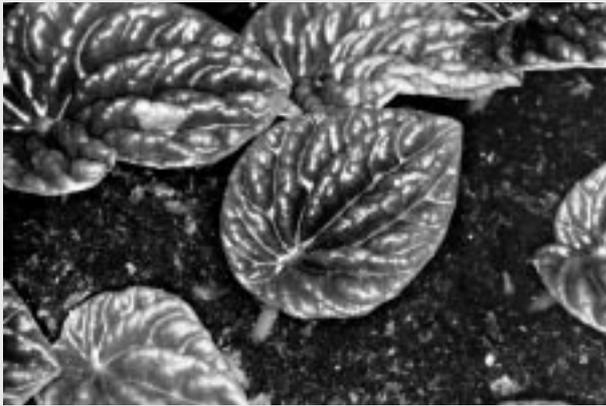
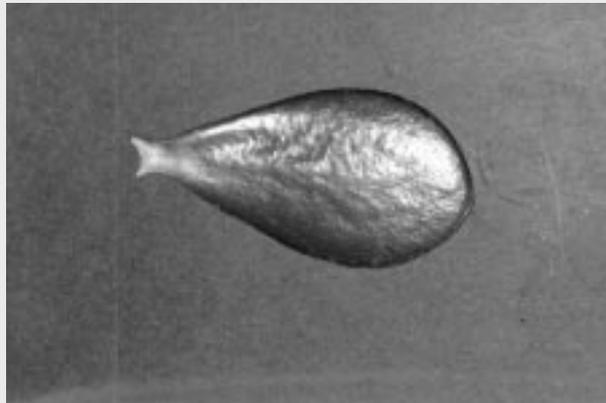


Quelques espèces peuvent être multipliées à partir des feuilles :  
Sansevière ; Bégonia ; Kalanchoë ; Saintpaulia ;

Peperomia :



Crassulacée :



### **Avantages et inconvénients de la multiplication végétative par rapport à la voie sexuée (graines) :**

- \* **Avantages** : obtention de plantes présentant toutes les mêmes caractéristiques : clones.
- \* **Inconvénients** : beaucoup d'espèces sont réfractaires à la multiplication végétative.

### **Tous les végétaux ne peuvent donc pas être multipliés par voie végétative.**

Pourquoi de nombreuses espèces sont-elles réfractaires aux techniques traditionnelles de multiplication végétative ?

Si on arrive à bouturer des tiges, pourquoi n'arrive-t-on pas à faire la même chose avec les racines ?

Pourquoi n'arrive-t-on pas à bouturer des petits morceaux de plantes ?

**C'est pourquoi, devant ces problèmes les chercheurs se sont tournés  
vers une autre technique :**

**LA CULTURE *IN VITRO*.**

# LES GRANDES ÉTAPES DE L'AVÈNEMENT DE LA CULTURE *IN VITRO*.

1870. Premières tentatives de culture d'organes vivants isolés : conservation de queues de têtards de grenouille.

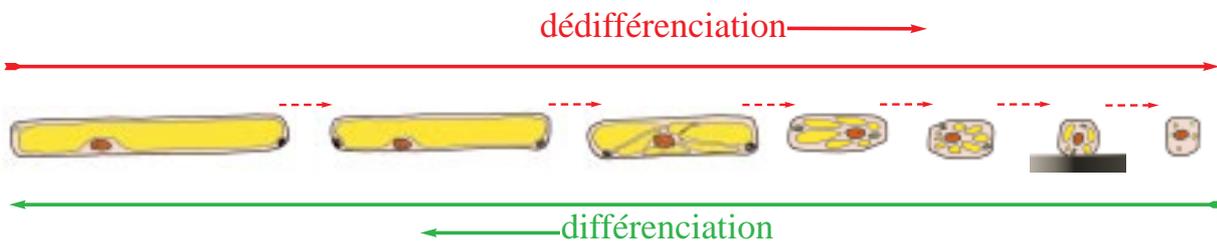
## LA TOTIPOTENCE CELLULAIRE

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"**.

La **dédifférenciation cellulaire** : on voit les grandes cellules différenciées (dans les feuilles, tiges, pétales,...) perdre leurs vacuoles, leur noyau se diviser activement, et de nombreuses et très petites cellules méristématiques apparaître. Une cellule dédifférenciée peut alors évoluer dans toutes sortes de directions.



## PREMIERS SUCCÈS !

En 1934, WHITE 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\*.

cellules méristématiques du cambium.



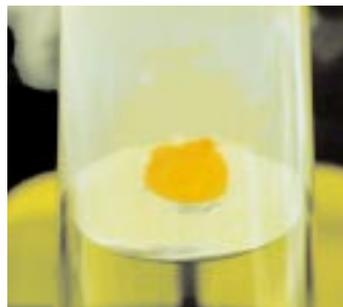
Mise en culture de racines de Tomate.



Au bout de quelques semaines on observe la croissance des racines.

\* En effet, en 1934, on découvre l'**auxine** (AIA) : il faut 100 kg de maïs immature pour obtenir 500 mg d'AIA. Cette substance naturelle est principalement synthétisée dans les parties apicales et agit sur l'élongation des cellules donc sur la croissance des plantes.

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").



Une rondelle de carotte est mise en culture sur un milieu approprié.



15 jours plus tard, on voit apparaître un amas plus ou moins vert : on a la formation d'un cal. Le cal résulte de la prolifération des

## UN MILIEU MIRACLE

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 sucres, des vitamines B, des auxines et des **cytokinines\***. Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de **méristèmes\*** de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative *in vitro*.

\* Les **cytokinines** ont été découvertes par le biais de la culture *in vitro* en 1956. Ce groupe de substances de croissance végétale est responsable des divisions cellulaires. Les cytokinines sont principalement synthétisées dans les parties racinaires jeunes.

\* Les **méristèmes** sont des organes de la plante contenant des cellules capables de se diviser, et sont responsables de la formation des tiges, des feuilles, des fleurs et des racines. On trouve des méristèmes apicaux (en haut des tiges), axillaires et racinaires (au bout des racines).

## L'IMPORTANCE DES HORMONES VÉGÉTALES

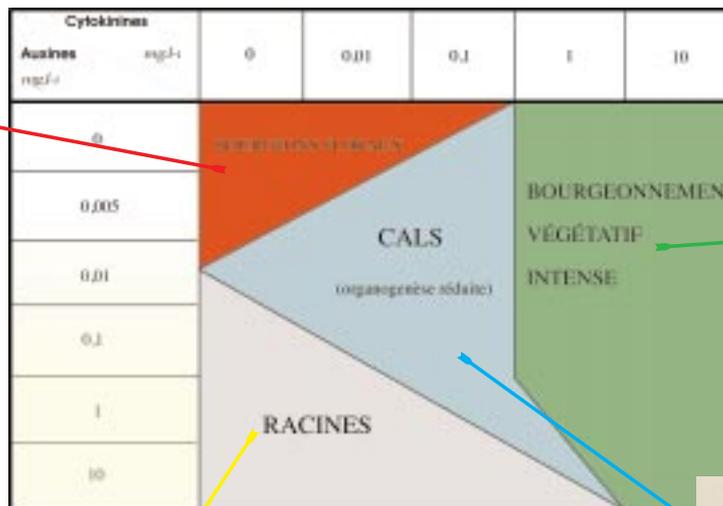
**EXPÉRIENCE SUR DES EXPLANTS DE TABAC** : comment on "oriente" une culture à l'aide de deux hormones : l'auxine et la cytokinine. On joue sur le rapport Auxine / Cytokinine :

$R = \text{concentration en auxine} / \text{concentration en cytokinine}$

Si  $R = 1$  : formation de cal uniquement ;  
 $R < 1$  : formation de fleurs ou de feuilles sur le cal ;  
 $R > 1$  : formation de racines sur le cal.



Fleur de Tabac sur le cal.



Plantule de Tabac obtenue à partir d'un cal.



Racines formées sur un cal.



Formation de cal sur un explant de tige de Tabac.

## FONDEMENTS TECHNIQUES de la CULTURE *IN VITRO*.

La technique *in vitro* est un mode de **multiplication végétative artificielle** des plantes.

Il s'agit un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'**asepsie** (stérilisation du matériel, désinfection des explants) :



Autoclave : sert à la stérilisation des milieux de culture et du matériel.



Hotte à flux laminaire : travail en conditions aseptiques.



Repiquage de fraisiers dans une hotte à flux laminaire.

et d'autre part des **conditions de culture parfaitement contrôlées** (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité,...).



Eléments minéraux et organiques rentrant dans la composition d'un milieu de culture.



Chambre de culture. Les conditions de lumière et de température sont contrôlées.

Ces **méthodes** s'appliquent des organes ou des fragments d'organes : les **explants**.

- graine immature,
- embryon,
- ovule,
- pollen,
- bourgeon terminal,
- bourgeon axillaire,
- morceau de tige,
- morceau de feuille,
- de pétale de fleur,
- etc....



L'**explant** doit trouver dans le **milieu de culture** tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu, en fait, tout ce que la plante mère peut fournir :

- a) par les racines : les éléments minéraux, l'eau ;
- b) par les feuilles et grâce à la photosynthèse : des sucres, des vitamines et des acides aminés ;
- c) les hormones, pour orienter la formation des organes.

# LE MILIEU DE CULTURE

Entreront dans la composition du milieu de culture, des éléments minéraux ainsi que des éléments organiques et éventuellement des régulateurs de croissance (hormones).

## A) LES ÉLÉMENTS MINÉRAUX :

**1- Les macroéléments :** interviennent en grande quantité.

Il s'agit de 6 éléments présents à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P).

**2- Les microéléments :**

Appelés parfois oligo-éléments, et bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel.

Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le chlore (Cl), le cobalt (Co), le nickel (Ni), etc...

## B) LES ÉLÉMENTS ORGANIQUES :

**1- Les sucres :**

Dans le cas de tissus végétaux placés en culture *in vitro*, l'assimilation chlorophyllienne est nulle ou insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant.

Dès lors, on ajoute des sucres, le plus souvent du **saccharose**, aux milieux de culture pour fournir à l'explant une source de carbone. Dans la nature, les sucres sont photosynthétisés à partir du gaz carbonique atmosphérique et de l'eau du sol.

**2- Les vitamines :**

L'emploi de diverses vitamines favorise fréquemment le développement des cultures *in vitro*: elles appartiennent essentiellement au groupe B.

**3- Les acides aminés :**

Il a parfois été observé que l'apport d'acides aminés favorisait la prolifération.

## C) LES RÉGULATEURS DE CROISSANCE.

Appelés généralement **hormones végétales**, ils induisent les phénomènes de croissance et de néoformation des organes.

On trouve ces substances de croissance naturellement dans toutes les plantes; cependant, on a pu synthétiser artificiellement des molécules possédant les mêmes propriétés.

Les hormones utilisées sont principalement :

- les auxines,
- les cytokinines,

car ces hormones sont capables d'orienter les explants vers la formation de nouveaux organes.

Les milieux ainsi constitués sont liquides. Il est nécessaire de les **solidifier** par l'ajout d'un **gélifiant** pour éviter que les explants ne tombent au fond des récipients et

# LES TYPES DE MULTIPLICATION *IN VITRO*

## 1- MULTIPLICATION PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE EXEMPLE : LE SÉQUOIA (*Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz.)

Le point de départ est un bourgeon terminal ou axillaire. Cette technique de micropropagation ne fait qu'accélérer *in vitro* le fonctionnement normal des bourgeons déjà formés sur une plante.

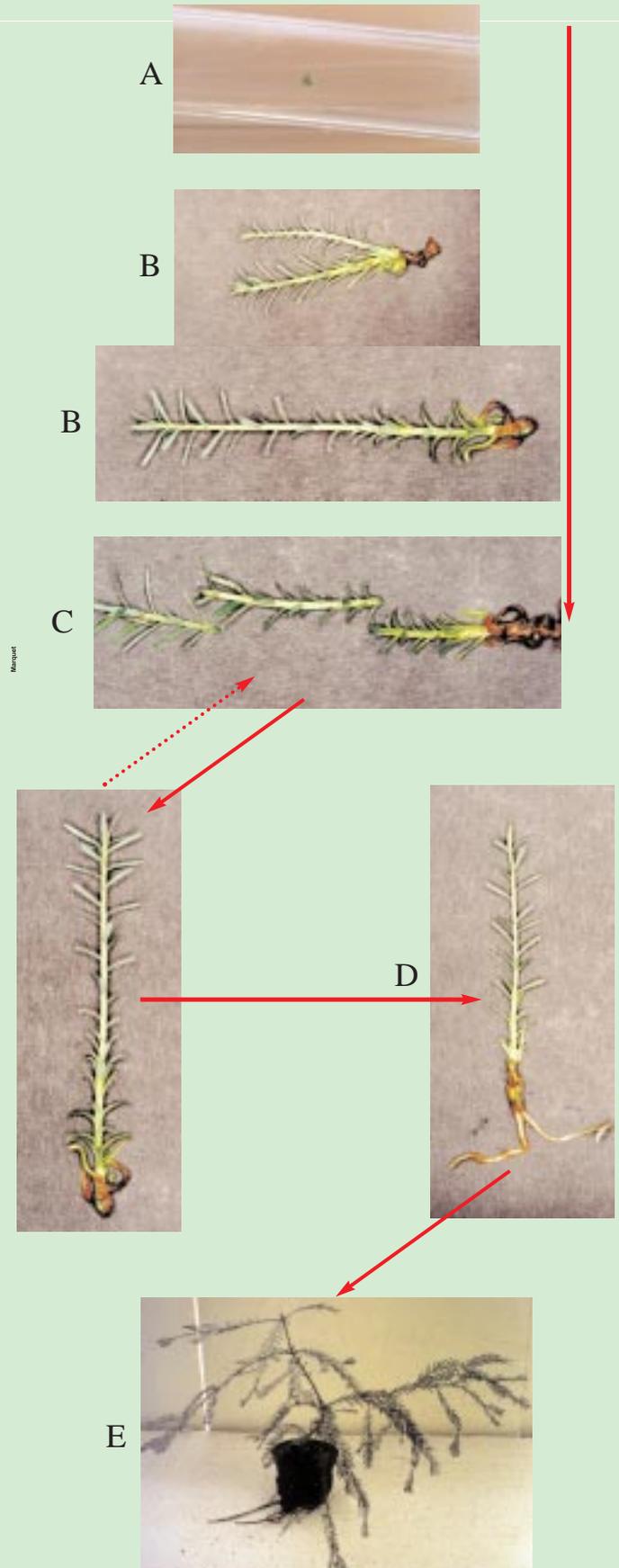
A . L'explant initial peut être soit un méristème, soit un bourgeon, soit un fragment de tige comportant au moins un bourgeon axillaire.

B . Sur un milieu approprié comprenant des cytokinines, le méristème se divise ou le bourgeon débourre et développent tous les deux une tige ou une touffe feuillée.

C . Cette tige peut être découpée en fragments (noeuds) qui, remis sur le milieu, vont redonner autant de touffes feuillées qui peuvent être aussi subdivisées : **c'est la phase de multiplication.**

D . Les tiges peuvent alors être transférées sur un milieu enrichi en auxines, qui permet **leur enracinement.** On obtient finalement dans chaque tube une plantule complète.

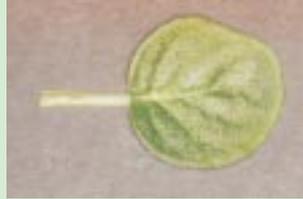
E . Les plantules sont mise **en acclimatation** en terre où elles reconstituent des plantes normales. Le nombre de plants de Séquoia obtenus en 1 an à partir d'un méristème peut atteindre par cette méthode 4096 ( $4^6$ ). Cela représente une **plantation de 16 hectares d'arbres adultes !**



## 2- MULTIPLICATION PAR BOURGEONNEMENT ADVENTIF EXEMPLE : LE SAINTPAULIA (*Saintpaulia ionantha* Wendl.)

Le terme "adventif" s'applique à la formation d'organes en un site inhabituel.

A . L'explant est constitué d'un fragment d'organe, d'une portion de tissu, ou même de cellules isolées.



B . Il est placé sur un milieu contenant des cytokinines. Soit des bourgeons sont néoformés directement à partir des cellules de l'explant initial (rare).



C . Soit des cellules de l'explant initial se divisent rapidement et forment un cal primaire rattaché à l'explant de départ et qui donnera des bourgeons néoformés. **C'est la phase de multiplication.**



D . Toutes les tiges obtenues dans les deux cas sont transférées sur un milieu enrichi en auxine qui va provoquer leur **enracinement**.



E . Les plantules sont alors **acclimatées** en terre où elles reconstituent des plantes normales.



### 3- MULTIPLICATION PAR EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE.

Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (**embryon zygotique**) qui résulte de la reproduction sexuée. L'**embryogenèse somatique** consiste à provoquer l'apparition d'embryons à partir de tissus végétaux mis en culture *in vitro*. Elle apparaît le plus souvent dans les suspensions cellulaires, occasionnellement dans les cals, plus rarement directement sur les organes.



Cals de Ginseng.

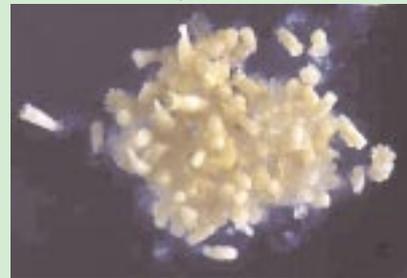


Formation d'embryons somatiques sur cals de Ginseng.



Suspension cellulaire de Ginseng.

A . Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent en nombreux petits massifs à structure bipolaire (avec un méristème de tige et un méristème de racine) nommés **embryons somatiques**.



Colonie d'embryons somatiques.



Germination.

B. Comme les embryons zygotiques (qui sont présents dans les graines), les embryons somatiques se développent, directement en plantules enracinées.



Plantule de Ginseng.



Plantule de Palmier à huile.

C . Des recherches actuelles tentent l'encapsulation des embryons somatiques, sans altérer leur viabilité, pour en faire des **semences artificielles**.



Encapsulation d'embryons somatiques dans de l'alginate enrichi de substances nutritives.



## AVANTAGES DE LA CULTURE *IN VITRO*.

La culture *in vitro* permet :

- l'**obtention de clones sélectionnés** pour leur vigueur, leur caractères intéressants (Chrysanthème, Fraisier, Bananier), leur rareté (Orchidées) ;
- l'**assainissement des végétaux** (plantes sans virus) : la Pomme de terre ;
- la **production rapide et en masse**, à n'importe quel moment de l'année ;



- le **raccourcissement des cycles de développement** ;



alir



es.



- la **diminution des coûts de production** (peu de personnel) et des **dépenses énergétiques** (réduction des surfaces de culture et éclairage réduit) ;
- la **facilité de stockage et conservation** (au froid) de millions de plantes sur de très petites surfaces, à l'état sain et à l'abri des contaminations ;
- le **rajeunissement d'un végétal** ;
- la **production de substances biochimiques** intéressantes pour l'industrie, les secteurs



## NÉANMOINS, UN CERTAIN NOMBRE DE PROBLÈMES SE POSENT :

### LA VITRIFICATION

- certains accidents, non prévisibles au départ, peuvent intervenir en cours de culture *in vitro*, comme des malformations dues à un déséquilibre hormonal : **la vitrification**.



Fraisier



Phalaenopsis



Oeillet

Plantes vitrifiées

### LA PERTE DE CARACTÈRES INTÉRESSANTS

- la production répétée de grands nombres de plants uniformes (clones) peut entraîner la perte des gènes nécessaires, par exemple, à la résistance aux maladies nouvelles; il faut donc conserver les pieds mères et à certains moments, repasser par la reproduction sexuée.



Drosera : plante normale



Drosera : plante albinos.

### PROBLÈMES INHÉRENTS À LA TECHNIQUE

- l'asepsie des explants : la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, contaminent la culture et tuent les jeunes plantules.

bactéries



moisissure



- L'acclimatation : le passage à des conditions de culture normale est parfois délicat. En effet, durant son séjour *in vitro*, 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.

# CULTURE *IN VITRO*

## SAUVEGARDE DES ESPÈCES EN DANGER.

### EXEMPLE : LES PLANTES CARNIVORES.

Les plantes carnivores sont un exemple de plantes en voie de disparition. La culture *in vitro* permet ainsi de conserver en un endroit réduit plusieurs dizaines d'espèces d'origines et de milieux différents.



*Dionaea muscipula* Ellis.,  
origine : Caroline.



*Darlingtonia californica* Torr.,  
origine : Californie.



*Heliophora nutans* Benth.,  
origine : Guyana.



*Sarracenia flava* L.,  
origine : Floride, Louisiane



*Nepenthes kashiana* Hook.,  
origine : Assam.



*Pinguicula moranensis* HBK.,  
origine : Mexique.



*Pinguicula gypsicola* Brandg.,  
origine : Mexique.



*Drosera capensis* L.,  
origine : Afrique du Sud.



*Drosera adelae* F. Muell.,  
origine : Nord Australie.



*Drosera gigantea* Lindl.,  
origine : Ouest Australie.



*Drosera filiformis* Ral.,  
origine : USA.



*Drosera natalensis* Diels.,  
origine : Afrique du Sud.



*Drosera peltata* Sm.,  
origine : de l'Inde au Japon.



*Drosera rotundifolia* L.,  
origine : Belgique.



*Drosera pygmaea* DC.,  
origine Nouvelle Zélande.

# CULTURE *IN VITRO*

## MULTIPLICATION D'ESPÈCES DIFFICILES À OBTENIR PAR DES MÉTHODES TRADITIONNELLES.



*Psychopsis papilio* (Lindl.) H. Jones,  
origine : Guyane.



*Phalaenopsis* hybride.



*Vanda* sp., origine : Asie du  
Sud Est.

Les travaux de Knudson dans les années 1940, ont ouvert une ère nouvelle dans la culture des Orchidées.

Les Orchidées botaniques, ou non (hybrides) ont des **taux de germination naturel très faible** (1 à 2 plantes pour un million de graines).

**La méthode des semis *in vitro*** dans un but de multiplication est d'application la plus facile. Elle permet d'avoir un pourcentage de germination très élevé (90%). La sauvegarde et le repeuplement de certaines espèces en voie de disparition ou rares est à présent possible.

Les graines sont semées sur un milieu de culture solide. Elles germent en donnant des **protocormes**. Les protocormes sont des structures peu différenciées directement issues du développement naturel de l'embryon des graines d'orchidées.

La production procède par la division de protocormes, chaque partie régénérant un nouveau protocorme en quelques semaines.



Semis de graines d'orchidées.



Rebeck



Formation de protocormes à partir d'un semis *in vitro* de *Catasetum barbatum* (Lindl.) Lindl., origine : Guyane.



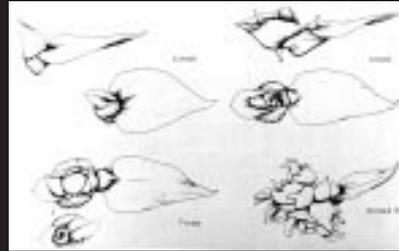
Organisation microscopique d'un protocorme.



Protocorme d'*Ansellia africana* Lindl.,  
origine : Afrique tropicale.

Par ailleurs, cultivés sur un milieu approprié et en présence de cytokinines, des protocormes peuvent être formés à partir de nombreux explants tels que :

- des jeunes feuilles (Cattleya, Epidendrum, Phalaenopsis, ...)
- des jeunes inflorescences (Vascostylis, Neostylis, ...)
- des boutons floraux de l'inflorescence (Vanda, Dendrobium, Phalaenopsis, Oncidium, Epidendrum, ...)
- des méristèmes : dans ce cas, les clones seront assainis (plantes exemptes de virus et/ou de bactéries).



Chaque protocorme néoformé évolue ensuite en une nouvelle plantule. La présence d'une autre hormone végétale (l'acide gibbérellique) favorise la germination des protocormes et l'élongation des tiges.



Lorsque les jeunes plantules présentent 3 à 4 feuilles et une taille de 5 à 7 cm (après 3 à 6 mois de culture selon l'espèce), elles sont transférées dans un pot contenant un substrat horticole pour Orchidées.



Par la technique in vitro, on peut obtenir un grand nombre de plants identiques (mériclones) qui sont d'une qualité sanitaire irréprochable. Ainsi, les Orchidées sont passées au premier rang des plantes horticoles micropropagées.



Angraecum sesquipedale  
Thouars, origine : Madagascar.



Rodriguezia lanceolata  
Lodd., origine : Guyane.



Sobralia violacea Lind.,  
origine : Vénézuéla.