

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE D'ORAN-MOHAMED BOUDIAF
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

POLYCOPIE DE COURS

MODULE

BIOTECHNOLOGIE ET GÉNIE GÉNÉTIQUE

(MASTER II BTV)

Présenté par

Mme ABDEDDAIM Katia Khadidja

INTRODUCTION

Le présent polycopié constitue un support de cours destiné aux étudiants de master II spécialité biotechnologie végétale. Il vise à leur transmettre les moyens d'amélioration des plantes par des méthodes de technologies nouvelles après avoir acquis les techniques classiques de reproductions sexuée et végétative.

Les méthodes biotechnologiques basées sur la culture in vitro, le transfert de gènes et la connaissance du patrimoine chromosomique permettent d'augmenter et d'améliorer la production végétale tout en l'adaptant à divers environnements et développer une meilleure résistance aux maladies et participent à la création de nouvelles espèces ou variétés.

Le contenu de ce cours a pour objectif également de faciliter la compréhension des méthodes de génie génétique pour une application ultérieure sur le terrain.

Contenu de la matière

Chapitre I. Culture des protoplastes et ses produits

Chapitre II. Recherche d'une nouvelle variabilité par recombinaison de génome d'espèces différentes ou très éloignées

Chapitre III. Amélioration d'une espèce polyploïde

Chapitre IV. Les haplométhodes

Chapitre V. La variation somaclonale et causes génétiques

K.ABDEDDAIM

SOMMAIRE

Chapitre I : CULTURE DES PROTOPLASTES ET SES PRODUITS : HYBRIDATION SOMATIQUE ET INTERETS EN SELECTION

I. Hybridation somatique.....	1
1. Définition.....	1
II. Etapes importantes de l'hybridation somatique.....	1
1. Protoplastes.....	1
2. Fusion.....	3
II. Intérêt en sélection.....	4

CHAPITRE II : RECHERCHE D'UNE NOUVELLE VARIABILITE PAR RECOMBINAISON DE GENOME D'ESPECES DIFFERENTES OU TRES ELOIGNES

I. Gestion des ressources des géotypes travaillés.....	5
II. Modification des géotypes issus des sources.....	5
III. Sélection dans la diversité créée et stabilisation des types retenus.....	6
IV. Multiplication en nombre du géotype retenu.....	6

CHAPITRE III : AMELIORATION D'UNE ESPECE POLYPLOIDE

I. Définition de la polyploïdie.....	7
a. Division mitotique normale.....	7
b. Apparition de la polyploïdie.....	8
c. Exemples de polyploïdie.....	9
II. Stérilité des hybrides.....	10
III. Obtention d'hybrides fertiles par polyploïdie.....	11
IV. Polyploïdisation.....	12

CHAPITRE IV : LES HAPLOMETHODES

I. Tissus sporogènes.....	13
II. Divers cas d'obtention de plantes haploïdes.....	14
1. Polyembryonie	14
2. Hybridations interspécifiques	15
3. Traitement des gamétophytes par irradiation.....	15
III. Androgénèse in vitro.....	15
a. Effet du génotype	16
b. Etat physiologique de la plante donneuse	16
c. Stade de prélèvement des anthères.....	17
IV. Gynogénèse in vitro.....	18
V. Variations liées aux techniques d'haploïdisation.....	20
CHAPITRE V : LES VARIATIONS SOMACLONALES ET CAUSES GENETIQUES	
I. Mise en évidence de la variabilité issue de culture in vitro.....	21
II. Type d'hérédité et niveau biologique impliqué : diagnostic génétique.....	22
CONCLUSION	23
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	24

I. Hybridation somatique

1. Définition

La reproduction sexuée est l'un des mécanismes les plus stricts que les processus évolutifs ont mis en place pour empêcher les flux génétiques entre les espèces et même à l'intérieur de l'espèce. Des types de fécondations bien précis autorisent ou non l'allogamie ou l'autogamie définissant ainsi la structure génétique plus ou moins hétérozygote du génotype. En effet la méiose implique l'appariement des chromosomes homologues et élimine tous remaniements profonds des chromosomes en contrôlant ainsi l'homogénéité de l'espèce.

A partir de manipulations cellulaires permettant l'obtention d'agrégations de cellules débarrassées de leurs parois pecto-cellulosiques il en résulte une fusion des éléments nucléaires et cytoplasmiques : c'est ce qu'on appelle l'hybridation somatique (1973).

Melchers (1978) montra ensuite que cette fusion était possible entre protoplastes différents (exemple de la tomate et la pomme de terre) transgressant ainsi les frontières de l'hybridation sexuée.

II. Etapes importantes de l'hybridation somatique

1. Protoplastes

Hanstein (1880) fut le premier à utiliser le terme de protoplaste (Protos=premier et plastos=formé) pour décrire la matière vivante contractée par la plasmolyse et limitée par le plasmalemme.

Pour Brenner (1958), le terme botanique de protoplaste désigne la partie de la cellule située à l'intérieur de la paroi cellulaire. Aujourd'hui la signification de ce terme a été précisée ; elle tient compte des caractéristiques physiologiques et structurales de ces entités cellulaires (Cocking, 1965).

Dans la cellule végétale, la membrane plasmique ou plasmalemme est doublée par une paroi constituée de fibres de cellulose et de pectine. C'est par des enzymes de type cellulase et pectinase qu'on pouvait attaquer les fibres pecto-cellulosiques et dissocier les tissus végétaux mettant ainsi à nu la

membrane plasmique de chaque cellule. Divers explants sont utilisables tel que : feuilles, cotylédons, hypocotyles... Il est également possible de partir de matériel déjà différencié : cals ou suspensions cellulaires. Malgré la diversité des origines possibles, le mésophylle foliaire reste la source de protoplastes la plus utilisée. Chaque unité cellulaire dénudée apparaît sous forme sphérique appelé protoplaste. Ex : chez la luzerne, on obtient ainsi $12 \cdot 10^6$ protoplaste/g de feuille. Les protoplastes récupérés par centrifugations et lavages puis mis en bonnes conditions de survie, reconstituent très vite leur paroi pecto-cellulosique (en quelques heures on voit apparaître les premières fibres).

La totipotence peut être maintenue dans les cals issus de protoplastes et s'exprime dans un milieu de régénération approprié où le cal donne des formations méristématiques qui se développent en jeunes plantes ou en embryons somatiques qui donneront des plantules.

2. Fusion

On appelle fusion l'agrégation de 2 ou plusieurs protoplastes (Fig.1).

La fusion se produit d'une manière aléatoire. Si on considère que le mélange contient en quantité égale deux espèces différentes A et B, on doit observer $\frac{1}{4}$ d'autofusion AA, $\frac{1}{2}$ d'hétérofusion AB et $\frac{1}{4}$ d'autofusion BB.

Lors de l'accolement des protoplastes, l'ensemble du contenu cellulaire est mis en commun : on peut donc aboutir à l'addition totale des 3 compartiments héréditaires : nucléaire, mitochondrial et chloroplastique. Cette addition totale accroît le niveau de ploïdie de l'unité résultante. Cependant des phénomènes peuvent perturber le déroulement de l'agrégation :

1- les échanges ne sont pas toujours totaux : addition incomplète

2- dès la fusion réalisée, des compétitions et des éliminations se mettent en place

3- Lorsque les noyaux se sont additionnés partiellement ou en totalité, on parle d'hybride somatique ; s'il ne subsiste que l'un des noyaux parentaux avec un cytoplasme composé ou recombiné on parle de cybride (cytoplasme hybride).

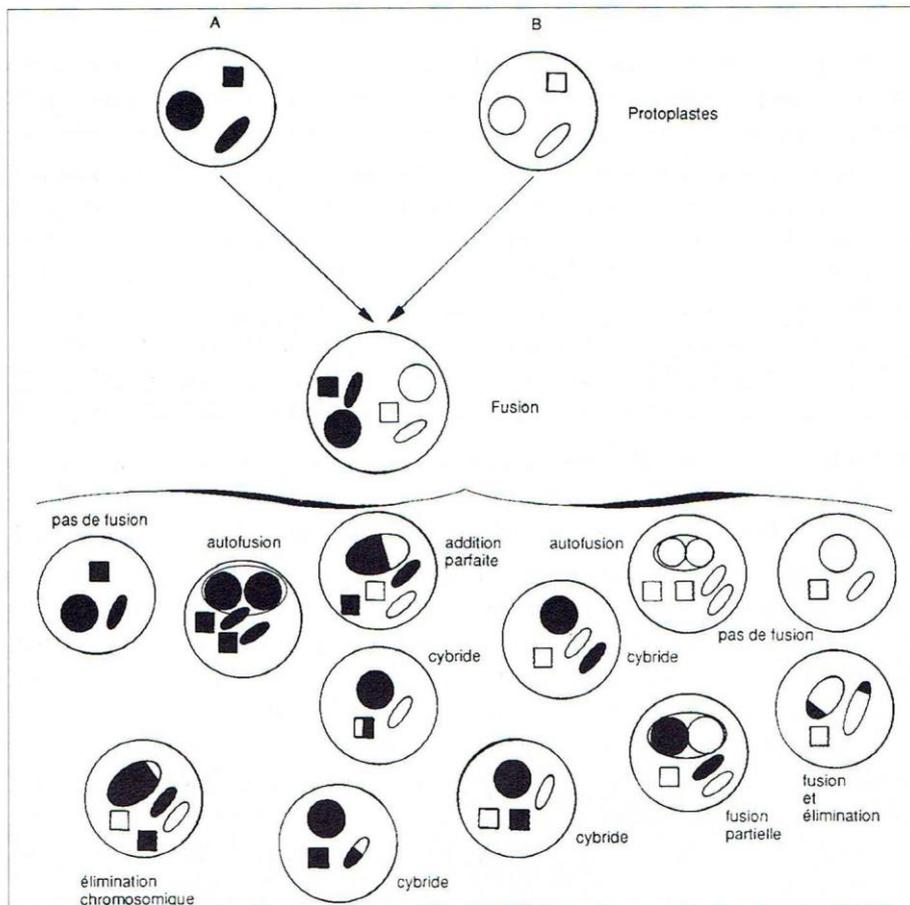


Fig.1. Diversité des produits d'une hybridation somatique

II. Intérêt en sélection

Le protoplaste, ayant perdu tout signal relationnel avec le tissu dont il est issu et tout repérage inscrit dans la paroi, se trouve dans l'incapacité de reconnaître le partenaire : on peut donc fusionner une cellule animale et une cellule végétale, ou un protoplaste de monocotylédone avec une dicotylédone, on peut aussi introduire des microplastes consistant en quelques organites cytoplasmiques ou des globules lipidiques ou une protéine. On peut enfin par électroporation faire pénétrer des fragments d'ADN et des plasmides.

Le protoplaste est un excellent récepteur, son seul défaut réside dans la faible probabilité de régénération.

L'amélioration des plantes se base sur des opérations génétiques nécessaires à la création de variétés et qui se déroulent en 4 phases :

1- Gestion des ressources dans lesquels sont choisis les génotypes travaillés

2- Remaniements dans les génotypes-sources entraînant des ségrégations ou des diversifications

3- Sélection dans la diversité créée s'accompagnant d'une stabilité des types retenus : on appelle cette phase sélection stabilisatrice

4- Opération aboutissant à la multiplication en nombre du génotype sélectionné

I. Gestion des ressources des génotypes travaillés

Le matériel de départ pour un améliorateur consiste en variétés déjà existantes. Grâce aux biotechnologies tout gène du règne vivant peut être accessible et par des manipulations moléculaires, transféré dans une espèce donnée.

Lors de cette phase, la gestion des ressources est accompagnée d'une évaluation agronomique et génétique des individus stockés.

II. Modification des génotypes issus des sources

Au cours de cette phase, on utilise généralement les génotypes extraits des sources comme géniteurs :

1. Hybridations sexuées intraspécifiques : Les génotypes sont croisés à l'intérieur d'une même espèce avec un ou plusieurs partenaires qui apportent des qualités complémentaires ou qui intensifient les performances.

Lorsque la caractéristique à transférer est génétiquement simple, on opère par des séries de croisement de retour sur la variété à améliorer (Back cross en série).

2. Hybridations sexuées interspécifiques : Il n'existe pas toujours à l'intérieur de l'espèce travaillée les caractéristiques que l'on désire introduire dans la variété à créer. Dans ce cas on fait fréquemment appel à des plantes issues d'espèces voisines. Ces hybridations entre espèces sont réalisées avec des formes spontanées très résistantes. Cependant ces hybridations sont difficiles car les embryons avortent fréquemment, la culture *in vitro* est maintenant la voie de sauvetage.

3. Hybridations somatiques : Cette opération est appelée fusion de protoplastes, elle peut avoir lieu entre protoplastes de génotypes différents à l'intérieur d'une même espèce mais aussi entre des groupes très éloignés. Lorsque les fusions entre organismes sont très éloignées la régénération du produit de fusion est impossible.

4. Transfert de gènes : obtention de plantes transgéniques grâce aux développements des connaissances sur le code génétique et la régulation de son expression.

III. Sélection dans la diversité créée et stabilisation des types retenus

La voie conventionnelle de sélection et de fixation d'une nouvelle variété nécessite beaucoup de temps. Exemple pour le blé ou l'orge la durée de création est de 10 à 15 ans et la durée de commercialisation est de 5 ans.

IV. Multiplication en nombre du génotype retenu

Lorsqu'un sélectionneur a élaboré un génotype assez proche de son idéotype, il lui reste encore à le reproduire en quantité suffisante pour satisfaire la demande du marché. Ce passage s'accompagne d'un retour au mode de reproduction naturel de l'espèce.

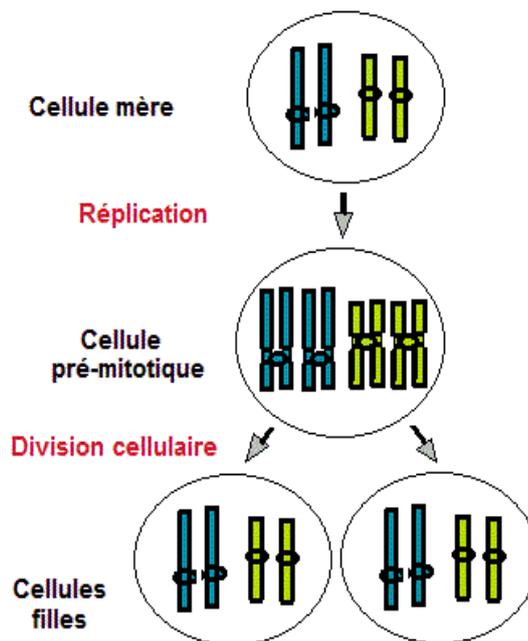
I. Définition de la polyplôïdie

Un bon nombre d'espèces végétales cultivées et sauvages sont polyplôïdes, c'est-à-dire qu'elles ont subi une ou plusieurs duplications des chromosomes durant leur évolution.

La polyplôïdie peut apparaître spontanément suite à un accident de la mitose (réplication de l'ADN sans séparation des cellules filles).

Depuis le milieu du XX^{ème} siècle, des substances chimiques ont été utilisées pour provoquer la polyplôïdie.

a. Division mitotique normale

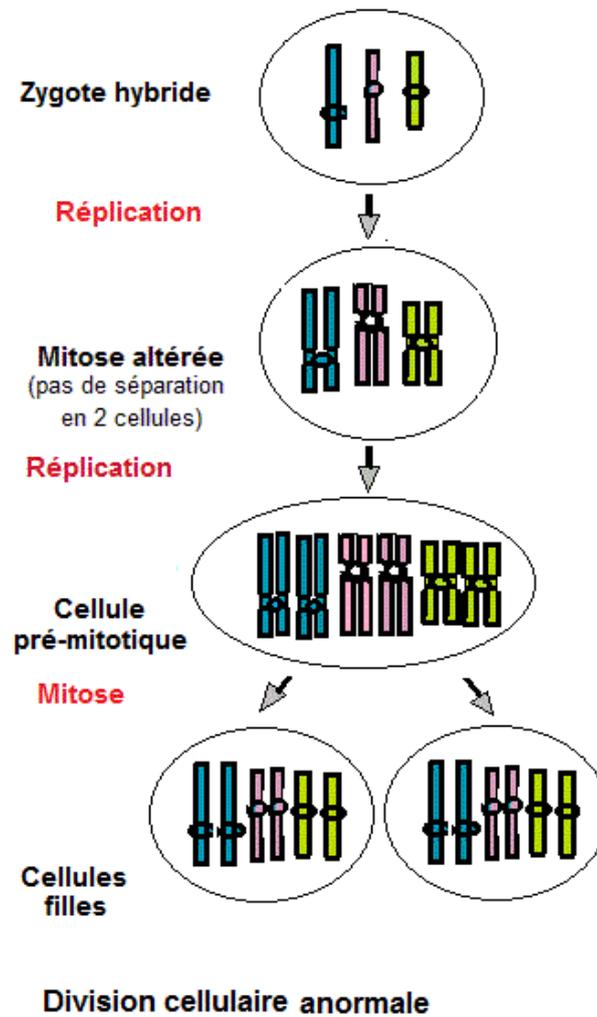


Division cellulaire normale

- Au départ chaque cellule porte deux copies de chaque chromosome (une copie de chaque parent)
- Avant la mitose, les chromosomes sont répliqués
- Durant la mitose, les chromosomes sont partagés entre les deux cellules filles
- Les cellules filles portent donc le même nombre de chromosomes que la cellule mère

b. Apparition de la polyploïdie

- Une cellule tétraploïde (4 copies de chaque chromosome) apparaît suite à une mitose sans division cellulaire.
- Chacun des chromosomes est répliqué avant la prochaine mitose
- Les cellules polyploïdes sont généralement plus volumineuses que les diploïdes
- Les plantes polyploïdes donnent généralement des fruits plus gros que les plantes diploïdes



c. Exemples de polyploïdie

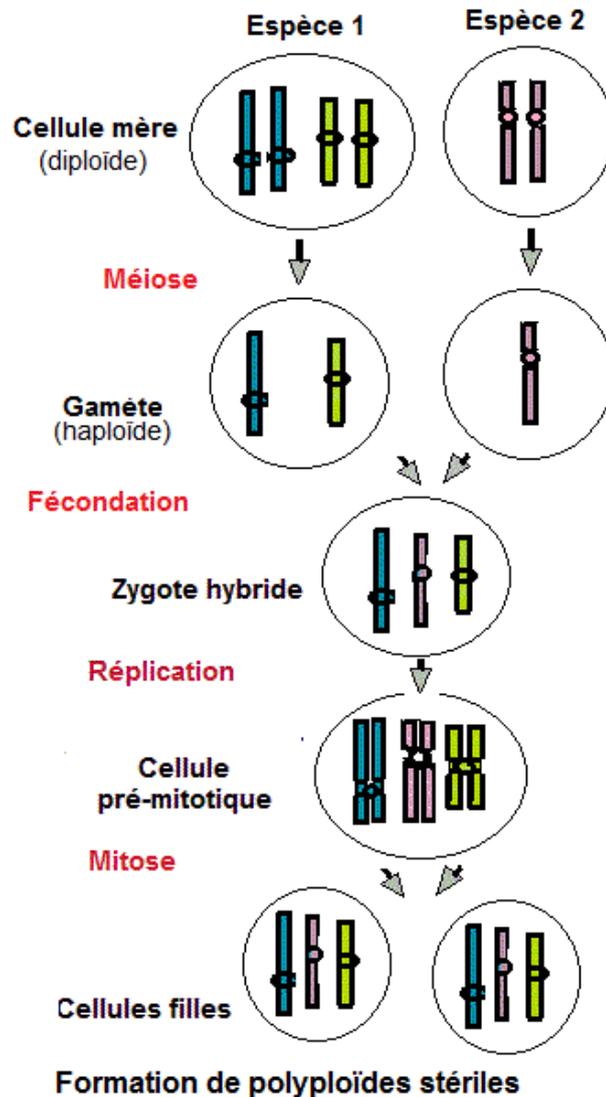
Les premières espèces de blé cultivé apparaissent il ya 10.000 ans. Il s'agit de l'engrain et l'amidonnier.

- l'engrain (*Triticum monococcum*) est diploïde et porte 7 paires de chromosomes

- l'amidonnier (*Triticum dicoccum*) est tétraploïde et porte 14 paires de chromosomes

Le froment est hexaploïde, il résulte d'une hybridation entre l'amidonnier (tétraploïde) et une variété de blé diploïde (*Triticum tauschii*)

II. Stérilité des hybrides

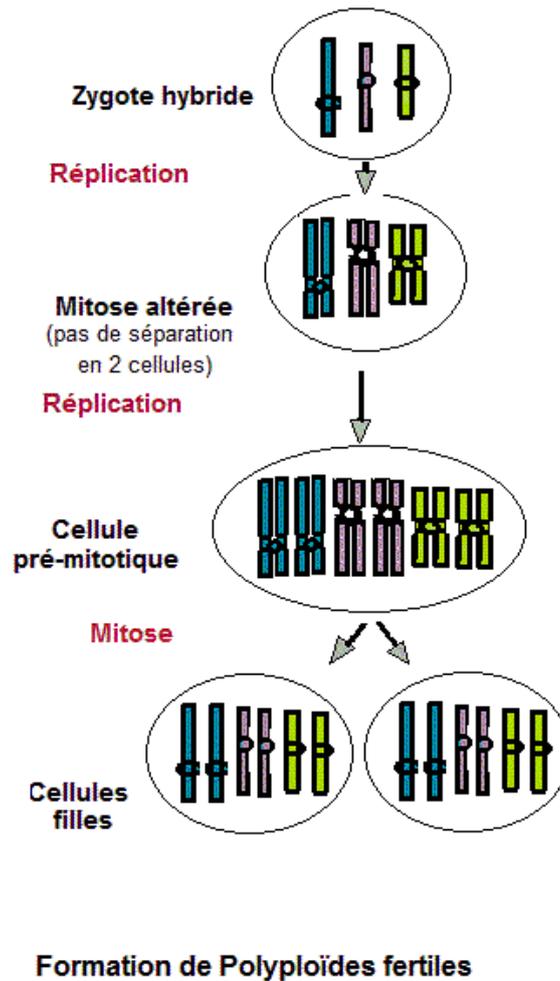


On peut réaliser des croisements entre espèces voisines mais les hybrides ne sont généralement pas fertiles.

- les cellules hybrides peuvent se multiplier par mitose et la plante peut croître
- la méiose chez l'hybride ne fonctionne pas car il n'y a qu'une copie de chaque chromosome des deux espèces parentales
- l'hybride est donc généralement stérile

Ex : le blé et le seigle peuvent être croisés mais leur descendance est stérile.

III. Obtention d'hybrides fertiles par polyploïdie



Si une hybridation est suivie d'une polyploïdisation, les cellules contiennent deux copies des chromosomes de chacune des espèces parentes. Elles sont donc susceptibles d'entrer en mitose, ceci permet d'obtenir des hybrides fertiles entre espèces voisines.

IV. Polyploïdisation

La polyploïdie peut être utilisée de différentes façons pour la sélection de plantes cultivées.

- Autopolyploïdie : dupliquer les chromosomes d'une plante afin d'obtenir une augmentation de chromosomes
- Allopolyploïdie : rendre fertile des hybrides interspécifiques afin de combiner leurs propriétés.

K.ABDEDDAIM

I. Tissus sporogènes

Les tissus sporogènes vont donner naissance à des structures bien différenciées : les gamétophytes. Ces organes portent les gamètes ou cellules reproductrices : il existe donc un gamétophyte mâle et femelle.

Dans un bouton floral au stade jeune, à l'intérieur des anthères, des files cellulaires donnent naissance aux sacs polliniques. Dans chacun de ces derniers, se différencie sous l'épiderme une assise mécanique puis 2 couches sous-jacentes, les assises nourricières qui serviront au développement des cellules internes. Celles-ci sont les cellules mères des grains de pollen qui vont chacune, à la suite de la méiose, produire 4 microspores haploïdes.

Il existe donc un noyau haploïde mâle dans la jeune microspore. Ce noyau se divise pour donner naissance au noyau reproducteur et au noyau végétatif. Cette structure constituera le pollen mûr chez les espèces dites à pollen binucléé (Solanacées, Fabacées, Rosacées...). Chez les espèces dites à pollen trinuéé (Astéracées, Poacées, Crucifères...) le noyau reproducteur se divise et le grain de pollen mûr comprend 2 cellules reproductrices et 1 cellule végétative. De même dans le jeune ovule sous les téguments, on trouve une masse parenchymateuse, le nucelle. Dans celui-ci une cellule située près du pôle micropylaire va subir la méiose, c'est la cellule mère du sac embryonnaire.

Normalement les tissus sporogènes sont destinés à participer à la fécondation, mais il arrive qu'avant la méiose, on puisse régénérer des plantes à partir des tissus qui différencient les cellules mères : on dit qu'il ya apomixie.

Quand ce sont des tissus ayant subi la méiose qui, avant la fécondation, sont à la source de régénérations, on parle, d'androgénèse pour les microspores, de parthogénèse pour l'oosphère, d'apogamie pour les synergides, les antipodes ou les noyaux polaires. L'ensemble de la parthénogénèse et de l'apogamie est plus fréquemment désigné par le terme gynogénèse.

On peut donc à partir de tissus ayant subi la méiose, régénérer in vitro des structures haploïdes à condition d'opérer avant la fécondation.

On peut aussi obtenir des régénérations haploïdes après fécondation dans le cas où l'un des deux stocks parentaux est éliminé (il ne sert alors que d'inducteur). D'autres situations donnent aussi des plantes haploïdes dans le cas de gémellarités ou polyembryonie.

II. Divers cas d'obtention de plantes haploïdes

1. Polyembryonie

Il existe chez certaines plantes (les citrus et les manguiers) une polyembryonie naturelle (Fig.1) : à côté de l'embryon sexué résultant de la fécondation se développent dans la graine plusieurs embryons dits adventifs ou nucellaires car ils dérivent de massifs cellulaires développés à partir du nucelle : ces embryons sont des copies végétatives de la plante mère, contrairement à l'embryon sexué. Mais chez les espèces, il est très rare (1/1000) que deux embryons se développent et donnent des semences à 2 plantules ; souvent l'une de ces plantules est moins vigoureuse et haploïde, son développement provient d'une induction de l'une des 2 synergides qui parallèlement à l'oosphère fécondée se différencie en un embryon apogamique. Pour l'amélioration de certaines espèces, on peut utiliser cette haploïdisation spontanée.

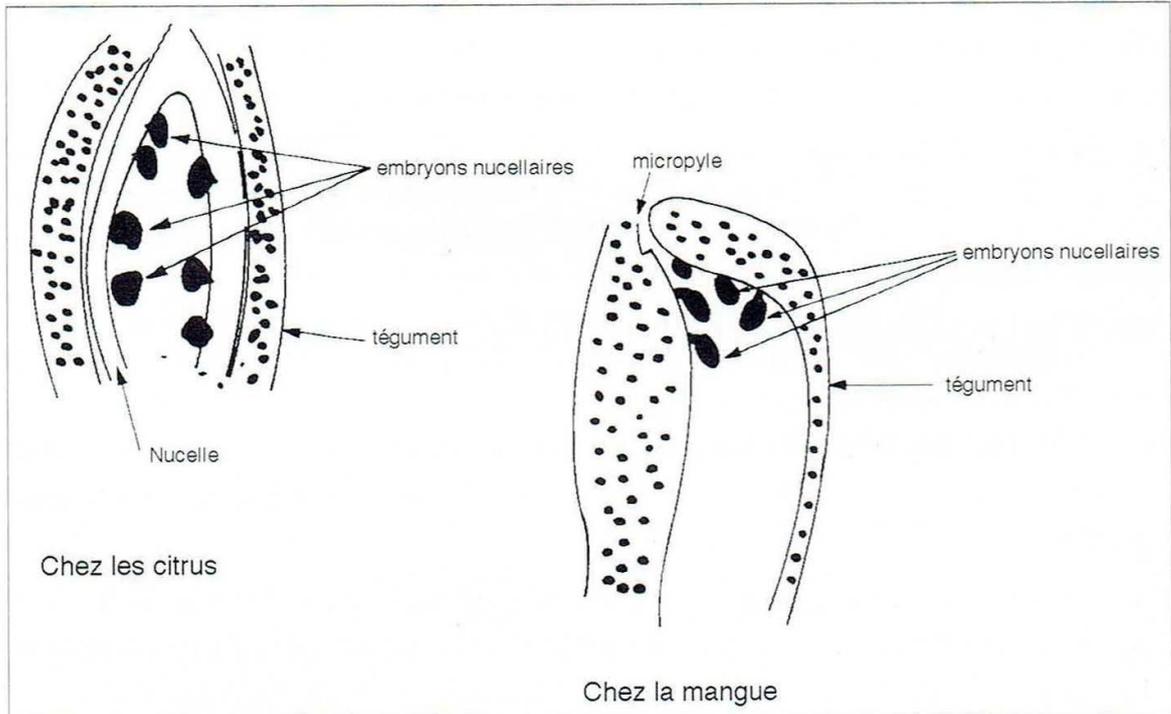


Fig.1. Polyembryonie naturelle

2. Hybridations interspécifiques

Dans certains croisements, l'incompatibilité ne se traduit pas au niveau de la reconnaissance pollen-stigmate, ni dans les phases ultérieures de la croissance du tube pollinique et de la rencontre gamète-oosphère, mais au stade de leur fusion au cours des premières mitoses.

3. Traitement des gamétophytes par irradiation

Le processus normal de la différenciation des spermatozoïdes dans le gamétophyte mâle peut être perturbé de manière à maintenir un pouvoir inducteur de l'embryogénèse en inhibant le pouvoir fécondant. En neutralisant l'un des deux spermatozoïdes, il arrive que seuls les noyaux polaires soient fécondés, ce qui engage alors le développement de l'albumen ; par entrainement l'oosphère peut alors se diviser sans fécondation et donner un embryon haploïde parthénogénétique. On pourra alors mener son développement à terme en le prélevant et en le cultivant *in vitro*. L'irradiation par des rayons γ est l'une des voies les plus expérimentées pour obtenir de telles interventions sur le gamétophyte mâle.

III. Androgénèse *in vitro*

Les premiers travaux ont été réalisés en 1964 par Guha et Maheshwari sur la culture *in vitro* des cellules sexuelles mâles de *Datura innoxia* et la régénération de plantes entières viables et haploïdes d'origine exclusivement paternelle. Cette technique a été ensuite adaptée au tabac.

Un certain nombre de cellules haploïdes ainsi traitées peut aboutir soit directement soit après des transferts dans des milieux adéquats à une plante haploïde viable issue d'un gamète paternel.

Le taux de réussite est très variable mais souvent très bas par rapport au nombre des microspores. C'est pourquoi les chercheurs se sont attachés à l'étude des paramètres qui influent sur le déroulement de chaque phase :

- Effet du génotype
- Etat physiologique de la plante donneuse
- Stade de prélèvement des anthères

a. Effet du génotype : Les réussites sont fortement liées à la famille végétale expérimentée tel que les Solanacées et certaines Poacées, certains genres comme *Datura* ou *Nicotiana* donnent de bons résultats à l'intérieur des Solanacées alors que *Lycopersicon* s'avère réfractaire. Chez les Poacées, le riz répond facilement aux traitements androgénétiques alors que le maïs reste difficile. Des facteurs génétiques sont donc liés aux processus de déroulement de l'androgénèse puisqu'on a pu mettre en évidence une héritabilité de l'aptitude.

b. Etat physiologique de la plante donneuse : Les conditions de culture des plantes sur lesquelles on prélève les anthères paraissent jouer un rôle majeur. Des plantes jeunes, végétativement vigoureuses et en croissance active donnent des résultats meilleurs ; aussi certaines périodes, correspondant à l'époque naturelle de floraison de l'espèce, fournissent des anthères plus réactives. Les traitements phytosanitaires ont en général un effet dépressif sur la potentialité des anthères. Il existe donc des conditions environnementales de culture qui

définissent, chez la plante donneuse, un état physiologique plus ou moins favorable, la position des rameaux floraux intervient sur les taux de réussite.

c. Stade de prélèvement des anthères :

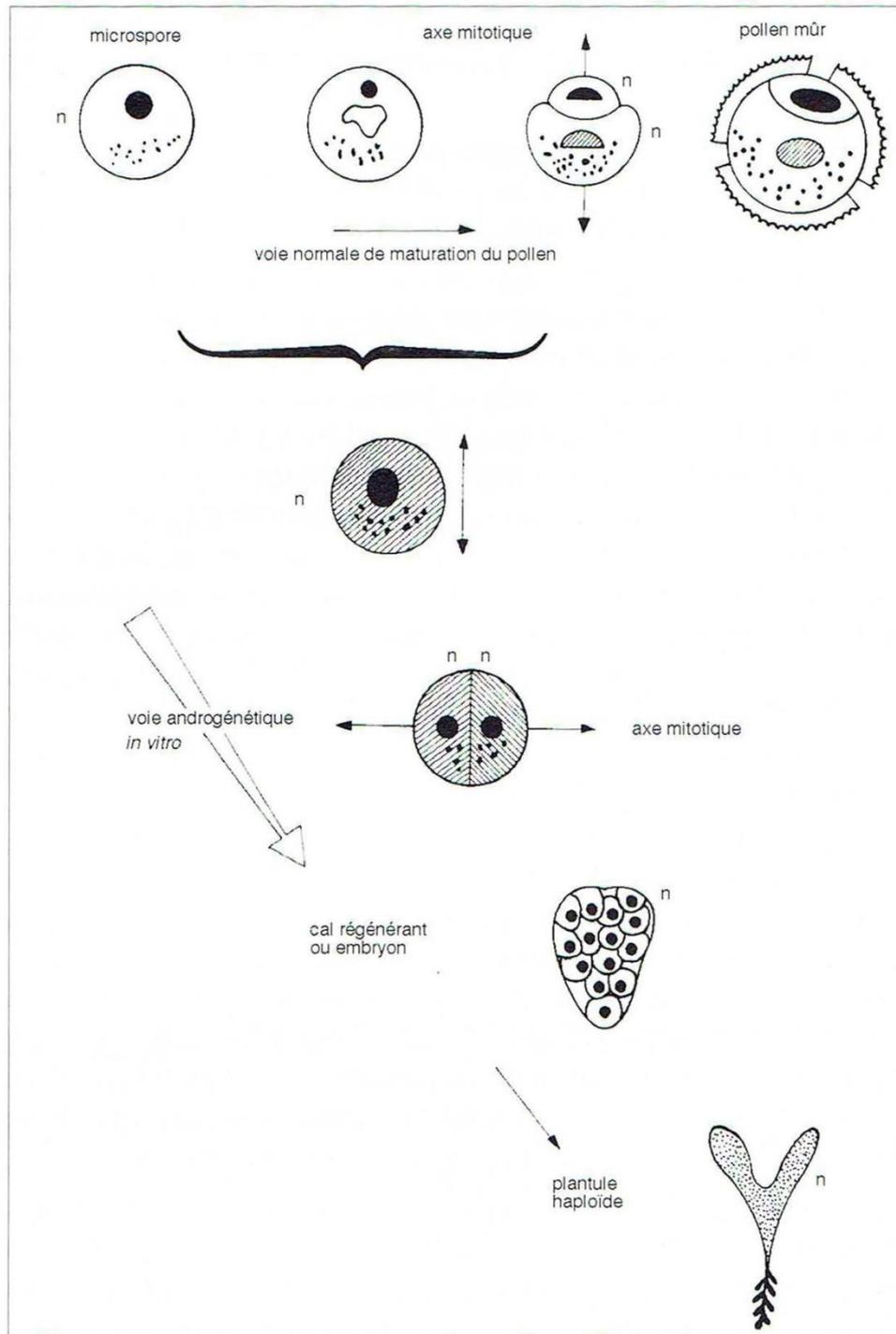


Fig.2. Maturation de la microspore et déviation du programme de différenciation lors de l'androgénèse *in vitro*

Lors de la maturation normale d'un grain de pollen, la méiose produit des tétrades haploïdes qui évoluent en jeune microspore uninucléée ; ce noyau haploïde entreprend alors une mitose dont l'axe fusorial est nord-sud. Cette mitose produit alors deux cellules de taille très inégale : une cellule reproductrice au pôle « nord » de faible volume à noyau très condensé et cytoplasme restreint. En revanche, au pôle « sud » se développe une large cellule végétative à noyau diffus et à cytoplasme abondant.

Lorsque cette différenciation est ainsi marquée entre cellule reproductrice et cellule végétative, le prélèvement des anthères pour culture *in vitro* et induction d'une androgénèse est généralement un échec. C'est le stade où la jeune microspore uninucléée va entrer en mitose qui constitue l'optimum pour la réussite de l'androgénèse (Fig.2).

Exemple : Chez *Datura* (Noreel, 1970) a observé que durant la culture *in vitro*, un certain nombre des microspores possédaient lors de la mitose un axe fusorial « est-ouest » ; les cellules produites ont alors des volumes semblables appelées cellules embryonnaires. Ces cellules indifférenciées développent des nodules sphériques dans l'anthère qui donnent ensuite des embryons cordiformes ou des formes proches des cals qui placées sur un milieu de régénération aboutissent à de jeunes plantes haploïdes.

Vu que la réorientation vers l'androgénèse est toujours délicate, il est utile de penser à des traitements ralentissant le processus de différenciation des microspores en grains de pollen tel que :

- des traitements par le froid
- des traitements par des températures élevées
- traitement par un gamétocide en pulvérisant la plante donneuse au moment de la méiose (Picard et al., 1975)

La composition des milieux de culture varie d'un auteur à l'autre et d'une espèce à l'autre.

IV. Gynogénèse *in vitro*

La régénération de plantes haploïdes à partir des cellules sexuelles semble plus logique par la voie femelle, puisque l'oosphère est destinée naturellement à devenir embryon. Cependant toutes les tentatives de régénérations de plantes à partir de la culture *in vitro* d'un ovule non fécondée avaient échoué. Ce n'est qu'en 1976 que les premiers résultats ont été obtenus en cultivant des ovaires d'orges non pollinisés issus du développement du sac embryonnaire.

a. Procédure de la gynogénèse : Le but est d'obtenir un développement parthénogénétique de l'oosphère ou une apogamie à partir des autres cellules (n) du sac embryonnaire. On prélève donc l'ovaire ou l'ovule dans la fleur non fécondée lorsque le sac embryonnaire est bien développé c'est-à-dire le plus près possible du stade de réceptivité des gamètes mâles. Les ovaires ainsi prélevés sont placés dans des milieux qui favorisent le développement des tissus haploïdes. Après 1 à 6 mois, l'oosphère parfois les antipodes et plus rarement les synergides se divisent et donnent des embryons différenciés qui se développent en jeunes plantes.

Le tableau 1 rapporte le gain de temps et les étapes d'obtention d'une plante à partir des cellules mères des gamètes.

Tableau 1. Calendrier des opérations dans la méthode généalogique et l'haplométrie

Sélection généalogique		Haplométrie	
Printemps		Réalisation de l'hybridation	
Année 1		Semis de la F ₁	
Production de la F ₂ (à condition d'avoir produit la F ₁ à contre-saison)		Culture des anthères Production des haploïdes Doublement à la colchicine	
Année 2	F ₂ → F ₃ sélection	Multiplication des lignées obtenues	
Année 3	F ₃ → F ₄ sélection	Choix entre lignées	
Année 4	F ₄ → F ₅ sélection	Essais de rendement dépôt pour inscription au catalogue	
Jusqu'en année 10	↓ suite de la fixation et des sélections		

Ko

V. Variations liées aux techniques d'haploïdisation

Les plantes haploïdes devaient après doublement chromosomique redonner la variété de départ ; cependant on pourrait obtenir une forte fréquence d'individus très distincts par leur taille, couleur....

Ces variations ont pu être analysées : les unes proviennent de mutations, les autres de remaniements chromosomiques. Chaque famille présente en fait un comportement qui lui est propre.

K.ABDEDDAIM

La régénération à partir de cultures *in vitro* est l'un des outils de plus en plus utilisés soit pour la multiplication soit pour la conservation ou dans le cadre des biotechnologies, mais au cours de ces régénérations il arrive que de façon surprenante de nouveaux phénotypes apparaissent appelés : vitrovariants ou vitrovariation.

I. Mise en évidence de la variabilité issue de culture *in vitro*

Le développement de plantes entières à partir de méristèmes amène rarement aux variations alors que la régénération de bourgeons à partir de calcs primaires ou de souches sont sources de variabilité.

La terminologie désignant les nouveaux types obtenus est le terme de « phénovariant » (Sibi, 1971). En, 1981 Larkin et Scrowcroft donnent l'expression de « variation somaclonale ».

Les vitrovariations obtenues peuvent se situer à plusieurs niveaux phénotypiques : cytologiques, morphologique dont les causes sont :

- les mutations
- les crossing over
- les interactions
- les incompatibilités

In situ, une cellule fait partie d'un organe, intégrée à l'ensemble de la plante. Son expression et sa régulation sont programmées et corrélées avec précision avec l'ensemble. Un entrenœud, un bourgeon préformé, un apex différencié ou un gamétophyte sont déjà programmés donc peu de modifications sont observées. Au contraire, les tissus excisés, les cellules dissociées et les protoplastes donnent une large variabilité d'autant que leur développement passe par un stade cal.

II. Type d'hérédité et niveau biologique impliqué : diagnostic génétique

Un matériel biologique convenable pour une approche expérimentale doit inclure les points suivants :

1. Une espèce diploïde c'est-à-dire possédant des critères génétiques qui suivent des lois classiques mendéliennes.
2. Une structure génétique homozygote, un matériel génétique fixé
3. Un système floral permettant d'effectuer facilement des croisements ou des auto-fécondations
4. Un nombre de chromosomes assez faible
5. Un matériel où l'on maîtrise in vitro la formation de cals et les conditions de régénération.

La culture des tissus in vitro est entreprise après vérification du comportement homozygote des génotypes.

Les étapes des analyses sont les suivantes :

- Etudes cytologiques : dénombrement chromosomique
- Analyse des descendances : analyses statistiques effectuées pour des caractères qualitatifs et quantitatifs
- Hypothèse épigénétiques c'est-à-dire modifications non permanentes : ces résultats infirment l'hypothèse de doubles mutations.

CONCLUSION

La régénération de plantes in vitro après passage par cals donne naissance à un large spectre de variations. Les nouveaux phénotypes observés sont le principal centre d'intérêt. La possibilité d'une transmission génétique de nouveaux caractères est fonction du type de changement qui s'opère au sein d'une cellule destinée à régénérer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DEMARLY Y. et SIBI M., 1996. Amélioration des plantes et biotechnologies. 2è éd., John Libbey, France, 151 p.

GALLAIS A. et BANNEROT H., 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées. INRA éd., Paris, 759p.

GALLAIS A., 2011. Méthodes de création de variétés en amélioration des plantes. Quae éd., 525 p.

MANSOURI S., KOBALISSI A., NZIENGUI H., FAKIRI M., SHEKAFANDEH A. et SIBI M. L., 2005. In vitro gynogenesis in some varieties of durum wheat of Maghreb and Middle east (*Triticum durum* L.) as a tool for regenerating plants from salt tolerant callus lines. *Geo-Eco-Trop*, 29 :77-88. Consulté le 12/11/2016 sur [www. geoecotrop.be](http://www.geoecotrop.be).

ROLAND J. C. ET F., 1987. Atlas de biologie végétale. 2. Organisation des plantes à fleurs. 4è éd., Masson, Paris, 117p.

TOURTE Y., 2002. Génie génétique et biotechnologies : Concepts, méthodes et applications agronomiques. Dunod éd., 256 p.

www.biotech-ecolo.net Consulté le 25/10/2015.