

Introduction

Utiliser un fragment de plante pour reproduire un individu comme dans le bouturage, ou pour l'associer à une autre plante comme dans la greffe, sont des biotechnologies anciennes. De ces techniques sont dérivées des méthodes plus fines, partant de fragments de plus en plus réduits, jusqu'à la cellule isolée ou le gamète.

Les biotechnologies végétales reposent principalement sur les cultures *in vitro*. De nombreux chercheurs considèrent la biotechnologie végétale comme le perfectionnement des techniques d'amélioration génétique qui ont commencé il y a des millions d'années avec la culture de plantes sauvages pour la consommation humaine.

1.1. Aspects historiques des cultures *in vitro*

La culture *in vitro* est par comparaison, une technique très récente puisqu'elle fut développée seulement au début de ce siècle. Les premiers pas de culture *in vitro* sont dus à un allemand Haberlant en 1902.

- **1902 G. Haberlandt**, énonce le concept de la **totipotence** cellulaire végétale. Il réussit à faire survivre *in vitro*, quelques mois, mais sans multiplication, de petits amas cellulaires.
- **1922** Aux Etats-Unis, **W.J. Robbins** et en Allemagne : **W. Kotte**, obtiennent la croissance de pointes déracinées pendant quelques mois seulement.
- **1926 E. Kurosawa** (Formose) découvre l'action de la gibbérelline sur la croissance, c'est la première fois qu'une substance hormonale est extraite d'une plante.
- 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.
- **1935** Le Professeur **R.J. Gautheret**, en France, cultive et multiplie des cellules cambiales de saule en introduisant des auxines dans le milieu.
- **1936 O. Orsosen** Hongrie induit des cals et des organes à partir de tissus de tubercule de chou-navet.
F.G. Gustafson obtient avec un grand succès les premiers fruits parthénocarpiques, (tomate, raisin, figue), par application d'auxine sur des ovaires non fécondés.
- 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").
- **1941 A.C. Braun** en étudiant les tumeurs végétales ou crown-gall, a amorcé les travaux qui ont conduit aux premières manipulations génétiques végétales.
- **1944 R. Buvat** par les techniques de culture de tissus met en évidence le phénomène de dédifférenciation: la Rejuvenation.
- **1946 E. Ball** obtient la régénération de plants de lupin et de capucine à partir d'apex.

- **1949 P. Limasset et P. Cornuet** notent l'absence de virus dans les méristèmes de tabacs virosés.
- **1952** Mettant à profit ces travaux, G. Morel et C. Martin à l'i.N.R.A. de Versailles, régénèrent des plantes entières saines de dahlia, variété "le Rêve" indemnes de virus à partir de culture de méristèmes de plants infectés par trois virus différents. De la même manière ils sauveront la variété de pomme de terre "la Belle de Fontenay" en 1954.
- **1954 W.H. Muir et col.** Obtiennent les premières cultures de cellules isolées à partir de cals friables cultivés en milieu liquide agité.
 - 1955 C.O. Miller et col.** Découvrent que les cytokinines induisent des divisions cellulaires dans des cultures de tissus de tabac.
- **1957 F. Skoog et C. Muller** régénèrent des racines et des tiges à partir de cals sous influence d'auxine et de cytokinine.
- **1958 F.C. Stewart et J. Reinert** obtiennent des embryons somatiques de carottes à partir de culture de racines et mettent ainsi en évidence le principe de totipotence cellulaire.
- **1962 T. Murashige et F. Skoog** mettent au point pour des cultures de tissus de tabac le fameux milieu de culture M.S. utilisé largement en culture in vitro. Il s'agit d'un milieu contenant des éléments minéraux, des vitamines du groupe B, du sucre, auxine et cytokinine.
- **1964 S. Guha et S.C. Maheshwari**, en Inde, obtiennent des plantes haploïdes de *Datura innoxia* Mill. A partir de culture d'anthères.
- En **1966**, **Guha et Maheshwari** en Inde obtenaient des plantes haploïdes de *Datura innoxia* M.LL à partir de culture d'anthères ;
- **1971 Au Japon, I. Takebe et col.** Régénèrent des plantes entières de *Nicotiana tabacum* à partir de protoplastes.
- **1972 P.S. Carlson** obtient le premier hybride somatique interspécifique par fusion de protoplastes entre différentes espèces de tabac.
- **1975 K.K. Pandey** utilise du pollen irradié de tabac pour réaliser des croisements interspécifiques.
- **1976 L.H. San Noe** dans l'équipe du Pr. Demarly à Orsay réussit la première culture d'ovaires d'orgeon fécondés. En même année, Seibert réussit à initier des pousses d'œillets à partir d'apex conservés à - 196°C, c'est le début de la cryoconservation pouvant être utilisée pour la constitution de banques de gènes.
- **1983 M. Van Montaignu et col.** Créent en Belgique les premières plantes transgéniques transformées par *Agrobacterium tumefaciens*. Il s'agit d'un plan de tabac résistant à la kanamycine.

1.2. Généralités et définition de la culture *in vitro*

1.2.1. Définition de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* ou culture de tissus se définit comme des cultures d'explants de plantes, sur un milieu nutritif artificiel, en laboratoire à l'abri de toute contamination, dans des récipients placés dans un endroit où l'intensité de la lumière, la durée de l'illumination, la température et l'hygrométrie sont constamment contrôlées (Zryd, 1988; Roberta, 2001 ; Edwin et al., 2008).

-Totipotence

Des 1902, Haberland. 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 totipotence cellulaire (toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issu).

La totipotence est l'aptitude de la cellule végétale à exprimer la totalité de ses potentialités pour donner un organisme entier.

totipotentialité cellulaire s'accompagne par multiplication indéfinie que l'on peut observer dans les zones de croissance de la plante : les méristèmes.

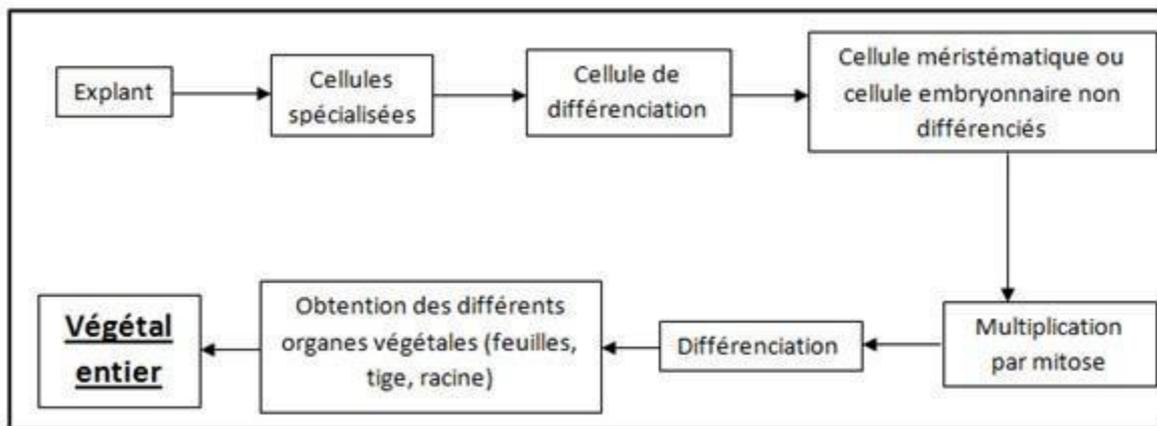


Figure. Totipotence, propriété qu'ont certaines cellules de pouvoir régénérer un individu entier.

1.2.2. Catégories de la culture *in vitro*

1.2.2.1. Catégorie de la culture *in vitro* conforme

Il s'agit d'un mode de multiplication conduisant à des individus pourvus de même stock d'information héréditaire que la plante d'ont ils sont issus (Nozeran et Bancilhon, 1972):

- Culture de nœuds ou apex,
- Culture de méristèmes, •Embryogenèse somatique.

1.2.2. Catégorie de la culture *in vitro* non conforme

Ce procédé utilise un matériel végétal peu régulé et le place en conditions déstabilisants les signaux ; on voit alors apparaître une variabilité importante (**Demarly, 1985**).

- Organogenèse directe.
- Organogenèse sur cal (Callogenèse).
- Haplométhodes.
- Culture et fusion de protoplastes.

1.2.3. Facteurs influençant la culture *in vitro*

Les facteurs influant sur la culture *in vitro* peuvent être:

1. **facteurs internes** (ceux liés à la plante) : génotype, nature et l'âge de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère.
2. **facteurs externes** englobent les milieux et les conditions de cultures.

1. Effet de l'explant

1.1. Nature d'explants

L'explant est choisi en fonction de la technique utilisée, de l'objectif visé, et de l'espèce travaillée. Il y a plusieurs types d'explants :

- * graine
- * organe (tige, feuille, racine, fleurs, etc)
- * morceau d'organe
- * un tissu (apex, bourgeons, méristème, épiderme, phloème, pièces florales)
- * cellule somatiques ou sexuelles
- * protoplaste

Il y a plusieurs sortes d'explants :

- Explants indifférenciés: sont prélevés à l'apex de : tige, racine, bourgeons, nœuds
- Explants différenciés: sont prélevés sur la tige, feuille, racine, inflorescence.

Les explants indifférenciés les plus aptes à entreprendre une multiplication sont généralement riches en zones méristématiques potentielles.

1.2. Âge physiologique et ontogénique de l'explant

Généralement dans les cultures *in vitro*, on privilégiera les explants les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) car c'est l'état juvénile qui semble offrir le plus de possibilités de régénération (Davis, 1986, Saadi, 1991).

1.3. Époque du prélèvement des explants

Ce problème se pose surtout pour les espèces vivaces (stade de vie active et ralentie 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 lors des différentes saisons (Auge et al, 1989).

1.4. Taille de l'explant

Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes.

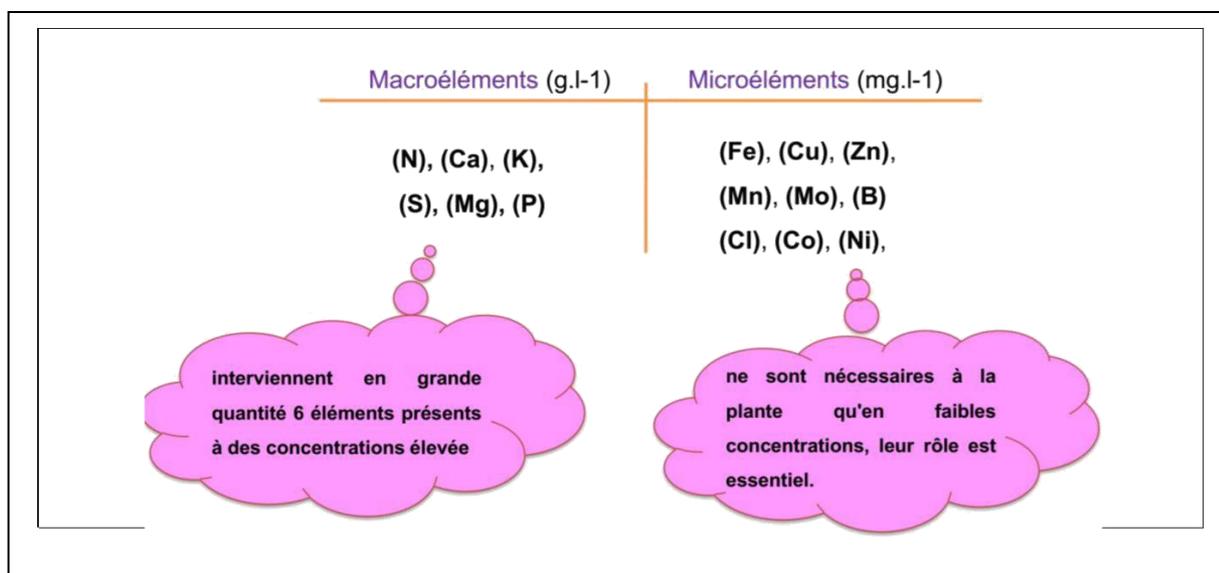
Tissu **organisée** : un ensemble assez complet sera nécessaire (soit un nœud, un apex, ou un bourgeon entier) mais dans le cas d'une structure **différenciée** (feuilles, tige, racines, inflorescence..) des fragments de 5 à 10 mm suffiront (Zryd, 1988, Auge et al., 1989; Hannweg et al., 1996).

2. Influence 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 (Auge et al, 1989)

3. Influence du milieu de cultur

□ Les éléments minéraux



- **Les éléments organiques**

Sucres	vitamines	acides aminés
<p>-Ils fournissent de l'énergie nécessaire pour la croissance des tissus et maintiennent une pression osmotique du milieu de culture .Cette pression osmotique, agit dans un certain cas, sur l'orientation ou l'expression morphogénétique des tissus et sur la maturation des embryons somatiques produits.</p> <p>-La saccharose constitue une source d'énergie , dans un cas particulier utiliser d'autres sources tels le glucose galactose et le lactose .</p> <p>-L'organisation peut-être influencée par la nature des sucres, et par sa concentration dans le milieu de culture.</p>	<p>Certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus, comme :</p> <p>Thiamine, acide nicotinique, pyridoxine , leurs concentrations sont fréquemment de l'ordre de 1mg /l</p>	

Régulateurs de croissance

Les hormones végétales sont des substances qui souvent peuvent supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de cytodifférentiation (**Street, 1997**).

L'orientation d'un explant vers un processus défini est fortement influencée par les régulateurs de croissance

Les deux hormones le plus souvent utilisées d'une manière conjointe ou séquentielle, sont les auxines et les cytokinines.

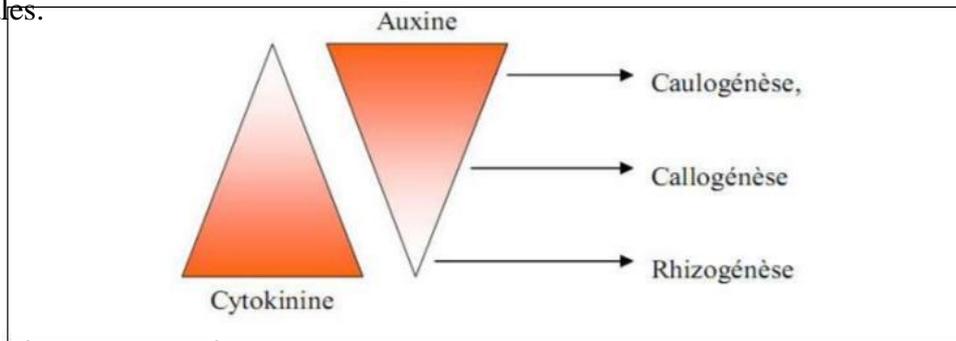
Le rapport hormonal auxine/cytokinine (balance hormonale) conditionne, en grande partie le type de la néoformation obtenu.

Ainsi la néoformation de bourgeons est souvent favorisée par des teneurs élevées en cytokinines (**Abri et Stadn, 2001, Compton *et al.*, 2001, Tang et Guo, 2001**), alors que les fortes doses en auxines

stimulent la formation de racines et améliorent leur qualité (**Druart, 1992, Hobbie, 1998; Abrie et Stadn ,**

2001; Compton *et al.*, 2001) figure.

L'influence de ce rapport hormonal n'est cependant pas une règle générale pour toutes les espèces végétales.



4. Lumière et Photopériode

La lumière et la photopériode affecte la vigueur et le développement des proliférations et la croissance (**Briggs, 1964 ; Hussey et al, 1981**).

De façon général, le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes (**Bommeneni et Jauhar, 2003**).

5. Température

La température de beaucoup de chambres à culture est constante de l'ordre de 22° à 25° C (**Margara,1984**).

2. Etapes de culture *in vitro*

Les étapes de la culture *in vitro* sont :

1. ASEPSIE

Lors de l'ensemencement de l'explant, la réalisation de l'asepsie demeure l'une des difficultés majeur de la culture *in vitro*.

L'asepsie ne présente pas des difficultés majeures lorsque le végétale est peu contaminée et que les tissus de l'explant sont bien protégés. C'est souvent le cas de l'ensemencement des méristèmes ou d'apex de tige naturellement protégés par les ébauches foliaires.

-stérilisation de la verrerie par la chaleur humide à l'autoclave (120C° pendant 45 mn par exemple).

-flambage des instruments après trempage dans l'alcool.

-stérilisation des milieux de culture par autoclave (110 à 120C° pendant 20 mn, par exemple). Il s'ensuit une décomposition et inactivation au moins partiellement de certains composés instables à la chaleur (vitamine).

Les installations utilisées pour la mise en culture aseptique se répartissent en 3 catégories :

- a- Petites pièces de mise en culture pourvues d'une paillasse et d'une lampe à U.V destinée à la stérilisation par émission d'ozone.
- b- Boîtes relativement étanches de petites dimensions en verre et matière plastique pourvues de portes coulissantes et éventuellement d'une lampe à U.V .(ces boîtes peuvent être posées sur une paillasse ou sur une table).
- c- Hottes fixes ou mobiles pourvue d'un dispositif de ventilation d'air filtré assurant une surpression et évitant ainsi la pénétration des germes venant de l'extérieur.

Stérilisation du matériel végétal

- a- Immersion des explants pendant quelques instants dans l'alcool puis dans une solution d'hypochlorite de calcium ou de sodium (5 à 10 %) pendant 10 à 30 mn . Et rinçage plusieurs fois à l'eau stérile.
- b- Utilisation de chlorure mercurique à 0.25 % pendant 6 heures.
- c- Immersion des explants dans une solution d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) à 3mg/l en association pendant 2 heures.

2.Choix du milieu de culture

Le milieu de culture comprend l'eau, la gélose, le sucre, les éléments minéraux, éventuellement un mélange de vitamines et de substances organiques divers et des régulateurs de croissance.

La grande difficulté du choix du milieu de culture est qu'il est pratiquement impossible de le faire à la suite d'une étude factorielle rigoureuse qui mettrait à l'essai toutes les combinaisons des facteurs choisis.

Il vaut mieux pour gagner du temps, de partir d'un milieu déjà utilisé par d'autres auteurs pour le même matériel ou pour des exemples comparables et en l'améliorant ponctuellement.

Il y a donc une grande part d'empirisme dans la pratique de la vitroculture : chaque plante et même chaque organe doit être considéré comme un cas particulier.

En général, on utilise des milieux de composition connue, déjà éprouvés pour des plantes particulières : MURASHGIE et SKOOG pour le tabac (convenant à de nombreuses plantes) , HELLER pour la carotte , GAMBORG pour le soja , le lin...

Il est impossible d'étudier pour un nouveau matériel. L'équilibre le plus convenable (chaque espèce à ses exigences propres vis-à-vis des macroéléments et micro-éléments, vitamines...).

Mais il suffit parfois d'une modification dans la concentration d'un élément chimique pour obtenir le résultat : par exemple la multiplication par 100 de la concentration en manganèse a permis la croissance des apex de Prunus (BOXUS et QUOIRIN , 1974).

Il est nécessaire de changer de milieu pour assurer toutes les phases de la régénération.

2-1- Le support

En culture *in vitro*, le support physique pose des problèmes particuliers.

-Gélose ou agar (dont la composition est variable et mal définie) .Le succès et le développement des cultures *in vitro* ont été liés à l'utilisation de la gélose qui permet de solidifier le milieu et réalise un complexe colloïdal ayant un faible pouvoir de rétention vis-à-vis des ions . Elle présente cependant des inconvénients : Le principal étant de fournir une aération insuffisante, qui inhibe la croissance de certains tissus.

Les concentrations les plus couramment employés varient entre 6 à 10 g/l.

Il y a une possibilité de libérer des éléments organiques et minéraux par la gélose.

-Bio-gels (gels de la polyacrylamides).Les substances nutritives peuvent migrer vers l'explant à travers les espaces intergranulaires.

-Liquides : Le problème majeur de la culture sur milieu liquide étant l'aération du milieu , qui peut être réalisée de diverses manières : - par agitation vigoureuse (secoueur).

-par immersion intermittente des tissus.

-par barbotage d'air stérilisé par filtration.

La culture sur milieu liquide stable est assez rarement réalisée en raison du risque d'asphyxie des tissus.

Lorsqu'on désire utiliser un milieu liquide stable tout en assurant l'aération des tissus , le dispositif de HELLER (1993) demeure le plus pratique : l'explant est placé sur un pont de papier filtre trempant dans la solution nutritive.

On peut rajouter du charbon activé qui présente l'avantage d'absorber les substances inhibitrices excrétées par l'explant ou apportées avec le milieu de culture (composés phénoliques , tanins...).

2.2. Le milieu minéral

Les principaux éléments minéraux indispensables sont l'azote (N) , le phosphore (P) , le potassium (K) , le calcium (Ca) , le Magnésium (Mg) , le Bore (B) et le molybdène (Mo) , la suppression ou l'absence d'un de ces éléments essentiels entraîne une inhibition de la croissance.

Le chlore et le sodium ne paraissent pas nécessaires.

Compte tenu des dimensions très réduites des explants et de la faible assimilation chlorophyllienne qui en découle, l'apport de carbone sous forme organique est absolument nécessaire (glucose , saccharose).

Dans les conditions de cultures d'organes et de tissus . Les corrélations physiologiques sont réduites au minimum (absence de mécanismes régulateurs de la plante entière où la nutrition minérale est étroitement liée aux interactions entre tissu et organes). Et les explants sont donc particulièrement sensibles à l'action des ions minéraux.

Compte tenu de la faible masse de tissus cultivés comparativement au volume du milieu de culture , on peut être surpris des quantités élevées d'éléments minéraux apportés dans les milieux modernes (MURASHIGE et SKOOG , 1962). Qui sont certainement très supérieurs aux besoins effectifs des tissus.

Les problèmes doivent se poser en termes d'équilibres ioniques plutôt que de besoins quantitatifs réels.

Il est évident que les exigences varient avec l'espèce. La nature du tissu et son état physiologique mais aussi avec le mode de culture et le type d'organogenèse étudié (par exemple. Les méristèmes ont des besoins importants en potassium).

En définitif, le problème du choix de la solution minérale de base est particulièrement complexe . Les concentrations élevées de certains macro et microéléments peuvent être stimulateurs et des fois , c'est le déséquilibre ionique (excès de NH_4^+ , K^+ , par exemple) qui dans certains cas favorise l'organogenèse à la suite de mécanismes ignorés.

Milieux anciens : milieu de SACHS, (1860) ; de KNOP (1865) ; de HOAGLAND et SNYDER (1933)...

Le milieu le plus anciennement utilisé est celui de KNOP (1865) qu'a utilisé par la suite GAUTHERET dilué de moitié. Milieux actuels : milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) ; de HELLER (1953).

Le milieu de MURASHIGE et SKOOG a été mis au point pour la recherche de la croissance optimale de cals de tabac.

Il est employé de manière générale pour tous les types de culture *in vitro* à cause de son aptitude à favoriser l'organogenèse nettement supérieure aux autres milieux anciens.

Il est principalement caractérisé par une très forte teneur en azote (60 meq/l) et une concentration élevée en potassium.

2.3. Les composés organiques

a- les sucres

Les tissus en culture *in vitro* sont largement hétérotrophes au carbone en raison de l'absence ou insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc indispensable d'ajouter des glucides au milieu de culture : sous forme de saccharose et de glucose à la concentration de 2 à 8 % en moyenne.

b- Les vitamines

Divers vitamines favorisent la croissance des tissus en culture et il n'est pas exclu que le manque de certains d'entre elles puissent être un facteur limitant de phénomène d'organogenèse.

c-Les acides aminés

La présence des acides aminés favorise la prolifération des cals (glutamine, tryptophane, caséine, tyrosine, phénylalanine).

d-Les acides organiques (ceux du cycle de Krebs).

e-Autres produits

certains produits de composition mal définie se sont révélés comme stimulants, c'est le cas de certains extraits naturels, lait de coco, extrait de levure ...

2-4 -Les régulateurs de croissances : phytohormones naturelles

Ce sont principalement les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique et l'éthylène.

Indépendamment des substances naturelles, de nombreux régulateurs de croissance de synthèse peuvent être utilisés en vitroculture. C'est surtout les auxines et les cytokinines qui sont utilisés.

L'importance des gibbérellines en vitroculture est beaucoup plus faible.

Les principales auxines utilisées sont : A.I.A (acide indolyl acétique) ; A.I.B(acide indolyl butyrique) A.N.A(acide naphtyl acétique).

3- Choix de l'explant

Un explant est un fragment d'organisme (apex , organe , fragment d'organe ou fragment tissulaire) excisé et mis en culture *in vitro* (milieu inerte).

Un « implant » est un fragment d'organisme excisé et greffé sur un support vivant (transplantation) .

Au cours de son développement, la plante peut présenter une succession de caractéristiques morphologiques et physiologiques qui sont fonction de son âge et de l'état de son développement.

Ces caractéristiques affectent le plus souvent la forme de la feuille , le port , le type de croissance des rameaux (orthotrope ou plagiotrope).

Sur une même plante, à un moment donné, on peut observer des bourgeons se trouvant dans des états différents de croissance (croissance active, repos végétatif, dormance induite). Des bourgeons végétatifs ou inflorescentiels.

2.1. Callogenèse

2.1.1. Définition :

Le cal est un amas cellulaire (n'a pas de forme précise) dont la croissance se fait de manière anarchique.

Le cal est le tissu de néoformation produit par l'explant initial ou après des repiquages successifs (**Margara, 1989**).

Pour la production de cals, on utilise généralement des explants dépourvus de méristèmes comme les morceaux de racines, d'hypocotyles ou d'entre-noeuds (**Eric, 2003 ; Richard, 2005**). dans un milieu renforcé par des régulateur de croissance (**Dubois,1989 ; Rousselle et al., 1996**).

Cependant, les embryons zygotiques et les méristèmes sont souvent utilisés pour la production de cals embryogènes.

Il y a plusieurs catégories de cals qui se distinguent par :

- Couleur
- Aspect: lisse ou noduleux
- Consistance: compact ou friable

D'après **Murashige (1974)**, les caractéristiques de l'explant initial qui influencera les capacités de callogenèse sont :

- □ L'espèce est le génotype de la plante mère.
- □ L'âge est la position de l'organe sur la plante mère.
- □ La nature de l'organe dont il est issu.
- □ La taille de l'explant.

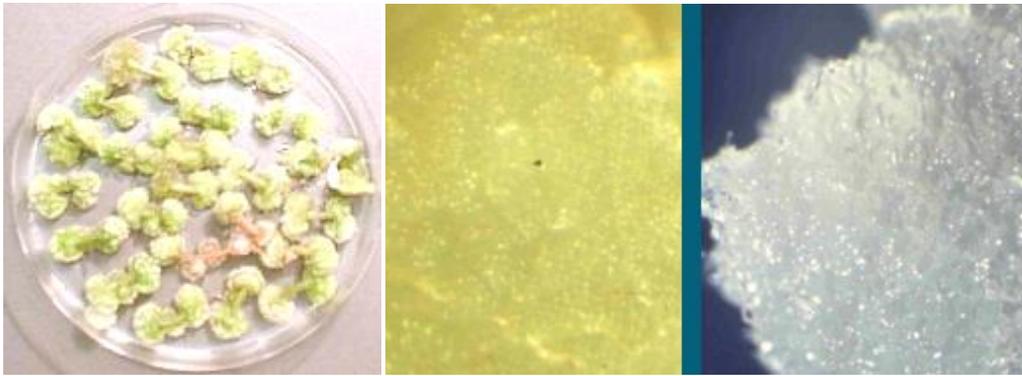


Figure. Production de cals

Le callogenèse induit à partir de la culture d'explants de tissu ou organes différencier, le cal est un tissu indifférencié, plus ou moins organisé, utilisé pour la culture cellulaires pour la production de métabolites secondaire ou encore en vue d'une variation somaclonale pour le domaine d'amélioration des plantes (i. sélection des variant aux caractères agronomiques améliorés, et la sélection des variant résistants aux maladies (orge: résistant à la

Les spécialistes arrivent à distinguer d'après l'aspect du cal sa capacité à régénérer des plantules par:

- **Organogenèse:** ce sont des cals qui sont capables, dans des conditions de milieu favorables, de former des bourgeons. Ces derniers peuvent alors être excisés pour former des plantes entières. Ce sont des cals organogènes.

2.1.2. Origine de la variation somaclonale

- Des variations peuvent s'accumuler au sein des cals suite aux nombreuses divisions anarchiques et probablement sous l'effet de régulateurs de croissance agressives comme le 2.4D ou la BAP.
- Des variations préexistantes au niveau des cellules de l'explant: les cellules embryonnaires ou méristématiques sont en général conformes, mais les cellules différenciées comprennent des variations dont la fréquence dépend du génotype, de l'âge, du tissu et des conditions de culture.

La variatonsomaclonale peut être trouvée se forme:

Génotypique : génétiquement stable, circulant aux prochaine générations (**Parrot et al., 1992**), permet l'isolations des mutations stables, déterminée dans les conditions de laboratoire ou après le renouvellement des plantes, il est utilisé dans les programmes de l'amélioration des plantes (**Kole , 2006**).

elle résulte selon (**EL Hamdouni et al., 1999**) par :

-changement dans le nombre de chromosome :

-Aspect multitude des ploïdes. Aspect inhabituel des ploïdes.

-changement dans la structure de chromosome et qui se produit par divers mécanisme :

*la coupure du chromosome en deux parties et ce par cassure interne.

*élimination d'un fragment intermédiaire du chromosome.

*transfert des fragments de chromosome entre les chromosomes asymétriques.

*les fragments du chromosome prennent une situation inverse par rapport à sa position originale à l'intérieur du chromosome.

*changement dans le nombre des nucléotides.

*mutations cytoplasmique.

Phénotypique : épidémique non stable et éteint après la production sexuée (Skivin et al., 1994), et ce par trouble physiologique ou l'amplification génique (Kole, 2006).

2.1.3. Nature des variations somaclonales

Les variations somaclonales sont des modifications qui touchent le génome nucléaire ou cytoplasmique par:

- Mutations ponctuelles
- Modifications de séquences: délétions, additions ou inversions de séquences.
- Polyploïdie
- Aneuploïdie
-

2.1.4. Type de variation somaclonale

Selon Evans et al (1984) il existe deux types de variation somaclonales :

1. Variations héritables

Est stable à travers le cycle sexuel ou renouvelée à travers une propagation asexuée.

2. Variations épigénétiques

Sont dues à l'environnement physico chimique de la culture c'est-à-dire: Composition du milieu devenue mal adaptée avec l'allongement du temps de culture: épuisement de certains éléments, acidité, pression osmotique etc...

Les variations épigénétiques disparaissent en général après le repiquage ou sevrage.

Elles ne se transmettent pas à la descendance.

Elle peut être instable même quand elle est propagée asexuellement.

La variation somaclonale bien qu'elle constitue un inconvénient quand on cherche la production conforme peut être une source très utile pour l'amélioration des plantes (Kacem, 2005).

2.1.5. Exemple de sélectionner des plantes résistantes à la salinité chez le riz

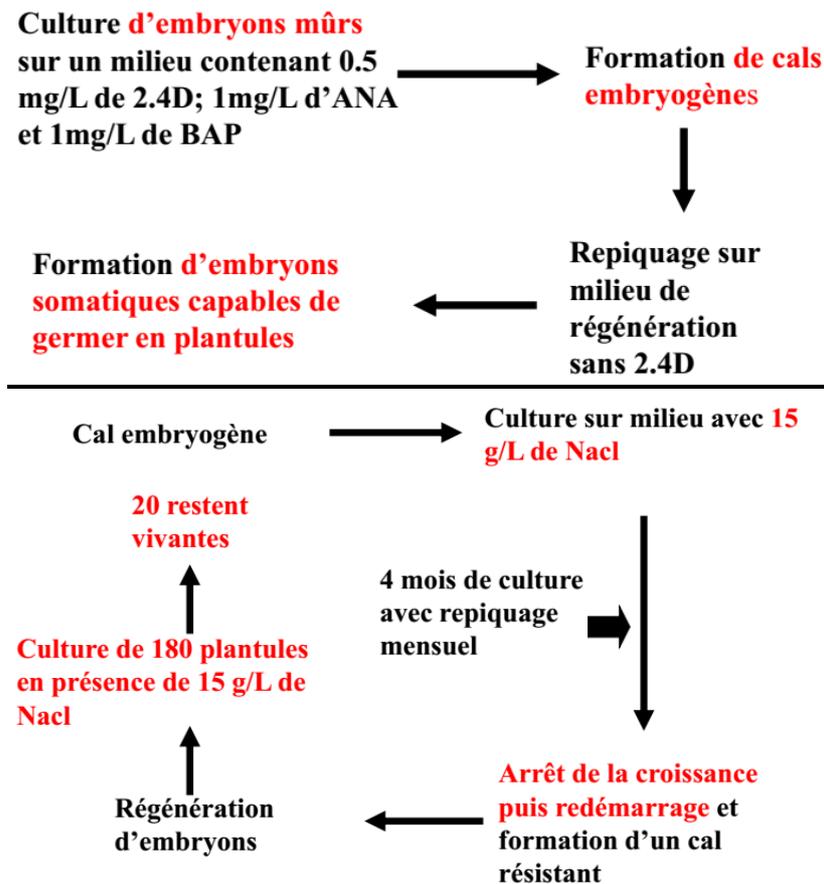


Figure. Protocole de sélectionner des plantes résistantes à la salinité chez le riz

2.2. Régulation hormonale de la calogène

Au cours des cultures in vitro deux hormones sont utilisées : l'auxine et cytokinine

- auxine/ cytokinine= 1 : croissance importante du cal cellulaire

La composite de milieu de culture considéré comme un facteur important dans la formation du variation somaclonale (Angela , 1995) ; parce que la production des cals lié de première classe avec le balance de régulateur de croissance, et qui différencie selon la nature de l'explant et le variété étudiée (Andre et al., 2003), lorsque les programmes morphogénétiques différencies selon le pourcentage de cytokinine/ auxine, à travers le balance hormonale on peut obtenus sur la forme organique (Akbar et Hakoomat, 2004),

Les cytokinines synthétiques (comme la BAP) et des auxines synthétiques fortes (comme le 2.4D).

le travail de régulateur de croissance exactement dans l'événement des modifications somaclonales reste inconnu (Charlotte et al., 1987).

2.3. Facteurs ayant une action sur la calogénèse

2.3.1. Matière végétale

on peut obtenir une variation somaclonale à partir du cal formé, de n'importe quelle partie de la plante ; feuille, tige et racine..., mais l'influence reste liée à la nature de chaque partie de la plante, et l'aspect physiologique (Filippone et al.,1992 ; Robert et al., 1994).

Le génotype flexible ainsi que l'espèce ont une importance rôle dans l'apparition de la modification génétique (**Demarly et Sibi, 1989**). par ailleurs le nombre de chromosome se reflète sur la moyenne et la qualité de la variation qui se produit, on observé que la variation génétique se fait boucaux dans les individus multiploïde par rapport les monoploïde et diploïde (**Yeoman, 1986**).

2.3.2. Duré de la culture de tissus

La duré de la culture de tissus influe sur la variation somaclonale, par ce que la moyenne des mutations liée par le nombre des transformations dans les conditions de laboratoire (**Demarly et Sibi, 1989**).

la lente croissance stimule la production de nombreuse variation somaclonale (**Wang et al., 1994**).

2.3.3. Composite de milieu de culture

2.3.4. Le génotype

La fréquence des variations somaclonales dépend de l'espèce et même de la variété ou du cultivar. Par exemple le bananier montre beaucoup de variations.

2.3.5. La technique

En général les techniques de multiplication basées sur l'utilisation d'un méristème préexistant (culture de nœuds, de méristèmes) ne permettent pas la formation de variants.

Toutes les techniques qui nécessitent des néoformations directement sur l'explant ou par l'intermédiaire d'un cal présentent un risque de variation. Ces techniques impliquent l'organogenèse directe ou sur cal et l'embryogenèse somatique.

Les variants sont très fréquents parmi les plantes régénérées à partir de protoplastes

2.4. l'intérêt de la callogenèse dans l'agriculture

- source de la diversité qui utilisé par fois dans la sélection et l'amélioration des plantes.
- un grand nombre de mutations
- peu coûteux par rapport à l'hybridation somatique et la transformation génétique.
- Certaines variations somaclonales peuvent s'avérer intéressantes et enrichir la base génétique de la plante.
- En effet, certains variants sont résistants à certains stress comme la salinité, la sécheresse ou certains pathogènes.

2.5. Caulogenèse

Désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs. Les tiges néoformées in vitro peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur un cal. Ils sont induits sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (Camefort, 1977 ; Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

-Le développement de tige in culture *in vitro* exige un équilibre hormonale:

Auxine/BAP (cytokinine) $\ll 1$: provoque la croissance des bourgeons et des feuilles.

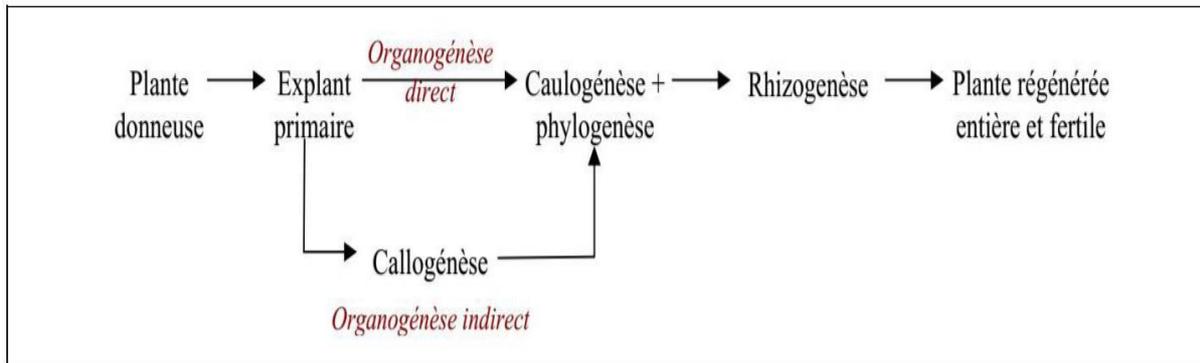


Figure. Schéma de la régénération d'une plante

2.6. Rhizogénèse

La rhizogénèse désigne la néoformation et la croissance de racine.

La rhizogénèse est un phénomène complexe, il comporte différentes phases :

-*Dédifférenciation* : formation d'amas de cellules méristématiques,

-*Différenciation* : et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines (**Margara, 1989; Boxus, 1995**).

Rhizogénèse directe : la différenciation de racines directement sur les explants.

Rhizogénèse indirecte : la différenciation de racines sur les cals produites au cours de la phase d'induction (Callogénèse) **Figure**.

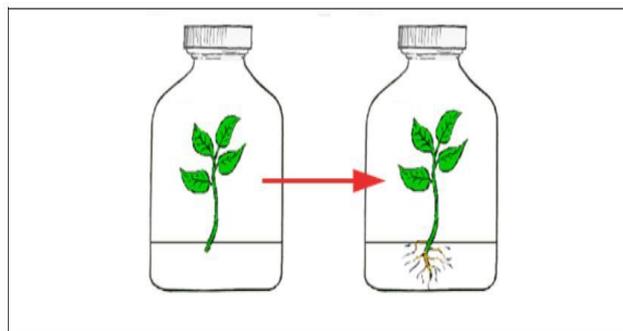


Figure. Néoformation et la croissance de racine (Rhizogénèse)

- Pour la réussite de rhizogénèse il faut assurer un équilibre hormonale:

Auxine/BAP (cytokinine) $\gg 1$: croissance des racines.

1. Principe de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est la formation d'embryons à partir de cellules somatique (non issues de la fusion des gamètes).

L'embryogenèse somatique permet de générer un embryon à partir d'un cal ou de suspensions cellulaires.

Cellules somatiques pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques (**Margara, 1984**).

Ces embryons peuvent se développer à partir des cellules à 2n chromosomes issues de tissus, organes ou cellules isolées.

Le développement de l'embryon ressemble étroitement à celui de l'embryon zygotique à la fois morphologiquement et physiologiquement avec: l'existence d'un axe polarisé terminé par un méristème de tige et un méristème de racine.

Son développement s'effectue selon une séquence de stades définis dont les principaux sont: le *stade globulaire, cordiforme, torpille, et cotylédonaire (figure)*.

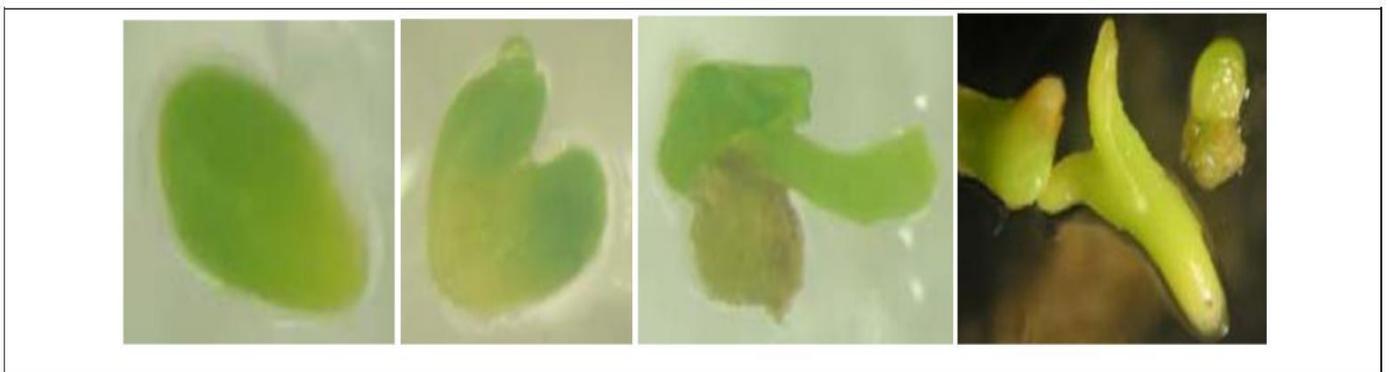


Figure. Stades de développement successifs au cours de l'embryogenèse (de gauche à droite): globulaire, cordiforme, torpille, cotylédonaire (*INRA Dijon, S Ochatt*)

2. Facteurs de l'embryogenèse somatique

- l'explant dans un premier temps placé dans un milieu primaire contenant de l'auxine où les cellules subissent un processus de différenciation.

Durant cette période, les cellules se multiplient pour former des amas globulaires ou amas proembryogène. Les cellules de ces amas sont caractérisées par un cytoplasme dense et une taille réduite.

- Après cette période d'initiation embryonnaire, le transfert dans un milieu secondaire sans auxine permettra le développement des embryons somatiques.

Ces structures sont hautement organisées et consistent soit en primordia racinaires soit en tissus méristématiques capables de régénérer des pousses feuillées et des racines (**Cure et Mott, 1978 ; Wernickeet al., 1982**) .

3. Modèles de l'embryogenèse somatique

3.1. Embryogenèse somatique directe

Dans ce cas, l'embryon apparaît directement sur l'explant mis en culture.

Ces embryons sont issus de cellules déjà prédéterminées.

L'environnement *in vitro* sert uniquement à déclencher le processus de divisions organisées menant à l'embryogenèse.

L'embryon peut se former au sein d'une masse qui peut être assimilée à un cal.

Sur le plan histologique cette masse est formée presque entièrement de proembryons.

Ce cas est généralement considéré comme faisant partie de l'embryogenèse directe.

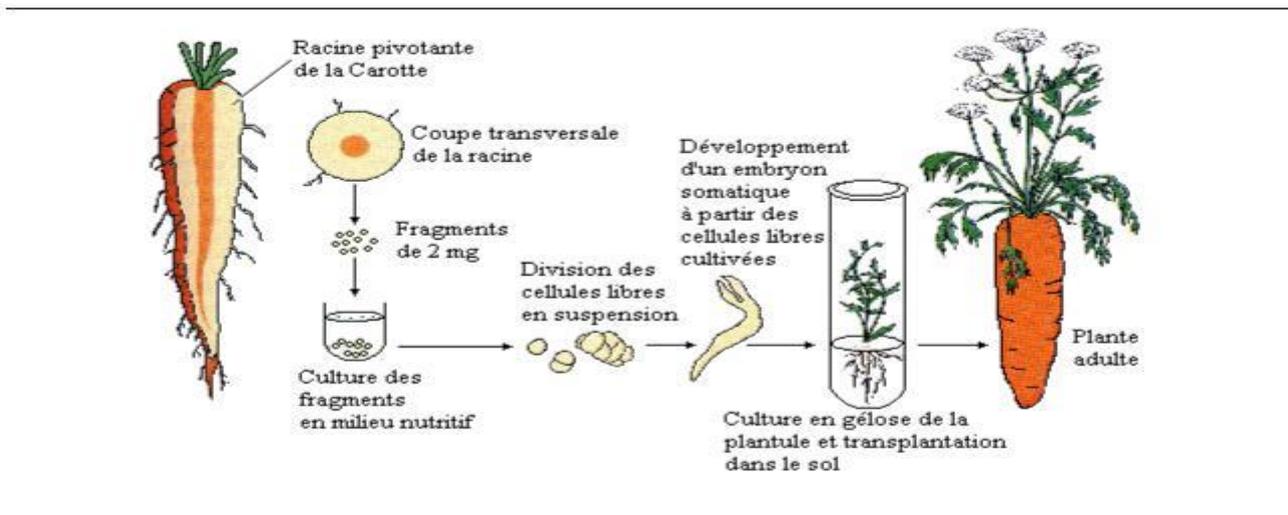


Figure. Induction de l'embryogenèse somatique directe

3.2. Embryogenèse somatique indirecte

Dans ce cas, une phase intermédiaire de callogénèse est nécessaire à l'embryogenèse.

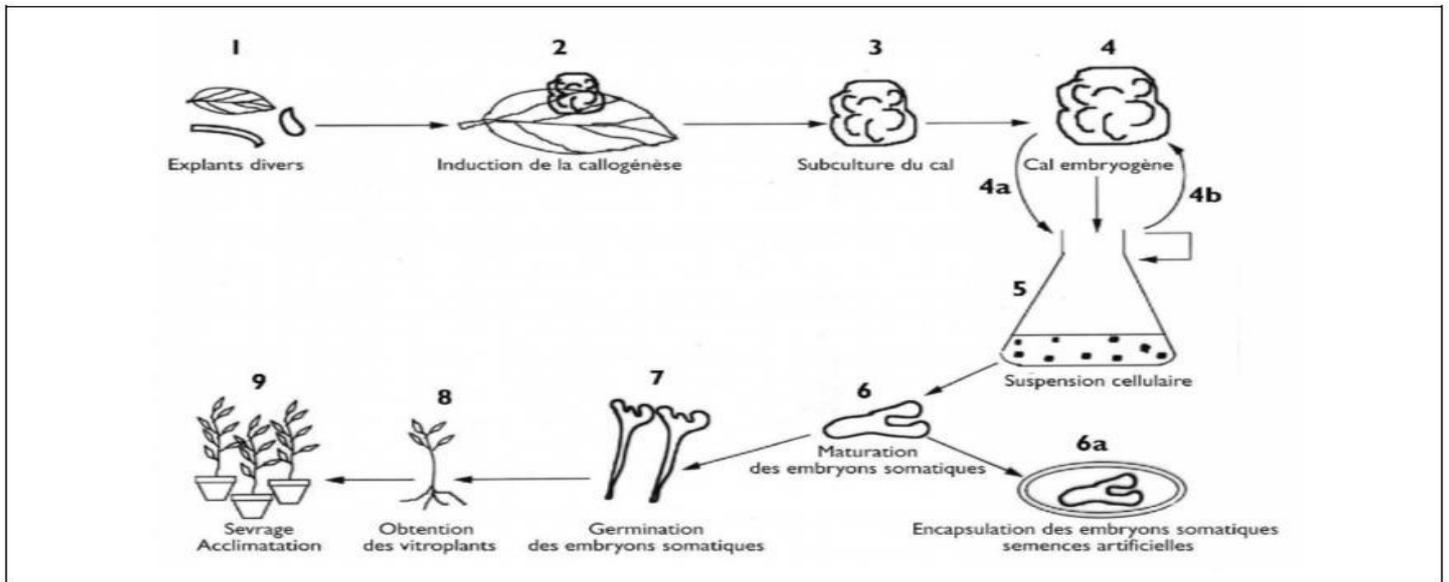


Figure. Induction de l'embryogenèse somatique indirecte

4. Evaluation de la différenciation embryonnaire

Les stades successifs du développement embryonnaire ont été définis par **Rijven (1952)** puis par **Ragavan et Torrey (1963)** ces stades sont indiqués sur le tableau.

Tableau: Evolution morphologique d'un embryon (**Rijven., 1952 ; Ragavan;Torrey., 1963**).

Longueur (µm)	Type
20-60	Globulaire jeune
60-80	Globulaire âgé
80-150	Cordiforme jeune
150-250	Cordiforme âgé
250-450	Pince
450-700	Torpille
700-1000	Canne
1000-1700	Fer à cheval
>1700	Embryon mûr

5. Maturation et conservation des embryons somatiques

Malgré l'abondance des embryons au stade globulaire et cordiforme rare sont ceux qui atteignent les stades supérieurs.

Les populations d'embryons ne sont pas uniformes, les embryons somatiques peuvent être transformés en semences artificielles. Ils sont enrobés par un gel composé d'alginate avec les éléments nutritifs nécessaires à la germination de l'embryon. L'ensemble est protégé de dessiccation par un film de résine soluble dans l'eau (polyox) (**Kitto et Janick., 1985**).

La durée de conservation est actuellement faible mais pourrait s'allonger par l'induction de la dormance. Actuellement les graines artificielles ne peuvent être conservées, à l'état humide et au froid, qu'une huitaine de jours. Il reste donc de nombreux problèmes à résoudre.

6. Applications de l'embryogenèse somatique

- Obtention de semences pour des variétés stériles (ex: pommes de terre polyploïdes, bananier...)
- Solution pour la conservation d'espèces tropicales dont les semences sont dites « récalcitrantes » à la déshydratation
- Obtention rapide de semences « d'élite » pour des espèces ligneuses
- Possibilité de cultures en réacteurs : production de semences artificielles à grande échelle (gymnospermes).
- Quelques espèces sont connues pour leurs fortes capacités embryogènes : carotte- chou fleur...

7. Avantage de l'embryogenèse somatique

- Peut être utilisée pour une production industrielle (culture des cellules en bioréacteur), car les embryons peuvent être induits à partir de cellules cultivées en suspension. Donc une technique de multiplication s'adapte à l'automatisation, ce qui permet de réduire les coûts de production.
- Le rendement en plantes produites est très élevé.
- Les embryons obtenus sont d'origine unicellulaire, il n'y a donc pas de problème de chimères.
- bon moyen pour produire des clones d'individus élites chez les ligneux.
- l'embryogenèse somatique est souvent utilisée pour le clonage surtout pour les espèces pour lesquelles le microbouturage est difficile voire impossible.
- C'est une technique très productive surtout en suspensions cellulaires.
- Les manipulations sont donc simplifiées par rapport à la micropropagation traditionnelle qui nécessite plusieurs milieux différents pour le développement des tiges et des racines et l'obtention de plantules complètes.
- les embryons peuvent être transformés en semences artificielles.

8. Inconvénients de l'embryogenèse somatique

- L'induction du potentiel embryogène et la régénération restent souvent difficile.
- Le passage par cal peut amener des risques de dérive génétique.
- Mains d'œuvre qualifiée.
- Cout élevé.

Chapitre IV :Potentialités organogénétiques du méristème végétatif en culture *in vitro*

1. Définition

Les **méristèmes** sont des zones de cellules à divisions intenses, situés au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et à l'origine des tiges feuillées ou du système racinaire. (**Espinoza et al., 1992**).

Cette technique est utilisée pour obtenir des plantes saines à partir des plantes virosés (**Auge, 1992**), surtout si il est associé à la thermothérapie (culture à température élevée, pour favoriser l'élimination des virus) (**Griffiths et al, 1990**).

La culture de méristèmes est une technique délicate et ne peut pas être considérée comme une technique de multiplication. Mais c'est une étape essentielle à la multiplication de matériel assaini.

2. Technique de la culture de méristème

- L'isolement des méristèmes se fait sous loupe binoculaire avec lumière froide pour éviter la dessiccation.
- La taille du méristème prélevé est de l'ordre de 0,2 à 0,5 mm.
 - En général plus le méristème prélevé est grand plus la probabilité de survie augmente et celle de l'assainissement diminue.
- La combinaison de la culture de méristèmes avec la thermothérapie permet d'augmenter la chance de réussite **Figure**.
- Méristèmes sont cultivés sur milieu MS additionné de phytohormones.

- La détection des virus peut se faire soit par indexage en greffant la plante supposée infectée sur des plantes indicatrices sensibles ou par détection sérologique de type ELISA ou Dot-ELISA (Feng et al., 2000).

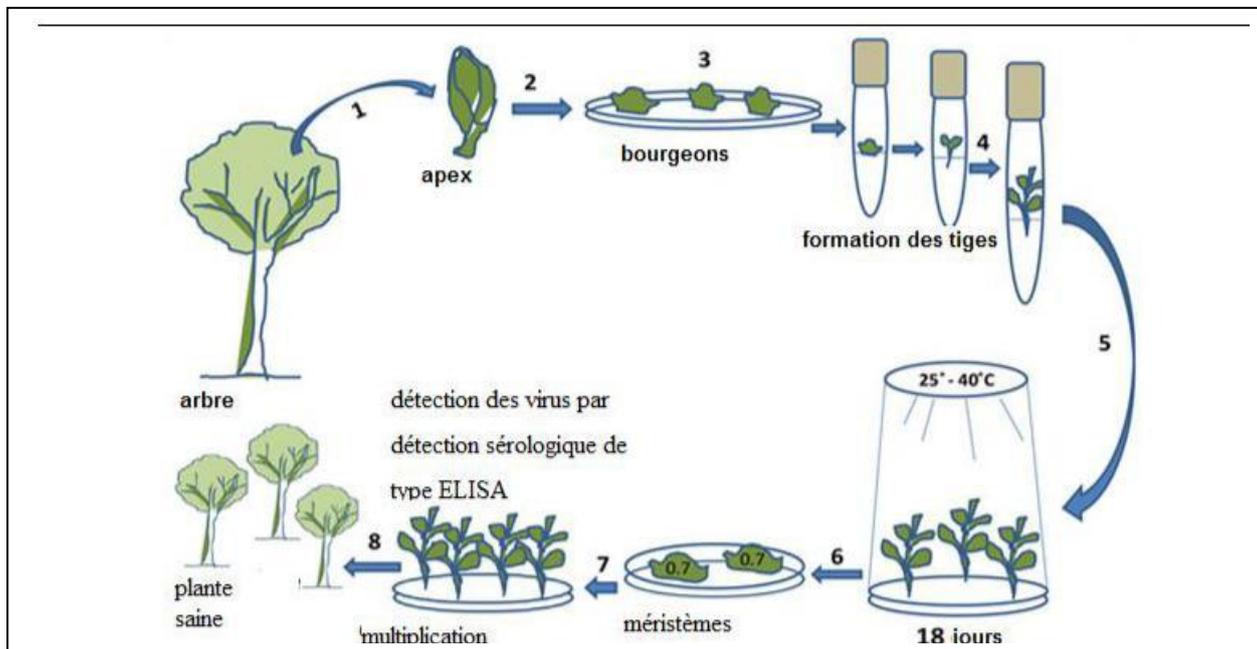


Figure. Culture de méristèmes avec la thermothérapie et la détection des virus par détection sérologique de type ELISA.

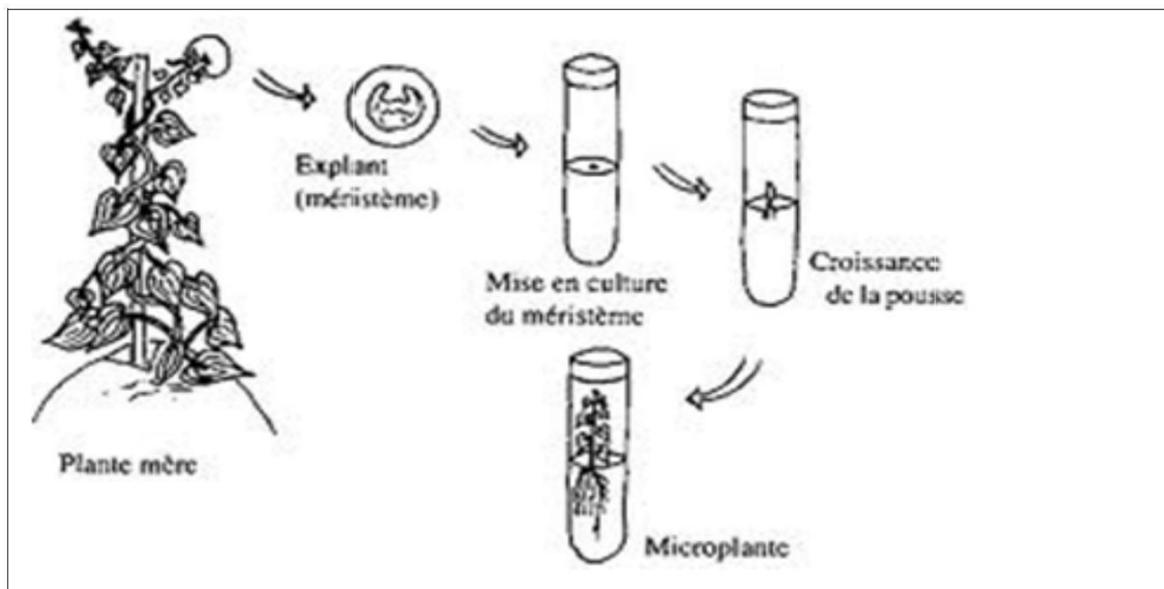


Figure. Régénération des plantes à partir la culture de méristème

3. Applications de la culture de méristème

De nombreuses variétés de diverses espèces ont été sauvegardées grâce à cette technique: pomme de terre (**Belle de Fontenay en 1954**), dahlias, fraisiers, vigne, iris, framboisiers etc.

Beaucoup de plantes horticoles de grande diffusion telle le *Pelargonium*, le *chrysanthème* etc. sont produites à partir de pieds mères qui ont été assainis par culture de méristèmes.

Il en est de même pour des espèces maraîchères tel *l'artichaut* ou encore le fraisier.

4. Avantages de la culture de méristème

- La culture de méristèmes permet le sauvetage des variétés virosées menacées.
- Elle concerne essentiellement les plantes à reproduction par voie végétative tels la pomme de terre, le fraisier, ...etc.
- Les plantes produites sont saines: sans virus, champignons et bactéries et répondent aux normes phytosanitaires d'échanges internationaux de plus en plus draconiennes.
- Les plantes assainies ont une vigueur accrue, et des qualités de floraison et de fructification restaurées.

5. Limites de la culture de méristème

- Les plantes obtenues sont indemnes de virus mais ne sont pas devenues résistantes aux virus. Elles peuvent être recontaminées via des insectes