

Chapitre 2. Clonage végétale et variation soma-clonale

2.1. Clonage végétale *in vitro*

1. Définition du clonage végétal

En biotechnologie, la micro bouturage ou micro propagation *clonale* en masse, est la multiplication *in vitro* des plantes par la culture de tissus pour produire des copies ou clones génétiquement semblables à la plante mère (Cottier et Guerry, 2000).

Les plantes obtenues sont appelées vitro plants et peuvent être dérivées à partir de la culture de nœuds, méristèmes ou apex suite à la morphogénèse (**organogénèse**) directe, ou bien par la formation d'**embryons somatiques** directe (**Figure 12**).

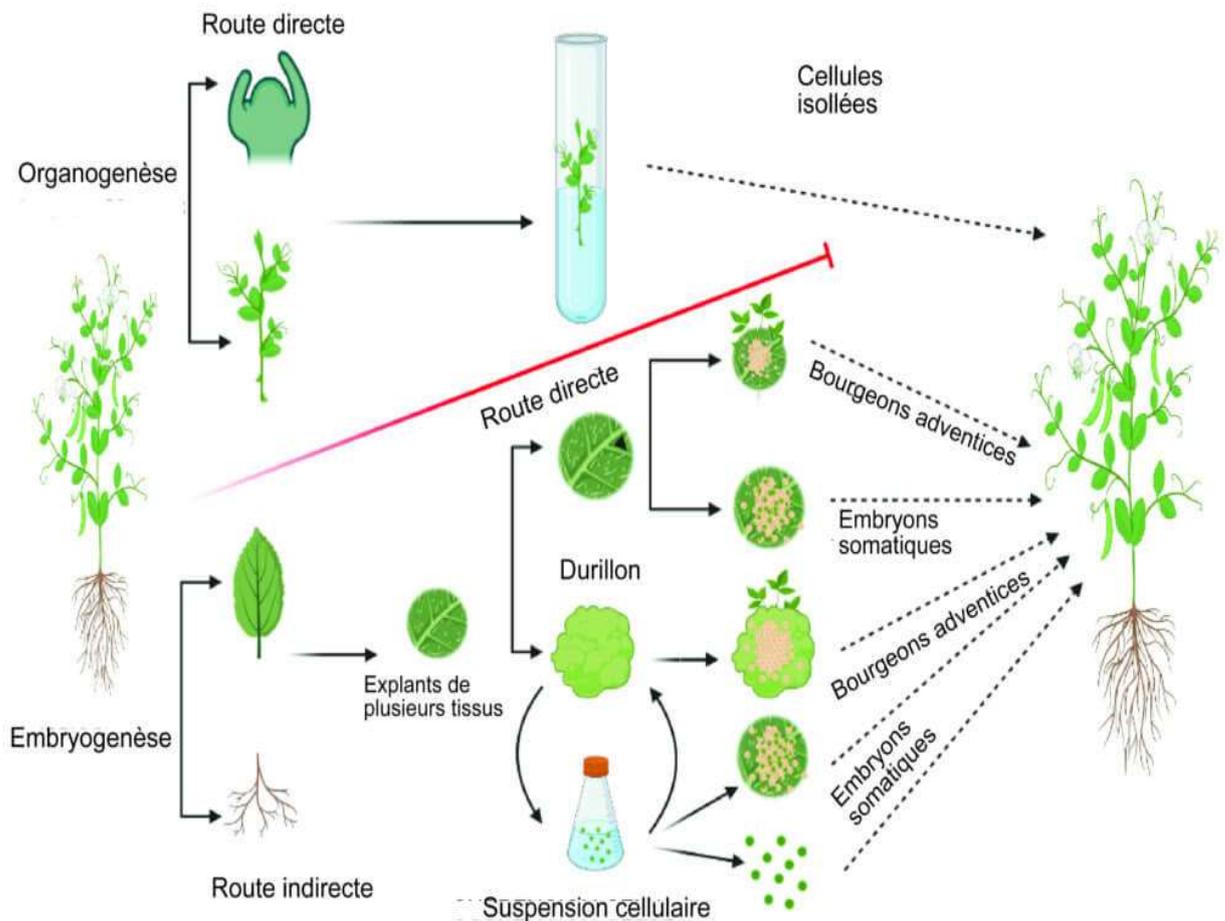


Figure 12. Principales méthodes de micro propagation (site web : Alchimia).

2. Micro propagation par organogénèse

L'organogénèse est le résultat de la régénération directe des méristèmes racinaires, des bourgeons axillaires et des cellules de bourgeons floraux en présence de phytohormones en très faible quantité. Son avantage est la formation directe des plantules sans le passage par une phase de dédifférenciation des cellules en formant des cals. Cette approche est très lente et le nombre de plantes obtenues reste limité par rapport à l'embryogenèse somatique car de nombreuses plantules ne survivent pas pendant l'étape d'enracinement (**Figure 13**).

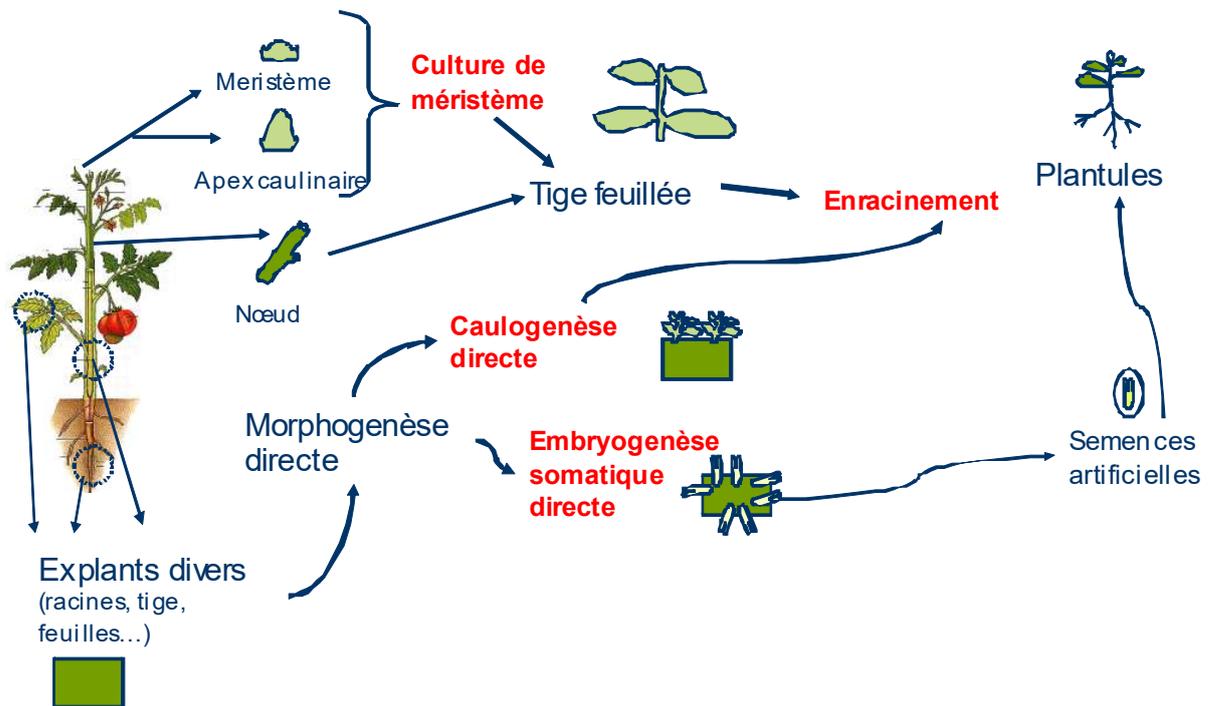


Figure 13. Principales méthodes du clonage végétal *in vitro*

L'organogénèse ou la micropropagation se divise en quatre étapes (stades) (Murashige, 1974).

Stade 0 : Conditionnement des plants mères

Le plant mère devrait être dépourvu de carences minérales et en pleine turgescence donc sans stress hydrique important. Au mieux et dans presque tous les cas, le plant devrait être en croissance active, donc mis en culture en dehors de sa période de dormance. Ceci limite dans le calendrier de production, les dates préférables de mises en culture pour le stade d'initiation. Mais, une fois *in vitro*, ces plants pourront être multipliés à l'année longue. Aussi les plants mères choisis le seront en fonction de leur état sanitaire.

Stade 1 : Établissement d'une culture aseptique : Durée 6 à 8 semaines

La littérature fournit souvent les premières informations essentielles au départ d'une culture. On trouve dans les livres ou revues spécialisés le détail des formulations (recettes) de milieux nutritifs convenant à de très nombreuses espèces végétales. Généralement les auteurs précisent aussi le protocole de désinfection de surface des explants ainsi qu'une description de l'explant mis en culture. Ce stade est de première importance puisqu'il comporte de nombreux facteurs critiques :

- Le choix du plant mère ;
- Le choix du fragment végétal à mettre en culture ;
- Une stérilisation de surface adéquate garantissant la survie de l'explant tout en assurant l'asepsie · La découpe de l'explant et sa position sur la gélose ;
- Le choix du milieu de culture qu'il est parfois nécessaire d'ajuster légèrement par la suite suivant la réponse de l'explant ;
- La qualité du travail en asepsie.

Dans plus de 50 % des cas, les premiers essais de mise en culture sont très satisfaisants et demandent très peu ou pas d'ajustements. Pour certains autres cas, la difficulté réside dans la désinfection des végétaux, pour d'autres dans l'ajustement de l'équilibre hormonal. Mais selon tous les auteurs, théoriquement tous les végétaux quels que soient leur espèce ou leur cultivar, peuvent être cultivés *in vitro*. Les explants les plus aptes à entreprendre une multiplication sont généralement riches en bourgeons ou en zones méristématiques potentielles. Ils varient selon les espèces :

- Les feuilles (ex. Ficus, Saintpaulia, Bégonia...);
- Les tiges (asperge, colza...);
- Les bourgeons (fraisier, vigne, lilas, bleuet...);
- Inflorescences (chou-fleur, gerbera, hosta, poireau ...).

La multiplication à partir de la croissance de bourgeons axillaires offre les meilleures chances de conserver les caractéristiques de l'espèce ou de la variété. En effet, cette technique ne fait qu'accélérer le fonctionnement normal des méristèmes de bourgeons déjà présents sur la plante. Par contre, on diminue les chances d'une stabilité génétique en provoquant l'apparition de bourgeons nouveaux (la plupart du temps à partir d'une cal, en des endroits inhabituels tels les feuilles, les tiges, les racines).

Stade 2 : La multiplication des tiges : Durée 4 à 5 semaines

Cette étape s'effectue au repiquage des plantules obtenues au stade précédent. On veut ici accroître le nombre de plants d'un facteur de 4 à 5 à chaque cycle chez les ligneux, et d'un facteur de 4 à 12 chez les herbacées. Le milieu nutritif utilisé est souvent identique à celui du premier, bien qu'une différence parfois mineure s'observe dans la balance hormonale (équilibre auxine-cytokinine). Au stade de la multiplication, les cytokinines sont généralement présentes en plus grande concentration dans le milieu que les auxines. Ceci s'explique d'un point de vue physiologique par le fait que les cytokinines s'opposent à la dominance apicale donc stimulent la croissance de nouvelles tiges. Encore une fois, la littérature fournit généralement les informations nécessaires nous permettant de fixer notre choix sur une formulation appropriée. La vitesse de croissance des plantes *in vitro* se module à celle *in situ*. Si l'espèce mise en culture est à croissance lente, on peut s'attendre à observer une croissance lente dans les tubes.

Stade 3 : La rhizogénèse (enracinement) : Durée 2 à 4 semaines

Cette étape se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de la multiplication. Il arrive parfois que des espèces présentent un système racinaire plus ou moins développé au stade de la multiplication. Dans ce cas, il serait avantageux de faire des essais pour le passage immédiat en acclimatation. On économise ainsi temps et argent s'il nous est possible de passer outre cette étape (ex. Bégonia, Saintpaulia, fougère). Toutefois, si ce stade s'avère nécessaire, le milieu de culture varie quelque peu des milieux précédents. Les sels minéraux et les vitamines demeurent généralement les mêmes. Mais dans le cas du rosier par exemple, on suggère de diminuer la concentration des sels minéraux de moitié.

La différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines. Des tiges très feuillées et bien pourvues de bourgeons s'enracineront assez facilement dans un milieu dépourvu de régulateurs de croissance.

Les jeunes feuilles et les bourgeons sont des sites naturels de production d'auxine et à l'image des boutures traditionnelles, ces jeunes plantules sauront s'enraciner d'elles-mêmes. Par contre, certaines espèces exigent l'apport d'auxines afin de stimuler l'initiation de leurs racines. Cette auxine est souvent fournie sous forme d'AIA.

Stade 4 : L'acclimatation : Durée 3 à 4 semaines

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à adapter progressivement les micro plantules aux conditions qui prévalent dans la serre ou à l'extérieur. Après avoir éliminé la gélose de la base des plants, ils sont transférés dans un substrat horticole. Les parties aériennes sont ensuite recouvertes de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine les 100 % d'humidité relative.

Les stomates de ces jeunes feuilles cultivées *in vitro* demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de transpiration de manière continue. Les risques de dessèchement sont très élevés. Aussi doit-on attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement.

3. Exemple de micro propagation de la pomme de terre

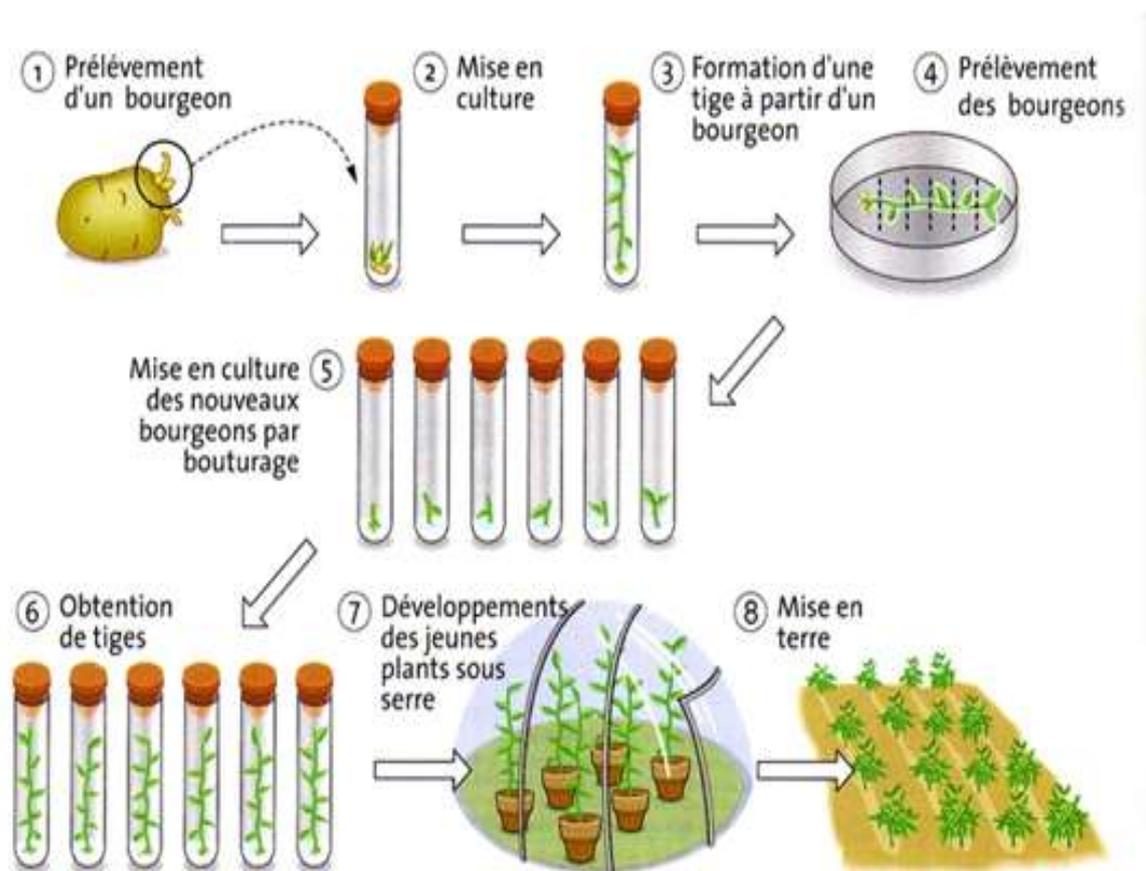


Figure 14 : Micro propagation de la pomme de terre par culture *in vitro*



Figure 15. Exemple des vitro plant de la pomme de terre

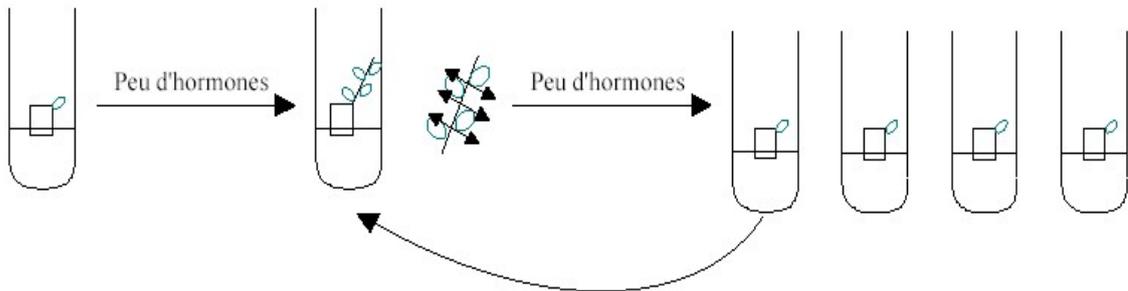


Figure 16. Culture simple de nœuds : le bouturage *in vitro*

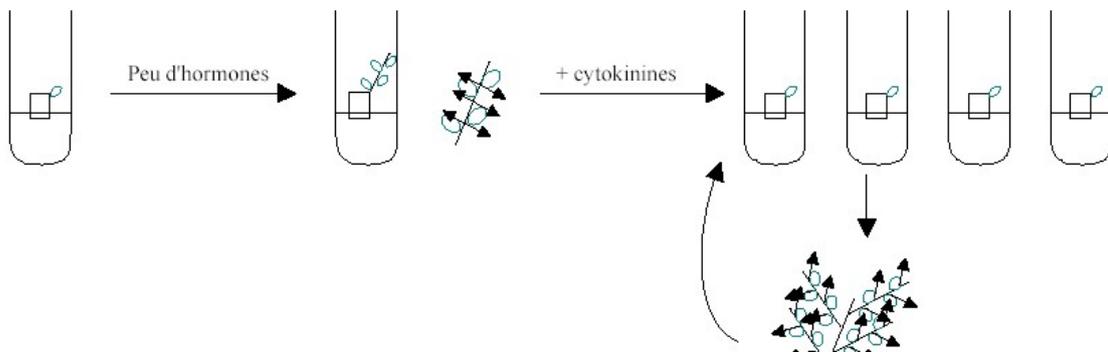


Figure 17. Prolifération de pousses axillaires

4. Avantages du clonage végétal

- Clonage très fidèle : 200 000 rosiers à partir d'un bourgeon, les plantes obtenues sont génétiquement identiques à la plante ou variété de départ,
- Clonage très efficace : production d'un grand nombre de plantes en un temps court.
- Les plantes obtenues sont de qualité : bon état sanitaire, enracinement régulier, nombreuses ramifications.
- Le volume de plantes nécessaire à la mise sur le marché des nouvelles variétés est plus rapidement atteint.

2.2. Variation somaclonale

1. Définition de la variation somaclonale

Durant la phase de callogénèse il peut faire des modifications génétiques aléatoire d'ADN, d'une source inconnue, et modification non habituelle dite la variation somaclonale (EL Hamdouni et al., 1999).

Donc c'est l'ensemble des modifications génétiques obtenues après le passage par les conditions du laboratoire. Et ce par l'apparition d'autre copie non conforme morphologiquement ou physiologiquement à la plante originale, les nouveaux phénomènes patterns nommé « phénovariant » ou « vitro variant » (Sibi, 1971),

D'après Nowbuth et al., (2005) on appelle variation somaclonale des modifications du phénotype des plantes qui apparaissent le plus souvent lors de la régénération de nouvelles plantules à partir de tissus déjà différenciés.

2. Principe de la variation somaclonale

*Callogenèse

Le cal est un amas cellulaire (n'a pas de forme précise) dont la croissance se fait de manière anarchique. Il y a plusieurs catégories de cals qui se distinguent par : couleur, aspect : lisse ou noduleux ou consistance : compact ou friable (**Figure 18**).



Figure18. Production de cals

Le cal est le tissu de néoformation produit par l'explant initial ou après des repiquages successifs. Pour la production de cals, on utilise généralement des explants dépourvus de méristèmes comme : morceaux de racines, feuilles, hypocotyles ou entrenœuds. Ou à partir de cals ou de protoplastes.

Dans un milieu renforcé par des régulateur de croissance, les embryons zygotiques et les méristèmes sont souvent utilisés pour la production de cals embryogènes.

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.

Embryogenèse somatique : ce sont des cals capables de former des embryons somatiques.

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.

3. 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 variation soma clonale peut être trouvée se forme :

1.Génotypique :

Génétiquement stable, circulant aux prochaines générations, 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.

Elle résulte selon **EL Hamdouni et al. 1999** par :

- Changement dans le nombre de chromosome,
- Aspect et inhabituel multitude des ploïdes.
- Changement dans la structure de chromosome et qui se produit par divers mécanismes :
 - *La coupure du chromosome en deux parties et ce par cassure interne.
 - *Elimination 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.

2.Phénotypique :

Epidémique non stable et éteint après la production sexué (**Skivin et al., 1994**), et ce par trouble physiologique ou l'amplification génique.

4. 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

5. 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 épigéniques

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**).

6. Etapes de la variation somaclonales

- Stimulation de production du cal
- Régénération des plantes.

7. Facteurs ayant une action sur la variation soma clonale

1. Matériel végétal

On peut obtenir une variation somaclonale à partir du cal formé, de n'importe quel explant (feuille, tige et racine...) mais l'influence reste liée à la nature de l'explant, et l'aspect physiologique. 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, ont observé que la variation génétique se fait boucaux dans les individus multiploïde par rapport les monoploïde et diploïde.

2. Durée de la culture de tissus

Selon **Demarly et Sibi, 1989**, la moyenne des mutations liée au nombre des transformations dans les conditions de laboratoire. La lente croissance stimule la production de nombreuse variation somaclonale.

3. Milieu de culture

La production des cals lié a la balance de régulateur de croissance, et qui différencie selon la nature de l'explant et la variété étudiée, lorsque les programmes morphogénétiques différencient selon le pourcentage de cytokinine/ auxine, à travers la balance hormonale on peut obtenus sur la forme organique (**Anjum et Ali, 2004**), le travail de régulateur de croissance exactement dans l'événement des modifications somaclonales reste inconnu (**Figure19**).

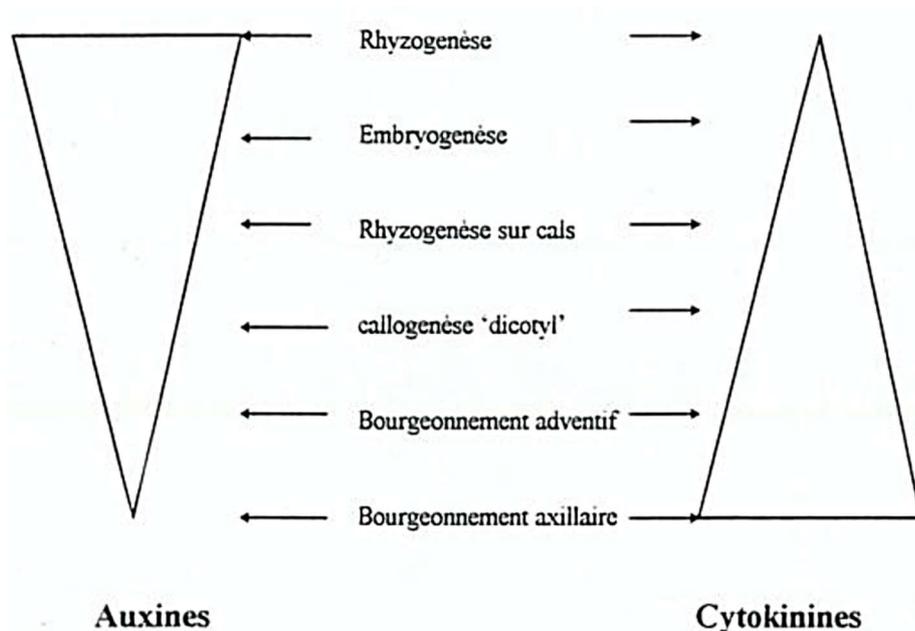


Figure 19. Type d'organogénèses contrôlés par les concentrations relatives d'auxines et de cytokinines (**Zryd, 1988**).

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.

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

8. Avantages de la variation somaclonale

- Un grand nombre de mutations
- Source de la diversité qui utilisé par fois dans la sélection et l'amélioration.
- Peu coûteux par rapport à l'hybridation somatique et la transformation génétique.
- N'est pas important de savoir la base des changements génétiques.
- Certaines variations sont intéressantes et enrichir la base génétique de la plante.
- Certains variants sont résistants à certains stress (salinité, sécheresse ou pathogènes).

9. Inconvénients de la variation somaclonale

- L'absence de contrôle sur la quantité, le lieu et l'importance des mutations qui se produisent, et les facteurs qui la concernent.
- L'émergence de changement inattendu.
- Faible stabilité des caractéristiques obtenues et qui disparaissent prochainement.
- Obtenir les caractéristiques de la plante désirée un peut être garantie.
- Dans un nombre de plante améliorée, l'analyse et le contrôle de la variation somaclonale reste difficile.
- La variation somaclonale est un facteur limitant pour le clonage commercial.
- Certaines techniques très rentables comme l'organogenèse ou l'embryogenèse somatique ont encore un impact commercial limité à cause du risque de variations.
- Ces techniques sont choisies lorsque les techniques de multiplication conformes sont difficiles (palmier dattier) ou impossibles (palmier à huile).

