

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun, Tiare

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



**Polycopié présenté par Dr. BOUSSAID Mohamed**

Destiné aux étudiants de Licence et de Master :

**Filières :** Sciences Biologiques, Sciences Agronomiques, Biotechnologies, Ecologie et Environnement.

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre 1</b>	
<b>La totipotence cellulaire et la culture in-vitro</b> .....	2
1. La totipotence .....	2
1.1. Totipotence végétale et clonage	
1.2. Le contrôle génétique du développement	
2. La culture in-vitro .....	3
2.1. Historique de la culture in vitro	
2.2. Technique	
<b>Chapitre 2</b>	
<b>Milieus de culture</b> .....	6
1. Composition et préparation du milieu de culture	
1.1. Composition du milieu de culture	
1.1.1. Les éléments minéraux :	
1.1.2. Les éléments organiques	
1.1.3. Les vitamines	
1.1.4. Les acides aminés.....	7
1.1.5. Les régulateurs de croissance	
1.1.6. Les différents milieux de cultures	
<b>Chapitre 3</b>	8
<b>Méthodes de cultures</b>	
1. La mise en oeuvre	
1.1. Principes fondamentaux	
2. Les différentes techniques de cultures invitro	
2.1. La culture de méristèmes (l'élimination du virus)	
<b>Chapitre 4</b> .....	
<b>Haplodiploïdisation</b> .....	8
1. Objectif.....	8
2. Obtention de plants haploïdes..... ;.....	8
3. L'haplodiploïdisation ou la création de lignées pures	10
3.1. Haploïdie induite par gynogénèse.....	
3.1.1. Haploïdie par culture in vitro d'ovaires ou d'ovules.....	10
3.1.2. Haploïdie induite par croisement interspécifique.....	10
3.2. Haploïdie induite par androgenèse.....	12
3.3. Le principe de l'haplodiploïdisation .....	13
<b>Chapitre 5</b> .....	14
<b>Hybridation somatique</b> .....	15
1. La paroi pectocellulosique.....	15
2. Les Protoplastes.....	15
2.1. Obtention .....	
2.2. Les agents stabilisants .....	16
3. Fusion de protoplastes.....	
3.1. Préparation de la solution fusionnante	
3.2. Les techniques de fusion de protoplastes	
3.2.1. La fusion par des méthodes chimiques	

3.2.2. La fusion par des méthodes électriques	
4. Produits de fusions somatiques	
4.1. Fusion des noyaux .....	19
4.2. Fusion unique des cytoplasmes (cybrides)	
5. Applications .....	20
<b>Chapitre 6</b>	
<b>Sauvetage de l'embryon</b> .....	
<b>Chapitre 7</b>	
<b>Embryogenèse somatique et semences artificielles</b> .....	
Conclusion.....	
Références bibliographiques.....	21

---

# Introduction

La culture cellulaire végétale *in vitro* est une technique qui permet de cultiver des cellules végétales en dehors de leur milieu naturel, dans des conditions contrôlées en laboratoire. Elle a révolutionné le domaine de la biotechnologie végétale en offrant de nombreuses applications pratiques, telles que la propagation clonale des plantes, la régénération de plantes entières à partir de cellules isolées, la production de plantes transgéniques et la conservation des ressources génétiques.

L'introduction de la culture cellulaire végétale *in vitro* a été rendue possible grâce à la découverte des capacités de dédifférenciation et de totipotence des cellules végétales. En effet, contrairement aux cellules animales, la plupart des cellules végétales ont la capacité de se dédifférencier et de retrouver leur potentiel de développement complet, leur permettant de régénérer un nouvel organisme.

Le processus de culture cellulaire végétale *in vitro* commence par l'isolation de cellules végétales, généralement à partir de méristèmes, de tissus embryonnaires, de nodules racinaires ou de parties foliaires. Ces cellules sont ensuite placées dans un milieu de culture contenant des nutriments, des hormones de croissance et d'autres composés nécessaires à leur survie et à leur développement.

La composition précise du milieu de culture varie en fonction du type de cellules et des objectifs de la culture. Par exemple, l'ajout d'hormones de croissance telles que l'auxine et la cytokinine peut induire la formation de bourgeons ou de racines, favorisant ainsi la régénération de plantes entières.

La culture cellulaire végétale *in vitro* nécessite également des conditions de croissance appropriées, telles que la température, l'éclairage et l'aération contrôlées. Les cultures sont généralement réalisées dans des boîtes de culture ou des flacons stériles, et les cultures en masse peuvent être réalisées dans des bioréacteurs.

Cette technique de culture cellulaire végétale *in vitro* présente de nombreux avantages, notamment la production rapide de plantes identiques, la régénération de plantes à partir de matériel génétiquement modifié, la conservation des ressources génétiques rares ou menacées, et la production de composés d'intérêt, tels que des métabolites ou des produits pharmaceutiques.

La culture *in vitro* ou culture de tissus se définit comme l'ensemble des techniques qui permettent de faire croître en milieu artificiel (en éprouvette) des cellules spécialisés, par exemple des cellules animales comme la peau humaine ou des cellules végétales, ce qui représente une grande variété de tissus.

La technique *in vitro* est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes.

Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants) ; et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité,...).

Les applications de la culture *in vitro* sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine de l'agriculture, de l'horticulture que dans celui de la recherche (notamment en amélioration des plantes), ou encore pour conserver la diversité variétale pour sauvegarder des espèces menacées (conservations *ex-situ*). Ces techniques exigent la connaissance des facteurs de l'environnement (température, lumière, composition du milieu...) du fragment de plante mis en culture afin de l'orienter vers un programme d'évolution déterminé.

La culture *in vitro*, peut être utilisée pour :

- Reproduire de façon identique, une espèce et la multiplier en grande quantité, et à moindre coût pour la mettre sur le marché dans les plus courts délais. On parle d'une micropropagation rapide ;
- Préserver des espèces anciennes et menacées, pour conserver la biodiversité ;
- Elaborer de nouvelles variétés de plantes plus rapidement
- Assainir des plantes virosées et conserver des plantes saines

# Chapitre 1

## La totipotence cellulaire et la culture in-vitro

### 1. La totipotence

La culture in vitro doit toute son extension à la totipotence cellulaire des végétaux. Toute cellule d'une plante peut, dans certaines conditions, se différencier pour devenir une cellule œuf, appelée cellule embryogène, capable de générer un nouvel individu. Ainsi on peut obtenir à partir d'un fragment végétal plusieurs dizaines de milliers de plantules.

Dès 1902, Haberland, un biologiste allemand, observe les potentialités naturelles de la multiplication végétative (bouturage). Suite à ces travaux, il énonce le premier grand principe qui ouvrira la voie de la micropropagation des végétaux. Il s'agit du principe de la totipotence cellulaire.

#### 1.1. Totipotence végétale et clonage

Le concept de totipotence, dérivé de la théorie cellulaire qui stipule que chaque cellule contient suffisamment d'informations nécessaires pour régénérer d'autres cellules et même un nouvel individu complet, sans passer par l'union des gamètes (fécondation).

Les cellules végétales différenciées peuvent revenir à un stade indifférencié dans lequel elles sont **totipotentes**. Elles ont alors les mêmes qualités que les cellules embryonnaires ; elles peuvent tout faire: se diviser, donner n'importe quel autre type cellulaire...

Cette propriété est en partie due au fait que lors des mitoses successives, la totalité du patrimoine génétique de la cellule est conservée.

L'homme a profité de ces propriétés de la totipotence végétale pour régénérer des plantes à partir de tissus variés, et obtenir des plantes toutes génétiquement identiques.

Une seule cellule adulte convenablement traitée peut être à l'origine d'une plante adulte génétiquement identique à celle dont a été extraite la cellule.

La totipotence des cellules végétales rend possible le **clonage**, effectué dans les cultures *in vitro*.

#### 1.2. Le contrôle génétique du développement

L'existence d'une totipotence des cellules végétales signifie que toute l'information nécessaire au développement complet de la plante est contenue dans le patrimoine génétique de chaque cellule, même très différenciée. En d'autres termes même si de nombreux gènes ne s'expriment pas ou sont silencieux au cours de la différenciation et du développement, les cellules n'ont pas perdu de gènes. Le développement ordonné d'une plante nécessite l'intervention, à un moment bien défini,

d'une séquence programmée d'activation de gènes afin de former les produits pour lesquels ils codent, à savoir les protéines. Les cellules doivent également avoir la capacité de répondre à ces produits. Lorsqu'une culture est établie à partir d'un explant, des processus de régénération et de morphogenèse ont lieu, favorisant le développement (croissance et différenciation) d'une nouvelle plante.

## **2. La culture in-vitro**

Les techniques de culture in vitro végétales utilisent la propriété de totipotence des cellules végétales prélevées sur un organe quelconque d'une plante, possèdent la capacité de régénérer un individu complet identique à la plante mère. Cette propriété s'exprime dans la nature (exemple bouturage).

### **2.1. Historique de la culture in vitro**

-1902, le botaniste Haberlandt fut le premier à définir exactement le problème de la culture des tissus et l'a tenté avec des fragments de plantes très diverses. Il obtenait une survie des cellules de quelque mois mais jamais de multiplication;

- 1932 White aux Etats Unis obtint des cultures indéfinies de cellules de tabac.

-1934, White : culture de racines de tomates dans un milieu contenant : eau, sels minéraux, extraits de levure, sucre et auxine (seule hormone végétale connue à l'époque) ;

- En 1934 Gautheret eut l'idée d'utiliser le tissu cambial des arbres.

Il avait aussi trouvé le matériel idéal mais pas encore le milieu nutritif optimal.

- 1939, Gautheret : développement indéfini d'un cal de cellules dédifférenciées à partir d'un fragment de racine de carotte (1ère culture in vitro) ;

-1946, partant d'apex, Bal aux USA obtient quelques plantes de lupin.

-1949, Wetmore et Morel régénèrent des fougères .

- 1958, Steward et son équipe obtinrent les premiers " embryons artificiels" appelés " embryons somatiques" à partir de cellules de carotte qui évolueront par la suite en jeunes plantules

-1962, Murashige et Skoog : 1er milieu de base pour la culture in vitro : sels minéraux (macro- et microéléments), sucres (saccharose), vitamines (Vit. B), hormones (auxines et cytokinines), tamponné à pH 5,6. Il faut contrôler la température, la lumière et l'hygrométrie.

Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de méristèmes de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative in vitro.

Le succès fut assuré lorsqu'on commença à ajouter au milieu de culture de l'auxine.

A la même époque l'équipe de Limasset et Cornuet en France démontrent l'absence de particules virales dans les apex de tabac.

## 2.2. Technique

La culture in vitro ou culture de tissus se définit comme l'ensemble des techniques qui permettent de faire croître en milieu artificiel (en éprouvette) des cellules spécialisés, par exemple des cellules animales comme la peau humaine ou des cellules végétales, ce qui représente une grande variété de tissus.

La culture in vitro se fait en laboratoire à l'abri de toute contamination cryptogamique, dans des récipients qui peuvent être tant des tubes à essai que des bocaux à conserve.

Ces récipients sont placés dans un endroit où l'intensité de la lumière, la durée de l'illumination, la température et l'hygrométrie sont constamment contrôlées.

Les cultures in vitro végétales sont des cultures d'explants de plantes, sur un milieu synthétique, dans des conditions stériles, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit.

Les explants peuvent être:

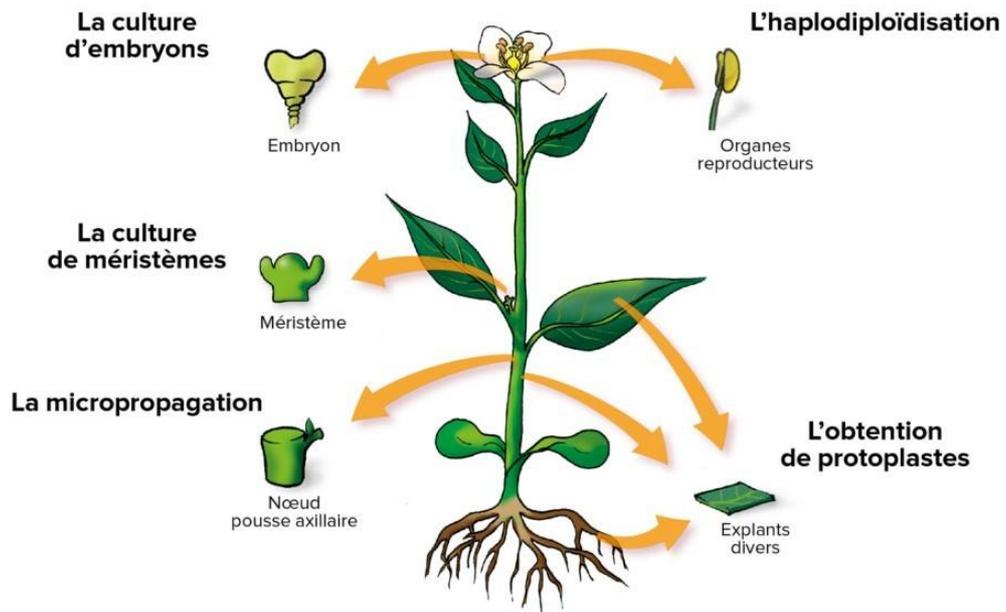
- des parties d'organes ou des organes entiers, (tige, feuille, racine, fleurs, etc.),
- des tissus,
- des pièces florales,
- des graines ou des embryons,
- des bourgeons ou des apex ou des méristèmes,
- des cellules somatiques ou sexuelles,
- embryon, ovule ou pollen,
- des protoplastes

L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu, en fait, tout ce que la plante mère peut fournir :

- a) par les racines : les éléments minéraux, l'eau ;
- b) par les feuilles et grâce à la photosynthèse : des sucres, des vitamines et des acides aminés ;
- c) les hormones, pour orienter la formation des organes.

On fait la culture in vitro pour:

- garder des plants stériles, exempts de virus et autres infections
- pouvoir produire rapidement une grande quantité de plantules
- la création de nouvelles plantes (par exemple des OGM) ;
- pour la multiplication de plantes commerciales produisant peu ou pas de graines ;
- pour la conservation et la multiplication d'espèces rares.



**Figure 1.** Les applications de la culture in-vitro.

# Chapitre 2

## Milieux de culture

### 1. Composition et préparation du milieu de culture

Le milieu de culture est un élément clé dans la technique de culture in vitro, il assure deux rôles à la fois, c'est un substrat et une source d'énergie pour le développement des tissus. Les milieux de cultures sont une combinaison de différents composants, qui varient proportionnellement en fonction des caractéristiques du tissu à développer et du processus morphogénétique à suivre (culture de méristèmes, organogénèse, embryogénèse somatique, etc.) (Gamborg et Shyluk, 1981).

Les nutriments de base requis par les cellules végétales sont similaires aux nutriments fournis par le sol pour le développement des plantes.

L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu, en fait, tout ce que la plante mère peut fournir :

- a)- par les racines : les éléments minéraux, l'eau ;
- b)- par les feuilles et grâce à la photosynthèse : des sucres, des vitamines et des acides aminés ;
- c)- les hormones, pour orienter la formation des organes.

#### 1.1. Composition du milieu de culture

Le milieu doit être composé principalement des composants suivants : éléments minéraux (macroéléments, microéléments), vitamines, acides aminés, sucres et gélifiants et éventuellement des régulateurs de croissance (hormones); cependant, la composition peut varier selon le génotype de la plante et l'objectif recherché.

##### 1.1.1. Les éléments minéraux

###### a. Les macroéléments

Interviennent en grande quantité. Il s'agit de 6 éléments nécessaires aux cellules végétales pour atteindre une croissance structurellement adéquate. Ils sont présents à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca), le soufre (S), et le magnésium (Mg). Les doses de ces éléments varient selon le milieu de culture. Les concentrations d'azote sont élevées dans la plupart des milieux nutritifs; cependant, chez certaines espèces, l'excès contribue à des désordres.

## b. Les microéléments

Appelés parfois oligo-éléments, et bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel.

Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le cobalt (Co),

### 1.1.2. Les éléments organiques

Dans le cas de tissus végétaux placés en culture in vitro, l'assimilation chlorophyllienne est insuffisante ou nulle pour assurer la survie et le développement de l'explant.

Dès lors, on ajoute des sucres, le plus souvent du saccharose, aux milieux de culture pour fournir à l'explant une source de carbone. Dans la nature, les sucres sont photosynthétisés à partir du gaz carbonique atmosphérique et de l'eau du sol.

### 1.1.3. Les vitamines

Les plantes à l'état naturel assurent leurs propres besoins en vitamines; cependant, les tissus végétaux et les cellules cultivées in vitro ont besoin de suppléments externes de ces composés pour mener à bien leurs processus de croissance et de développement. Dans les premiers temps du développement des techniques de culture tissulaire in vitro, les vitamines étaient ajoutées en conjonction avec d'autres nutriments provenant de suppléments nutritionnels non spécifiques tels que les jus de fruits ou certains extraits (Caplin et Steward, 1948). Actuellement, ces composés sont ajoutés individuellement, les plus courants sont les suivants :

***Thiamine (vitamine B1):*** C'est un composant essentiel de la plupart des milieux de culture, il est additionné sous forme de thiamine HCl en quantité comprise entre 0,1 mg/l et 30 mg/l.

***Acide nicotinique (niacine ou vitamine B3):*** C'est un composant des enzymes qui agissent dans les réactions activées par la lumière. Son utilisation est moins courante que la thiamine.

***La pyridoxine (Vitamine B6):*** établit une résistance contre les maladies (Zhang et al, 2015) et agit comme antioxydant, on l'ajoute sous forme de pyridoxine HCl

***Le méso-inositol :*** C'est un composant régulier de tous les milieux de culture, il produit un effet stimulant sur la morphogenèse car il participe probablement à la synthèse de l'acide galacturonique. Les cultures se comportent mieux en sa présence.

***La vitamine E :*** elle aide à la formation des cals provenant d'embryons et elle contribue à la viabilité des cellules dans les cultures en suspension.

#### 1.1.4. Les acides aminés

Les acides aminés procurent aux tissus une source immédiate d'azote à assimilation plus rapide qu'avec l'azote inorganique fourni par le milieu. Les principaux AA dans les systèmes in vitro ont les fonctions suivantes : la glutamine et l'asparagine transportent l'azote; la L-arginine stimule les racines; la L-sérine est employée dans la culture de microspores et la L-cystéine est un agent réducteur.

#### 1.1.5. Les régulateurs de croissance

Ils sont également connues sous le nom d'hormones végétales (phytohormones), ce sont des substances synthétisées dans certaines parties de la plante et sont déplacées vers une autre, où elles agissent à de très faibles concentrations, régulant la croissance, le développement et le métabolisme de la plante (Davies, 2004). Le terme "régulateur de croissance" est plus général et recouvre les substances d'origine naturelle et celles synthétisées en laboratoire, qui déterminent les réponses de la plante.

Les tissus in vitro ne produisent généralement pas les quantités nécessaires de régulateurs pour répondre aux besoins de leurs processus, il est donc nécessaire de compléter le milieu de culture avec des sources exogènes. Les hormones classiques ou régulateurs de croissance sont les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscisique et l'éthylène (Suárez, 2011).

Les régulateurs de croissance jouent un rôle essentiel dans la détermination des voies de développement des cellules végétales lors de la culture in vitro. Généralement, les régulateurs les plus largement utilisés sont les auxines, les cytokinines et les gibbérellines. Ces substances peuvent agir en synergie ou en antagonisme.

**Auxines:** ce sont des régulateurs de croissance qui stimulent la dominance apicale, la croissance et la division cellulaires, le développement méristématique, l'induction de racines adventives et la formation d'embryons somatiques. À l'état naturel, la plante produit de l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) et de l'acide indolbutyrique (AIB), qui sont synthétisés dans les apex des feuilles et ils se déplacent de manière basipétale vers la partie radicale.

Parmi les composés synthétiques analogues aux auxines, figurent l'acide naphthalèneacétique (ANA), l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et le piclorame. En culture tissulaire in vitro, les plus couramment utilisés sont l'IBA et l'ANA dans la micropropagation des méristèmes et l'organogénèse. Le 2,4-D et le picloram ont des effets plus forts, ils sont donc utilisés dans l'induction de tissus embryogéniques. L'AIA est moins utilisé, il est facilement dégradé enzymatiquement.

**Cytokinines :** elles dérivent de l'adénine et sont synthétisées par l'apex racinaire. Elles favorisent la dominance apicale, les divisions cellulaires dans les tissus non méristématiques, le développement des bourgeons axillaires et la sénescence retardée des feuilles.

Naturellement, la zéatine et la 2-isopentenil adénine (2iP) sont synthétisées par la plante, mais des substituts tels que la benzylaminopurine ou benzyladénine (BAP ou BA), la kinétine et le tidiazuron (TDZ) peuvent être trouvés sur le marché. Le BA est le plus largement utilisé en

culture in vitro, en particulier dans la multiplication des méristèmes préexistants et l'organogenèse (Acosta et al., 2013; Lopez, 2017).

**Gibbérellines** : elles sont constituées par un ensemble de composés dérivés des terpènes. Elles activent l'allongement des entre-nœuds par élongation et prolifération cellulaire suite à l'augmentation de la plasticité de la paroi cellulaire, elles favorisent la croissance des feuilles et lèvent la dormance, elles sont impliquées dans le développement de la graine, l'élongation des organes et le contrôle de la floraison (Santner et al., 2009). Leur synthèse chez les plantes se produit principalement dans les jeunes feuilles.

Malgré le grand nombre d'effets physiologiques des AG, leur utilisation dans les milieux de culture n'est pas répandue. Dans certains cas, comme dans les cultures de carottes, il a été démontré que l'AG3 affecte davantage la division cellulaire que la croissance cellulaire (Krikorian, 1995).

Les milieux ainsi constitués sont liquides. Il est nécessaire de les solidifier par l'ajout d'un gélifiant pour éviter que les explants ne tombent au fond des récipients. C'est l'agar qu'on utilise communément comme support gélosé pour la préparation des milieux solides et semi solides.

Les avantages de l'agar sont :

- l'agar forme avec l'eau un gel qui fond à 100°C et se solidifie à 45°C. ceci veut dire que ce gel est stable quelque soit les températures d'incubation ;
- l'agar ne réagit pas avec les constituants du milieu ;
- l'agar n'interfère pas avec la mobilisation des constituants du milieu.

### **1.1.6. Les différents milieux de cultures**

#### **a. Milieu Knop**

- La solution de Knop (ou liquide de Knop) a été inventée par le chimiste allemand **wilhelm Knop** (1817-1891).
- Utilisé plus particulièrement dans la culture des plantes à chlorophylle.
- Il existe différentes types. Ces différentes solutions ne possèdent pas de source de carbone. Elles permettent d'expérimenter les exigences des plantes en faveur de tel ou tel élément non carbonaté

#### **b. Milieu MS**

- Le milieu de Murashige et Skoog (ou Milieu MS ou MSO).
- inventé par les physiologistes végétalistes Toshio murashige et Folke K Skoog.
- utilisé dans les laboratoires de biologie végétale pour la culture de cellules ou de tissus de plantes.

# Chapitre 3

## Méthodes de culture

On fait la culture in vitro pour:

- garder des plants stériles, exempts de virus et autres infections
- pouvoir produire rapidement une grande quantité de plantules
- la création de nouvelles plantes (par exemple des OGM) ;
- pour la multiplication de plantes commerciales produisant peu ou pas de graines ;
- pour la conservation et la multiplication d'espèces rares.

### 1. La mise en œuvre

Pour réussir une culture cellulaire, on doit:

- Maintenir des conditions de stérilité:
  - Utiliser une hotte à flux laminaire, que l'on désinfecte préalablement à la manipulation

Tremper les outils dans l'alcool et les flamber ;

- Flamber les ouvertures des récipients (de culture) avant et après la manipulation.
- Utiliser les bons milieux de croissance.
- Contrôler les conditions (environnementales) de cultures.

Si on ne suit pas rigoureusement la technique (milieux de culture, équilibre hormonal, cycle de repiquage, conditions de lumière, de température...), on peut obtenir des plantes malformées.

### 1.1 Principes fondamentaux

Lorsqu'on cultive des cellules, tissus ou organes in vitro, il faut prendre en compte:

- Le choix du matériel que l'on veut cultiver ;
- Puis le prélèvement de la plante;
- l'éliminer les micro-organismes;
- et enfin il faut fournir aux cellules, tissus et organes des conditions ambiantes appropriées en leur procurant un milieu de culture synthétique et des conditions d'incubation adéquates.

Les cultures in vitro peuvent être initiées à partir de presque toutes les parties de la plante. Cependant la source originale du matériel végétal peut déterminer le succès de la mise en place de la culture. Généralement on recommande d'utiliser des plantes saines et vigoureuses comme source d'explants.

- On choisit les parties qui se trouvent en division active (régions méristématiques);
- on conseille d'employer de jeunes plantes ;
- le type de plantes est déterminant pour le succès du culture in vitro (les tissus des gymnospermes sont plus difficile à cultiver que les tissus des angiospermes) ;
- le matériel issu des dicotylédones est plus facile à cultiver que celui provenant des monocotylédones ;
- Il faut tenir compte de la taille de l'explant car plus il sera petit et plus il sera difficile d'initier

la culture.

## 2. Les différentes techniques de culture in vitro

Par le type de matériel végétal employé on peut classer les cultures in vitro en:

- culture d'organes;
- culture de tissus;
- culture de cellules en suspension;
- culture de protoplastes.

L'appellation générale « culture de tissus » est utilisée pour faire référence à toutes ces modalités.

### 2.1. La culture de méristèmes (l'élimination de virus)

Les méristèmes sont des zones de cellules à divisions intenses, situées au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et sont à l'origine des tiges feuillées ou du système racinaire.

L'idée de cultiver des méristèmes est apparue vers 1934, lorsque White a observé qu'un virus du tabac est inégalement réparti dans toute la plante. Plus tard, Limasset et Cornuet (1949) ont montré que les méristèmes étaient indemnes de virus, la division de ses cellules est rapide et constante. Morel et Martin, en 1952, ont réussi à cultiver des méristèmes à partir de dahlias infestés de virus et à obtenir des plantes exemptes de virus. Depuis de nombreux efforts ont été faits dans ce domaine et aujourd'hui la culture des méristèmes est pratiquée sur de nombreuses espèces végétales.

D'autres hypothèses proposent une inhibition de la répllication des virus dans la zone du méristème en raison du taux métabolique élevé des cellules qui composent le méristème et de la forte concentration de régulateurs dans cette zone. Bien que l'absence de virus dans le méristème ne soit pas entièrement clarifiée, ces hypothèses ou leur conjonction semblent correctes (Morel et Martin, 1952).

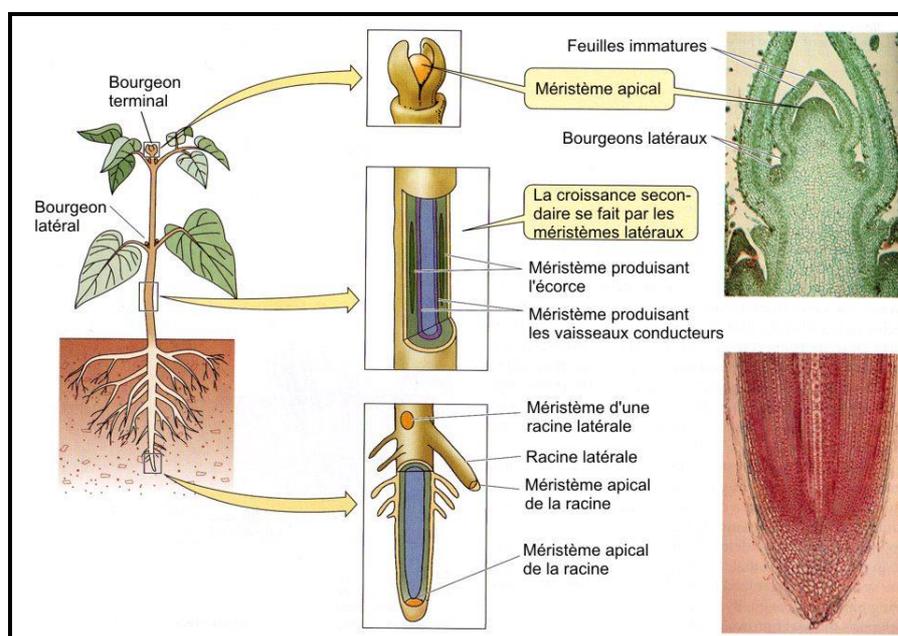


Figure 2. Emplacement des méristèmes

Les plantes obtenues de la culture de méristèmes, sont indemnes de virus mais ne sont pas devenues résistantes aux virus; elles peuvent être décontaminées via des insectes si des mesures de prophylaxie ne sont pas prises.

### a. Technique

La culture de méristème est une culture aseptique du dôme apical sans ébauche foliaire sur milieu artificiel, La taille du méristème est peut-être le facteur le plus critique pour sa culture, et le succès de son isolation est d'autant plus grand que l'explant est petit (0,05 mm - 0,2 mm de diamètre). La séparation du méristème du reste de la plante se fait sous loupe binoculaire.

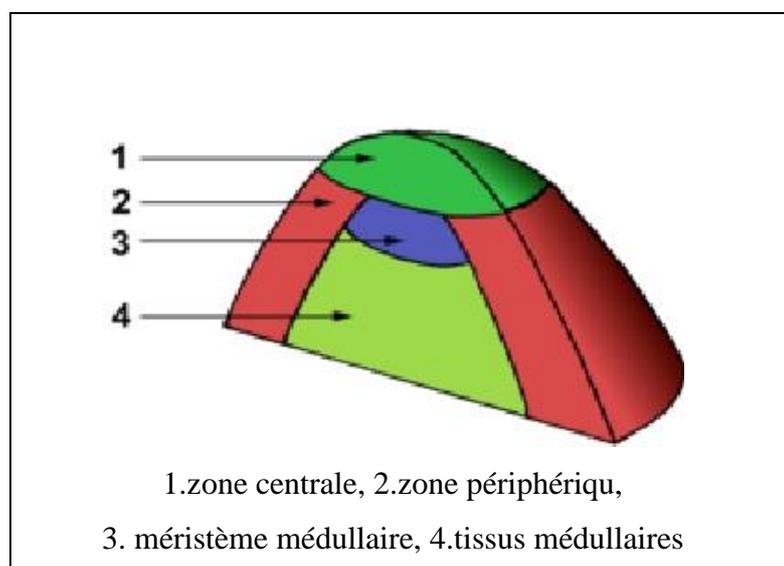
La technique peut être associée à de la thérapie: culture à température élevée, pour favoriser l'élimination des virus.

### b. Protocole de prélèvement

On choisit le dessus d'un rameau d'une plante, on le désinfecte puis on procède au prélèvement sous une loupe binoculaire et sous hotte stérile ou paillasse désinfectée. Le fragment de rameau est débarrassé de ses feuilles, puis les ébauches foliaires sont éliminées. Quand le méristème apparaît, on ôte les dernières ébauches foliaires, puis l'on découpe un minuscule cube dont les faces sont tangentes au méristème ; une dernière section transversale permet de le détacher.

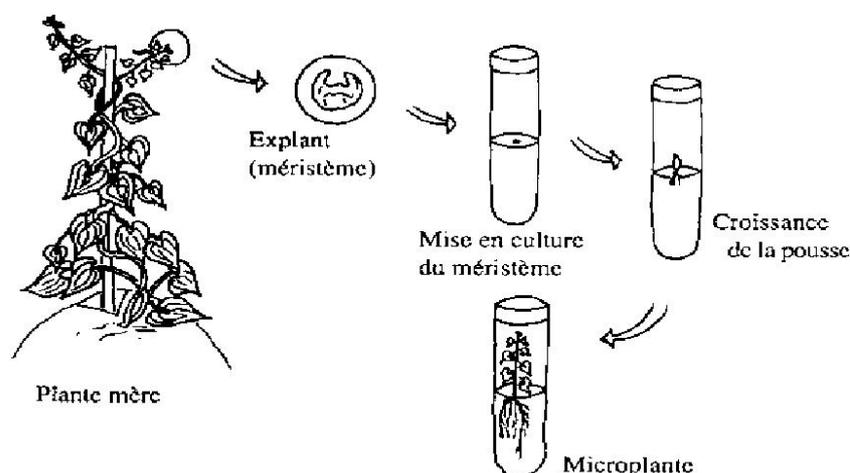
Il est aussitôt placé dans un tube à hémolyse, sur milieu gélosé. Toutes ces opérations doivent être conduites rapidement afin d'éviter le dessèchement de cette structure fragile et limiter les risques de contamination.

Pour leur croissance, les méristèmes (minuscule partie) de la plante, ont les mêmes besoins nutritifs que la plante entière. Toutefois, ils ne reçoivent plus certaines substances fournies par d'autres parties du végétal, ils ont des exigences particulières. Ces besoins seront satisfaits par le milieu des cultures.



**Figure 3.** Organisation en zones d'un méristème apical

La lumière n'est pas strictement indispensable pour une bonne croissance des méristèmes mais sa présence donne de meilleurs résultats. Les intensités apportées sont comprises entre 1000 et 3000 lux. Un régime de 16 heures de jour, pour 8 heures de nuit, est souvent adopté bien qu'un éclairage en continu soit possible. L'humidité relative doit être proche de la saturation. Les tubes étant en général fermés pour des raisons sanitaires. La température doit être impérativement contrôlée, d'où l'utilisation d'une chambre de culture en moyenne entre 22 et 25 °C.



**Figure 4.** Mise en culture d'un méristème apical

Le taux de réussite est très variable et le taux de régénération varie de 0 à 80%, les causes de cette variation sont très diverses.

**Facteurs techniques:** les méristèmes étant de très petite taille (de l'ordre de 0,1mm), il arrive très souvent que des tissus voisins soient prélevés en même temps.

**Facteurs physiologiques:** le stade d'évolution de la plante a une grande importance, en général, le taux de réussite est supérieur pour les espèces herbacées; les chances de régénération sont également plus importantes quand le prélèvement se fait sur une plante en pleine croissance. Les prélèvements de méristèmes sur des bourgeons au repos, mais dormance levée, donnent de meilleurs résultats en culture mais le taux de régénération est plus faible. Les ligneux posent un problème plus délicat. Le méristème prélevé sur une plante en croissance a parfois tendance à brunir et à se nécroser sur le milieu de culture.

**Facteurs pathologiques:** le taux de régénération est en relation directe avec le statut viral. Certains virus s'éliminent facilement, d'autres plus difficilement. On peut associer la thermothérapie et la culture de méristème en plaçant la plante à régénérer à la température d'élimination du virus pendant le temps voulu, puis on pratique un prélèvement de méristème sur cette plante (Hartmann et al., 1997).

### c. Multiplication in vitro

Les plantes (qui ont survécu) auront développé un cal. Si l'objectif de la culture est la reproduction, c'est le moment de fragmenter le cal et de réaliser à nouveau le processus antérieur pour créer plus de plantes. Sinon, on passe directement à la phase suivante. Un contrôle rigoureux de l'environnement est nécessaire à la bonne croissance des vitroplants en milieu

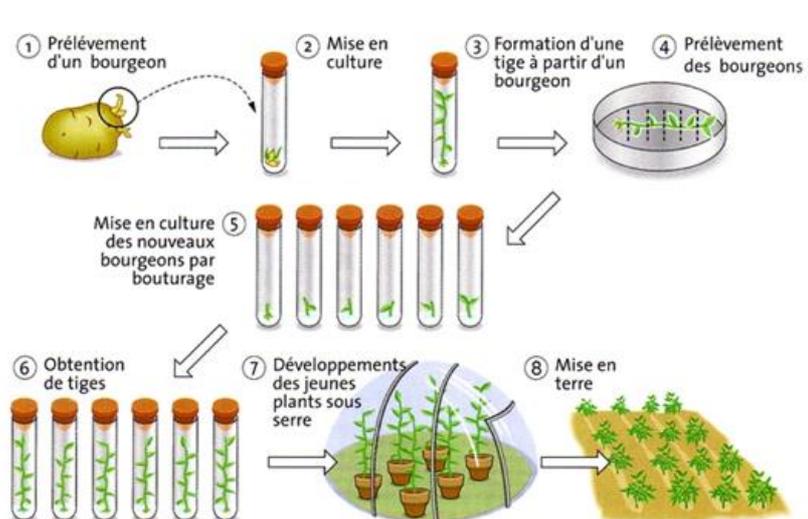
artificiel. Chaque contenant (bocal, boîte ou tube) est étiqueté pour garantir la traçabilité.

#### d. Transplantation et acclimatation

Passer les jeunes vitroplants des chambres de laboratoire climatisées en serres nécessite une étape intermédiaire de quelques semaines pendant laquelle la plante développe son système racinaire. Cette phase d'acclimatation se déroule dans des locaux spécifiques permettant un contrôle précis des conditions d'éclairage, de température et surtout d'humidité.

A la fin d'acclimatation, le système racinaire est désormais suffisamment développé, à ce stade, les plantules sont logées en plaques alvéolées. Les substrats utilisés sont désinfectés à la vapeur afin d'éliminer tout risque pathogène ; cette stérilisation crée un vide microbiologique favorable à une bonne installation de la biotisation : les micro-organismes non bienveillants sont remplacés par les micro-organismes bénéfiques au développement du plant. Les plants sont repotés en godets et conduits sous serres d'élevage pendant quelques mois. Ils sont alimentés par fertirrigation et font toujours l'objet d'une surveillance quotidienne. À l'issue de cette période d'élevage, la plupart des plants sont commercialisés.

Exemple : Dans le cas de la pomme de terre, il est possible de repiquer des fragments de germe comportant un nœud muni d'une petite feuille et d'un bourgeon. La plante issue de la bouture peut être fragmentée à son tour et conduite à d'autres boutures. Un seul bourgeon permet de produire jusqu'à 100 000 plantes en six mois.



**Figure 5.** Exemple de multiplication de la pomme de terre in vitro.

# Chapitre 4

## Haplodiploïdisation

Le processus d'haplodiploïdisation comprend l'obtention de plantes haploïdes à partir des organes porteurs des cellules reproductrices, appelés gamétophyte mâle ou femelle, et le retour vers la phase diploïde.

### 1. Objectif

La culture des cellules reproductrices est utilisée afin d'obtenir des haploïdes pour :

- Recherche de mutations récessives ;
- Haplo/diploïdisation : homozygotie 100%.

Des homozygotes, pour :

- Outil de sélection ;
- espèces autogames, espèces allogames.

### 2. Obtention de plants haploïdes

Plusieurs possibilités existent afin d'obtenir des plantes haploïdes (Figure 2). La méthode la plus fréquente repose sur la culture *in vitro* de tissus haploïdes, c'est-à-dire du gamétophyte mâle (pollen immature) ou femelle (sac embryonnaire). Comme on peut rencontrer dans la nature des plantes haploïdes produites par haploïdisation spontanée. La culture *in vitro* permet de régénérer un embryon qui possède un génome haploïde, qui se développera en plante haploïde.

- Haploïdisation spontanée par :
  - Parthénogenèse (cellules sac embryonnaire)
- Haploïdisation induite par :
  - Androgenèse *in vitro*
  - Gynogenèse *in vitro*
  - Parthénogenèse *in situ*

### 3. L'haplodiploïdisation ou la création de lignées pures

Les plantes haploïdes sont issues d'une cellule sexuelle mâle ou d'une cellule sexuelle femelle sans fécondation. Les plantes obtenues n'ont qu'un seul lot de chromosomes au lieu de 2 normalement, qui est doublé naturellement ou artificiellement afin qu'elles deviennent fertiles.

Elles peuvent être obtenues par androgenèse, par gynogenèse, par fécondation avec du pollen irradié ou par croisements interspécifiques.

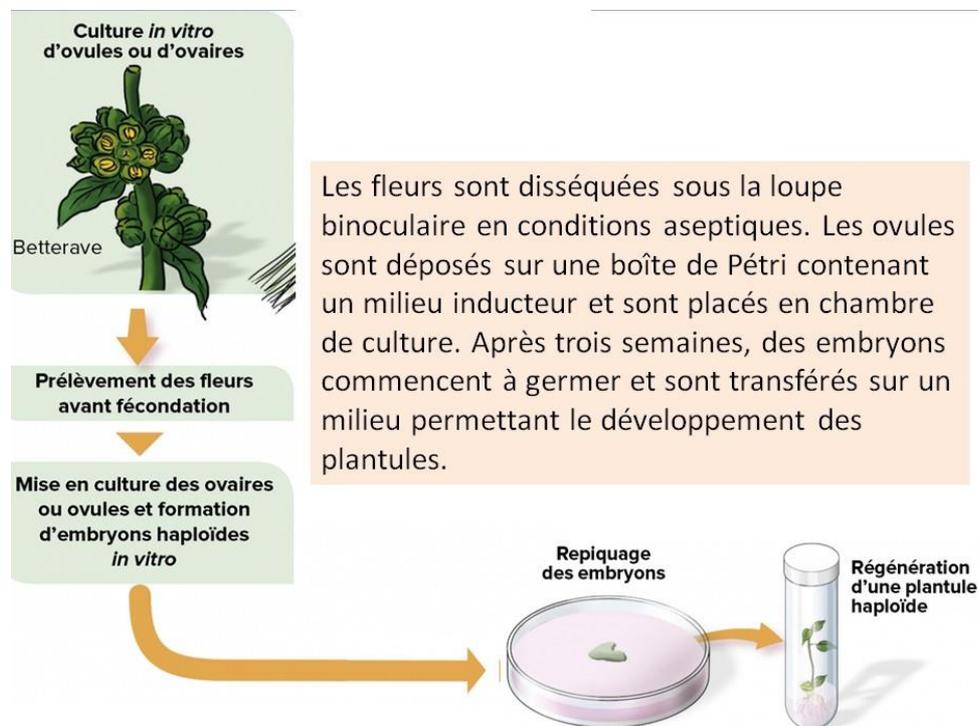
Il existe dans la nature à des pourcentages très faibles des plantes haploïdes, non issues de fécondation normale.

### 3.1. Haploïdie induite par gynogenèse

#### 3.1.1. Haploïdie par culture *in vitro* d'ovaires ou d'ovules

Elle consiste à mettre en culture *in vitro* des ovules ou des ovaires prélevés sur la plante avant fécondation. Des plantes haploïdes ont pu être obtenues chez l'orge, le blé, le riz, le maïs, le tabac, la betterave...

Sur la betterave, la gynogenèse est la technique la plus opérationnelle de production d'haploïdes, même si on obtient moins de 8 % d'haploïdes. Elle permet notamment de travailler sur des betteraves mâles fertiles, aussi bien que sur des betteraves mâles stériles (contrairement à la culture d'anthères).



**Figure 6.** Gynogenèse chez la betterave (source GNIS 2021).

Chez un certain nombre d'espèces, comme l'asperge, il apparaît de façon spontanée, à de faibles fréquences, des graines polyembryonniques, où l'un des embryons est parfois haploïde.

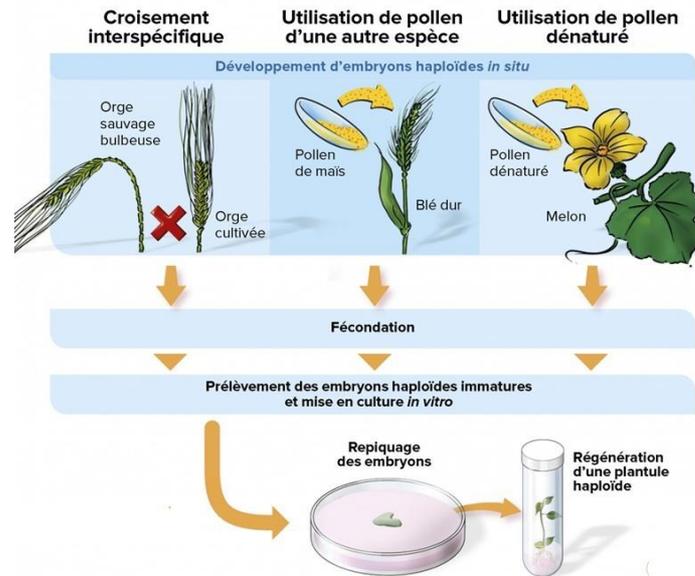
L'utilisation de cette source haploïde reste très peu efficace.

Des résultats intéressants ont été obtenus concernant l'obtention de plantes haploïdes par l'utilisation de différentes sources de pollen, ce dernier ayant alors le simple rôle d'induire le développement de l'embryon.

### 3.1.2. Haploïdie induite par croisement interspécifique

Le croisement interspécifique entre une espèce cultivée et une espèce sauvage permet parfois de produire des plantes haploïdes.

En effet, après fécondation au cours des premières divisions cellulaires, les chromosomes de l'espèce sauvage sont éliminés.



**Figure 7.** Obtention d'haploïdes par croisement interspécifique (organe femelle)  
(Source GNIS 2021).

On obtient ainsi un embryon haploïde ne comportant que les chromosomes de l'espèce cultivée. Cette méthode s'applique à l'orge, à la pomme de terre, ainsi qu'à quelques génotypes de blé.

Le croisement interspécifique de l'orge cultivée par l'orge sauvage **bulbeuse** permet l'obtention d'embryons haploïdes d'orge cultivée.

La culture in vitro est alors nécessaire pour permettre à cet embryon de poursuivre son développement et de donner une plante.

Exemples :

- a. La pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum*) est tétraploïde ( $2n = 4x = 48$ ). La réduction du stock chromosomique est obtenue par pollinisation de la pomme de terre cultivée par une espèce sauvage *Solanum phureja*. Ce système permet d'obtenir des plantes diploïdes.  
Ces plantes peuvent être alors facilement croisées par des espèces sauvages, fréquemment diploïdes, ce qui permet de restaurer la tétraploïdie.
- b. Haploïdie induite par croisement intergénérique, plus récemment, les croisements entre genres ont été étudiés. Haploïdie induite par croisement intergénérique.
  - La pollinisation du blé dur par du pollen de maïs offre la possibilité de produire des plantes haploïdes chez le blé dur, espèce récalcitrante aux techniques de culture d'anthères.
- c. Haploïdie induite par l'utilisation de pollen dénaturé
  - L'induction d'haploïdes est également possible par pollinisation avec du pollen dénaturé par irradiation. Cette technique s'est révélée utile pour tout un ensemble d'espèces légumières et est utilisée couramment chez le melon. L'étape de culture in vitro des embryons haploïdes est là aussi obligatoire.

### 3.2. Haploïdie induite par androgenèse

L'androgenèse a été la première voie d'obtention d'haploïdes *in vitro*.

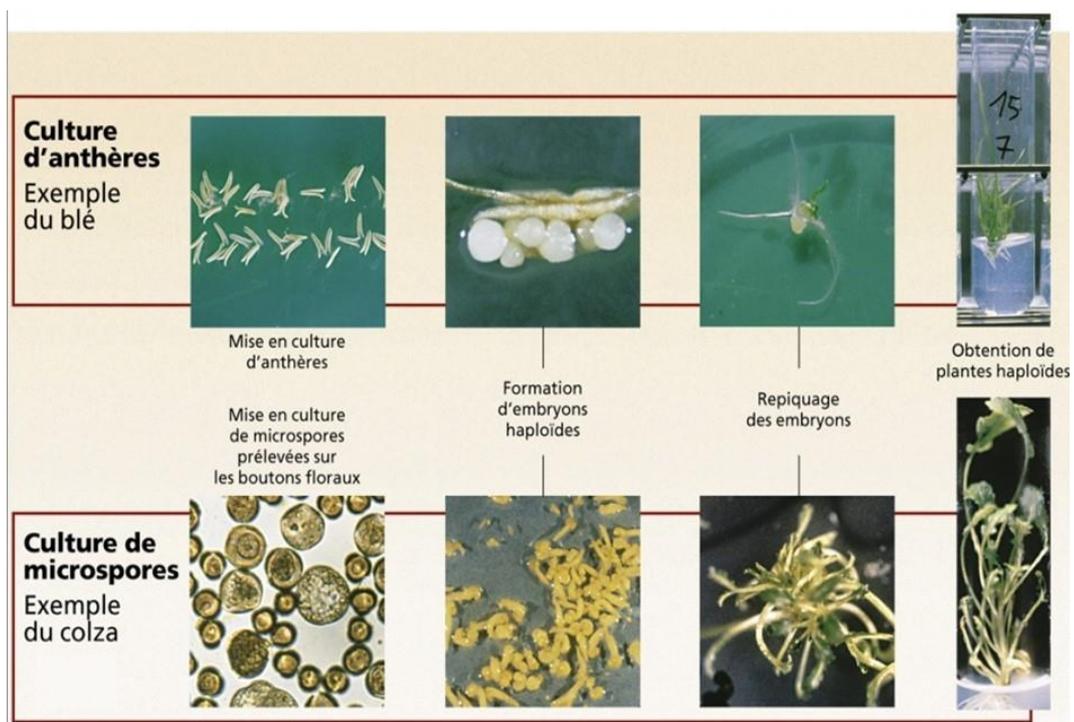
Les plantes haploïdes ont été obtenues par culture d'anthers.

Plus récemment, la culture de microspores (grains de pollen immatures) a été mise au point.

L'haploïdie induite par androgenèse permet :

- L'obtention de lignées HD (Haploïde doublé) de bonne valeur agronomique.
- La création de géniteurs peut se révéler intéressante.

Chez l'orge, il a été possible d'obtenir par androgenèse des lignées résistantes à *Yellow mosaic*



**Figure 8.** Haploïdie induite par androgenèse

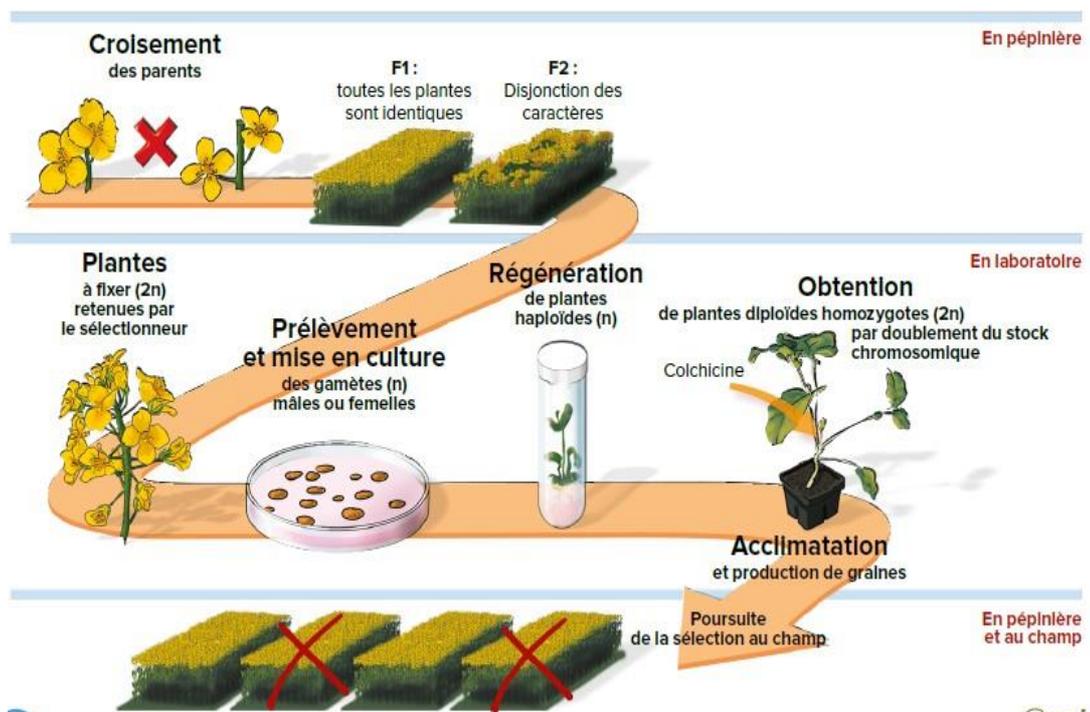
### 3.3. Le principe de l'haplodiploïdisation

#### a. Production de plantes mères

Le sélectionneur effectue un croisement entre deux lignées parentales présentant des caractéristiques intéressantes et complémentaires.

Ce croisement produira la génération F1. Ce sont les plantes mères pour l'obtention de la phase haploïde. A ce stade, toutes les plantes sont identiques. En revanche, sur ces plantes, la méiose à l'origine de la formation des gamètes permet la ségrégation des caractères, selon les lois de Mendel et les recombinaisons entre les chromosomes parentaux. Les individus F2 seront alors tous différents les uns des autres, c'est la disjonction des caractères.

Pour faciliter le travail de sélection, l'haplodiploïdisation va permettre d'obtenir des plantes homozygotes.



**Figure 9.** Haplodiploïdisation (exemple : colza) (source GNIS 2021).

#### b. Obtention de la phase haploïde

Il s'agit de récupérer les cellules ayant subi la méiose avant la fécondation. C'est là que commence le travail de laboratoire. L'obtention des plantes haploïdes peut se faire par culture in vitro de cellules destinées à fournir les cellules reproductrices ou gamètes. S'il s'agit de gamètes mâles, on parle d'androgenèse. S'il s'agit de gamètes femelles, c'est la gynogenèse.

### c. Retour à l'état fertile diploïde

Pour utiliser en sélection une plante régénérée par l'une de ces voies, il faut disposer de plantes fertiles et donc diploïdes. L'état haploïde étant instable, l'individu régénéré est parfois diploïde, on parle de doublement spontané du stock chromosomique. Pour le blé, on peut compter 20 à 25 % d'haploïdes doublés spontanément, 60 à 65 % chez l'orge.

Sinon, on provoque artificiellement un doublement des chromosomes, le plus couramment par l'action d'un agent chimique, la colchicine. Les plantes obtenues sont des diploïdes homozygotes : elles portent des paires de gènes ou allèles identiques, d'où leur grand intérêt.

#### Traitement à la colchicine

La **colchicine** bloque la mitose après la duplication des chromosomes et les cellules deviennent **diploïdes**. Le traitement à la colchicine peut se réaliser au stade plantule par trempage des racines ou injection dans les méristèmes. Les taux de doublement sont alors très variables.

Actuellement, se développent des traitements in vitro au stade embryonnaire.

La colchicine est un alcaloïde tricyclique très toxique, extrait au départ des colchiques (plantes du genre *Colchicum*), principalement le colchique d'automne.

Elle se fixe sur les microtubules cellulaires (tubuline) et bloque la division cellulaire à la métaphase, empêchant la formation des fibres fusoriales (fuseau achromatique) et la séparation des chromosomes accolés au niveau de la plaque équatoriale.

#### c2. Déterminisme du niveau de ploïdie

Une vérification de la ploïdie des plantes régénérées peut être effectuée précocement par cytométrie de flux. Une substance fluorescente se liant à l'ADN permet la coloration des cellules. La mesure de la densité de cette coloration permet de déterminer le niveau de ploïdie. Sinon, la constatation de la fertilité de la plante garantit qu'elle est effectivement diploïde.

Au labo, concrètement, il est possible de trier les plantules sur leur niveau de ploïdie à l'aide de la cytométrie en flux. Un petit fragment de feuille suffit. Seules les plantes diploïdes sont conservées et le sélectionneur a alors très peu de déchet dans les descendance HD qu'il récupère.

#### Application en amélioration des plantes

La technique de l'haplodiploïdisation permet la ;

- Production des homozygotes
- Obtention des hybrides vigoureux (hétérosis)
- Réduction de la ploïdie
- Production de plantes mâles (asperge)
- Production des plantes à fruits sans graines (stériles)

# Chapitre 5

## Hybridation somatique

### 1. La paroi pectocellulosique

La présence de la paroi pectocellulosique des cellules est une des barrières aux échanges d'information génétique. On peut séparer les cellules d'un tissu végétal grâce à l'action d'enzymes généralement extraites de champignons, qui dégradent la cellulose et les matières pectiques de la paroi. Des agents stabilisants sont ajoutés au milieu pour empêcher l'éclatement de la cellule. On obtient ainsi des cellules « déshabillées », qui deviennent sphériques : les protoplastes.

Ces derniers peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu végétal, mais ce sont généralement les parenchymes des jeunes feuilles qui sont utilisés pour leur préparation.

### 2. Les Protoplastes

Les protoplastes sont des cellules de plante, de bactérie ou de champignon débarrassées de leur paroi. Les protoplastes peuvent être obtenus à partir d'explants divers (fragments prélevés sur les tissus d'une plante, de préférence des limbes de jeunes feuilles). La fusion de protoplastes permet d'introduire des caractères à hérédité cytoplasmique et de créer de nouvelles variétés.

La propriété la plus importante des protoplastes est leur capacité à fusionner entre eux lorsqu'ils sont placés dans un milieu approprié.

Cette technique permet de surmonter les barrières liées à la reproduction sexuée et de créer de nouvelles combinaisons entre noyau et cytoplasme. Du fait de l'absence de la paroi pectocellulosique, l'introduction directe de l'ADN dans les cellules est facilitée.

#### 2.1. Obtention

L'obtention de protoplastes se fait habituellement par digestion enzymatique de la paroi, grâce notamment à des enzymes telles que la pectinase, la cellulase ou le lysozyme. La digestion a lieu en milieu hypertonique car les cellules végétales, privées de leur "armature" pecto-cellulosique risquent l'éclatement.

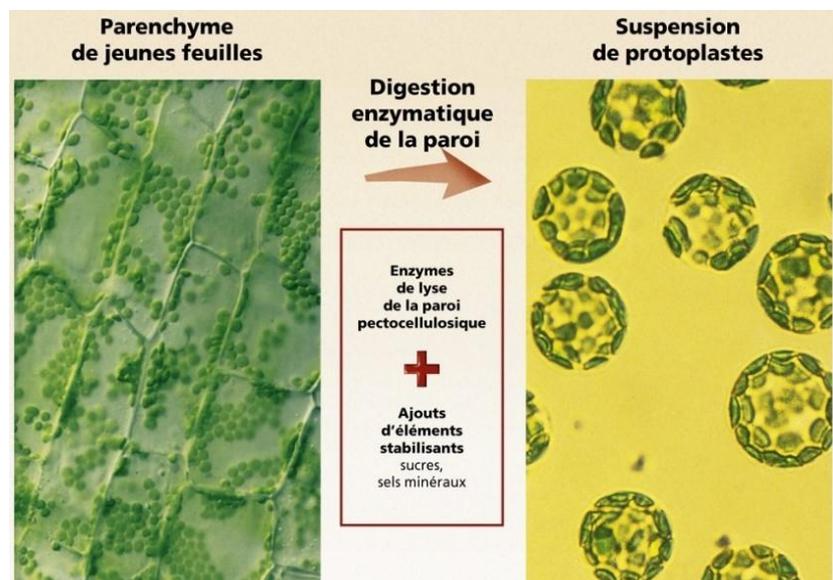
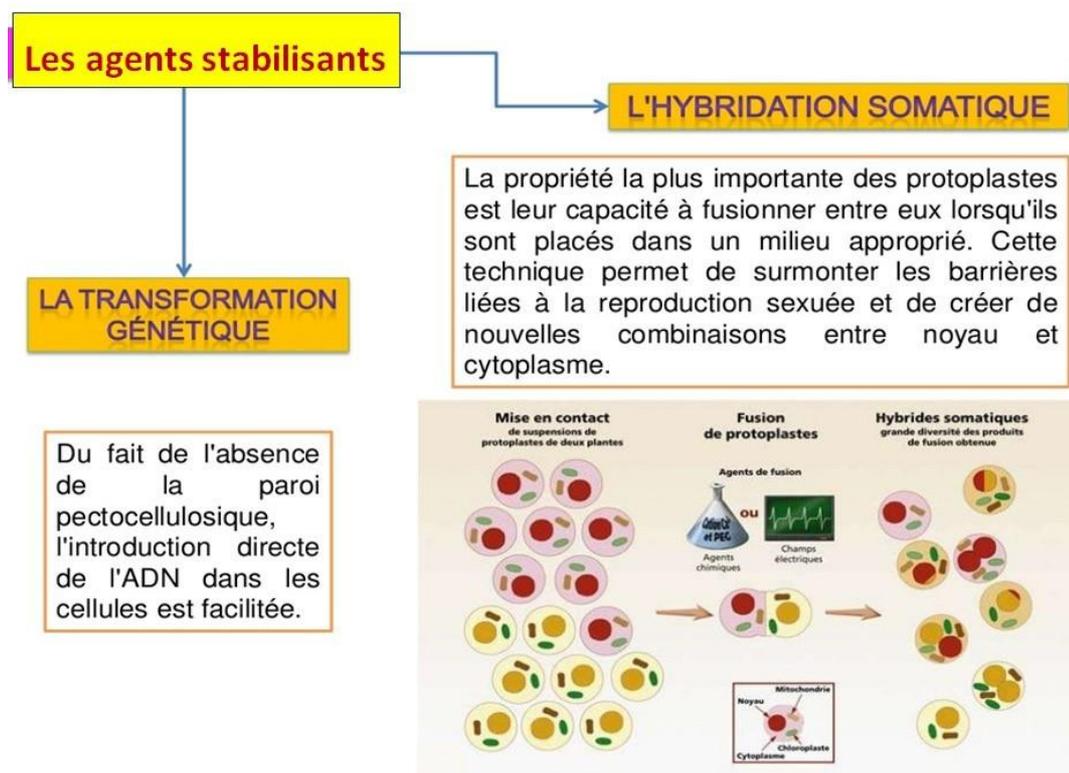


Figure 10. Obtention des protoplastes

## 2.2. Les agents stabilisants

Ordinairement, l'appel d'eau provoqué par le potentiel osmotique de la vacuole de la cellule est contrebalancé par la paroi végétale. La suppression de la paroi doit donc être compensée par l'adjonction dans le milieu d'agents plasmolysants, qui abaissent le potentiel osmotique, tels que des sucres ou des sels minéraux en concentrations déterminées.

A partir de ces protoplastes, il est possible d'obtenir de nouvelles plantes. Si les conditions de milieu sont favorables, la paroi végétale se reconstitue. Les organites cellulaires se réarrangent et les cellules entrent en division. Elles donnent ainsi naissance à des microcolonies, puis des cals. Transférés sur un milieu de régénération, les cals se développent en embryons somatiques qui donneront des plantules.



**Figure 11.** Les agents stabilisants en hybridation somatique (source GNIS 2021).

## 3. Fusion de protoplastes

Pour obtenir des fusions dirigées (inter-spécifiques ou inter-génériques), il a été nécessaire de mettre au point des produits qui favorisent une fragilisation contrôlée de la membrane plasmique ou qui permettent l'accolement de plusieurs membranes. Parmi les produits les plus utilisés :

- les sels ( $NaNO_3$ )
- le PEG (Poly Ethylène Glycol).
- $Ca^{2+}$  pH basique

Avec un Choc électrique

### **3.1. Préparation de la solution fusionnante**

- pour 100 ml de tampon pH 7
- 40 g de PEG (Poly Ethylène)
- Glucose 2 g Nitrate de Calcium 1,5 g

### **3.2. Les techniques de fusion de protoplastes**

Les protoplastes sont des cellules chargées négativement et la fusion spontanée n'est que très rarement observée. La fusion est obtenue sous l'action de divers agents chimiques ou d'un choc électrique.

#### **3.2.1. La fusion par des méthodes chimiques**

Neutraliser la charge électrique des protoplastes par des cations  $\text{Ca}^{2+}$  et un pH élevé.

Ensuite, on utilise le polyéthylène glycol (PEG) qui provoque une forte agrégation des cellules et déstabilise la membrane plasmique. Après retour aux conditions initiales, les protoplastes fusionnent.

#### **3.2.2. La fusion par des méthodes électriques**

Cette technique, l'électrofusion, plus récente, utilise des champs électriques intenses et de courte durée, qui en déstabilisant les membranes entraînent la fusion des protoplastes. Ce système semble être plus efficace.

### **4. Produits de fusions somatiques**

Lors de la fusion entre protoplastes, tous les échanges sont possibles entre les deux.

On peut ainsi obtenir des degrés de fusion très variables.

En théorie, la fusion permet d'obtenir toutes les combinaisons. Dans la réalité, de nombreuses régulations ont lieu au moment de la première mitose, rendant impossibles certaines combinaisons. De plus, ce n'est pas parce qu'il y a fusion qu'il y a addition des noyaux et des cytoplasmes. Il se produit des éliminations de matériel, dont les mécanismes sont inconnus.

#### **4.1. Fusion des noyaux**

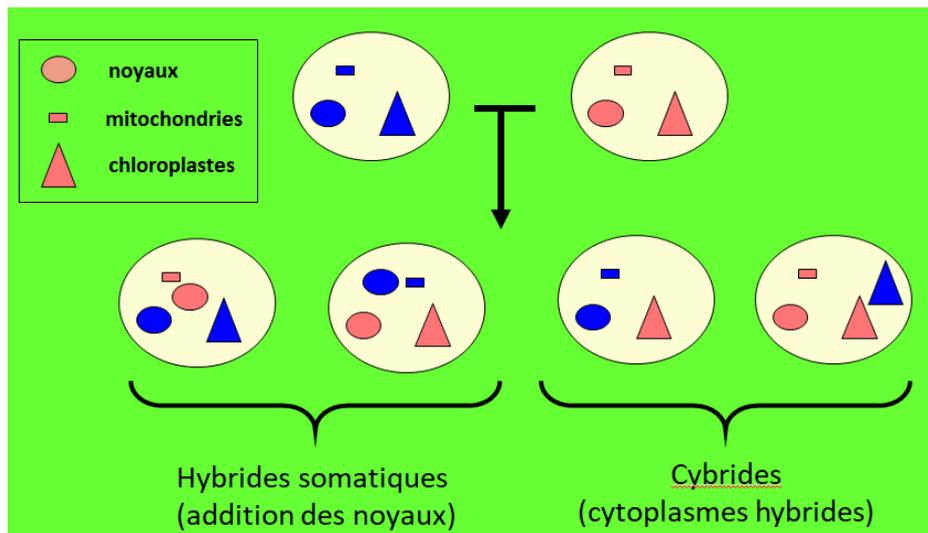
Recombinaison  $\pm$  entre les chromosomes des deux parents. Ce phénomène peut être utilisé pour transférer des gènes nucléaires.

- Obtention des hybrides somatiques asymétriques, où seuls quelques fragments d'ADN du parent donneur seront introduits dans l'espèce receveuse. Pour favoriser ce transfert partiel, l'ADN du parent donneur est partiellement fragmenté par irradiation ménagée des protoplastes (rayons X) avant la fusion.
- En cas de fusion importante de génomes entre espèces conduisent à des plantes souvent stériles.

## 4.2. Fusion unique des cytoplasmes (les cybrides)

Très souvent, la fusion des noyaux n'a pas lieu et au cours des divisions successives, il ne subsistera que l'un des noyaux parentaux. Celui-ci sera associé à un cytoplasme composite ou recombiné. Il contient les organites cytoplasmiques de l'un ou l'autre parent.

On constate souvent une recombinaison des mitochondries. En revanche, les chloroplastes de l'un des deux parents sont souvent éliminés. Il y a alors modification des relations nucléo-cytoplasmiques.



**Figure 12.** Répartition du matériel génétique après la fusion des protoplastes

La dernière étape consiste à induire la division des cellules.

Elle aboutit à la formation de cals. Ensuite, la différenciation des tissus est provoquée pour reformer une plante entière. Les travaux de sélection commencent sur la descendance de l'hybride somatique.

## 5. Applications pratiques

La première démonstration de fusion entre des protoplastes différents remonte aux travaux de Melchers et al., en 1978. Il recherchait des tomates cultivables à basse température et réalisa, à cette fin, des hybrides entre la tomate et la pomme de terre par fusion de protoplastes : la pomate. Cette nouvelle espèce est malheureusement un exemple théorique, car elle est stérile.

### Exemples

La pomme de terre cultivée, *Solanum tuberosum*, est une espèce chez laquelle l'introduction de caractères par fusion de protoplastes est facilement réalisable. Ainsi, on a pu introduire des gènes de résistance au virus de l'enroulement, aux virus Y et X, au mildiou et à la pourriture bactérienne due à *Erwinia*, à partir des espèces sauvages d'Amérique du Sud, notamment *Solanum brevidens*. De nouvelles lignées mâles stériles de colza résistantes à l'atrazine ont pu également être obtenues par cette technique.

# Chapitre 6

## Sauvetage de l'embryon

Le sauvetage de l'embryon végétal fait référence à une technique utilisée en culture in vitro en biotechnologie végétale pour préserver et développer des embryons végétaux dans un milieu de culture contrôlé, en dehors de la plante mère.

Cette technique est généralement utilisée à différentes fins, entre autres pour étudier les besoins nutritionnels des embryons en développement, sauver des embryons hybrides issus de croisements interspécifiques, produire des monoploïdes et surmonter la dormance des graines (accélérer les cycles végétatifs) de certaines espèces récalcitrante. Les embryons obtenus après la fécondation peuvent être prélevés, mis en culture in vitro et donner un nouvel individu.

La première étape de cette technique consiste à prélever des embryons immatures de l'ovule de la plante. Ces embryons sont généralement prélevés avant leur stade de développement complet. Ils sont ensuite placés dans un milieu de culture spécialement formulé, appelé milieu de culture in vitro, qui contient tous les nutriments et les hormones nécessaires à leur croissance et à leur développement.

Dans le milieu de culture in vitro, les embryons immatures se développent progressivement en plantules. Ce milieu de culture fournit aux embryons tous les nutriments essentiels, les vitamines, les hormones de croissance et autres composés nécessaires à leur développement normal. Les conditions de culture, telles que la température, l'humidité et la lumière, sont également contrôlées pour optimiser la croissance des embryons.

En cultivant les embryons végétaux in vitro, il est possible de contourner les barrières physiologiques ou environnementales qui les empêchent de se développer naturellement. Cela peut inclure des problèmes tels que des coques de graines dures, des inhibiteurs de croissance ou des conditions défavorables dans le milieu extérieur. La culture des embryons immatures est aussi utilisée comme il soit pour accélérer les cycles de végétation. Mais ce sauvetage peut encore être effectué quand l'embryon ne pourrait peut-être pas se développer dans les tissus maternels comme dans le cas d'un croisement interspécifique.

de certaines espèces cultivées dans le domaine d'amélioration des plantes.

Le sauvetage de l'embryon végétal in vitro permet de développer des plantes à partir d'embryons qui seraient autrement perdus ou incapables de se développer. Cette technique est utilisée pour la propagation de plantes rares ou précieuses, la conservation des ressources génétiques, la production de plantes génétiquement modifiées, la production commerciale de plantes et la recherche en biologie végétale.

La culture in vitro des embryons immatures présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet de multiplier rapidement des plantes à partir d'un seul embryon, ce qui est bénéfique pour la propagation de plantes rares ou précieuses. De plus, cette technique facilite également la

production de plantes génétiquement modifiées, car les embryons peuvent être génétiquement transformés avant d'être cultivés in vitro.

La culture d'embryons immatures pour accélérer les cycles de végétation

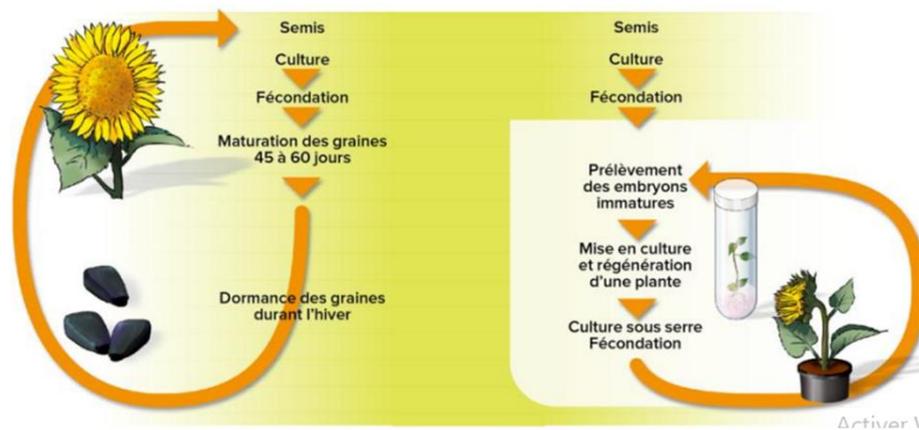
En cultivant des embryons immatures in vitro, il est possible de stimuler leur développement et leur maturation de manière contrôlée et accélérée. Cette approche est souvent utilisée dans le cadre de programmes de sélection végétale pour obtenir rapidement de nouvelles variétés avec des caractéristiques souhaitables. Cette technique permet de diminuer la durée de cycle de développement de la plante ce qui assure une réduction de la durée de la création variétale par la réalisation de plusieurs générations par an, exemple du tournesol (Fig 13). Les coûts élevés de la recherche, les contraintes agronomiques des agriculteurs, les attentes des industriels et des consommateurs conduisent les sélectionneurs à diminuer constamment la durée de la création variétale. Par cette technique, le sélectionneur peut éviter la phase de maturation de la graine par le prélèvement des embryons quelques jours après la fécondation et non à maturité de la graine et cela permet ainsi de réaliser plusieurs générations par an.

En cultivant des embryons immatures in vitro, il est possible de stimuler leur développement et leur maturation de manière contrôlée et accélérée. Cette approche est souvent utilisée dans le cadre de programmes de sélection végétale pour obtenir rapidement de nouvelles variétés avec des caractéristiques souhaitables.

La technique implique généralement de collecter des embryons immatures à un stade précoce de développement et de les placer dans un milieu de culture in vitro spécifique contenant les nutriments et les hormones nécessaires à leur croissance. Les conditions de culture sont optimisées pour favoriser une croissance rapide et un développement accéléré des embryons.

En ajustant les paramètres du milieu de culture, tels que les niveaux d'hormones, la composition du milieu et les conditions environnementales, il est possible de stimuler la croissance et la différenciation accélérées des embryons. Cela permet de raccourcir le temps nécessaire pour atteindre la maturité reproductive et produire de nouvelles générations de plantes.

En utilisant cette approche, les cycles végétatifs peuvent être réduits de manière significative, ce qui accélère les progrès réalisés dans les programmes de sélection végétale et permet d'obtenir plus rapidement des lignées ou des variétés améliorées. Cela peut être particulièrement bénéfique pour les espèces végétales qui ont des cycles de reproduction longs ou pour lesquelles la reproduction sexuée traditionnelle est difficile ou lente.



Une génération par an.

Cycle de vie normal

4 à 5 générations par an.

Cycle de sélection avec Culture d'embryons immatures

**Figure 13.** Culture d'embryons immatures in vitro du tournesol

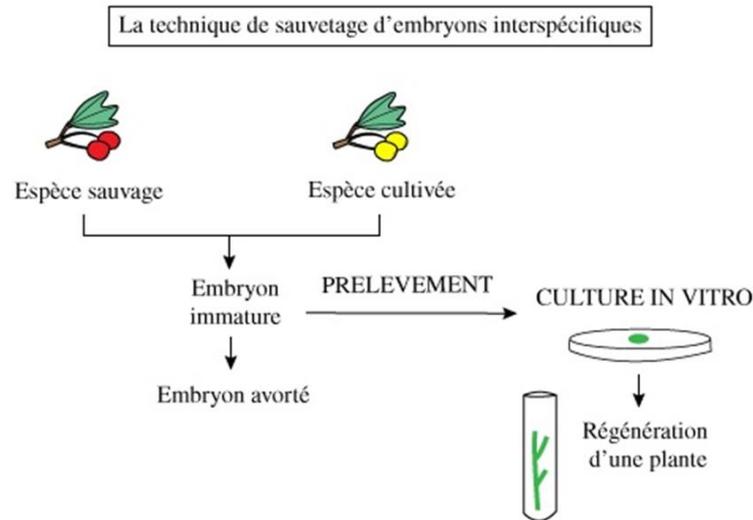
### Sauvetage d'embryons interspécifiques

Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique, après fécondation, un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif. Cette technique de culture in vitro est appelée sauvetage d'embryons interspécifiques.

Le sauvetage d'embryons interspécifiques par culture in vitro est une technique utilisée en biotechnologie végétale pour récupérer et développer des embryons résultant de croisements entre des espèces végétales différentes. Cette méthode permet de surmonter les barrières biologiques qui empêchent souvent le développement normal des embryons interspécifiques dans des conditions naturelles (Fig 14). L'avortement d'embryons issus de croisements interspécifiques est attribué à un développement retardé de l'albumen, par incompatibilité entre les tissus embryonnaires et maternels. La réalisation de croisements interspécifiques entre espèces sauvages et cultivées peut être utile pour introduire de nouveaux traits génétiques dans les variétés cultivées, tels que la résistance aux maladies ou la tolérance aux conditions environnementales difficiles.

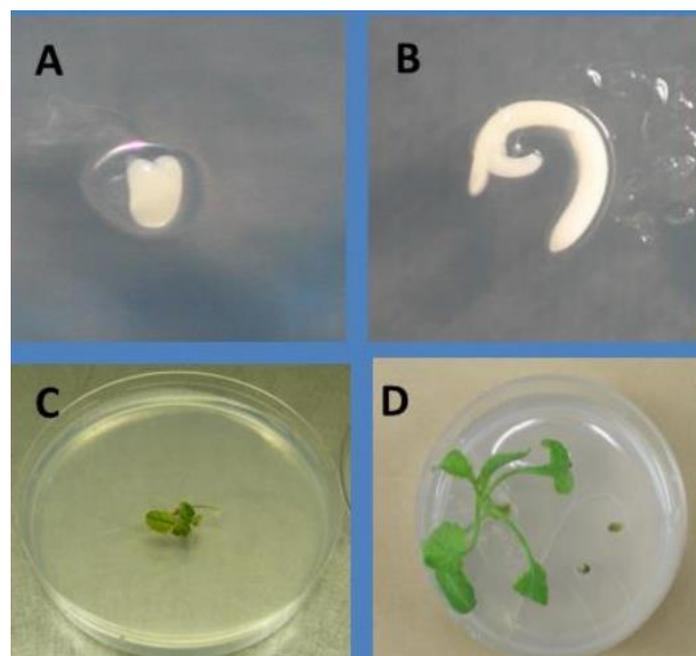
*Exemples :*

La tomate cultivée (*Lycopersicum esculentum*) sensible à certaines maladies est croisée avec, du les tomates sauvages possèdent de nombreux gènes de résistance aux maladies notamment l'espèce (*Lycoparium peruvianum*).



**Figure 14.** croisements interspécifiques entre une espèce sauvage et une espèce cultivée

Le processus de sauvetage d'embryons interspécifiques par culture in vitro implique plusieurs étapes. Tout d'abord, le croisement est réalisé en fécondant les ovules d'une espèce avec le pollen d'une autre espèce. Cette pollinisation croisée permet la formation d'embryons interspécifiques dans les graines obtenues. Les graines contenant les embryons interspécifiques sont ensuite collectées et préparées pour la culture in vitro. Les embryons sont extraits des graines et placés dans un milieu de culture spécifique, contenant tous les nutriments, les vitamines et les hormones nécessaires à leur développement. Au fur et à mesure de leur croissance, les embryons se développent en plantules (Fig 15.). Une fois que les plantules ont atteint un stade de développement suffisant, elles peuvent être transférées dans des pots ou des conditions de culture appropriées pour poursuivre leur développement en plantes matures.



**Figure 15.** **A,** Embryon obtenu à partir d'une graine immature d'un fruit résultant d'un croisement entre la tomate cultivée (*Solanum lycopersicum*) et *S. peruvianum*. **B,** Embryon extrait d'un fruit immature après autopollinisation chez la tomate. **C et D,** Plantes issues de la culture des embryons A et B après 20 jours de culture.

Le sauvetage d'embryons interspécifiques par culture in vitro et hybridation permet de créer de nouvelles combinaisons génétiques en surmontant les barrières biologiques normalement présentes entre les espèces. Cette approche est utilisée en recherche agronomique et en amélioration des plantes pour explorer et exploiter la diversité génétique afin de développer de nouvelles variétés avec des caractéristiques souhaitables, telles que la résistance aux maladies, la tolérance aux conditions environnementales difficiles ou l'amélioration des rendements.

# Chapitre 7

## Embryogenèse somatique et semences artificielles

L'embryogenèse somatique est un processus de régénération des embryons à partir de cellules somatiques, c'est-à-dire des cellules non reproductrices d'une plante. Cela permet de générer des embryons sans passer par la fécondation traditionnelle des gamètes. C'est la génération d'un embryon à partir d'un méristème, d'un cal ou de suspensions. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire munie de deux méristèmes, l'un caulinaire et l'autre racinaire qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante.

Il est intéressant de noter que les embryons somatiques, qui se développent à partir de cellules somatiques (non reproductrices), passent par des stades de développement similaires à ceux de l'embryon zygotique, qui se forme après la fécondation. Ces stades de développement sont généralement observés chez les dicotylédones ((globulaire, cordiformes, torpille, cotylédonaire chez les dicotylédones) (Aminaro, 1987).

La voie de l'embryogenèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la longueur des cycles d'amélioration comme par exemple, le temps nécessaire à la valorisation du matériel sélectionné âgé ou juvénile ou la production de parents hybrides nécessaires à la diffusion de nouvelles variétés.

De telles applications ont été réalisées chez plusieurs espèces :

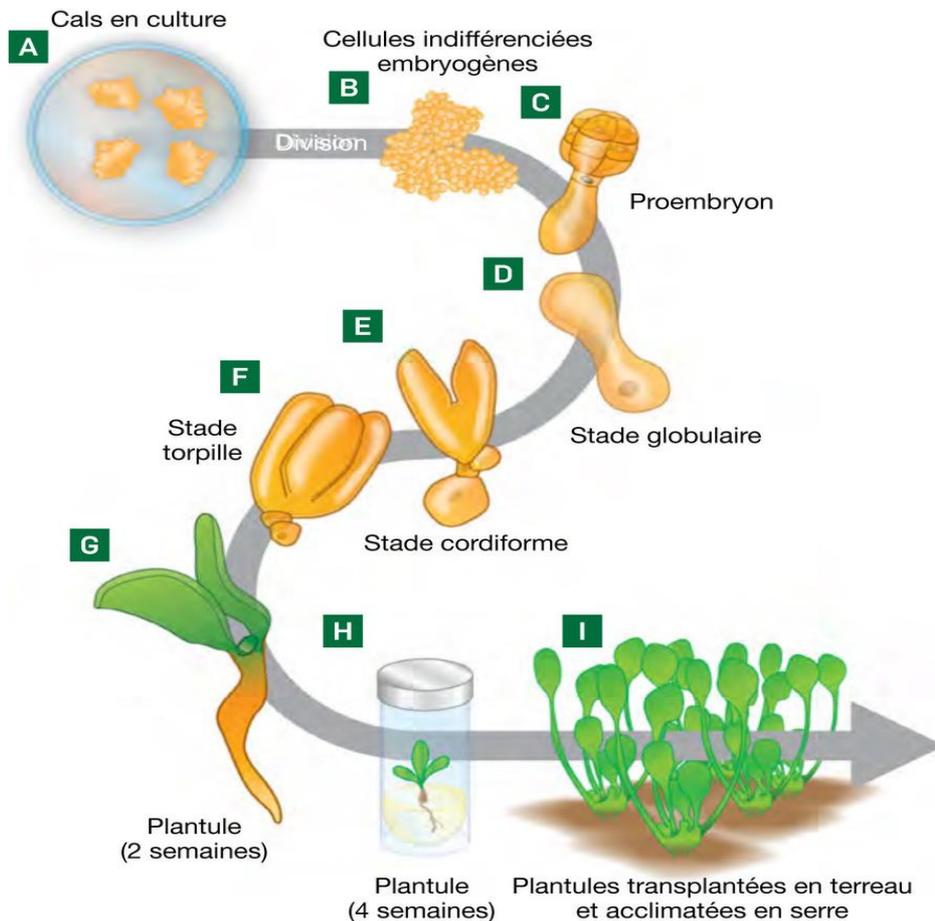
Comme la luzerne (Redenbough et al., 1986; Ray et Bingham, 1989) ; la carotte (Toute, 1998); le palmier dattier (Ferry et al, 1998) et le palmier à huile (Rival et al., 1998), le café (Carneiro, 1999).

Le processus général de l'embryogenèse somatique et des semences artificielles peut inclure les étapes suivantes :

1. Culture de tissus : Des explants, tels que des morceaux de feuilles, de tiges ou de racines, sont prélevés sur une plante saine et cultivés sur un milieu de culture approprié. Ce milieu contient des nutriments, des hormones de croissance et d'autres substances nécessaires à la régénération des cellules.
2. Induction de l'embryogenèse : Les tissus cultivés sont manipulés pour stimuler le développement des embryons. Cela peut être réalisé en modifiant les hormones de croissance présentes dans le milieu de culture ou en utilisant d'autres techniques de manipulation cellulaire.
3. Formation d'embryons somatiques : Les cellules végétales se multiplient et se différencient pour former des structures ressemblant à des embryons. Ces embryons somatiques sont des structures multicellulaires qui ressemblent aux embryons formés lors de la fécondation naturelle.
4. Conversion en plantules : Les embryons somatiques sont isolés et placés sur un milieu de culture approprié pour les amener à se développer en plantules. Ce milieu fournit les

conditions nécessaires à la croissance des plantules, telles que les nutriments, l'eau et la lumière.

5. Durcissement et transplantation : Les plantules se développent jusqu'à devenir des plantes matures et sont ensuite durcies, c'est-à-dire qu'elles sont progressivement adaptées aux conditions environnementales extérieures.



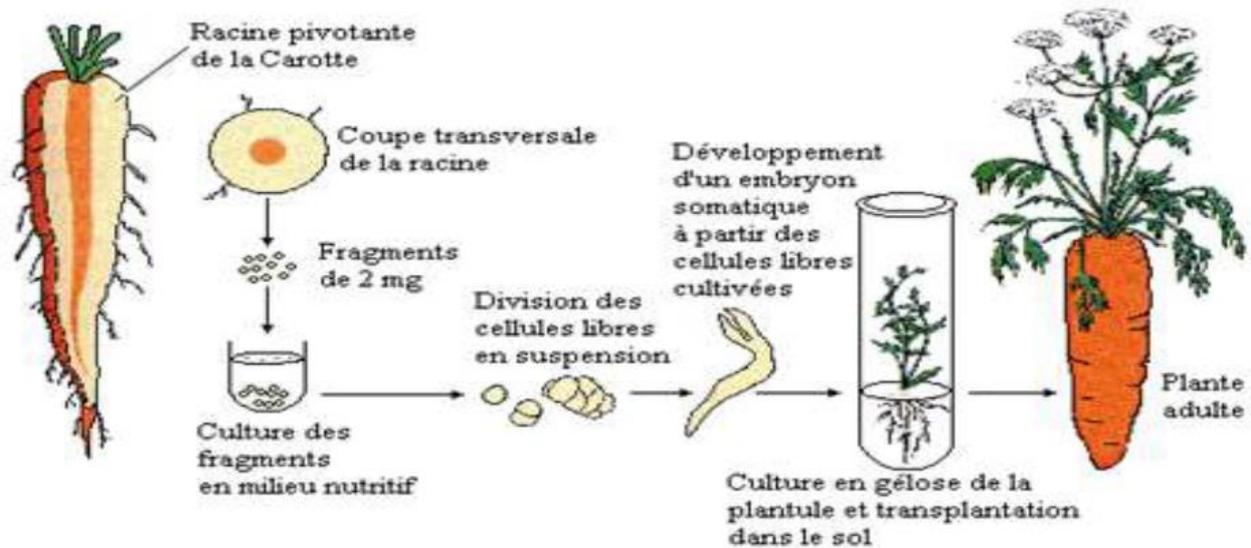
**Figure 16.** Les différents stades des embryons somatiques

### **b. Origine et développement des embryons somatiques**

Les données cytologiques montrent que les embryons somatiques ont pour origine des cellules particulières; dites embryogènes, qui présentent des caractères de cellules méristématiques primaires: petites tailles, cytoplasme dense, gros noyaux aux nucléoles proéminents et petites vacuoles. Elles fixent de manière intense les colorants ce qui les rend aisément repérables en cytologie. Il existe deux voies principales pour l'embryogenèse somatique : la voie directe et la voie indirecte. Ces voies diffèrent dans les méthodes de régénération des embryons à partir de cellules somatiques. Les embryons somatiques ont une structure chromosomique souvent semblable à celle de la plante- mère dont ils sont issus. Le critère qui permet de reconnaître un embryon somatique est certainement sa structure bipolaire, qui développe précocement et simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire.

### Directe:

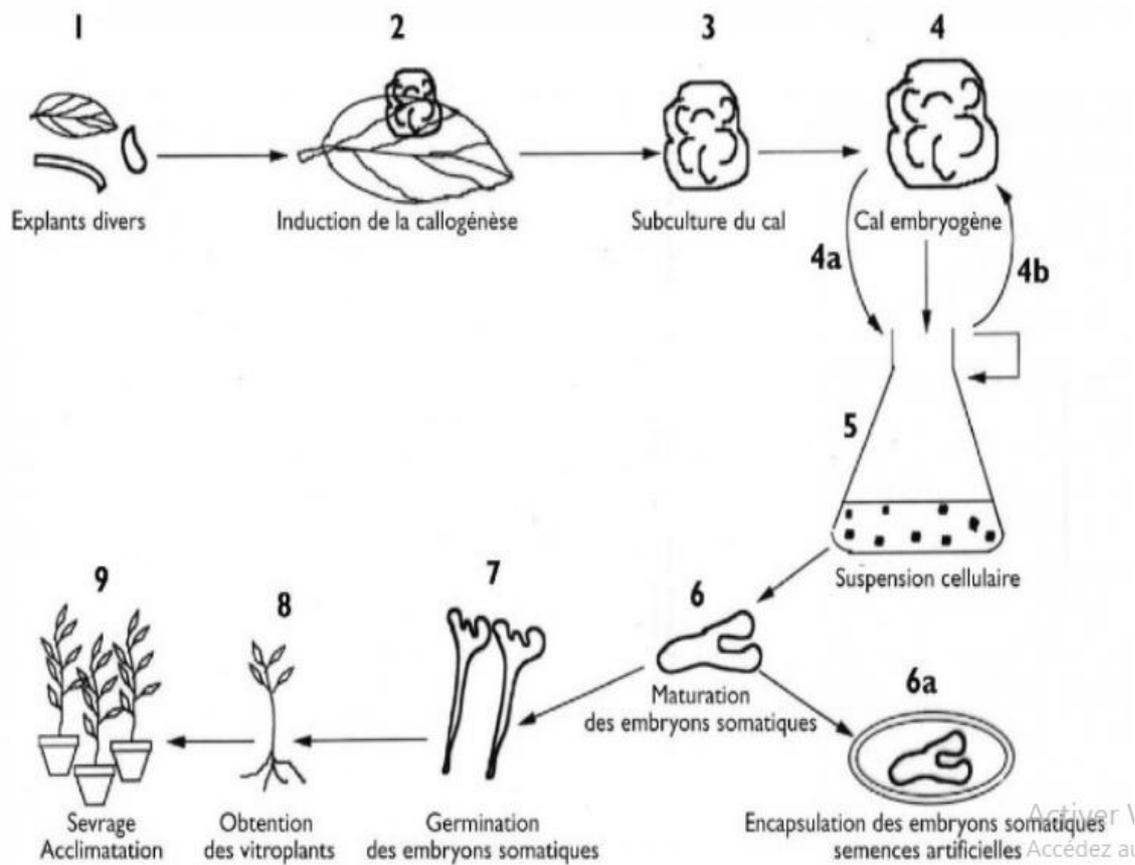
L'embryon apparaît directement sur l'explant mis en culture sans passer par la formation de structures intermédiaires. Elle s'effectue directement à partir de cellules très jeunes (prédéterminées) embryogènes. Les cellules somatiques sont généralement exposées à des conditions de culture spécifiques, telles que l'utilisation de certains milieux de culture et de régulateurs de croissance, pour induire directement la formation des embryons après qu'elles ont subi une dédifférenciation puis une redifférenciation au sein du tissu dont elles sont issues (Fig 17). Cette voie est considérée comme plus rapide et plus efficace que la voie indirecte.



**Figure 17.** Embryogenèse somatique directe (cas de carotte).

### Indirecte:

Une phase intermédiaire de callogenèse est nécessaire à l'embryogenèse. Les cellules somatiques sont d'abord cultivées sur un milieu de culture spécifique, contenant généralement des hormones de croissance et d'autres nutriments nécessaires à la prolifération cellulaire. Sous ces conditions, les cellules somatiques se divisent et prolifèrent, formant une masse de cellules appelée cal. Ce cal peut ensuite être induit à se différencier en embryons somatiques (Fig 18). Cette voie nécessite généralement plus de temps et peut impliquer des étapes supplémentaires pour obtenir des embryons.



**Figure 18.** Embryogenèse somatique indirecte.

### c. Multiplication par embryogenèse somatique.

L'embryogenèse somatique consiste à provoquer l'apparition d'embryons à partir de tissus végétaux mis en culture in vitro. Elle apparaît le plus souvent dans les suspensions cellulaires, occasionnellement dans les cals, plus rarement directement sur les organes.

L'embryogenèse somatique est le processus par lequel une structure similaire à un embryon zygotique est obtenue sans la fécondation des gamètes, tandis que par organogenèse des tiges, des racines ou des fleurs peuvent être obtenues. Ces organes sont induits à partir d'une cellule ou d'un groupe de cellules qui, selon les conditions de culture, ont la propriété de rester en division active.

Cette totipotence cellulaire a été énoncée par Haberlandt en 1902, qui a proposé la théorie selon laquelle toutes les cellules végétales ont la capacité de régénérer des plantes entières. Haberlandt n'a pas réussi à prouver son hypothèse parce qu'il ne pouvait pas atteindre la division cellulaire.

### **Semences artificielles (synseeds)**

Les semences artificielles, également connues sous le nom de semences synthétiques ou semences in vitro, sont des structures produites en laboratoire à partir de l'embryogenèse somatique.

Dans le contexte des semences artificielles, l'embryogenèse somatique est utilisée pour produire des embryons somatiques à partir de cellules végétales. Ces embryons somatiques peuvent ensuite être ensemencés sur un support de culture approprié pour induire la formation de structures semblables à des embryons, appelées semences artificielles.

Les semences artificielles sont utilisées dans le domaine de la biotechnologie végétale pour la propagation clonale des plantes. Elles offrent plusieurs avantages par rapport aux méthodes traditionnelles de multiplication végétative, telles que la division de touffes ou la bouture. Par exemple :

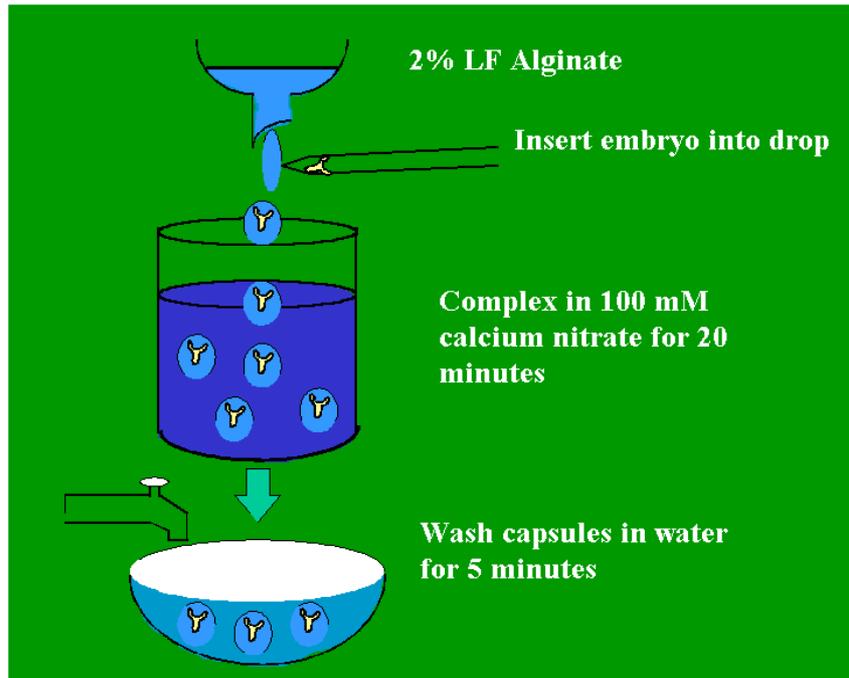
- Production de masse : Les embryons somatiques peuvent être multipliés rapidement en culture in vitro, ce qui permet de produire un grand nombre de semences artificielles à partir d'un seul embryon somatique.
- Uniformité génétique : Les semences artificielles sont des clones de l'embryon somatique d'origine, assurant ainsi une uniformité génétique parmi les plantes issues de ces semences.
- Propagation de plantes rares : Les semences artificielles permettent de propager et de conserver des plantes rares, menacées ou difficiles à reproduire par d'autres méthodes.
- Propagation de plantes génétiquement modifiées : Les semences artificielles peuvent être utilisées pour propager des plantes transgéniques, c'est-à-dire des plantes qui ont été génétiquement modifiées pour exprimer des caractéristiques spécifiques.

Cependant, il est important de noter que l'utilisation des semences artificielles reste limitée par rapport aux méthodes de propagation traditionnelles. Les semences artificielles nécessitent des conditions de culture spécifiques et peuvent être plus coûteuses à produire que les méthodes traditionnelles

En effet, la maîtrise de la production d'embryons, chez certaines espèces, via les **suspensions cellulaires** permet d'obtenir des milliers d'embryons par litre de milieu de culture et par conséquent la régénération de milliers de plants.

L'embryogenèse somatique permet aussi en un temps très court de produire des plantes entières sans passer par les contraintes que connaît habituellement l'**organogenèse** ( phase de caulogenèse et de rhizogenèse)

La voie de l'embryogenèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la longueur des cycles d'amélioration comme par exemple , le temps nécessaire à la valorisation du matériel sélectionné âgé ou juvénile ou la production de parents hybrides nécessaires à la diffusion de nouvelles variétés.



**Figure 19.** Représentation schématique du procédé d'enrobage des embryons somatiques

De telles applications ont été réalisées chez plusieurs espèces :

Comme la luzerne (REDENBOUGH *et al.*, 1986 FUJII *et al.*, 1987 ; STUART *et al.*, 1987 ; RAY *et* BINGHAM, 1989) ;

la carotte (TOUTE, 1998) ;

le palmier dattier (FERRY *et al.*, 1998) et

le palmier à huile (RIVAL *et al.*, 1998) ;

le café (CARNEIRO, 1999) ;

*Asparagus officinalis* (MAMIYA *et* SAKAMOTO , 2001) ;



**Figure 20.** Semences artificielles (embryons somatiques enrobés) de *Feijoa sellowiana*

Le rendement en plantes produites est très élevé.

L'embryogenèse somatique est une technique qui s'adapte bien à la production industrielle (à l'automatisation).

Les embryons somatiques peuvent être initiés dans des bioréacteurs, afin soit de produire des semences artificielles en les encapsulant dans un gel nutritif, ou encore pour la synthèse de métabolites secondaires utilisés dans des médicaments, colorants, etc. Ce peut-être également un moyen de cloner des ligneux.

### **Applications**

Obtention de semences pour des variétés stériles

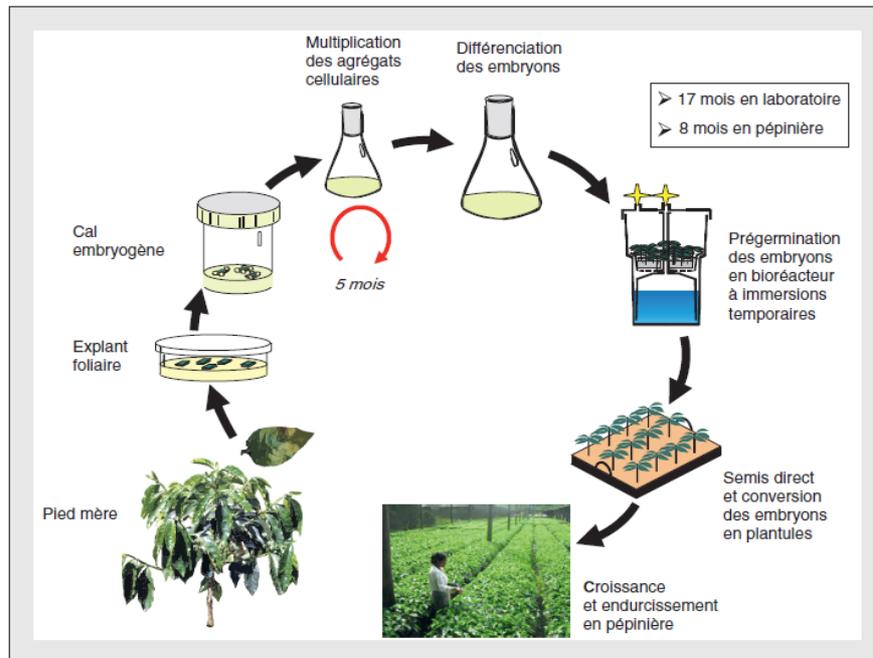
(ex: pommes de terre polyploïdes, bananier...)

Semences « d'élite » pour des espèces allogames

Solution pour la conservation d'espèces tropicales dont les semences sont dites « récalcitrantes » à la déshydratation

Obtention rapide de semences « d'élite » pour des espèces ligneuses

Possibilité de cultures en réacteurs : production de semences artificielles à grande échelle (gymnospermes)



**Figure 21.** Représentation schématique du procédé industriel de propagation in vitro du caféier par embryogenèse somatique.

### Inconvénients

- N'est pas appliquée sur toutes les espèces végétales;
- Le coût est élevé;
- Modifications génétiques possibles

# Références bibliographiques

- Agnès B., Hélène R. et F. Louise. 2013. La culture *in vitro* en TPE. <http://culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com/>
- Acosta C, Suárez I y Gatti K. 2013. In vitro multiplication of *Gmelina arborea* Roxb. Adult trees. UDCA Actualidad y Divulgación Científica 16(1):97-102
- Bommineni U.R. et P.P. Jauhar. 2003. Regeneration of plant through isolated scirtelum culture of durum. Wheat. Plant sci. p 116; 197.
- Bourrain L. 2012 : La multiplication in vitro du fraisier (*Fragaria x ananassa* Duch.) : un outil pour produire en quantité des plants sains dans une large gamme variétale. Biotechnologie végétale, hier, aujourd'hui et demain, Colloque AFBV.
- Boxus P. 1995 : multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique dans les biotechnologies Végétales. BV 93, Ed CNED. AUPELF-UREF 191p.
- Bretaudeau A. 2006. Les techniques de culture in vitro et la micropropagation des espèces végétales, IPR/Kolibougou Koulikoro B P 06.
- Caraglio Y. 2012. L'organogénèse. UMR Cirad/Inra de Modélisation des plantes (AMAP). Programme modélisation des plantes du Cirad-amis <http://amap.cirad.fr/architecture/organo/organo.html#introduction>.
- Cedevit. 2013. La culture in vitro. <http://www2.ulg.ac.be/cedevit/french/Index-invito-fr.htm>.
- Changins, 2011. Des semences de pomme de terre in vitro à récolter en boîte de culture « Agrobox ». <http://www.news.admin.ch/message/index.html?lang=fr&msg-id=42719>
- Corringan G. et Trillion P. 2005. Catalogue des variétés de pomme de terre produites en France. Ed : Carousel, Paris (France). 312P.
- Dalvesco L.L et P.M. Guerra. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64:19 – 25.
- Davies P. 2004. The plant hormones: Their nature, occurrence and function. En: Davis J. (ED) Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Springer, Dordrecht, p1-15.
- Dellaa A. 2013. La culture in vitro. <http://fr.slideshare.net/AhmedDellaa/culture-in-vitro-des-plantes>.

- Demol J., Baudoin J.P. et B.P. Louant. 2008. Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales, Ed presse agronomique de Gembloux, la Belgique, p 581.
- Dodeman V.L., Ducreux G. et M. Kreis. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48N 313 : 1493 -1509.
- Dutuit P. et R. Gorenflot. 2008. Glossaire pour le développement durable : des mots pour les maux de la planète, Ed des archives contemporaines, p 182.
- Flowfast. Flowfast V Hotte à flux laminaire verticale. 2015. <http://www.elscolab.com/fr/produits/flowfast-v-hotte-a-flux-laminaire-verticale>.
- Gamborg O y Shyluk J. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: Thorpe T (Ed): *Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York, p21-44.
- GNIS. 2021. <https://www.semae-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-sauvetageembryonsinterspecifiques/#:~:text=La%20récupération%20de%20l%27embryon,prélèvement%20sous%20une%20loupe%20binoculaire>.
- Guyot M.J., Segulier-Guis M. et D. Duris. 2003. *Terre des cafés*, Ed CIRAD, p 141.
- Isac V., Popescu A.N. et M. Coman. 1994. Studies on plant regeneration from tissue- derived callus in *Fragaria X ananassa* Duch. In : Schmidts H. et M Kellerhals. *Progress in temperate fruit breeding*. Kluwer Academic Publishers. 395-398 p.
- Jayasree T., Pavan U., Ramesh M., Rao A.V., Reddy J .M.K. et A. Sadanandam. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato.
- Hartmann, H., D.E. Kester, F.T., Davies & R. Geneve., 1997. *Plant propagation principles and practices*. 6<sup>a</sup> ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, U.S.A. 747 p.
- Kone T., Kone M., Kone D., Kouakou T.H., Traore S. et Y.J. Kouadio. 2010. Effet de la photopériode et des vitamines sur la micropropagation du bananier plantain (*Musa AAB*) à partir de rejets écailles de rang. *Journal of Applied Biosciences* 26: 1675 – 1686.
- Krikorian AD. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer, 774–796
- Lê C.L. 1994. Apport de l'électrophorèse dans l'identification des variétés de pomme de terre saines en suisse. *Revue suisse Agric* .26(6),373-379.
- Lepoivre P. 2003. *Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*, Ed De Boeck, p 432.
- López C. 2017. *Micropropagación de tres variedades de caña flecha (Gynerium sagittatum Aubl.)*. Tesis M. Sc. Biotecnología, Universidad de Córdoba, Departamento de Química, Montería.
- Margara F. 1989. *Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse*. Ed INRA Paris 262p.

- Morel G. et R.H. Wetmor. 1951. Ferncallus tissue culture. *Ann.J. Bot.*, 38, 141-143. In: Haïcour R., 2002. Multiplication de plantes herbacées in vitro modèle *Solanum tuberosum* L, Biotechnologie végétale, techniques de laboratoire. Londres, Paris, New york: TEC & DOC., 1-16.
- Murashige T. et F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15, 473–497.
- Ochette C. 2005. Growth, quality and biothecnology, WFP publisher.finland.
- Rousselle P., Yvon R. et J. Crosnier. 1996. La pomme de terre : production, ammélioration, ennemis et maladies. Ed INRA, 640p.
- Saadi A. 1991. Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon 162p.
- Saadi A. et F. Hamdani. 2007. Régénération in vitro du *Scorpiurus muricatus* ssp. *subvillosus* via la caulogenès. *Biotechnologie, Agronomie,Société et Environnement*, Volume 11 (2007) numéro 3. <http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=815>.
- Sama A.E., Simon Z., Nyochembeng L., Tambong T.A., Nezana X. et J.G Wutah. 1998 Culture in vitro et multiplication rapide de plante à tubercules et racines au Caméroune. *Cahier Agriculture*. 7 : 63-66. In : Hamdani F.Z. 2001. Régénération via l'organogénèse Ou L'embryogenèse somatique chez le *Scorpiurus*. Univeristé Hassiba Ben Bouali de Chlef - Magister.
- Samuel2014. Qu'est-ce qu'une hotte à flux laminaire? <http://champignonscomestibles.com/author/admin>
- Santner A; Calderon-Villalobos L.I et Estelle M., 2009 - Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* 5: 301–307.
- Schmid J. et E. Keller. 1981. Nouvelles possibilités pour l'amélioration et la multiplication des plantes : les cultures de tissus et de cellules. *Revue Suisse Agriculture*. 13(6): 265-272. In :Hamdani F.Z. 2001.Régénération via l'organogénèse Ou L'embryogenèse somatique chez le *Scorpiurus*. Univeristé Hassiba Ben Bouali de Chlef – Magister.
- Soltener D. 2005. Les grandes productions végétales. Collection Scientifique des technologies agricoles 20eme édition, p 472.
- Staritsky G. et G.A.M. Van Hassel. 1980. The synchronized mass propagation of *Coffea canephora* in vitro. *Proc. 9. Int. Science Colloquium on Coffea*, Paris, 597– 602.
- Svobodova H., Albrechtova J., Kumstyrova L., Lipavska H., Vagner M. et Z. Vondrakava. 1999. Somatic embryogenesis in Norway spruce.
- Tchetché Y., Bouo-Bella D.F.X., Sallanon H., Coudret A. et H. Isaka. 2008. Modélisation des conditions d'environnement des bocalux de culture in vitro : bocalux avec agar et vitroplants. *Afrique SCIENCE* 04(1) (2008) 154 – 166.

- Unnikrisham S.K., Mehta A.R. et P.N. Bhatt. 1990. Abscisic acid induced high frequency embryogenesis from *Sapindus trifoliatus* leaves :89-94. *Acta Horticulturae* 280. In vitro culture and Horticultural breeding.
- Vidalis H., Augé R., Beauchesne G., et al. 1989. La culture in vitro et ses applications horticoles. Lavoisier, Tec et Doc (ed). 7- 24.
- Webb K.J., Osifo O.E. et G.G. Henshaw. 1983, Shoot regeneration from leaflet discs of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). *Plant Sci. Lett.* 30, 33-47. 26.
- Wheeler V.A, Evans N.E., Foulger D., Webb K.J., Karp A., Franklin J. et S.W.J. Bright. 1985, Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants. *Ann. Bot.* 55, 309-312.
- Zhang, Y., X. Jin, Z. Ouyang, X. Li, B. Liu, L. Huang, Y. Hong, H. Zhang, F. Song and D. Li. 2015. "Vitamin B6 contributes to disease resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*."

