

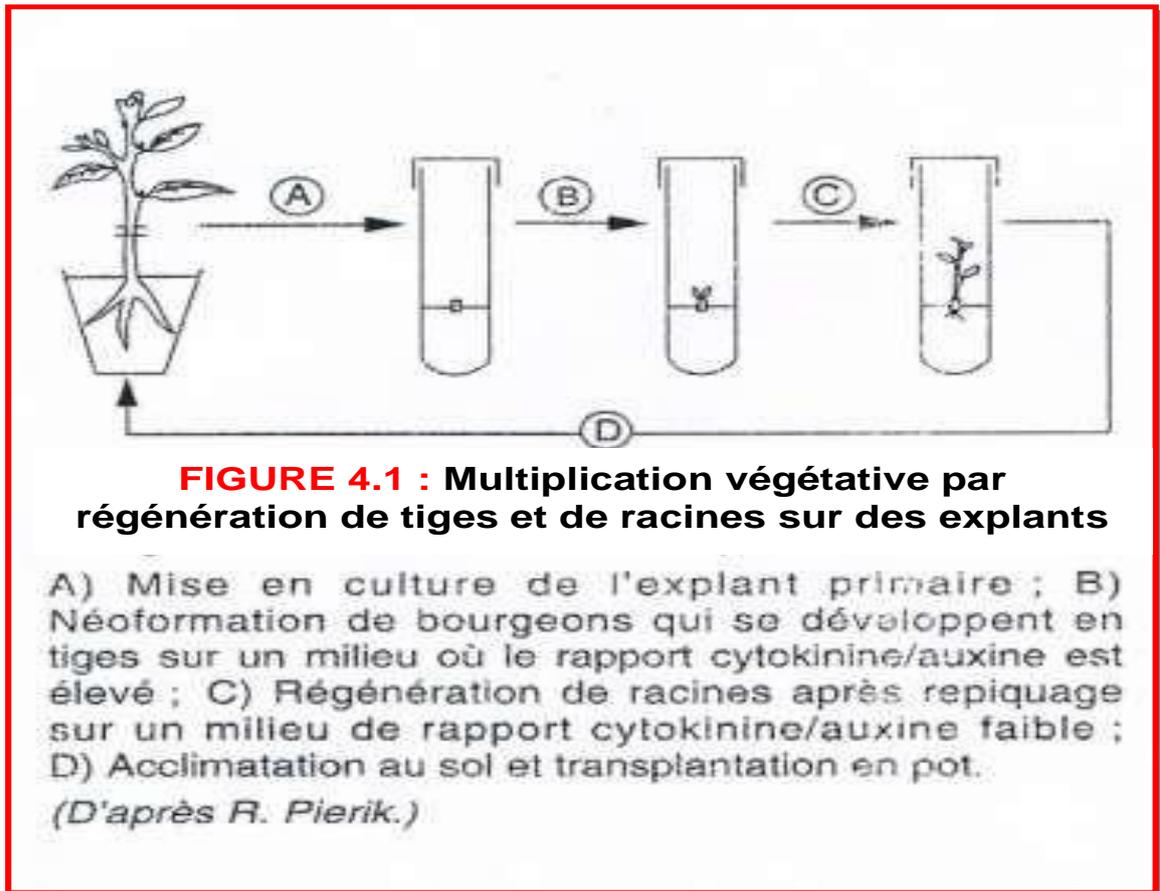
# **Chapitre IV :**

## ***Les techniques de la culture in vitro***

## Chapitre IV : Les techniques de la culture *in vitro* :

### 4.1. 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 (*voir 2.1.1*). 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. 4.1*), soit par la formation d'un massif cellulaire inorganisé, le *cal*, au sein duquel la compétence organogène apparaît plus tardivement (*fig. 4.1*).

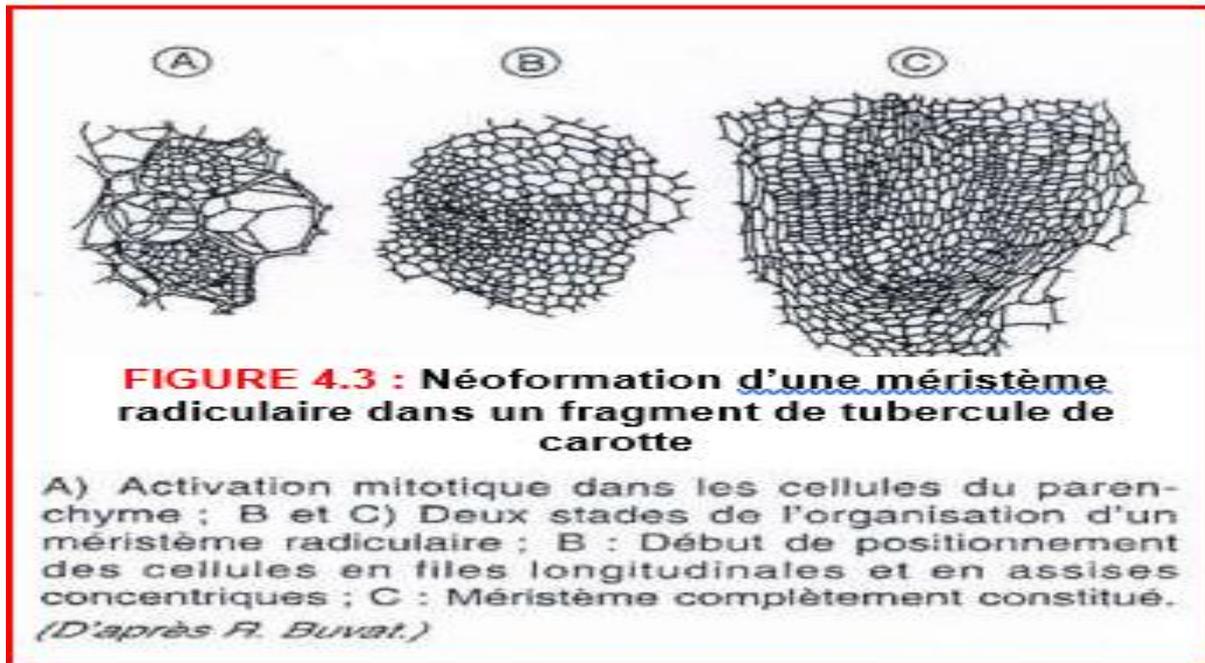


#### **4.2 – Néof ormation directe de tiges et de racines adventives :**

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 en faveur de l'auxine, pour assurer l'engraissement.



### 4.3. La néoformation des racines adventives



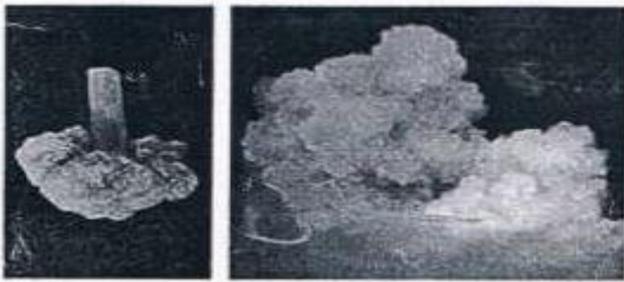
La culture in vitro d'explants végétaux exploite donc des potentialités morphogènes masquées au cours du développement du végétal ; de nouveaux méristèmes sont formés à partir de cellules différenciées, sous l'influence des **régulateurs de croissance**. Le programme qui se met en place consiste d'abord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

### 4.4. Formation de cal, organogenèse différée et embryogenèse somatique

Dans certains cas, la culture d'un explant conduit d'abord à la formation d'un cal (fig.4.4). **L'induction calogène** 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 4.5). 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.4.6):

- **Soit l'entretien** par fractionnement en éléments plus petits, repiqués sur un nouveau milieu solide (fig.4.6). 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 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

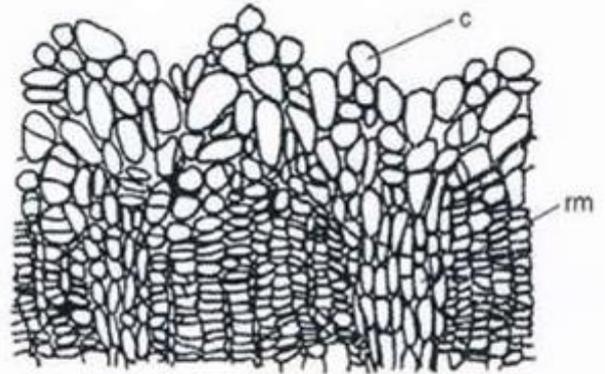
parle alors de souche anergiée). Les raisons de cette accoutumance sont inexplicées : s'agit-il de mutations ou de changements épigénétiques ?



**Fig 4.4** : Formation d'un cal sur un fragment de tige cultivé in vitro.

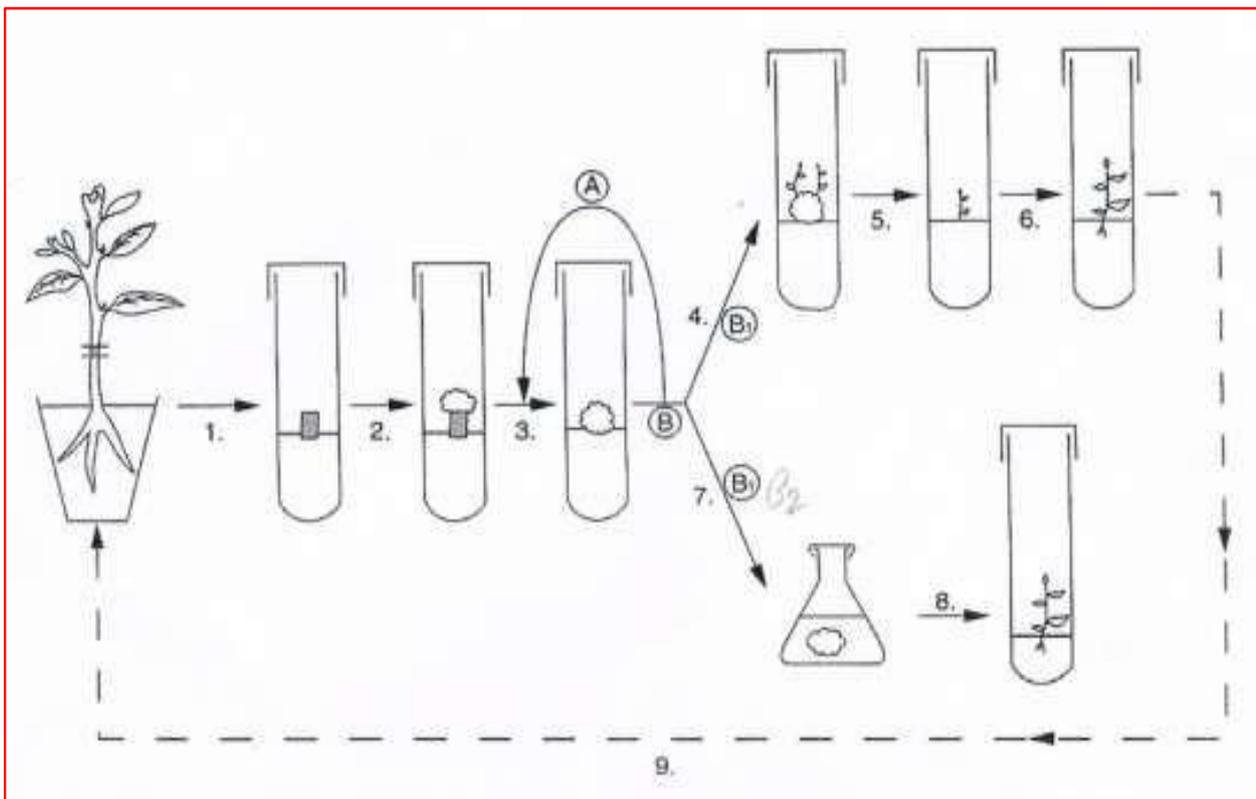
A) Cal sur un fragment de tige de Fenouil (culture à la lumière en présence d'AIB à une concentration de 1 mg/L) ; B) Culture du cal en présence de lumière et de 2,4-D à la concentration de 1 mg/L : le tissu primitif, à gauche, a donné naissance à une colonie embryogène blanche.

(Reproduit de G. Hunault, *La culture in vitro des tissus de Fenouil (Foeniculum vulgare Miller). Premières observations sur le comportement des explants primitifs et des cals.*



**Fig 4.5** : Schéma de la structure histologique d'un cal formé sur un tissu cambial d'Erable en culture.

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



**FIGURE 4.6:** 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 B<sub>1</sub>), soit par culture du cal en milieu liquide agité (7), formation d'embryons somatiques qui se développent en plantules (8) (voie B<sub>2</sub>). 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 vitro-venants. Il est donc nécessaire de contrôler la qualité génétique des plantes obtenues.

#### **4.5. 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. (Avantage = Rendement).

On peut prélever le dôme apical seul, le dôme apical accompagné de quelques primordiums ou d'ébauches (*fig. 4.7*) ou l'apex entier. L'expiant est alors déposé sur un milieu de culture solide (*fig. 4.8A*). 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'expiant. 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. 4.7B, C*). Les cytokinines peuvent aussi favoriser le développement de nombreux bourgeons axillaires qui sont alors repiqués individuellement sur des milieux d'enracinement (*fig. 4.7B, C*).

#### **4.6. Les applications de la culture de méristèmes et de bourgeons concernent :**

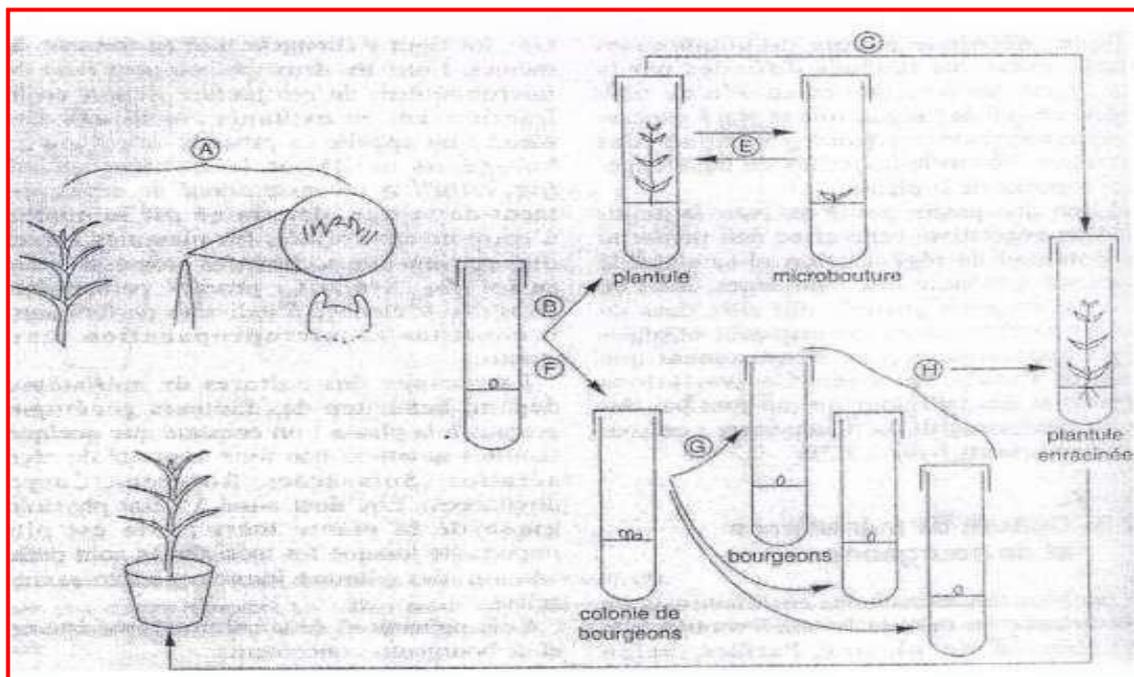
- **La régénération de plantes saines** à partir de plantes atteintes par des agents pathogènes. Les maladies à virus sont en effet responsables de pertes considérables pour certaines cultures, et, malgré les progrès des connaissances en virologie, on ne possède pas encore de méthodes de lutte efficaces 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 nombreuses espèces herbacées (Pomme de terre, Trèfle, Tabac, Œillet).



**FIGURE 4.7:** *Méristème d'Œillet avec deux ébauches foliaires, préparé pour la mise en culture*

(Gr. x 65).

(Cliché M. Galeme)



**FIGURE 4.8:** *Culture de méristèmes : Différentes phases de la micro-propagation.*

- 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 micro-boutures (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 micro-propagation avant transplantation; stockage par cryoconservation ou conservation en chambre froide) ; **H**) Développement des plantules et enracinement avant transplantation en pot (D). Iris, Chrysanthème et ligneuses (Cerisier, Pommier, Framboisier, Groseiller, Forsythia et vigne).

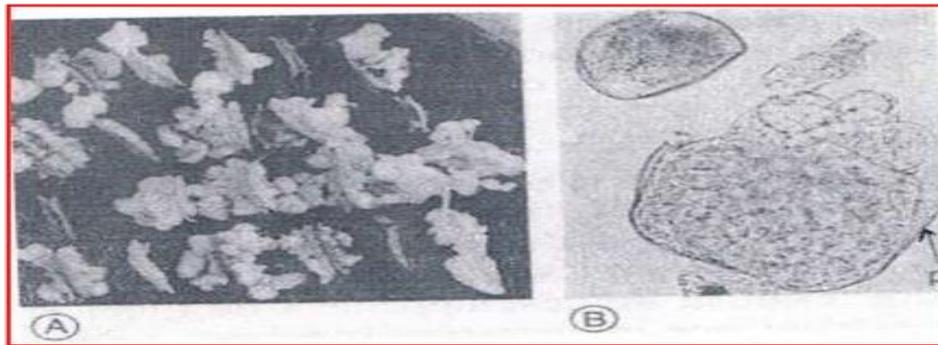
#### **4.7. Culture d'embryons :**

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 collinaire.

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 embryogène peut apparaître à la surface ou à l'intérieur de calcs de différents tissus (voir 4.4), 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.

#### **4.8. Androgenèse et plantes haploïdes:**

Dans le cas de l'androgenèse (formation d'embryons somatiques par culture d'anthers ou de pollen ; *fig. 4.9*), 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. 4.10, II*) ou bien comme dans les microspores normales à un noyau végétatif et un noyau reproducteur (*fig. 4.10, 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). Le grain de pollen gamétophyte dont l'évolution est programmée - subit une induction qui entraîne son retour au stade potentiellement embryon flaire

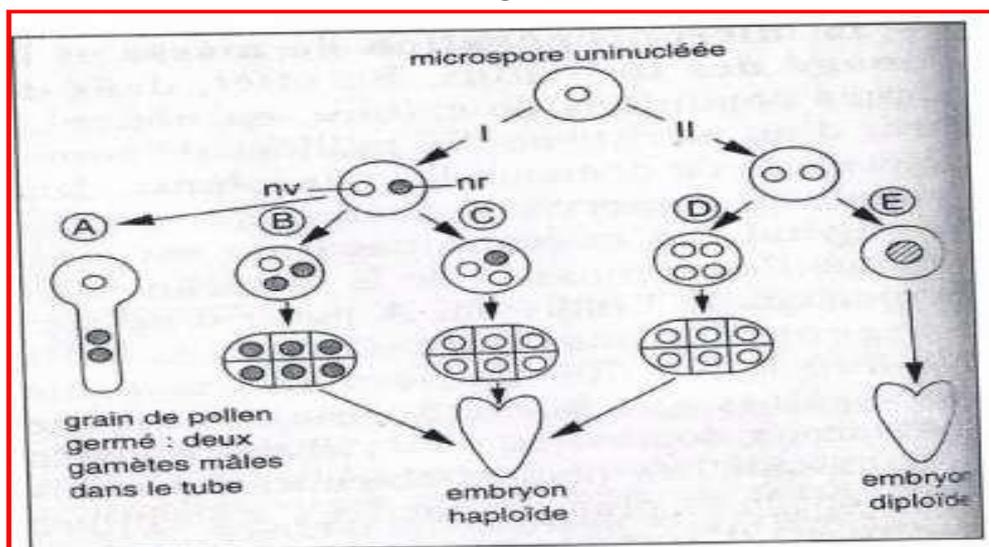


**FIGURE 4.9: Androgenèse chez le Maïs**

**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. x280).

(Cliché P. Vergne, C. Dumas)



**FIGURE 4.10 : Développement d'une microspore uninucléée :**

**Différentes voies possibles 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 diviser, on obtient un embryon androgénétique haploïde (**D**), mais s'ils fusionnent, c'est un embryon androgénétique diploïde (**E**) qui se forme.

#### **4.9. La gynogenèse:**

Dans ce cas, les plantes haploïdes sont obtenues par développement des cellules du sac embryonnaire. -Contrairement à l'androgenèse - 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 toute fois que cette technique est actuellement restreinte à un petit nombre d'espèces.

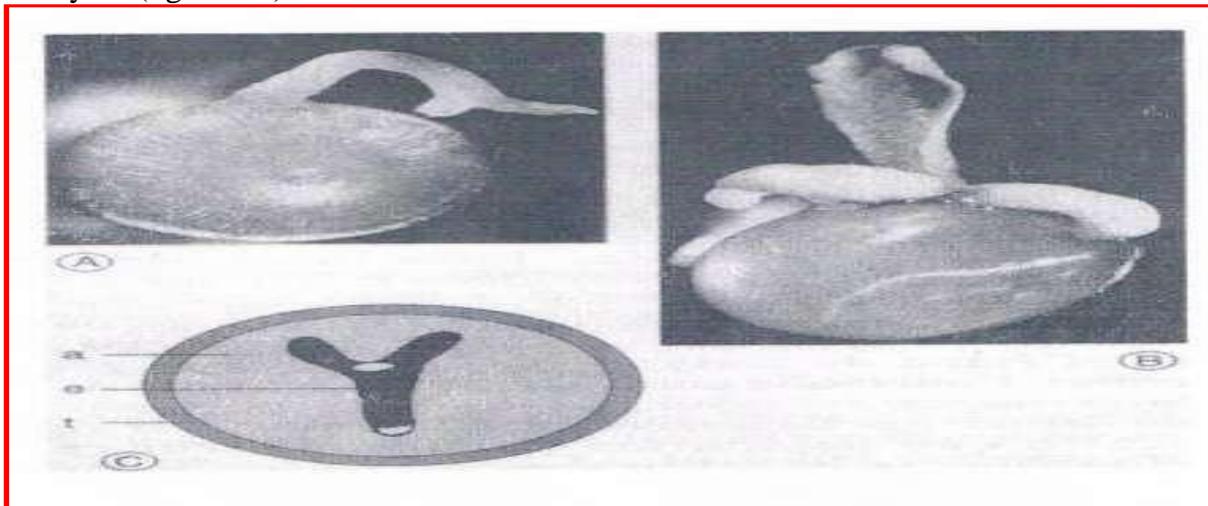
D'autres cas d'embryogenèse somatique concernent le développement d'embryons diploïdes dans des cultures de cellules issues de l'appareil reproducteur femelle (ovule, nucelle, de génotype identique à la plante mère), ou de l'embryon lui-même (seul ou accompagné du suspenseur et de génotype zygotique).

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.

#### **4.10. Les 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 cyto-culteur (bioréacteur) à partir de cals dissociés ou de protoplastes. 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. 4.11C) 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.4.11A). 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. 4.11B).



**FIGURE 4.11: Semences artificielles.**

A) Germination d'un embryon somatique de Carotte enrobé dans l'alginate (Gr. x 7,5).

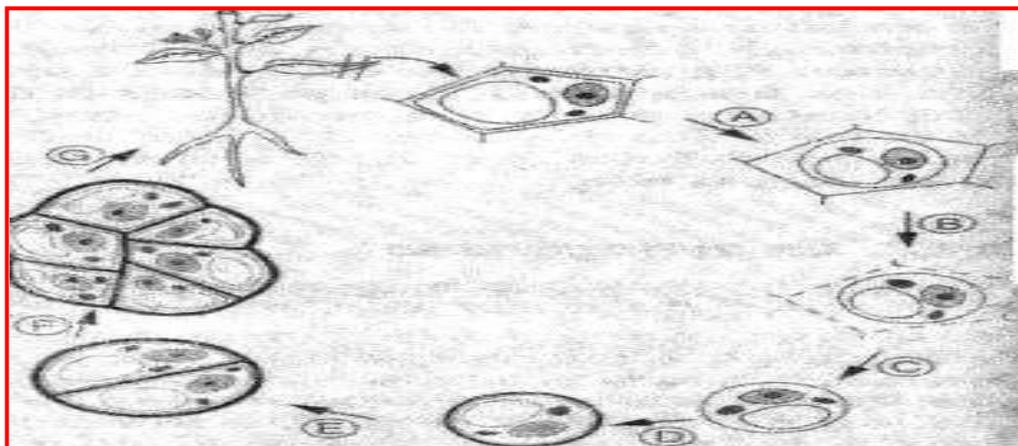
B) Germination d'un embryon somatique de Poirier après traitement par l'azote liquide, réchauffement et culture de 30 jours sur un milieu gélosé (Gr. x 7,5)

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 decalcium).

### **3.. 4.11. Culture de protoplastes et hybridation somatique:**

#### **4.. 4.11.1 Isolement et culture des protoplastes:**

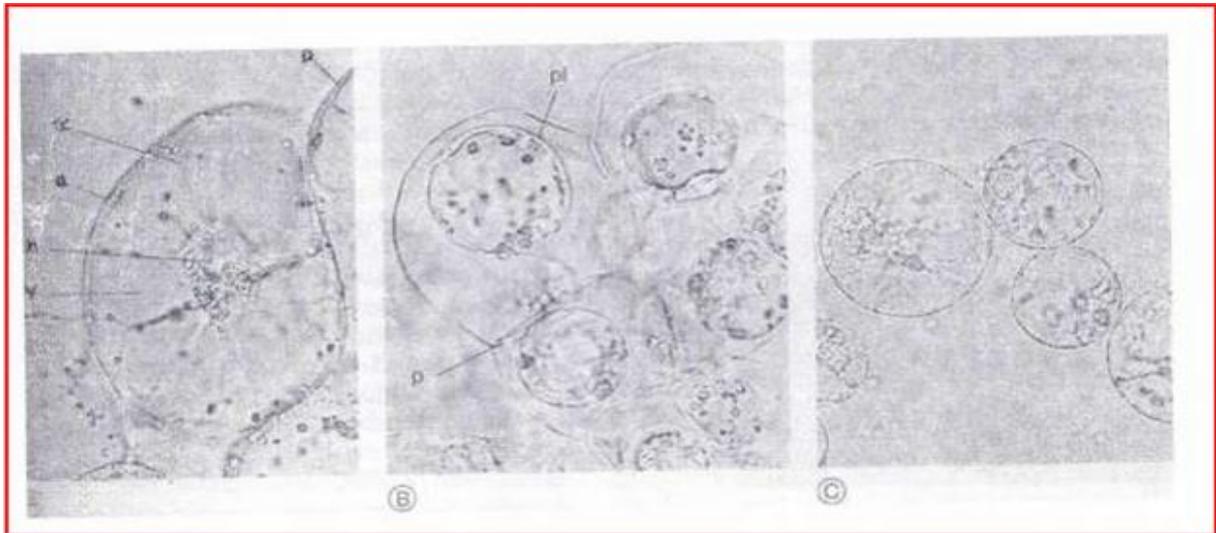
Ces cellules végétales dépourvues de paroi peuvent être obtenues soit à partir d'organes de plantes (*fig. 4.12*), soit à partir de suspensions cellulaires (*fig.4.13*). La suppression de la paroi et le maintien en vie des cellules nues ne peut se faire que si le milieu extérieur est hypertonique par rapport au milieu vacuolaire afin d'éviter une entrée d'eau qui conduirait à leur éclatement.



**FIGURE 4.12 : Isolement et culture de protoplastes.**

A) Plasmolyse du parenchyme foliaire excisé;

**B)** Digestion enzymatique des parois, **C)** Isolement des protoplastes par centrifugation ; **D)** Culture en milieu hypertonique : reformation de la paroi en quelques heures, **E)** Première division après quelques jours de culture; **F)** Formation d'un micro cal au bout de quelques semaines, **G)** Régénération d'une plante entière au bout de quelques mois.



**FIGURE 4.13 :** Isolement de protoplastes à partir de suspensions cellulaires de *Cathartus roseus*.

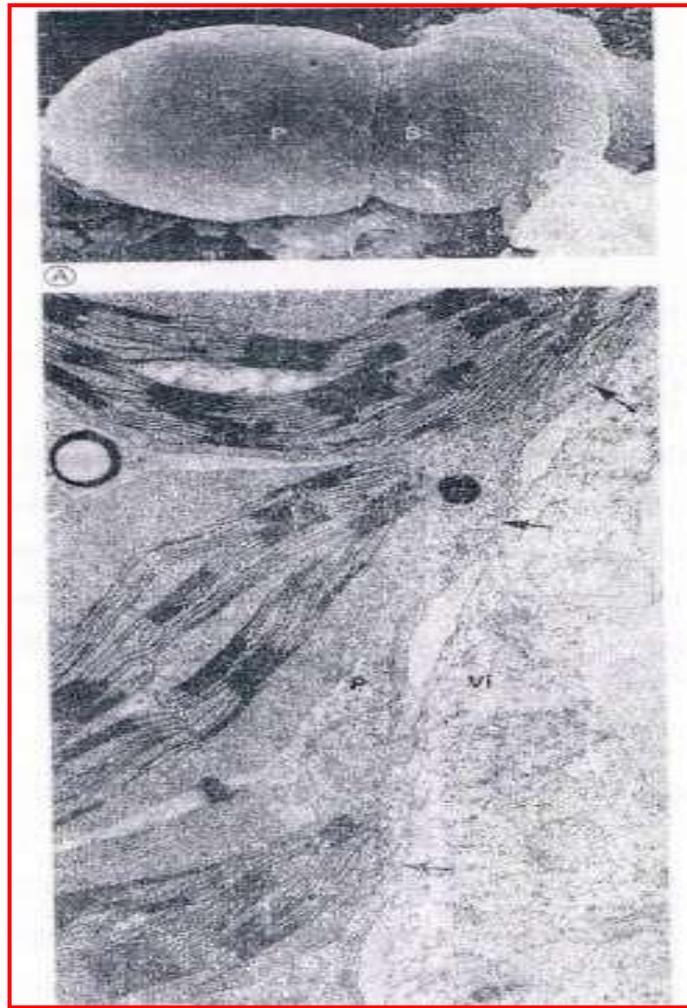
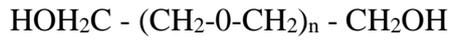
**A)** cellules d'un microcal, **B)** Cellules plasmolysées par du sorbitol 1M, encore associées par leur paroi, p; **C)** protoplastes isolés après digestion enzymatique des parois ('Gr. x 850). a, amyloplaste ; n, noyau, p, paroi ; p1, plasmalemmes ; tc tractus cytoplasmique; y, vacuole.

(Cliché C. Gazeau)

#### 4.11.2. Méthode de fusion des protoplastes :

La fusion des protoplastes implique la formation de ruptures membranaires réversibles. Si la fusion des protoplastes dérive 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 polyvniélique et le polyéthylène glycol, PEG, dont la formule est la suivante :



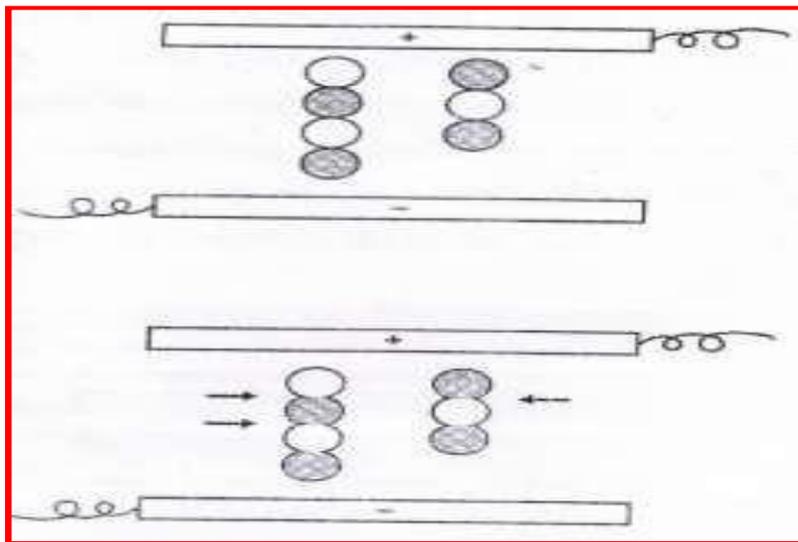
**FIGURE 4.14 :** Fusion de protoplastes (méthode chimique)

**A) Vue en microscopie à balayage de deux protoplastes agglutinés après traitement par le PEG. P, protoplaste de feuille de Pois ; S, protoplaste de cellule de Soja en, culture (Gr. X1 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).**

Les protoplastes d'origine différente mis à incuber dans une solution de PEG enrichie en ions  $\text{Ca}^{2+}$  s'agglutinent (*fig 4.14*): 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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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.

Avec la méthode électrique (**électrofusion ou électroporation**), les protoplastes, en suspension dans une solution hyperionique de Force ionique faible, sont soumis à un champ électrique de l'ordre de  $200 \text{ V.cm}^{-1}$  créé par un courant alternatif non uniforme qui passe entre deux microélectrodes parallèles très rapprochées (de 0,2 à 1 mm). Ils se comportent alors comme des dipôles, migrent dans la suspension et tendent soit à s'agréger autour des électrodes soit à se disposer entre celles-ci en suivant les lignes de champ selon le phénomène de diélectrophorèse (fig 4.15) . Le contact étroit qui s'établit entre les cellules ne dure pendant le temps d'application du champ : il conduit à la formation de chapelets de cellules. La fusion cellulaire proprement dite est obtenue dans une seconde étape lorsqu'une ou plusieurs impulsions brèves (quelque us) d'un courant continu d'intensité élevée (de l'ordre du  $\text{kV.cm}^{-1}$ ) sont appliquées.

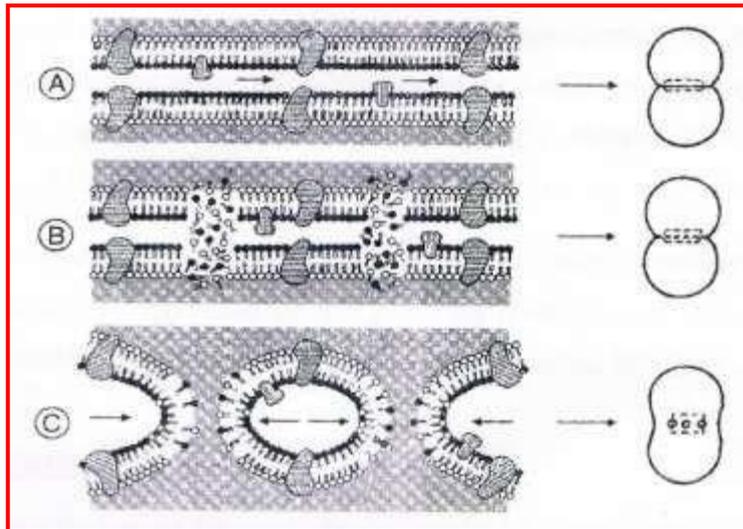
C'est ce **choc électrique** qui provoque la fusion; celle-ci s'opère de façon rapide (quelques minutes) et intervient de manière pratiquement synchrone dans les cellules agglutinées. La suspension de protoplastes fusionnés est alors reprise dans un milieu de culture. Des méthodes se sont développées pour induire les électrofusions à grande échelle et le rendement obtenu est généralement excellent (de l'ordre de 80%).



**FIGURE 4.15** : Hybridation somatique par électro-fusion: les deux étapes de la technique.

**A) Diélectrophorèse:** l'application du champ électrique entraîne l'agréation des protoplastes entre les électrodes de 0,2 à 1 mm; ils se comportent comme des dipôles et forment des "chaines de perles"

**B) le choc électrique** provoqué par une ou plusieurs impulsions brèves conduit à la fusion cellulaires dans les agrégats (flèches).



**FIGURE 4.16 :** *Représentation schématique d'un mécanisme possible de fusion membranaire par la méthode électrique.*

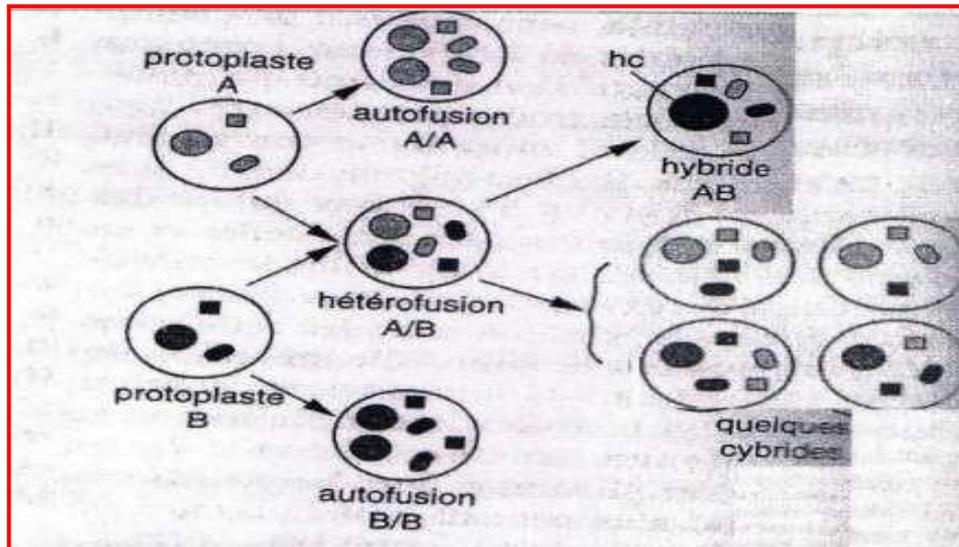
- A) L'application du courant alternatif entraîne l'accolement des membranes de protoplastes adjacents et la formation de domaine purement lipidiques.**
- B) A la suite du choc électrique, création de pores dans la zone de contact membranaire : deux pores sont représentés.**
- C) Des ponts de phospholipides se forment entre les deux bicouches opposées (flèches); la continuité cytoplasmique est ainsi établie entre les cellules: formation du produit de fusion.**

#### **4.12. Hybridation somatique :**

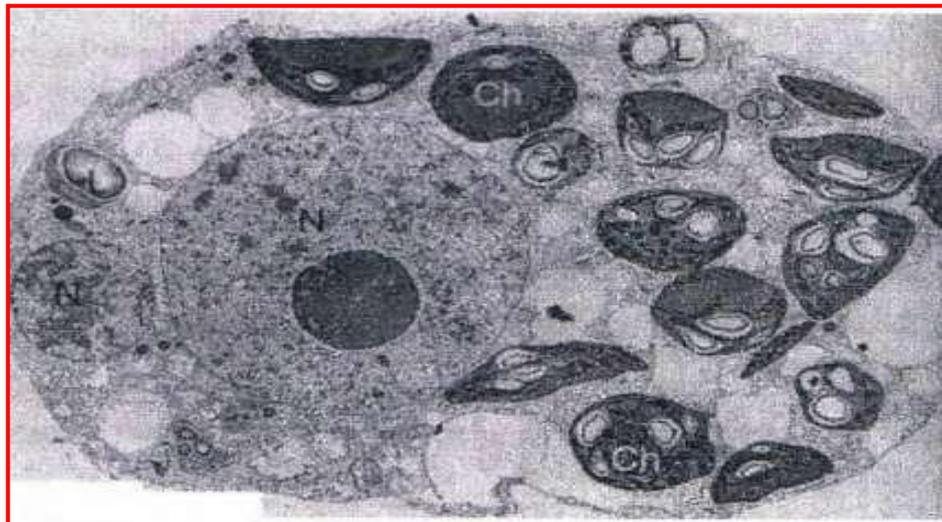
La possibilité de faire fusionner des protoplastes de types différents (issus de variétés de la même espèce ou même d'espèce différentes), et d'obtenir à partir de ces hybrides la même régénération des plantes entières a ouvert la voie à une nouvelle technologie qui permet d'additionner les génomes de deux cellules sans passer par la reproduction sexuée : c'est l'hybridation somatique. Isolé 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 : les autofusions résultent de l'union de deux protoplastes identiques (A/A ou B/B) ; les hétérofusiones correspondant à l'union de deux protoplastes différents (A/B). Celles-ci peuvent entraîner une addition totale des trois compartiments héréditaires, nucléaire, 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 les intermédiaires entre une addition totale et l'absence d'un des types : les cybrides sont donc très variés.

les produits d'hétérofusion 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.

Ils peuvent générer les plantes entières de la même manière que les protoplastes isolés, et avec le même faible rendement. De nombreux hybrides somatiques ont cependant été obtenus à partir de Solanacées entre espèces différents du même genre mais aussi entre genre différents (exemple ; Pomme de terre x tomates).



**FIGURE 4.17 :** Diversité des produits d'une hybridation somatique. Hc, hétérocaryon résultant de la fusion des noyaux de A et de B



**FIGURE 4.18 :** 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)

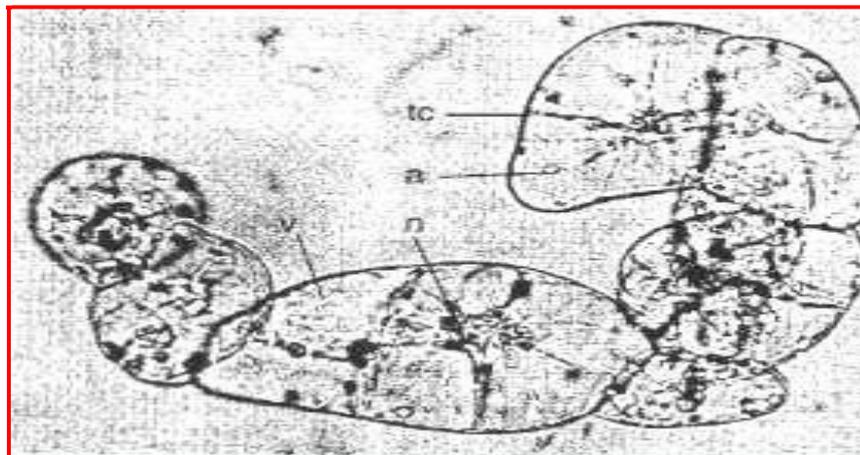
### **4.13. Culture de cellules**

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. 4.12) ; 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.

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.



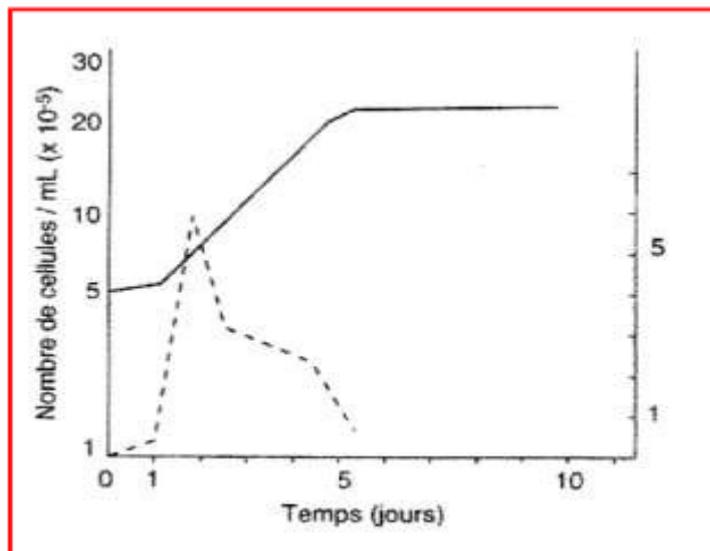
**FIGURE 4.19** : Microcal dans une culture de cellules

*Catharanthus roseus*

a, amyloplaste ; n, noyau ; tc, trabécule cytoplasmique ; v, vacuole (Gr. X800)

(Cliché C. Gazeau)

L'étude de la prolifération des cellules en suspension a permis de montrer l'existence de trois phases (fig. 4.20) : 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 4.20 :** Croissance (\_\_\_\_\_) et évolution de l'indmitotique (-----) au cours du

**temps dans une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus* conditions d'entretien.**

Les applications particulières des cultures de cellules végétales - qui rejoignent celles des protoplastes - concernent l'amélioration des plantes et les biotechnologies. Une voie nouvelle pour l'amélioration des espèces est en effet ouverte grâce aux cultures cellulaires en 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 métabolites. Cependant, le problème de la régénération de plantes fertiles, on les caractères - sélectionnés sont exprimés et transmissibles, constitue une limite à l'utilisation de ces cultures. Dans le cadre des biotechnologies, l'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.

#### **4.11. 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.

## Résumé du quatrième chapitre

Les applications de la culture *in vitro* sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine de l'horticulture que dans celui de la recherche (notamment en amélioration des plantes et la création variétale), ou encore pour conserver la diversité variétale (Conservatoires) ou sauvegarder des espèces menacées. Parmi les applications de la culture *in vitro* de tissus et de cellules connues actuellement nous citons :

- Multiplication végétative ou micropropagation, Ex: culture de méristèmes d'orchidées (très dures à bouturer).
- Application industrielle, permet la multiplication clonale (à l'identique) d'un génotype sélectionné. Utilisé sur plus de 1000 espèces.
- Etude de l'embryogenèse somatique, embryon issu de cellule somatique
- Assainissement des plantes par culture de méristèmes Éradication des virus qui ne se propagent pas dans les méristèmes apicaux et racinaires.
- Micro-bouturage : par simple enracinement sur milieu de culture, augmente la rapidité et la fiabilité du processus de croissance.
- Production d'hybrides interspécifiques : cellules débarrassées de leur paroi par traitement enzymatique (cellulases), peuvent se diviser (suivant les conditions) et régénérer des plantes entières. A l'aide de cations, les protoplastes fusionnent pour donner un hybride interspécifique.
- Obtention d'haploïdes : les individus haploïdes (possédant un seul jeu de chromosomes) permettent de produire rapidement, par doublement chromosomique, des individus totalement homozygotes.
- Production de métabolites secondaires.