement la formation de bourgeons. Si ces bourgeons sont repiqués sur un milieu dépourvu de substances

de croissance, des racines apparaissent et l'implantation dans le sol est possible au bout de 3 à 8 semaines.

Méthode de fusion des protoplastes

La fusion des protoplastes implique la formation de ruptures membranaires réversibles. Si la fusion de protoplastes dérivés de cellules adjacentes reliées par des plasmodesmes peut se produire spontanément, la fusion entre deux protoplastes différents doit être induite. Une agglutination des cellules précède la fusion qu'on peut provoquer par des substances chimiques ou des méthodes électriques.

Parmi les substances chimiques utilisées, on peut citer le nitrate de sodium, le dextran, l'alcool polyvinylique et le polyéthylène glycol, PEG, dont la formule est la suivante :



Les protoplastes d'origine différente mis à incuber dans une solution de PEG enrichie en ions Ca^{2+} s'agglutinent (**Fig. 38**) : il y a alors mise en contact de vastes surfaces membranaires entre deux ou plusieurs cellules. Cependant, les fusions se produisent principalement lorsque le PEG est éliminé du milieu de culture. Le PEG serait capable de former des liaisons hydrogène avec les constituants membranaires et assurerait ainsi la formation de ponts moléculaires entre les surfaces adjacentes entraînant une adhésion, renforcée par les ions Ca^{2+} . L'élimination du PEG provoquerait ensuite des redistributions de charges électriques dans la membrane, favorisant la fusion membranaire à partir des points de contact créés. On obtient environ 20 % de fusions dans ce cas, mais seulement 10 % sont des cellules hybrides.

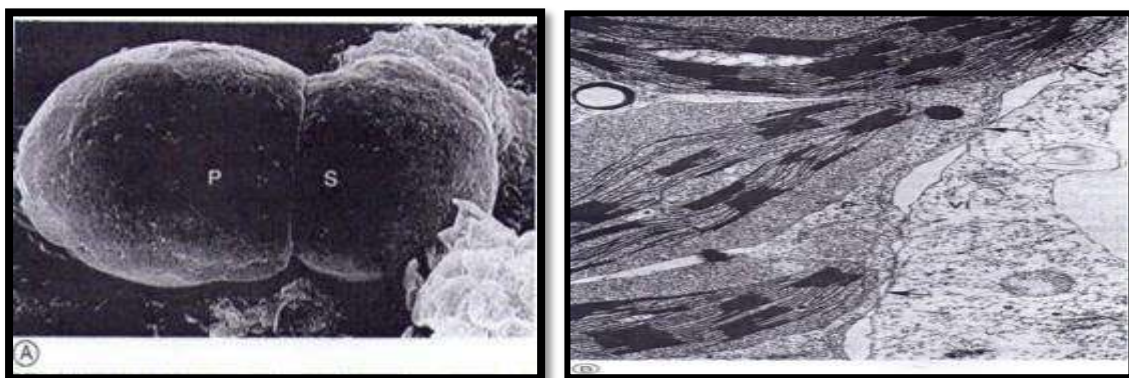


Figure 38 : Fusion de protoplastes (méthode chimique).

- A) Vue en microscopie à balayage de deux protoplastes agglutinés après traitement par le PEG. P, pro-toplaste de feuille de Pois ; S, protoplaste de cellule de Soja en culture (Gr. x 1 400) ;
B) Aspect ultrastructural de l'agglutination de deux protoplastes. P, protoplaste de feuille de Pois ; Vi, Protoplaste de cellule de Vicia en culture. Les flèches soulignent les régions de forte adhésion membranaire (Gr. x 16 000).

Avec la méthode électrique (**électrofusion ou électroporation**), les protoplastes, en suspension dans une solution hypertonique de force ionique faible, sont soumis à un champ électrique de l'ordre de $200 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ créé par un courant alternatif non uniforme qui passe entre deux microélectrodes parallèles très rapprochées (de 0,2 à 1 mm). C'est ce **choc électrique** qui provoque la fusion ; celle-ci s'opère de façon rapide (quelques minutes) et intervient de manière pratiquement synchrone dans les cellules agglutinées. La suspension de protoplastes fusionnés est alors reprise dans un milieu de culture. Des méthodes se sont développées pour induire les électrofusions à grande échelle et le rendement obtenu est généralement excellent (de l'ordre de 80 %).

Hybridation somatique

La possibilité de faire fusionner des protoplastes de types différents (issus de variétés de la même espèce ou même d'espèces différentes), et d'obtenir à partir de ces hybrides la régénération de plantes entières a ouvert la voie à une nouvelle technologie qui permet d'additionner les génomes de deux cellules sans passer par la reproduction sexuée : c'est l'hybridation somatique. Isolés du tissu à partir duquel ils sont obtenus, les protoplastes n'ont pas la capacité de reconnaître les partenaires avec lesquels ils sont en mélange : ils sont donc d'excellents receveurs.

Dans les produits de fusion, deux cas peuvent cependant se présenter ; ils aboutissent à l'obtention d'une grande diversité de produits (**Fig 39**) : les **autofusions** résultent de l'union de deux protoplastes identiques (A/A ou B/B) ; les **hétérofusions** correspondent à l'union de deux protoplastes différents (A/B, **Fig. 39** et **Fig. 40**). Celles-ci peuvent entraîner une addition totale des trois compartiments héréditaires, nucléaires, chloroplastique et mitochondrial ; on obtient alors un hybride somatique. Mais, il n'est pas rare que des compétitions apparaissent peu après la fusion ; elles ont pour conséquence l'élimination de certains territoires cellulaires. L'un des noyaux peut être éliminé - par disparition des chromosomes lors des mitoses suivantes, par exemple -, on obtient alors un hybride cytoplasmique ou **cybride**. La totalité des chloroplastes provenant d'une même cellule dégénère souvent ; les mitochondries ont un comportement différent car on rencontre tous Ses intermédiaires entre une addition totale et l'absence d'un des types : les cybrides sont donc très variés.

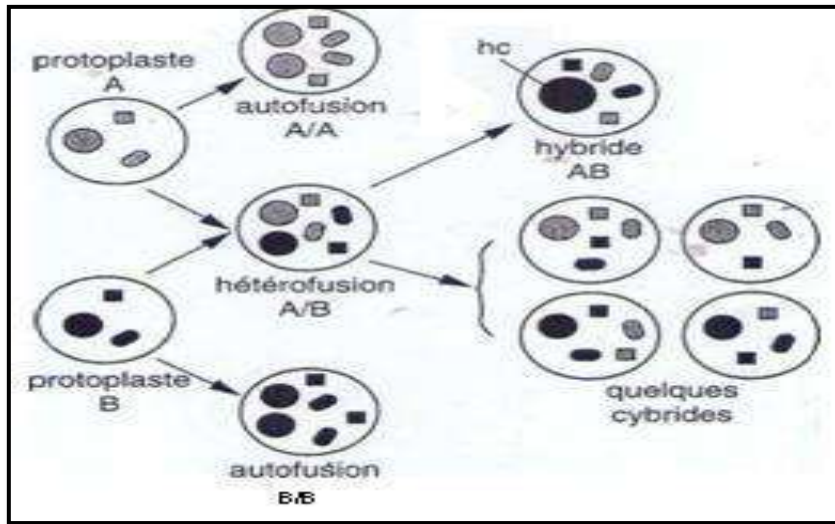


Figure 39 : Diversité des produits d'une hybridation somatique.
hc, hétérocaryon résultant de la fusion des noyaux de A et de B.

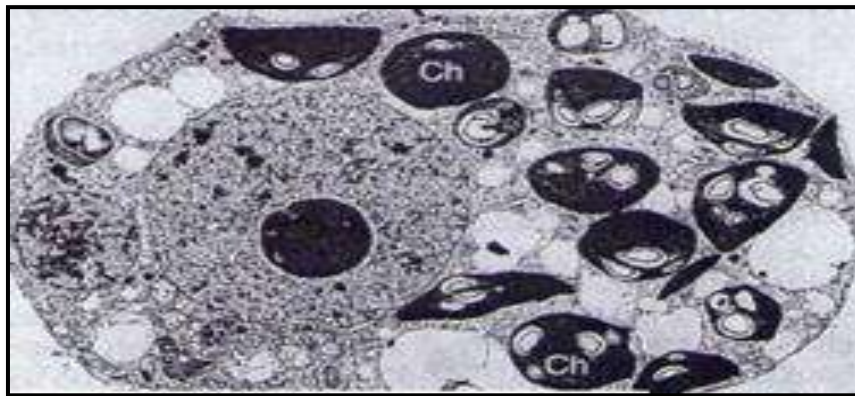


Figure 40 : Hybridation somatique.

Vue générale d'un produit d'hétérofusion entre un protoplaste de feuille de **Vicia narbonensis** et un protoplaste de cellule en culture de **Vicia hajastana**. Les noyaux, **N**, n'ont pas encore fusionné. La cellule hybride contient à la fois des chloroplastes, **Ch**, et des leucoplastes, **L** (Gr. x 2 200).

Les produits d'hétérofusions doivent être repérés rapidement (couleur naturelle, fluorescence des chloroplastes immédiatement visible au microscope, cytométrie de flux, marqueurs génétiques, etc.) pour être isolés et sélectionnés ; ils sont alors récupérés un à un à l'aide de micropipettes et mis en culture.

V. Culture de cellules

Les cultures d'Algues et de Champignons unicellulaires sont extrêmement développées à l'échelle industrielle pour la biosynthèse de métabolites secondaires (pigments, polysaccharides, antibiotiques, etc.), mais seuls les aspects de la culture de cellules isolées de Végétaux supérieurs seront abordés ici.

On peut obtenir les cellules libres de plusieurs façons :

- en isolant directement les cellules d'un tissu, soit par la **dissociation mécanique** provoquée par un broyage modéré dans un tampon approprié, soit par l'action d'enzymes pectinolytiques comme dans la première étape d'isolement des protoplastes (**Fig.36**) ; les enzymes cellulolytiques sont omises. Ces cellules, débarrassées des débris par lavage et filtration, sont récoltées par centrifugation légère et placées en milieu liquide agité : elles constituent les **suspensions d'origine primaire**. Le pourcentage de cellules libres et viables obtenu dépend beaucoup de la nature du tissu, de sa cohésion et de la résistance des parois. La méthode enzymatique est la plus couramment employée car son rendement est meilleur ;

- en utilisant les propriétés d'un cal friable, résultant de la prolifération d'un explant mis en culture, dont les cellules sont dissociables spontanément. Malgré des filtrations répétées, les **suspensions** de ce type - **d'origine secondaire** - ne sont jamais constituées exclusivement de cellules isolées : les cellules libres sont mélangées à de petites colonies cellulaires, les microcals (**Fig. 41**).

Tandis que les suspensions d'origine primaire sont homogènes puisque les cellules sont issues d'un tissu donné, les suspensions d'origine secondaire sont hétérogènes tant du point de vue physiologique (âge, état, propriétés différentes) que du point de vue génétique (variété des degrés de ploïdie) ; cela peut être un inconvénient lors de l'utilisation.

Une fois isolées, les cellules doivent être placées dans un milieu favorable à la reprise de l'activité mitotique. Selon les buts poursuivis, on dispose de plusieurs méthodes : micro cultures, cultures en milieu gélose en couche mince sur le fond d'une boîte de Pétri, cultures en milieu liquide agité pour de grandes quantités de cellules.

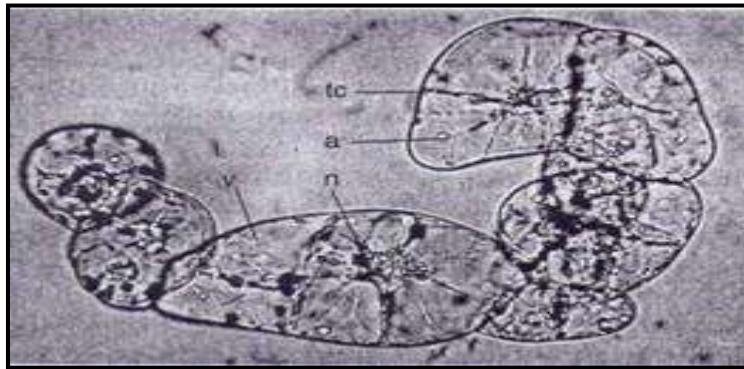


Figure 41 : Microcal dans une culture de cellules de *Catharanthus roseus*.

a, amyloplaste ; **n**, noyau ; **te**, trabecule cytoplasmique ; **v**, vacuole (Gr. x 800).

L'étude de la prolifération des cellules en suspension a permis de montrer l'existence de trois phases (**Fig ; 42**) : une **phase de latence** pendant laquelle le nombre de cellules n'augmente pas - elle correspond à la reprise des divisions ; une phase exponentielle au cours de laquelle le nombre de cellules augmente énormément grâce à une activité mitotique intense ; une **phase stationnaire** pendant laquelle le nombre de cellules n'augmente plus - elle traduit l'épuisement du milieu en facteurs indispensables à la division cellulaire. L'entretien d'une culture nécessite donc **un repiquage** dans un milieu neuf où le même type de croissance se reproduira : c'est la culture discontinue (**batch-culture** des Anglo-Saxons). C'est pendant la phase exponentielle qu'on prélève les parties aliquotes de culture pour les repiquages ; ceux-ci peuvent s'effectuer de très nombreuses fois. Ainsi **on peut théoriquement entretenir indéfiniment une suspension cellulaire**.

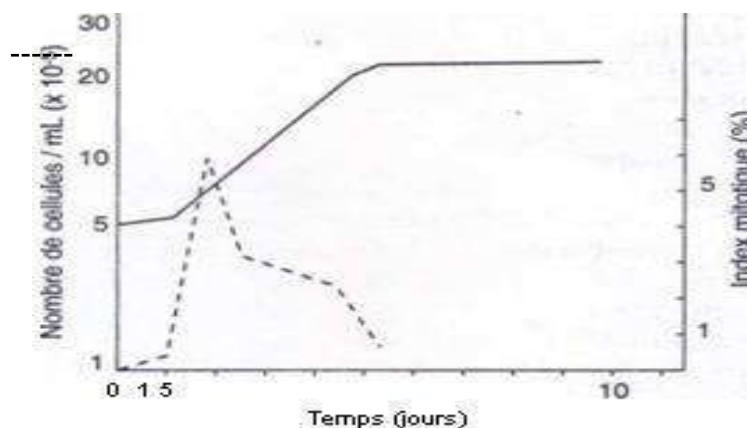


Figure 42 : Croissance (____) et évolution de l'Index mitotique (-----) au cours du temps dans une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus* en conditions d'entretien.

Quelle que soit leur origine, les cellules isolées en culture peuvent régénérer de nouveaux organismes selon un processus voisin de celui décrit pour les protoplastes. Contrairement à l'organogénèse à partir d'un cal qui s'effectue souvent grâce à l'activité de plusieurs cellules, l'origine des plants néoformés dans ce cas est unique, ce qui démontre à nouveau **la totipotence des cellules végétales**. Mais l'expression de cette totipotence n'est pas immédiate : elle passe par la formation de colonies cellulaires qui résultent des divisions de la cellule initiale. On pense généralement que l'expression du génome de l'ensemble de la plante, partiellement réprimée dans la cellule différenciée, ne peut s'effectuer qu'après l'activation mitotique qui lèverait cette répression. C'est au sein de ces colonies que s'établissent soit des zones méristématiques responsables d'une organogénèse par étape, soit les embryons somatiques. Dans des suspensions cellulaires d'hypocotyles de Carotte, des cellules uniques à l'origine d'embryons somatiques ont pu être suivies par une analyse vidéo (*video cell tracking*). La recherche dans ces cellules d'un gène marqueur de la transition du programme somatique vers le programme embryogène a conduit à l'identification d'un gène exprimé transitoirement, le gène **SERK** (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*). Il code pour une protéine kinase riche en leucine dont l'expression cesse après le stade globulaire. Dans la plante entière, l'activité de ce gène n'est détectable que dans l'embryon zygotique Si seulement jusqu'au stade globulaire précoce. Il y aurait donc une chaîne de transfert de signaux commune aux deux types d'embryogénèse. Le développement ultérieur en plantules passe par les mêmes stades que celui des organes ou des embryons obtenus en culture. Cependant, la compétence organogène d'une suspension cellulaire peut diminuer au fil des repiquages, jusqu'à disparaître. Etais quelques cas, cette perte de potentialités a pu être reliée à des modifications du nombre chromosomique. Les cellules génétiquement anormales forment alors des colonies tissulaires non organogènes ou à organogénèse perturbée. Les suspensions cellulaires issues de cals montrent facilement ce phénomène, elles constituent donc, pour la néoformation de plantes entières, un matériel moins favorable que les suspensions de cellules isolées à partir de tissus. On a déjà souligné que ces variations sont extrêmement rares avec les cultures d'apex ou de méristèmes qui en conséquence sont préférées pour la multiplication végétative.

Les applications particulières des cultures cellules végétales - qui rejoignent celles protoplastes - concernent l'amélioration plantes et les biotechnologies. une voie nouvelle pour l'amélioration des espèces est effet ouverte grâce aux cultures cellulaires grandes quantités qui facilitent la production et la sélection de mutants de résistance aux toxines spécifiques de certains pathogènes, ou de lignées résistantes à des herbicides ou à des stress de l'environnement (gel, salinité), ou encore surproductrices de métalites. Cependant, le problème de la

régénération de plantes fertiles, où les caractères sélectionnés sont exprimés et transmissibles, constitue une limite à l'utilisation de ces cultures. Dans le cadre des biotechnologies, importance économique et pharmaceutique de divers métabolites secondaires extraits des végétaux où ils sont parfois en faible teneur (alcaloïdes, stéroïdes, pigments, composés aromatiques, antibiotiques..., qui sont difficiles à obtenir par synthèse artificielle), a conduit au développement des méthodes industrielles de culture en masse dans des fermenteurs où le milieu est régulièrement renouvelé (culture continue). Les capacités de biosynthèse des cellules isolées de ces végétaux sont souvent augmentées et peuvent être stables : on sélectionne les clones qui ont le meilleur rendement. Enfin, les cultures de cellules sont également capables d'effectuer in vitro des biotransformations qui sont exploitées à l'échelle industrielle.

VI. Clonage et variation somaclonale

Alors que la micropropagation produit généralement des plantes d'une grande conformité génétique, un taux élevé de variation peut être induit en culture in vitro lorsque les cultures sont réalisées dans des conditions particulières.

Plus précisément, les plantes régénérées à partir de cultures initiées d'explants différenciés (ne contenant pas de méristèmes préexistant) ou à partir de cultures de cals présentent des taux parfois importants de non-conformité. Cette variabilité semble de plus être proportionnelle au temps de culture.

Des mutations induites pendant la culture ont été détectées chez de nombreuses espèces végétales. L'existence de ces variations spontanées a stimulé l'intérêt de la culture de cellules ou de tissus pour l'isolement de plantes présentant des caractéristiques nouvelles.

La majorité des lignées isolées à ce jour se sont toutefois révélées sans intérêt agronomique. Dans quelques cas cependant, l'existence de cette variation somaclonale a permis d'isoler des plantes présentant des caractères intéressants d'un point de vue agronomique. Par exemple, des plants de canne à sucre présentant un taux de sucre plus important ont été isolés. De même, des génotypes résistants à certains virus, ont été obtenus chez la tomate et la pomme de terre