

Projet de Fin d'Études

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phytoressources

Initiation aux techniques de la culture in vitro

Présenté par : Aabouch Farah

Encadré par :

- Pr. El Ghachtouli Naïma (Fst -Fès)
- Dr. Diria Ghizlane (INRA-Rabat)
- Dr. Rabha Abdelwahd (INRA-Rabat)
- Pr. Abbas Younes (FP, USMS, Béni Mellal)

Soutenu le :06/06/2018

Devant le jury composé de :

- Pr. El Ghachtouli Naïma, FST-Fès
- Mme Diria Ghizlane, INRA-Rabat
- Pr. Bouchama El Ouzna, FST-Fès

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Président de l'Université Sidi Mohamed Ibn Abdellah ainsi que Mr le Doyen de la FST de Fès

Je remercie **Pr. Ghachtouli Naïma** d'avoir accepté de superviser ce travail.

Je remercie **Dr. Rabha Abdelwahd** et **Dr. Ghizlane Diria** de m'avoir accueillie dans leur équipe et leur laboratoire, ainsi que pour l'aide et les conseils concernant les missions évoquées dans ce rapport.

J'adresse mes remerciements au **Pr. Younes Abbas** qui a co-encadré ce travail. Je ne peux pas oublier son appui pour trouver un stage qui m'a permis d'accéder aux locaux de l'INRA de Rabat. Son écoute et ses conseils m'ont été d'une grande utilité pour la suite de ce travail.

Je remercie aussi **Pr. Bouchama** d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier mes collègues **Oumaima** et **Asmae** pour leur aide précieux. Ainsi que toute personne qui a contribué de près ou de loin pour réaliser ce mémoire.

Pour la même occasion, nous adressons nos remerciements à tous nos enseignants pour leurs efforts épargnés qui ont guidé nos pas et enrichi nos travaux tout le long de nos études universitaires.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude

A tous celui qui a sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite :

***A ma mère**, à qui je dois la réussite, pour l'éducation qu'elle m'a prodigué; avec tous les moyens et au prix de toutes les sacrifices qu'elle a consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'elle m'a enseigné depuis mon enfance.*

***A l'âme de mon père** Ce travail est dédié à mon père Lhaj Mohammed, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours priée pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

***A mes chers frères** : Aziz, Kamal, Mustapha, pour leurs patiences et leurs soutiens qu'ils n'ont cessés d'apporter au cours de ma formation*

***A mes belles sœurs** Naima, Zainab*

***A toute ma famille** avec tous mes sentiments de respect, d'amour, de gratitude et de reconnaissance pour tous les sacrifices déployés pour m'élever dignement et assurer mon éducation dans les meilleure conditions pour leurs encouragements et leurs soutiens*

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude,

Table des matières

Introduction.....	1
Partie I : synthèse bibliographique	
I. Généralité sur la culture in vitro.....	2
1. Définition.....	2
2. Historique.....	2
3. Avantages et les inconvénients.....	3
II. Technique du la culture in vitro.....	3
1. Micropropagation.....	3
a. Organogénèse.....	4
b. Culture de méristème.....	4
c. Microbouturage.....	5
i. Définition.....	5
ii. Principes étapes de microbouturage.....	6
2. Embryogénèse somatique.....	6
a. Généralités.....	6
b. Types d'embryogénèse somatique.....	7
c. Principes étapes d'embryogénèse somatique.....	8
3. Haplo diploïdisation ou création de lignées pur.....	8
III. Facteurs influençant les cultures in vitro.....	9
1. La lumière et la photopériode.....	9
2. La température.....	9
3. Milieu de culture	9
IV. Importance de culture in vitro chez l'arganier et le blé dur.....	10
1. Généralités.....	10
2. Quelque donnée sur les espèces étudiées.....	11
a. Arganier.....	11
b. Blé dur.....	12
c. Classification scientifique	12

Partie II : matériel et méthodes

I. Matériel.....	14
1. Matériel végétal.....	14
2. Matériel utilisé.....	14
II. Méthodes.....	14
1. Multiplication végétative d'arganier.....	14
a. Préparation des amandes.....	14
b. Stérilisation des amandes	15
c. Germination des graines.....	15
d. Mise en culture.....	15
e. Stérilisation des instruments.....	16
2. Embryogénèse somatique du blé dur	17
a. Stérilisation de matériel végétal.....	17
b. Excision des embryons et mise en culture.....	17
c. Condition de culture	17
d. Régénération des cals d'embryogénèse somatique.....	17

Partie III : Résultat et discussion

1. Multiplication d'arganier.....	18
2. Embryogenese somatique.....	19
a. Induction de l'embryon.....	19
b. Principales étapes de l'embryogénèse somatique.....	20
c. Morphologie des embryons durant différentes.....	21
phases de l'embryogenèse somatique	
Conclusion générale.....	22

Liste des figures

Figure 1	Schéma de la régénération d'une plante
Figure 2	Méristème de tige et de racine
Figure 3	Schématisation du micro bouturage
Figure 4	Représentation schématique des principales phases du développement d'embryon somatique
Figure 5	Arbre d'argane
Figure 6	Fruits d'arganier
Figure 7	Graines de blé dur
Figure 8	Les amandes d'arganier
Figure 9	Plantule d'arganier après quatre semaines de culture en milieu MS/2
Figure 10	Les différentes étapes de la mise en culture de cotylédons
Figure 11	Matériel utilisé pour la stérilisation
Figure 12	Organogénèse de l'arganier : Formation des cals et des racines sur cotylédons et les hypocotyles
Figure 13	Induction des cals embryogènes
Figure 14	Plantules régénérées par embryogénèse somatique
Figure 15	déférent phase de l'embryogénèse somatique

Liste des abréviations

MS	Murashige et Skoog
AIA	Acide indole 3-acétique
2,4D	Acide naphtyl-1 acétique
AG	Acide Gibbérelline
INRA	Institut National de recherche agronomique
MS /2	Milieu de base de MS 1962 avec une dilution de 2* des macro et micro élément
BAB	6-benzylaminopurine

Présentation de la structure d'accueil

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) a été créé en 1914. C'est un établissement public doté de l'autonomie financière et ayant comme mission d'entreprendre des recherches à l'échelle nationale dans le domaine agricole.

Les axes traités sont liés principalement au développement agricole au Maroc visant l'amélioration de la productivité, la compétitivité et la durabilité de la production agricole. Ces volets sont de concert avec les partenaires régionaux. L'accomplissement des projets est réalisé en partenariat avec des organisations nationales et internationales, les structures de développement, le secteur privé et les Organisations Non Gouvernementales (ONG).

L'INRA couvre les divers agrosystèmes du pays par dix centres régionaux de la recherche agronomique et 23 domaines expérimentaux. Les unités de recherche situées au centre régional de RABAT sont :

- ✓ L'environnement et la Conservation des Ressources Naturelles.
- ✓ La protection des Plantes.
- ✓ La production animale et les fourrages.
- ✓ La biotechnologie.
- ✓ Les techniques Agro-alimentaire et Qualité.
- ✓ L'amélioration des Plantes, Conservation et Valorisation des Ressources phylogénétiques

Mon stage a été effectué pendant 2 mois au sein de l'unité de biotechnologie. Cette dernière comprend 3 grands laboratoires (biologie moléculaire, culture in vitro et transgénèse végétale). Cette unité est mise en place en 2003. Elle a été créée dans le cadre de la nouvelle stratégie et orientation de l'INRA, afin d'utiliser les nouvelles techniques de biotechnologies pour trouver des solutions aux stress biotiques (Virus, bactéries, champignons, parasites et ravageurs...) et abiotiques (sécheresse, salinité...) des plantes

Introduction

Depuis les débuts de l'agriculture l'Homme a cherché à améliorer les plantes qu'il cultivait par rapport à des critères de qualité ou de rendement correspondant à ses besoins. Tout d'abord assez empiriques, ces techniques d'amélioration ont évolué grâce, en particulier à l'apport de la génétique. L'objectif de l'amélioration des plantes est de créer de nouvelles variétés combinant un certain nombre de caractères définis par le sélectionneur.

Les méthodes de culture *in vitro* sont de plus en plus employées pour assurer la propagation clonale des géotypes élités 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* 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 géotypes 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.

Malgré l'importance de cette technique, elle reste non applicable chez plusieurs espèces qui sont récalcitrantes. Ainsi, des recherches sur les différents facteurs influençant la réussite de cette technique chez ces espèces sont indispensables.

Mon stage au sein du laboratoire de culture *in vitro* à l'INRA de rabat a pour objectif de s'initier à quelques techniques de multiplication de plantes par culture *in vitro* en utilisant des explants différents cultivés dans conditions de culture variées, telles que des milieux avec différentes combinaisons hormonales. Au cours de ce stage j'ai pu appréhender la technique de l'embryogenèse somatique chez le blé dur et celle de la micropropagation chez l'arganier.

Partie I
Synthèse bibliographique

I. Culture in vitro : Généralité

1. Définition

De très nombreux ouvrages ont traité de 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 ; Margara, 1989**). C'est une méthode de culture des plantes en condition aseptiques en utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés (**Jay-Allemand et al., 1992**)).

La multiplication végétative par culture in vitro (aussi appelé micropropagation) est donc une technique visant à régénérer une plante entière à partir de cellules ou de tissus végétaux en milieu nutritif, en utilisant des techniques modernes de culture cellulaires.

2. Historique

La culture in vitro est par comparaison, une technique très récent puisqu'elle fut développée seulement au début de 19^{ème} siècle (**Jay-Allemand et Capelli, 1997**). Les premiers pas de culture in vitro sont dus à un **allemand Haberlandt en 1902**. Il obtient ainsi sur un milieu KNOP amélioré, la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires. Mais il n'y avait de multiplication cellulaire (**Augé et al., 1989**) en 1912, Alexie Carrel réussissait la culture indéfinie de cellules de cœur d'embryon de poulet par repiquages successifs. Il fallut attendre 1922 et les travaux de Rablens pour voir apparaître une croissance chez les pointes et racine isolées sur milieu synthétique. Mais la date qui marque réellement le début de la culture in vitro est 1932 avec les travaux de White aux USA sur la croissance indéfinie en milieu liquide de racine de tomates. Ce succès fut sans doute à l'origine du regain d'effort qui se portera sur les cultures tissus végétales. Dès 1934, Gautheret obtient à partir de prélèvement de tissus cambiaux d'arbre des proliférations de tissus qui malheureusement ne dépassèrent pas huit mois (**Morel, 1952 ; scriban, 1988**).Après les travaux de White aux USA en (1932) sur le tabac, Nobecourt en France sur la carotte, **Limasset et Cornuet en (1949)** qui publiaient leurs observations sur l'absence de virus dans les méristèmes de tabac virosé. **Morel et Martin, en (1952)** mirent à profit ces observation et entreprirent de mettre en culture in vitro des méristèmes de Dahliya et de pomme de terre atteints de maladies à virus A partir de méristèmes, ils obtiennent in vitro des plantes entières qui furent remises en culture normale et révélèrent saines au contrôle (**Augé et al, 1989**).

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

Les avantages de culture *in vitro* sont :

- ✓ Sauvegarde et Conservation des variétés anciennes et menacées de disparition. C'est un moyen de sauvegarder la diversité des espèces sauvages et les espèces rares ou difficiles à multiplier naturellement (peu de graines ou de rejets) par la création des banques de gènes.
- ✓ Assainissement des plants par la culture du méristème De nombreuses variétés de plantes horticoles et maraîchères de grand intérêt, anciennes ou nouvelles, ont été sauvées de la menace de disparition par des virus en utilisant la culture de méristèmes.
- ✓ La multiplication massive et rapide des plants
- ✓ La facilité de leur transport d'une région à l'autre ou d'un pays à l'autre
- ✓ Accélération de la création variétale par haplo-diploïdisation
- ✓ Sélection et amélioration de la tolérance à certains stress biotiques et abiotiques
- ✓ Reboisements....
- ✓ L'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures *in vitro* souvent associées à la réduction des contaminations

Cette technique a aussi des inconvénients, parmi lesquelles on trouve :

- ✓ Problème des contaminations endogènes ou exogènes brunissement vitrification
- ✓ L'Exigence de main d'œuvre qualifiée
- ✓ Culture *in vitro* difficile à mettre en place (asepsie)...
- ✓ Récalcitrante de certaines espèces

II. Techniques de culture *in vitro*

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

1 Micropropagation

Les plantes se multiplient par multiplication végétative, ce dernier est indispensable quand on veut conserver les caractères d'une variété donnée. La micropropagation *in vitro* apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (**Ochatte et al., 2005**). La micropropagation consiste en une prolifération des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère. Ceci offre une bonne

garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours de repiquages successifs (**Demol et al., 2008**). Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforesteries (**Bretaudefeu, 2006**).

Elle a pour objectif de produire en grande quantité des cultivars d'intérêt horticole, sylvicole, ou agronomique qui viennent d'être créés ou découverts ou qui ont toujours un intérêt.

a. Organogénèse

L'organogénèse consiste à la néoformation d'organes, souvent ce terme est utilisé pour décrire la formation de bourgeons mais il s'applique également à des racines (**Auge et al., 1989 ; Simonin, 2006**). Elle est la base fondamentale de la multiplication végétative qui s'appuie sur la formation de nouveaux méristèmes (**Margara, 1984**) et peut être réalisée soit par :

- La voie directe, qui conduit à la morphogénèse directe de tiges (caulogénèse) ou de racines (rhizogénèse) donnant ainsi naissance à des plantules viables, qui peuvent être acclimatées progressivement au milieu naturel (**Margara, 1984**).
- La voie indirecte, qui passe d'abord par une callogénèse (la néoformation d'un tissu cellulaire indifférencié) et dont l'organogénèse, suite à des repiquages, apparaît plus tardivement (**Margara, 1984 ; Zryd, 1988**).

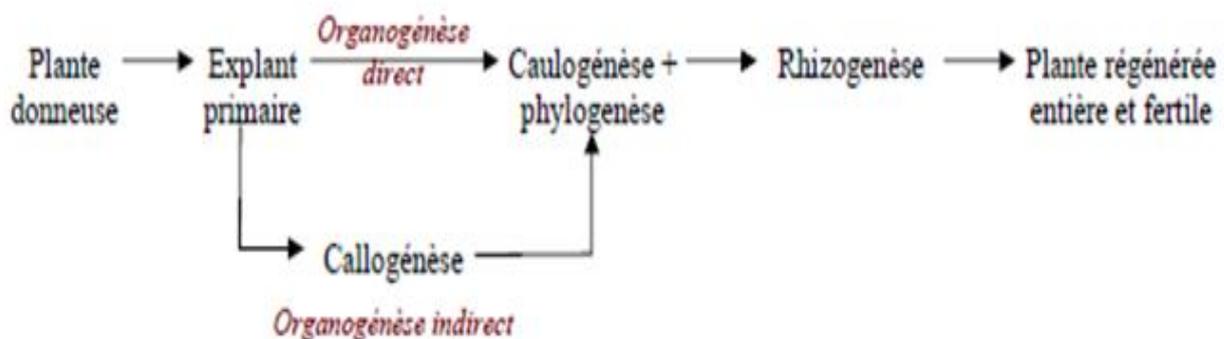


Figure 1 : Schéma de la régénération d'une plante

b. Culture de méristème

Culture de méristème Cette méthode consiste à prélever le cœur d'un bourgeon ou l'extrémité d'une racine où se trouve le méristème, zone de cellules qui se divisent activement pour assurer la croissance de la plante. Cette région est toujours dépourvue de virus, de bactéries ou de champignons, même chez les plantes contaminées. Cette méthode permet donc de créer des plants sains et a assuré le sauvetage de variétés entières des espèces tels que le Pélargonium, le dahlia, le chrysanthème, la pomme de terre, l'artichaut, le

fraisier, framboisier. Contrairement aux techniques bouturages, marcottage,... car cette voie favorise la transmission des virus à la descendance

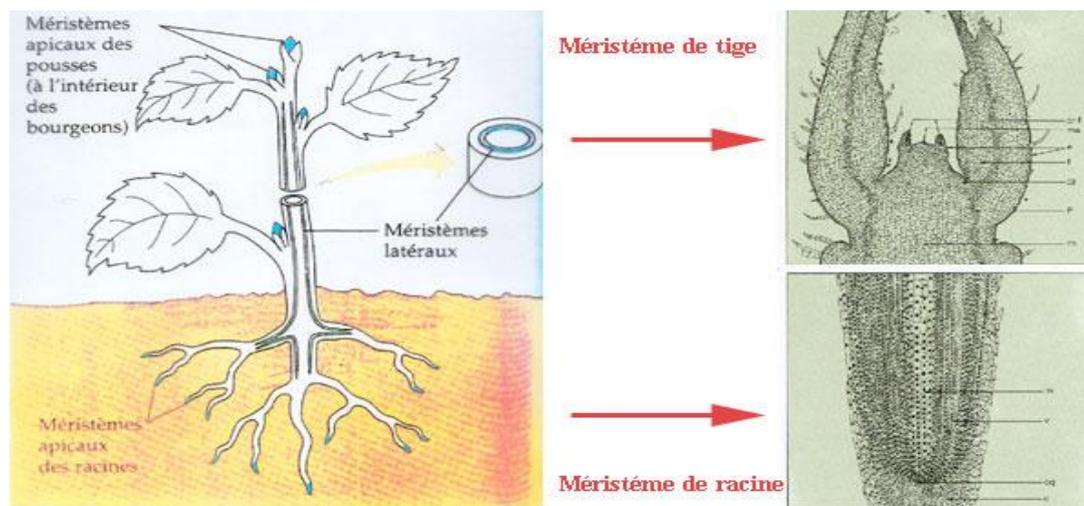


Figure 2 : Méristème de tige et de racine

c. Microbouturage

i Définition

Le micro bouturage est la technique la plus répandue pour produire en un minimum de temps un maximum de plantes. L'explant sera repiqué sur un milieu permettant son développement en nouvelle plante qui se sera enracinée. Cette technique passe cependant par plusieurs étapes qui doivent être réalisées de manière la plus stérile possible

Le microbouturage est un mode de multiplication conforme qui accélère le fonctionnement normal des bourgeons formés sur une plante (Montes, 2009). La prolifération des méristèmes préexistants peut être réalisée en utilisant trois types d'explants: méristème, apex ou nœuds (unique ou multiple) (Gonçalves et Romano, 2012). Ils sont cultivés pour régénérer des pousses multiples sans passer par une phase cal (Pati et al., 2006). De nombreuses espèces ont été régénérées via le microbouturage.

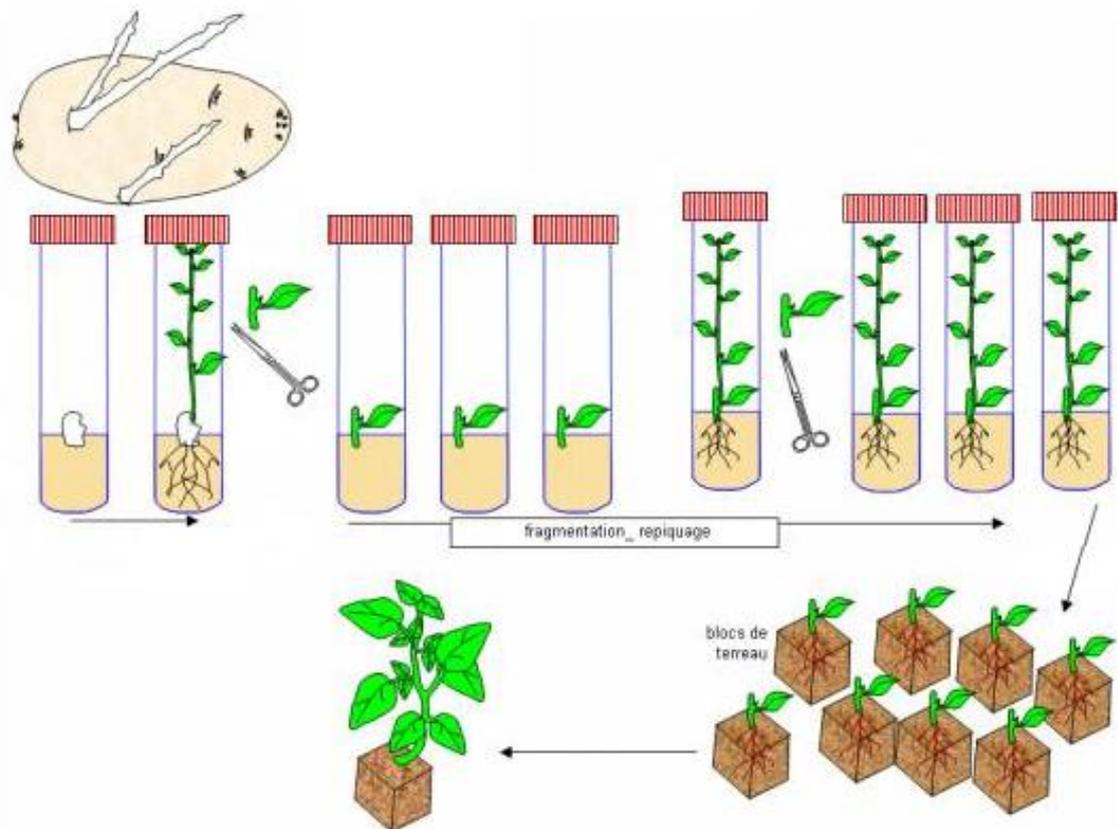


Figure 3 : Schématisation du microbouturage

ii **Principales étapes de microbouturage**

- ✓ L'établissement de la culture aseptique
- ✓ La multiplication : on cherche le maximum d'unités de propagation dans un minimum de temps.
- ✓ Le changement de milieu de la plante : apport de nouvel élément indispensable au développement de la plante fille
- ✓ L'enracinement : c'est l'étape la plus délicate. On cherche à différencier des initiaux racinaires et provoquer leur développement
- ✓ L'acclimatation en serre (10 à 60 jours) : on maintient une humidité très élevée au début, qu'on baisse progressivement jusqu'à atteindre l'humidité ambiante

2 **Embryogénèse somatique**

a **Généralités**

L'embryogénèse somatique est une forme de multiplication végétative permettant d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère. Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée. Cette technique consiste alors à provoquer l'apparition d'embryons à partir des tissus végétaux mis en culture *in vitro* qui provoquent de nombreuses divisions cellulaires. Cette embryogénèse somatique génère alors des embryons dans ces divisions cellulaires ou dans

les cals, c'est-à-dire un amas de cellules indifférenciées (qui ont été différenciées sur l'explant de la plante mère avec le phénomène de totipotence végétale. Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent ensuite en nombreux petits massifs à structure bipolaire nommés embryons somatiques (avec un méristème de tige et un méristème de racine). Comme les embryons zygotiques (présents dans les graines), les embryons somatiques, obtenus à partir de cellules non sexuées (sans fécondation), se développent en un nombre illimité de plantes génétiquement identiques. C'est actuellement la technique la plus performante pour la multiplication végétative des conifères (**Agnès et al., 2013**).

Cependant, d'autres types d'embryons peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte, embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique et qui sont appelés « embryons somatiques ». Parfois, chez certaines espèces, ils résultent d'une embryogenèse somatique naturelle qualifiée d'apomixie. Dans certains cas en effet, les anthérozoïdes, l'oosphère, voire d'autres cellules gamétophytiques peuvent engendrer des embryons parthénogénétiques. Dans d'autres cas, certaines cellules saprophytiques localisées au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier le nucelle, fournissent naturellement des embryons apoméiotiques appelés aussi l'embryons nucellaires. Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les Citrus (**Tisserat et al., 1979 ; Vardi et al., 1990**) Toutefois, cette appellation est essentiellement appliquée, selon certains auteurs comme **Piatti (1988) et Margara (1989)**, aux embryons obtenus à partir de culture de tissus *in-vitro* du sporophyte.

b Types d'embryogenèse somatique

Il y'a deux types 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 callogénèse, caractérisée par une activité cellulaire élevée. Dans ce modèle, la formation d'embryons se fait à partir de cal.

c Principales étapes de l'embryogénèse somatique

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

- ❖ Prolifération des cultures embryogénèse sur milieu solide contenant une composition en régulateurs de croissance similaire à celle de l'étape précédente. Pour La propagation à grande échelle, il est souvent préférable d'établir des suspensions cellulaires (Von Arnold et al. 2002).
- ❖ Prématuration des embryons somatiques sur milieu généralement dépourvu de régulateurs de croissance ce qui inhibe la prolifération cellulaire mais stimule la formation des embryons et le début du développement (Von Arnold et al. 2002).
- ❖ Maturation des embryons somatiques par culture sur un milieu contenant de MS.
- ❖ Développement de plants sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance.

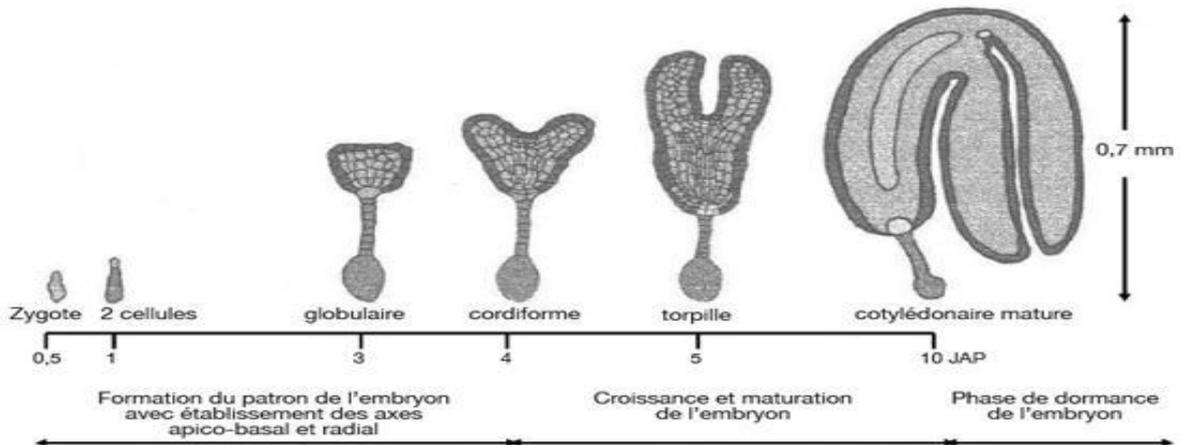


Figure4: représentation schématique des principales phases du développement d'embryon somatique (Siluét al., 2010).

4. Haplo-diploïdisation ou création de lignées pures

L'aploidiploïdisation est une méthode utilisée pour fixer plus rapidement le matériel génétique en cours de sélection. Elle repose sur l'obtention de plantes haploïdes (n) à partir des organes mâles ou femelles puis sur le doublement stock chromosomique. Ainsi le sélectionneur va disposer de plantes diploïdes (2n) homozygotes ou l'ensemble du génome est fixé. C'est donc une technique rapide de production de lignées pures en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations. Avec cette méthode la durée d'un cycle de sélection est raccourcie de 3 à 4 ans

De plus cette méthode permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants.

III. Facteurs influençant la culture in vitro

Quelque soit la technique, la culture in vitro requiert des conditions de culture précises en effet, il est indispensable de contrôler les conditions de température d'éclairement (durée et intensité) et humidité relative.

1. La lumière et la photopériode

La lumière est un facteur déterminant pour la culture in vitro des plantes. Elle est indispensable au déclenchement et au bon déroulement de certains processus morphogénétiques, L'intensité lumineuse nécessaire dépend de la durée de l'éclairement et de la qualité spectrale de la lumière reçue par la culture. En effet selon **Hussey et al (1981)** la longueur de jour affecte la vigueur et développement des proliférations ainsi que la croissance des cals.

2. La température

La température est également un élément important lors de la pratique des cultures in vitro, elle doit être en générale constante et régulée entre 20 et 25°C.

3. Milieu de culture

Les milieux de culture doivent être constitués en général de sels minéraux de substances organiques de phytohormones et d'extraits naturels :

- **Les éléments minéraux**

Pour la plupart des plantes supérieures, les sels minéraux sont de 2 types :

- Les macroéléments (N, P, K, S, Mg et Ca) qui sont absorbés sous forme d'ions.
- Les micro-éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe), bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel.

- **Les éléments organiques**

- **Le saccharose:**

Le saccharose permet assurer la survie et le développement de l'explant il est indispensable d'ajouter une source d'énergie

- **Les vitamines:**

L'emploi de diverses vitamines tels que : la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, favorise fréquemment la croissance des tissus des cultures in vitro.

- **Les phytohormones:**

Ce sont des substances indispensables au bon démarrage et à l'entretien des tissus végétaux des cultures in vitro, les régulateurs naturels de croissances des végétaux, appelés aussi hormones de croissance, se répartissent actuellement en cinq groupes : Auxines, Cytokinines, Gibbérellines, Acides abscissiques, Ethylènes. Ces substances de croissance peuvent agir en synergie ou en antagonisme.

IV. Importance de la technique de culture in vitro chez l'arganier et le blé dur

1. Généralités

En guise de conclusion de cette partie bibliographique, on a soulevé l'importance de la culture in vitro comme étant un outil de biotechnologie permettant d'une part la multiplication en masse des espèces d'intérêt pour leur sauvegarde et leur réhabilitation (comme chez l'arganier) et d'autre part l'introduction des gènes d'intérêt à savoir les gènes de tolérance à la sécheresse chez les lignées sélectionnées (comme le cas de blé avec le HVA1). En effet, L'arganier (*Argania spinosa*. (L.)) est un arbre endémique du Sud-ouest Marocain où il représente la deuxième essence forestière. Il est connu par ses intérêts économiques, écologiques et environnementaux. Malgré son importance, l'arganeraie Marocaine régresse en termes de superficies et de densité ce qui impose des programmes urgents de reboisement. La régénération naturelle ne pouvant à elle seule assurer la reconstitution de cette espèce, l'application de la micropropagation par la culture in vitro s'avère donc nécessaire.

Pour ce qui est du blé, il présente un enjeu économique important. Il occupe le premier rang au Maroc (FAO stat, 2010). Cependant sa demande ne cesse de s'accroître avec l'augmentation de la population, raison pour laquelle l'amélioration de la productivité de cette culture est un sujet d'actualité afin de créer des variétés plus productives et plus adaptées. La culture du blé au Maroc est confrontée à plusieurs contraintes telles que la sécheresse de plus en plus fréquente. Le transfert de la résistance à la sécheresse via les approches traditionnelles reste limité (Patnaik et Khurana, 2003). Toutefois, la

transformation génétique permet l'acquisition de cette tolérance tout en surmontant les difficultés liées à l'amélioration classique.

Ainsi notre objectif s'est focalisé sur l'initiation aux techniques biotechnologiques, notamment, la micropropagation de l'arganier et l'embryogénèse somatique chez le blé dur.

2. Quelques données sur les espèces étudiées

a. Arganier

L'arganier [*Argania spinosa* (L.) Skeels)] est un arbre endémique du sud-ouest Marocain. C'est un arbre multi-usage, qui constitue une ressource primordiale pour les populations de cet espace semi-aride et aride du Maroc. Il constitue la clef de voûte de l'agro-écosystème traditionnel de l'arganeraie qui produit de l'huile à forte valeur ajoutée et peut être utilisé dans l'élaboration de produits cosmétiques. Par ailleurs, il sert également de fourrage pour les animaux. Cet écosystème repose sur un équilibre entre ressources et exploitation humaine, et joue également un rôle important dans la lutte contre la désertification et l'érosion.

En effet, en moins d'un siècle, plus de la moitié de l'arganeraie marocaine a disparu et sa densité moyenne est passée de 100 à 30 arbres par ha (Charrouf, 2007). Cette dégradation est essentiellement due aux facteurs anthropiques (démographie, agriculture intensive, à la coupe du bois pour des besoins de chauffage, pastoralisme) et les changements climatiques globaux (succession et allongement des périodes de sécheresse).

Compte tenu d'une part de l'importance que peut revêtir la culture de l'arganier sur le plan économique, écologique et social pour le pays et d'autre part de la situation chaotique et désastreuse dans laquelle se trouve actuellement l'arganeraie Marocaine (situation pouvant entraîner sa déperdition), l'élaboration d'une stratégie nationale pour la conservation de l'espèce en question s'avère indispensable.



Figure 5 : fruits d'arganier



Figure 6 : arbre d'argane

b. Blé dur

Le blé est une monocotylédone de la famille des *Poaceae* appartenant au genre *Triticum*. Cette plante annuelle produit un fruit sec indéhiscent, le caryopse. Le blé dur (*Triticum durum*) est une espèce plus cultivées dans le monde

La production du blé est une activité agricole majeure qui a une implication importante sur l'économie nationale du Maroc. En moyenne, environ 3 millions hectares du blé sont cultivés annuellement au Maroc avec 2 millions hectares du blé tendre et 1 million hectares du blé dur (USDA, 2014). La superficie moyenne occupée par les fermes est moins que 5 ha, impliquant que la plupart de production du blé est entreprise par des pauvres fermiers avec de petites participations. Environ 94% de la superficie totale et 74% de la production se trouve dans les zones pluviales (Dahan et al., 2012). La production totale du blé en 2015 atteint 8 Mt, cette valeur a connu une augmentation par rapport à l'année 2014, dont la quantité était de 5 M.



Figure 7 : graines de blé dur

L'embryogenèse somatique est pratiquée pour avoir des cals embryogénèse ou des embryons pour permettre l'amélioration génétique et dépasser les limites de cette espèce.

C. Classification scientifique

- **Classification d'arganier**

- ✓ **Embranchement** : Phanérogames
- ✓ **Sous embranchement** : Angiospermes
- ✓ **Classe** : Dicotylédones
- ✓ **Sous –classe** : Gamopétales
- ✓ **Ordre** : Ebénales
- ✓ **Famille** : Sapotacées
- ✓ **Genre** : Argania
- ✓ **Espèce** : *Argania spinosa L*

- **Classification de blé dur**

✓ Règne	Plantae
✓ Sous-règne	Tracheobionta
✓ Division	Magnoliophyta
✓ Classe	Liliopsida
✓ Sous-classe	Commelinidae
✓ Ordre	Cyperales
✓ Famille	Poaceae
✓ Sous-famille	Pooideae
✓ Genre	Triticum
✓ Espèce	<i>Triticum turgidum</i>

Partie II

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail correspond à des graines matures d'arganier, qui ont été récoltées au Maroc dans la région d'Essaouira, au village de R'zwa (est une région située à 15 Km au sud de la ville d'Essaouira, sa nature du sol est essentiellement sableuse). Les collectes ont été faites par les chercheurs du laboratoire dans le cadre du projet arganier/INRA.

Le matériel végétal utilisé pour le blé dur est sous forme des embryons mis en culture dans des milieux d'induction auxquels on ajoute différentes concentrations de différentes hormones, utilisant des variétés existants au laboratoire

II. Méthodes

1. Multiplication végétative de l'arganier

a. Préparation des amandes

Pour récupérer les amandes, les fruits d'argan passent par une série d'opérations :

- La récolte des fruits : Les fruits récoltés doivent être sains et matures,
- L'épluchage du fruit : ils ont été épluchés pour séparer la pulpe de la noix. Cette dernière a été lavée dans l'eau de robinet contenant un peu de l'eau de javel, séchée au soleil, et stockée dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation,
- Le concassage de la coque : les noix d'arganier ont été cassées à l'aide de deux pierres, pour récupérer les amandes (figure 8)



Figure 8 : les amandes d'arganier

b. Stérilisation des amandes

Les amandes prélevées des graines matures ont été désinfectées pendant 1 min avec de l'éthanol à 70 % avant d'être immergés durant 15min dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) diluée à 20 % et additionnée de quelques gouttes de Tween 20 .Ces amandes ont ensuite été rincés trois fois à l'eau distillée stérile (E.D.S).Les tissus de l'arganier sont très sensibles à un phénomène de brunissement dû aux poly phénols. Pour surmonter cette difficulté, les amandes ont été trempées pendant une heure dans une solution anti-oxydante contenant 2g/l de Polyvinylpyrrolidone (PVP) stérile.

c. Germination des graines

Les amandes ainsi préparées ont été mis à germer dans des bocaux contenant un milieu de culture MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) dilué de moitié, a été utilisé comme milieu de base pour produire des plantules, puis les cultures ont été maintenues à l'obscurité et avec une température de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

d. Mise en culture

Les plantules obtenues après 30 jours de culture, ont été découpées en morceaux dans les conditions stériles sous la hotte. Elles ont été utilisées comme source d'explant juvénile tels que : cotylédons inférieur (Coty inf.) (0,5 cm de diamètre), cotylédons supérieur (Coty sup) (0,5 cm de diamètre), epicotyle (epi) (0,5 cm de longueur), hypocotyles (hypo) (0,5 cm de longueur), racines (R) (0,5 cm de longueur).



Figure 9 : Plantule d'arganier après quatre semaines de culture en milieu MS/2

Les différents explants ont été déposés sur les boîtes de pétri contenant un milieu de base MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962). Additionnées des concentrations en hormones de croissance

La culture ensuite a été scellée, à l'aide d'un parafilm, pour éviter les contaminations

Après la mise en culture, elle a été incubée sous une photopériode de 16h de la lumière et 8h d'obscurité avec une intensité lumineuse de $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et à une température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (figure 10)



Figure 10 : les différentes étapes de la mise en culture de l'explant

e. Sterilisation des instruments

Tous les instruments métalliques (pinces, scalpel...) ou verreries (Béchers, bocaux, tubes de culture...) ont été enrobés avec du papier aluminium, et mis à l'autoclave à une température de 121°C pendant 20 min. Au cours des manipulations les instruments métalliques ont été désinfectés par l'alcool à brûler, puis passés à la flamme du bec Bunsen.



Autoclave : sert à la stérilisation milieux de culture et du matériel



étuve : sert à conserver des milieux de la culture Des dans l'obscurité



Hôte à flux laminaire : travail en condition aseptiques

Figure 11: Matériel utilisé pour la stérilisation

2. Embryogénèse somatique du blé dur

a. Stérilisation du matériel végétal

Les graines ont été collectées 12-16 jours après l'anthèse, elles ont stérilisées par lavage dans l'éthanol 70% pendant 3 min Rincées dans javel avec une goutte de tween 20 pendant une période de 15 min Elles ont été rincées 3 fois à l'eau distillée stérile

b. Excision des embryons et mise en culture

L'embryon zygotiques ont été prélevés sous la loupe dans un environnement leurs axes ont été ôtés pour empêcher la germination précoce.les embryons ont été placés dans de boites de pétri contenant le milieu d'induction MS. le a été solidifié par 2,5g de phytigel.le PH a été ajusté à 5,7 avant la stérilisation à 121°C à l'autoclave pendant 20min. L'hormone peclorame a été stérilisée par filtration et ajoutée au milieu après refroidissement.

c. Condition de la culture

Les boites de pétri ont été incubées à l'obscurité à 25°C. Pour les expériences de transformation génétique. Les embryons dont les cellules ont présenté une division rapide, après 3-5 jours d'incubation ont été sélectionnés

d. Régénération des cals d'embryogénèse somatique

Le milieu de régénération et composé du milieu MS supplémenté de 100mg de Myo-inositol, et 30 g de saccharose .Le milieu a été solidifié par 3 g de phytigel.le pH ajusté à 5,7 avant la stérilisation à 120°C à L'autoclave pendant 20 minutes. Le BAP a été stérilisée par filtration et ajoutée au milieu après refroidissement.

Les plants régénérés ont été transférés au milieu d'enracinement (1/2 MS).

Partie III

Résultat et discussions

1. Multiplication de l'arganier

L'objectif de cet essai est de développer un protocole de régénération in vitro efficace et reproductible d'*Argania spinosa*.L. Des explants issus de cotylédons, d'épicotyles, d'hypocotyles et de racines prélevés à partir des amandes germées in vitro pendant 30 jours ont été mis en culture sur milieu Murashige and Skoog (MS) additionnés avec différentes concentrations et combinaisons de 6 - benzylaminopurine (BAP), Acide indole-3-butyrique (AIB) et la kinétine (Kin).

Les résultats préliminaires ont montré que parmi les différents explants (épicotyles, hypocotyles, cotylédons, racines) mis en culture, seuls les épicotyles ont régénérés des pousses tandis que les autres types ont formé des cals ou des racines ou bien ils finissent par se nécroser (Figure 12). Des bourgeons se forment à partir des épicotyles dans les dix premiers jours de culture, puis se développent en pousses de 0.5 à 1 cm de longueur.

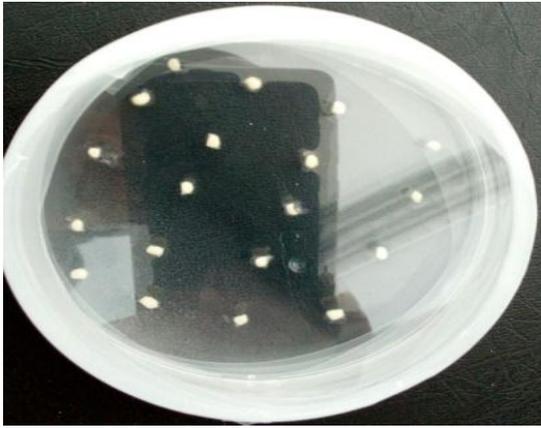


Figure 12 : Organogenèse de l'arganier : Formation des cals et des racines sur cotylédons et les hypocotyles a et b. Induction des bourgeons et apparition des pousses c et d

2. Embryogenèse somatique

a. Induction de l'embryon

Les premières observations faites montrent que les embryons excisés et mis en culture dans un milieu MS additionné de l'auxine Peclorame au lieu de 2,4D ont montré un bon développement en cals (figure 13). Ces cals embryogènes ont été transférées au milieu de régénération.



Embryons excisés sur milieu d'induction blé dur



Formation des cals et des racines après 5jr de l'incubation

Figure 13 : Induction des cals embryogènes

Le pourcentage de régénération sera noté après quelques semaines de culture. Plantules escomptées à régénérer (figure 14)



Figure 14 : Plantules régénérées par embryogénèse somatique

b. Principes étapes d'embryogénèse somatique

L'embryogénèse somatique est un processus dans lequel se développe un embryon somatique avec une structure bipolaire, identique à l'embryon zymotique

Généralement l'embryogénèse 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 deux premières étapes de l'embryogenèse somatique du fait que la durée du stage ne permet pas d'observer d'autres étapes.

c. Morphologie des embryons 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 embryons mis en culture ce qui indique leur adaptation au milieu et leur préparation à donner des cals (Figure 15 : A). Cette phase dure 5 jours.

La phase de prolifération est la deuxième phase de l'embryogenèse somatique, à sa fin on constate que la plupart des embryons ont donné des cals. Ces cals sont de couleur blanchâtre (Figure 15 : B). Cette phase dure une semaine.

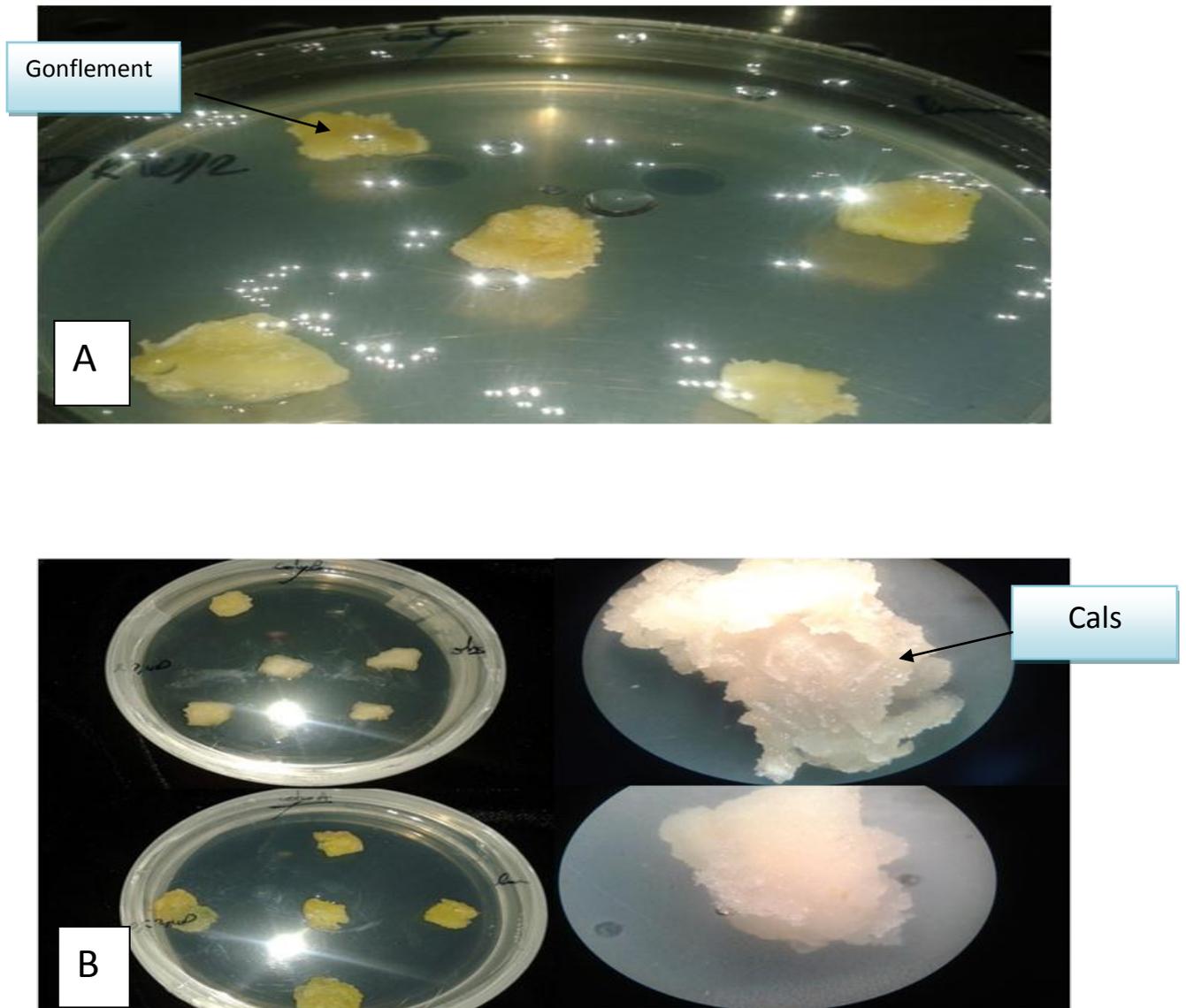


Figure 15: différent phase de l'embryogénèse somatique

Conclusion Générale

Nous avons essayé, dans ce travail, de déterminer la composition hormonale du milieu de culture qui pourra engendrer une régénération d'*Argania spinosa*. Il nous a paru nécessaire de tester le plusieurs milieux possible avec différents combinaisons hormonales, pour avoir plus de chances de trouver la composition du milieu qui induit à la formation des pousses et par la suite la réussite de la culture *in vitro* de l'arganier.

En ce qui concerne le blé dur, la technique d'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. Et l'introduction des gènes d'intérêt à savoir les gènes de tolérance à la sécheresse chez les lignées sélectionnées

Ce stage de courte durée était une opportunité très intéressante pour approfondir mes connaissances acquises au cours de ma formation dans le domaine de biotechnologie et ce en pratiquant les différents techniques de culture *in vitro*.

Références bibliographiques

- **Bretau** A., 2006. Les techniques de culture *in vitro* et la micropropagation des espèces végétales. IPR/Kolibougou Koulikoro.
 - **Casselle A.C., 1987.** *In vitro* induction of free-virus potatoes by chemotherapy .In Biotechnology and forestry.
 - **Demol J., Baudoin J.P. & Louant., 2008.** Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Ed. Presse agronomique de Gembloux, la Belgique.
- Margara J., 1989.** Base de la multiplication végétatives .Les méristèmes et l'organogenèse. Institut National de la recherche Agronomique
- **Soltner D., 2005a.** Les grandes productions végétales, phytotechnie spéciale-céréales-plantessarclées-prairies .Collection Sciences et Techniques Agricoles 20eme édition
 - **Ochatte C., 2005.** Growth, quality and biotechnology, WFP Publisher .Finland
 - **Caraglio Y., 2012.** L'organogenèse. UMR Cirad/Inra de Modélisation des plantes (AMAP). Programme modélisation des plantes du Cirad-amis <http://amap.cirad.fr/architecture/organo/organo.htm> introduction.
 - **Cedevit., 2013.** La culture *in vitro*. http://www2.ulg.ac.be/cedevit/french/Index-in_vitro-fr.htm
 - **Agnès B., Hélène R. & F. Louise., 2013.** La culture *in vitro* en TPE. <http://culture-in-vitrotpe.e-monsite.com/>
 - **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. 3ème 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**

- Guedira M, Dubois T, Vasseur J, Dubois J.**1989. Embryogénèse somatique directe à partir de cultures d'anthers du *Cichorium (Asteraceae)*. Revue canadienne de botanique, 67(4): 970-976.
- **Scriban, R.** (1988). Biotechnologie. 3ème édition revue, corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Paris 400p.
 - **Morel, G. (1952).** Guérison de dahlias atteints de maladie à virus. C.R. Acad. SCI. Paris.235 :1324_1325
 - **Limasset, P., et Cornuet, P. (1949).**Recherche du virus de la mosaïque du Tabac dans lesméristèmes des plantes infectées. CR. Ac. Sci. Paris. 228 : 1971-1972.
 - **Tisserat, B., Esane, B., et Murashige, T. (1979).** Somatic embryogenesis in Angiosperms. Hort. Rev 1: 1-78.
 - **Jay allemend, 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 horticultura. 51(3-4) : 335-342.
 - **Murashigue, T. And F Skoog., 1962** .A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaywith Tobacco Tissus Cultures .Physiologia Plantarum, 15:473_497.
 - **PATI, P.K., RATH, S.P., SHARMA, M., SOOD, A., AHUJA, P.S.***In vitro* propagation of rose - a review, *Biotechnol Adv* , 2006, vol. 24, p.94-114.
 - **MONTES, E.** Embryogenese somatique et transformation genetique du cotonnier via *agrobacterium tumefaciens* : mise au point d'une méthode de transformation sur tissus embryogènes. Theses. Ecole pratique des hautes études. 2009.
 - **GONÇALVES, S., ROMANO, A.,***In vitro* culture of lavenders (*Lavandula spp.*) and the production of secondary metabolites, *Biotechnol Adv*,2012,

Annexes

Annexe 1 : composition d'un litre de milieu MS

Elément	Concentration en 500ml
Macro éléments	
KNO ₃	38g
NH ₄ NO ₃	33g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	7,4g
KH ₂ PO ₄	3,4g
Micro élément	
KI	
MnSO ₂ , 4H ₂ O	0,166g
H ₃ BO ₃	4,46g
Na ₂ MO ,2H ₂ O	1,24g
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0,05g
	1,72g
Vitamine MS	
Dans 50ml d'eau distillé on ajoute :	25mg
Nicotine acide	25mg
Pyridoxine	5mg
Thiamine	5mg
Glycine	5mg
Solution ferrique :	
FeSO ₄ , 7H ₂ O	2,78g
NaEDTA, 2H ₂ O	3,73g

Annexe 2 : préparation de milieu MS

Elément	Concentration 1g/l
SI	25ml
SII	2,5ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O	25ml
Solution ferrique	10ml
Myo-inositol	100mg
sucrose	30g

Annexe 3 : préparation de milieu MS/2

Elément	Concentration 1g/l
SI	12,5ml
SII	1,25ml
CaCl ₂	12,5ml
Solution ferrique	10ml
Myo-inositol	100mg
sucrose	30g

pH	5,7_5,8
agar	8g
Phytigel	2,5g