

**COURS DE**  
**BIOTECHNOLOGIE**  
**VEGETALE**  
*CULTURE IN VITRO*

**(Cours : module biotechnologies végétales  
Module M 33  
Pr Guédira )**

**10 h:**

**techniques de culture *in vitro***

**(Pr Guédira)**

**5h:**

**Amélioration classique**

**(Pr Triqui)**

**6 h :**

**transformation génétique**

**(Pr Bendaou)**

# 1. Définitions

- a) **La biotechnologie** est ensemble de techniques biologiques appliquées pour la production de la biomasse à partir de cellules animales ou végétales.

**b) Les biotechnologies végétales sont des biotechnologies – techniques industrielles- où le matériel végétal constitue la matière première.**

**c) Les biotechnologies végétales utilisent la culture des tissus végétaux afin d'améliorer la production agricole ou industrielle.**

**Elles permettent l'amélioration et la production des plantes .**

**Les principaux buts des biotechnologies végétales sont :**

➤ **La multiplication massive de plantes saines et/ ou hybrides avec éventuellement une production commerciale.**

➤ **la création de nouveaux génotypes**  
**par:**

- **Sélection de variants somaclonaux ou gamétoclonaux intéressants présentant des caractères de résistance aux stress biotiques ou abiotiques).**
- **Haplométhodes (gamètes)**
- **fusion de protoplastes**
- **transformation génétique**

➤ **Utilisation des cellules végétales pour la production massive de molécules à forte valeur ajoutée**  
**métabolites secondaires:**  
**médicaments, biocarburants (alcool canne à sucre).....**

# La culture des tissus :

terme général pour  
indiquer la culture  
aseptique et *in vitro*  
d'un explant.

## **Un explant:**

- \* **graine**
- \* **organe** (feuille, racine...)
- \* **morceau d'organe**
- \* **un tissu**(méristème, épiderme,  
phloème ....)
  
- \* **cellule**
- \* **protoplaste**

## Deux types de cellules

### 1. Cellules meristématiques:

- petites isodiamétriques ,
  - N/C élevé,
  - mitoses actives
- pas de méats intercellulaires.

## 2. Différenciation cellulaire:

spécialisation de **la forme** et de la **fonction**

Au niveau de la cellule avec l'âge.

**Cellules grandes fonctions**

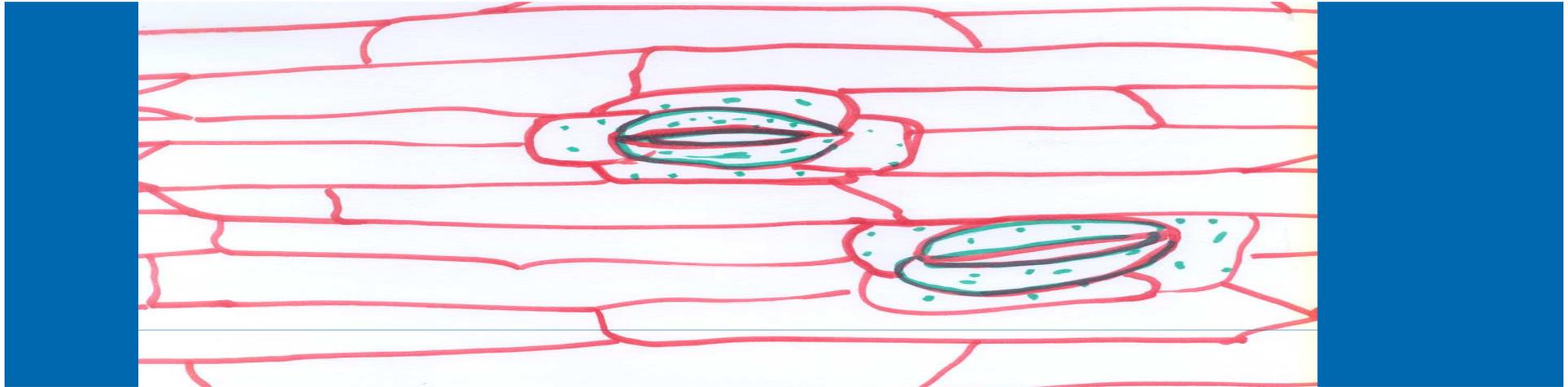
**précise**

**peu ou pas de division.**

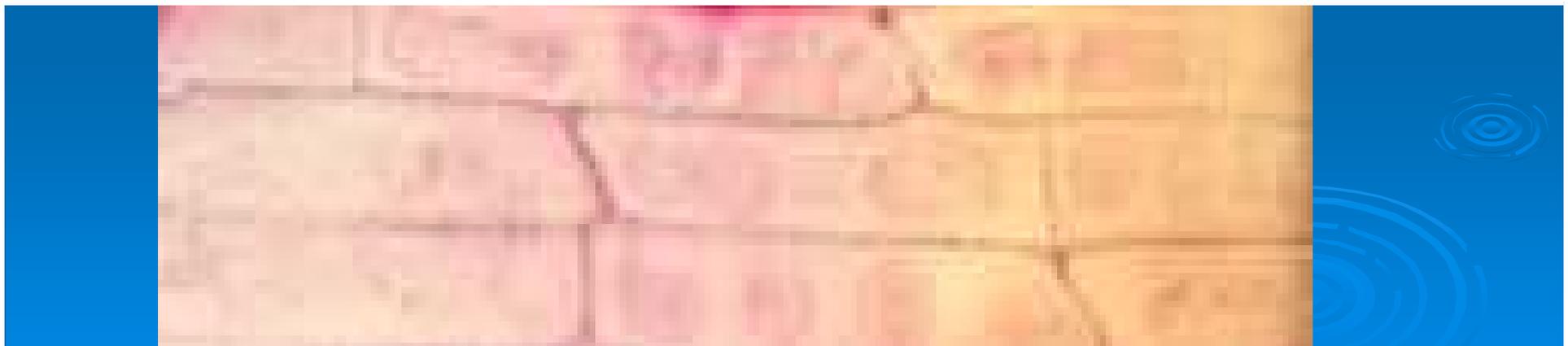
# Dédifférenciation

cellulaire: les cellules différenciées peuvent se transformer en cellule non différenciée grâce à la culture in vitro

# Epiderme de l'hypocotyle du lin cellules différenciées témoin

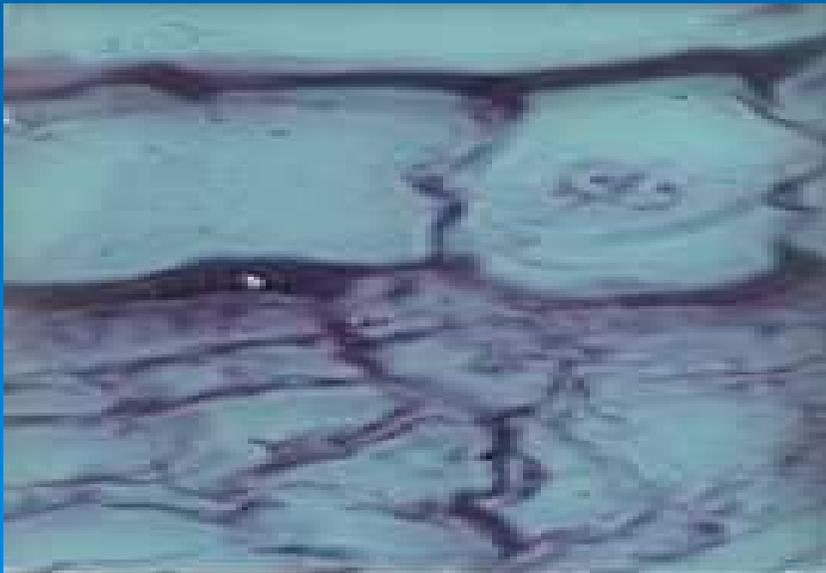
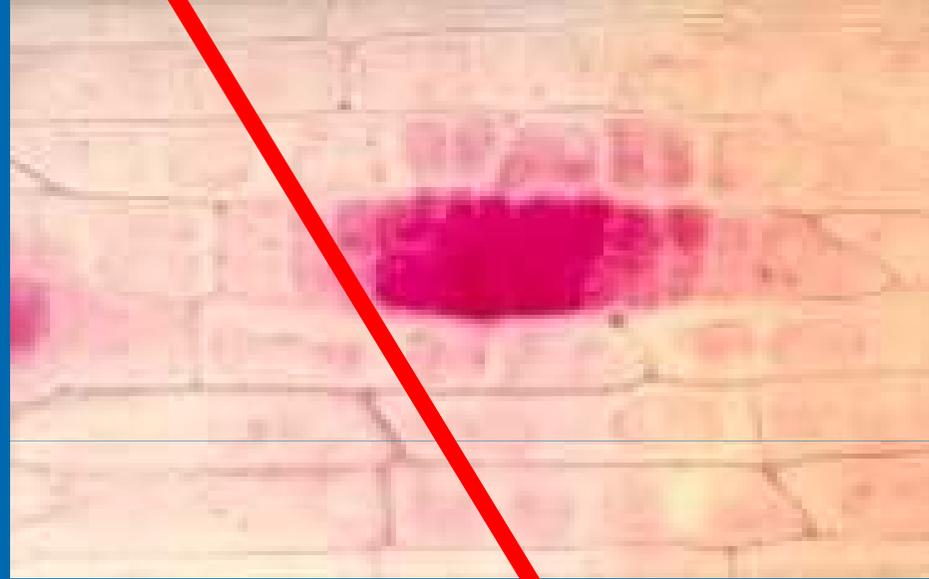
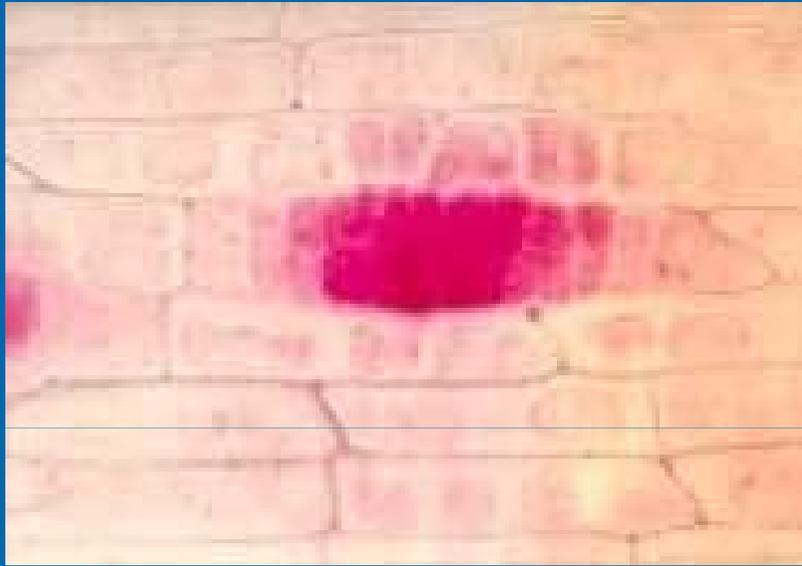


**Epiderme au début du traitement avec la BAP**



**DEBUT DE DIVISION DES NOYAUX**

# FORMATION DE CELLULES MERISTEMATIQUES



**La culture in vitro** : se base sur la **propriété de la dédifférenciation** cellulaire **imposée** par la culture **in vitro**

**Totipotence:** aptitude de la cellule végétale à exprimer la totalité de ses potentialités pour donner **un organisme entier.**

## La totipotentialité cellulaire

s'accompagne par **multiplication indéfinie** que l'on peut observer dans les zones de croissance de la plante : **les méristèmes**, cellules **restant** dans un état de **dédifférenciation permanent**.

## **2. Historique de la CULTURE IN VITRO**

**1902 HABERLANDT :**

**pensait isoler des cellules  
puis les rassembler pour  
constituer un tissu**

**1934 White (USA):**

**croissance indéfinie de  
pointe de racine de tomate  
(macro et micro+ vit B1  
et B2)**

**1939 WHITE :**

**prolifération cellulaire  
tomate (macro et micro-  
vit B1 et B2 et auxine).**

### **3. Caractéristiques des techniques de la culture des in vitro**

**a. Asepsie:** en absence de microbes qui peuvent envahir le milieu et introduire des éléments inconnus (toxines) dans le milieu de culture

**Présence de matières organiques dans le milieu**



**Risque de prolifération de contaminants**



**Nécessité de l'asepsie**



**Maintien de la propreté du laboratoire**



**Stérilisation des milieux par autoclavage ou ultrafiltration**



**Mise en culture dans des conditions aseptiques**



## **Autoclave**

**Stérilisation des  
milieux**

**à la vapeur d'eau  
par autoclavage  
1 bar(120°C)  
pendant 20 mn**



**Stérilisation des  
milieux de culture  
par **filtration : filtre  
millipore 22 $\mu$ m**  
pour les substance  
thermolabile  
(zéatine... vitamines  
....)**



## **Mise en culture:** **flux laminaire:**

paillasse balayée par l'air filtré stérilisé Le manipulateur doit **rincer ses mains avec une solution antiseptique**. Il faut aussi éviter toutes les actions pouvant amener des contaminants comme la **parole, la toux Etc.**



**Tous les  
instruments  
utilisés  
doivent être  
flambés  
après  
immersion à  
l'alcool**



**Verrerie,  
papiers... à  
l'étuve  
180°C (à  
sec) pendant  
2h**

# Stérilisation du matériel végétal

Méthode dépend:

- des conditions de culture de la plante mère,
- explant réside ou non,
- âge, état sanitaire, proximité du sol, **type de pathogènes**

---

# **Produit utilisés pour une désinfection superficielle (externe)**

**Laver bien à l'eau puis**

**-rinçage rapide dans l'alcool 70 °C**

**-Hypochlorite de Ca ou de Na  
20mn puis rinçage**

---

## Exemples de traitements pour la stérilisation

organes	prétraitements	traitements	Post-traitements
semences	Immersion Alcool 70°C 10'-20'	Ca(ClO) <sub>2</sub> 10% 20-30'	3 lavages eau stérile
fruits fleurs	Laver avec coton imbibé Alcool 70°C	Na(ClO) <sub>2</sub> 2% 10'	idem
tiges	Eau courante Puis frotter avec coton imbibé Alcool 70°C	Na(ClO) <sub>2</sub> 2% 5-30'	idem
Organes de réserves	Eau courante (long temps)	Na(ClO) <sub>2</sub> 2% 20-30'	idem
feuilles	Laver rapide Alcool 70°C	Hgcl <sub>2</sub> 0,1% 1' (chlorure de mercure)	6 lavages

**-Utilisation des antibiotiques dans le cas infections bactériennes externe :**

**Pénicilline  
Rifampicine**

**Infections bactériennes interne :  
antibiotiques dans le milieu de culture ( problème: variants)**

## **b. Milieu de culture:**

**La composition du milieu de culture est totalement connue:**

**La composition du milieu de culture dépend de beaucoup de facteurs dont les plus importants sont : le matériel végétal (espèce, variété, cultivar. .Etc.), le type d'explant (taille), l'objectif de la culture.**

Tableau 2 ■ Composition des milieux de culture utilisés pour les différentes techniques de micropropagation de *Sequoiadendron giganteum* (en mg · L<sup>-1</sup>).

Constituants	Milieux						
	PG	LP/2	LP/4	MM	M20	RIM	REM
<b>Macroéléments</b>							
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	200	100	825	825	—	—
KNO <sub>3</sub>	1900	900	450	950	950	250	250
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	—	—	220	220	—	—
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	180	90	185	185	250	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	135	67	85	85	250	250
KCl	—	—	—	—	—	—	—
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	—	—
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	—	600	300	—	—	1000	1000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	—	—
NaNO <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—
<b>Microéléments</b>							
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,85	27,85	13,9	27,85	27,85	13,9	13,9
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25	37,25	18,6	37,25	37,25	18,6	18,6
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,012	0,012
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,012	0,012
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	11,2	11,2
KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,41	0,41
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,012	0,012
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	4,3	4,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	3,1	3,1
<b>Autres</b>							
Myo-inositol	—	100	50	50	50	50	50
Glycine	—	2	2	2	2	2	2
Thiamine-HCl	—	1	1	1	1	1	1
Pyridoxine-HCl	—	1	1	1	1	1	1
Acide nicotinique	—	1	1	1	1	1	1
BAP	—	—	—	0,1 à 0,5	—	0,01	—
ANA	—	0,1	—	0,01	—	1	—
Saccharose	30 000	30 000	30 000	30 000	30 000	5 000	30 000
Charbon actif	—	—	—	—	—	—	—
(Merck 2186)	—	—	—	—	20 000	—	—
Gelrite	—	3 000	3 000	3 000	3 000	3 000	3 000

## En général, le milieu comprend:

- **L'eau et les sels minéraux** essentiels. Le milieu de Murashige et Skoog en 1962 est le plus largement utilisé.
- **Les matières organiques** comprenant un sucre et des vitamines.
- **Des régulateurs de croissance.**
- **Le pH** du milieu est en général ajusté vers 5.8 par quelques gouttes de NaOH ou HCl.
- **Un gélifiant** pour maintenir l'explant en surface.

**Certaines espèces nécessitent de fortes teneurs en ions pour pousser, tandis que d'autres connaissent des toxicités aux sels**

<b>Macro-éléments</b>	<b>MS</b>		<b>mg/l</b>	<b>g/l S. mère</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	-	-	<b>1650</b>	<b>33,0</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	-	-	<b>1900</b>	<b>38,0</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O</b>	-	-	<b>440</b>	<b>8,8</b>
<b>MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O</b>	-	-	<b>370</b>	<b>7,4</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	-	-	<b>170</b>	<b>3,4</b>

**Micro-éléments****milieu****solution-mère  
(mg/l)****(x xxx) g/l**

<b>H3BO3</b>	-	-	-	-	<b>6,2</b>	-	-	<b>620,0</b>
<b>MnSO4 .4H2O</b>	-	-	-	-	<b>22,3</b>	-	-	<b>2230,0</b>
<b>ZnSO4 .4H2O</b>	-	-	-	-	<b>8,6</b>	-	-	<b>860,0</b>
<b>KI</b>	-	-	-	-	<b>0,83</b>	-	-	<b>83,0</b>
<b>Na2MoO4 .2H2O</b>	-	-	-	-	<b>0,25</b>	-	-	<b>25,0</b>
<b>CuSO4.5H2O</b>	-	-	-	-	<b>0,025-</b>	-	-	<b>2,5</b>
<b>CoCl2 .6H2O</b>	-	-	-	-	<b>0,025-</b>	-	-	<b>2,5</b>

**FeSO<sub>4</sub> ;7H<sub>2</sub>O**

**27,8**

**2780,0**

**Na<sub>2</sub>EDTA**

**37,3**

**3730,0**

**Les régulateurs de croissance :**

**Les auxines et les cytokinines sont les plus utilisés**

**L'AUXINE**

1926, Went : Découverte d'une substance de croissance, **l'acide indole acétique : AIA**

**Stimulation de l'élongation cellulaire, de la rhyzogenèse (racines).**

La **synthèse** de l'auxine s'effectue dans les apex méristématiques des tiges, et dans les jeunes feuilles des bourgeons terminaux.

Le **transport** de l'auxine s'effectue de façon polarisée, de l'apex vers la base dans la tige.

# LES CYTOKININES

**1941: Blakeslee, essaie de créer des hybrides entre différentes espèces de Datura, les embryons meurent.**

L'utilisation **de lait de coco** (un albumen liquide) permet de les faire développer *in vitro*

**1948: le lait de coco, active la prolifération plus que l'auxine et permet la culture de tissus ne répondant pas à l'auxine**

**1962: la molécule active du lait de coco a les caractéristiques d'une base nucléique**

**Indépendamment Skoog et Miller 1957,**

**Isolement de la kinétine d'extrait de  
levure,**

**Zéatine d'albumen de maïs,**

**zéatine de lait de coco en 1974 .**

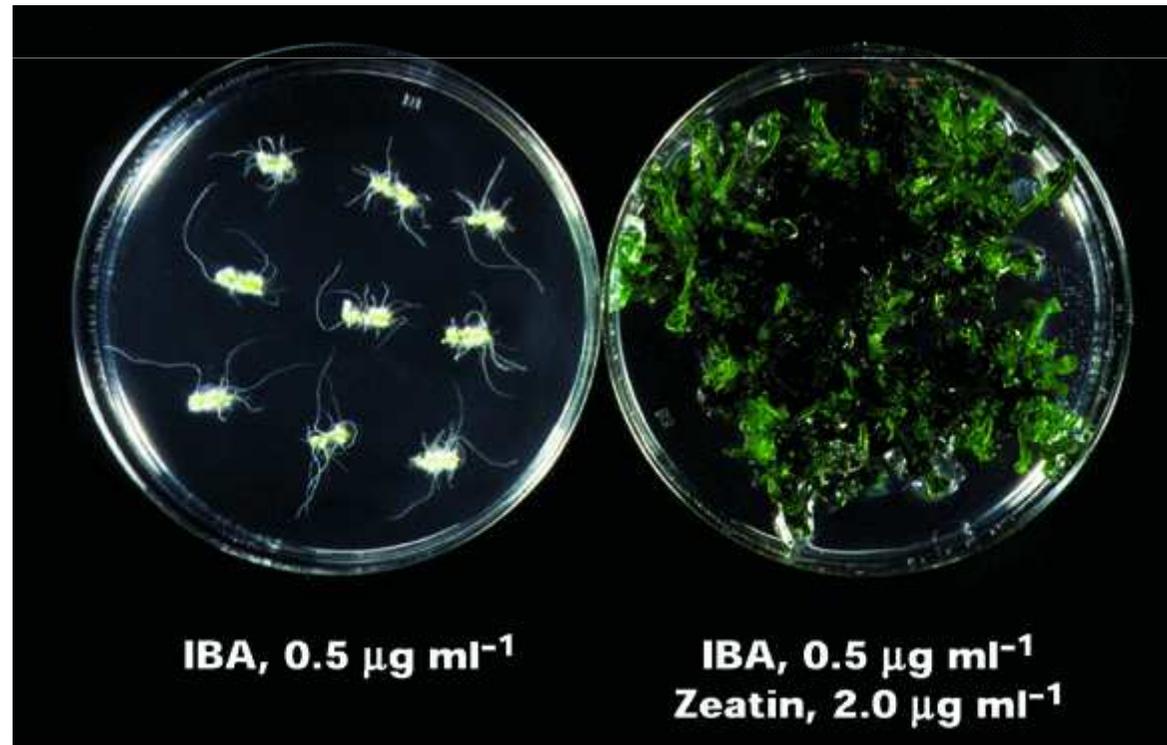
**kinétine** *Stimule la division  
cellulaire et l'organogénèse  
Synthèse dans les racines  
puis migrent dans la plante  
via la sève brute (xylème)*

## Rôle des auxines et des cytokinines dans l'organogenèse

Le rapport auxines / cytokinines détermine le devenir des tissus en culture,

Notion de balance hormonale

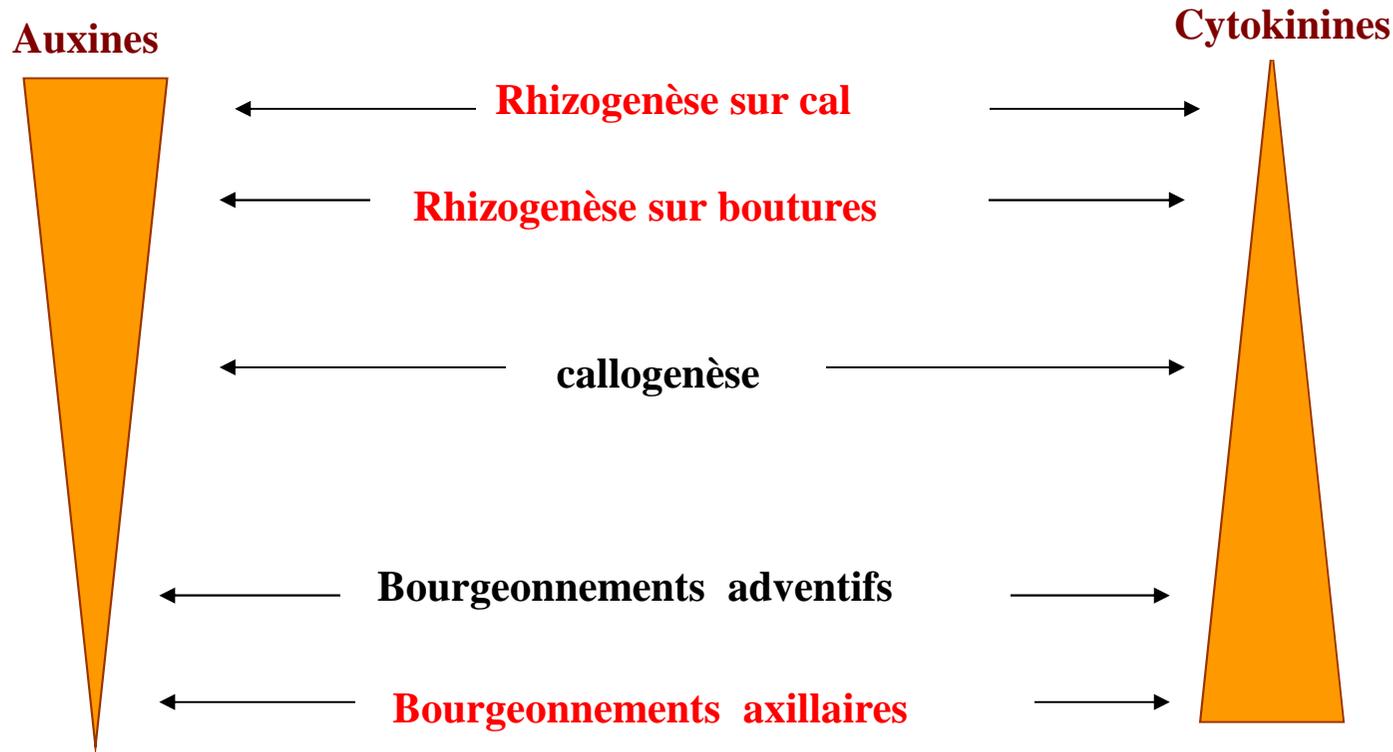
- En **concentrations égales**->**division** de cellules indifférenciées
- **Auxine** -> formation de racines
- **Cytokinines** -> bourgeons



**Exemple d'organogenèse contrôlée par des concentrations relatives d'auxines et de cytokinines**  
**Hypocotyle du lin**

- **Fortes [auxines]** associées ou non à **faibles [cytokinines]**, favorisent la formation de **racines sur cal** ainsi que **l'enracinement** des tiges feuillées
- **Fortes [cytokinines] + faibles [auxines]**, favorisent développement des **bourgeons axillaires ou adventifs** et donc la **multiplication** des plantes.

- [Auxines & Cytok ] équilibrées : prolifération anarchique (cal) de cellules qui ne peuvent s'organiser en tissus et organes distincts.



## ■ **Incubation des cultures**

Les cultures sont incubées dans une salle climatisée qui permet de stabiliser les facteurs suivants:

- **La température:** stable.
- **La lumière:** intensité, photopériode.
- **Humidité** relative parfois même si c'est souvent un facteur secondaire.

**Les chambres de culture sont souvent des salles climatisées équipées d'étagères en bois surmontées de tubes de néon.**

# SALLE DE CULTURE





**Sevrage des plants après sortie des tubes (humidité élevée température contrôlée aux premiers jours)**

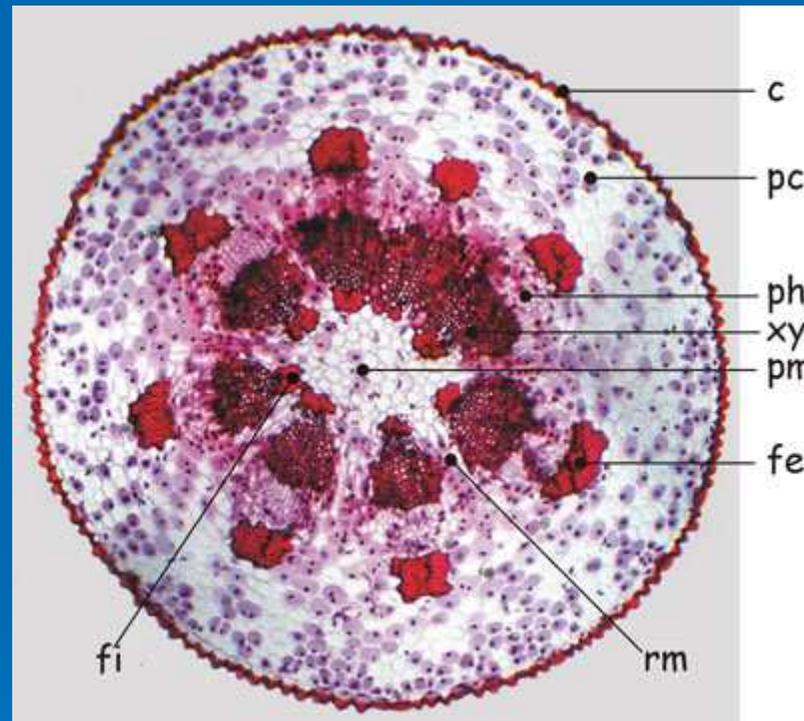
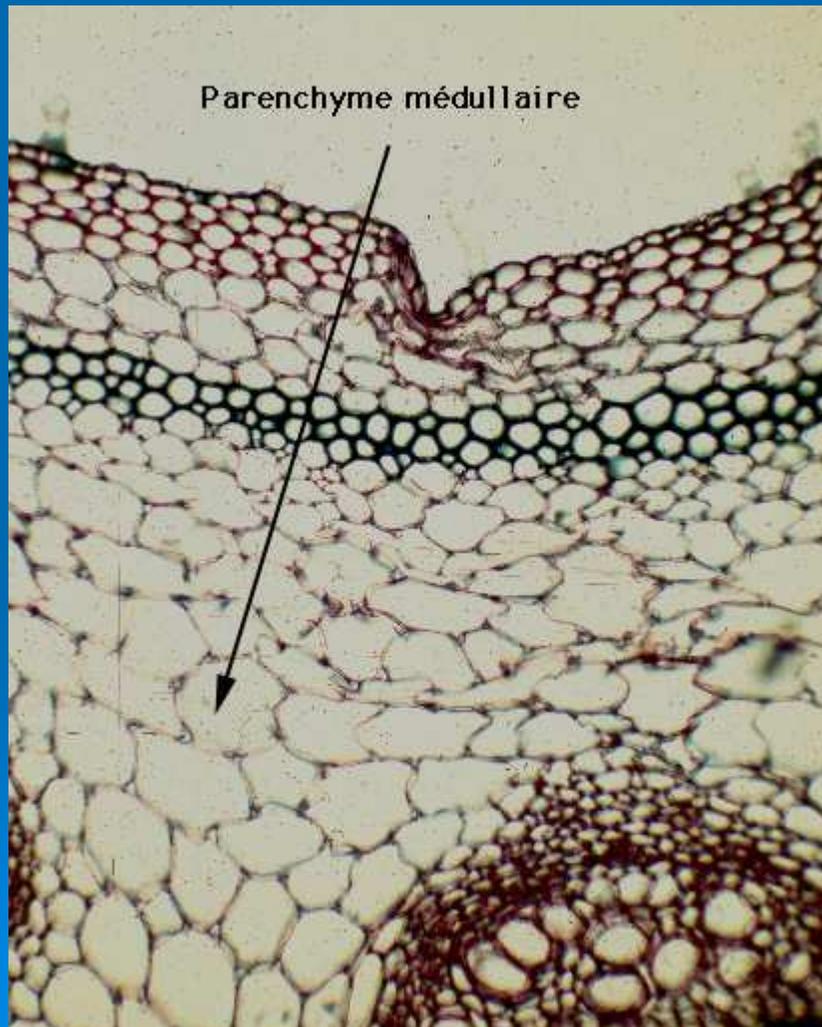
# Comparaison culture *in vitro* / culture *in situ*

Culture *in vitro*: les *facteurs biotiques* ont disparu (*asepsie*)

Culture *in vitro* : différences physiologiques, peu de synthèse *de vitamines* et pas ou peu *de photosynthèse*, *miniaturisation des plantes*

Culture *in vitro*: teneur plus importante en eau = *vitrification*, pas de cuticule

## 4. Régulation de la croissance d'un tissu simple : moelle de tabac



**Cellules différenciées  
peu actives**

**Cellules de moelle / cellule avec grande vacuole/ turgescente maintiennent le port de la tige**

**1954 Naylor et Skoog**

**AIA+ Moelle tabac: après 3 jours  
: division nucléaire pas de cytotodiérèse avec élargissement cellulaire**

**1954 Jablonski et Skoog**

**AIA seul +moelle +elts vasculaires: division cellulaire complète**

**1957**

**moelle de tabac+ KIN: 20%** des noyaux se divisent+ synthèse ADN+ division nucléaire

**Moelle + AIA : 50%** de division des noyaux + synthèse ADN

**Moelle +AIA+KIN: 100%** synthèse ADN + division des noyaux +division cellulaire donc prolifération cell donc grandissement des tissus

**Donc il faut AIA+ KIN  
pour la prolifération  
des tissus**

## 5. Inhibition de l'organogenèse

### Action GA3 In vivo:

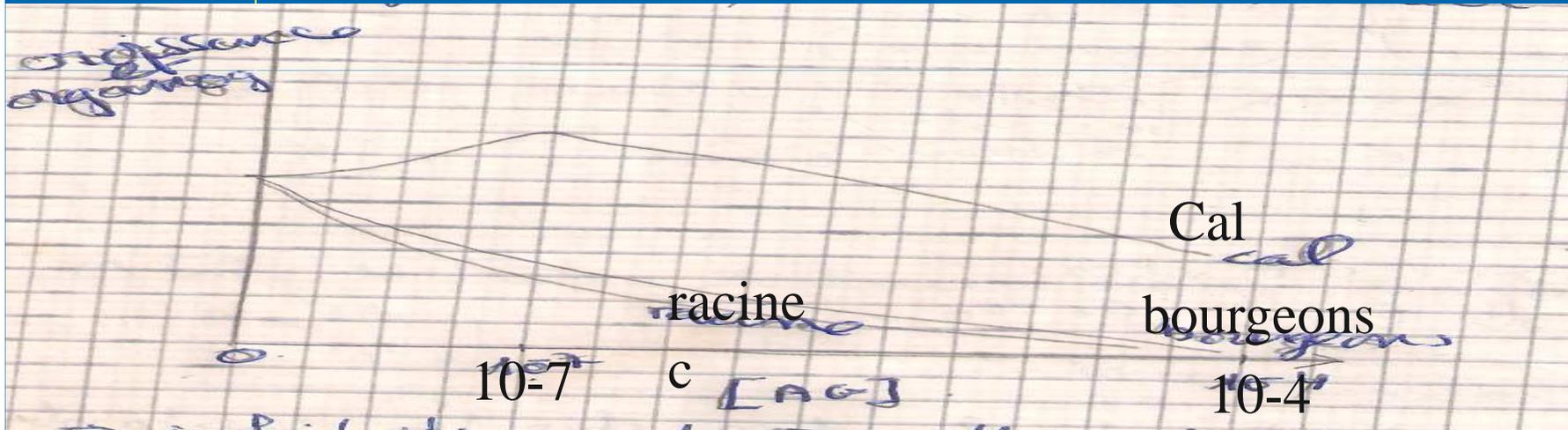
- Elongation
- Germination (hydrolyse d'amidon)

### Action GA3 In vitro

Skoog 1964

- Moelle de tabac+ AIA+KIN: bourgeons + racines
- Moelle de tabac+ AIA+KIN+GA3: cals donc **inhibition de l'organogenèse** avec stimulation de la prolifération

# Organogenèse ou callogenèse



Concentration en GA3

# 6. Les techniques de multiplication

Deux types de techniques

```
graph LR; A[Deux types de techniques] --> B[Techniques de multiplication conforme]; A --> C[Techniques de multiplication non conforme];
```

**Techniques de multiplication conforme:**

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

**Techniques de multiplication non conforme:**

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

## 6.1. la micropropagation

a) A partir de la culture de nœuds ou de bourgeons

- Cette technique appelée aussi **microbouturage** est la plus utilisée .

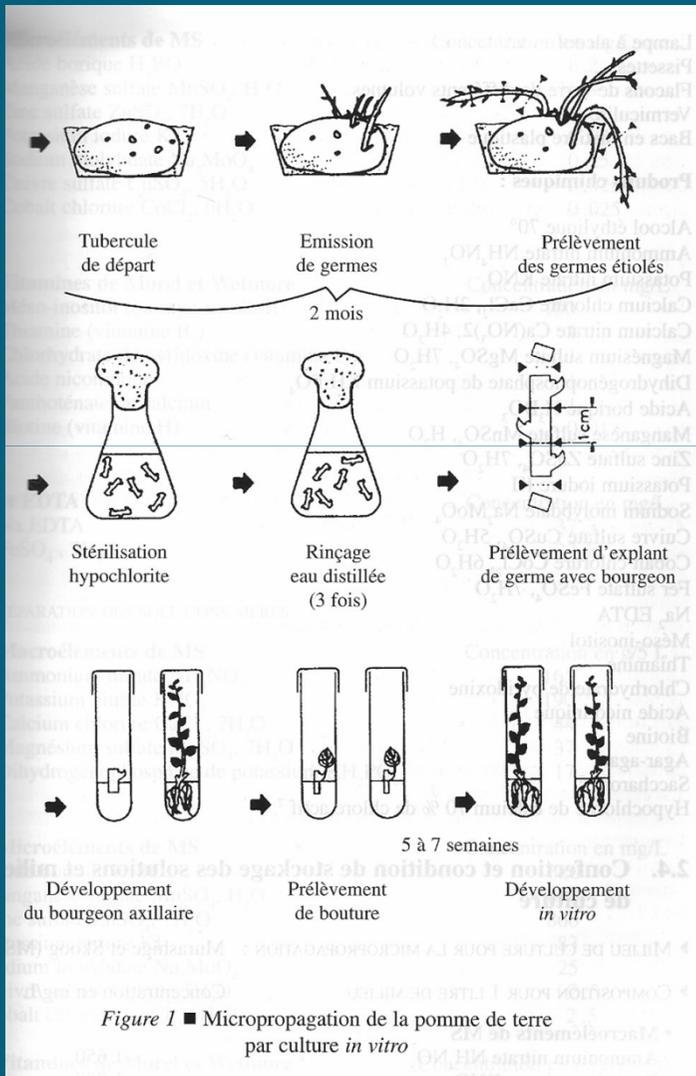
- C'est le moyen le plus simple pour obtenir rapidement **un grand nombre de copies** .

- L'explant utilisé est généralement **un fragment de tige de 1 cm de long contenant un bourgeon.**

- Chez beaucoup d'espèces herbacées **comme la pomme de terre, le cycle se fait en une seule étape.** Mais en général, **il faut trois étapes** avec plusieurs repiquages au sein de chaque étape.

# 1er exemple

# Micropropagation de la pomme de terre

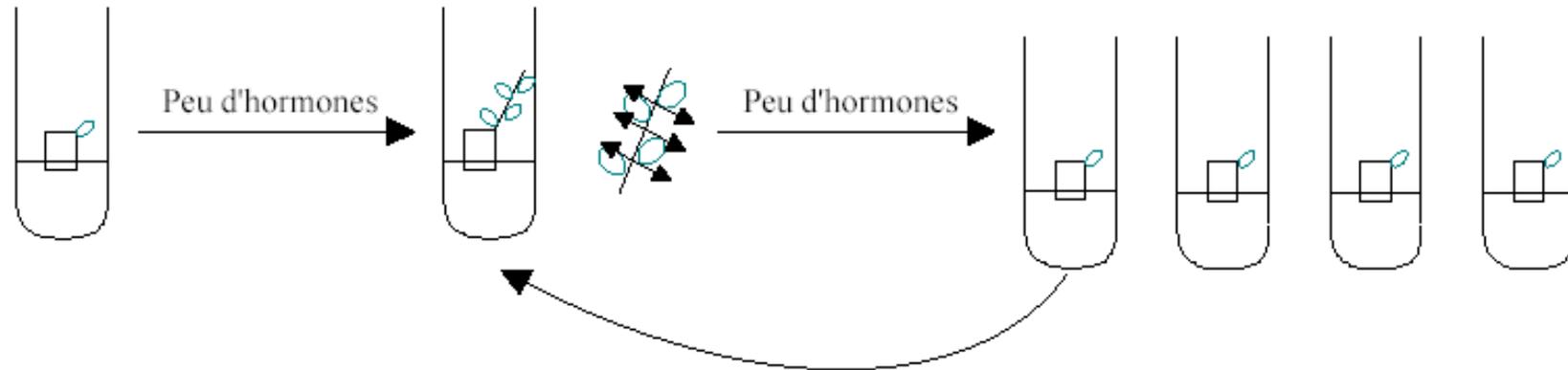


**Explant de départ: nœuds issus de germes de tubercule ou de vitroplants.**

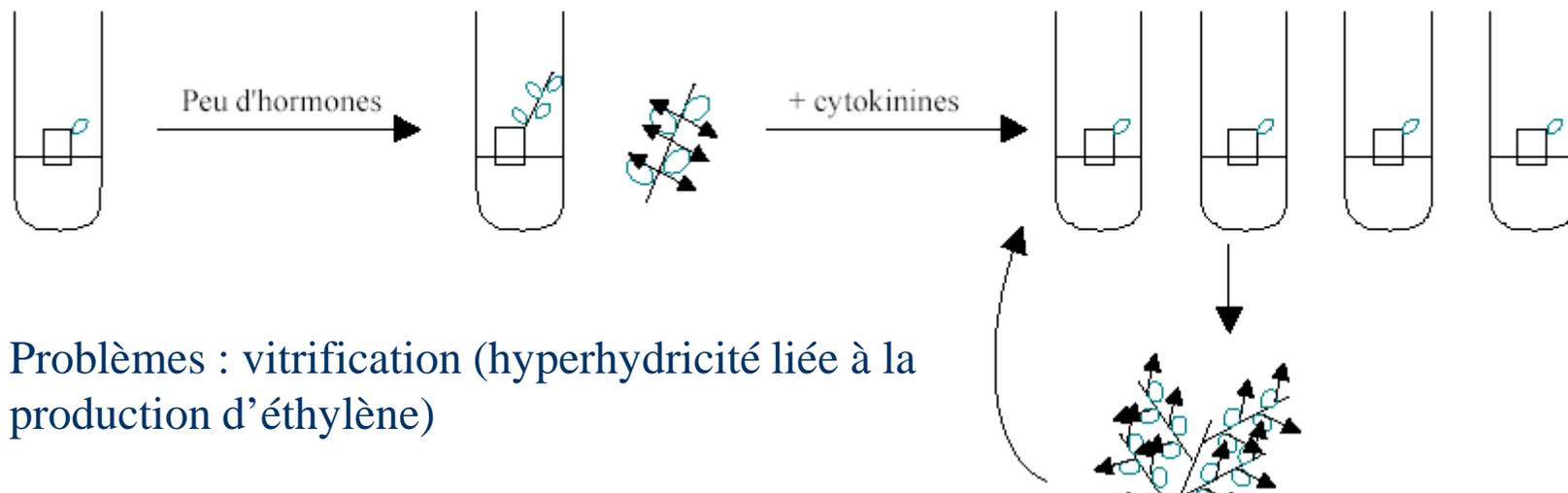


**Différents stades de développement d'une nouvelle plantule**

## Culture simple de nœuds : le bouturage *in vitro*



## Prolifération de pousses axillaires



Problèmes : vitrification (hyperhydricité liée à la production d'éthylène)

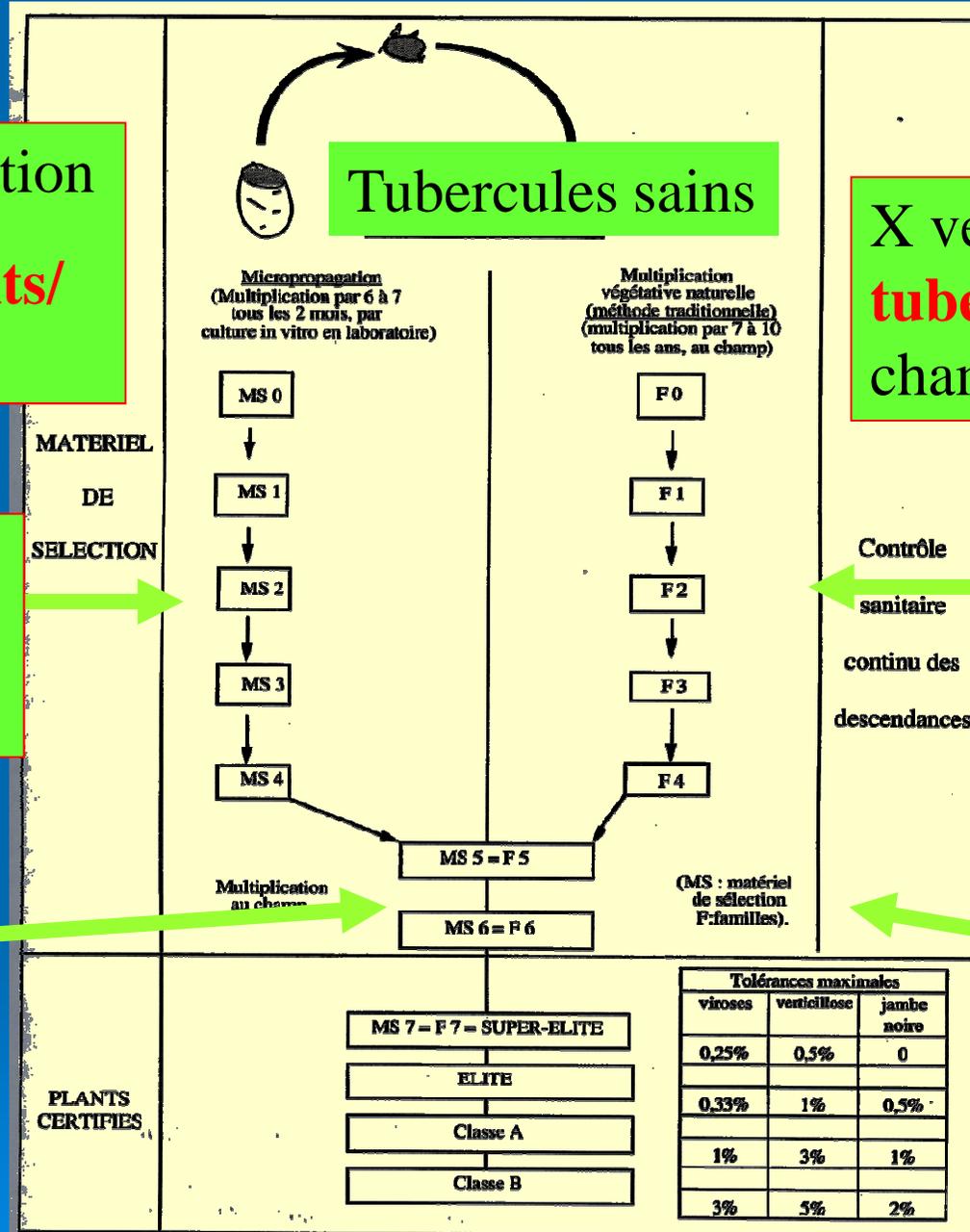


*Multiplication par bouturage des vitroplants*

Micropropagation  
X par **6-7plants/**  
**2mois**

4repiquages x  
2  
mois=**8mois**

X au  
champ **1 à**  
**qlq**  
**génération**



X veg: **7-10**  
**tubercules/an** au  
**champ**

4cycles  
de 1 année=  
**4ans**

X au champ  
**1 à qlq**  
**génération**

**1-2**  
**génération**  
**super - élite**

Figure 1

Méthodes de sélection conservatrice chez la pomme de terre

## Avantages de la x in vitro

1) La micropropagation permet de faire les premières générations dans des **conditions contrôlées en labo.** Sans contamination. Mais les dernières générations doivent **se faire au champ** pour une physiologie normale et pour obtenir les très grands nombres nécessaires.

2) La micropropagation permet d'accélérer les générations : **une année de bouturage in vitro = 5 à 7 ans de x naturelle**

coeff de x in vitro = 7 / 6 semaines

coeff de x in vivo 8-10 tubercules fil/plante mère/an.

## **Les vitro tubercules**

**Micro tubercules: 4-12 mm de diam**

**Conditions de culture particulières: obs. ou photopériode courte ou retardants de croissance**

**Avantages: -produits à toute époque**

- faciles à conservés (3 mois -1 an à 4 C°)
- transports facile

**Inconvénients – contiennent peu de reserve pour servir au champ**

**micro- and mini-tubers production and improvement of methods,**



# **2<sup>é</sup>me exemple:**

## **le bananier**

➤ Dans le monde, le bananier et le bananier plantain (*Musa spp.*), présentent une grande importance alimentaire et économique.

➤ La banane est **2<sup>ème</sup> fruit consommé au monde.**

➤ La culture du bananier **a été introduite au Maroc** pour la première fois en 1940. Cette culture en plein champ a été limitée à quelques sites à microclimats particuliers dans la **région d'Agadir.**

➤ L'extension de cette culture est devenue possible grâce à l'interdiction de l'importation de la banane en 1978 et à la réussite de cette culture sous abri serre au début des années quatre vingt. ce nouveau type de culture a connu une extension rapide allant de 2 ha en 1980 à plus de 4470 ha en 2002.

bananier est une **herbe géante**, dont le **pseudo-tronc**, formé par l'emboîtement des **gaines foliaires**, mesure environ 8 m de hauteur.

Les feuilles sont émises par le méristème terminal de la **tige vraie, appelée bulbe caulinaire ou corne**. Le corne, donne des ramifications latérales, désignées sous le **nom de rejets** .

**Production après 1 an (cycle production 1 an)**

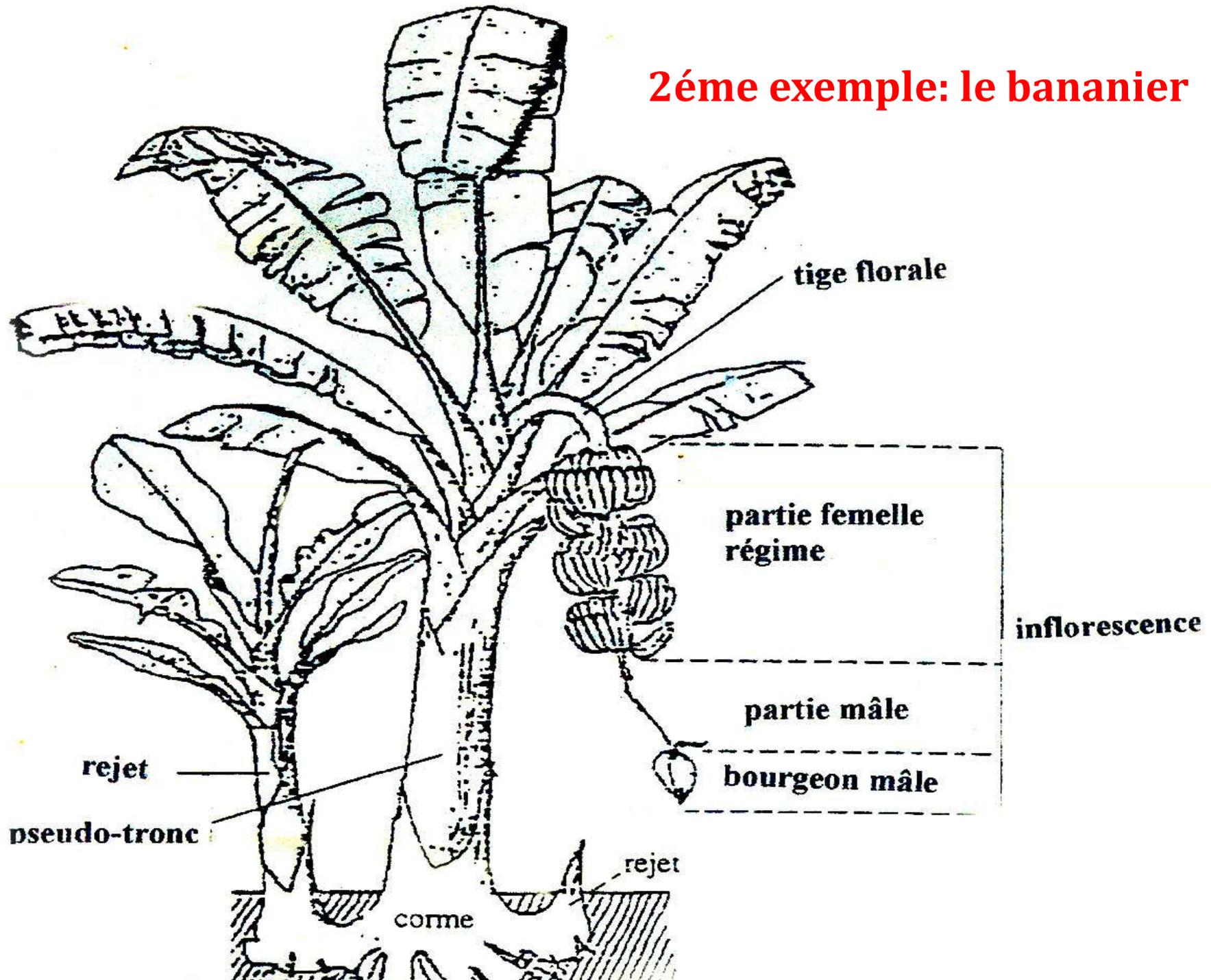
**Rendement 30 kg /plant/ an**

**2000 plants / ha**

**6- 10 rejets /an/ pied**

**Principale ennemis : nématodes**

## 2ème exemple: le bananier

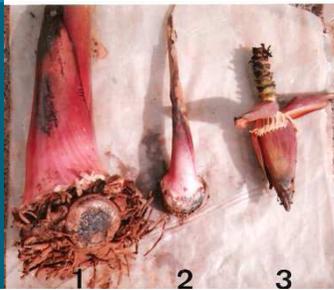


**\*\*La micropropagation de bananier se fait généralement en deux phases :**

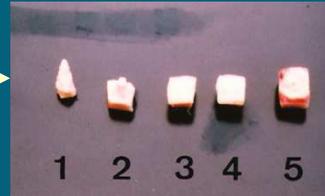
**une phase de multiplication suivie d'une phase d'enracinement et d'allongement des pousses .**

## 2ème exemple

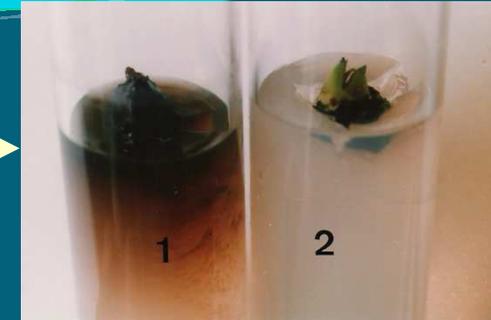
# Multiplication du bananier



Source d'explants: rejets (1 et 2) et inflorescence mâle (3)



Explants isolés: 1. apex floral; 2. apex végétatif.



Explants dans les premiers stades de culture



Plante en serre



sevrage



Elongation et enracinement



Phase de multiplication après repiquage sur le même milieu

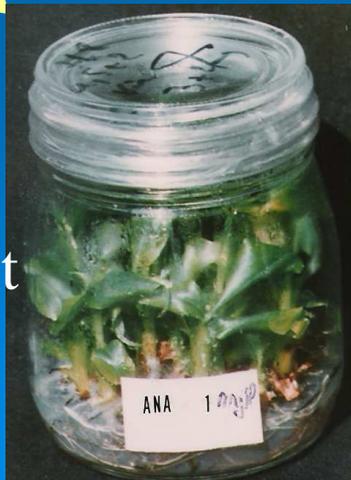


Riche en  
BAP



Séparation des  
pousses

Phase  
d'enracinement



2<sup>ème</sup> phase  
de x



# Principaux facteurs agissant sur la phase de multiplication

## A- Taille de l'explant

- le taux de multiplication obtenu à partir d'un apex comprenant 6 à 8 ébauches foliaires est supérieur par rapport à celui obtenu à partir d'un apex ne contenant qu'une ou deux ébauches foliaires.
- **Les apex utilisés** pour assurer la multiplication des pousses **possèdent en général deux ou trois ébauches foliaires** avec une taille **de 2 à 3 mm<sup>3</sup>**

## Manipulations expérimentales de l'explant

**Trois types** de manipulations de l'explant.

Ces techniques **consistent toutes à blesser le méristème terminal** de façon à induire la prolifération.

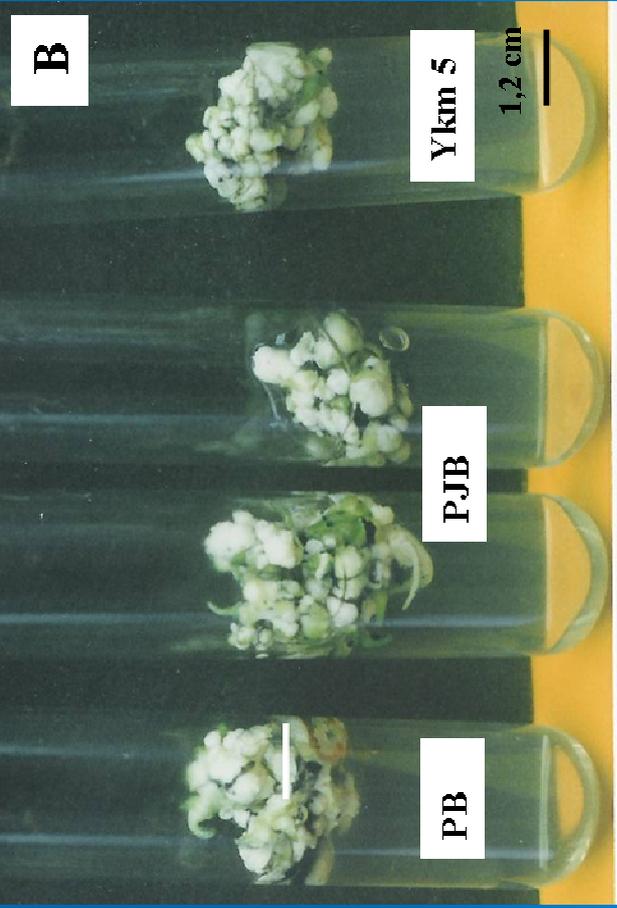
**1 - La technique de décapitation du dôme apical** de l'explant augmente le taux de multiplication de six fois par rapport au témoin

**2-La coupure de l'explant en deux parties** ou en **quatre parties**) donne deux pousses par **demi-bananier** et une pousse par **quart-bananier**

**3- une série d'incisions** verticales à travers le dôme méristématique avec préservation de la base de l'explant

## Cytokinines

- la **supériorité** de la **BAP** par rapport à la **Kinéatine**, la **zéatine** et **2 iP**.
- **doses** de la **BAP** varient de **1 à 5 mg/l** .
- Pour **d'autres auteurs** des doses plus fortes allant de **10 mg/l à 22,5 mg/l** de **BAP**



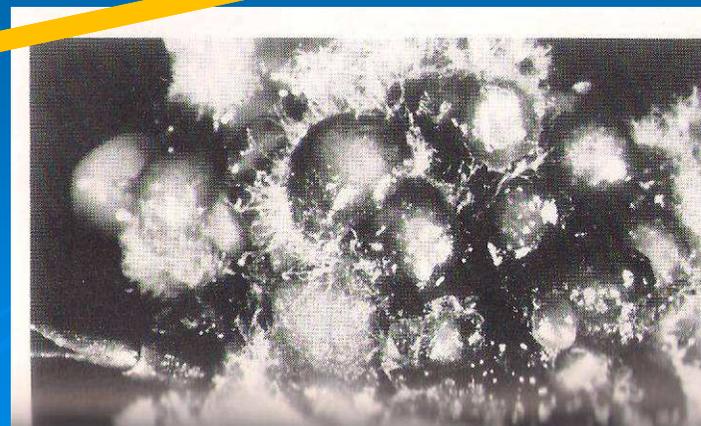
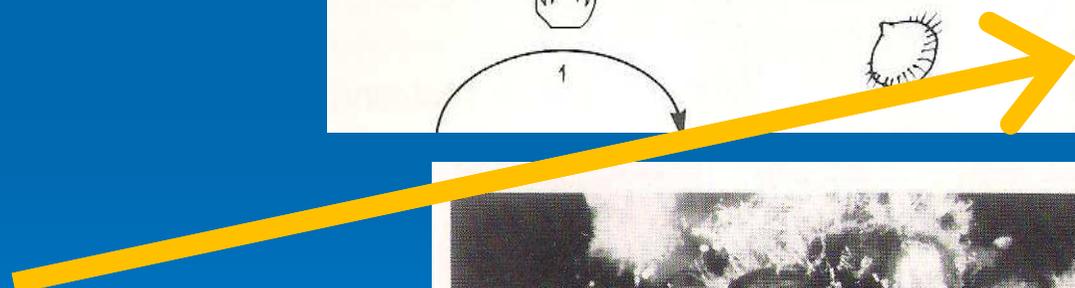
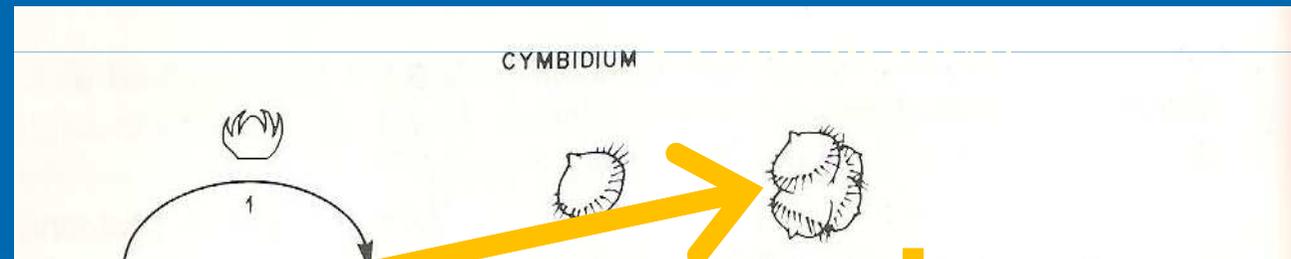
**3ième exemple:**  
**micropropagation des**  
**orchidées**



**Culture méristème**

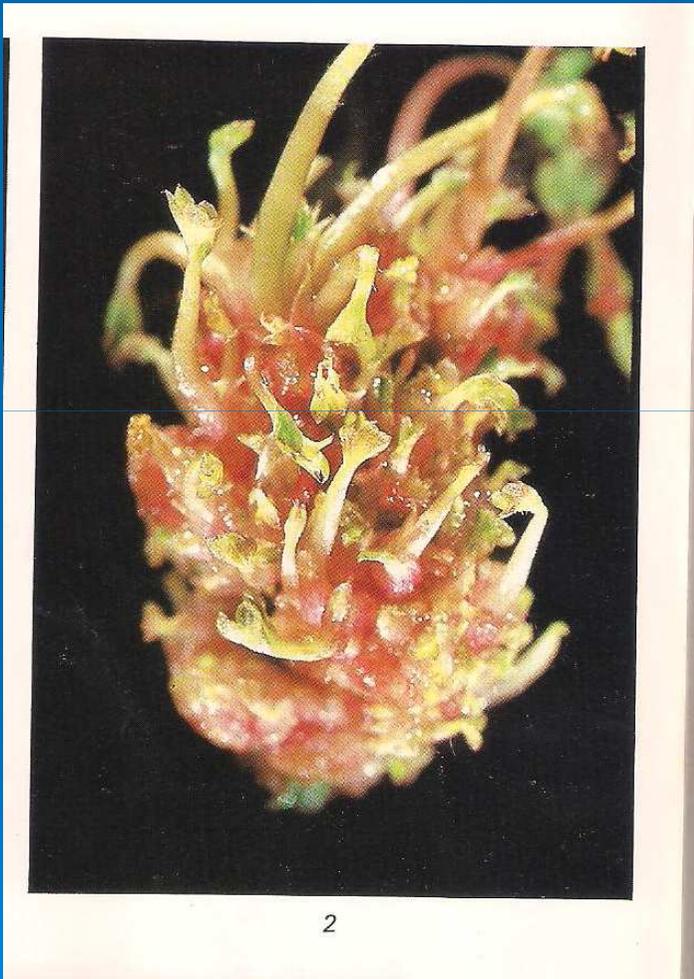


**Formation de protocormes (structure tubérisées organogène qui peut produire d'autres)**



**Structures typiques des orchidées**

**4ième exemple:  
micropropagation  
à partir d'apex du  
fraisier**



**Les bourgeons axillaires produisent eux –mêmes des axillaires. Les limbes sont réduits. X intensive déclenchée par la cytokinine, prédomine sur la croissance.**

# Avantages de la micropropagation

- **X en masse**
- **Sans contamination.**
- **La micropropagation permet d'accélérer les générations : une année de bouturage in vitro**
- **= 6-8 ans de x naturelle ( x en masse) pomme de terre**  
**coeff de x in vitro = 7 bourgeons/ 6 semaines**  
**coeff de x in vivo 8-10 tubercules fil/plante mère/an**

- **200 000 rosiers** à partir d'un bourgeon/an
- En théorie plus de **4 millions de plants d'œillets** à partir d'un seul apex
- produits **à toute époque**
- **faciles à conservés** (3 mois -1 an à 4 C°)
- transports facile**
- **bon rendement**
- échange facile
- petite surface
- Meilleure protection contre les maladies (x in vitro)
- **accélération de diffusion des nouvelles variétés**

- La production de **plantes or saison.**
- La **réduction du nombre de pieds mères** nécessaire à la production de boutures.
- Le microbouturage permet de multiplier des espèces **difficiles à reproduire naturellement** . En faisant germer les graines d'orchidées *in vitro* , la présence des **champignons symbiotiques est inutile.**

-La culture *in vitro* permet de **multiplier des plantes stériles.**

- **Conservation de la biodiversité** La culture *in vitro* permet de **conserver des variétés anciennes** à l'abri des parasites et pathogènes.

## **Inconvénients :**

- Coût élevé**
- Parfois une x non-conforme.**

## **Espèces dont la micropropagation fonctionne:**

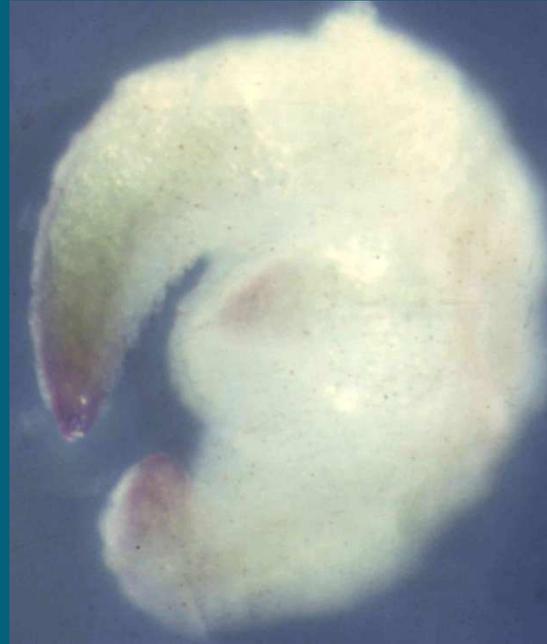
**PT**

**Artichaut**

**les allium**

**Bananier , fraisier, plante ornementales**

## **b) Culture de méristèmes**



**Méristème de patate  
douce**

**A la fin des années 40,**  
**deux chercheurs français ont prouvé que la**  
**quantité de virus diminuait du bas vers le**  
**haut de la tige.**

**Morel et Martin (1951) ont réussi à**  
**obtenir des plants de dahlia indemnes**  
**de virus en cultivant le méristème isolé.**

**Méthodologie: 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.**

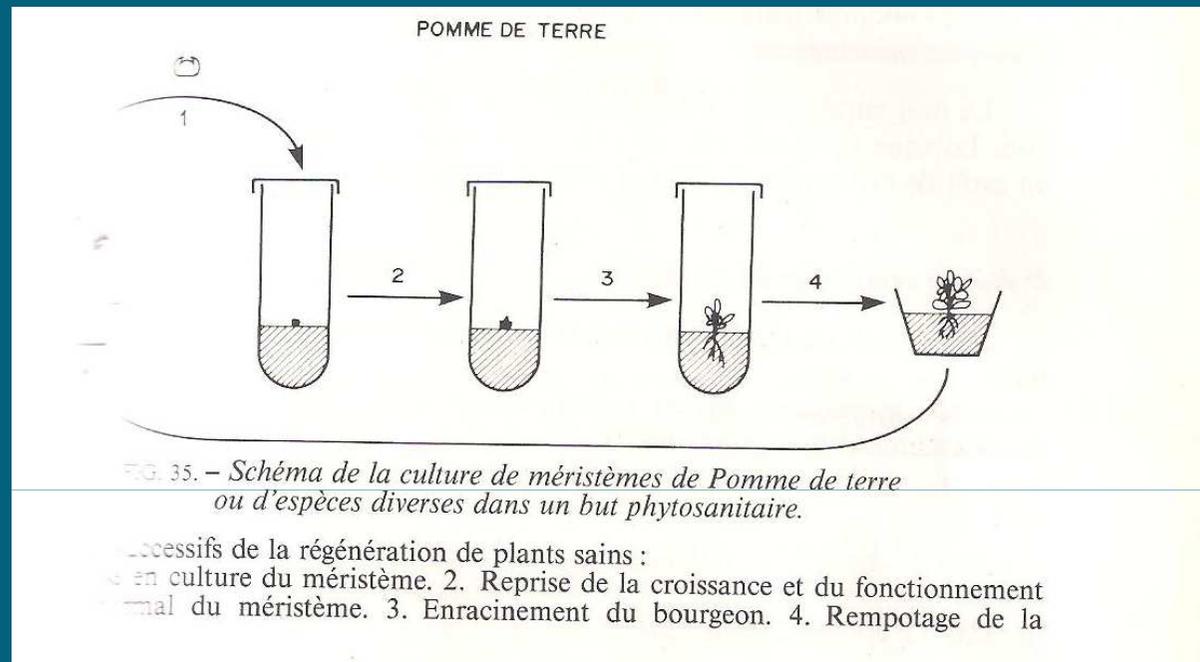
- L'isolement des méristèmes se fait sous **loupe binoculaire** avec **lumière froide** pour éviter la dessiccation.
- La **taille du méristème** prélevé est de l'ordre de **0.2 mm**. En général plus le méristème prélevé est grand plus la **probabilité de survie augmente** et celle de l'assainissement diminue.
- La combinaison de la culture de **méristèmes avec la thermothérapie** permet d'augmenter la chance de réussite.

## **Exemple: culture de méristème de PT**

**La réussite de l'éradication virale chez la PT dépend du type de virus et ils sont éliminés dans l'ordre suivant :**

- virus Y**
- virus M (PVM),**

# Milieu de culture des méristèmes dans un but phytosanitaire: **Cas de la Pomme de terre**



**1) Mise en culture du méristème ( milieu MS +ANA +GA3 )pour**

**augmenter le taux de reprise ( brunissement: obscurité+ charbon actif...)**

**2)Reprise de croissance 3)enracinement 4)Rempotage**

## Effet régénération par culture de méristème l'artichaut en % du clone d'origine

	1 <sup>ère</sup> plantation			2 <sup>ème</sup> plantation	
	1 <sup>ère</sup> récolte	2 <sup>ème</sup> récolte	3 <sup>ème</sup> récolte	1 <sup>ère</sup> récolte	2 <sup>ème</sup> récolte
<b>Nbre de capitules/plante (% clone d'origine)</b>	<b>109</b>	<b>136</b>	<b>108</b>	<b>121</b>	<b>126</b>
<b>Poids moy des capitules</b>	<b>113</b>	<b>113</b>	<b>114</b>	<b>103</b>	<b>112</b>
<b>R total/ plante</b>	<b>128</b>	<b>168</b>	<b>119</b>	<b>128</b>	<b>134</b>

## c) Callogenèse

Le cal est **un amas cellulaire** dont la croissance se fait de manière anarchique.

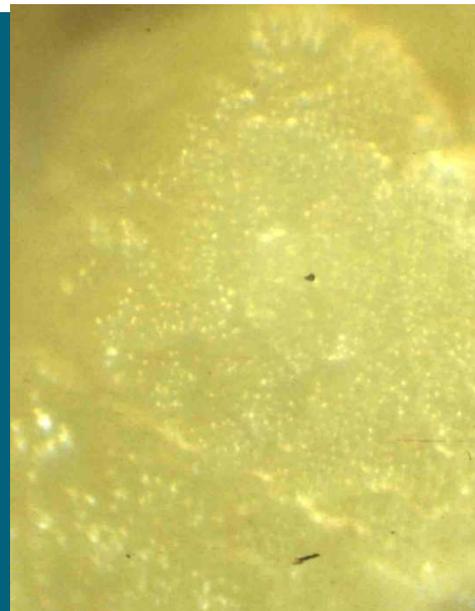
Le cal **n'a pas de forme précise**.

Pour la production de cals, on **utilise généralement des explants dépourvus de méristèmes** comme les morceaux, de racines, d'hypocotyles ou d'entre-noeuds.

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 :

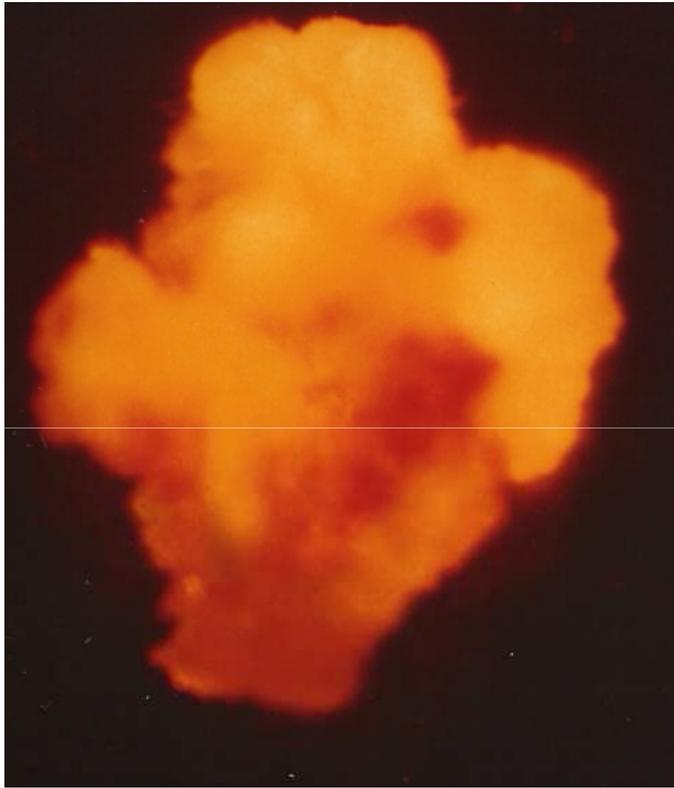
- **Couleur**
- **Aspect: lisse ou noduleux**
- **Consistance: compact ou friable**



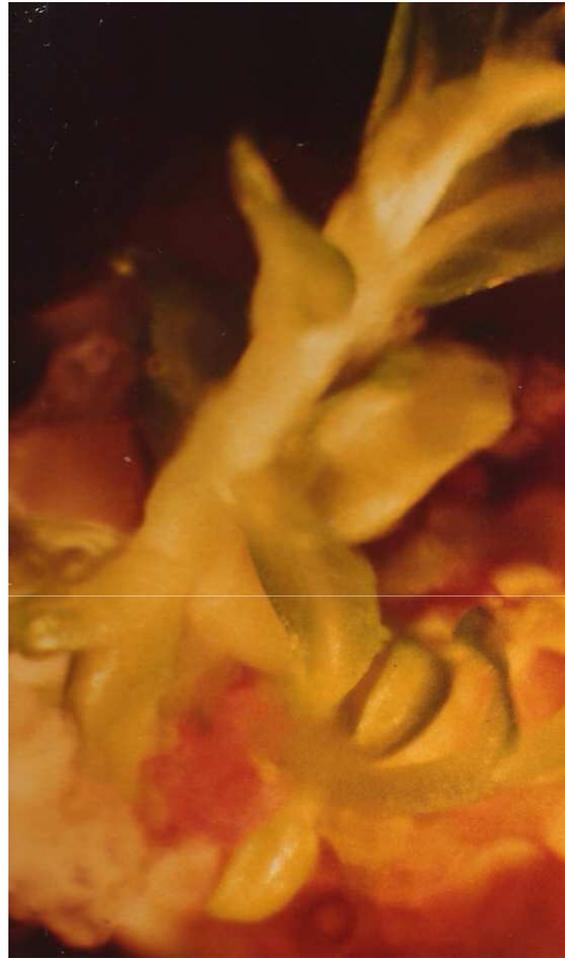
**Les spécialistes arrivent à distinguer d'après l'aspect du cal sa capacité à régénérer des plantules par:**

➤ **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**.



**Cal organogène d'Eucalyptus**



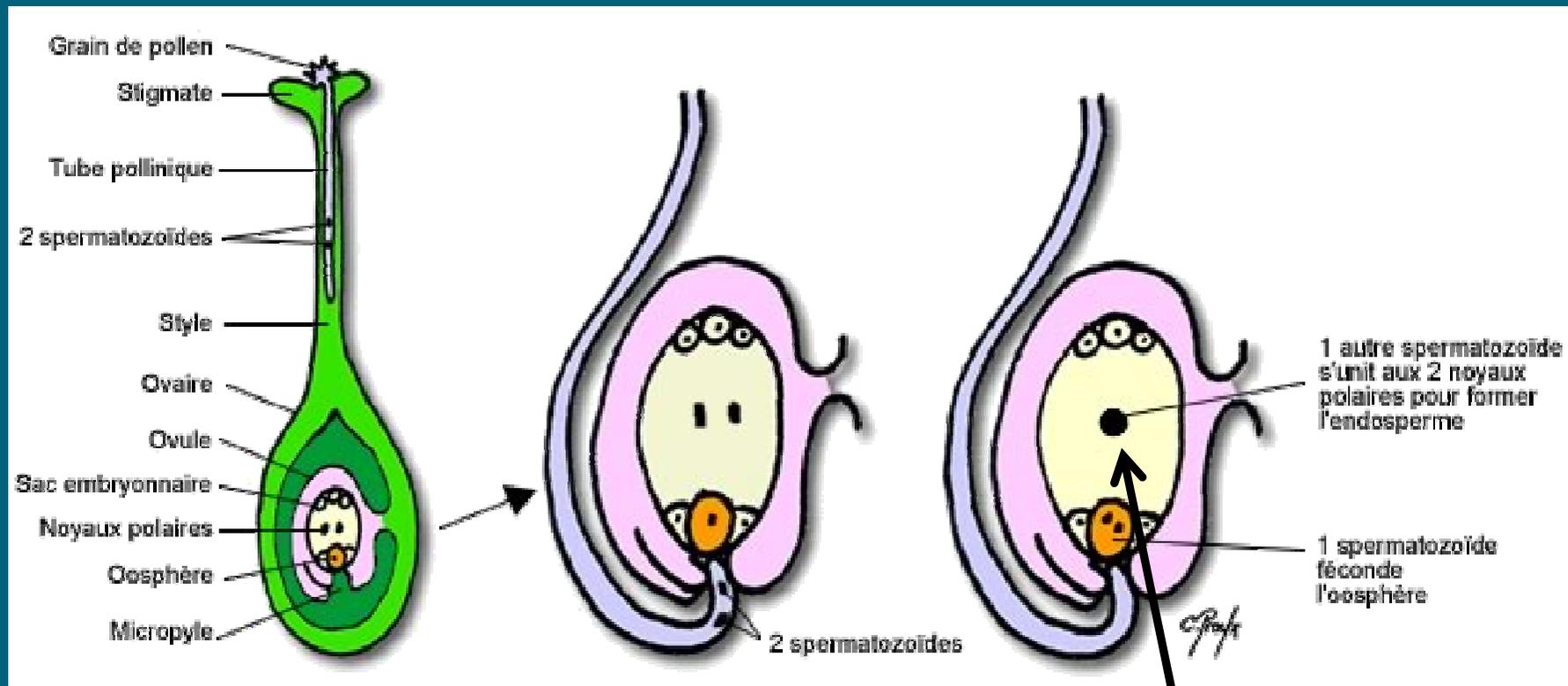
**Le même cal après la régénération**



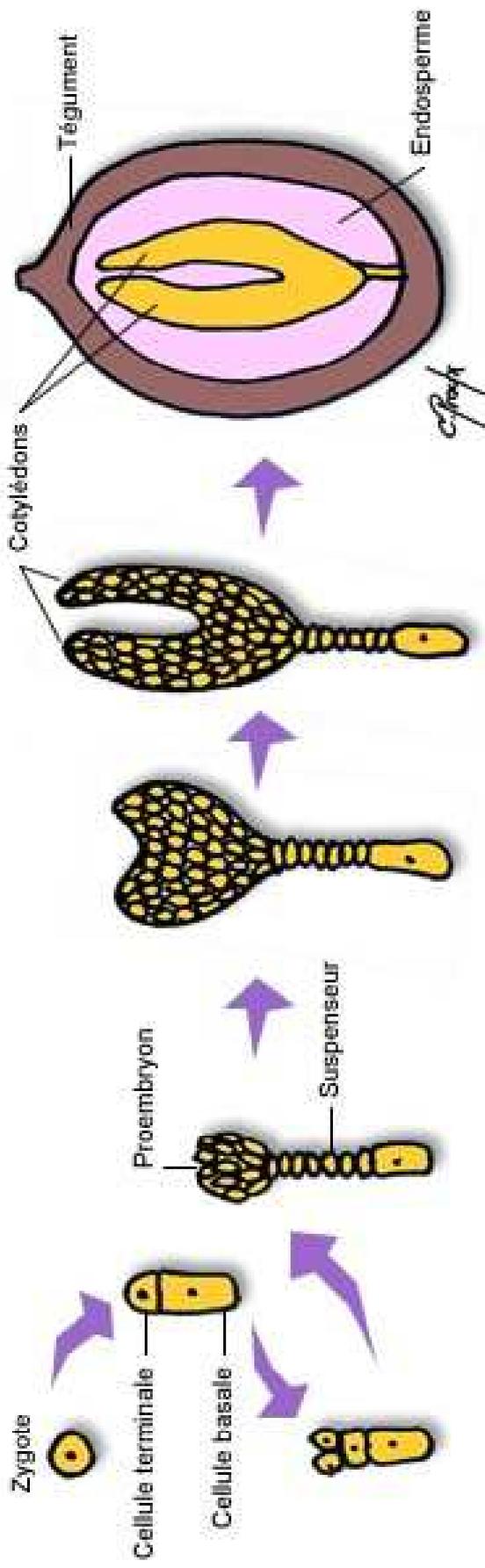
**Cal avec racine  
(patate douce)**

## **d) Embryogenèse somatique**

# Rappels: embryogenèse zygotique



**Sac embryonnaire de l'ovule**



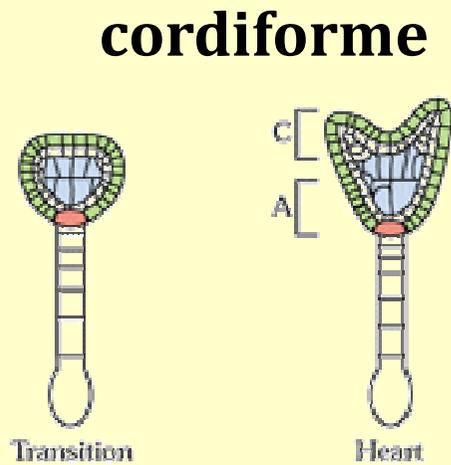
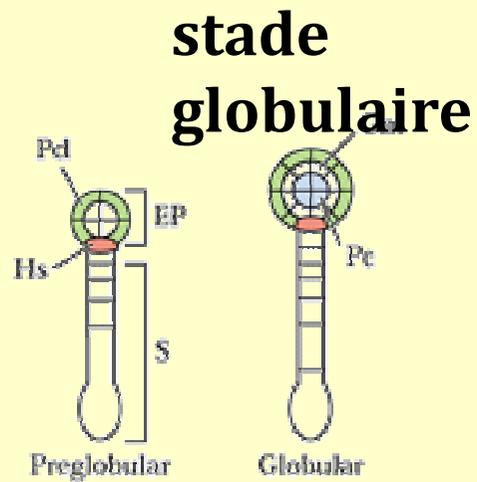
# 1. Définitions

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

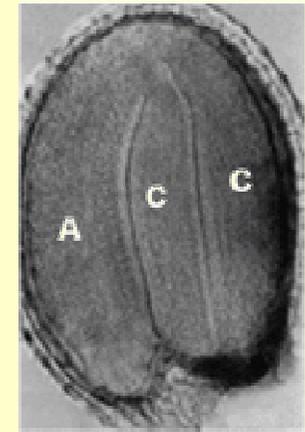
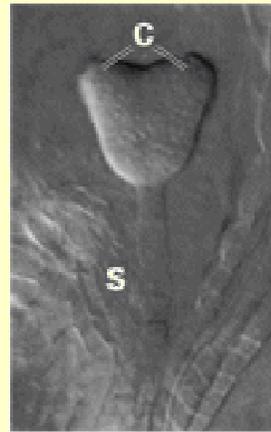
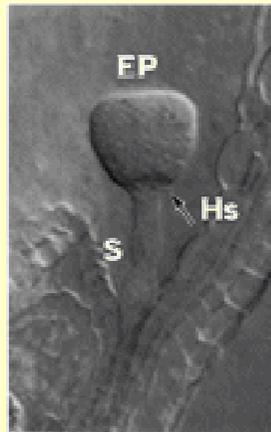
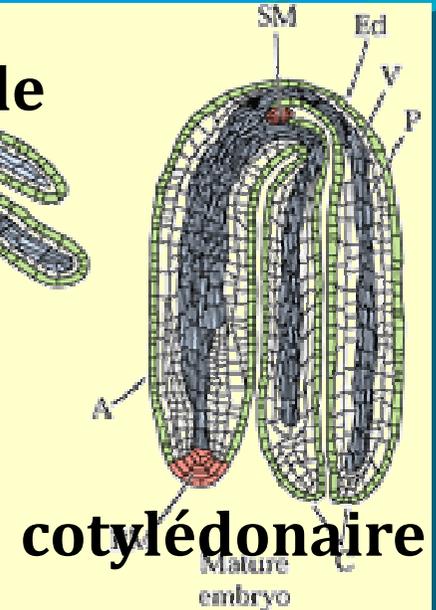
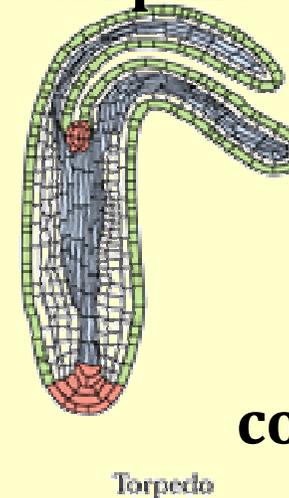
Le développement de l'embryon somatique **ressemble étroitement à celui de l'embryon zygotique** à la fois morphologiquement et physiologiquement avec:

➤ 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 .



**torpille**



**le stade globulaire, cordiforme, torpille, et cotylédonaire**

**Embryogenèse  
somatique directe**



**2 types  
d'embryogenèse  
somatique**

**Embryogenèse  
somatique  
indirecte**



## **En résumé**

- embryogenèse non zygotique.**
- formation d'embryon à partir de cellules somatique.**
- Multiplication rapide par régénération de vitroplants.**
- Quelques espèces sont connues pour leurs fortes capacités embryogènes : carotte- chou fleur...**

---

**Il y a quelques différences** entre les deux types d'embryogenèse dont les principaux caractères sont:

- **L'absence de différenciation d'albumen.**
  - **Développement absent ou retardé.**
  - **Absence de dessiccation et de dormance.**
-

## **Exemple : carotte**

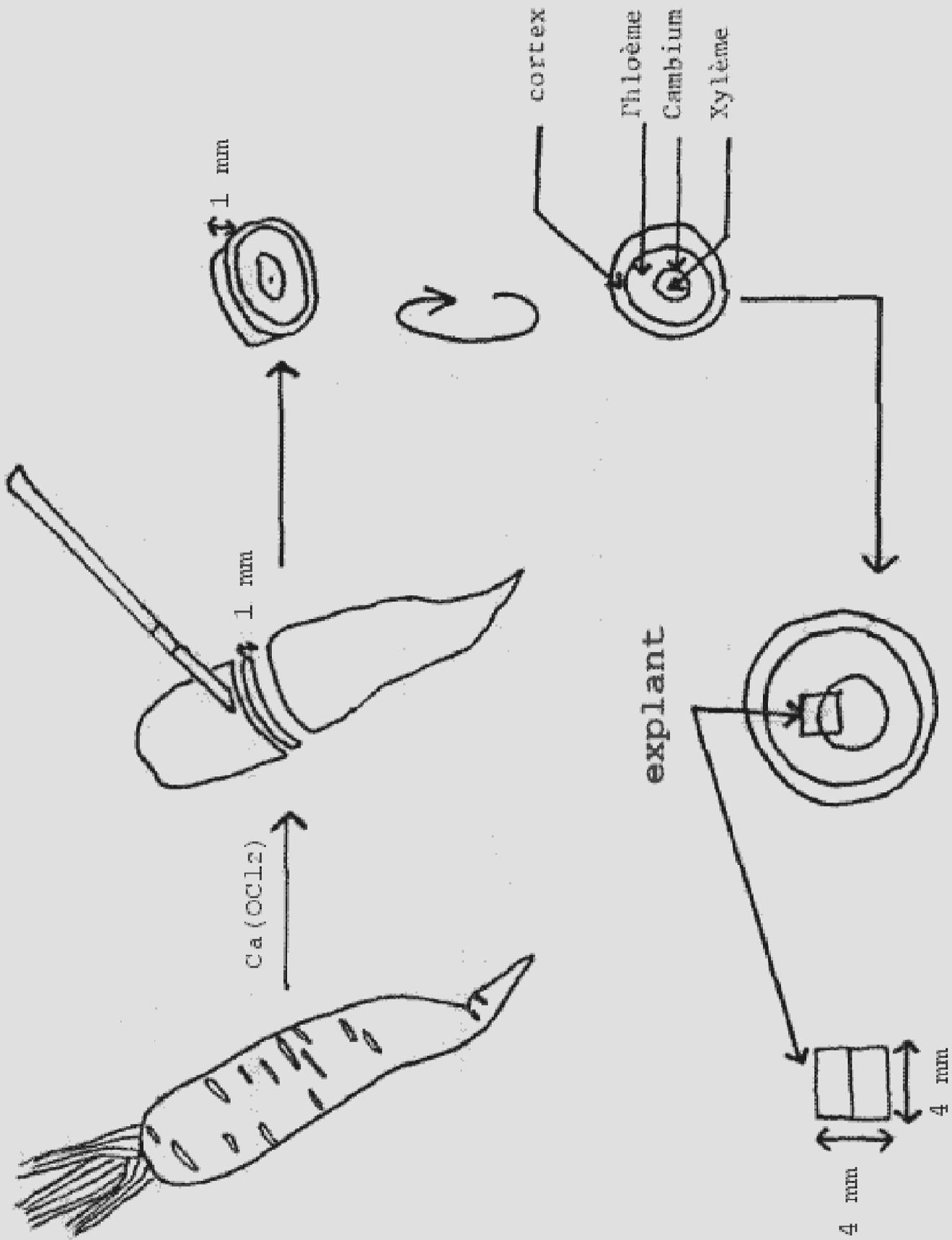
1958 steward et coll aux USA

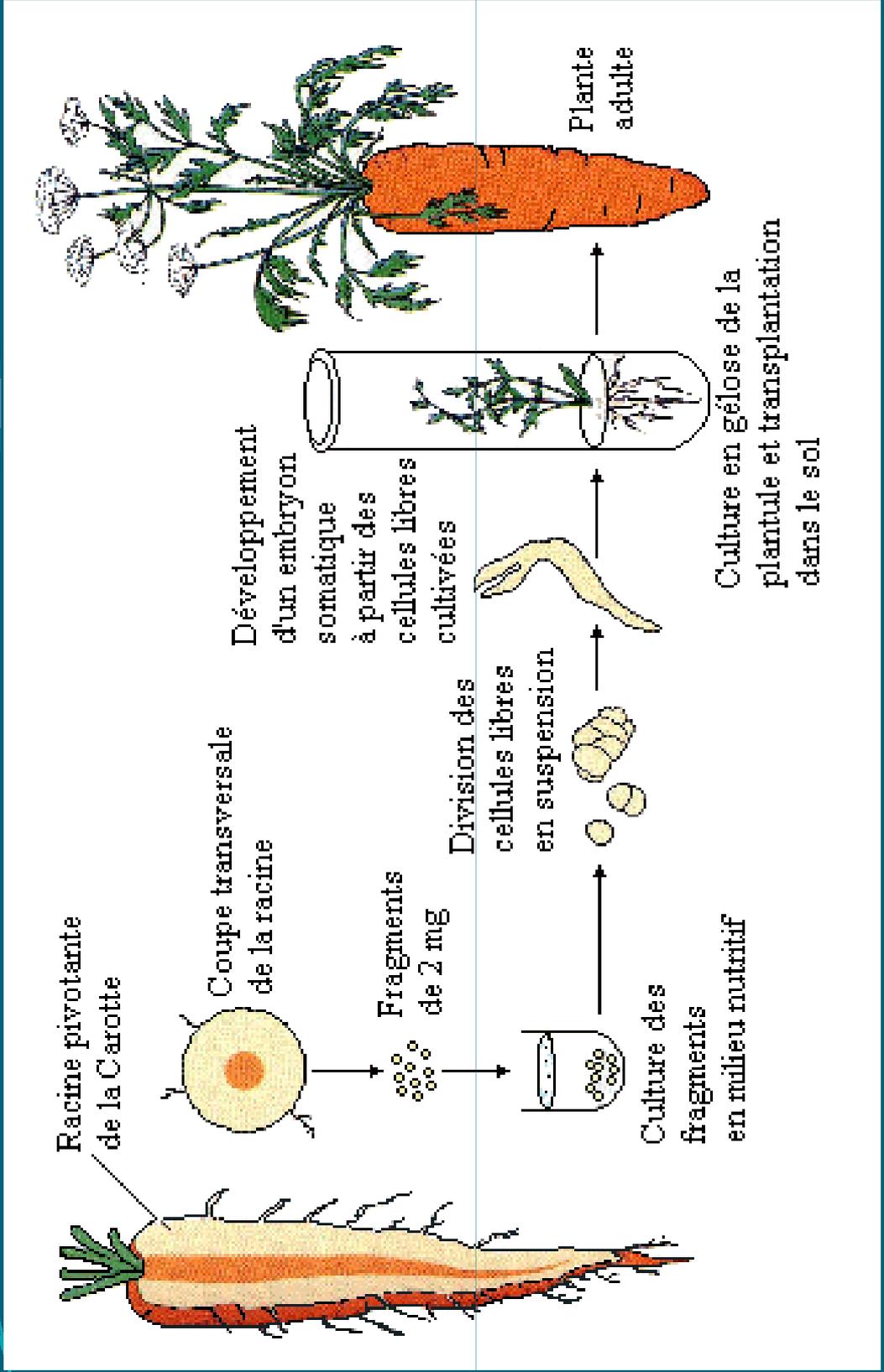
- Tissus **du phloème** donnent un **cal embryo** sur milieu avec auxine.

Puis **embryons somatiques** sur milieu **sans auxine**.

Ou

**Tissus du phloème + xylème** donnent cellules isolées (**suspension cellulaire embryogène**) en milieu liquide puis des embryons sur milieu solide sans auxine.







**Embryons somatiques sur cal  
de **carotte** (2,4 D)**



*embryogenèse sur un explant  
foliaire petit pois*

**L'aptitude de la **carotte** à produire l'embryogenèse somatique en a fait **une espèce modèle : avec 1 ou 2 bioréacteurs** il est possible théoriquement de produire **assez d'embryons pour créer des semences** pour tous les pays du monde.**

**SUSPENSION  
CELLULAIRES  
EMBRYOGENES  
CHEZ LE  
BANANIER**

**a) A partir des fleurs  
mâles**

# Cas du bananier : PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES MAINS DES FLORALES



Mise en culture  
sur milieu Ma1  
2,4D+  
AIA+ANA



Inflorescence de 1cm



Isolement des mains  
des 15 rangs floraux



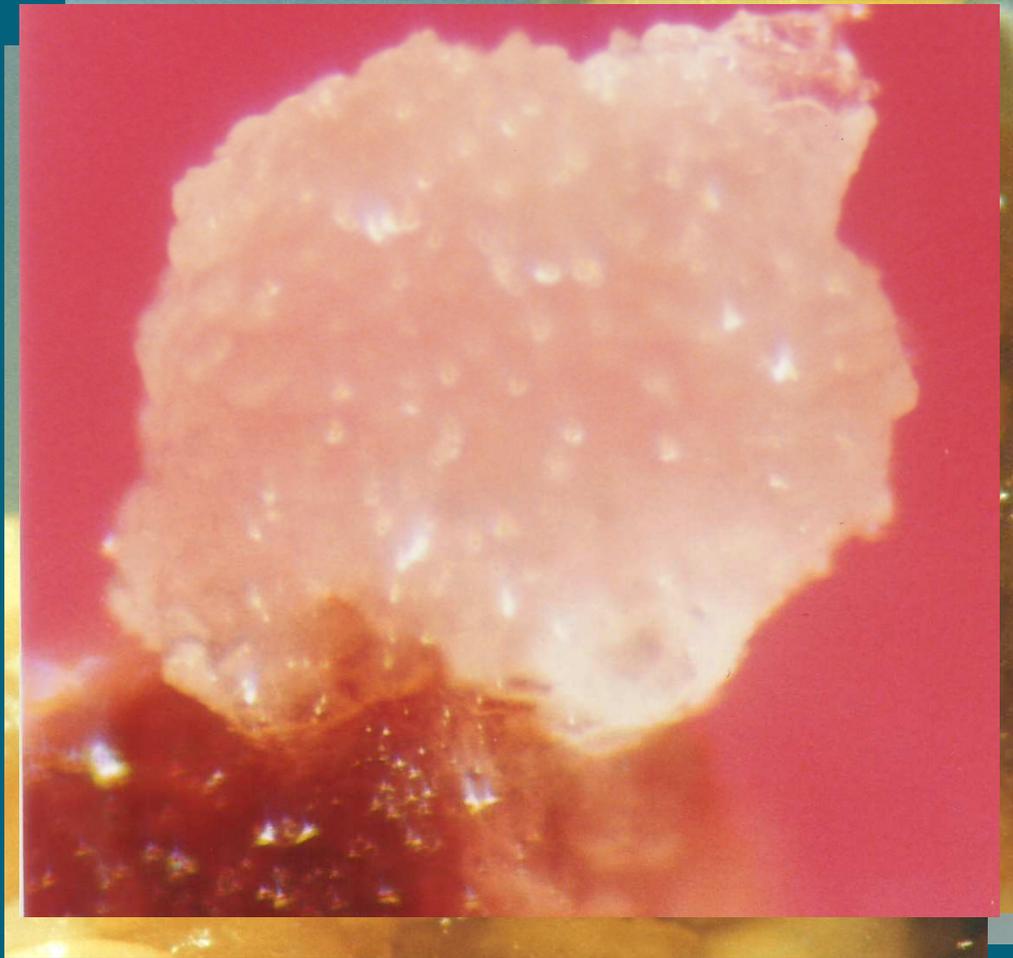
Position 15



Position 7



# Différents types de réponses morphogénétiques

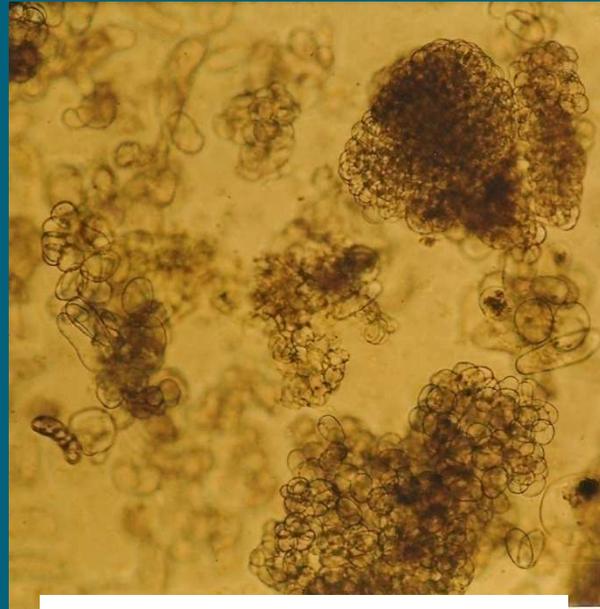


Cal jaune nodulaire compact  
Cal jaune nodulaire porteur de  
cal blanc friable  
d'embryons

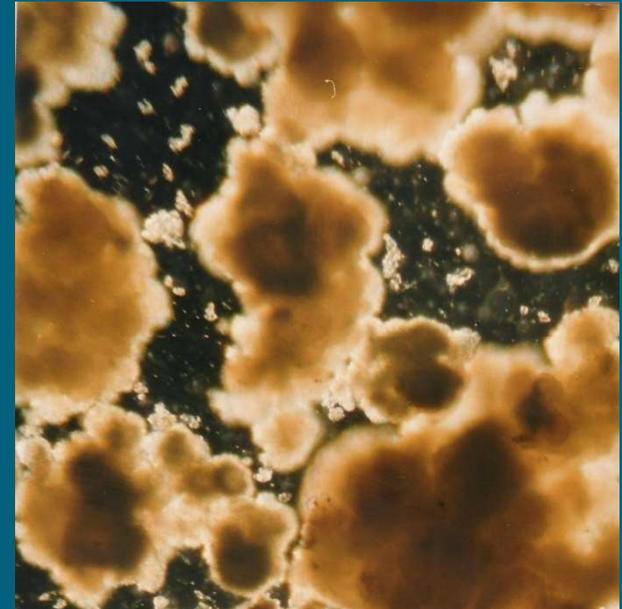
# Description de la suspension cellulaire du cultivar IRFA 903



Suspension granulaire fine de couleur jaunâtre

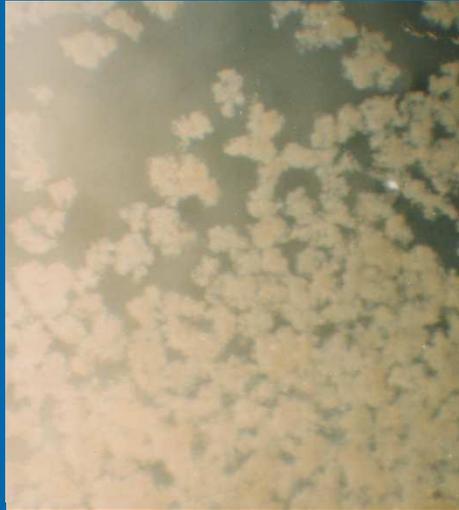


Rares cellules isolées en forme de “ banane” Un grand nombre de massifs de cellules embryogènes

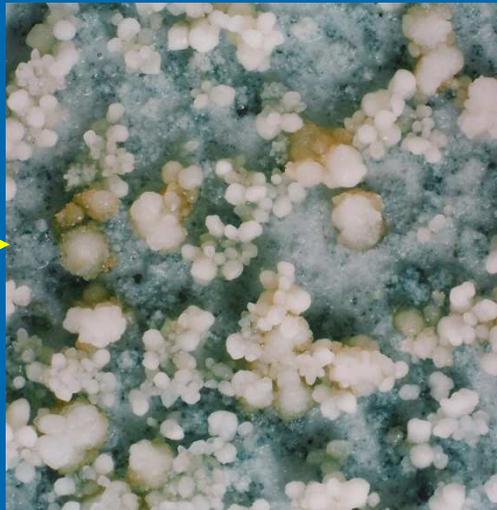


Structures embryogènes

# Evolution morphologique de la suspension sur milieu de régénération



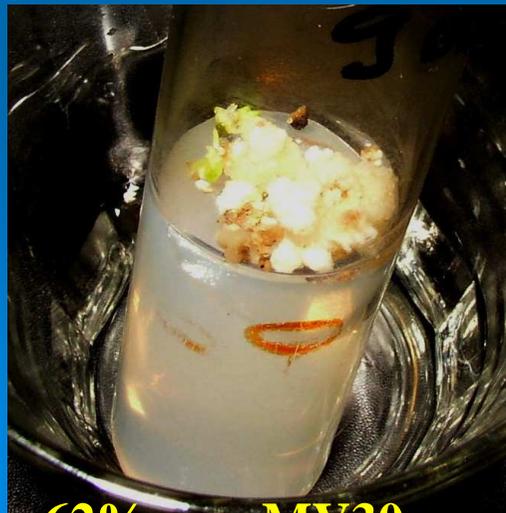
Structures lisses  
individualisées



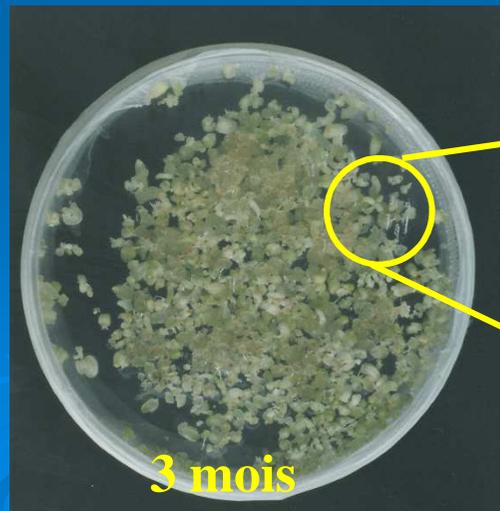
Structures grossies



Structures avec  
dépression sous  
forme de cratère



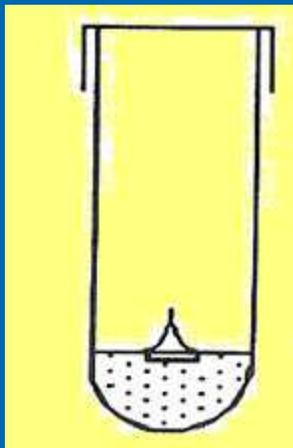
62% sur MV30



3 mois  
43%



**b) A partir des ‘scalps’  
des apex**



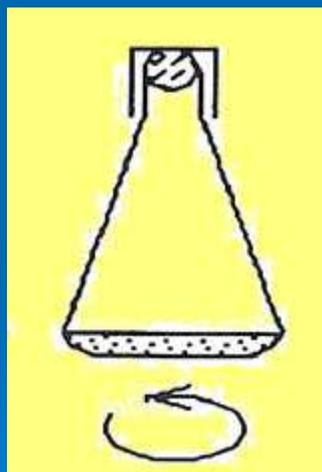
**Culture d'apex**



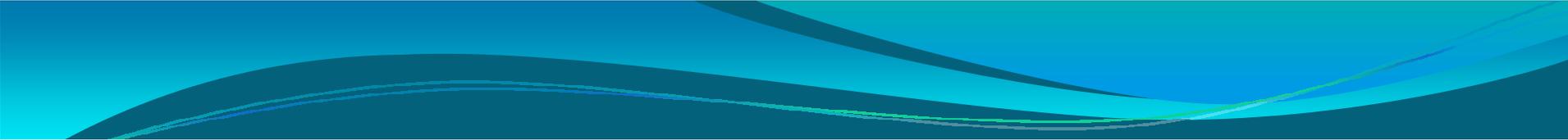
**Culture hautement proliférantes**



**« Scalps »**



**Initiation de suspensions cellulaires**



L'embryogenèse somatique est un processus de régénération à plusieurs étapes.

On distingue ainsi 5 étapes essentielles chez la patate douce:



- **Initiation** des cultures embryogènes par culture de **l'explant initial** sur un milieu contenant des régulateurs de croissance surtout **l'auxine avec souvent des cytokinines.**

- Prolifération des cultures embryogènes sur milieu solide ou liquide avec une composition en régulateurs de croissance similaire à celle de l'étape précédente.

**•Prématuration des embryons somatiques sur milieu généralement dépourvu de régulateurs de croissance ce qui inhibe la prolifération mais stimule la formation des embryons et le début du développement.**



**•Maturation des embryons somatiques par culture sur un milieu contenant l'ABA .**

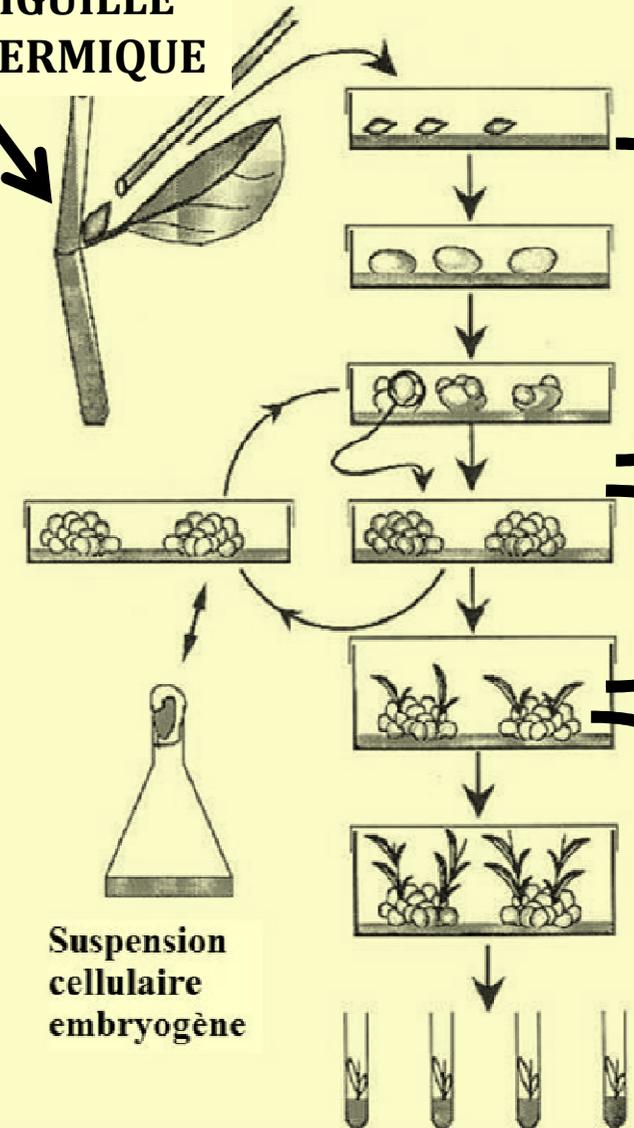
**•Développement de plants sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance.**

# PROTOCOLE EXPERIMENTAL

**ISOLEMENT DU  
BOURGEON  
PAR AIGUILLE  
HYPODERMIQUE**



**VITROPLANTS AGES DE 6 A 8  
SEMAINES**

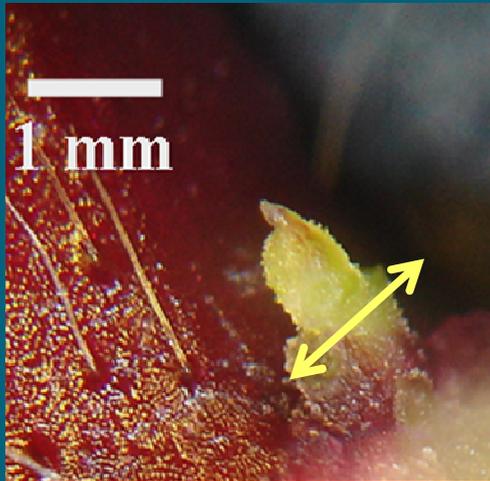


**INDUCTION DE  
CALS  
EMBRYOGENES**

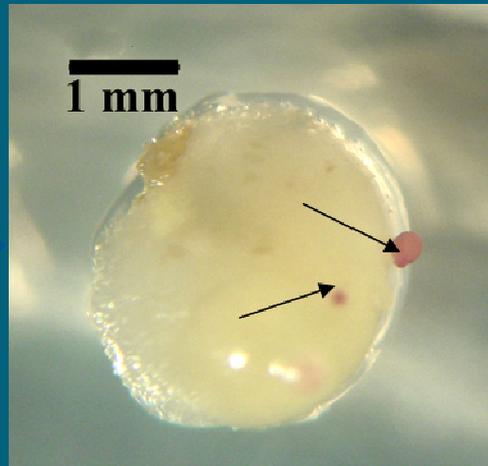
**ENTRETIEN DE  
CALS  
EMBRYOGENES**

**REGENERATION**

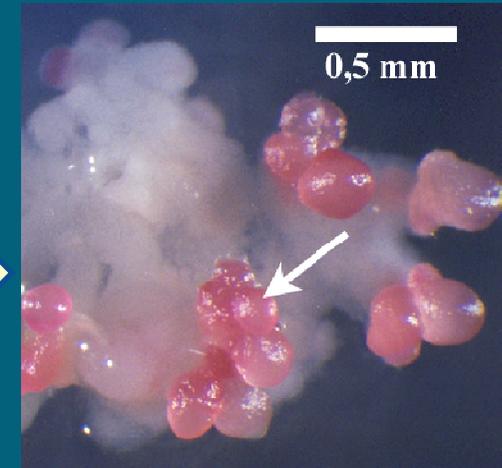
# LES ETAPES DE LA FORMATION DE CALS EMBRYOGENES



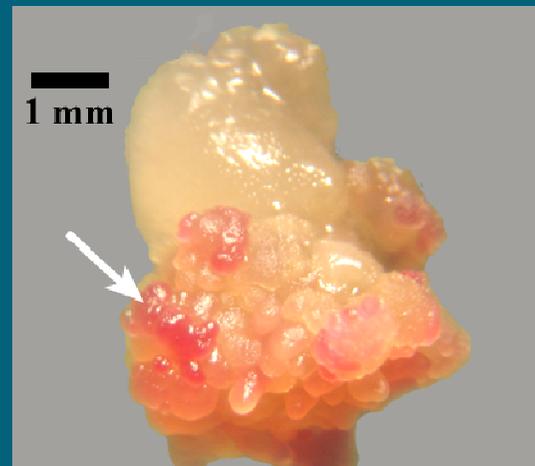
Isolement et  
ensemencement de  
l'explant



Formation d'une  
masse mucilagineuse

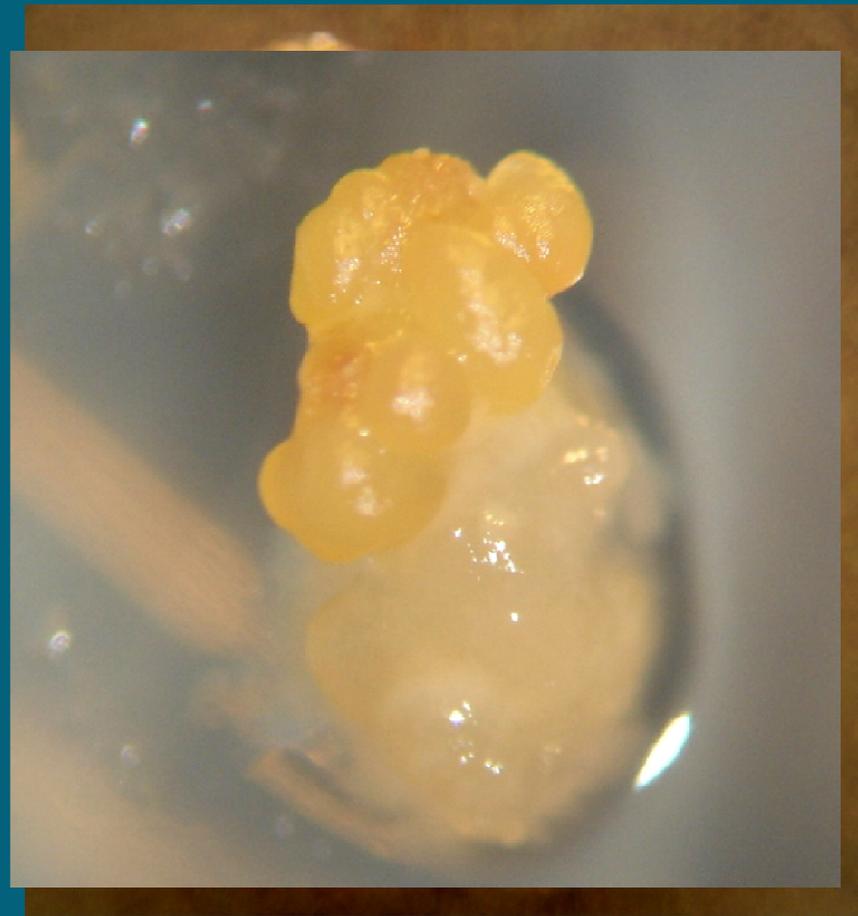
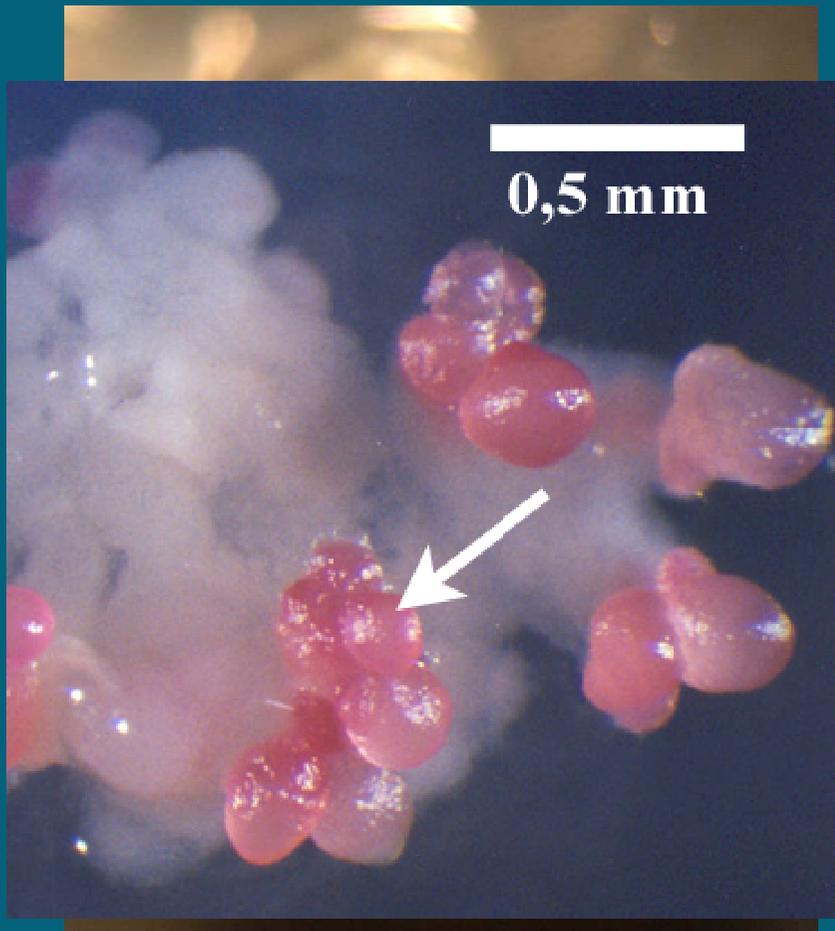


Emergence de masses  
compactes nodulaires



Formation de cals  
embryogènes en 2 parties

Les cals diffèrent d'un cultivar à l'autre essentiellement par la couleur qui se manifeste dès les premières étapes



# REGENERATION A PARTIR DE CALS EMBRYOGENES

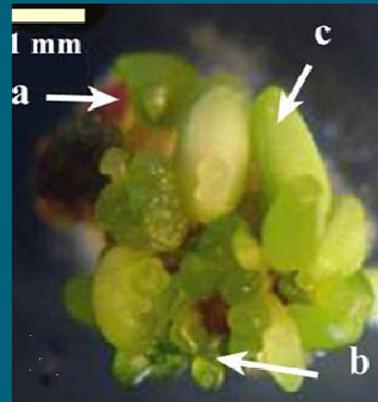
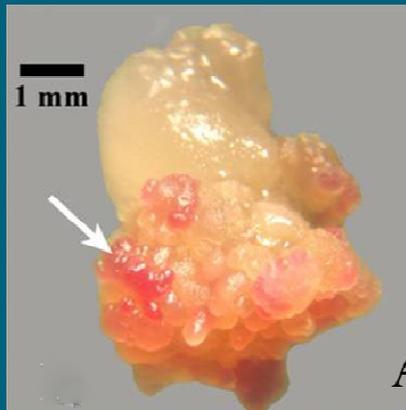
La régénération chez la patate douce est un processus complexe qui nécessite trois phases:



Phase de  
prématuration

Phase de  
maturation

Phase de  
germination



## Intérêt de l'embryogenèse somatique

➤ Malgré le risque de **variation génétique**, 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 embryons somatiques peuvent être transformés en semences artificielles Ils sont enrobés par un gel composé d'alginate avec des éléments nutritifs nécessaires à la germination de l'embryon. L'ensemble est protégé de dessiccation par un film de résine soluble dans l'eau .**

➤ L'embryogenèse somatique est aussi utilisée pour la production de **variants intéressants**. L'embryon est **d'origine unicellulaire** et présente moins de risque de **production de chimères**. Cette méthode est utilisée pour sélectionner des plants **de canne à sucre résistants à la salinité**.

# LES VARIATIONS SOMACLONALES ET LEURS APPLICATIONS

Beaucoup de techniques de culture in vitro forment **des vitroplants différents par rapport à la plante mère**. Ces variations sont de deux types:

- Variations **épigénétiques**
- Variations **somaclonales et gamétoclonales**

**Les 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...**
- **Confinement**
- **Compétition entre les structures ou les plantules dans un espace devenu trop étroit.**

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

➤ Même quand les variations épigénétiques persistent, elles ne **se transmettent pas à la descendance.**

➤ On parle de **variations somaclonales** ou gamétoclonales quand les variations détectées sont **stables et sont transmises** à la descendance sexuée ou in vitro.

➤ Les variations somaclonales sont obtenues dans des cultures dont l'explant initial présente **théoriquement la même information génétique** que la plante mère et qui visent la multiplication clonale.

➤ Les **variations gamétoclonales** sont observées dans les cultures qui visent l'**haplodiploïdisation**.

# 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.

➤ **Polyploidie**

➤ **Aneuploidie**

# SOURCE DES VARIATIONS SOMACLONALES

La variation somaclonale a **deux sources principales**:

➤ 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.

➤ 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.

**La fréquence des variations somaclonales dépend de plusieurs facteurs dont les principaux sont:**

- **Le génotype**
- **La technique ou l'explant utilisés**
- **La composition du milieu de culture**
- **La durée de la culture**

## **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.**

## Techniques de culture et explants

- 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.
- Plus la **durée de la phase de callogenèse** sur milieu solide ou en suspensions cellulaire augmente plus les cellules portant une variation s'accumulent.
- Les variants sont très fréquents parmi les plantes régénérées à **partir de protoplastes**.

**En général, l'utilisation de certains régulateurs de croissance augmente le risque de variation. Deux types de régulateurs sont particulièrement impliqués dans ce processus: Les cytokinines synthétiques (comme la BAP) et des auxines synthétiques fortes (comme le 2.4D))**

# Inconvénients des variations somaclonales

La variation somaclonale est un facteur limitant pour le clonage commercial.

➤ La multiplication du bananier ne doit pas excéder la **5<sup>ème</sup> génération et nécessite un retour** fréquent à la culture initiale ce qui implique un supplément important de travail et d'intrants.

➤ 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)

## **INTÉRÊT DE LA VARIATION SOMACLONALE**

**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.**

**L'application de pressions de sélection permet de sélectionner ces variants.**

## Exemple de protocole permettant de sélectionner des plantes résistantes à la salinité chez le riz

Culture **d'embryons mûrs**  
sur un milieu contenant **0.5**  
**mg/L de 2.4D; 1mg/L d'ANA**  
et **1mg/L de BAP**



Formation **de cals**  
**embryogènes**



Formation **d'embryons**  
**somatiques capables de**  
**germer en plantules**



Repiquage sur  
milieu de  
régénération  
sans 2.4D

**Cal embryogène**



**Culture sur milieu avec 15 g/L de NaCl**

**20 restent vivantes**

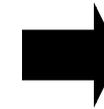


**Culture de 180 plantules en présence de 15 g/L de NaCl**



**Régénération d'embryons**

**4 mois de culture avec repiquage mensuel**



**Arrêt de la croissance puis redémarrage et formation d'un cal résistant**



## **Inconvénients des variations somaclonales**

**La variation somaclonale est un facteur limitant pour le clonage commercial.**

➤ **La multiplication du bananier ne doit pas excéder la 5<sup>ème</sup> génération et nécessite un retour fréquent à la culture initiale ce qui implique un supplément important de travail et d'intrants.**



## **Autres inconvénients des variations**

### **somaclonales**

➤ **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)**

## **INTÉRÊT DE LA VARIATION SOMACLONALE**

**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.**

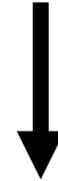
**L'application de pressions de sélection permet de sélectionner ces variants.**

## Exemple de protocole permettant de sélectionner des plantes résistantes à la salinité chez le riz

Culture **d'embryons mûrs**  
sur un milieu contenant **0.5**  
**mg/L de 2.4D; 1mg/L d'ANA**  
et **1mg/L de BAP**



Formation **de cals**  
**embryogènes**



Formation **d'embryons**  
**somatiques capables de**  
**germer en plantules**



Repiquage sur  
milieu de  
régénération  
sans 2.4D

**Cal embryogène**



**Culture sur milieu avec 15 g/L de NaCl**

**20 restent vivantes**

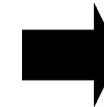


**Culture de 180 plantules en présence de 15 g/L de NaCl**



**Régénération d'embryons**

**4 mois de culture avec repiquage mensuel**



**Arrêt de la croissance puis redémarrage et formation d'un cal résistant**



**Amélioration des plante par  
des méthodes de  
biotechnologie**

## **CHAPITRE II.**

Méthodes d'haplodiploïdisation

## **CHAPITRE III.**

**Protoplastes: obtention,  
applications en biotechnologie**

# **CHAPITRE II**

## **Méthodes d'haplodiploïdisation expérimentale et son utilisation en biotechnologie**

**I – Androgenèse**

**II – Gynogenèse**

**III – Culture d'embryons après croisements  
interspécifiques et intergénériques**

**IV – Applications**

# **CHAPITRE III**

## **Protoplastes: obtention, applications en biotechnologie**

**I – Méthodes et conditions  
d'isolement**

**II – Culture de protoplastes :  
méthodes et conditions**

**III– Régénération de plantes**

**IV –Fusion de protoplastes**

**V – Applications**

## **Méthodes d'haplodiploïdisation**

**DEF:**

**C'est le processus aboutissant à la formation de plantes haploïdes ou haploïdes doublés.**

**Une plante haploïde est une plante qui possède un nombre de chromosomes identique à celui des gamètes de la plante dont elle est issue.**

**La plante haploïde possède une morphologie identique mais elle est plus réduite et stérile.**

**Le doublement artificiel (colchicine bloque la mitose ) du nombre de chromosomes permet de restaurer la fertilité. La plante obtenue est dite haploïde doublée ou dihaploïde.**

## **INTERETS:**

**La production d'haploïdes permet :**

**- aux gènes récessifs de s'exprimer en absence d'hétérozygotie: les caractères ne sont pas perdus grâce à l'homozygotie des dihaploïdes . On peut donc connaître tous les caractères du génome ( important pour les sélectionneurs et généticiens).**

**- Création variétale : haploïde doublé.**

**- Gain de temps par rapport à la sélection traditionnelle.**

**- Recherche de mutants spontanés ou provoqués (rayon ou produit chimique): les relations de dominance entre allèles n'interviennent pas et les caractères récessifs s'expriment et donc les mutants sont directement observables**

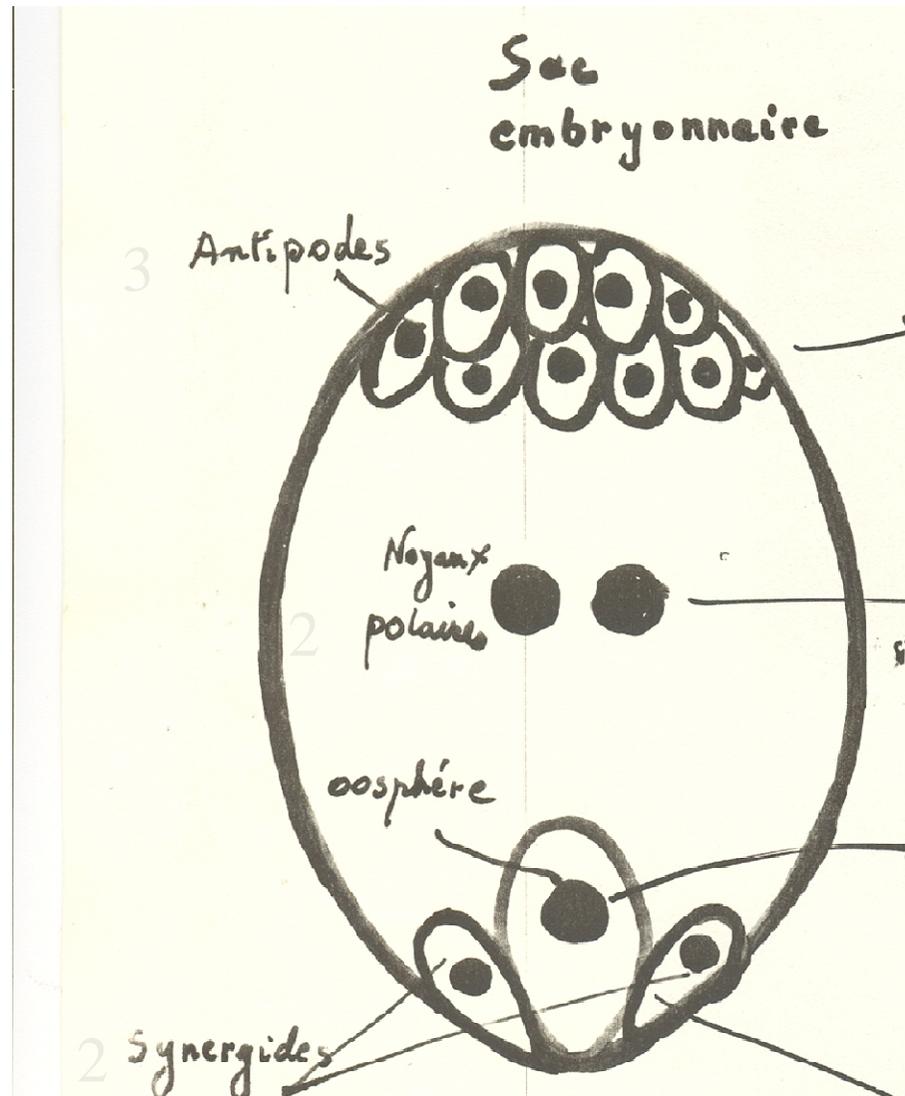
# PRODUCTION DE PLANTES HAPLOIDES:

## 1- Spontanément dans la nature

rare

EX: - **Parthénogenèse** (dev du gamète femelle -oosphère- sans fécondation : oosphère à n embryon puis plante à n chro .

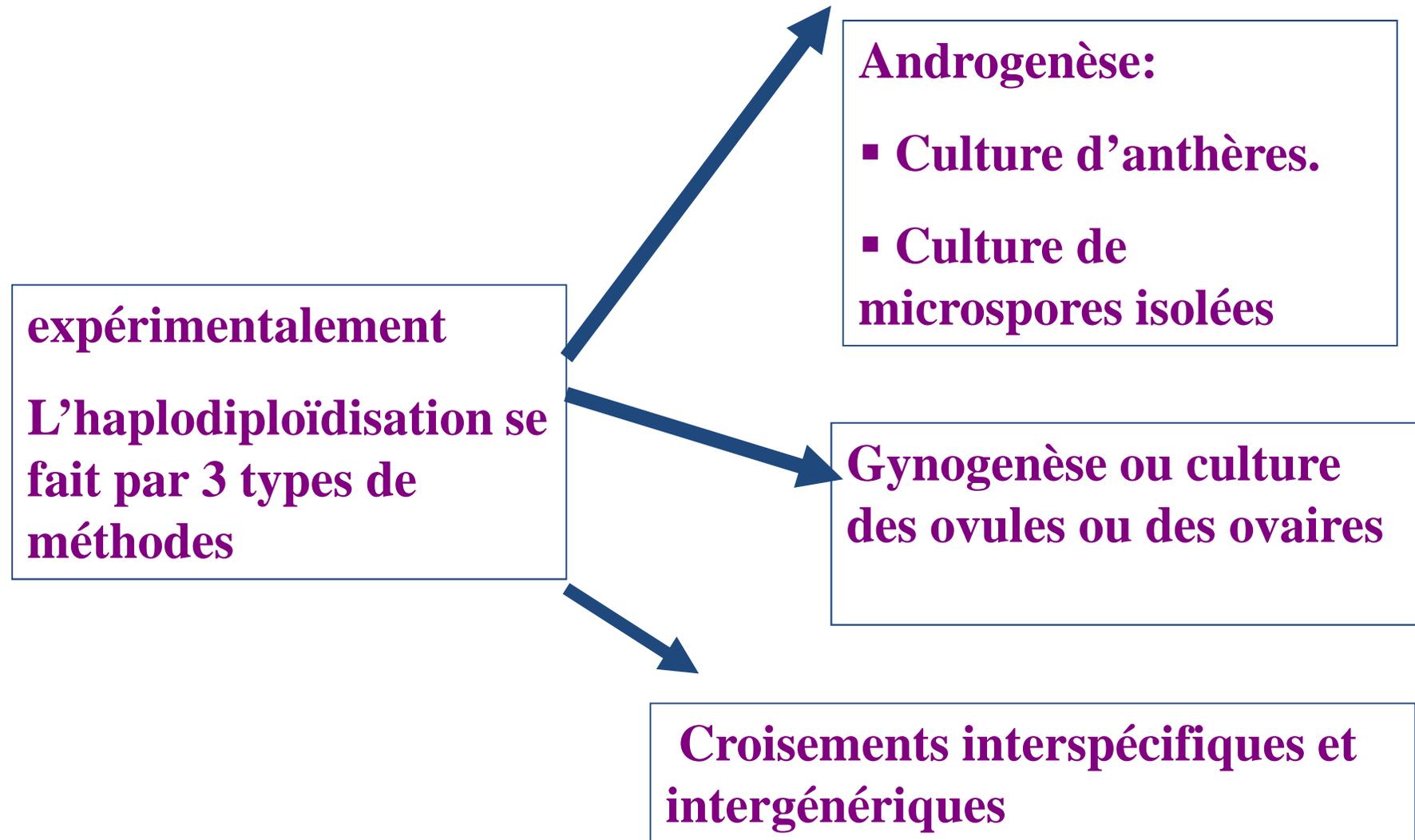
- **Apomixie** (formation d'embryon sans fécondation à partir de cellules autres que l'oosphère tel que cell synergide ou antipode )



2 noyaux polaires + 1  
cell sper  
Donnent l'albumen

**Sac embryonnaire d'un ovule**

## 2- Induites expérimentalement



## En résumé

L'haploïdie in vitro consiste à cultiver sur milieu synthétique **des anthères**, des **microspores**, des **ovules** ou **des ovaires** ou des **embryons haploïdes** issus des croisements **intergénériques** ou **interspécifiques**.

# **A/ Androgenèse**

**1-DEF: Andro= homme    genèse =  
évolution**

**C'est la formation d'une plante à  
partir d'un microspore ou d'1 grain de  
pollen le plus souvent qui se trouve  
dans un anthère**

## 2- Découverte de l'androgenèse et premiers travaux

-1964 Guha et col. obtiennent des embryons sortant des loges polliniques chez Datura après 15 j culture d'anthère. origine??

-1966/67 origine: embryons à n chromosome issus de microspores chez Datura



### **3-Technique de culture d'anthères**

**C'est la méthode la plus facile techniquement.**

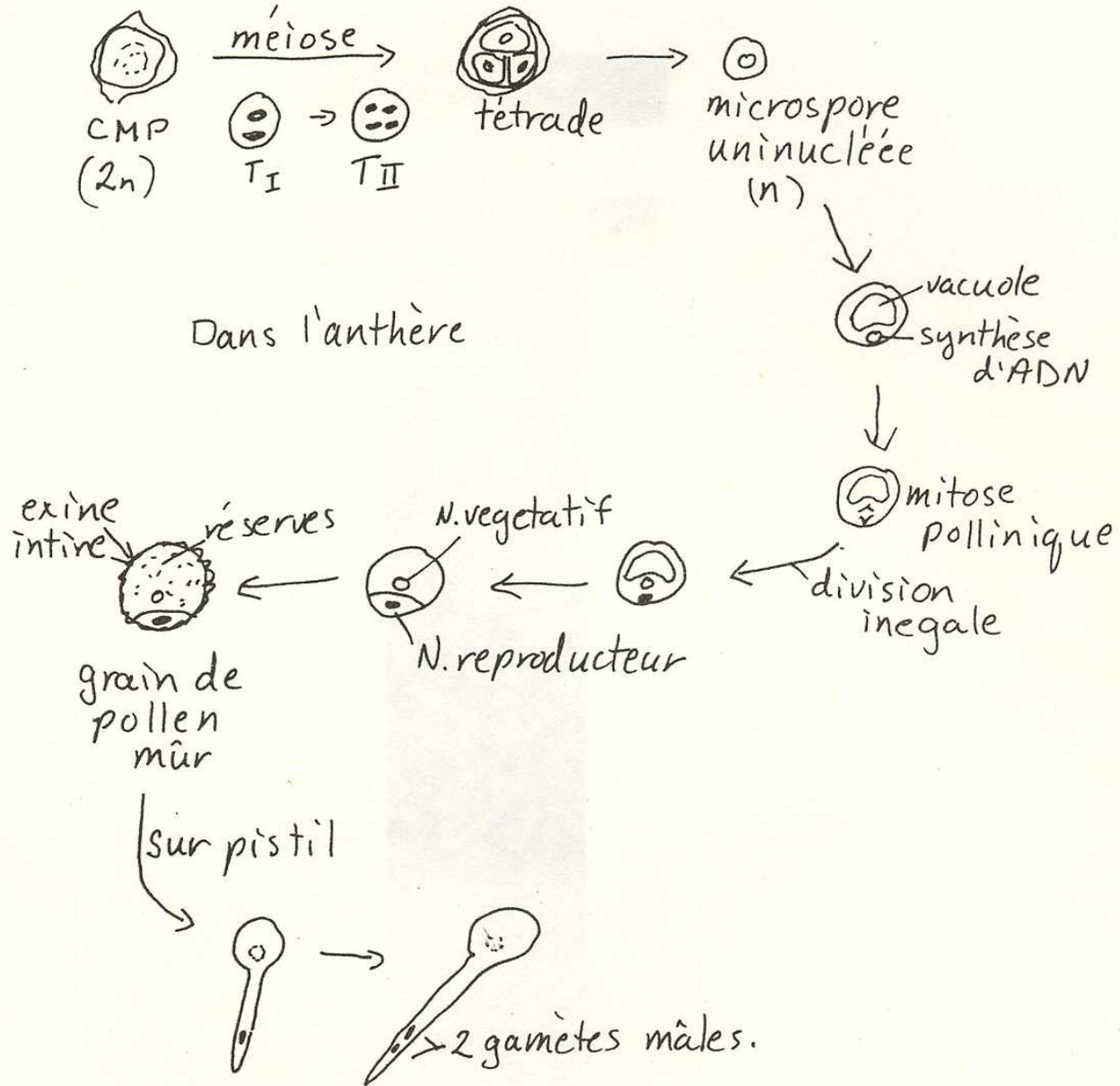
- Méthode permet :la Coupure des liens entre l'anthère et plante mère**
- Certaines corrélations sont maintenues: tissus d'anthères et microspores + ou -**
- Présence de cellules n et 2n ( cell de paroi)**

## 4-Voies de l'androgenèse après culture d'anthère

**Il ya deux voies:**

- directe androgenèse
- indirecte en passant par un cal

# Microsporogenèse



## 5.2- Différenciation et développement Androgénétique des microspores

*Comportements possibles du  
pollen mis en culture in vitro.*

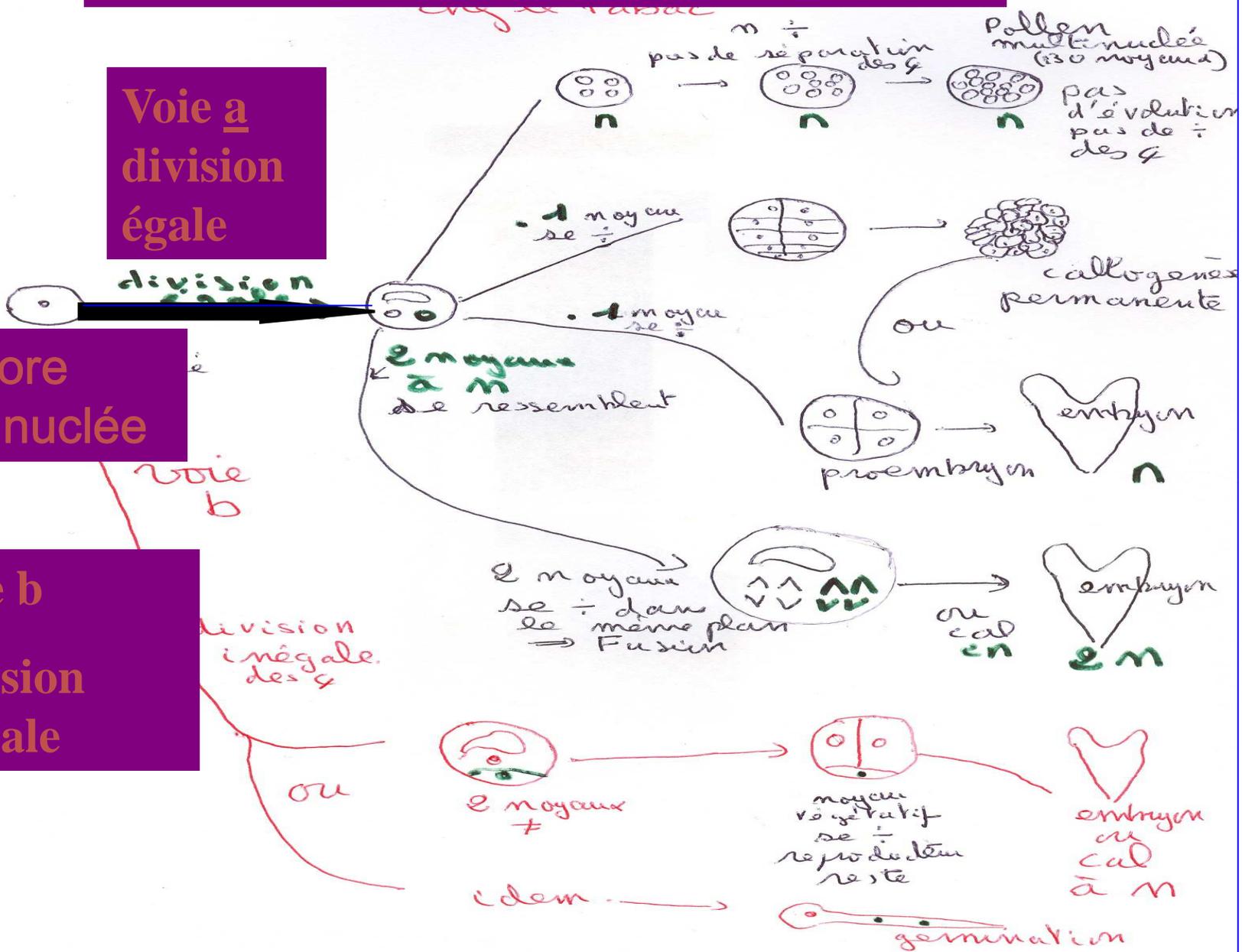
**Chez le tabac: Nicotiana Selon  
Sunderland 1971-1974**

# Voies Androgénétique chez le tabac

**Voie a**  
division  
égale

**Spore**  
uninuclée

**Voie b**  
Division  
inégale



**La division égale du microspore est anormale  
cause??**

## **Hypothèses**

**--Choc de mise en culture? Donc  
dérangement de la division cellulaire?**

**--Coupure des corrélations avec la plante  
mère??**

## **6- Techniques de culture**

**Culture d'anthère intact sur milieu solide ( agent gélifiant) donc simple**

## 7- Rendement en embryons

**Rd initial=  $\frac{\text{nombre de microspores embryogène}}{\text{nombre total microspores}}$**

**En général plusieurs milliers/ 40.000 ( par anthère tabac)**

$$\text{EX Rd} = \frac{200}{40000} \times 100$$

**Tabac Rd= 20 à 40%**

**Riz Rd= 1/30000**

## **8- Facteurs d'induction de l'androgénèse**

### **8-1 Facteur génotype**

- **C'est le facteurs déterminant dans la plupart des cas**
- **Certaines familles, genres, espèces et variétés sont plus « doués » que d'autres pour l'androgénèse.**

#### **Familles prédisposées**

**Dicotylédones : Solanacées -Nicotiana tabaccum**

**- Datura innoxia**

**Crucifères - Brassica campestris ...**

**Monocotylédones** - Graminées

- riz
- orge
- maïs.....

A L'intérieur **du genre** il ya des différences entre espèces

*Triticum aestivum* +++++

*Triticum durum* +

**A L'intérieur des espèces il ya des différences entre variétés**

**Étude 1** : chez tomate sur 100 variétés 10/100

une réponse andro

**étude 2**: chez tomate sur 43 variétés 3/43

réponse andro

**Origine de cette différence de réponse??**

**-Ziv et al. 1984 ont montré chez la tomate que le gène  $ms 10^{35}$  (gène nucléaire) de stérilité mâle favorise l'androgenèse. Ce gène empêche la différenciation du pollen: microsporogenèse arrêtée au stade méiose.**

**- Utilisation d'un « gamétocide (empêche la différenciation des microspores en pollen) » appliqué au champ au blé et qui provoque la stérilité mâle favorise l'androgenèse**

## **8-2 Facteurs physiologiques**

### **a) Environnement de la plante donneuse**

**Les facteurs ( $t^{\circ}$ ;  $\mu$ , hygrométrie)  
agissent sur l'embryogenèse des  
anthères**

**Blé :- meilleurs en plein champ**

**- aussi augmentation de la  $t^{\circ}$  7j  
avant est favorable**

## **b) Stade de microsporogenèse du pollen**

**Stade de microsporogenèse au moment de la mise en culture du pollen conditionne leur évolution ultérieurs**

**Stade dépend du génotype,**

**chez la plupart des espèces les microspores dont le dév est arrivé au début ou à la moitié du stade uninulé offrent de meilleurs résultats en androgenèse in vitro**

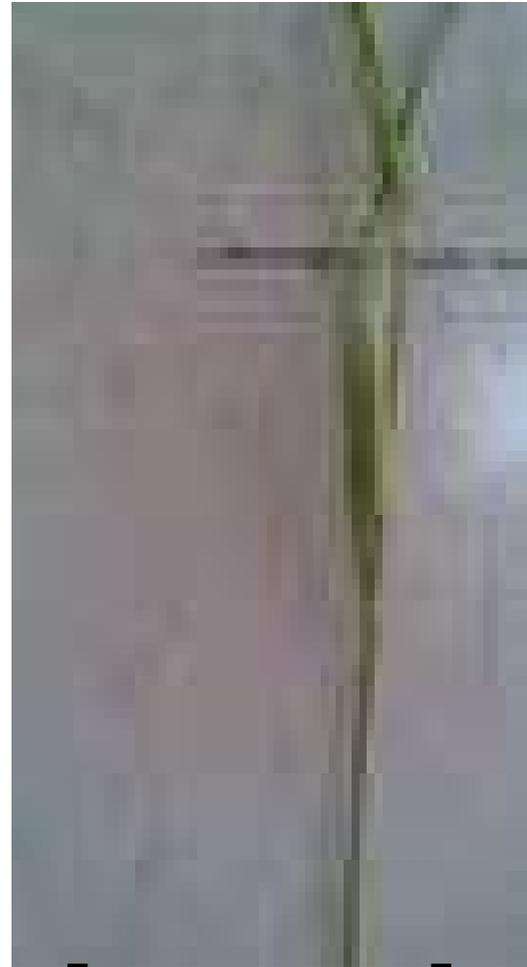
**Tomate**= stade méiose – tétrade

**TABAC** = stade microspore uninuclée

On utilise le bouton floral fermé,  
lorsque la longueur des pétales est  
égale à la longueur des sépales

**Pétunia et Brassica** = stade microspore  
binuclée

**Blé=** stade microspore juste avant la première division pollinique (épis prélevés lorsque leur ptie apicale atteint le tiers sup de la gaine)= stade morphologique de référence car il correspond au stade favorable où les microspores sont **uninuclées,** **vacuolisées et proche de la premier** mitose pollinique



2/3

**épis prélevés lorsque leur ptie  
apicale atteint le tiers sup de la  
gaine**

## C) Prétraitement appliqué aux explant

### 1- températures basses

Nitsch et Moreel chez *Datura* ont montré qu'une t° fraîche de 3° augmente l'androgonèse

traitements	% d'anthères embryogènes
<b>Témoin:</b> ensemencement direct des anthères	<b>1.59 %</b>
<b>2 j à 24°</b> des boutons floraux puis isolement et culture d'anthère	<b>3.5 %</b>
<b>2 j à 3°</b> puis isolement et culture d'anthère	<b>23 %</b>

**T° ?? Moment (stade des microspores  
 )?? du prétraitement**

**Chez le tabac**

**Le choc à 5°C, 7°C, et 9°C**

**7°C, et 9°C étaient les meilleurs et juste avant  
la mitose pollinique**

**Si le choc thermique est appliqué bien avant  
la mitose pollinique ou à 1 stade plus tardif  
(binuclée) → pas d'effet**

## **Rôle du froid?**

**On fait une étude cytologique du pollen au chaud et à froid :**

**Au froid= + de mitose pollinique de type égale.**

**Sans traitement= + de mitose qui sont gamétophytiques de type inégales**

**Donc + on a de division de type égale + on a de l'embryogenèse**

## hypothèses sur l'action du froid

hypothèses :

- 1) Sur le plan cytologique le froid stimule la division **égale** des microspores  
+d'embryons
- 2) Action **conservatrice** du froid ( survie)
- 3)Le froid **ralentit la différenciation** du pollen

## **2- températures élevées**

**- Chez Brassica  $t^{\circ}=35^{\circ}\text{C}$**   
**stimulatrice de l'androgenèse**

**- Chez le piment à  $35^{\circ}\text{C}$**   
**pendant 2à 4j ( en culture)**  
**stimule**

## d) Le dimorphisme pollinique

Chez certaines espèces comme

{	Tabac
	Orge
	Anémone

### 2 types de pollen:

-Pollen + gd + colorable + nombreux, + différenciés

- Pollen + petit, - colorable, - nombreux , - différenciés, pas d'amidon . comme il suit + lentement la vie gamétophytique

C'est le plus embryo



Plate II (Figs 13-19)

**- Le prétraitement au froid augmente la proportion des grains de pollen (petits) embryo??**

**-Chez les espèces sans les 2 types de pollen in vivo le froid les crée in vitro**

## 8-2 rôle des facteurs physiques et chimiques

### 1/ Facteurs physiques

**- Position des anthères: chez Datura la position à plat avec un contact max avec le milieu de culture donne le meilleur résultat. Pas submergés**

**- t° d'incubation au cours de la culture**

**Dépend de l'espèce**

**Chez Datura:**

**Datura**

**15°c** —————> **rien**

**20°c** —————> **rien**

**25°c** —————> **++++++**

**30°c** —————> **++**

**Sup à 30°c** —————> **rien hors des  
conditions physiologique**

## - La lumière

Dépend du génotype

**Chez Datura** :  $\mu$  positif      obscurité =  
peu d'embryon

La **majorité des travaux** montrent :

Obscurité nécessaire au cours de l'induction et lumière  
pour la régénération (blé)

## **2/ Facteurs chimiques (milieux de culture)**

**Milieu d'induction + milieu de régénération**

**Milieu de culture:**

- Sels minéraux(macro, micro)**
- Vitamines et aa**
- Source de carbone**
- Régulateurs de croissance(phytohormones)**
- Gélose; - extraits végétaux (extrait P.T , lait de de noix de coco....)**

## **A- Milieu minéral**

**Les milieux les plus utilisés sont :**

**le milieu (Murashige et Skoog, 1962) MS**

**Le milieu C17( 2 mg /l 2,4 D) pour l'induction  
chez le blé**

**Le milieu R9 ( pas d'hormones) pour la  
régénération chez le blé**

## **B -Source de carbone**

**Saccharose le plus utilisé 2à 3%**

**Céréales 8 à 12% effet trophique  
et osmotique (division des  
microspores)**

## **C - Agent gélifiant**

**Agar, Agarose, gélyte pour solidifié le milieu**

**milieu solidifié par l'amidon (amidon d'orge)**

**La solidification du milieu par l'amidon d'orge augmente le nbre d'embry, de cals, de plantes vertes par rapport à l'agar**

## **D - Régulateurs de croissance**

**présence est généralement favorable**

**-les auxines:**

**2,4 D pas d'effet Datura , Pétunia**

**graminées tq céréales**

**indispensables à  $10^{-8}M$  à  $10^{-6}M$**

**ANA**

**10-7 à 10-4 ont un effet chez Pétunia**

**10-6 donne le plus grand nbre d'embryons/anthère**

**AIB**

**10-5 donne le plus grand nbre d'anthère embryo**

**AIA**

**-GA:**

**GA à 10-7 M action positif sur nbre d'anthère embryo  
mais peu d'embryon / anthère**

**-CYTOKININES**

**Kin, Zéa, BAP Rôle très important opt 10-8 M Action +  
sur nbre d'anthère embryo et sur nbre d'embryo par anthère**

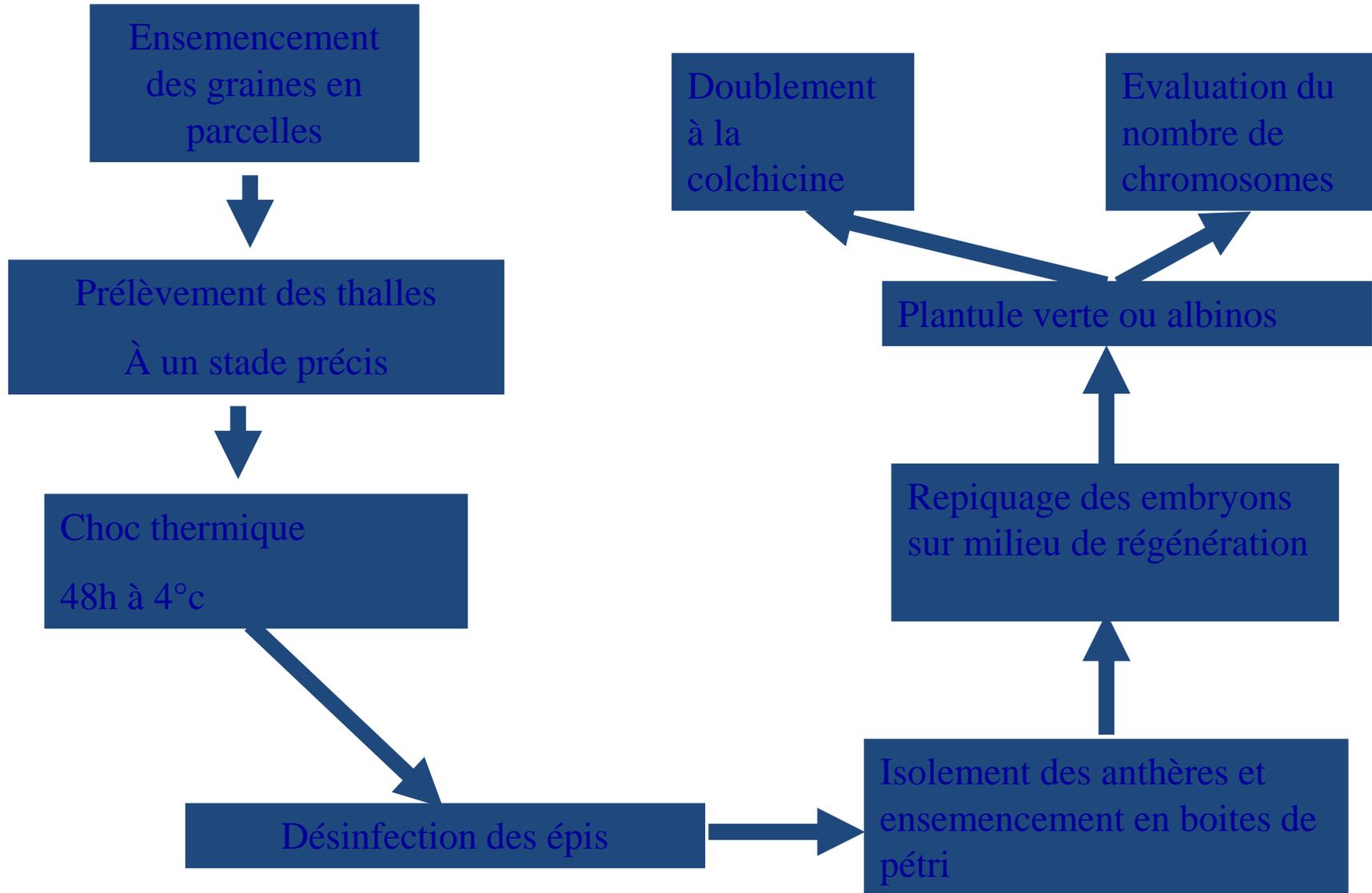
**Hypothèses rôles des régulateurs de croissance??**

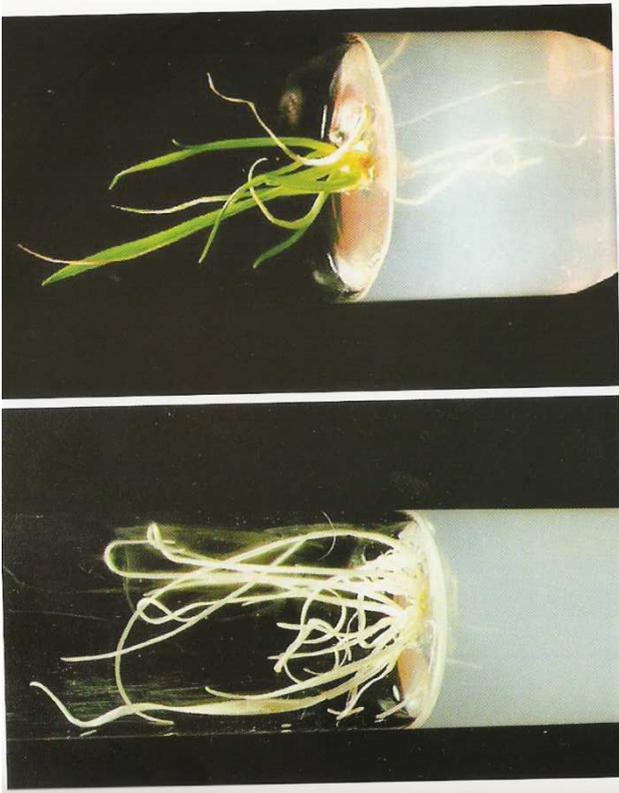
**Stimulation par empêchement de la différenciation cellulaire**

**Charbon actif =adsorbant, Lait de coco**

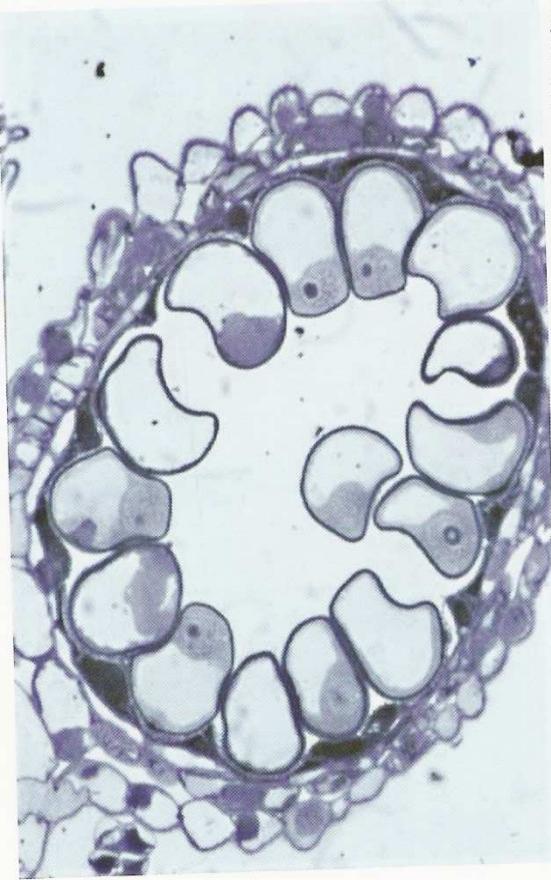
**2/ Etapes de production de  
plantes haploïdes par  
culture d'anthères: cas du  
blé**

### 3- L'androgenèse chez le blé (MADAME CHERKAOUI )





*Photo 18* ■ Plantes chlorophylliennes et albina androgénétiques obtenues en culture d'anthers de blé (cliché, E. Picard, J. de Buyser, D. Froger).



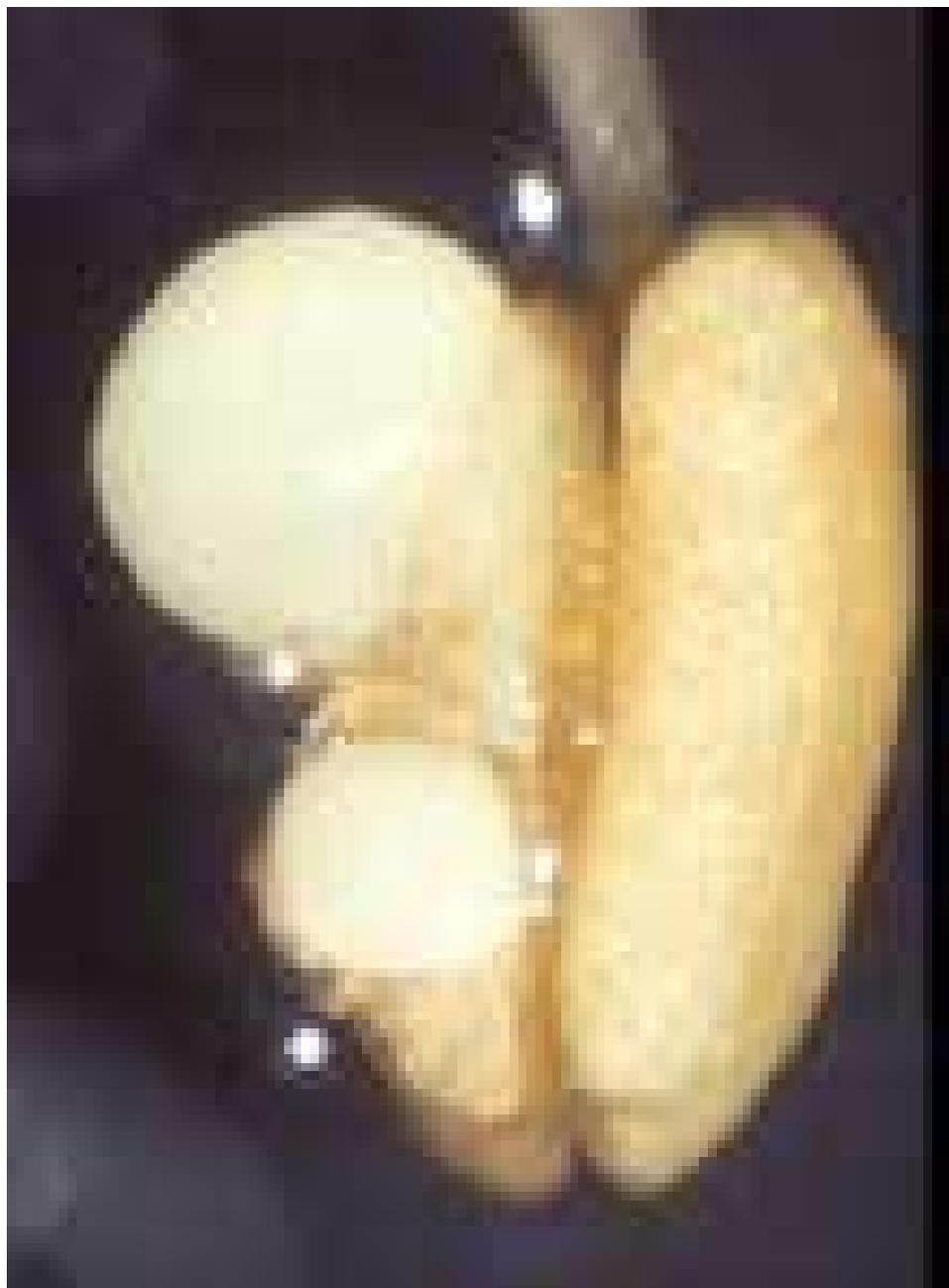
*Photo 16* ■ Coupe transversale montrant la disposition des grains de pollen à l'intérieur d'un sac pollinique (cliché L. Benkrima, E. Picard).



*Photo 17* ■ Anthers de blé après 3 semaines de culture dans le milieu liquide CHB3 et produisant de nombreux embryons (cliché E. Picard, J. de Buyser, D. Froger).



*Photo 19* ■ Régénération de blé dur



## **4- problème d'albinisme**

**Pb majeur**

**Chez les céréales surtout chez le blé dur le taux d'albinisme après culture d'anthere dépasse 99% Ce taux est de 77 % chez le blé tendre**

**- Ce pb est du:**

**-A une différenciation incomplète des proplastés en chloroplastes**

**-Vaughn et al., 1980 : plastes des albinos endommagés et donc incapables de se dev en en chloroplastes .**

**-À des divisions rapides des cell qui inhibent la synthèse en quantité suffisante de protéines de structure spécifique nécessaire à la formation de chloroplastes**

- Zhou, 1996 a suggéré que l'albinisme peut être  
causé par **l'expression des**  
**gènes récessifs** sous les conditions  
d'haploïdie

# Culture de microspores isolées

Après des **progrès réalisés** dans le domaine des cultures en milieu liquides ou semi-solide ce sont les méthodes de culture de microspores isolés qui ont fait **l'objet des recherches les plus actives**

## **1- Définition:**

La culture des microspores isolés est une culture qui se **fait en dehors** de la paroi des anthères

## 2- avantages:

**A-** les microspores (**40 000 Datura**) sont **dispersés** dans un milieu de culture au lieu **d'être comprimés** dans l'anthère = on élimine la concurrence entre les microspores : **culture homogène sur milieu de culture** : conditions de nutrition **plus uniformes** que dans l'anthère.

**B- culture monocellulaire : on**  
**est sûr que toutes les cel sont n**  
**et pas de mélange de cell**

**C – pas de conditionnement de**  
**la paroi de l'anthère = on**  
**élimine les corrélations +ou-**

## **3-Méthodes de culture**

### **3.1 Culture de microspores avec préculture des anthères**

**Technique mise en évidence par Nitsch et Moreel 1973 chez Datura**

**Cette technique consiste à cultiver des anthères en milieu liquide en attendant, ou en provoquant , l'ouverture des loges polliniques et la libération dans le milieu des microspores: méthode non considérer comme culture de microspores isolées au sens strict**

Protocole expérimental: Méthode de Nitsch et  
moreel chez Datura 1973

**Prétraitement des  
anthères 3°  
PENDANT 2J**



**CULTURE INITIALE DES  
ANTHERES SUR  
MILIEU LIQUIDE jusqu' à  
ouverture des loges des  
anthères PENDANT 1-5 J**



**Résultat?  
corrélations avec  
l'anthère maintenues  
un certain temps  
stimulation ou  
inhibition**



**Retrait des anthères  
Prélèvement des  
microspores et culture sur  
milieu frais**

## Résultats obtenus chez Datura:

➤ Culture du pollen sur milieu liquide simple

➔ **RIEN**

➤ Culture du pollen sur milieu liquide simple +  
extrait d'anthères ➔ **Embryons**

➤ **Rôles de l'extrait d'anthères??**

➤ **NITSCH 1974 montre que:**

**-Anthères riche en sérine et glutamine**

**Milieu+ sérine et glutamine ➔ Embryons**

## 3.2. Culture de microspores isolées sans préculture des anthères

La culture des microspores isolées au sens strict implique **un isolement préalable des microspores** qui s'effectue le plus souvent par broyage mécanique des anthères ou des inflorescences, suivi de filtrations et centrifugations

**Protocole expérimental pour  
isolement et culture de microspores  
du blé tendre utilisé par Picard et  
Debuyser -1998- labo ORSAY PARIS-  
SUD**

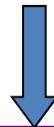
**Prétraitement de des épis 3-4° PENDANT 2J-14J**



**Désinfecter des épis**

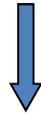


**Dissection des épillets**

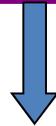


**Mettre les épillets dans un bol d'extraction placé sur un broyeur réglé à une faible vitesse**

**Broyer durant 10s**



**La solution du broyage est filtrée sur tamis puis transférée sur tube à centrifuger**



**Centrifuger 3 fois 5 min à 100g  
Puis éliminer le surnageant**

**Au niveau du culot déterminer le nombre de microspores sur cellules nageotte**

**Puis ajuster à 50 000 microspores /ml**

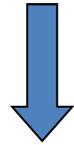


**Mettre en culture en BP 1,5 ml de la suspension de microspores**



### **Co-culture d'ovaires**

**Prélever aseptiquement 5 à 10 ovaires à partir d'autres épislets et les mettre en culture dans la BP contenant les microspores**



**Après 15j les embryons sont visibles**

**Après 3 semaines les embryons sont repiqués sur milieu MS sans hormones**

**Après 4 semaines 1000embry/boite**

## **Rôle de la co-culture**

**L'effet positif** de l'incubation **des ovaires** dans le milieu de culture a été observé chez l'orge :

Les ovaires enrichissent le milieu **en pr-** ,  
**aminoacides**, composés **phénoliques**  
**et hormonaux**

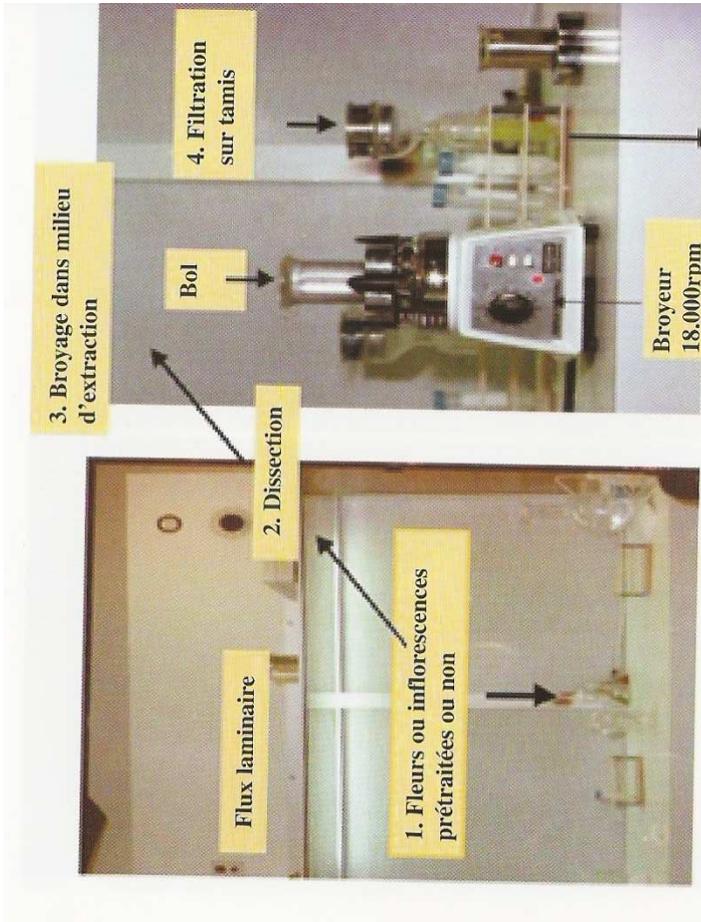


Photo 20 ■ Matériel utilisé pour l'extraction des microspores

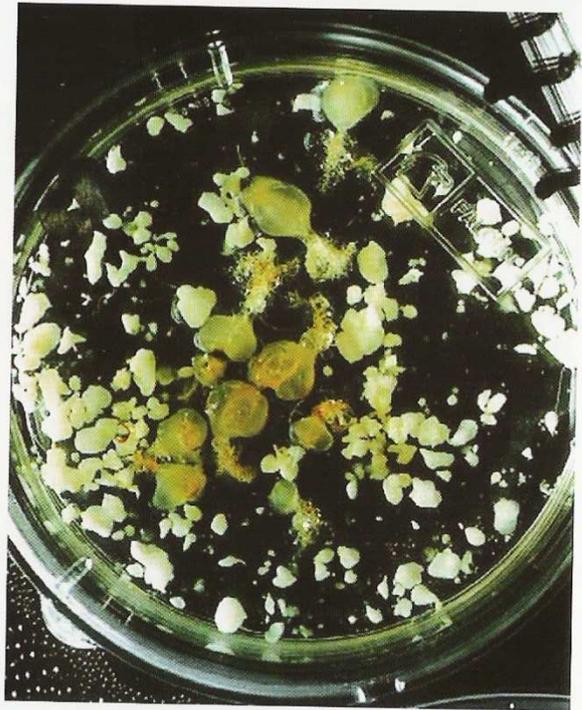


Photo 21 ■ Obtention d'embryons



Photo 22

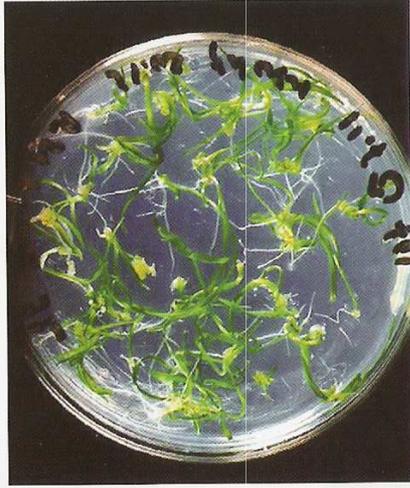


Photo 23



Photo 24

Photos 22-24 ■ Embryons (22), régénération (23), détail de régénération (24)

## **conclusion**

**le rendement en embryons par cultures de pollen isolés n'est actuellement supérieur que pour le **colza et l'orge****

**Donc la culture d'anthère reste plus efficace**

## **B/ Gynogenèse**

### **1- DEF:**

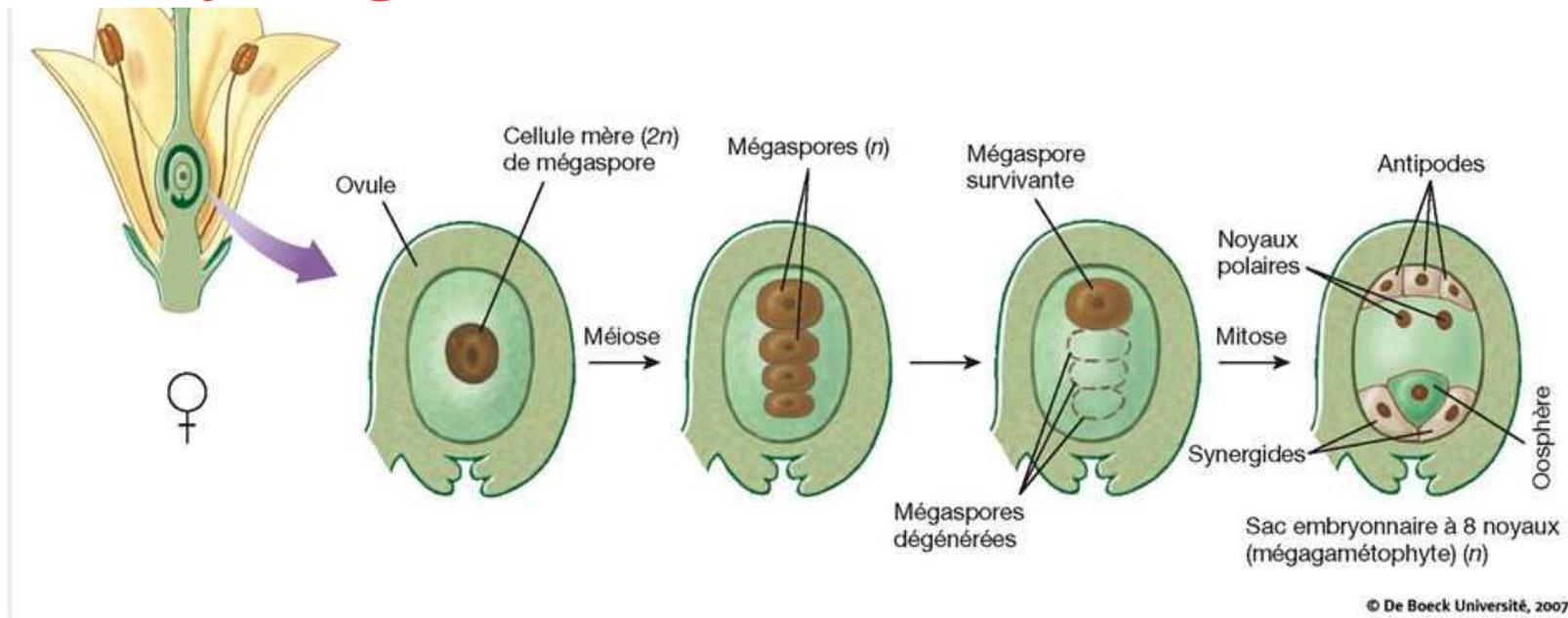
**Elle consiste à mettre *in vitro* des ovaires ou des ovules non pollinisés pour la production de plantes haploïdes .**

**-Peu étudier par rapport à l'androgenèse**

## 2- Origine du développement in vitro du gamétophyte femelle:

Ce dev peut avoir différents origines A partir:

- des **antipodes** chez **Crepis**
- des **synergides** chez **Hevea**



- de l'ensemble des cell formées par les antipodes, les synergides et l'oosphère chez **le tournesol**

- **chez l'orge** : synergides permettent l'induction du cal et les antipodes à l'origine des embryons

- **chez le blé tendre** : embryons à partir de l'oosphère, antipodes, des noyaux polaires

### **3-Facteurs influençant sur la gynogenèse**

Ces facteurs sont en général **similaires** à ceux influençant sur la culture d'anthère

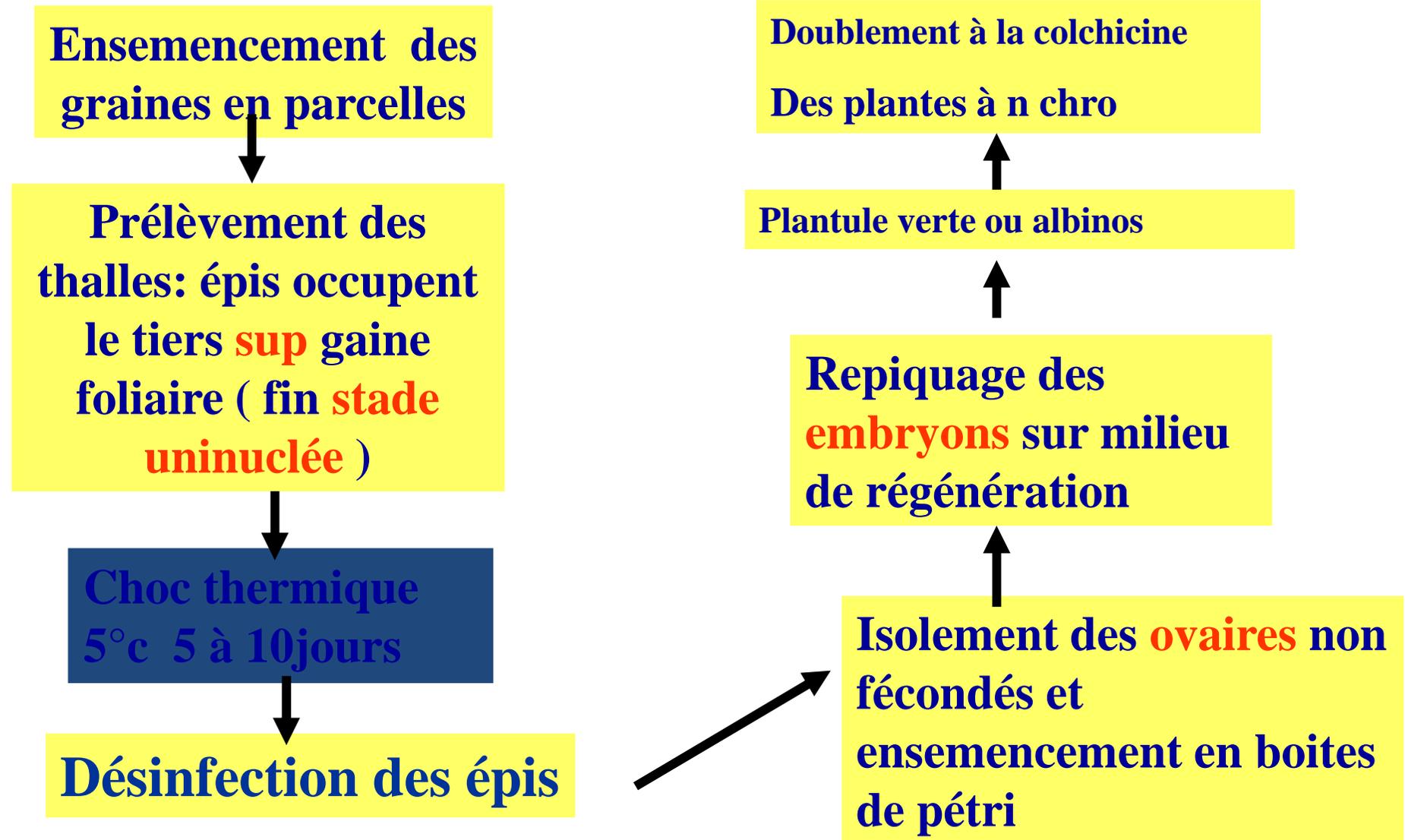
### **Stade de développement du sac embryonnaires**

La détermination directe du stade du dev du sac embryonnaires est délicate donc recours aux méthodes indirectes:

- **Chez l'orge** = plantes obtenues au stade mature du sac embry = **stade binuclée du pollen**

**4-Protocole expérimental pour  
isolement et culture d'ovaires du  
blé tendre utilisé par  
MADAME Mdarhri Alaoui**

# Gynogenèse chez le blé (MADAME MDARRHRI Alaoui-1998-)



# CONCLUSION

Gynogenèse:

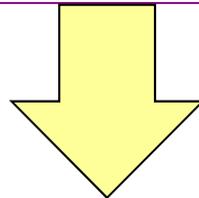
**Chez le blé tendre pas  
d'albinisme mais méthode peu  
étudiée et limitée par le faible  
nombre d'ovaire en comparaison  
avec le nombre d'anthère**

**c) Haplodiploïdisation  
par croisements  
interspécifiques et  
intergénériques**

## Croisements intergénériques

L'hybridation intergénérique est une méthode d'haplodiploïdisation, en raison de l'élimination sélective et spontanée du génome du parent pollinisateur au cours des premières divisions cellulaires de l'embryon.

La variété de blé tendre Chinese Spring croisée avec le maïs (*Zea mays*)

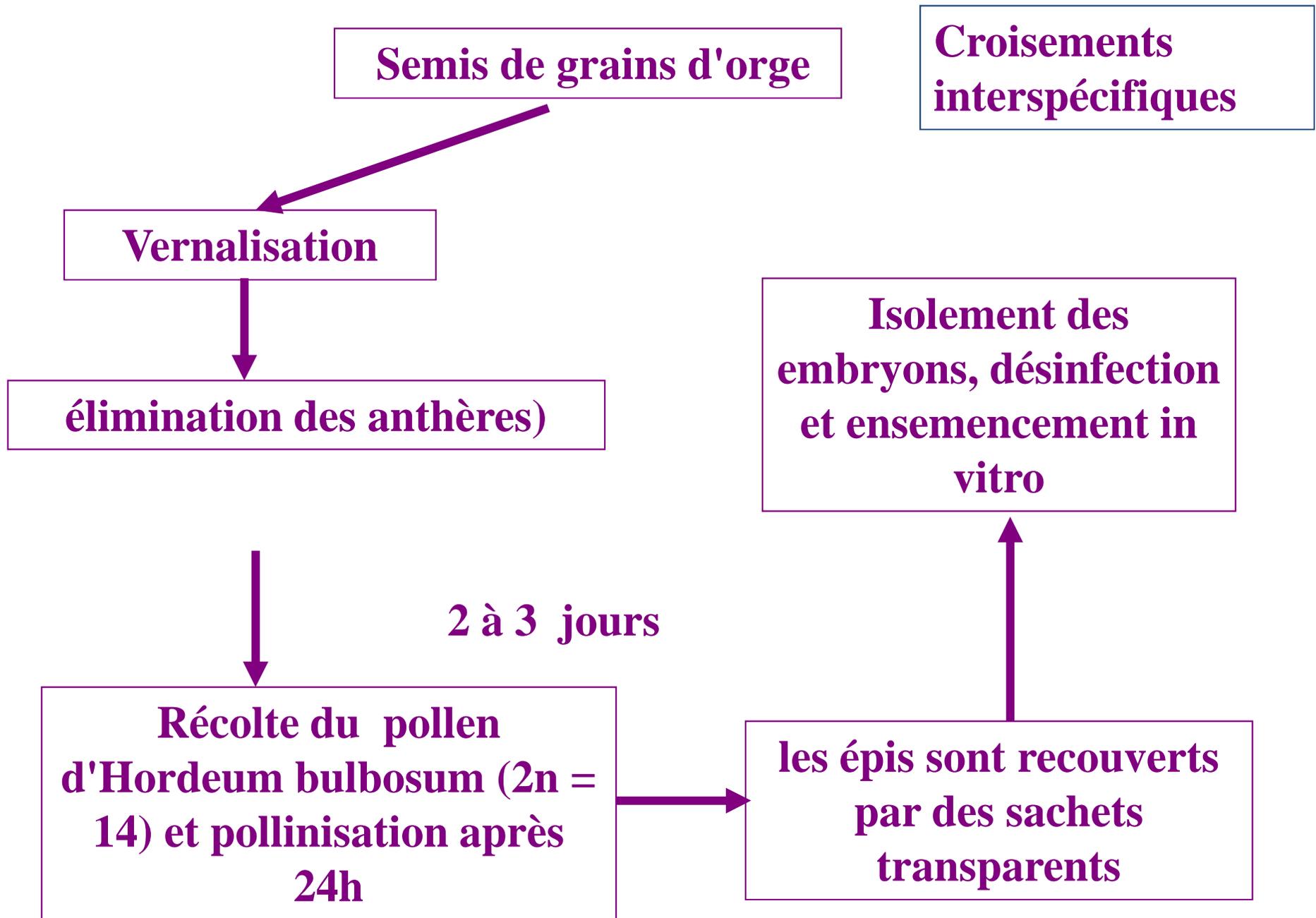


Taux de réussite de 22% (22 embryons formés pour 100 fleurs pollinisées).

Le zygote issu de ce croisement contient une combinaison de **21 grands chromosomes** de blé et **10 petits chromosomes** du maïs. Ces derniers sont rapidement éliminés au cours des trois premières divisions cellulaires, donnant un embryon haploïde avec des chromosomes du parent

L'embryon issu de ces croisements pourrait dégénérer si on le laisse sur la plante mère plus de 10 à 14 jours après leur formation .

# Croisements interspécifiques



# APPLICATIONS PAR HAPODIPLOIDISATION

**riz- : amélioration du rendement**

**exemple d'haploïdisation**

**cas de l'asperge**

**a) Données botaniques**

**Dioïque : mâle et femelle 50% / 50%**



## **b) Problématiques de l'amélioration et de la culture**

**- les pieds mâles sont plus productifs et plus précoces : le sexe est déterminé par un gène majeur à 2 allèles M et m**

**Les plantes mâles sont hétérozygotes Mm**

**Les plantes femelles sont homozygotes récessives mm**

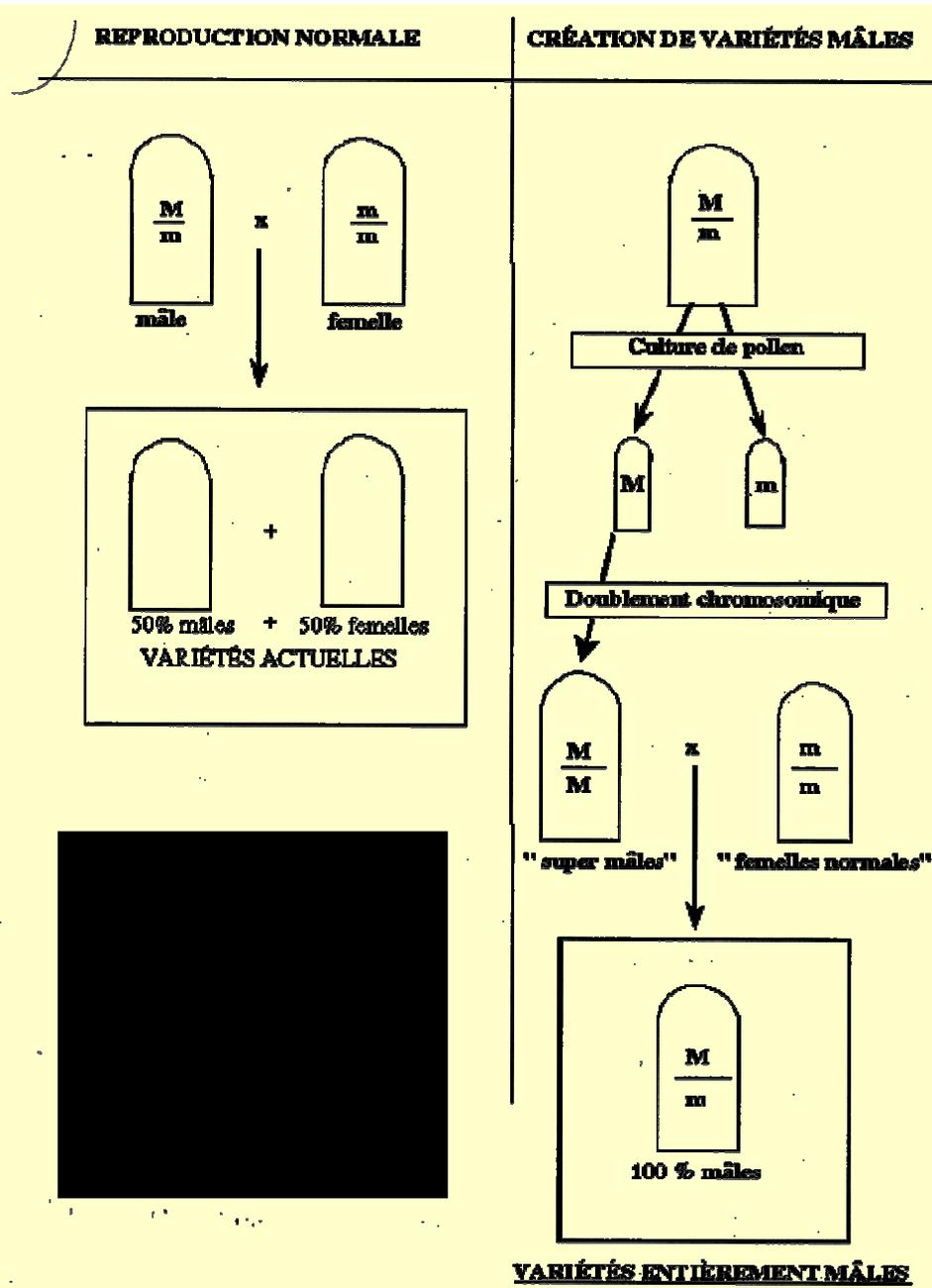
# **Objectif de l'amélioration**

## **Obtention d'haploïde par culture d'anthère**

**des plantes mâles hétérozygotes Mm sont utilisées pour établir des cultures d'anthères:**

**des structures embryoides haploïdes sont obtenues, puis après dédoublement chromosomique spontanée les plantes régénérées conduisent à des clones diploïdes :**

- soit homozygotes MM appelés super mâles**
- soit homozygotes mm donc femelles**
- Le croisement entre clones homozygotes super mâles et les clones homozygotes femelles produit des hybrides hétérozygotes et entièrement mâles Mm**



les clones  
homozygotes  
femelles/ avec  
super mâles

Figure 2

Utilisation de l'haplodiploïe pour la création de variétés entièrement mâles chez l'asperge

## **CHAPITRE II**

# **Protoplastes: obtention, culture applications en biotechnologie**

# I – Méthodes et conditions d'isolement

## 1- DEFINITION

## 2- Historique

**Klerker (1892)** fut le 1<sup>ier</sup> à isoler les proto à partir de la **levure** suite à une **plasmolyse** et **dissection de la paroi** sous **microscope**.

**Cocking 1960** par méthode  
**enzymatique** obtient des  
proto à partir des racines de  
**tomates.**

### **3- Intérêts des protoplastes**

a) les protoplastes autorisent de nombreuses études **de physiologie** et de **biochimie** de la paroi:

-les proto avant de se diviser **reconstituent** leur paroi

- Il faut **1 à 3 jours** pour la formation de la paroi.

On utilise le **Calcofluor** qui est un colorant spécifique **pour les fibrilles de cellulose** sous les rayons UV

-la division **nucléaire** peut se faire sans la paroi mais **la cytotière** ( division cellulaire) ne se fait qu'après la reconstitution de la paroi

-**b) Obtention de clones d'origine unicellulaire : pas de plantes chimères**

c) Elle peut **permettre la micropropagation** de certaines espèces

d) Protoplaste comme une cellule animale : possibilité introduire des **particules** ou macroéléments: particule contenant une information : **ADN, ARN,**

**Organites:** mitochondries, plastes chez les albinos

**Carlson 1972** a introduit un **chloroplaste** de tabac chez une plante **albinos**: plante verte

e) Élément nécessaire pour la **transformation** génétique **OGM** : électroporation, transformation par *Agrobacterium Tumefaciens*

f) **Création et amélioration** des plantes par **fusion des protoplastes** : interspécifique et intergénérique

## **4- Méthodes et conditions d'isolement des protoplastes**

**L'isolement de protoplastes  
comprend deux étapes : la plasmolyse  
et la dégradation de la paroi.**

**La présence de solutés et de sels minéraux dans la cellule provoque l'entrée d'eau dans la cellule.**

**le potentiel osmotique est équilibré par la paroi.**

**IL faut plasmolyser les cellules pour éviter l'éclatement de protoplastes .**

**Les agents plasmolysants les plus utilisés sont les oses alcools (sorbitol, mannitol).**

## **A – méthode mécanique**

**-Les premiers protoplastes ont été obtenus, en hachant des fragments végétaux dans une solution hypertonique de saccharose.**

**- Plasmolyse des cellules puis micro-dissection sous le microscope**

**peu efficace et non reproductible.**

## **B – méthode enzymatique**

la méthode la plus utilisée

**Paroi** : constituée de pectine,  
cellulose, hémicellulose protéine

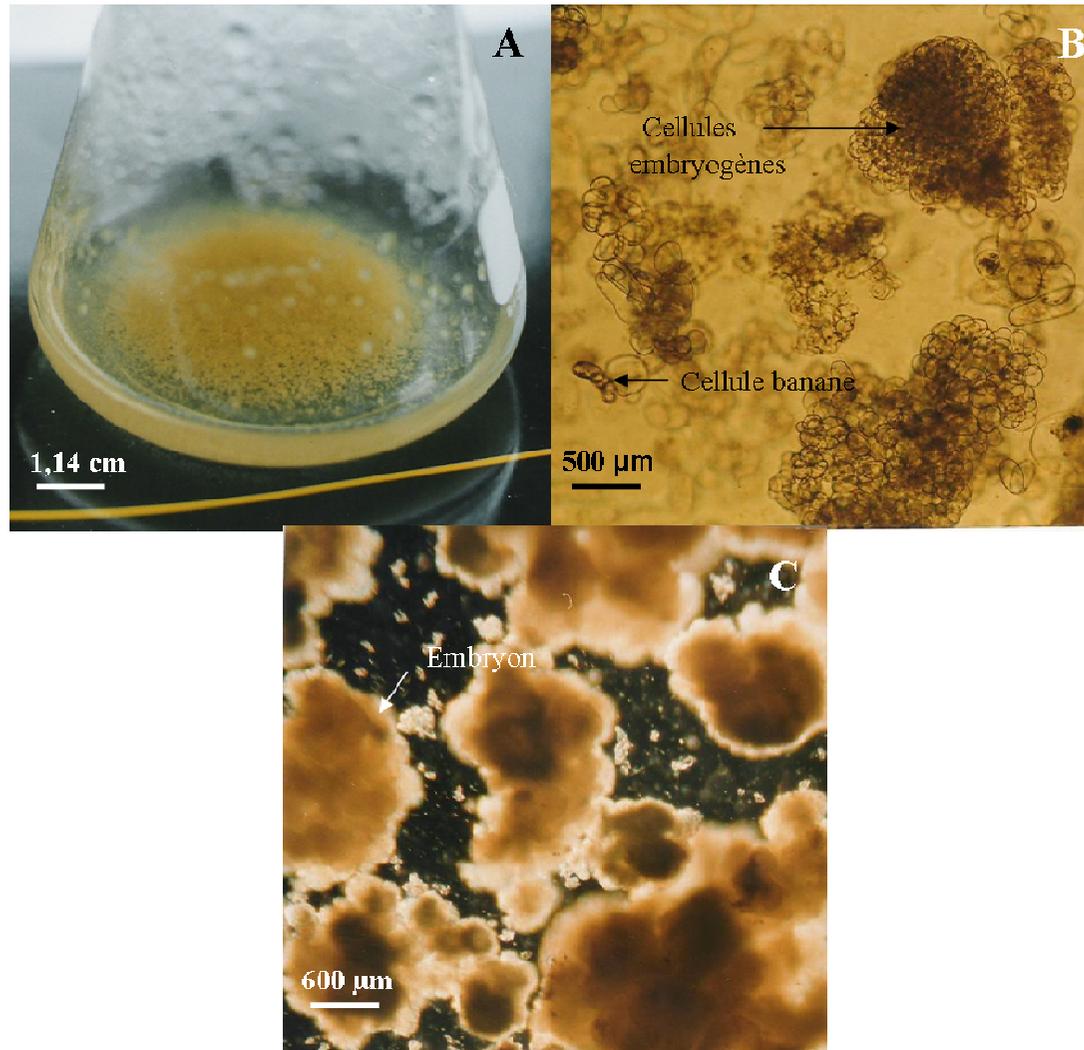
Utilisation des **enzymes** ( cellulase-  
pectinase –hémicellulase) permet  
l'isolement des proto

# **.1- FACTEURS AGISSANT SUR LE RENDEMENT**

## **1-1 Tissus donneurs**

- Les protoplastes à partir de différents types d'organes.**
- Le mésophylle des feuilles est le plus utilisé(P.T).**

- **D'autres tissus sont aussi employés : --**
- **Souvent les tissus cell** cultivés in vitro déjà stériles
- les suspensions cellulaires **embryogènes** sont les plus favorables chez les **monocotylédones** : céréales, bananiers et le riz
- **bon Rd et favorisent la régénération.**



Suspension cellulaire du bananier

## **2- Pré- traitement des tissus**

**-parfois traitement osmotique EX: mannitol**

**-Le prélèvement de l'épiderme améliore souvent le Rd (choux)**

## **-3 -Conditions d'incubations**

**-Types d'enzymes, concentrations, durée 1 à 24 h, pH**

**CaCl<sub>2</sub> = stabilisateur de la membrane plasmique**

## 4-TESTS DE VIABILITE DES PROTO

Le colorant FDA est utilisé pour vérifier la viabilité des proto: la fluorescence en jaune vert s'accumule dans la m. plasmique lorsque la cell est viable.

c'est les chloroplastes qui fluorescent en rouge si proto sont morts

## **REMARQUE**

**Le meilleur matériel végétal est celui qui donne :**

**Un bon Rd en ptro**

**Qui forment la paroi , se divisent,  
capables de régénérer des pousses**

## **-II – Culture de protoplastes : méthodes et conditions**

### **1- DIVISION CELLULAIRE**

**une densité minimale de  $10^4$  pro/ml  
pour réussir la culture**

## **2-Milieu de culture**

**-Souvent MS**

**-Vitamines + aa+ saccharose ou glucose.. Rôle trophique et osmotique,**

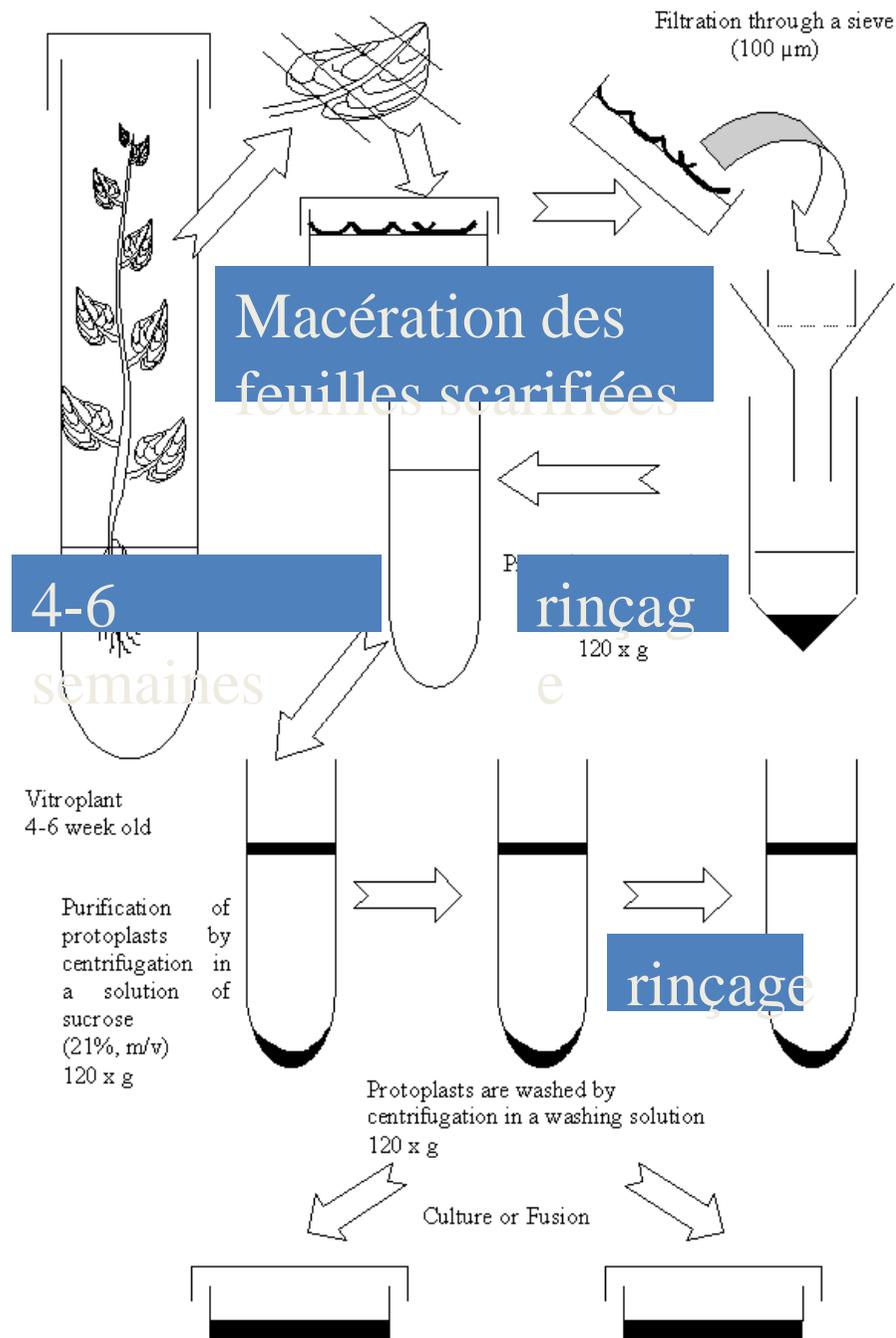
**-+ 2,4 D=1 mg/l, kin = 1-2 mg/l.....**

**Milieu liquide = PT**

**Milieu solide = bananier**

# **3- Exemple de protocole d'isolement de protoplastes**

## **3-1 cas de la pomme de terre**



### 3- 1.1. Isolement de protoplastes

#### ➤ Solution enzymatique

- 0.5% (w/v) Cellulase RS

- 0.05% (w/v) Pectolyase Y23.

- mannitol 0,5 M

#### ➤ Source de protoplastes:

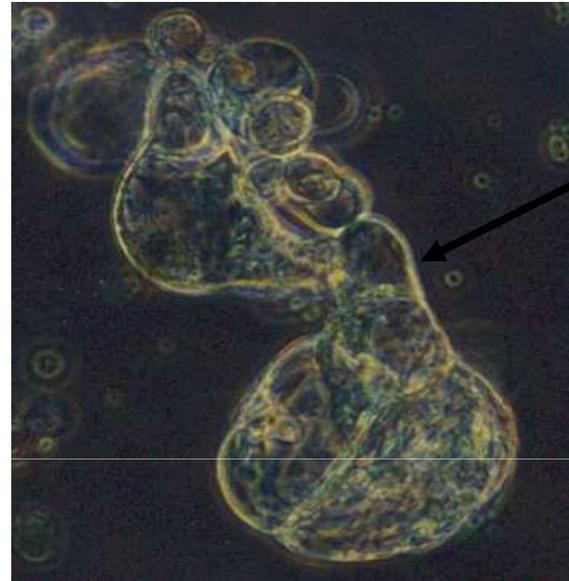
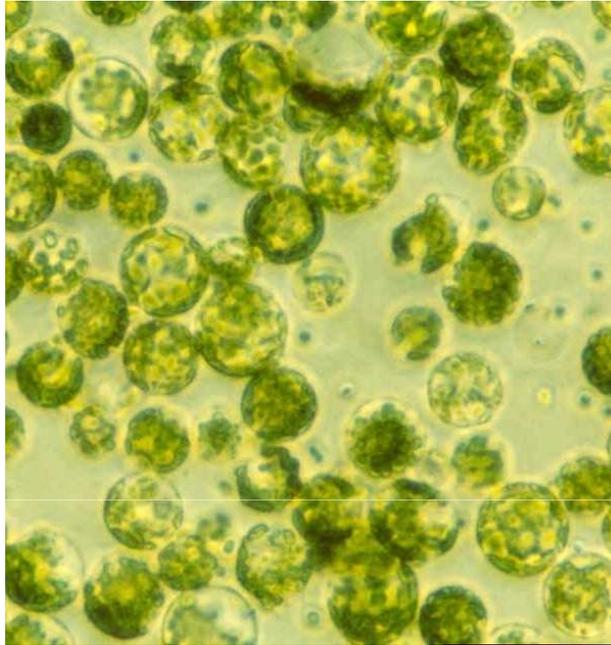
-limbe foliaire à partir de vitroplants;

- Cal embryogène.

### 3.1.2.Culture de protoplastes

➤ Milieu liquide riche en régulateurs de croissance (2.4-D, NAA and zéatine)

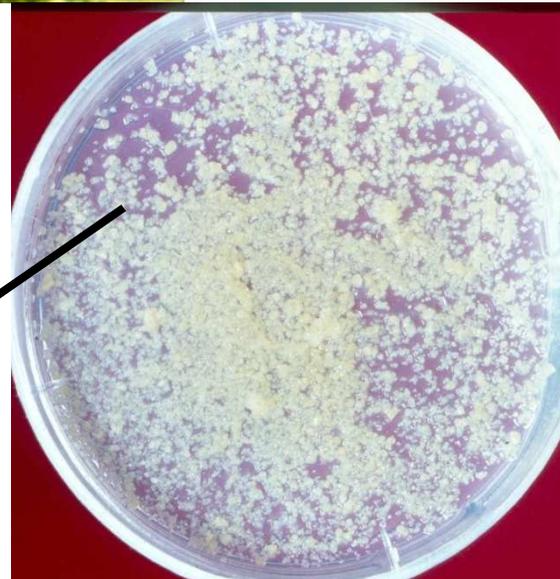
# Développement de Protoplasts cultivés chez la POMME DE TERRE



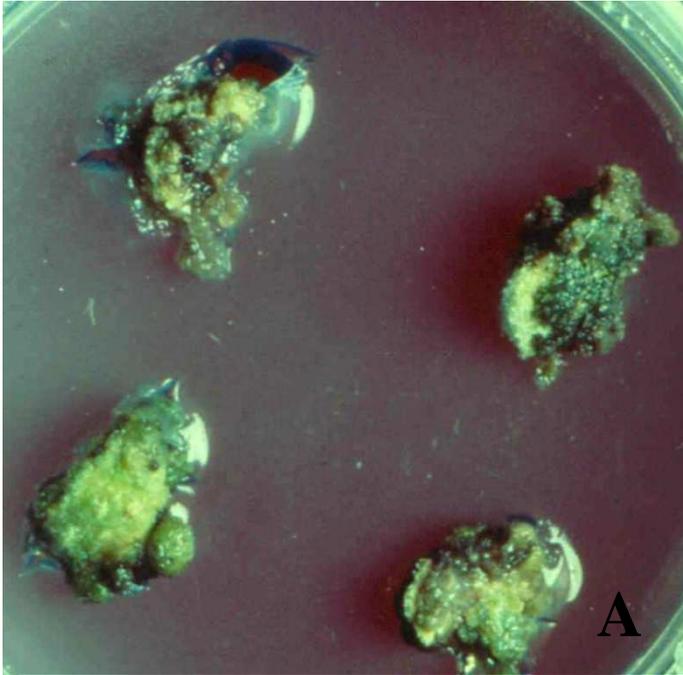
microcolonies

Cals  
sur milieu  
solide:  
BAP+2,4D

Microcals  
sur milieu  
liquide  
2,4D+Zéa+  
ANA



# Régénération de plantes à partir de protoplastes cultivés chez la pomme de terre

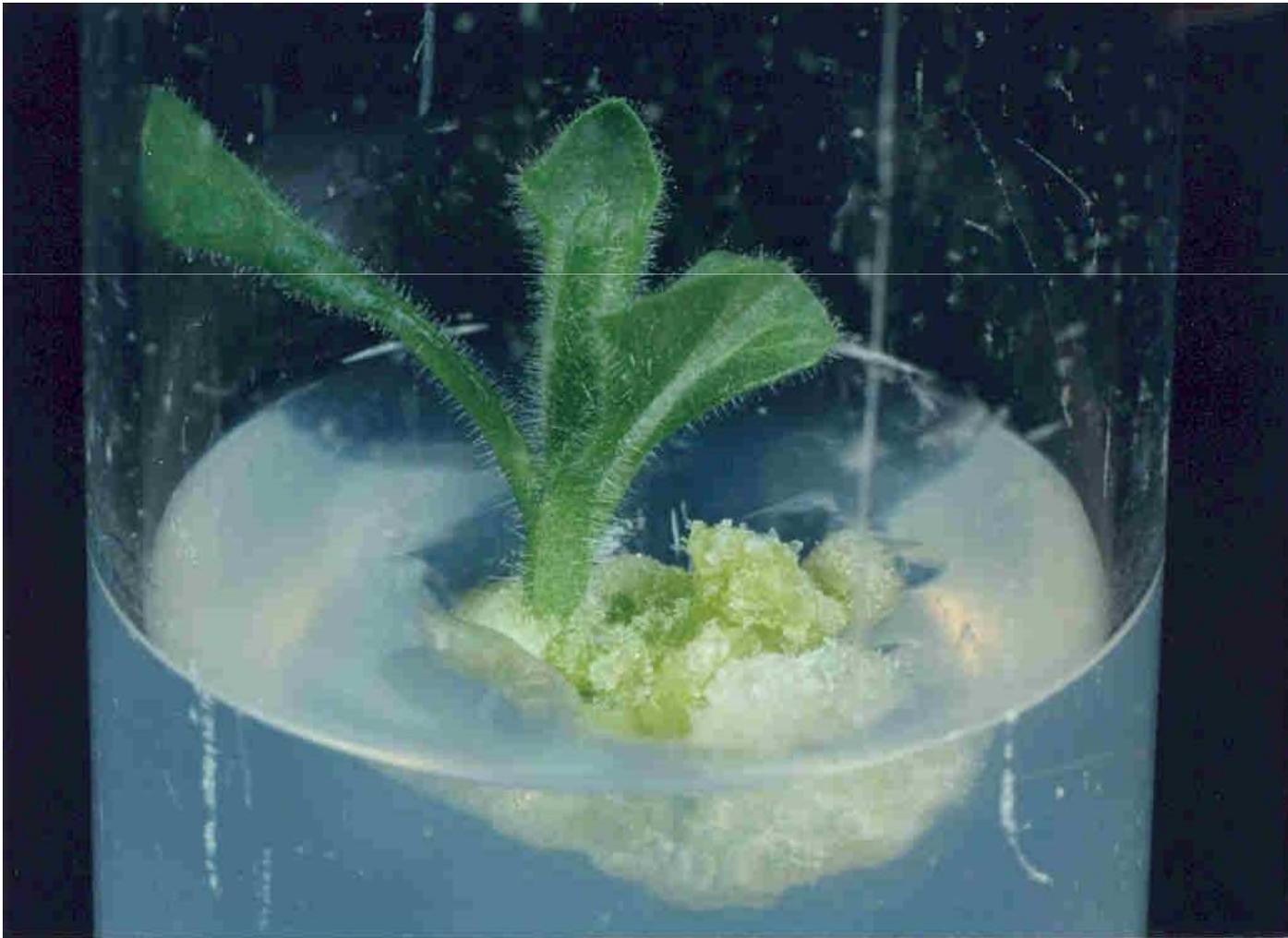


Régénération: néoformation

Repiquage sur des milieux riches en cytokinines.

Risque de variant (néoformation)

# Plant régénéré à partir de protoplastes cultivés



## 3-2 cas du bananier

### 3.2.1-Isolement des proto

Limbe **âgé** : pas de proto

**Jeunes feuilles** : peu de proto et qui ne se divisent pas en culture

Les rendements en protoplastes élevés chez le bananier ont été obtenus à partir **des suspensions cellulaires** + se divisent + évoluent en plantes

A partir de  
jeunes feuilles

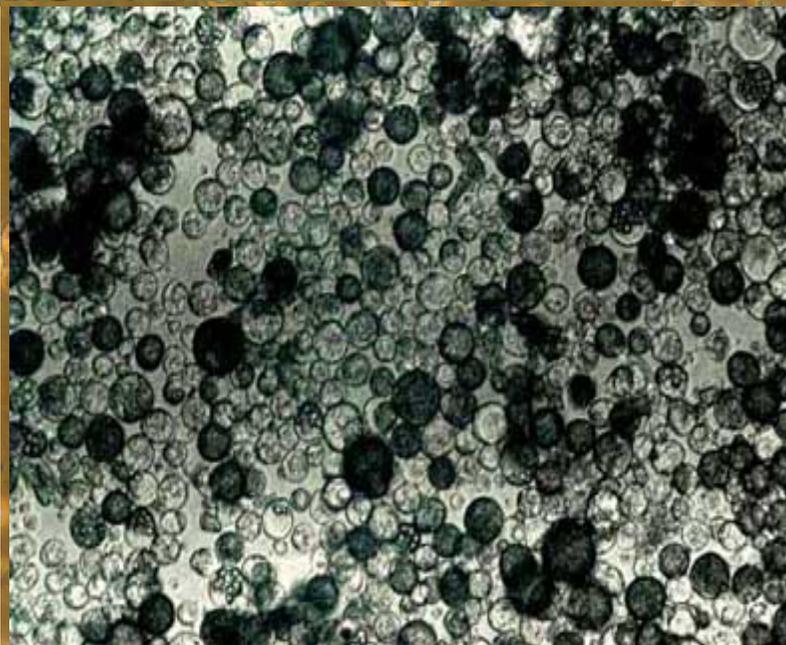
50  $\mu\text{m}$

22  $\mu\text{m}$

A

B

Proto du  
bananier

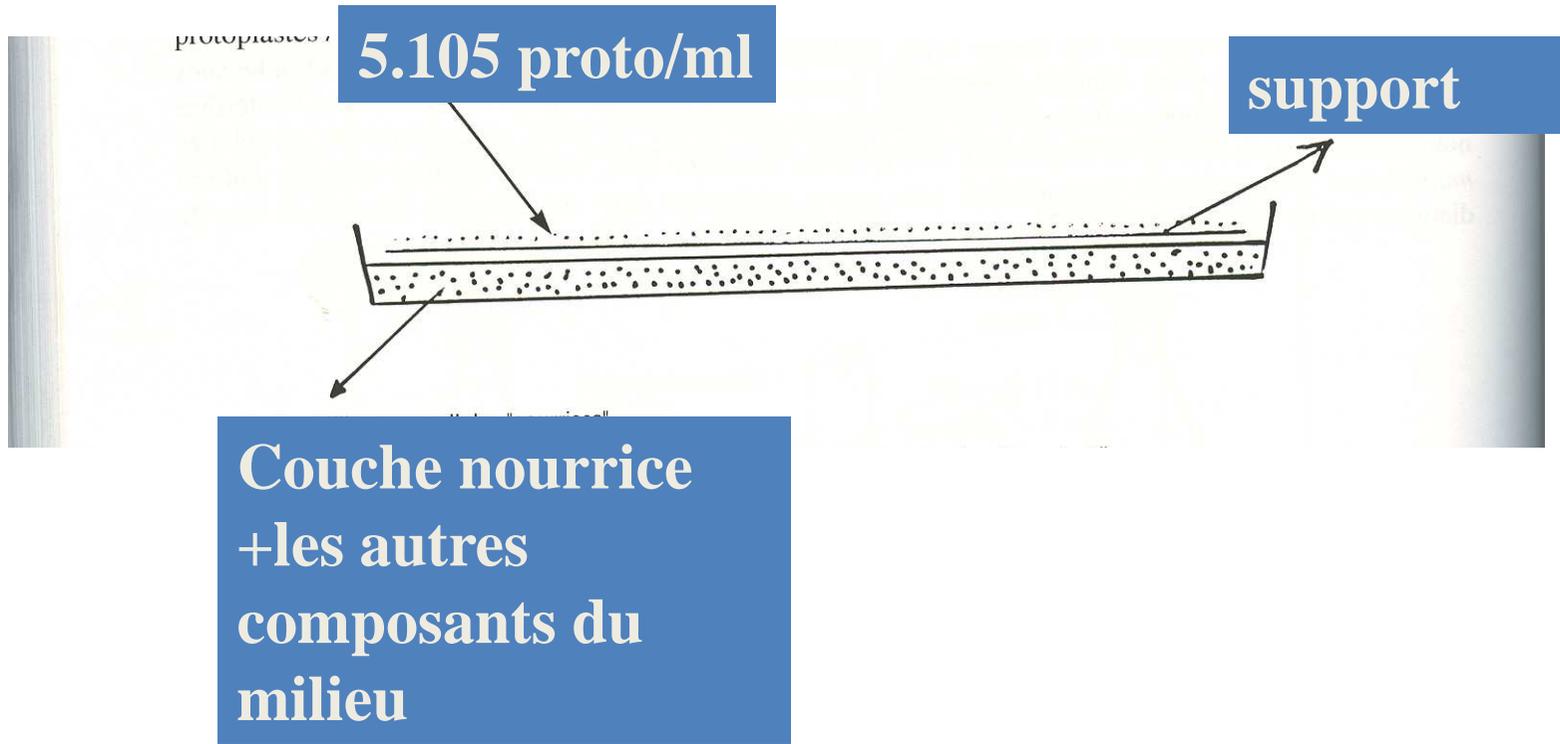


A partir de  
suspension cell

## 3.2.2-culture des protoplastes

### a) Milieu d'étalement des protoplastes

Composition du milieu PCM	
<b>Macro-éléments</b>	<b>MS</b>
<b>Micro-éléments</b>	<b>MS</b>
<b>Fe-EDTA</b>	<b>MS</b>
<b>Vitamines</b>	<b>Morel et Wetmore</b>
<b>Glucose</b>	<b>500 mg/L</b>
<b>Maltose</b>	<b>100 mg/L</b>
<b>Saccharose</b>	<b>40 g/L</b>
<b>Myo-inositol</b>	<b>45 mg/L</b>
<b>2,4 D</b>	<b>2,5 mg/L</b>
<b>Agarose Sea plaque</b>	<b>10 g/L</b>
<b>3 à 6 % de suspension cell</b>	





**Evolution des proto directement en embryon**

## b) Milieu de régénération

<b>Composition du milieu A<sub>0,4</sub>B<sub>0,5</sub></b>	
<b>Macro-éléments</b>	<b>1/2MS</b>
<b>Micro-éléments</b>	<b>1/2MS</b>
<b>Fe-EDTA</b>	<b>1/2MS</b>
<b>Vitamines</b>	<b>Morel et Wetmore</b>
<b>BAP</b>	<b>0,5 mg/L</b>
<b>AIA</b>	<b>0,4 mg/L</b>
<b>Saccharose</b>	<b>30 g/L</b>
<b>Gelrite</b>	<b>4 g/L</b>
<b>pH = 5,7</b>	



**Régénération des pousses**

# Action de la couche nourricière

hypothèses

## **Effet type de support**

**Les protoplastes de bananiers peuvent se développer sur trois types de supports:**

**1) toile à blutter,**

**2) membrane Millipore,**

**3) disque de cellophane**

**Le type de support peut agir par les échanges qu'il permet entre la couche nourrice et les protoplastes mis en culture.**

# Effet de la nature de la nourrice et du supports sur l'évolution des protoplastes

	support				Millipore			
	toile à blutter,							
nourrice	Lolium	Triticum	Musa	Témoin	Lolium	Triticum	Musa	Témoin
« nourrice »	<i>multiflorum</i>	<i>monococcum</i>	<i>Long Tavoy</i>		<i>multiflorum</i>	<i>monococcum</i>	<i>Long Tavoy</i>	
Répétition								
1	116	142	431	4	346	3	3	4
2	149	90	521	6	455	5	2	10
3	126	114	140	3	405	4	5	3
4	309	8	618	2	533	4	24	3
5	115	121	125	8	471	3	17	4
Moyenne	16	95	367	4,1	442	3,8	10,2	4,8

## **Fusion des protoplastes**

**Cellules isolées : pas de fusion.**

**Les proto : possible**

**Ils doivent s'approcher, fusion membranaire, fusion des cytoplasmes, fusion nucléaire donc fusion des génomes**

Il y a plusieurs techniques permettant la fusion de deux protoplastes de variétés différentes (fusion intraspécifique) ou d'espèces voisines (fusion interspécifique). Les plus connues sont: la fusion chimique et la fusion électrique.

## 1) La fusion spontanée

-Peut se faire spontanément pendant la digestion enzymatique

**8 % chez Datura**

**50 % chez le maïs**

La fréquence de fusion augmente **avec l'élévation de  $t^{\circ}$**

## 2) La fusion chimique

- La fusion chimique est basée sur l'utilisation de substances **à fort poids moléculaire** qui permettent le rapprochement des protoplastes et par la suite leur fusion.

### a) Fusion au nitrate de sodium

L'addition de **NaNO<sub>3</sub>** à la solution enzymatique : fusion des proto chez les céréales.

Ce taux est faible 0- 5% (pb de toxicité)

b) Fusion par forte concentration en ions **Ca<sup>2+</sup>** à pH élevé = 10

Fréquence : 25% si présence de **CaCl<sub>2</sub>** à t° = 37° en incubation

### **c) Fusion au polyéthylène glycol (PEG)**

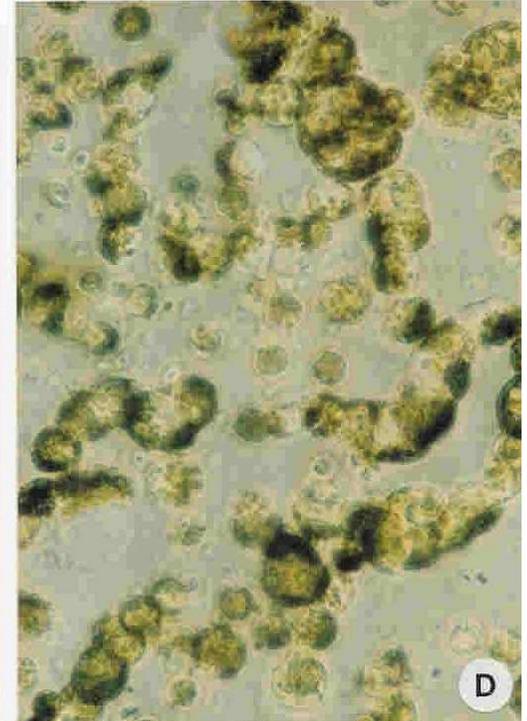
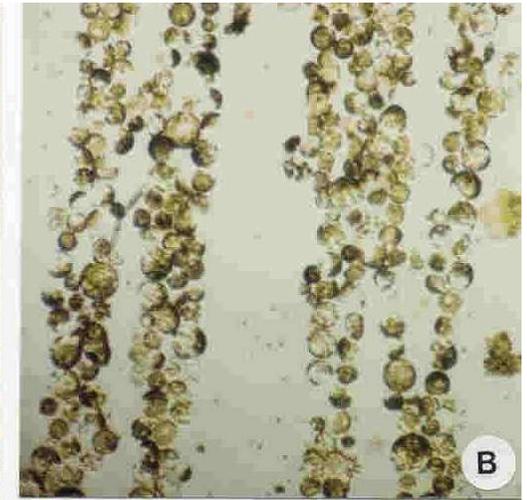
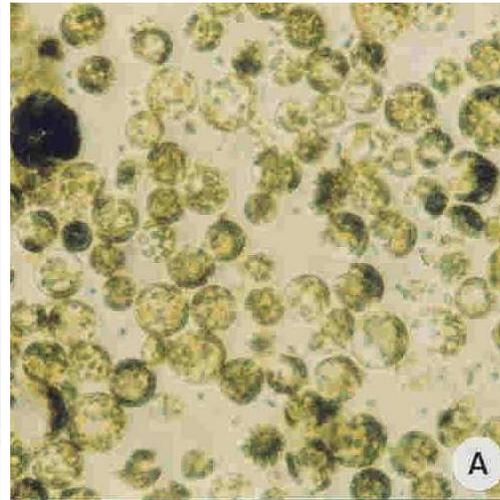
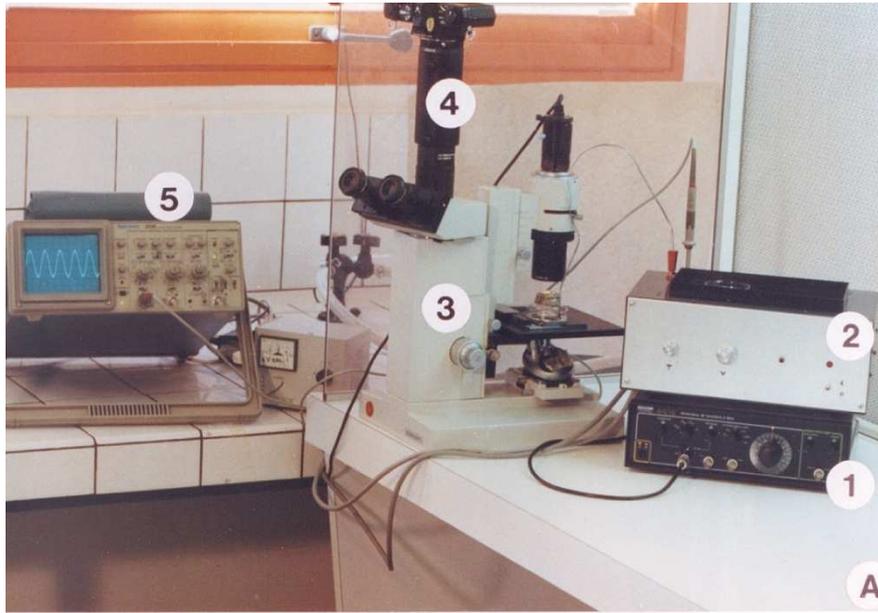
La méthode **chimique la plus utilisées**, la plus **efficace** chez un grand nombre d'espèces, donne un taux de fusion élevé

Cette substance non ionisée provoque **l'accolement** des protoplastes en neutralisant les charges négatives conduisant ainsi au contact membranaire. **La dilution** de cette substance **induit des perturbations** au niveau moléculaire provoquant ainsi la fusion des protoplastes

### 3)La fusion électrique

- Électrofusion : Les protoplastes sont soumis à un champ électrique induit par un courant sinusoïdal créé entre 2 électrodes non symétriques.
- provoquent **leur alignement** en chaînes observables sous microscope inversé.
- Après l'accolement des protoplastes, la fusion est obtenue par l'envoi d'impulsions de **courant continu** pendant quelques microsecondes.

# Electrofusion de protoplastes



## Diversité des produits de fusion

Lors de la fusion des protoplastes, divers événements peuvent avoir lieu:

homo-fusions,

hétéro-fusions

ou des fusions partielles.

Pour les populations de protoplastes fusionnés **par couple**, toute une gamme d'événements peut se produire :

**-le génome nucléaire**

- ou bien **un seul noyau parental** va être conservé (cybride),

- ou bien **les deux noyaux** vont fusionner. Dans ce dernier cas, soit tous les chromosomes seront conservés (**hybrides somatiques symétriques**),

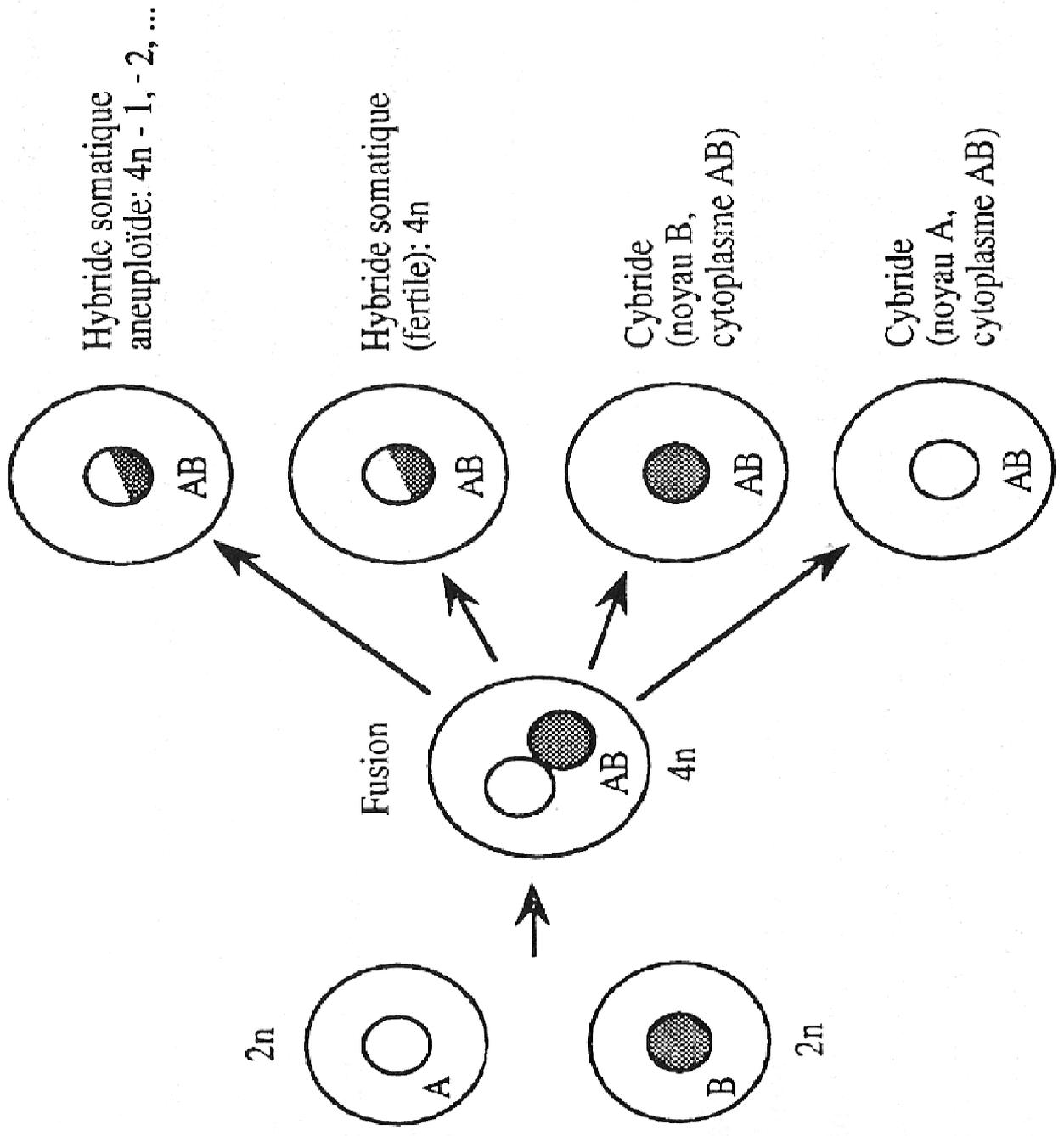
-soit il se produira le plus souvent une **élimination partielle de l'un des génomes** dans cette fusion (**hybrides somatiques asymétriques**).

## -le génome chloroplastique

les plantes régénérées possèdent,  
dans pratiquement tous les cas,  
**l'un ou l'autre** type de  
chloroplastes.

- le génome mitochondrial

soit une **seule population** parentale sera conservée, soit il y aura **recombinaison de l'ADN mitochondrial**, et il semble que ce soit les cas le plus fréquent .



## **Sélection de produits de fusion = Identification des produits de fusion**

Plusieurs systèmes sont utilisés pour sélectionner les produits de fusion de protoplastes :

-La complémentation de résistance à des molécules chimiques : **antibiotiques,..**

ou la complémentation physiologique pour les **besoin pour la croissance in vitro**

La régénération d'un grand nombre d'individus suivie de tris basés sur les caractères morphologiques intermédiaires (vigueur hybride- souvent les hybrides sont plus vigoureux-).

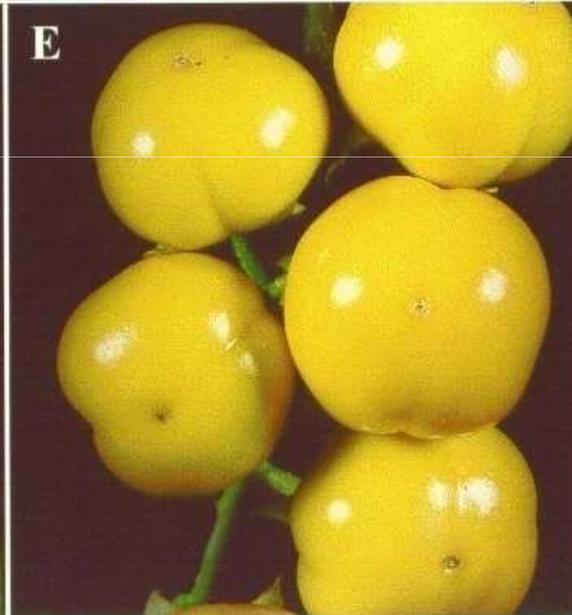
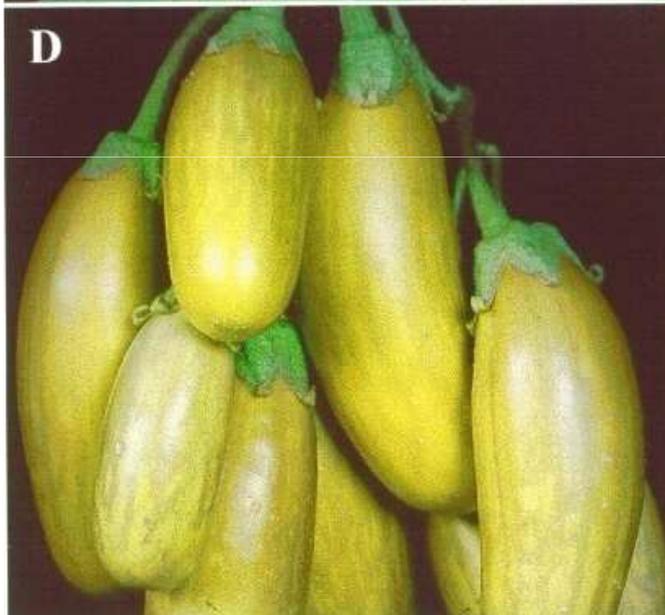
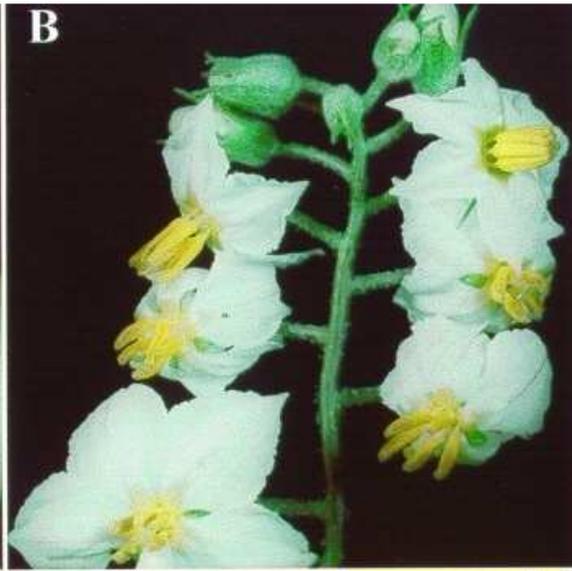
-La détermination du niveau de ploïdie par cytométrie en flux

-L'analyse des isoenzymes (pro).

-L'analyse moléculaire (gène).

**a) Exemple de sélection basés sur les  
caractères morphologiques**

**Fusion de deux espèces : cas de l'aubergine**



*S. melongena* cv Pusa

Somatic hybrid

*S. aethiopicum*

Somatic Hybrid of Eggplant with *S. aethiopicum*

**b) Exemple de sélection basés sur la capacité de régénération in vitro**

**Croisement entre *Datura innoxia* mutants albinos capables de régénérer des bourgeons albinos avec *Datura discolor* vert mais incapable de régénérer**

**Si résultats régénération de plantes vertes donc il s'agit d'hybrides somatiques**

## **Problématiques de la technique de la culture des protoplastes**

**-Limitation de la régénération à partir des proto à seulement qlq familles telle que les Solanacées**

**- instabilité chromosomique observée dans la plupart des plantes hybrides: des plantes aneuploïdes récupérées sont normalement incapable de propagation sexuelle**