

CHAPITRE 1 : Fondements de la culture in vitro et multiplications des plantes

Introduction

La culture in vitro des plantes constitue l'un des piliers de la biotechnologie végétale moderne. Elle regroupe l'ensemble des techniques permettant de cultiver, dans un environnement contrôlé et aseptique, des cellules, tissus ou organes végétaux isolés de l'organisme initial. L'objectif principal est de favoriser leur croissance, leur différenciation ou leur multiplication selon des voies physiologiques ou morphogénétiques définies.

Développée au cours du XX^e siècle grâce aux progrès de la physiologie végétale, de la biochimie et de la biologie cellulaire, la culture in vitro est aujourd'hui largement utilisée dans des domaines variés : amélioration des plantes, conservation des ressources génétiques, production de plants élite, recherche fondamentale, ou encore production de métabolites secondaires.

Plus largement, la biotechnologie désigne l'ensemble des techniques exploitant des systèmes biologiques pour produire ou transformer des substances, comme le montre l'exemple classique de la fermentation vinicole. Le terme, introduit en 1919 par l'ingénieur hongrois Karl Ereky, englobe également la biotechnologie végétale, qui applique des procédés de manipulation des plantes afin d'en améliorer les caractéristiques ou les performances.

Cette discipline se divise principalement en deux branches complémentaires :

- * La culture de tissus, qui correspond à la culture in vitro de différents éléments végétaux (cellules, tissus, organes, embryons, graines ou protoplastes) sur des milieux nutritifs adaptés et en conditions aseptiques.

- * Le génie génétique, centré sur la manipulation directe de l'ADN, permettant d'introduire ou de modifier des gènes afin d'obtenir de nouvelles propriétés. Il rend possible, par exemple, la production contrôlée de molécules telles que hormones, vaccins, anticorps monoclonaux ou encore l'amélioration ciblée de plantes et d'animaux.

1. Aspects historiques du développement des cultures in vitro

Gottlieb Haberlandt est considéré comme le père de la culture de tissus végétaux, car il a émis l'hypothèse de la totipotence des cellules végétales et a tenté la culture in vitro de cellules de mésophylle dès 1902.

La totipotence est la capacité d'une cellule végétale à se multiplier, se différencier et se développer en une plante complète.

La première culture d'embryons a été tentée par Hanning en 1904.

En 1925, Laibach réussit à obtenir une descendance hybride issue d'un croisement interspécifique chez *Linum* en utilisant des embryons zygotiques comme explants.

La première hormone de croissance végétale, l'acide indole-acétique (AIA), a été découverte dans les années 1930 par F. Kögl et al.

En 1934, le professeur Philip White réussit à cultiver des racines de tomate sur un milieu qui sera plus tard connu sous le nom de milieu de White.

En 1939, Gautheret réussit à cultiver des tissus de carotte, et la possibilité de cultiver des tissus végétaux pour une durée illimitée fut confirmée indépendamment par Gautheret, White et Nobécourt en 1939.

En 1955, Miller et Skoog publièrent leur découverte de la kinétine, une cytokinine.

La première plante régénérée à partir d'une cellule adulte fut obtenue par Braun en 1959.

Les recherches se sont ensuite orientées vers la préparation de cultures de cellules uniques.

Muir (1953–1954) démontra que les tissus de cal sur milieu liquide, soumis à une agitation, se fragmentaient en cellules isolées.

En 1960, Bergmann développa une méthode de clonage de ces cellules uniques en filtrant les cultures en suspension. Cette technique, appelée technique de plaquage, est largement utilisée pour le clonage de protoplastes isolés.

En 1962, Toshio Murashige et Skoog publièrent la composition d'un milieu de culture végétale, connu sous le nom de milieu MS, qui demeure aujourd'hui le milieu le plus utilisé en culture de tissus.

Pour la première fois au monde, des plantes haploïdes issues d'anthères de *Datura* furent obtenues par les chercheurs indiens Guha, S. et Maheshwari, S.C. (Nature, 204:497 (1964) ; Nature, 212:97–98 (1966)).

Cette découverte eut un impact majeur, car les plantes obtenues après doublement chromosomique des haploïdes sont homozygotes et expriment tous les gènes récessifs, ce qui les rend idéales pour la création de lignées pures.

Les travaux classiques de Steward (1966) sur l'induction d'embryons somatiques à partir de cellules libres dans des cultures en suspension de carotte démontrèrent définitivement la totipotence des cellules somatiques, confirmant ainsi les prédictions d'Haberlandt.

Morel appliqua cette approche pour la propagation rapide d'orchidées et de dahlias. Il fut également le premier à produire des plantes d'orchidée et de dahlia exemptes de virus grâce à la culture du méristème apical de plantes infectées.

Le protoplaste (cellule dépourvue de paroi) fut produit par Cocking en 1960 grâce à des enzymes dégradant la paroi cellulaire.

Les premiers hybrides somatiques résultant de la fusion de protoplastes (*Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii*) furent obtenus par Carlson et al. en 1972.

2. Fondements de la culture in vitro

Toute cellule végétale vivante dotée d'un noyau possède la capacité de reproduire intégralement la plante d'origine. Cette propriété exceptionnelle, appelée **totipotence**, est à la base de l'expansion et du potentiel de la culture in vitro. Toutefois, bien que toutes les plantes puissent théoriquement être cultivées in vitro, les connaissances actuelles sur les milieux de culture et le comportement spécifique des espèces ne permettent pas encore une application universelle immédiate et sans difficulté.

2.1. La dédifférenciation

Lorsqu'une cellule différenciée, comme le parenchyme médullaire de tabac, redevient capable de proliférer et de former différents organes, elle subit des transformations profondes. Ces modifications la ramènent à un état juvénile, équivalent à celui des cellules méristématiques, capables de se diriger vers la formation de bourgeons végétatifs, de méristèmes racinaires ou même d'embryons. Au cours de cette **dédifférenciation**, de grandes cellules perdent leurs vacuoles, leur noyau se divise activement et de petites cellules méristématiques apparaissent au sein du tissu parenchymateux. Selon la composition du milieu de culture, ces cellules peuvent continuer à se diviser indéfiniment. Certaines deviennent même **anergiques**, c'est-à-dire capables de proliférer sans phytohormones stimulantes telles que les auxines ou les cytokinines.

2.2. L'organogenèse à partir de tissus

Au début du XX^e siècle, l'objectif principal des recherches en culture in vitro était la prolifération indéfinie de tissus végétaux indifférenciés. L'organogenèse in vitro, c'est-à-dire la formation d'organes à partir de tissus, a été abordée plus tard. Les cytokinines et les auxines ont joué un rôle central dans la régulation de la différenciation. Des expériences, notamment celles de F. Skoog sur le parenchyme médullaire de tabac, ont montré que l'interaction de ces phytohormones peut orienter les cellules soit vers la formation de racines, soit vers la formation de bourgeons, soit maintenir un état de tissu indifférencié.

2.3. La totipotence

La **totipotence** repose sur le fait que chaque cellule vivante contient toutes les informations génétiques nécessaires à l'embryogenèse et au développement complet de la plante. Cette propriété permet aux cellules dédifférenciées, aux cellules germinales comme les grains de pollen ou les ovules, et même aux protoplastes isolés, de régénérer une plante entière identique à la plante parentale. La totipotence peut être activée par des stress, des traumatismes ou l'action de phytohormones, permettant à des cellules hautement spécialisées de revenir à un état indifférencié et de se redifférencier ensuite selon les besoins expérimentaux. Ainsi, toute cellule végétale vivante, dans des conditions appropriées, est capable de régénérer une plante entière.

3. Les grands domaines de la biotechnologie

Les biotechnologies jouent un rôle déterminant dans la santé, l'agriculture, l'environnement, l'agroalimentaire et le développement de procédés industriels innovants. Selon l'OCDE, elles représentent aujourd'hui moins de 1 % du PIB des pays membres, mais pourraient atteindre 2,7 % d'ici 2030. L'Union européenne investit également fortement dans ce secteur afin de développer une véritable bioéconomie.

3.1. Les biotechnologies vertes (agriculture)

Les biotechnologies vertes visent à répondre aux défis agricoles tout en préservant l'environnement, en contribuant à la production alimentaire, énergétique et de biomatériaux. Elles reposent sur la connaissance du génome et le génie génétique, permettant le transfert ciblé de gènes pour améliorer la résistance des plantes aux insectes, virus ou herbicides. Elles permettent aussi de développer des plantes servant de bio-usines capables de produire des molécules d'intérêt médical, biomédical ou industriel.

3.2. Les biotechnologies rouges (santé)

Dans le domaine de la santé humaine et vétérinaire, les biotechnologies sont essentielles pour la découverte, la production et l'évaluation de nouveaux traitements : vaccins, protéines recombinantes, anticorps monoclonaux, thérapies cellulaires et géniques. Elles améliorent également le diagnostic grâce aux puces à ADN, aux typages moléculaires ou aux biocapteurs. L'ingénierie génétique permet de concevoir des organismes produisant des médicaments ou des antibiotiques, et de développer des approches innovantes comme la thérapie génique.

3.3. Les biotechnologies blanches (biotechnologies industrielles)

Les biotechnologies blanches regroupent l'ensemble des procédés industriels utilisant des systèmes biologiques — principalement enzymatiques ou fermentaires — pour produire, transformer ou dégrader des molécules à partir de matières premières renouvelables. Elles se distinguent des biotechnologies traditionnelles (pain, vin, fromage) par l'usage de technologies modernes, notamment le génie génétique, permettant un meilleur contrôle des processus. Ces biotechnologies offrent des perspectives majeures pour une industrie plus durable grâce à la réduction des consommations et rejets de matières premières.

3.4. Les biotechnologies bleues (biodiversité marine)

Les biotechnologies bleues exploitent la biodiversité marine afin de développer des produits ou d'améliorer la gestion des espèces marines, sauvages ou d'élevage. Elles fournissent des applications dans l'alimentation, la santé, la médecine régénérative ou la cosmétique, notamment grâce à l'utilisation de biomolécules, d'hydrocolloïdes et de gélifiants issus d'organismes marins. De nombreuses molécules d'intérêt, utilisées en recherche ou en pharmacologie, proviennent également de ces organismes. La biotechnologie bleue reste un domaine en forte expansion scientifique et industrielle.

3. 5. Les biotechnologies jaunes (protection de l'environnement)

Les biotechnologies jaunes regroupent les applications liées à la préservation de l'environnement. Elles incluent :

- L'entretien de la biodiversité grâce à la génétique des populations, à la classification moléculaire et aux techniques de conservation (clonage, banques de gènes).
- La bioremédiation, utilisant microorganismes et plantes pour dépolluer les sols et eaux (métaux lourds, hydrocarbures) tout en valorisant parfois les sous-produits.

4. Objectifs et intérêts de la biotechnologie végétale

4.1. Participer à l'avancée des connaissances

Les avancées en biologie moléculaire, bioinformatique et génomique permettent aujourd'hui d'identifier, de caractériser et de comprendre les fonctions des gènes des plantes (blé, maïs, colza...), notamment ceux impliqués dans la résistance aux maladies ou les caractères agronomiques.

4.2. Augmenter la biodiversité

L'intégration de nouveaux caractères se fait par sélection assistée ou, lorsque nécessaire, par transgénèse. Ces méthodes enrichissent la diversité génétique disponible pour l'amélioration variétale.

4.3. Améliorer l'environnement

La biotechnologie permet de créer des variétés plus résistantes aux stress, comme le maïs tolérant la sécheresse grâce à l'introduction d'un gène de sorgho. Cela contribue à une meilleure gestion des ressources naturelles, notamment l'eau.

4.4. Renforcer la qualité sanitaire des aliments

La résistance accrue du blé ou du maïs à certains champignons pathogènes permet de réduire les pertes et d'améliorer la qualité sanitaire des récoltes.