

## Chapitre I: Aspects fondamentaux de la multiplication végétative in vitro



La culture *in vitro*, peut être utilisée pour :

- Reproduire de façon identique, une espèce et la multiplier en grande quantité, et à moindre coût pour la mettre sur le marché dans les plus courts délais. On parle d'une micropropagation rapide ;
- Préserver des espèces anciennes et menacées, pour conserver la biodiversité ;
- Elaborer de nouvelles variétés de plantes plus rapidement ;
- Assainir des plantes virosées et conserver des plantes saines (Agnès *et al.*, 2013).





## 1. Micropropagation

- Elle apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de **100 à 1000** fois plus élevé et en un temps plus réduit (Ochette, 2005).
- La technique consiste à proliférer des **bourgeons axillaires** préexistants sur l'explant mère ➡ une parfaite garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours des repiquages successifs (Demol *et al.*, 2008).
- L'application de la technique de la micropropagation des plantes ligneuses ; fruitiers, forestiers et d'ornement permet l'amélioration de leurs capacités d'enracinement notamment sur le porte greffe reconnue difficile.
- ce système de production de semences représente sans nul doute une alternative intéressante et efficace pour constituer rapidement un **stock de matériel de qualité sanitaire irréprochable**.
- Il peut être aisément intégré dans le cadre d'un approvisionnement en plants de base de haute qualité destiné à la production de **semences certifiées** (Changins, 2011).

## Le repiquage



(1)



(2)



(3)



(4)

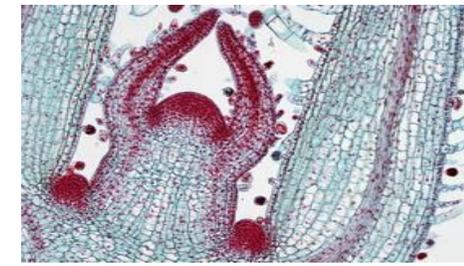


(1): mise en culture des explants sur un milieu nutritif gélosé.

(2): repiquage des explants dans un nouveau milieu de culture une fois le système racinaire et aérien est développé.

(3): un second repiquage des plants

(4): acclimatation des nouvelles plantules dans une serre.



## 2. Culture méristématique

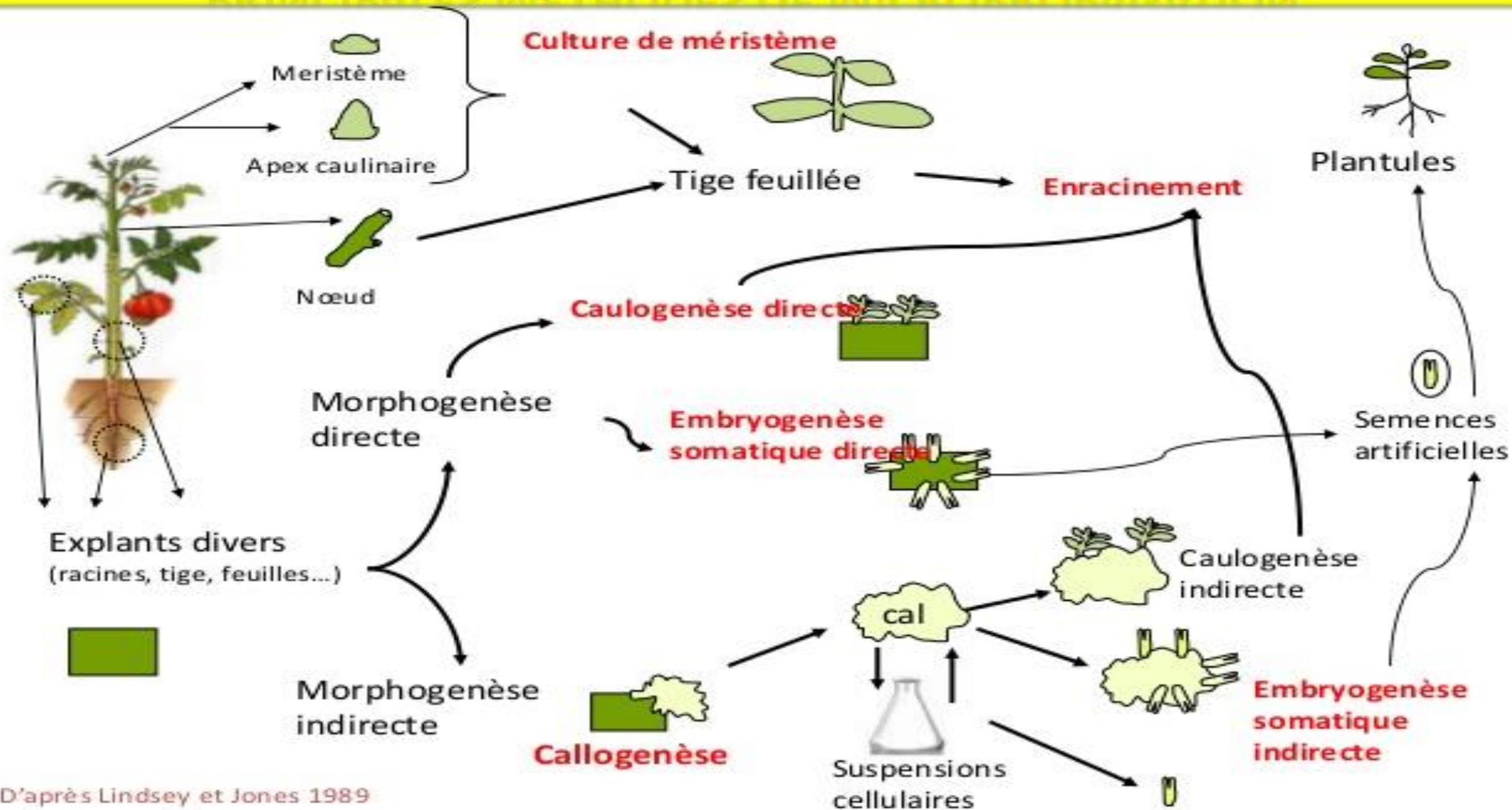
- Les méristèmes sont des tissus de formation, en expansion continue, confèrent à la plante une organogenèse permanente chez les végétaux supérieurs.
- Des petits massifs de cellules indifférenciées (0,1 mm à 0,5 mm), ont la capacité de se diviser activement, ils gardent jusqu'à leur mort le caractère juvénile.
- Elles jouent un rôle capital, car elles édifient tous les organes (Margara, 1989 ; Zryd *et al.* 1988).
- La culture de méristème est la méthode la plus généralisable et la plus sûre pour éviter l'apparition de plantes non conformes à la plante mère ou variants (Saadi, 1991).
- En multipliant le méristème prélevé au sommet d'une plante ou dans le bourgeon axillaire, le plus souvent indemne de maladies. On pourra très rapidement obtenir de nombreuses plantes, toutes semblables du point de vue génétique et débarrassées de maladies dont elles étaient affectées (Sama *et al.*, 1998)

- En conditions aseptiques et sous une loupe binoculaire, le dôme du méristème (partie centrale du bourgeon) est prélevé et placé en milieu artificiel.
- Selon les objectifs, le milieu de culture est modifié périodiquement, afin d'aboutir à un jeune plant.

➔ La culture méristématique permet donc, d'obtenir une plante identique à la plante initiale. Lorsqu'une plante est atteinte par un virus ou une bactérie, les méristèmes restent indemnes, car ils ne sont pas encore infectés du fait que leur multiplication est plus rapide que la prolifération des virus pathogènes. La culture de cette structure aboutit alors à une plante saine (Agnès *et al.*, 2013 ; Schmid et Keller, 1984 ; Sama *et al.*, 1998).



# PRINCIPALES MÉTHODES DE MICROPROPAGATION



### 3. Facteurs de régénération et de croissance

Les facteurs influençant sur la *régénération in-vitro* peuvent être répartis en deux groupes :

1- Les facteurs internes, liés à la plante : concerne d'une part le **génotype**, la **nature** et l'**âge ontogénique** de l'explant et d'autre part l'**état physiologique** de la plante mère sur laquelle, l'explant a été prélevé ;

2- Les facteurs externes qui englobent, les milieux de cultures (notamment leur composition en régulateurs de croissance et les sucres) et les conditions de la mise en culture.



### 3.1. Effet de l'explant

Un des atouts majeurs de la culture *in-vitro* est de montrer que, les cals pouvaient produire soit des **embryons somatiques**, soit des **bourgeons** et dont le développement permet de régénérer des **plantes conformes** à la plante mère. Pratiquement, n'importe quel organe (bourgeon, racine, feuille, anthère, etc.) ou fragment d'organe (explant), prélevé sur celle-ci, peut être cultivé isolément sur **milieu nutritif synthétique**, mais le choix de celui-ci est d'une importance primordiale. On retiendra cependant que la réponse *in-vitro* est sous la dépendance de nombreux facteurs (Saadi et Hamdani, 2007):

- ✓ **L'âge physiologique et ontogénique de l'organe:** les explants les plus jeunes sont les plus privilégiés
- ✓ **L'époque du prélèvement:** ce problème se pose plus pour les plantes vivaces!!!!
- ✓ **La taille de l'explant:** elle varie selon la nature de l'explant (en entier si l'organe est reproducteur, un fragment de 5 à 10 dans le cas d'un organe différencié).



### 3.1.1. L'âge physiologique et ontogénique de l'organe

Généralement dans les cultures *in vitro*, les explants les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) sont les plus privilégiés. Leur état juvénile favorise plus de possibilités de régénération. (Vidalis *et al.*, 1989). Souvent, ce sont les tissus provenant d'embryons qui expriment le plus souvent, d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à la régénération, suivis de loin par les cotylédons (Saadi et Hamdani, 2007).

### 3.1.2. L'époque du prélèvement

Ce problème se pose surtout pour les espèces vivaces, on peut distinguer un stade de vie active et un stade de vie ralentie de la plante ce qui conduit les explants à développer des réactions différentes en culture in-vitro. Cette différence peut être expliquée par la modification des équilibres internes des régulateurs de croissance (auxines, cytokinines, gibbérelline ...) lors des différentes saisons (Vidalis *et al.*, 1989).

### 3.1.3. La taille de l'explant

Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes. La taille choisie variera selon la nature de l'explant. Si l'explant est de nature reproducteur, le prélèvement devrait engendrer l'organe en sa totalité (un nœud, un apex, ou un bourgeon entier). mais dans le cas d'un tissu différencié (feuilles, tige, racines, inflorescence...) des fragments de 5 à 10 mm suffiront (Vidalis *et al.*, 1989; Saadi et Hamdani, 2007).

D'une manière générale, il existe des tissus privilégiés appelés «**tissus cibles**» qui répondent à un stimulus indicateur qui orientera son programme morphogénétique vers une voie particulière de développement, contrairement à certains tissus récalcitrants aux manipulations in-vitro, dues essentiellement à un manque de compétence cellulaire (Webb *et al.*, 1989; Wheeler *et al.*, 1985).

## 3.2. Effet du génotype

- La plupart des plantes montrent une régénération génotypique spécifique liée à l'espèce. A l'intérieur d'une même espèce, un génotype donne des bourgeons tandis qu'un autre ne peut fournir que des embryons (Boxus, 1995).
- Plusieurs auteurs mentionnent que seulement certains génotypes paraissent posséder la capacité de fournir des embryons somatiques (Soltener, 2005). Cette technique semble être génotypiquement contrôlée (Isac et *al.*, 1994 ; Vidalis et *al.*, 1985 ; Caraglio, 2012). Et elle permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforestières,... (Bretaudeau, 2006).
- Chez la pomme de terre, cette technique est actuellement utilisée pour la production de semences de base.



### 3.3. Effet du milieu de culture

- Avec le développement des cultures de tissus, divers milieux de base comprenant des sels inorganiques, des composés organiques (sucres, vitamines et régulateurs de croissance) ont été progressivement utilisés. Ils doivent être adaptés aux besoins nutritifs de la plante soumise à l'étude, afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique.
- Les principaux constituants d'un milieu de culture sont représentés par : les macro et les microéléments, les sources carbonée et azotée, les vitamines et régulateurs de croissance (Vidalis et *al.*, 1989).
- Dans **70%** des cultures, le milieu Murashige et Skoog (MS) est utilisé comme milieu de base pour tout type de culture in vitro. Ce milieu est essentiellement conseillé pour le déclenchement de l'organogenèse, en particulier pour la néoformation de bourgeons, il s'est révélé nettement supérieur à d'autres milieux (Margara, 1989).



### 3.4. Les régulateurs de croissance

- appelé également «phytohormone», une substance qui, suivant sa concentration absolue ou relative dans le milieu, peut supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de différenciations (Vidalis et *al.*, 1989).
- L'induction d'embryons somatiques et la formation de plantules sont très sensibles aux conditions de cultures dont principalement la composition hormonale du milieu. Le développement in vitro d'espèces végétales dépend essentiellement des taux d'auxines et de cytokinines (équilibre hormonal) (Staristky et Van Hassel, 1980).
- L'influence de ce rapport hormonal n'est cependant, pas une règle générale pour toutes les espèces végétales. En effet, il suffit, dans certains cas, de modifier la concentration de l'un des régulateurs pour parvenir à une réponse morphogénétique (Dalvesco et Guerra, 2001).

➤ Par ailleurs, il est important de dire, en se basant sur la diversité des réponses obtenues dans ce domaine, qu'il n'existe pas de règle générale, concernant l'efficacité des différentes auxines et cytokinines sur la caulogenèse ou sur la rhizogenèse. Les effets paraissent varier essentiellement avec le matériel végétal employé. Il est utile de rappeler, que les auxines les plus souvent utilisées en organogenèse ou en embryogenèse somatique sont le 2.4-D, l'AIA, l'AIB et l'ANA. A cause de son bon pouvoir inducteur, le 2.4-D semble détenir, le record d'utilisation dans les études portant sur l'embryogenèse somatique ; puisque 57 % des travaux de recherche l'utilisent comme régulateur. Quant aux cytokinines, elles sont représentées par la Kinétine, la benzyladenine (BA), la 2-isopentenyladénine et la zéatine (Vidalis et *al.*, 1989).