



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES**



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Titre :

Initiation à la culture *in vitro*

Présenté par : Zakari Zineb

Encadré par :

- Pr. Belkoura.I (E.N.A-Meknès)
- Pr. Mikou.K (FST-Fès)

Soutenu le : 08/06/2017

Devant le jury composé de :

- M^{me} Belkoura.I (E.N.A-Meknès)
- M^{me} Mikou.K (F.S.T-Fès)
- Mr Lazraq.A (F.S.T-Fès)

Année universitaire : 2016/2017

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail :

A mes chers parents, sources de tendresse, noblesse et d'affection : en témoignage de ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur. Aujourd'hui, je dépose entre vos mains le fruit de votre patience et de votre sacrifice.

A mon frère en preuve de l'amour que j'ai pour lui.

A mes deux cousines Kaoutar et Imane pour leur soutien tout au long de mon parcours.

A Youssra et Sara pour tous les moments difficiles et joyeux qu'on a passé ensemble.

A mes respectueux enseignants et formateurs : veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mes profondes reconnaissances et ma grande estime.

A tous mes ami(e)s : pour votre soutien moral, veuillez trouver ici l'expression de mon grand amour et sincère amitié.

A tous ceux et celles que j'aime et j'estime.

MERCI

Remerciements

Parfois les mots semblent fades à côté de la profondeur des sentiments, mais pourtant il faut les concrétiser par des remerciements, pour honorer tous ceux qui m'ont aidé à franchir ce pas vers l'avenir.

Je tiens à remercier le bon dieu tout puissant, qui m'a donné patience, force et santé pour achever ce travail.

J'ai eu la chance de travailler au laboratoire de culture in vitro, dans les meilleures conditions grâce à mon encadrante Pr. BELKOURA Ilham, enseignante chercheur au département des sciences de base de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, que je remercie vivement. Veuillez trouver ici madame l'expression de mes respectueuses considérations.

Je tiens aussi à remercier Mme Mikou Karima, professeur de Biologie à la Faculté des Sciences et des Techniques de Fès, pour son encadrement, sa gentillesse et sa patience.

Je remercie vivement Mr Lazraq.A membre du jury pour sa présence honorable.

Par la même occasion je tiens à remercier Sara Oulbi, Sara Nia et Fatima Zahrae Belarbi qui m'ont beaucoup aidée pendant mon stage.

Un grand merci chaleureux à toute ma famille et tous mes amis(es).

Sommaire

| | |
|---|----------|
| Introduction générale..... | 1 |
| Revue bibliographique | |
| I- Culture <i>in vitro</i> | 4 |
| 1) Généralités | 4 |
| 2) Techniques de culture <i>in vitro</i> | 5 |
| 3) Avantages et inconvénients de la culture <i>in vitro</i> | 7 |
| II- L'embryogenèse somatique..... | 8 |
| 1) Généralités | 8 |
| 2) Modèle de l'embryogenèse somatique | 9 |
| 3) L'embryogenèse somatique chez la Picholine Marocaine | 10 |
| III- Microbouturage | 10 |
| 1) Définition..... | 10 |
| 2) Principales phases du microbouturage | 11 |
| IV- Quelques données sur les plantes étudiées | 12 |
| 1) Picholine marocaine | 12 |
| 2) Caroubier | 13 |
| V- Etude histologique | 14 |
| Matériels et Méthodes | |
| I- Matériel végétal | 15 |
| 1) Olivier : (Picholine marocaine) | 15 |
| 2) Caroubier | 15 |
| II- Méthode expérimental | 16 |
| 1) Stérilisation du matériel | 16 |
| 2) Stérilisation du matériel végétal..... | 16 |
| 3) Mise en culture | 16 |
| a) Milieu de culture | 16 |
| 4) Observations histologiques | 17 |
| Résultats Et Discussion | |

| | |
|--|-----------|
| 1) Microbouturage | 18 |
| a) Etablissement de culture axénique | 18 |
| b) Présence de phénols | 18 |
| c) Taux de nécrose | 19 |
| 2) Embryogenèse somatique..... | 20 |
| a) Morphologie des cals durant différentes phases de l'embryogenèse somatique | 20 |
| b) Taux de callogenèse, nécrose et infection | 21 |
| c) Observations histologiques | 22 |
| Conclusion générale..... | 23 |

Liste des abréviations

| | |
|-----|--|
| ENA | Ecole Nationale d'Agriculture |
| AIB | Acide Indole 3-Butyrique |
| BAP | Benzyl-amino-purine |
| MS | Murashige et Skoog |
| OM | Olive Medium |
| OMc | Olive Medium modifié |
| Eco | Olive Embedded Cyclic |
| 2Ip | 2-isopentenyladenine |
| FAA | Formaldéhyde, Acide acétique, Alcool éthylique |

Liste des figures

| | |
|------------------|--|
| Figure 1 | Méristèmes de tiges et de racines |
| Figure 2 | Embryogenèse somatique et zygotique chez la carotte. |
| Figure 3 | Schéma illustrant la multiplication par microbouturage |
| Figure 4 | Fruits de la Picholine Marocaine (COI) |
| Figure 5 | L'arbre du Caroubier se trouvant à l'ENA Meknès |
| Figure 6 | Explants du caroubier au début de mise en culture |
| Figure 7 | Explants du Caroubier 3 semaines après la mise en culture |
| Figure 8 | Gonflement d'un explant mis en culture dans un milieu d'induction |
| Figure 9 | Cal de couleur blanchâtre formé lors de la phase de prolifération |
| Figure 10 | Cal en phase d'expression sur lequel on remarque la formation d'une structure lisse qui pourra donner un embryon |
| Figure 11 | Infection bactérienne |
| Figure 12 | Infection fongique |
| Figure 13 | Coupe histologique sur cal obtenu à partir d'explant de feuilles rajeunis GRX20;GRX40 |

Introduction

générale

Depuis le début de l'agriculture l'homme a cherché à multiplier et améliorer les plantes qu'il cultivait par rapport à des critères de qualité ou de rendement correspondant à ses besoins. Néanmoins, les techniques de multiplication végétative traditionnelle ne sont pas arrivées à répondre aux besoins du consommateur. Dans les programmes d'amélioration classiques des plantes, la création de nouvelles variétés et leur multiplication peut durer entre 8 et 15 ans selon l'espèce, sans oublier que les objectifs de sélection : goût du consommateur, contrainte industrielle, etc peuvent évoluer. Pour l'ensemble de ces raisons, la technique de la multiplication *in vitro* s'est imposée comme solution promotrice.

Les méthodes de culture *in vitro* sont employées afin de satisfaire les besoins en agriculture et horticulture. La culture *in vitro* est par ailleurs un outil très efficace au service de la recherche biologique et physiologique (**Haicour, 2002**).

De nombreux ouvrages ont traité la culture *in vitro* au cours de la deuxième moitié de ce siècle décrivant toutes les méthodes déployées aussi bien dans le domaine animal que végétal (**Augé et al., 1989**). Il s'agit globalement d'une méthode de culture des plantes en conditions aseptiques en utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés.) qui peuvent être liquides ou solidifiés (**Jay-Allemand et al., 1992**).

La culture *in vitro* permet de cultiver, des cellules, des tissus ou fragments d'organes isolés d'une plante (apex, bourgeon, nœud, feuille, racine). Elle permet donc d'utiliser toutes les potentialités régénératrices d'une plante, notamment la totipotence cellulaire.

La culture *in vitro* est un moyen efficace pour l'obtention d'une grande quantité de clones homogènes et performants d'une manière rapide, assure l'amélioration génétique et la sélection des génotypes jugés intéressants sur le plan agronomique. Les avantages de cette technologie ne se limitent pas au seul coefficient de rapidité de la multiplication, en effet les plantes auto-enracinées *in vitro* se sont avérées plus vigoureuses et plus résistantes aux maladies.

Les techniques de culture *in vitro* ne sont pas applicables chez toutes les espèces, il existe des espèces récalcitrantes à savoir l'olivier, le caroubier, l'arganier ... d'où réside la complexité du choix des conditions de cultures (compositions minérales des milieux de cultures,

combinaisons hormonales,...). Il est donc indispensable de mener plus de recherches et d'essais pour contribuer à l'amélioration de ces techniques.

Mon stage au sein du laboratoire de culture *in vitro* à l'ENAM a pour objectif d'étudier quelques techniques de multiplication de plantes par culture *in vitro* en utilisant des explants différents cultivés dans différentes conditions de culture, tels que des milieux différents avec différentes combinaisons hormonales. Dans ce stage j'ai étudié la technique de l'embryogenèse somatique chez l'olivier et celle du microbouturage chez le caroubier. On a aussi suivi le développement des cals obtenus par embryogenèse somatique et étudié leurs caractéristiques par étude histologique.

Présentation de la structure d'accueil

L'École Nationale d'Agriculture de Meknès (**ENAM**) est créée en 1942 sous le nom de l'École Marocaine d'Agriculture (**EMA**), les cours furent interrompues durant la 2^{ème} guerre mondiale, puis ont repris en 1945. En Octobre 1957 elle prend la dénomination d'**ENA** au lieu d'**EMA**. En 2004, l'ENA a réorganisé son cursus de formation et a adopté une formation BAC+5.

Missions et objectifs :

L'École Nationale d'Agriculture de Meknès (**ENA**) est un Etablissement Public Marocain d'enseignement supérieur agronomique, ayant pour missions principales :

- La formation d'ingénieurs agronomes ayant les compétences nécessaires pour accompagner le développement de l'agriculture marocaine,
- La recherche scientifique et technique dans les domaines agricole et rural,
- L'appui au développement,
- La formation continue.

L'**ENA** contribue à la recherche scientifique et au développement agricole et rural à travers des études et projets réalisés dans le cadre des thématiques de compétences des enseignants chercheurs de l'**ENA** avec des financements internes ou externes et des collaborations et des partenariats publics ou privés nationaux ou internationaux. Elle dispose de plusieurs laboratoires et d'une ferme expérimentale de 60 ha permettant de réaliser les diverses activités de formation et de recherche.

L'**ENA** offre divers services d'assistance et de conseil à travers ses structures d'Interfaces avec le milieu professionnel notamment dans les domaines de la production et de la valorisation de l'olivier (Agropole-Olivier), du management, de la fertilité des sols et la fertilisation des cultures (FertiConseil), de la protection des cultures (PhytoConseil). Elle dispose également d'un centre dédié à la formation continue et l'appui au développement agricole et rural (AGRODEV).

Mon stage a été effectué dans le laboratoire de culture *in vitro* de l'ENAM.

Revue
bibliographique

I- Culture *in vitro*

1) Généralités

Culture *in vitro* ou culture des tissus se définit comme l'ensemble des techniques qui visent le développement ou la croissance d'un matériel végétal qu'il soit plante entière ou fragments de plantes ; tout en contrôlant les facteurs environnementaux (température, lumière, humidité, milieu nutritif, etc.) et respectant les conditions d'asepsie (**Zryd et al., 1988**). Cette technique permet également de cultiver les cellules isolées voir même des protoplastes capables de se diviser, de former des cals, des tissus organisés et même de régénérer un plante entière (**Jay-allemant et al., 1992**).

A ses débuts, la culture *in vitro* ne s'était intéressée qu'à l'étude des exigences nutritionnelles des plantes en rapport avec leurs diverses phases de croissance et de développement (**Zryd et al., 1988**). Mais elle s'est développée à la suite de l'apparition du concept de la totipotence cellulaire découverte en 1902 par Heberlandt et définit par Boxus (1995) comme suit : « la cellule, une unité morphologique et physiologique de l'être vivant, est capable d'autonomie. Elle possède toute l'information génétique nécessaire à régénérer la plante entière, à condition bien sûr de créer les conditions favorables à ce développement ».

Ces techniques ont rendu possible la multiplication des espèces dont les semences sont rares ou ont une difficulté germinative ainsi que celle des espèces récalcitrantes au bouturage et au greffage (**Zryd et al., 1988**).

La multiplication *in vitro* permet d'obtenir des embryons somatiques et des plantes haploïdes, ce qui ouvre une voie considérable aux généticiens qui peuvent ainsi se débarrasser des cycles de développement annuel ou bisannuel des plantes (**M. Larpent-Gourgaud et al., 1992**).

C'est grâce à la capacité de division et différenciation de nouveau que possèdent les cellules végétales en fonction des conditions expérimentales, que la culture *in vitro* doit toute son extension. Ce qui veut dire que tout individu de règne végétal peut être cultivé *in vitro*, mais le développement actuel des milieux de culture et les connaissances qu'on possède vis-à-vis du comportement de ces espèces dans ces milieux ne permettent pas de réaliser sans problème leur culture *in vitro* (**Augé et al., 1989**).

2) Quelques techniques de culture *in vitro*

Les techniques de culture *in vitro* sont des outils qui peuvent aider l'obteneur de plantes à différents niveaux de son programme d'amélioration, notamment pour réduire les délais de mise sur le marché des nouveaux cultivars, mais aussi pour assainir les variétés, les conserver et réduire les coûts de production.

Le principe de la culture des végétaux est de cultiver des explants en conditions axéniques (exemptes de tous germes saprophytes ou pathogènes) sur des milieux nutritifs qui sont également favorables au développement de micro-organismes. Il faut ensuite définir les milieux ainsi que les conditions de culture à appliquer aux techniques de multiplication *in vitro* choisies pour obtenir des taux de multiplication assez élevés pour rendre l'opération rentable.

Dans le laboratoire on utilise plusieurs techniques de culture *in vitro* qui respectent toutes les conditions d'asepsie convenable. Parmi ces techniques on trouve :

- La micropropagation

Elle a pour objectif de produire une grande quantité de cultivars d'intérêt horticole, sylvicole, ou agronomique qui viennent d'être créés ou découverts ou qui ont toujours un intérêt. Il peut s'agir également de plantes difficiles à reproduire naturellement.

Des centaines de millions de plantes issues de microbouturage sont produites annuellement dans le monde, dans un nombre toujours grandissant d'espèces. Plus de 300 espèces seraient concernées par la multiplication *in vitro* à l'échelle industrielle.

- La culture de méristèmes

Les méristèmes sont des zones de cellules à divisions intenses, situés au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et à l'origine des tiges feuillées ou du système racinaire. En 1950, les travaux de Limasset et Cornuet ont montré que les méristèmes étaient indemnes de virus.

Cette technique est la seule qui permet d'obtenir des plantes saines indemnes de virus. Elle concerne principalement les plantes à reproduction par voie végétative : bouturage, marcottage... comme la pomme de terre, le fraisier, le framboisier...

Elle a des avantages qui la rendent de plus en plus importante à titre d'exemple : le sauvetage de variétés menacés de disparition car elles sont virosées, mais elle a aussi des limites ; les

plantes obtenues sont indemnes de virus mais elles n'y sont pas devenues résistantes, elles peuvent être contaminées par des insectes, et c'est possible qu'à la régénération on ne trouve pas le caractère horticole chez certaines espèces comme les plantes de Pelargonium.

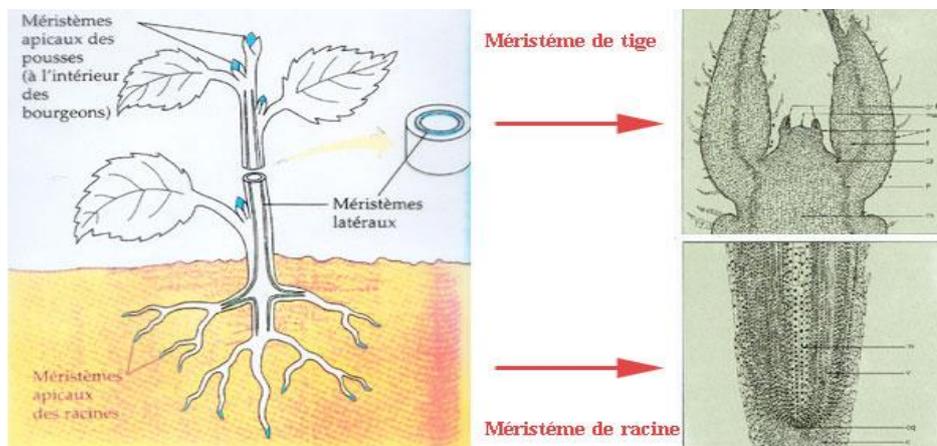


Figure 1: Méristèmes de tiges et de racines

- L'embryogenèse somatique

Cette technique a pour but de régénérer un embryon à partir d'un cal ou de suspensions cellulaires. Elle s'adapte très bien à la production industrielle. Pour la technique, les applications, les avantages et les limites on les détaillera dans la partie suivante.

- L'haplo-diploïdisation ou création de lignées pures

C'est la régénération de plantes entières à partir de culture de cellules sexuelles mâles: des grains de pollen immatures, soit par culture de pollen isolé, soit par culture d'anthers, ou de cellules sexuelles femelles. Cette technique présente un grand intérêt pour l'amélioration des plantes car elle permet d'accélérer les cycles de sélection.

L'haplo-diploïdisation a pour objectif d'obtenir des plantes haploïdes doublées (spontanément ou artificiellement par colchicine), elle permet l'obtention de lignées pures en quelques mois au lieu de 8 à 10 ans. L'obtention de ces lignées est une étape importante pour les programmes d'amélioration des plantes.

C'est une technique qu'on utilise chez plusieurs espèces : blé, riz, pomme de terre, tabac, maïs, piment etc...

Cette technique amène un important gain de temps, ce qui permet de mettre plus rapidement sur le marché de nouvelles variétés qui présentent des avantages pour l'agriculteur, l'industriel ou le consommateur. Ainsi une plante homozygote est directement obtenue, ce qui évite de faire une dizaine de générations d'autofécondations pour obtenir une lignée pure. Puisque les

plantes obtenues par cette technique sont totalement homozygotes, cela permet de dévoiler des caractères intéressants par l'expression des allèles récessifs habituellement cachés.

Comme cette technique a des avantages elle a des limites comme le fait que certaines variétés de céréales produisent un grand nombre de plantes albinos, et donc non viables, aussi, le rendement, (nombre de plantes viables/100 anthères cultivées) est souvent dépendant du cultivar.

3) Avantages et inconvénients de la culture *in vitro*

a) Avantages

Les avantages de la culture *in vitro* sont nombreux qu'ils soient sur le plan économique ou dans la conservation des plantes ;

- Economique
 - Production en masse à n'importe quelle période de l'année,
 - Production rapide,
 - Taux de multiplication 100 à 1000 fois plus élevé que les techniques traditionnelles,
 - Diminution des coûts de production (moins de personnel et de suivi),
 - Facilité de stockage,
 - Production d'espèces très demandées ou exotiques rapidement sur le marché...
- Conservation des plantes
 - Multiplication de plantes saines, sous condition de partir d'une souche saine contrôlée,
 - Obtention de clones sélectionnés pour leur vigueur, leurs caractères intéressants,
 - Assainissement des végétaux,
 - Sauvegarde d'espèces en danger,
 - Rajeunissement d'un végétal,
 - Multiplication d'espèces difficiles à obtenir avec les méthodes traditionnelles,
 - Tolérance à divers facteurs,
 - Reboisements...

b) Inconvénients

Comme la culture *in vitro* a des avantages elle a aussi des inconvénients, parmi lesquelles on trouve :

- Coût du plant plus élevé que celui d'une bouture classique,
- Automatisation limitée,

- Main d'œuvre qualifiée et spécialisée,
- Culture *in vitro* difficile à mettre en place (asepsie)...

II- L'embryogenèse somatique

1) Généralités

Un embryon dérive normalement de la fécondation de l'œuf précisément l'oosphère par un gamète mâle : c'est l'embryogenèse zygotique. Cependant, il y'a des embryons qui peuvent se développer à partir d'autres cellules à 2n chromosomes comme les feuilles, racines et tiges d'où la terminologie : embryogenèse somatique (**Augé et al, 1989**). Ces embryons se développent en plantes différenciées à travers des stades embryonnaires caractéristiques des embryons zygotiques.

L'embryogenèse somatique est potentiellement la méthode de régénération la plus performante pour la propagation clonale suite à son taux de multiplication élevé. La cryoconservation des cultures embryogènes dans l'azote liquide à -196°C donne la possibilité de disposer à volonté de matériel juvénile et de conserver les ressources génétiques d'où l'intérêt de cette technologie dans l'amélioration génétique. L'embryogenèse somatique présente aussi un outil de développement en foresterie (**Laurence et al., 2006**).

L'embryogenèse somatique, expérimentée sur un grand nombre d'espèces, présente des perspectives très prometteuses pour la propagation des cultivars récalcitrants et pour la création de nouveaux génotypes. Cette voie offre de grandes potentialités en matière de production industrielle de plants. Les embryons somatiques constituent un matériel de base important pour analyser les évènements biochimiques et moléculaires intervenant durant l'induction et la maturation des cals embryogènes (**Brhadha et al., 2006**).

L'embryogenèse somatique est un processus qui permet la formation d'un embryon à partir d'une cellule somatique sans qu'il y ait fusion gamétique et ceci en passant par des étapes provoqués artificiellement. Les embryons formés sont des structures morphologiquement très semblables aux embryons zygotiques et peuvent se développer en plantes entières, produisant des fleurs et des graines.

La production d'embryons somatiques a été décrite pour la première fois chez la carotte en 1958 (**Steward et al., 1958**). La figure 2 illustre ce phénomène Les explants sont cultivés dans un milieu riche en auxine. Les cellules de l'explant se dédifférencient et se divisent, elles

deviennent compétentes pour initier un programme embryogène. Depuis, des embryons somatiques ont été obtenus chez différentes plantes en utilisant des techniques très variées et à partir de différents explants.

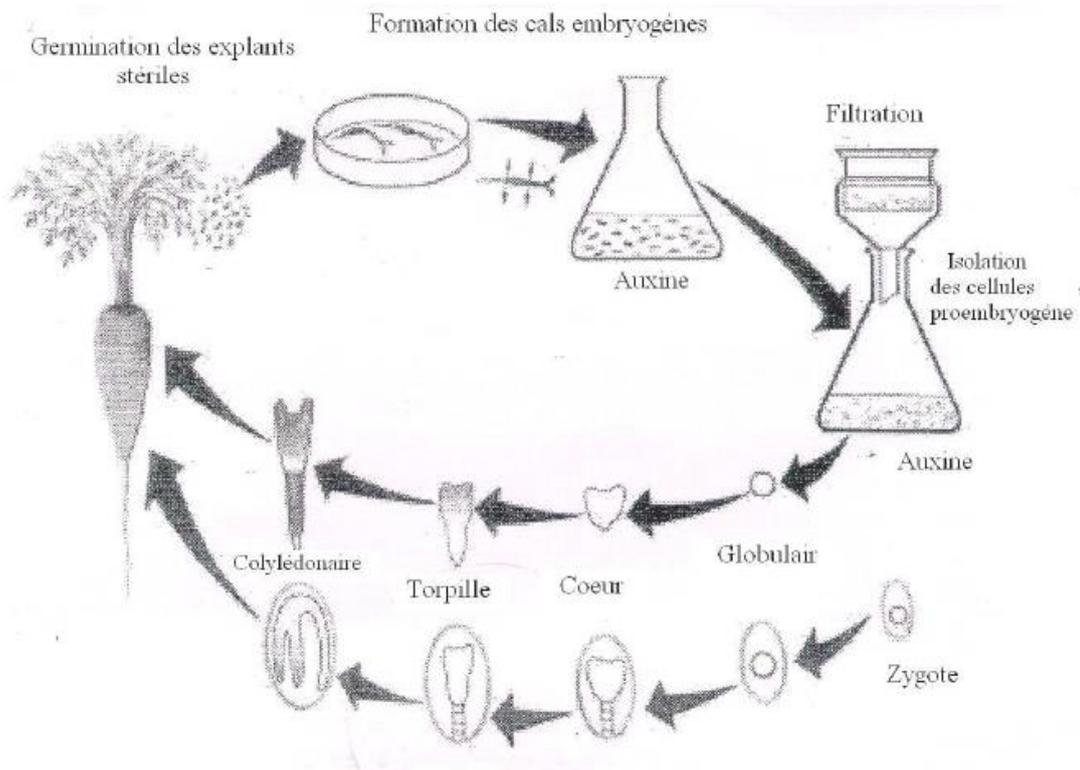


Figure 2 : Embryogenèse somatique et zygotique chez la carotte.

2) Modèle de l'embryogenèse somatique

Il y'a deux modèles de l'embryogenèse somatique :

- **Embryogenèse somatique directe** : dans ce processus, les embryons somatiques se développent directement à partir des explants initiaux mis en culture sans qu'il y ait formation de cal. Ce processus est cependant rarement observé (**Guedira, 1989**).
- **Embryogenèse somatique indirecte** : c'est un processus beaucoup plus fréquent et au cours duquel la formation d'embryons nécessite une callogenèse, caractérisée par une activité cellulaire élevée. Dans ce modèle, la formation d'embryons se fait à partir de cal, suspension cellulaire ou à partir d'autres embryons somatiques. Dans ce dernier cas, le processus est appelé embryogenèse somatique secondaire.

3) L'embryogenèse somatique chez la Picholine Marocaine

Chez l'olivier, l'embryogenèse somatique a pu être induite chez plusieurs cultivars à partir de tissus zygotiques immatures et matures (**Rugini et Gutiérrez Pesce 2006**) mais plus rarement à partir de tissus somatiques.

Les travaux réalisés jusqu'à maintenant ont confirmé que les conditions d'apparition de ces embryons diffèrent selon le potentiel embryogène de l'espèce voire de la variété. Mais jusqu'à maintenant aucun protocole expérimental standard n'a été établi pour déterminer les conditions.

L'embryogenèse somatique de la Picholine marocaine a été jusqu'à présent très peu étudiée malgré l'importance de cette variété au Maroc qui représente près de 98 % des plantations oléicoles, quelques travaux seulement ont porté sur l'embryogenèse somatique. (**Brhadha et al., 2003**).

La variation dans l'induction des cals et le développement des embryons somatiques et ensuite, leur régénération en plantules est en fonction de la consistance du milieu de culture et de la concentration d'auxine utilisée. En effet l'induction des embryons somatiques peut s'effectuer soit sur un milieu gélosé, soit en suspension liquide. La culture en suspension liquide présente plusieurs avantages par rapport à celle sur milieu solide. Le milieu solidifié avec de la gélerite n'est pas favorable à l'embryogenèse somatique de la picholine marocaine où aucune régénération n'a été notée. (**Brhadha et al., 2006**).

III- Microbouturage

1) Définition

La technique de microbouturage consiste à cultiver des nœuds sur des milieux artificiels et dont le développement des bourgeons donne des pousses feuillées identiques à la plante de départ (Figure 3), et que l'on peut multiplier indéfiniment en exploitant ainsi la totipotence des cellules végétales.

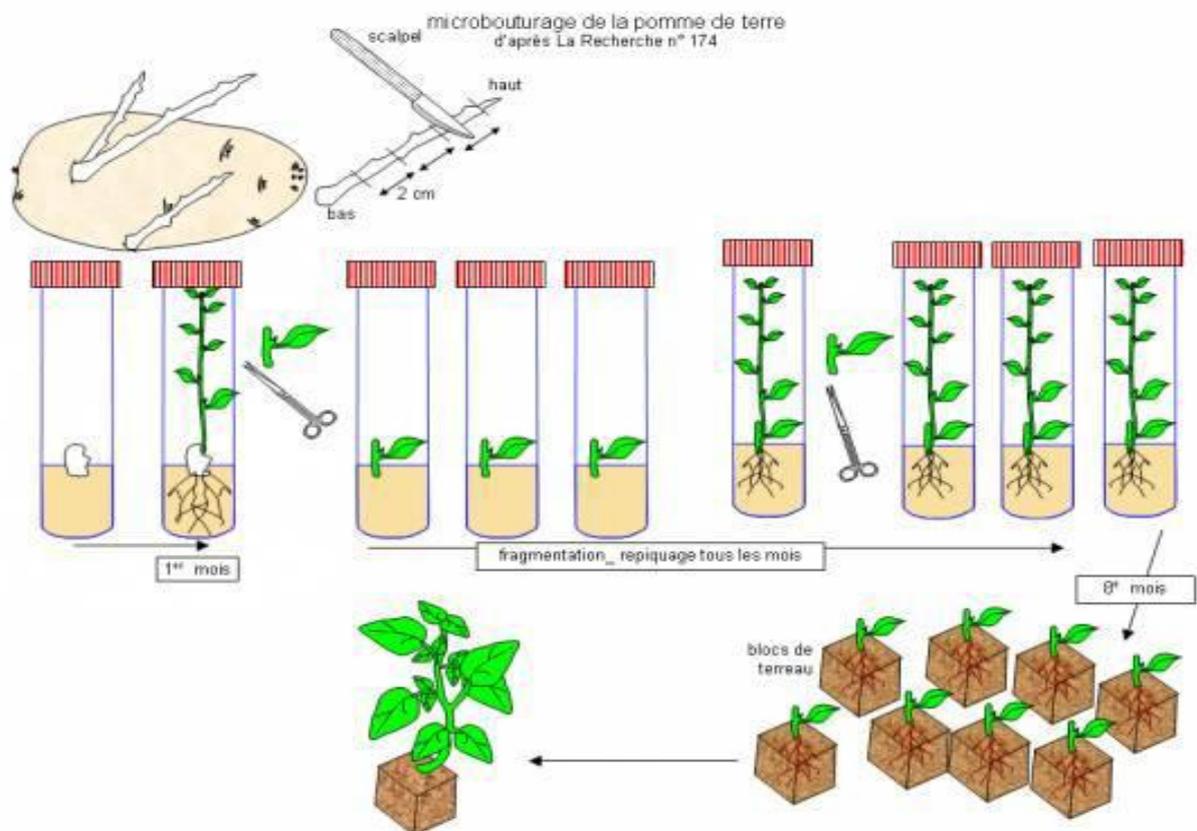


Figure 3: Schéma illustrant la multiplication par microbouturage

Le microbouturage permet de multiplier des espèces difficiles à reproduire naturellement. C'est ce qu'on appelle la micropropagation qui peut être une multiplication par bourgeonnement axillaire ou par bourgeonnement adventif.

- La multiplication par bourgeonnement axillaire consiste à provoquer et à accélérer le débourrement axillaire normal des bourgeons axillaires présents naturellement à la base des feuilles (Sghir, 2005). Cette technique permet aussi une production de haute qualité et une croissance rapide des plantes, exemptes d'agents pathogènes à la surface et dans le système vasculaire (Rugini, 2006).

2) Principales phases du microbouturage

Le déroulement de la multiplication *in vitro* par microbouturage est divisé en quatre étapes :

- ✓ Etablissement de la culture aseptique,
- ✓ Le débourrement des bourgeons et leur multiplication : on cherche le maximum d'unités de propagation dans le minimum de temps. Un milieu riche en cytokinines est favorable pour la multiplication cellulaire,

- ✓ Enracinement : c'est l'étape la plus délicate où on essaie de différencier les racines initiales et on provoque leur développement,
- ✓ Acclimatation en serre : elle dure de 10 à 60 jours. On varie l'humidité : élevée au début puis on la diminue progressivement.

IV- Quelques données sur les plantes étudiées

1) Picholine marocaine

L'olivier est une espèce thermophile très adaptée au climat méditerranéen. Il a été exporté dans plusieurs pays du monde tel que l'Afrique du Sud et l'Argentine, l'Australie et les Etats unis (**Haouane, 2012**). L'olivier occupe actuellement le premier rang des espèces arboricoles cultivées au Maroc (**COI, 2016**). Son intérêt est dû non seulement à son importance socio-économique et environnementale, mais aussi aux qualités sanitaires et nutritionnelles de l'huile d'olive (**Abousalim et al, 2005**).

La principale variété produite est la Picholine Marocaine elle occupe 96% des plantations oléicoles au Maroc (**MAPM, 2015**)

La Picholine Marocaine est très appréciée par les agriculteurs vu ses qualités d'adaptation et aussi pour la destination de ses olives à deux fins (conserverie et huilerie).

Les travaux concernant la Picholine Marocaine restent très limités (**Brhadda et al., 2003**).



Figure 4 : Fruits de la Picholine Marocaine (COI)

L'embryogenèse somatique est pratiquée pour avoir des cals embryogènes ou des embryons pour permettre l'amélioration génétique et dépasser les limites de cette espèce puisqu'elle est connue par son côté récalcitrant aux techniques de multiplication *in vivo* et *in vitro*.

2) Caroubier

Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) appartenant à la famille des *Cesalpiniaceae*, est largement utilisé dans les régions méditerranéennes et cultivé à des fins ornementales et industrielles (Girolamo et al., 2002).

Le Caroubier joue un rôle socio-économique et écologique important dans le système agro-sylvo-pastoral. Il est classé parmi les arbres les plus performants, cela est dû principalement à l'utilité de toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) et la valeur ajoutée qu'elles présentent dans plusieurs domaines.

La pulpe des fruits et la gomme tirée des graines sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Cette pulpe représente près de 90% du poids de la gousse est utilisée comme substituant du chocolat. Par ailleurs, les polyphénols extraits de la gousse présentent une capacité antioxydante appréciable (Makris et Kefalas, 2004). Il est aussi utilisé dans l'industrie pharmaceutique et dans l'industrie des alcools.

Cette espèce s'installe favorablement dans les zones arides et semi-arides, grâce à sa physiologie qui lui permet de développer différentes stratégies d'adaptation aux contraintes hydriques. (Ait Chitt et al, 2007).



Figure 5 : L'arbre du Caroubier se trouvant à l'ENA de Meknès

Le caroubier est également une plante mellifère, d'ailleurs son miel est de bonne qualité. Même l'écorce et les racines du caroubier sont exploitées en tannerie. **(Benmahioul et al, 2011).**

La culture de bourgeons axillaires dérivant de jeunes plantules offre une bonne possibilité de micropropagation de cette espèce sans que l'on soit gêné par la contamination des cultures très fréquente quand on travaille sur des explants issus d'un arbre adulte.

V- Etude histologique

Classiquement les études histologiques sont réalisées à l'échelle microscopique. Elle a pour but d'explorer la structure des organismes vivants, les rapports constitutifs et fonctionnels entre leurs éléments fonctionnels, ainsi que le renouvellement des tissus.

L'analyse histologique comprend la mesure de la taille et de la forme des cellules ainsi que leur arrangement. En microscopie les cellules sont identifiées individuellement et des paramètres morphologiques sont extraits pour chacune d'elle.

Matériels
et
Méthodes

I- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail est issu de deux espèces présentant toutes les deux une importance majeure dans la culture *in vitro*. Il s'agit de l'olivier et du caroubier.

1) Olivier : (Picholine marocaine)

- **Systématique**

- **Règne:** Plantae
- **Sous-règne:** Tracheobionta
- **Classe:** Magnoliopsida
- **Sous-classe :** Asteridae
- **Ordre:** Lamiales
- **Famille:** Oleaceae
- **Genre:** Olea
- **Espèce:** Olea europaea

Le matériel végétal utilisé pour cette espèce est sous forme de cals préalablement mis en culture dans des milieux d'induction auxquels on ajoute différentes concentrations de différentes hormones (auxines et cytokinines).

Les cals sont obtenus à partir de feuilles rajeunies et qui proviennent de pousses feuillées entretenues par repiquages successifs dans des milieux de multiplication, cela assure le rajeunissement du matériel végétal.

2) Caroubier

- **Systématique**

- **Règne:** Plantae
- **Sous-règne:** Tracheobionta
- **Classe:** Magnoliopsida(dicotylédones)
- **Sous-classe :** Rosidae
- **Ordre:** Fabales
- **Famille:** Fabaceae
- **sous-famille:** caesalpinoïdeae
- **Genre:** Ceratonia
- **Espèce:** Ceratonia siliqua

Le matériel végétal utilisé pour cette espèce est sous forme de boutures issues des rameaux de l'année, prélevé d'un Caroubier qui se trouve à l'ENAM.

II- Méthode expérimental

1) Stérilisation du matériel

- Toutes les manipulations ont été réalisées dans des conditions d'asepsie absolue de façon à ce que les milieux de culture, les boîtes de Pétri, tubes et le papier filtre sont tous stérilisés par autoclavage à une température de 120°C et une pression de 1 bars pendant 20 minutes.
- Les instruments servant à la dissection, repiquage et transfert sont stérilisés à sec dans une étuve à une température de 200°C pendant 2 heures.
- Les parois de la hotte à flux laminaires sont aussi désinfectées à l'éthanol 70% 20 minutes avant de commencer la manipulation.
- Tout le matériel et les instruments inclus dans la hotte sont désinfectés à l'éthanol 70%.

2) Stérilisation du matériel végétal

Pour stériliser le matériel végétal on suit un protocole bien précis :

- On lave délicatement au Tween 80 les rameaux tout en les brossant avec une petite brosse puis on rince à l'eau du robinet,
- On lave à l'éthanol 70% pendant 2 minutes,
- On les met dans HgCl₂ à 1g/L pendant 10 minutes,
- En fin on rince 3 fois à l'eau distillé stérile.

3) Mise en culture

a) Milieux de culture

1) Olivier : Picholine Marocaine

- Milieu d'induction

Les fragments de feuilles rajeunies ont été mis en culture dans un milieu OM (annexe 1) auquel on a ajouté différentes combinaisons d'hormones (auxines et cytokinines) à différentes concentrations. Ce milieu constitue le milieu d'induction.

- Milieu de prolifération : OMc

Après avoir passé 4 semaines dans le milieu d'induction, on fait un transfert des cals dans un milieu OMc de prolifération auquel on a ajouté des éléments organiques, saccharose,

vitamines OM et d'autres éléments (annexe2). Le pH est ajusté à 5.7 et le milieu est solidifié avec de l'agar.

- Milieux d'expression : Eco

Après un séjour de 4 semaines dans le milieu de prolifération les cals sont transférés dans un milieu d'expression Eco (annexe 3).

2) Caroubier

Pour cette manipulation on utilise comme milieu de culture l'eau gélosée composé de 7g d'Agar dilué dans 1 litre d'eau distillée et à un pH compris entre 5.7 et 5.75. Les boutures sont placées pendant 1 mois dans une chambre de culture. La chambre de culture est réglée sous des conditions précises : température de 25°C et une photopériode : 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

4) Observations histologiques

Les observations histologiques concernent les cals susceptibles de donner naissance à des embryons somatiques.

Les coupes histologiques de cals, prélevés sur des jeunes feuilles rajeunies d'olivier, sont faites à l'aide d'un microtome manuel pour l'obtention d'une épaisseur mince de l'ordre de 8µm.

Les échantillons à observer subissent les étapes du traitement suivantes :

- Fixation dans le FAA à 70% : permet de bloquer tous les mécanismes de la cellule et d'éviter la dégradation de sa structure,
- Déshydratation de cals fixées par plusieurs passages dans des bains d'alcool à degrés croissants,
- Imprégnation et inclusion des cals à la paraffine,
- Coulage des échantillons dans des blocs cubiques cartonnés
- Coupes et fixation sur les lames par l'eau gélatinisée,
- Déparaffinage : la paraffine est éliminée par une série de bains de xylène et d'alcool,
- Coloration des coupes par l'acide périodique de schiff,
- Observation se fait à l'aide d'un microscope optique (annexe 4).

Résultats
et
Discussion

VI- Microbouturage

a) Etablissement de culture axénique

L'établissement d'une culture axénique est parmi les étapes les plus importantes du microbouturage. Elle a pour objectif de permettre l'obtention d'un maximum d'explants sains et vivants.

Le but principal de cette partie est d'exploiter les explants stériles issus de la culture axénique dans la suite du travail : développement et enracinement des pousses feuillées issues du matériel végétal adulte.

Les observations quotidiennes des explants de caroubier pendant les 3 premières semaines n'ont dévoilé aucune infection.

b) Présence de phénols

Une observation quotidienne des tubes a indiqué un assombrissement du milieu de culture chez tous les explants. Ceci est attribué à des composés phénoliques exsudés des tissus et qui s'accumulent dans le milieu de culture. Ce processus est dû à l'oxydation des composés phénoliques, ce qui entraîne la formation de quinones hautement réactives et toxiques pour les tissus végétaux.

Dans ce travail, on a 100% de sécrétions phénoliques. Les 24 tubes portant les explants présentent cet assombrissement autour de la bouture.



Figure 6 : Explants du caroubier au début de mise en culture

La figure 6 montre l'aspect du milieu de culture (eau gélosée) au début de la mise en culture. On remarque que le milieu de culture est transparent, il a une couleur blanchâtre ce qui témoigne de l'absence de composés phénoliques secrétés par les explants. 3 semaines après la mise en culture, le milieu est devenu jaunâtre suite aux phénols (Figure 7).

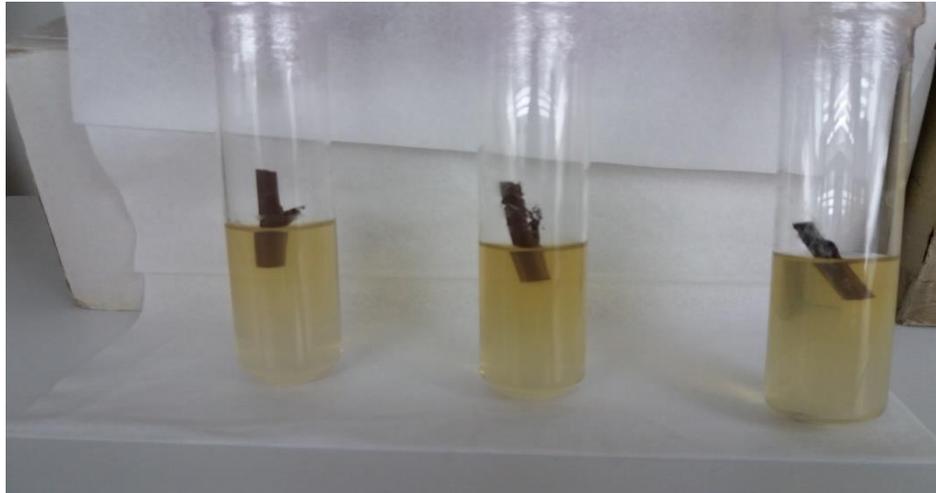


Figure 7 : Explants du Caroubier 3 semaines après la mise en culture

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires qui n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la production. h

Dans la nature, les phénols sont des alcools aromatiques produits par les végétaux. Les phénols simples, déchets du métabolisme végétal, sont assemblés en polyphénols comme la lignine.

La sécrétion de ces phénols par la plante est due à un stress causé par l'humidité. Les boutures subissent ce stress une fois mis en culture et que les tubes sont fermés. C'est un type de défense de la plante contre des conditions défavorables.

c) Taux de nécrose

Après 3 semaines de mise en culture, on constate qu'aucun explant n'a donné un débourrement. On a donc 100% de nécrose.

Ceci peut être expliqué de deux façons :

- La première est la stérilisation : puisqu'on utilise un fort désinfectant le HgCl₂, et la durée pendant laquelle les explants y sont restés (10 minutes) peuvent être la cause de la nécrose.
- La deuxième est reliée à la période de récolte. Il se peut qu'en mois de mai la saison n'était pas favorable pour effectuer des prélèvements ce qui peut expliquer aussi la cause de la nécrose.

VII- Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est un processus dans lequel se développe un embryon somatique avec une structure bipolaire, identique à l'embryon zygotique mais sans fusion de gamètes (Litz et Gray, 1995).

Généralement l'embryogenèse somatique comprend cinq étapes :

- Initiation des cultures embryogènes,
- Prolifération des cultures embryogènes,
- Expression des embryons somatiques,
- Maturation des embryons somatiques,
- Conversion des embryons en plantules.

Lors de notre étude, nous nous sommes focalisés sur les trois premières étapes de l'embryogenèse somatique du fait que la durée du stage ne permet pas d'observer les deux dernières étapes.

a) Morphologie des cals durant différentes phases de l'embryogenèse somatique

La première phase de l'embryogenèse somatique est la phase d'induction, à la fin de cette phase on remarque un gonflement au niveau de la majorité des explants mis en culture ce qui indique leur adaptation au milieu et leur préparation à donner des cals susceptibles de donner des embryons (Planche 1 : A). Cette phase dure 4 semaines.

La phase de prolifération est la deuxième phase de l'embryogenèse somatique, à sa fin on constate que la plupart des explants ont donné des cals. Ces cals sont de couleur blanchâtre (Planche 1 : B). Cette phase dure 4 semaines également.

La troisième phase de l'embryogenèse somatique est celle d'expression. A la fin de cette phase on remarque que certains cals ont tendance à former des structures lisses qui peuvent devenir des embryons par la suite (Planche 1 : C). Les cals sont transférés sur le milieu

d'expression qui permettra l'expression d'embryons somatiques. Cette phase peut durer jusqu'à 4 mois.

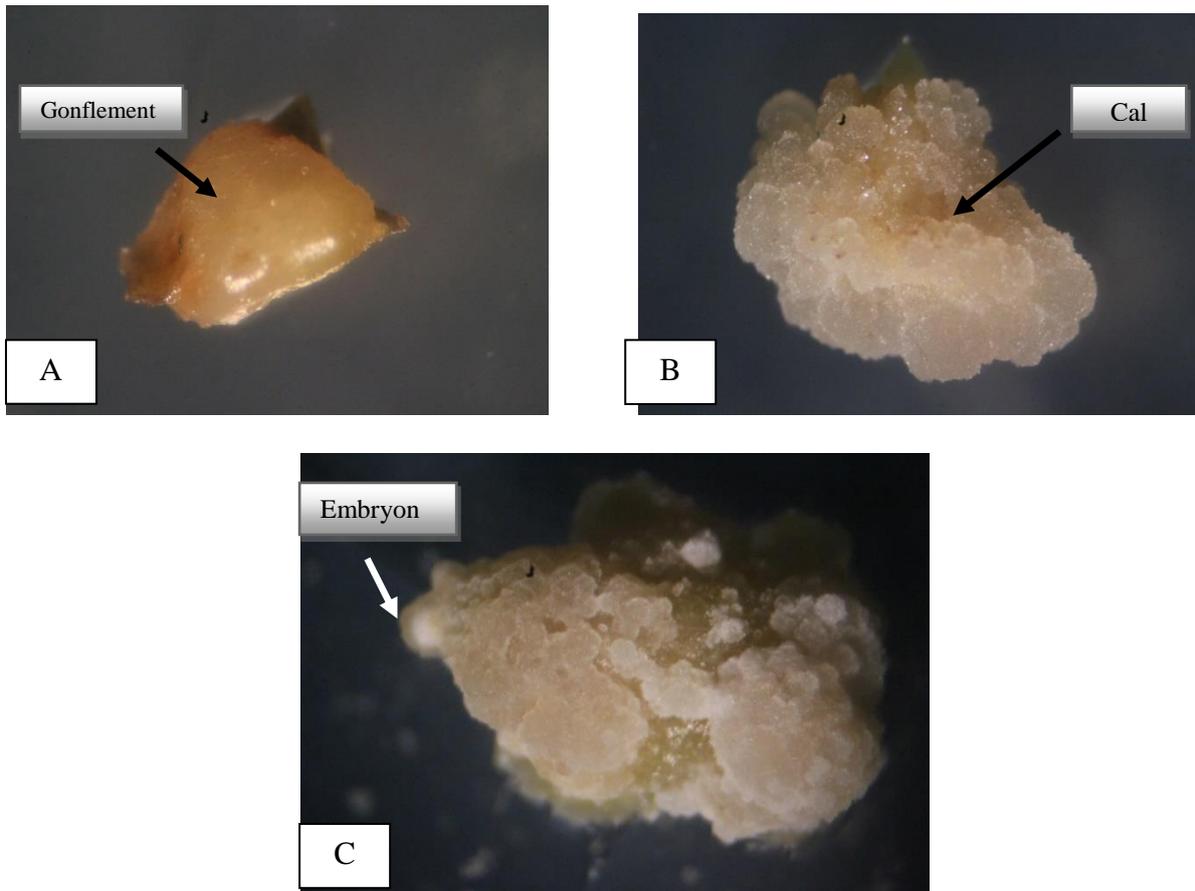


Planche 1 : Morphologie des cals issus de feuilles rajeunies de picholine. Différentes phases de l'embryogenèse somatique.

b) Taux de callogenèse, nécrose et infection

Le taux de callogenèse est élevé par rapport à celui des nécroses et des infections.

Les infections étaient généralement d'origine bactérienne, à part quelques-unes qui étaient fongiques.



Figure 11 : Infection bactérienne



Figure 12 : Infection fongique

c) Observations histologiques

Les observations histologiques des cals obtenus est une partie importante du travail vu qu'elle permet de déterminer les changements structuraux produits au niveau des explants, d'identifier les conditions d'induction et d'expression susceptibles de donner naissance à des embryons somatiques et aussi de réduire le temps d'investigation en identifiant assez tôt les cultures non morphogènes.

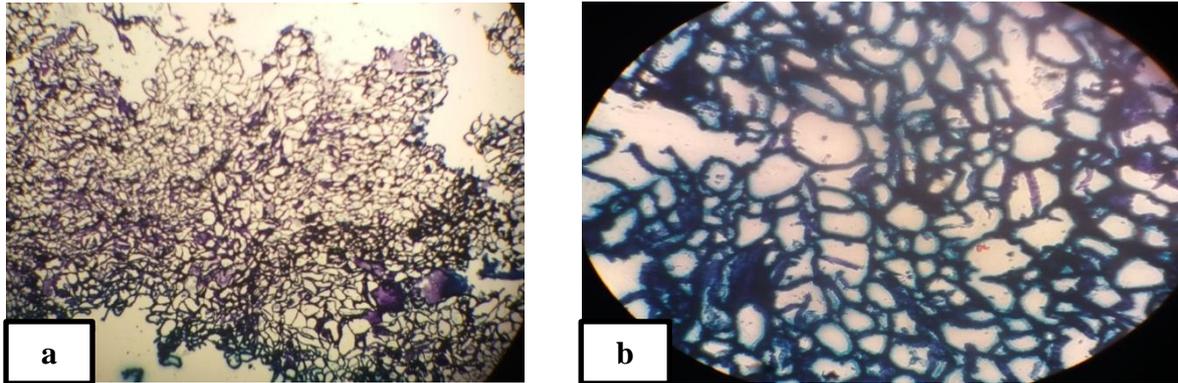


Figure 13 : Coupe histologique sur cal obtenu à partir d'explant de feuilles rajounies a, GRX20 ; b, GRX40

On observe des cellules vidées de leur protoplasme, ces cellules ne pourront pas évoluer en embryons somatiques. Cet état observé peut être dû à la qualité du cal lui-même ou à son traitement au cours de la préparation en vue de son observation au microscope. Il s'agit d'une culture non morphogène. Néanmoins, d'autres cultures peuvent être morphogènes. La culture *in vitro* ne donne pas souvent 100% de réussite ceci constitue la majeure contrainte de cette technique.

Conclusion générale

Le recours aux techniques de culture *in vitro* chez l'olivier s'avère nécessaire, en raison de l'importance de cette espèce non seulement au niveau de la méditerranée mais aussi à l'échelle mondiale, cet intérêt est dû en plus à son importance socio-économique et environnementale et aux qualités nutritionnelles de ses fruits et de son huile.

Parmi les techniques de culture *in vitro* appliquées à l'olivier, l'embryogenèse somatique, peut être avantageuse du fait qu'elle permet potentiellement l'obtention de nouvelles plantes saines à partir de cellules somatiques dans un temps court, ce processus est aussi prometteur dans le domaine de l'amélioration génétique, qui constitue à l'état actuel l'un des objectifs majeurs de la culture *in vitro*.

En ce qui concerne le Caroubier, les recherches concernant sa multiplication *in vitro* sont récentes et insuffisantes. Par conséquent, toutes les techniques ne sont pas encore maîtrisées.

L'amélioration des différentes techniques de multiplication *in vitro* contribuera à la production des plantes uniformes, qui seront par la suite exploitées dans les programmes de sélection clonale; particulièrement au Maroc qui ne dispose pas encore des variétés.

De plus cette plante médicinale a un considérable potentiel morphogénique. Ce dernier peut être optimisé en recherchant les facteurs performants dans chaque stade de la technique de reproduction: l'âge de l'arbre mère, le type et la concentration des régulateurs de croissance.

Dans le même sens, les problèmes associés à la grande variabilité du caroubier et la longue étape de juvénilité peuvent être surmontés à l'aide de la multiplication *in vitro*.
(Naghmouchiet al, 2008).

Bibliographie

- **Haicour, R.** (2002). Biotechnologie végétale : technique de laboratoire. Ed Tec et Doc. Montréal AUF, 2002(universités francophones ISBN 2-7430-0560-2). 275p.
- **Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, J-Cl., Reynoird, J.P., et Strullu, D.G.** (1989). La culture in vitro et ces applications horticoles. 3^{ème} édition revue, corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Lavoisier 225p.
- **Jay-Allemand, C., Capelli, P., et Cornu, D.,** (1992). Root development of in vitro hybrid walnut microcutting in vermiculite containing gelrite medium. Station d'amélioration des arbres forestiers INRA, 45160. Ardon France. Scienda horticulura. 51(3-4) : 335-342.
- **Zryd J.P., Brettell R., Derreure J., Duhoux E., Gaspar T., Gazeau C.M., Hosters M., Jacobs M., Monnier M., Negrutiu L., Paszkowski J., Pelletier G., Vernade D.,** (1988). « Culture de cellules, tissus végétaux, fondements théoriques et utilisations pratiques », Diffusion Lausanne, Suisse, Presses polytechniques romandes, pp : 16-43.
- **M. Larpent-Gourgaut, J. J. Sanglier.,** 1992. "Biotechnologies: Principes et méthodes". Collection 'Biosciences et techniques'. P: 344-360
- **Laurence, T., Mohamed, S., et Lamhamedi.** (2006). Embryogenèse somatique au ministère des ressources naturelles et de la faune du Québec. Dans : Du laboratoire au site de plantation. Revue des plants et des hormones. 9 :6-11
- **Brhadda N ., Loudyi dou ElMacane W, Abdelhadi., A.** (2006) Étude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier *Olea europaea* cv. Picholine marocaine *Fruits*, 2007, vol. 62, p. 115–124 2007 Cirad/EDP Sciences.
- **Steward, F.C ., Mapes, M.O., et Smith, J.** (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely susoended celles .45 :693-703.
- **Guedira M, Dubois T, Vasseur J, Dubois J.**1989. Embryogénèse somatique directe à partir de cultures d'anthères du *Cichorium (Asteraceae)*. Revue canadienne de botanique, 67(4): 970-976.
- **Rugini E, Gutiérrez Pesce P.** (2006). Genetic improvement of olive. POMOLOGIA CROATICA. 12: 43-74.
- **Brhadda N., Abousalim A., Walali LD.** (2003). Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) par culture d'apex. (En ligne), Volume 5, N ° 131008.

- **SGHIR S.**, (2005). « Etude des techniques de la multiplication végétative de l'olivier (*Olea europaea* L.) par bouturage semi-herbacé et par micropropagation *in vitro* ». thèse de doctorat. Université My Ismail, faculté des sciences Meknès.
- **Haouane H.**, (2012). « Origines, domestication et diversification variétale chez l'olivier (*Olea europaea* L.) à l'ouest de la Méditerranée », Thèse en co-tutelle pour obtenir le grade de docteur en spécialité : Evolution – Ecologie – Ressources Génétiques – Paléontologie, FST Marrakech
- **Abousalim A, Brhadda N, Dou el macane Walali L.**, (2005) Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (*Olea europaea* L.) et de germination *in vitro* : effets de cytokinine et d'auxines. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2005 **9** (4), 237–240.
- **Girolamo R. & Laura D.**, (2002). Evaluation and preservation of genetic resources of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in southern of Italy for pharmaceutical use. *Breed. Res. Aromat. Med. Plants*, **9**, 367-372.
- **Makris D. P. and Kefalas P.**, (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidant. *Food Technol. Biotechnol*, N° 42, 105- 108 pp.
- **Ait Chitt M., Belmir H et Lazrak A.**, (2007). Production de plants sélectionnés et greffés de caroubier. Transfert de technologie en agriculture. Maroc. N° 153, 1-4 pp.
- **Benmahioul B., Kaid-Harche M et Daguin F.**, (2011). Le caroubier, une espèce Méditerranéenne à usages multiples. *In Forêt méditerranéenne*, N° 1, 51-58 pp.
- **Litz R.E. et Gray D.I.**, (1995). « Somatic embryogenesis for agricultural improvement », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 11, Issue 4, p : 416 – 425.
- **Naghmouchi S., Larbi Khouja M., Rejeb M .N et Boussaid M.**, (2008). Effect of growth regulators and explant origin on *in vitro* propagation of *Ceratonia siliqua* L. via cuttings. *In Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* volume 12(3), 251-258 pp.

Webographie

- **COI**, (2016) **Conseil oléicole international** consulté le 24/04/2017 disponible sur http://www.internationaloliveoil.org/?lang=fr_FR .

MAPM (2015) <http://www.agriculture.gov.ma/pages/actualites/ouverture-de-la-3eme-edition-du-salon-national-de-lolivier-el-kelaa-des-sraghnas>

ANNEXES

- ANNEXE 1 : Composition d'un litre du milieu de base OM

| Eléments | Concentration en mg/l |
|---|-----------------------|
| <u>Macroéléments</u> | |
| KNO ₃ | 950 |
| NH ₄ NO ₃ | 720 |
| Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O | --- |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 166 |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 185 |
| KCl | --- |
| KH ₂ PO ₄ | 86 |
| <u>Micro-éléments</u> | |
| MNSO ₄ , 4H ₂ O | 22,3 |
| ZNSO ₄ , 7H ₂ O | 14,3 |
| H ₃ BO ₃ | 12,4 |
| KI | 0,83 |
| CuSO ₄ , 5H ₂ O | 0,25 |
| Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O | 0,25 |
| CoCl ₂ , 6H ₂ O | 0,025 |
| FeSO ₄ , 7H ₂ O | 27,8 |
| Na ₂ EDTA, 2H ₂ O | 37,5 |
| | 100 |
| <u>Vitamines</u> | |
| Myoinositol | 0,5 |
| Thiamine HCl | 5 |
| Acide Nicotinique | 0,5 |
| Pyridoxine | 0,5 |
| Acide folique | 2 |
| Glycine | |
| Saccharose | 30 000 |
| Agar | 8 000 |
| pH | 5,6 – 5,8 |

- **ANNEXE 2: Milieu de prolifération OMc**

Sels minéraux

| Quantité prélevée (ml) | Eléments | Concentration préparée (g/l) |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| 4,36 | NH ₄ NO ₃ | 165 |
| 5 | KNO ₃ | 190 |
| 3,77 | CaCl ₂ 2H ₂ O | 44 |
| 5 | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 37 |
| 4 | KH ₂ PO ₄ | 17 |
| 10 | Solution de fer | |
| 10 | Micro-éléments MS | |

Composition organique

| Quantité prélevée | Eléments | Concentration préparée (mg/ml) |
|--------------------------|--------------------|---|
| 20 g | Saccharose | |
| 10 ml | Vitamines OM | |
| 0,1 g | Myo-inositol | |
| 5 ml | Auxine AIB | 0,1 |
| 1 g | Caséine hydrolizat | |

| | |
|------|----------|
| Agar | 7 g |
| pH | 5.7-5,74 |

- **ANNEXE 3 : Milieu d'expression ECO**

Sels minéraux

| Quantité prélevée (ml) | Eléments | Concentration préparée (g/l) |
|------------------------|--|------------------------------|
| 0.62 | NH ₄ NO ₃ | 165 |
| 1.44 | KNO ₃ | 190 |
| 2.5 | CaCl ₂ 2H ₂ O | 44 |
| 10 | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 37 |
| 5 | KH ₂ PO ₄ | 17 |
| 2.5 | Solution de fer | |
| 2.5 | Micro-éléments MS | |
| 3 | Ca(NO ₃) ₄ H ₂ O | 50 |
| 2.5 | KCL | 50 |

Composition organique

| Quantité prélevée | Eléments | Concentration préparée (mg/ml) |
|-------------------|--------------------|--------------------------------|
| 20 g | Saccharose | |
| 10 ml | Vitamines OM | |
| 0,05 g | Myo-inositol | |
| 0.5 ml | Auxine AIB | 0,1 |
| 1 ml | Cytokinine 2iP | 0.1 |
| 1 ml | Cytokinine BAP | 0.1 |
| 1 g | Caséine hydrolyzat | |

| | |
|------|----------|
| Agar | 7 g |
| pH | 5,7-5,74 |

- **ANNEXE 4:**

- 1) **Fixation à la FAA :**

Préparation du fixateur (100 ml)

Ethanol 70° : 90 ml

Aldéhyde formique : 5 ml

Acide acétique glacial : 5ml

- 2) **Inclusion à la paraffine**

- a) **Déshydratation**

| | |
|--------------|------------------------------------|
| Ethanol 10° | 1h |
| Ethanol 20° | 1h |
| Ethanol 30° | 1h |
| Ethanol 40° | 1h |
| Ethanol 50° | 1h |
| Ethanol 60° | 1h |
| Ethanol 70° | 1h |
| Ethanol 80° | 1h |
| Ethanol 90° | 1h |
| Ethanol 95° | Toute la nuit au frigo Ethanol 95° |
| Ethanol 100° | 1h |
| Ethanol 100° | 1h |
| Ethanol 100° | 1h |

- b) **Imprégnation et inclusion**

| | |
|----------------------|-----------------|
| Xylène + alcool 100° | 1h |
| Xylène pur | 1h |
| Xylène pur | 1h |
| Xylène + paraffine | 1h à 60°C |
| Paraffine | 1h à 60°C |
| Paraffine | 1h à 60°C |
| Paraffine | une nuit à 60°C |

- c) **Déparaffinage**

| | |
|--------|-------|
| Xylène | 10 mn |
| Xylène | 10 mn |

| | |
|---------------|------|
| Ethanol 100°C | 1 mn |
| Ethanol 100°C | 1 mn |
| Ethanol 95°C | 1 mn |
| Ethanol 95°C | 1 mn |
| Ethanol 70°C | 1 mn |
| Ethanol 50°C | 1 mn |
| Ethanol 50°C | 1 mn |

3) Coloration des échantillons :

| | |
|--------------------|---------------------|
| Acide périodique | 10 mn |
| Réactif Schiff | 20 mn à l'obscurité |
| Naphtol blue black | 7 minutes |