

Chapitre II: les différentes techniques de la culture in vitro



Quatre techniques principales exploitent la totipotence végétale en multiplication végétative:

- La **micropropagation**.
- La **régénération** par culture de méristèmes.
- La création de **semences** artificielles.
- Les cultures de **cellules** végétales pour la production de métabolites.

1. La micropropagation ou bouturage accéléré:

C'est la culture in vitro la plus largement utilisée, pour produire en un temps record un maximum de plants à partir d'une plante mère.

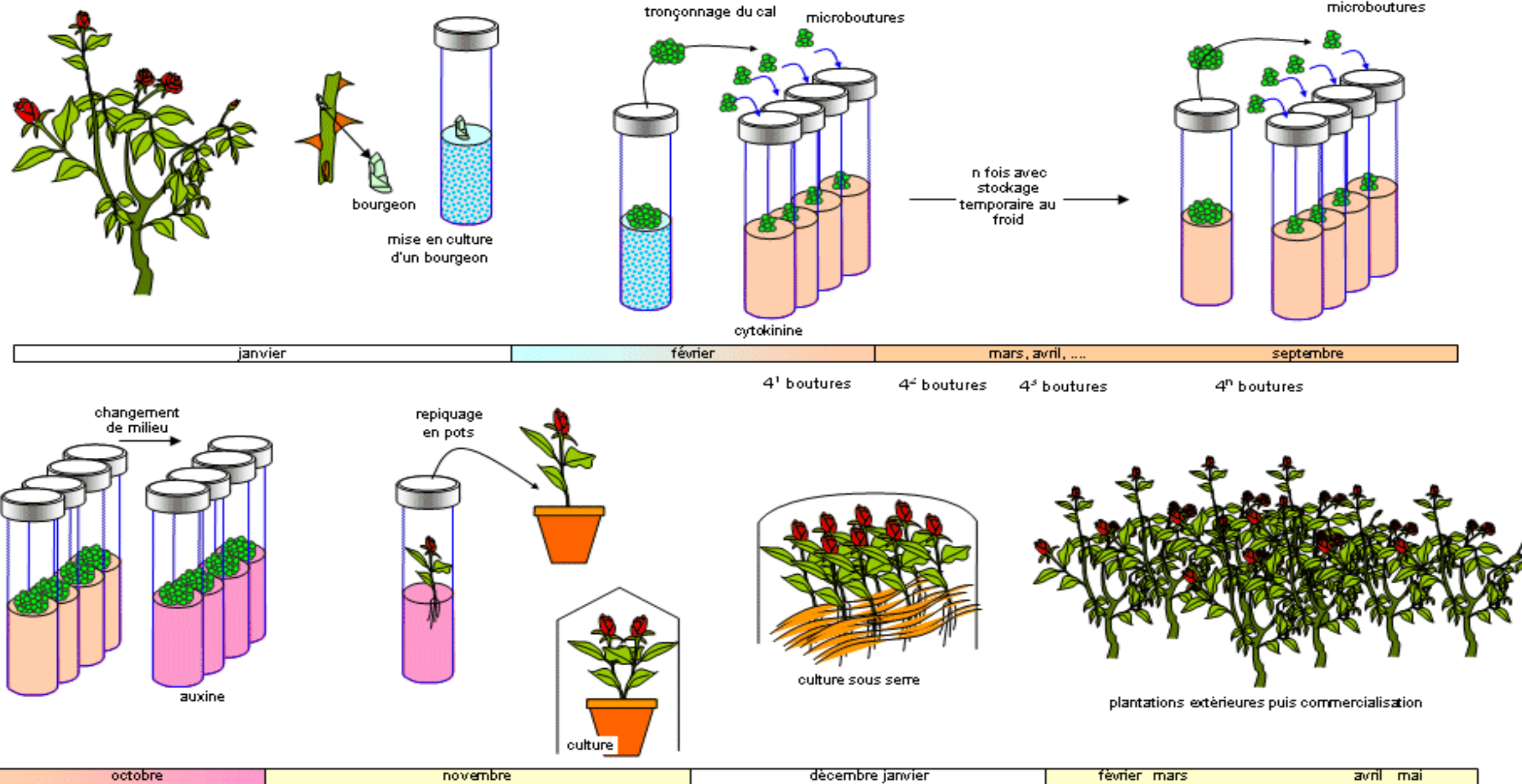
Principe: cette technique repose sur:

- le prélèvement d'explants riches en bourgeons ou en zones méristématiques  les feuilles (Ficus, Saint-paulia, Bégonia..), dans les tiges (Asperge, Colza, Rosier..), dans les bourgeons (Fraisier, Lierre, Vigne...), ou encore les inflorescences (Chou-fleur, Gerbera, Poireau..).
- La croissance et la multiplication in vitro, avec repiquages successifs et modification éventuelle des équilibres hormonaux.
- Le servage et le repiquage des boutures ou «vitro-plantes», d'abord en serre puis en pleine terre.

Intérêt: elle présente trois intérêts principaux:

- La production en masse de plants d'espèces à multiplication végétative: plantes **légumières** (Ail, Artichaut, Pomme de terre, Fraisier....); plantes **ornementales** (Rosier, Oeillet, Gerbera, Orchidée....); plantes **fruitières** et **forestières** (Vigne, Framboisier, Merisier...).
- Elle permet de s'**affranchir** à la loi des saisons (production continue) et des surfaces de multiplication (exemples 100 m² de laboratoire permettent d'alimenter des dizaines d'hectares de pépinière).
- L'**accélération** de la diffusion de **nouvelles variétés**, pour multiplier un **nouveau génotype** issu de la création variétale, quelques mois de culture in vitro suffisent au lieu de plusieurs années de culture traditionnelle.
- La **conservation** du matériel génétique dans les collections ou banques de gènes. Quelques m² de laboratoire permettent de conserver en **survie**, par le **froid** et avec des repiquages **très espacés**, des **collections entières** de génotypes intéressants.

bouturage in vitro d'après C. Martin- INRA Dijon



200 000 à 400 000 boutures

2. La régénération par cultures de méristèmes

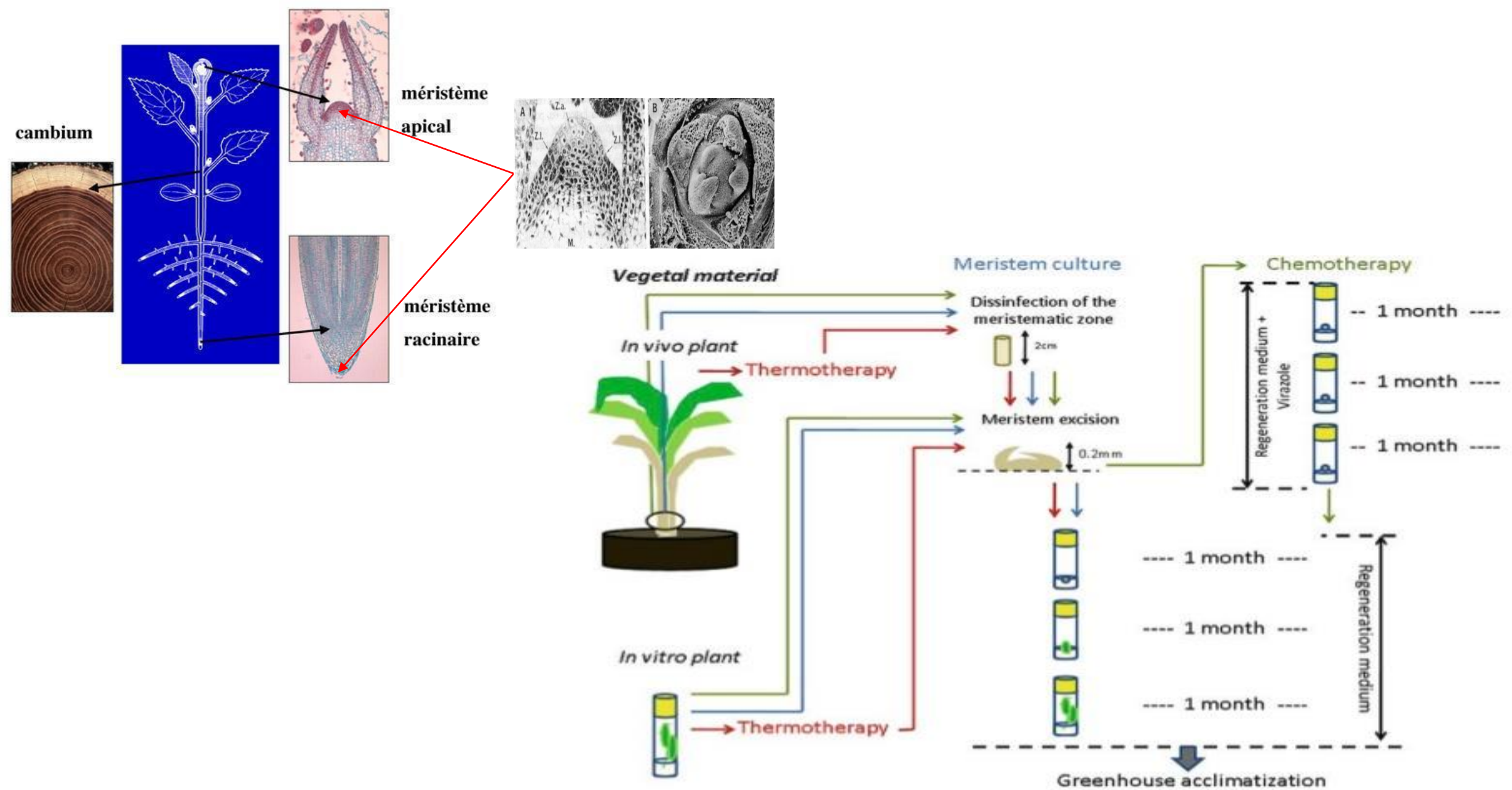
Principe: c'est une méthode dont on a recours le plus souvent pour sauver ou préserver un génotype intéressant dans le cas de plante malade ou infestée de germes, elle s'appuie sur:

- Le prélèvement des zones méristématiques isolées indemnes de maladies, généralement au niveau des bourgeons et organes jeunes.
- La croissance et la multiplication in vitro, avec repiquages successifs et modification éventuelle des équilibres hormonaux.
- **Sauvetage** d'espèces ayant un génotype intéressant, à partir de plante malade et **obtention** de jeunes vitro plants sains .

NB: le méristème ne transmet pas de maladie la vitesse de sa multiplication dépasse de loin la prolifération des germes!!!!

Intérêts :

- Les méristèmes sont indemnes, Le méristème d'une plante infestée de maladies virales, ne peut contenir ces dernières (multiplication active et continue) et donne naissance à une plante saine; **contrairement** à une multiplication végétative par boutures, greffons, stolons, bulbes ou tubercules (organes riches en sève peut abriter et transmettre les virus et les bactéries).
- C'est la seule méthode qui permet le sauvetage d'une espèce rare ou ancienne à partir d'une plante malade sans transmission de virus ou bactéries (cas de certaines variétés de pomme de terre, artichaut et les œillets).
- Elle peut être associée à une thermothérapie, qui consiste à détruire le virus par chauffage des plantes à 35-39°C (limite de leur survie).



Schematic representation of virus eradication processes for banana. The *green*, *blue*, and *red* arrows represent the process of chemotherapy, meristem culture, and thermotherapy, respectively (Lassois *et al.*, 2012. In Maurizio Lambardi *et al.* (eds.), In press)

3. L'Embryogenèse somatique et les semences artificielles:

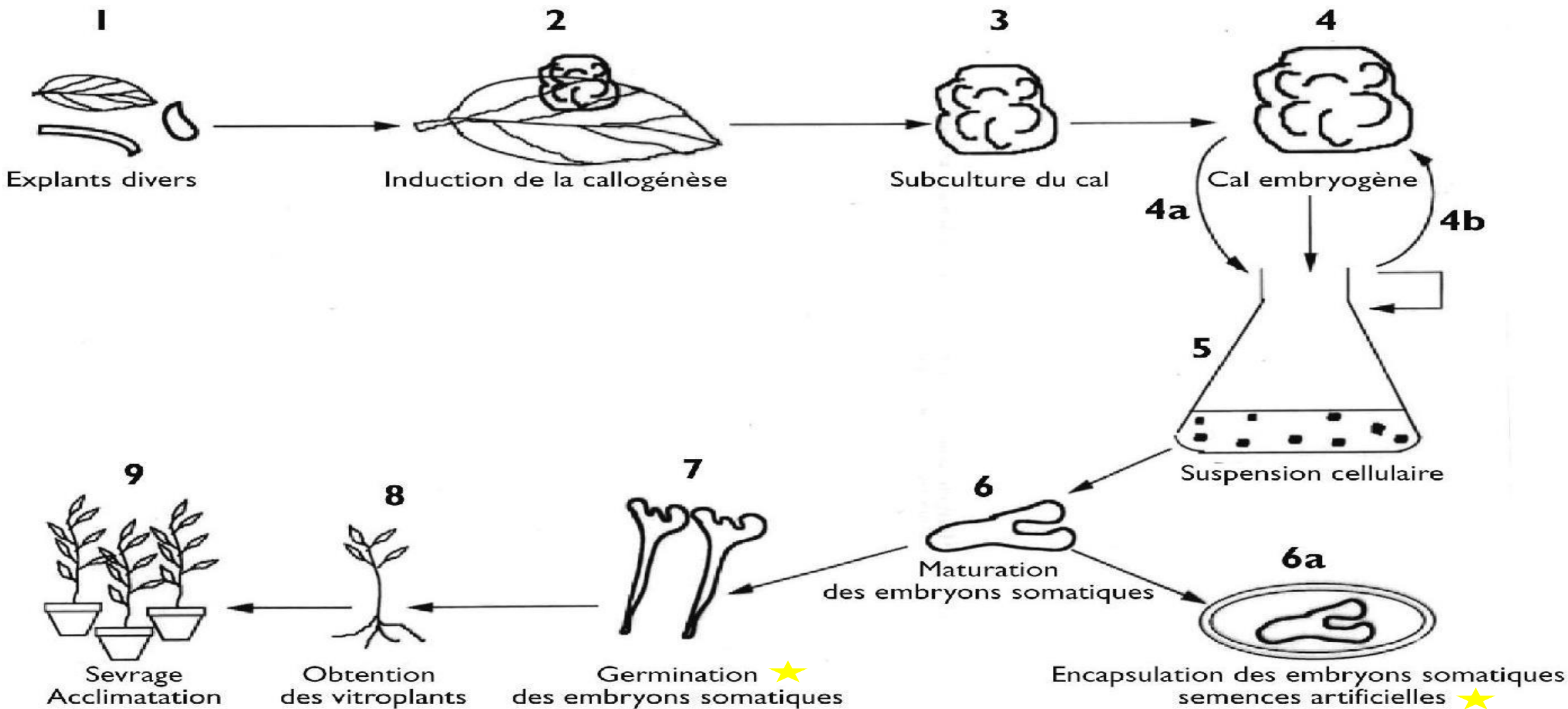
Principe: L'embryon est normalement le résultat de la fécondation au cours de la reproduction sexuelle il est protégé par la graine jusqu'à la germination, néanmoins par culture in vitro on peut obtenir une production massive d'embryons somatiques mais qui sont plutôt fragile, dépourvu de réserves par absence de graine.

- Ce type de culture in vitro nécessite un milieu de culture très spécifique et approprié.
- L'obtention d'un embryon avec un pôle radicule et un pôle bourgeon à partir de fragment de tissu végétal.
- Il repose sur le phénomène d'embryogénèse qui se résume en la dédifférenciation des tissus, suivie d'une différenciation cellulaire bien spécifique.

Intérêts:

- Obtention de semences artificielles dont les caractéristiques sont définies sans passer par la reproduction sexuée.
- Certaines espèces ne produisent pas de semences (cas du bananier).
- Des sujets mutants ou exceptionnels pourraient être multipliés rapidement, sans modification de leur génotype.
- En sélection, les semences artificielles permettent la multiplication d'individu difficiles à obtenir comme le cas des mâles stériles.

NB: les semences artificielles peuvent être encapsuler afin de différer leur mise en culture



4. Cultures industrielles de cellules végétales pour production de métabolites:

Principes: c'est une culture en suspension des cellules végétales ayant subi une isolation mécanique, ces cellules sont sélectionnées pour leur aptitude à produire dans des milieux appropriés des substances chimiques avec des quantités importantes dont une plante ne peut produire en état normale.

L'obtention des cellules isolées repose sur:

- Le choix du tissu mère dépend de l'objectif de la culture.
- La fragmentation du tissu sans pour autant provoquer la destruction de l'ensemble des cellules .
- La filtration de la suspension afin d'éliminer les débris de cellules.
- Le repiquage successif afin de maintenir les cellules en état juvénile et éviter leur flétrissement.