

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية-الحراش (الجزائر)
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE-EL HARRACH
(ALGER)

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Sciences Agronomiques

Option : Amélioration de la résistance des plantes



Thème

Isolement purification et culture de protoplastes
de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)
variété Désirée

Présenté par :

M^{elle} AMZAL TASSADIT

Devant le jury :

Président : M^r BOUZNAD Z ; Professeur ENSA

Promotrice : M^{me} KHELIFI M ; Professeur ENSA

Examineurs : M^r KHELIFI L ; Professeur ENSA

M^{me} CHAOUCH FZ ; Maitre de conférences USDB Blida

Année universitaire 2009-2010

Résumé

Notre travail a porté sur l'isolement, la purification et la culture de protoplastes de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), variété Désirée. Pour ce faire deux types d'explants ont été utilisés, des feuilles de vitroplants âgés de 6 à 7 semaines issus de culture de bourgeons prélevés sur des germes de tubercules prégermés et des cals friables (d'entre nœuds et de feuilles) âgés de 4 à 5 semaines issus du repiquage des cals durs. Les concentrations d'enzymes 1% de cellulase trichoderma et 0.3% de macérozyme R-10 ; pH de 5 et 0.5 mole de mannitol ont permis l'obtention des meilleurs rendements (plus de 10^6 protoplastes/g- MF) après 3h00 et 6h00 de macération respectivement pour les protoplastes de feuilles et ceux issus de cals friables. La macération a été réalisée dans la solution MS sans sucre. L'addition du CaCl_2 à une concentration de 0.05 mole s'est avérée bénéfique pour la stabilité de la membrane plasmique des protoplastes issus de feuilles de vitroplants, les protoplastes de cals se sont montrés plus stables sans CaCl_2 . Au cours des essais de purification sur monocouche de saccharose les concentrations et vitesses de centrifugations 30% pendant 15 mns et 21% pendant 20 mns ont permis une bonne purification respectivement pour les protoplastes de feuilles de vitroplants et ceux issus de cals friables (d'entre nœuds et de feuilles). Le milieu de culture MS (macroéléments/2 sans NH_4NO_3 ; microéléments/2 + 3mg/l d'ANA + 1mg/l de BAP + 0.18 mole de glucose + 0.18 mole de mannitol + 0.07 de saccharose) a permis d'obtenir le meilleur taux de division qui a été de 21.22%. Le stade de microcolonies (plus de 10 cellules) a été atteint

Mots clés: Pomme de terre, Désirée, protoplastes, feuilles, cals, isolement, purification, culture.

Summary

Our work concerned the isolation, the purification and the culture of protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) variety Désirée. To do it two types of explants were used, leaves of vitroplants from 6 to 7 weeks stemming from culture of buds taken from germs of tubers and crisp callus of fragments of (internods and leaves) from 4 to 5 weeks stemming from the transplanting of the hard callus. The concentrations of enzymes 1 % of cellulase trichoderma and 0.3 % of macerozyme R-10; pH of 5 and 0.5 mole of mannitol allowed the obtaining the best returns (more than 10^6 protoplasts/g- FW) after 3:00 am and 6:00 am of maceration respectively for the protoplasts of leaves and those stemming from crisp callus. The maceration is realized in the solution MS without sugar. The addition of the CaCl_2 in a concentration of 0.05 mole turned out beneficial for the stability of the membrane plasmique of the protoplasts stemming from leaves of vitroplants, the protoplasts of callus showed itself more stable even without the addition of the CaCl_2 . During the essays of purification on monolayer of saccharose the concentrations and the speed of centrifugation hanging 30 % 15 mns and hanging 21 % 20 mns allowed a good purification respectively for the protoplasts of leaves of vitroplants and those stemming from crisp callus (of internods and of leaves). The medium of culture MS (macroelements / 2; microelements / 2 + 3mg / l of ANA + 1mg / l of BAP + 0.18 mole of glucose + 0.18 mole of manntol + 0.07 mole of sucrose) allowed to obtain the best rate of division which is 21.22 %, the stage of microcolonies (more of 10 cells) was reached.

Key words: Potato, Désirée, protoplasts, leaves, callus, isolation, purification, culture.

□ لخص:

تتمثل الدراسة التي قمنا بها في عزل البروتوبلاستات (خلايا بدون جدار سليلوزي) للبطاطا (*Solanum tuberosum*.L) فصيلة (désirée) تصفيتها ، ثم القيام بزراعتها .من أجل ذلك إستعملنا نوعين من الأنسجة ، أوراق نباتات أنبوبية عمرها 6 إلى 7 أسابيع وكالوسات (الظاهرة على قطع من الساق والأوراق) عمرها 4 إلى 5 أسابيع.

ثم نقع الأنسجة في الوسط (MS) سائل بدون سكر ,تركيز الأنزيمات السليلوزية (1%) والبكتينية (0.3%) ، PH (5) ، و 0.5 مول من المانيتول سامحوا لنا بتحقيق أعلى مردود من البروتوبلاستات (أكثر من 10^6 بروثوبلاش (غ و أ) ، بعد 3 ساعات للأوراق و6 ساعات للكالوسات.

كان لإضافة ($CaCl_2$) بتركيز 0.05 مول إلى وسط النقع أثر إيجابي على توازن الغشاء السيتوبلازمي ومكونات السائل السيتوبلازمي وعدم نلاصق بروتوبلاستات نسيج الأوراق ، أما بروتوبلاستات نسيج الكالوسات فلم يتأثروا بعدم إضافة ($CaCl_2$) إلى وسط النقع.

ثم تصفية البروتوبلاستات على طبقة واحدة من السكروز بتركيز 30 % للأوراق و 21% للكالوسات.

زراعة البروتوبلاستات في الوسط الزراعي MS ($2+ macroéléments/2+ microéléments/2$ + 3 ملغ/ل ANA + 1 ملغ/ل BAP + 0.18 مول جلوكوز + 0.18 مول مانيتول + 0.07 مول سكروز) سمح بالحصول على أحسن معدل إنقسام (21.22 %) ، تمكنا من الوصول إلى طور أكثر من 10 خلايا .

كلمات مفتاح : بطاطا ، désirée ، بروتوبلاستات ، أوراق ، كالوسات ، تصفية ، زراعة .

REMERCIEMENT

Au terme de ce travail je tiens à exprimer ma forte gratitude et reconnaissance à ma promotrice Mme KHELIFI, Docteur en biologie végétale et forestière pour la qualité de son encadrement, ses encouragements et ses conseils.

Je remercie également Mr BOUZENAD pour bien vouloir présider le jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements vont également à Mr KHELIFI pour ses précieux conseils et à M^{me} CHAOUCH qui me font l'honneur de participer au jury de cet examen.

J'exprime ma profonde reconnaissance à M^{me} DJAMILA ingénieur du Laboratoire des Ressources Génétique et Biotechnologies (L-RGB) pour son aide et sa disponibilité durant toute l'expérimentation.

Je tiens à remercier également tous mes camarades du laboratoire pour leurs aides, conseils et soutien durant toute l'expérimentation.

Je ne saurais oublier de remercier tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes chers parents

*A mes frères, Hakím et Boussad et mes beaux frères Fahím et
abderrahmane*

A mes sœurs Kahína, Nawel, Nadia, Fifi et à ma belle sœur Lila

A mes chers neveux, Samí, Massínissa et Ghíllas

A mes amies Louíza, Djamíla et Assia

A toute la famille AMZAL et AMANI

Je dédie ce modeste travail

Liste des abréviations

* : effet significatif ;

** : effet hautement significatif ;

*** : effet très hautement significatif ;

AIA : acide indolacétique ;

ANA : acide naphtylacétique ;

BAP : 6-benzyl-aminopurine ;

2-4-D : 2, 4 Dichlorophenoxyacétique.

CNCC : Centre national de control et de certification ;

ddl : degré de liberté ;

DSA : Direction des services agricoles ;

FAO : Food and Agriculture Organization;

G : génération ;

G : grossissement ;

GA₃ : acide gibbérelique ;

g-MF : gramme de masse fraiche;

ITCMI : Institut technique des cultures maraichères et industrielles ;

L-RGB : Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies ;

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural ;

mg/l : milligramme par litre ;

NS : effet non significatif ;

P : probabilité ;

pH : potentiel hydrogène ;

PPDS : Plus Petite Différence Significative ;

SCE : somme des carrés des écarts ;

Liste des tableaux

Tableau 1 : Production mondiale de pomme de terre, 1991-2007 (FAO, 2008)	P 05
Tableau 2 : Surface récoltée, production de pomme de terre et rendement dans différentes régions du monde en 2007 (FAO, 2008)	P 05
Tableau 3 : Evolution de superficie, de production et du rendement de pomme de terre de consommation en Algérie (MADR, 2008)	P 07
Tableau 4 : Composition hormonale des différents milieux de calogénèse	P 28
Tableau 5 : Composition hormonale des milieux d'organogénèse (essai 1)	P 29
Tableau 6 : Composition hormonale des milieux d'organogénèse (essai 2)	P 30
Tableau 7 : Concentrations enzymatiques appliquées aux cals	P 32
Tableau 8 : Composition minérale de la solution CPW.....	P 33
Tableau 9 : Composition des milieux de culture de protoplastes utilisés (pour 1 litre de solution)	P 37
Tableau 10 : Résultats de la purification sur monocouche de saccharose 21% et 30%.....	P 82

Liste des figures

- Figure 1** : Totipotence cellulaire végétale et son exploitation par manipulations génétiques (AUGE, 1989). **P 15**
- Figure 2** : Protocole expérimental adopté **P 39**
- Figure 3** : Evolution du taux de réactivité des fragments d'entre nœuds en fonction du temps et des différents milieux testés **P 42**
- Figure 4** : Evolution du taux de réactivité des fragments de feuilles en fonction du temps et des différents milieux testés **P 42**
- Figure 5** : Taux de cals d'entre nœuds rhizogènes après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés **P 43**
- Figure 6** : Nombre moyen de racines néoformées sur cals d'entre nœuds après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés **P 44**
- Figure 7** : Taux de cals de feuilles rhizogènes après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés **P 45**
- Figure 8** : Nombre moyen de racines néoformées par cals de feuilles après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés..... **P 46**
- Figure 9** : Evolution du taux de cals issus d'entre nœuds présentant une néoformation de bourgeons sur le milieu M6 en fonction du temps **P 48**
- Figure 10**: Evolution du nombre moyen de bourgeons néoformés sur cals d'entre nœuds sur le milieu M6 en fonction du temps **P 49**
- Figure 11**: Evolution du taux de cals issus de feuilles présentant une néoformation de de bourgeons sur le milieu M6 en fonction du temps. **P 49**
- Figure 12**: Evolution du nombre moyen de bourgeons néoformés sur cals de feuilles sur le milieu M6 en fonction du temps **P 50**
- Figure 13** : Evolution du taux de cals d'entre noeuds présentant une néoformation de bourgeons sur le milieu M7 en fonction du temps **P 53**
- Figure 14** : Evolution du nombre moyen de bourgeons néoformés sur cals d'entre nœuds sur le milieu M7 en fonction du temps **P 53**
- Figure 15** : Evolution du taux de fragments de feuilles présentant des Bourgeons adventifs sur le milieu M7 en fonction du temps **P 54**

Figure 16 : Evolution du nombre moyen de bourgeons adventifs sur fragments de feuilles sur le milieu M7 en fonction du temps	P 54
Figure 17 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux , selon les différentes concentrations de macérozyme R-10 et en fonction du temps.	P 57
Figure 18 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables , selon les différentes concentrations de macérozyme R-10 et en fonction du temps.	P 57
Figure 19 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux , selon les différentes concentrations de mannitol et en fonction du temps.	P 58
Figure 20 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables , selon les différentes concentrations de mannitol et en fonction du temps.	P 59
Figure 21 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux , selon le pH et en fonction du temps.	P 60
Figure 22 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, selon le pH et en fonction du temps.	P 60
Figure 23 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux , avec ou sans CaCl ₂ en fonction du temps.	P 63
Figure 24 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables , avec ou sans CaCl ₂ en fonction du temps.	P 64
Figure 25 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, avec la solution MS et CPW en fonction du temps.....	P 65
Figure 26 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, avec la solution MS et CPW en fonction du temps.	P 65
Figure 27 : Protoplastes issus de mésophylle foliaire de vitroplants de 1 ^{ère} génération obtenus après 4h30 de macération dans la solution CPW.	P 66
Figure 28 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, en fonction de l'âge et en fonction du temps.	P 67
Figure 29 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, en fonction de l'âge et en fonction du temps.	P 67
Figure 30 : Protoplastes de mésophylle foliaire issus de vitroplants de la G1 âgés de 12 semaines après 4h30 de macération.....	P 68
Figure 31 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux issus de feuilles de vitroplants (de a : G ₂ ; b : G ₃) avec ou sans CaCl ₂ en fonction du temps.....	P 69
Figure 32 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables issus de feuilles de vitroplants (de a : G ₂ ; b : G ₃) avec ou sans CaCl ₂ en fonction du temps.....	P 69

- Figure 33** : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux issus de feuilles de vitroplants en fonction des générations et du temps..... **P 71**
- Figure 34** : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables issus de feuilles de vitroplants en fonction des générations et du temps **P 71**
- Figure 35** : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux issus de cals durs (de a : entre nœuds ; b : feuilles) en fonction des différentes combinaisons enzymatiques et du temps de macération..... **P 74**
- Figure 36** : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables issus de cals durs (de a : entre noeuds ; b : feuilles) en fonction des différentes combinaisons enzymatiques et du temps de macération..... **P 74**
- Figure 37** : Cals friables obtenus, 5 semaines après fragmentation et repiquage des cals durs sur milieu de callogenèse M4 (EN: entre nœuds, F: feuilles) **P 77**
- Figure 38** : Protoplastes issus de cals friables..... **P 77**
- Figure 39** : Evolution du nombre moyen de protoplastes (a : totaux ; b : viables) issus de cals friables d'entre nœuds et de feuilles en fonction du temps de macération ... **P 77**
- Figure 40** : Protoplastes issus de cals friables de feuilles après purification sur monocouche de saccharose à 21% à une vitesse de centrifugation de 75% pendant 20 minutes **P 83**

Liste des planches

- Planche 1:** Aspect de vitroplant de 3^{ème} génération, (G3), (G x 1) Cals d'entre noeuds après 5 semaines de culture selon les 4 milieux testés (M1, M2, M3 et M4) **P 44**
- Planche 2:** Aspects des cals de feuilles après 5 semaines de leur mise en culture selon les 4 milieux testés (M1, M2, M3, et M4) **P 46**
- Planche 3:** Aspects des cals issus de fragments d'entre noeuds et de feuilles après 11 semaines de mise en culture sur le milieu M5. EN : entre noeuds (G x 1); F : feuilles (G x 0,92). **P 47**
- Planche 4 :** Bourgeons néoformés après transfert sur milieu M6 et les vitroplants qui en dérivent **P 51**
- Planche 5 :** Comportement des explants de feuilles et d'entre noeuds sur les milieux M7 et M8 **P 55**
- Planche 6 :**Protoplastes issus du mésophylle foliaire de vitroplants de 1^{ère} génération âgés de 6 semaines **P 62**
- Planche 7 :** Protoplastes issus de mésophylle foliaire de vitroplants (de a : G₂ ; b : G₃) obtenus après 4h30 de macération dans la solution MS additionnée de 0.05 mole de CaCl₂ **P 70**
- Planche 8 :** Protoplastes issus de mésophylle foliaire de vitroplants (de a : G₂ ; b : G₃) obtenus après 4h30 de macération dans la solution MS sans CaCl₂ **P 70**
- Planche 9 :** Tissus de cals durs récalcitrants à la digestion enzymatique..... **P 75**
- Planche 10 :** Centrifugeuse, a : vitesses en pourcentage, b : rotor libre Différentes étapes de purification des protoplastes issus du mésophylle foliair **P 80**
- Planche 11 :** Protoplastes issus de mésophylle foliaire après purification sur monocouche de saccharose 30% **P 77**
- Planche 12 :** Différents stades de divisions cellulaires. A : sur milieu S1, B : sur milieu S2, C : sur milieu S3 **P 87**
- Planche 13 :** Différents stades de divisions cellulaires sur milieu S4. **P 88**

SOMMAIRE

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I- Généralités sur la pomme de terre	4
1- Modes de multiplication de la pomme de terre	4
2- Situation économique.....	4
2-1 Dans le monde.....	4
2-2 En Algérie.....	5
3- Maladies de la pomme de terre.....	8
4- Lutte contre les maladies.....	8
4-1 Méthodes traditionnelles.....	8
4-2 Amélioration génétique pour la résistance aux agents pathogènes	10
4 -2-1 Sélection créatrice traditionnelle.....	10
4-2-2 Culture in vitro et biotechnologies.....	12
a- Mutagenèse	12
b- Ingénierie génétique	12
c- Culture in vitro et variants somaclonaux	13
II- Les protoplastes	16
1- Définition.....	16
2- Source du matériel végétal.....	16
3- Obtention des protoplastes.....	16
3-1 Plasmolyse des cellules.....	16
3-2 Traitements permettant l'isolement des protoplastes.....	17
3-2-1 Traitement mécanique.....	17
3-2-2 Traitement enzymatique.....	17
4- Purification des protoplastes libérés	18

4-1 Origine des protoplastes	19
4-2 Nature de l'agent de purification.....	19
5- Culture de protoplastes	19
5-1 Milieux liquides.....	19
5-2 Milieux semi solides	20
5-3 Techniques de couches nourrices.....	21
6- Milieux de culture	21
III- Objectif du travail	23

Matériel et méthodes

I Origine du matériel végétal	25
II Conditions de travail	25

III Culture proprement dite	26
1- Micro propagation du matériel végétal.....	26
1-1 Milieu de micropropagation.....	26
1-2 Méthode de micropropagation.....	27
2- Aptitude de la variété Désirée à la callogenèse et à l'organogenèse	27
2-1 Callogenèse.....	27
2-1-1 Milieux de culture.....	27
2-1-2 Observations réalisées.....	28
2-2 Organogenèse.....	29
2-2-1 À partir de cals	29
2-2-2 À partir de fragments de feuilles et d'entre nœuds	30
2-2-3 Observations réalisées.....	30

IV LES PROTOPLASTES	30
1- Isolement.....	30
1-1 Matériel végétal utilisé	30

1-2 Composition de la solution de macération.....	31
1-2-1 Milieu minéral.....	31
1-2-2 Enzymes.....	31
1-2-3 Agent plasmolysant.....	32
1-2-4 pH.....	32
1-2-5 Effet du CaCl ₂	33
1-2-6 Effet de la solution CPW	33
1-3 Conditions physiques de macération.....	33
1-4 Test de viabilité.....	34
1-5 Dénombrement des protoplastes	34
2- Purification.....	34
3- Culture.....	35

V- Protocole experimental	39
----------------------------------	-----------

VI- Analyse statistique et representation graphique	40
--	-----------

Resultats

I- Callogenèse et caulogenèse	41
--------------------------------------	-----------

1- Callogenèse.....	41
1-1 Réactivité.....	41
1-1-1 Fragments d'entre nœuds	41
1-1-2 Fragments de feuilles.....	41
1-2 Racines néoformées	42
1-2-1 Sur cals d'entre nœuds.....	42
1-2-2 Sur cals de feuilles.....	45
2 Caulogenèse.....	47
2-1 Sur les cals précédemment obtenus	47
2-1-1 Cals issus d'entre nœuds.....	48
2-1-2 Cals issus de feuilles.....	49
2-2 Sur les fragments de feuilles et d'entre nœuds.....	52
2-2-1 Les entre nœuds.....	52

2-2-2 Les feuilles	56
--------------------------	----

II- Protoplastes	56
-------------------------	-----------

1- Isolement.....	56
-------------------	----

1-1 À partir du mésophylle foliaire.....	56
--	----

1-1-1 Vitro plants de 1 ^{ère} génération (G1).....	56
---	----

a- Effets des différentes composantes de la solution de macération.....	56
---	----

a-1 Concentration en enzymes.....	56
-----------------------------------	----

a-2 Concentration de mannitol.....	58
------------------------------------	----

a-3 pH.....	59
-------------	----

a-4 CaCl ₂	63
-----------------------------	----

a-5 Solution CPW.....	64
-----------------------	----

b- Age des vitro plants (G1).....	66
-----------------------------------	----

1-1-2 Vitroplants G 2 et G 3.....	68
-----------------------------------	----

1-1-3 Effet des générations.....	71
----------------------------------	----

1-1-4 Bilan.....	72
------------------	----

1-2 À partir des cals d'entre nœuds et de feuilles.....	72
---	----

1-2-1 Cals durs.....	72
----------------------	----

1-2-2 Cals friables.....	76
--------------------------	----

1-2-3 Bilan.....	76
------------------	----

2- Purification.....	78
----------------------	----

2-1 Purification des protoplastes issus du mésophylle foliaire.....	78
---	----

2-1-1 Pré purification	78
------------------------------	----

2-1-2 Purification finale sur monocouche de saccharose.....	78
---	----

2-1-3 Bilan.....	72
------------------	----

2-2 Purification des protoplastes issus de cals : friables de feuilles et d'entre nœuds.....	82
---	----

3- Culture de protoplastes de mésophylle foliaire	84
---	----

Discussion

I- Callogenèse	89
1- Réactivité.....	89
2- Développement des cals.....	90
3-Organogenèse.....	91
3-1 Rhizogenèse.....	91
3-2 Caulogenèse.....	92
3-2-1 Sur cals.....	92
3-2-2 Sur fragments de feuilles et d'entre nœuds.....	93
II-Protoplastes	95
1- Isolement.....	95
1-1 A partir du mésophylle foliaire.....	95
1-1-1 Durée de macération et concentration en enzymes.....	95
1-1-2 Concentration de mannitol.....	96
1-1-3 pH.....	97
1-1-4 Age des vitroplants.....	98
1-1-5 Effet du CaCl₂ et de la solution CPW.....	99
1-1-6 Etat du matériel végétal utilisé.....	101
1-2 A partir des cals d'entre nœuds et de feuilles.....	101
2- Viabilité.....	103
3- Purification.....	103
4- Culture.....	104
Conclusion générale	107

INTRODUCTON

INTRODUCTION

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L) est la plante alimentaire et économique la plus importante de la famille des solanaceae, le genre solanum regroupe environ 2000 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses (**HAWKES, 1990 in GALLAIS et BANNEROT, 1992**). Connue dans les Andes (son pays d'origine) depuis 8000 ans environ, elle fut introduite en Europe grâce aux espagnols au 16^{ème} siècle, elle a rapidement gagné le reste du globe (**FAO, 2008**).

La pomme de terre est actuellement le quatrième aliment dans le monde après le riz, le blé et le maïs. Elle est cultivée dans 151 pays, 18 millions d'hectares sont plantés annuellement pour produire à peu près 324 millions de tonnes. Elle contribue à réduire la faim, à obtenir la sécurité alimentaire, et améliore le revenu des plus pauvres populations (**FAO, 2008**).

Le tubercule est la justification économique de la culture de la pomme de terre (**ROUSSELLE et al, 1996**), il intervient dans l'alimentation humaine, l'alimentation du bétail, et en industrie féculière.

En Algérie la pomme de terre est un produit de large consommation, son ratio en 2005 a été de l'ordre de 50 kg par habitant et par an (**ITCMI, 2008**). Selon **CHEHAT (2008)** ces besoins devraient atteindre 65 kg/ habitant/ an et exiger une production annuelle de 2.3 millions de tonnes.

En effet la production nationale en pomme de terre de consommation a pu dépasser les 2.1 millions de tonnes au cours des années 2005/2006, récoltées sur une superficie dépassant les 98 000 hectares, qui représentent plus de 26% de la superficie consacrée aux cultures maraîchères (**MADR, 2006**). Néanmoins, en 2007 cette production a chuté pour atteindre 1.50 millions de tonnes sur une superficie de 79 339 hectares (**MADR, 2007**).

Jusqu'ici et malgré quelques crises conjoncturelles liées à un déficit ou à un excédent saisonnier, la production locale a réussi à suivre l'évolution de la demande et à y répondre correctement (**CHEHAT, 2008**).

Cependant, si l'Algérie arrive à subvenir en grande partie à ses besoins en matière de pomme de terre de consommation, elle reste largement dépendante vis-à-vis des pays producteurs pour assurer son approvisionnement en semences.

Nos besoins annuels en semences sont estimés à 210 000 tonnes (**GACEM, 2008**). Ils sont assurés en partie par une production locale qui couvre approximativement 60% des besoins, le reste étant assuré par le biais des importations (**ITCMI, 2008**).

Au cours des années 1995 jusqu'à 2007, il a été importé en moyenne annuelle 88 298 tonnes de semences pour une valeur de 84.8 millions de US\$ (**CHEHAT, 2008**).

Une partie de ce matériel importé, soit 25 000 tonnes, est prélevée en classe élite et sert à produire les plants de classe A pour un objectif dépassant les 120 000 tonnes (**ITCMI, 2008**).

Cette situation pose au moins deux problèmes :

- Vulnérabilité de la production de saison pour laquelle d'importantes superficies sont plantées à partir de semences importées ;

- Dépendance de l'étranger quant à notre production de semences destinée à la tranche arrière saison et primeurs, car jusqu'à présent nous ne disposons pas de matériel de multiplication de base.

En outre l'importation de la semence peut avoir des répercussions désastreuses du point de vu sanitaire, avec l'introduction de diverses maladies à travers les tubercules (**OULD KIAR et al, 2005**).

Cette situation nécessite des solutions profondes afin de satisfaire localement une grande partie et pourquoi pas la totalité de nos besoins en semences de base. Dans ce contexte des initiatives ont été prises depuis 03 ans par des entreprises privées. Comme à titre d'exemple celle de la SAGRODEV (Société Agro développement) pour la production de semences saines à partir de culture de méristèmes (**LAHMISSI, 2004 ; OULHA, 2005**)

La production de semences peut se faire par deux voies (**KHELIFI et al, 2008**) :

- Voie classique : sélection par les méthodes traditionnelles ;
- Voie moderne : par utilisation des vitro méthodes.

Les techniques de culture in vitro peuvent engendrer deux situations possibles (OUDIN, 1982 ; LAFON, 1987) :

- La conformité : les vitroplants sont obtenus par stimulation de l'organogenèse sur des explants organisés (tiges, bourgeons, méristèmes) sans passer par la voie de cals ;
- La variabilité : les vitroplants sont produits à partir de la néoformation d'organes sur des explants organisés ou inorganisés (cals ou colonies cellulaires). Cette technique représente une source de variabilité génétique. On obtient alors des individus non conformes à la plante mère et dont les phénotypes peuvent avoir un intérêt particulier dans les programmes de sélection, mais pas pour la multiplication conforme de la variété.

Dans ce cadre là, les protoplastes offrent un intéressant système cellulaire pour l'induction de la variabilité génétique par :

- Fusion de protoplastes, qui peut conduire à une hybridation probable des noyaux mais aussi à celle des cytoplastes. Ceci est très intéressant pour le transfert de caractères à hérédités cytoplasmiques ;
- Variation somaclonale suite à leur culture.

Ainsi la présente étude vise à mettre au point un protocole d'isolement, de purification et de culture de protoplastes de pomme de terre, « variété Désirée ».

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- GENERALITE SUR LA POMME DE TERRE

1- Modes de multiplication de la pomme de terre

La pomme de terre cultivée *Solanum tuberosum* L est une espèce tétraploïde ($2n = 4x = 48$) dont les cultivars sont des clones hétérozygotes (**ROUSSELLE et al, 1992**).

L'utilisation des graines pour la multiplication est commercialement impossible à cause de leur faible pouvoir germinatif et de leur large variabilité génétique due aux ségrégations chromosomiques complexes lors de la méiose, les graines peuvent varier génétiquement à l'intérieur du même fruit et par rapport aux plants parent (**TICAN et al, 2008**). D'où la multiplication par voie végétative (tubercule) qui assure la fixation des caractères (**CORNUET, 1959**).

Ce mode de multiplication présente l'inconvénient de transmettre diverses maladies responsables de chutes considérables de rendements et d'une dépréciation de la qualité des tubercules, nuisant ainsi à leur commercialisation (**CORNUET, 1959**).

2- Situation économique

2-1 Dans le monde

Cultivée dans plus de 150 pays, la pomme de terre joue un rôle clé dans le système alimentaire mondial. C'est la principale denrée alimentaire non céréalière du monde.

Comme elle est facile à cultiver et que sa teneur énergétique est élevée, c'est une culture commerciale précieuse pour des millions d'agriculteurs (**FAO, 2008**).

Dans les pays développés, la consommation de pomme de terre a augmenté considérablement et représente plus de la moitié de la récolte mondiale qui a atteint le chiffre record de 325 millions de tonnes en 2007 (**Tableau 1**).

Selon la **FAO (2008)** depuis 1990, la production et la demande de pomme de terre ont enregistré une forte croissance en Asie, en Afrique et en Amérique latine, où la production est passée de moins de 30 millions de tonnes au début des années 60 à plus de 165 millions de tonnes en 2007, dépassant ainsi celle du monde développé (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Production mondiale de pomme de terre, 1991-2007 (FAO, 2008)

	1991	1993	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2007
<i>Pays</i>	<i>millions de tonnes</i>								
développés	183,13	199,31	177,47	174,63	165,93	166,93	160,97	159,97	159,89
en développement	84,86	101,95	108,50	128,72	135,15	145,92	152,11	160,01	165,41
MONDE	267,99	301,26	285,97	303,35	301,08	312,85	313,08	319,98	325,30

L'Asie et l'Europe sont les deux principales régions productrices de pomme de terre du monde de par les superficies qui lui sont consacrées et les quantités récoltées, elles ont fourni plus de 80% de la production mondiale en 2007. C'est l'Amérique du Nord qui a enregistré le rendement le plus élevé, avec plus de 40 tonnes par hectare (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Surface récoltée, production de pomme de terre et rendement dans différentes régions du monde en 2007 (FAO, 2008)

	<i>Surface récoltée</i>	<i>Quantité</i>	<i>Rendement</i>
	<i>hectares</i>	<i>tonnes</i>	<i>tonnes/hectare</i>
Afrique	1 541 498	16 706 573	10,8
Asie et Océanie	8 732 961	137 343 664	15,7
Europe	7 473 628	130 223 960	17,4
Amérique latine	963 766	15 682 943	16,3
Amérique du Nord	615 878	25 345 305	41,2
MONDE	19 327 731	325 302 445	16,8

2-2 En Algérie

Parmi les produits de base, la pomme de terre revêt une place stratégique par son importance dans notre alimentation, les surfaces qu'elle occupe, les emplois qu'elle procure et les quantités de production qu'elle génère. Par conséquent, les flux financiers qu'elle mobilise sont considérables tant en amont qu'en aval de sa culture (**ITCMI, 2008**).

Selon **CHEHAT (2008)** le développement de la filière a entraîné un accroissement de son poids économique et social. En effet la filière représentait en 2007 un chiffre

d'affaire évalué à 98 milliards de dinars, soit près de 1.5 milliards de US\$. Elle assure directement l'équivalent de 52 000 emplois permanent et près du double si on comptabilise les emplois indirects.

La consommation par habitant et par an a subi une croissance très significative entre 1970 et 1998, passant de 20 kg à 42 kg pour se maintenir à un niveau quasi constant jusqu'en 2002. A partir de 2005 la consommation a encore augmenté en raison des prix très accessibles affichés sur le marché pour atteindre 50 kg/ habitant et par an (**ITCMI, 2008**).

Les superficies réservées à la pomme de terre de consommation ont enregistré une croissance de 43.79 % en moyenne, passant ainsi de 68 640 ha en 1998 à 98 825 ha en 2006 (**Tableau 3**).

La production (toutes saisons confondues) quant à elle a presque doublé en l'espace de 9 ans, elle est passée de 11 000 000 qx en 1998 pour atteindre en 2006 plus de 21 000 000 qx en enregistrant un taux de croissance de 90.90% (**Tableau 3**).

D'après **CHEHAT (2008)** la croissance de la production serait liée essentiellement à une amélioration des rendements qui s'expliquent par une maîtrise des itinéraires techniques par les agriculteurs. Un bon nombre de ces derniers se spécialisent dans la culture de la pomme de terre. Et par une utilisation accrue et systématique de fertilisants ainsi que par la généralisation de l'irrigation par aspersion.

Ceci a permis pour certains cultivateurs d'obtenir régulièrement des rendements très élevés (300 qx/ha) par rapport à la moyenne, surtout dans les wilayas d'Ain Defla et de Mascara. La wilayat de Ain Defla occupe la première place en terme de superficies cultivées, dépassant les 15 000 ha pour une production de plus de 350 000 tonnes et assure ainsi en moyenne 25% de la consommation et par fois jusqu'à 40% des semences (**DSA Ain Defla, 2008**).

Tableau 3 : Evolution de superficie, de production et du rendement de pomme de terre de consommation en Algérie (MADR, 2008)

<i>Année</i>	<i>Superficie (ha)</i>	<i>Production (q)</i>	<i>Rendement (q/ha)</i>
1998	68 640	11 000 000	160,3
1999	64 890	9 962 680	153,5
2000	72 690	12 076 900	166,1
2001	65 790	9 672 320	147
2002	72 560	13 334 650	183,8
2003	88 660	18 799 180	212,0
2004	93 144	18 962 700	203,6
2005	99 717	21 568 787	216,3
2006	98 825	21 809 610	220,7
2007	79 339	15 068 590	189

Malgré l'accroissement des rendements enregistré durant la dernière décennie, ces derniers restent influencés par plusieurs contraintes qui limitent l'ampleur des progrès réalisables, entre autres (MOUHOUCHE et BAZOUCHE 2008) :

- La rareté de l'eau pour l'irrigation surtout pour les cultures de primeur et d'arrière saison;
- Le coût de mise en place de la culture nécessitant un travail du sol soigneux, une fumure de fond, l'épandage d'importantes quantités de fertilisants, l'utilisation de 20 à 25 quintaux de semences par hectare et l'apport à plusieurs reprises de produits phytosanitaires. En 2007 pour la culture de saison, ce coût atteignait en moyenne 475 000 DA/ ha ;
- Disponibilité d'une semence de bonne qualité et en quantité suffisante.

Selon CHEHAT (2008) le segment production de semences n'a pas suivi la dynamique connue par le segment production de pomme de terre de consommation et une

partie des besoins serait couverte par des importations, particulièrement depuis 1999. Ces importations n'ont cessé d'augmenter suite à la croissance des superficies plantées. La disponibilité en qualité et en heure de la semence importée sur le marché Algérien dépendra de l'abondance relative de ce produit sur les marchés Hollandais, Français et Danois qui représentent nos principaux fournisseurs.

3- Maladies de la pomme de terre

Selon **BOUZNAD (2008)** la pomme de terre est sensible à beaucoup de maladies et ravageurs, qui peuvent avoir une action significative sur la culture, en particulier le mildiou qui peut causer la perte totale de la culture.

JELLIS et BOULTON (1984) in **ROUSSELLE et al (1992)** estiment qu'au niveau mondial les maladies causent 32% de pertes avec :

- 30% causées par des champignons ;
- 20% causées par des virus ;
- 10% causées par les bactéries.

Selon **LOUANCHI (1988)** Les maladies virales représentent l'une des affections les plus redoutables, elles sont incurables et dites de dégénérescence et pour les quelles aucune lutte chimique n'est possible, disséminées principalement par certains insectes pucerons, cicadelles, aleurodes, et acariens (infection primaire) et par le mode de multiplication végétatif de certaines plantes tel que les tubercules pour la pomme de terre (infection secondaire).

Parmi ces maladies nous citons les plus importantes :

- Le PLRV (virus de l'enroulement de la pomme de terre), qui cause des pertes de rendements assez importantes pouvant atteindre 90% (**CIP, 1979**).
- Le VPY (virus Y de la pomme de terre, responsable de mosaïque) qui peut provoquer jusqu'à 80% de pertes suivant la sensibilité des variétés et les souches de virus (**CIP, 1979**).

4- LUTTE CONTRE LES MALADIES

4-1 Méthodes traditionnelles

Certaines pratiques peuvent largement influencer l'apparition et la transmission des maladies, parmi elles :

- Le respect des rotations : **PETERS et al (2004)** rapportent que l'assolement accroît la résistance de la pomme de terre à *Phytophthora erythroseptica* (agent causal de la pourriture rose de la pomme de terre) et que les plants de pomme de terre cultivés dans des parcelles assolées trois ans sont plus résistants aux attaques des pathogènes que ceux cultivés dans des parcelles assolées deux ans. L'interposition de plants non hôtes dans le temps et dans l'espace diminue la vitesse de propagation des épidémies (**RIB et SILVY, 1989** in **LAHMISSI, 2004**).
- La fertilisation minérale peut par son équilibre, ses carences ou ses excès influencer la gravité des maladies. Pour **LAURENT (1997)** un excès d'azote génère une production excessive de feuillage maintenant une humidité élevée, favorisant ainsi certains parasites obligatoires (rouille, oïdium).
- Le choix de la date de semis peut être manipulé afin de réduire l'incidence des viroses, ceci est particulièrement aisé si l'abondance des vecteurs se produit au cours d'une période donnée que l'on évite de faire coïncider avec une phase sensible de la culture (**LEPOIVRE, 2003**).
- La lutte contre les mauvaises herbes qui sont des végétaux nuisibles pour les plantes cultivées, avec lesquelles elles entrent en compétition pour l'eau, l'espace et les éléments minéraux. Elles jouent aussi le rôle de plantes hôtes de divers parasites, insectes, champignons, bactéries et virus, constituant ainsi une source d'infection importante si elles ne sont pas éliminées par traitement chimique (**LARBI, 1988**).
- Selon **CORNUET (1987)** la lutte contre les insectes vecteurs a toujours paru être le moyen le plus élémentaire pour établir un barrage entre la plante saine et la plante

infectée. La lutte par les produits chimiques est le seul moyen dont on dispose, plus simplement encore, il est possible dans certains cas d'éviter de planter dans les zones les plus infestées.

- La mise à la disposition de l'agriculteur de semences et de plants indemnes de toutes maladies surtout lorsque les germes sont transmis par semences multipliées végétativement (MESSIAEN et al, 1991 in LAHMISSI, 2004).

Ces derniers sont obtenus par : sélection sanitaire (généalogique ou clonale) à partir de plants testés sérologiquement sains, ou par méthode curative, par culture de méristèmes associée ou non à la thermothérapie (LEPOIVRE, 2003). D'après MESSIAEN et al (1991) in LAHMISSI (2004) Les méthodes de culture in vitro permettent d'améliorer les schémas de sélection sanitaire, en pratiquant des générations de micropropagation. On peut ainsi ne pratiquer en plein champs que les dernières multiplications sur quatre ou cinq générations, diminuant ainsi les risques de recontamination.

4-2 Amélioration génétique pour la résistance aux agents pathogènes

L'introduction de cultivars résistants représente la stratégie la plus efficace pour réduire les pertes causées par certains pathogènes surtout les virus, vu l'inexistence de méthodes de contrôle chimique (RUIZE et al, 1998).

Deux grands axes permettent l'élargissement de la variabilité génétique et l'obtention de nouveaux cultivars à caractères améliorés :

4-2-1- Sélection créatrice traditionnelle

Les espèces sauvages du genre *Solanum* constituent une importante source de variabilité et de résistance contre les maladies, ainsi des gènes codant pour la réaction d'hypersensibilité contre le PVS ont été mentionnés chez plusieurs espèces sauvages à savoir : *Solanum chacoense*, *Solanum megistacrolobum*, et *Solanum microdontum* (SWIEZYNSKI, 1994 in RUIZE et al 1998).

Phytophthora infestans, agent causal du mildiou, est considéré comme le pathogène le plus dangereux pour la production de pomme de terre (CIP, 1979). D'après HAWKES

(1994) cité par RUIZE (1998), des gènes de résistance à ce pathogène ont été mentionnés chez les espèces sauvages suivantes : *Solanum bulbocastanum*, *Solanum circaeifolium*, *Solanum demissum*, *Solanum microdontum* et *Solanum phureja*.

L'introggression des gènes de résistance dans les génomes de cultivars sensibles est possible grâce à l'hybridation intraspécifique et interspécifique.

- Des croisements intraspécifiques dans l'espèce *Solanum tuberosum* ssp *andigenum* ont permis à la fin du 16^{ème} siècle la création de la sous espèce *Solanum tuberosum* pour lui permettre de tubériser en jours longs (MASSON, 1990 in LAHMISSI, 2004).
- Les premiers croisements interspécifiques ont permis au début du 20^{ème} siècle l'introduction d'une résistance au mildiou provenant de *Solanum demissum* (ROUSSELLE, 1992 in GALLAIS, 1992).

ROUSSELLE et al (1992) stipulent que la création variétale chez la pomme de terre est limitée par l'hérédité tétrasomique de la plupart des caractères, par l'hétérozygotie des parents et par la base génétique relativement étroite due au faible nombre de clones introduits au départ à partir d'Amérique du sud. La sélection au niveau diploïde est possible grâce à l'obtention de génotypes de plantes dihaploïdes induites par parthénogenèse à partir d'un croisement inter-spécifique des variétés tétraploïdes avec certains clones de *Solanum phureja* utilisés comme parents mâles.

L'intérêt des dihaploïdes est de permettre par croisement sexué l'accès à l'importante source de variabilité génétique et de résistance constituée par les espèces sauvages qui sont souvent diploïdes, et de tirer avantage de ségrégations génétiques plus simples (HAICOUR, 2002).

Selon ROUSSELLE (1992), le retour au niveau tétraploïde est indispensable, car même les meilleurs diploïdes ne remplissent pas les exigences d'une variété commerciale, en particulier au niveau productivité, cela est possible par traitement à la colchicine.

Pour **DUCREUX et al (1986)** il faut compter environ 100 000 hybrides pour avoir une chance d'obtenir une variété intéressante. Dix années sont nécessaires pour effectuer cette sélection puis dix autres années pour que la nouvelle variété soit commercialisée à grande échelle.

Vu le travail laborieux que présente la sélection traditionnelle, d'autres techniques qui permettent l'élargissement de la variabilité génétique comme la mutagenèse, la fusion de protoplastes, l'ingénierie génétique et la variation somaclonale présentent un excellent outil pour la création de nouveaux génotypes.

4-2-2 Culture in vitro et biotechnologies

a- Mutagenèse

Pour **LEPOIVRE (2003)** les traitements mutagènes physiques ou chimiques visent à transformer un allèle sensible d'un gène préexistant en allèle résistant ou à modifier un système génétique qui empêche un gène de résistance de s'exprimer. Les mutations étant aléatoires avec une fréquence moyenne de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} .

Les protoplastes isolés présentent un matériel intéressant auxquels des traitements mutagènes peuvent être appliqués, nous prenons un exemple réussi avec le tabac dont les protoplastes ont été mis en contact avec la méthionine sulfoximine (un analogue d'une toxine d'une bactérie, *Pseudomonas tabaci*) responsable du feu bactérien du tabac. Les plantes de tabac régénérées à partir de ces protoplastes étaient toutes résistantes à la bactérie (**AUGE, 1989**).

b- Ingénierie génétique

L'obtention de résistances aux maladies virales et aux herbicides ont été les premières applications des techniques de transfert de gènes chez les végétaux, le nombre de plantes qui ont été transformées génétiquement ne cesse de croître et il n'y a plus guère d'espèces cultivées importantes totalement réfractaires à cette opération (**LEPOIVRE, 2003**).

Dés 1987 un gène codant pour la phosphinothricine acétyl transférase, responsable d'une résistance à un herbicide a pu être inséré dans le génome du tabac, de la pomme de terre et de la tomate (**AUGE, 1989**).

c- Culture in vitro et variants somaclonaux

D'après **AUGE (1989)** la fréquence des variations induites par culture in vitro peut être suffisante pour obtenir une source de variabilité utilisable en sélection.

Dés 1967 des variants somaclonaux de canne à sucre plus résistants que la forme parentale à la maladie virale de FIJI (tumeurs jaunes, blanchâtres ou brunâtres sur la face inférieure des jeunes feuilles) et à l'helminthosporiose furent sélectionnés et utilisés en production. De même la culture de protoplastes de pomme de terre qui a permis d'obtenir à partir du cultivar < Russet burbank > des variants à résistance améliorée vis-à-vis de *Phytophthora infestans* et d'*Alternaria solani* ; et à partir des cultivars << Mari piper, Foxton, et Fetwell >> des variants à résistance améliorée vis à vis de *Streptomyces scabies*, du PVY et du PLRV (**LEPOIVRE, 2003**).

Les protoplastes offrent un système cellulaire particulièrement approprié pour l'application des techniques nouvelles.

Ainsi, outre les avantages tirés de la variation somaclonale suite à leur culture, les cultures in vitro utilisant les protoplastes offrent des perspectives prometteuses tels que :

- L'introduction de caractères mono ou oligogéniques (en particulier la résistance à une maladie ou à un prédateur) par transfert d'ADN dans des protoplastes à l'aide d'agrobactéries (**ELLOUZ et al. 1994**) ;
- Les protoplastes peuvent constituer un intéressant système expérimental pour étudier la formation de la paroi ainsi que les facteurs contrôlant son organisation moléculaire et sa texture (**TOSHIYUKI, 1970 ; ROLAND, 1973 et MEYER, 1974 in SLAOUI, 1990**) ;
- Application de traitements mutagènes (**LEPOIVRE, 2003**);
- Etude de la relation hôte pathogène par inoculation, dans la plus part des cas en utilisant le poly-L-ornithine (PLO) (**JHON, 1983**) ;
- Réalisation d'une hybridation somatique dont les avantages sont :

- hybridation entre individus chez lesquels la reproduction sexuée est nulle ou faible comme c'est le cas de la pomme de terre.
- Réunion dans une même cellule des informations cytoplasmiques des deux partenaires.

Selon **HAICOUR (2002)** le succès de l'hybridation somatique passe par la maîtrise de plusieurs facteurs :

- Isolement des protoplastes en grandes quantités et régénération des plantes ;
- Techniques de fusion de protoplastes ;
- Sélection de structures hybrides ;
- Régénération à partir des cals hybrides ;
- Confirmation de la nature hybride des structures régénérées.

La figure (1) résume succinctement les intérêts qu'apportent les protoplastes pour l'amélioration des espèces végétales.

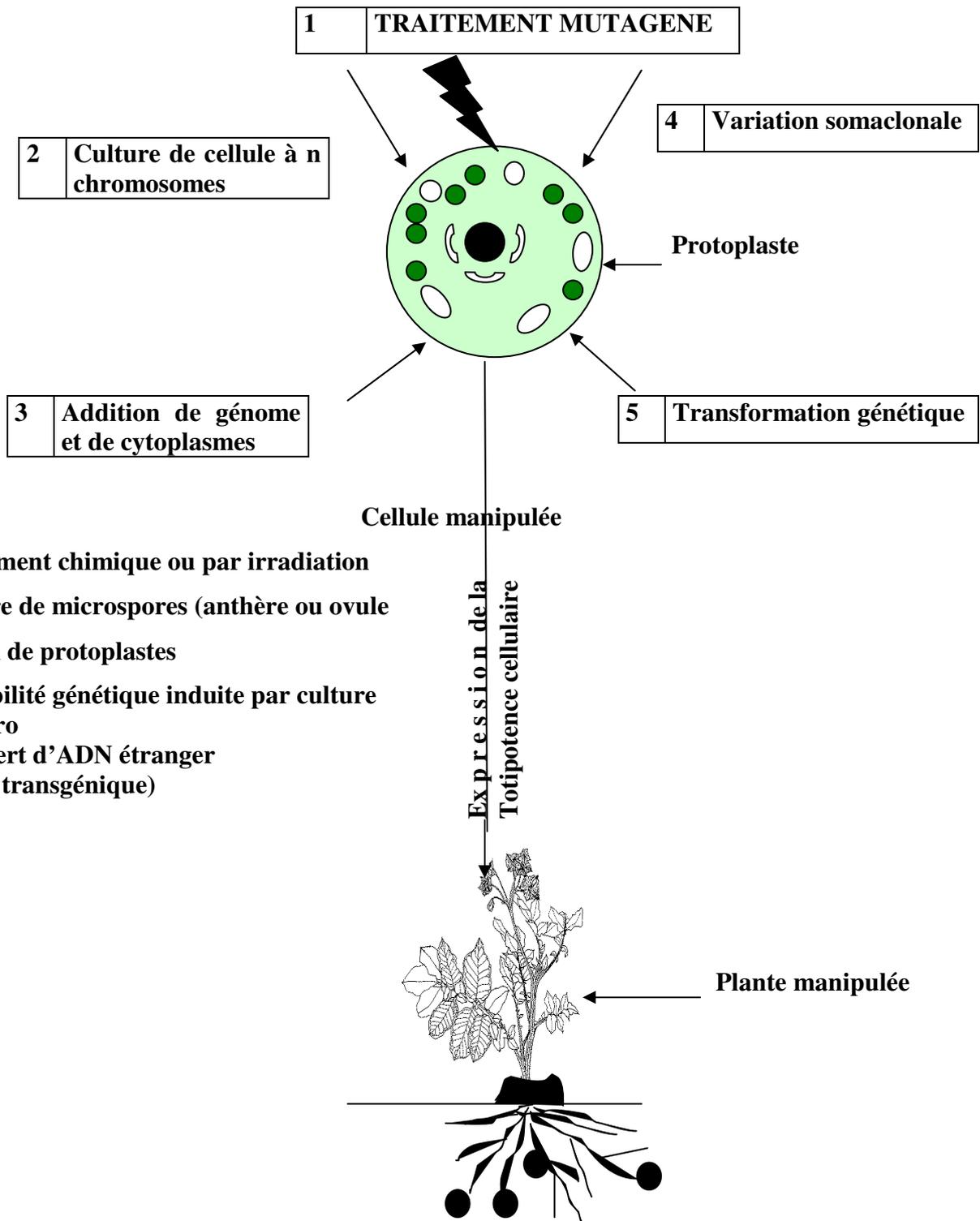


Figure 1 : Totipotence cellulaire végétale et son exploitation par manipulations génétiques (AUGE et al, 1989).

II- LES PROTOPLASTES

1- Définition

Les protoplastes sont des cellules de plantes ou de bactéries débarrassées de leurs parois pécocellulosiques (ZRYD, 1988).

En 1960 COCKING découvre que des protoplastes intacts pouvaient être obtenus en incubant des tissus de plantes dans une solution concentrée en cellulase préparée à partir de champignons (*Myrothecium verrucaria*) (COMPTON et al in TRIGIANO, 1999).

Ainsi, l'isolement de protoplastes issus de plantes est devenu largement pratiqué dès 1960 avec l'extraction et la purification d'enzymes capables de dégrader la paroi pécocellulosique des végétaux (CHAWLA, 2002).

Selon le même auteur les premiers protoplastes ont été isolés par voie mécanique à partir de bulbes d'oignon par KLERCKER en 1892. Les rendements obtenus par cette voie furent très réduits, et elle n'était appliquée que pour les cellules hautement vacuolisées non méristématiques.

2- Source du matériel végétal

Les protoplastes peuvent avoir diverses origines, la source la plus commode est le mésophile foliaire, d'autres organes tels que les cotylédons, les pédoncules floraux, les ovaires, les pétales, et les pointes de racines sont aussi utilisables (ZRYD, 1988).

TAGE (1986) stipule que les plantes cultivées en pleins champs, sous serre, issues de culture in vitro de tissus sont des sources de matériel végétal régulièrement utilisées. L'état physiologique de ce matériel influence directement les rendements et la viabilité des protoplastes isolés. C'est pour cela que les conditions de développement des plantes et des tissus sources doivent être bien contrôlées. Ainsi lorsqu'il s'agit de plantes cultivées sous serre la stérilisation de la surface des tissus utilisés peut affecter la viabilité des protoplastes. Selon DAVEY et al (2004) ces inconvénients peuvent être levés en utilisant un matériel issu de culture in vitro.

3- Obtention des protoplastes

3-1 Plasmolyse des cellules

Selon ZRYD (1988) la cellule végétale est fortement turgescente. Le potentiel osmotique (négatif) est équilibré par la pression exercée par la paroi. La suppression de

cette dernière ne peut se faire que si le milieu extérieur au protoplaste a lui-même un potentiel osmotique suffisamment négatif.

Cette étape permet la rétraction du plasmalemmes pour le rendre indépendant de la paroi (**HAICOUR, 2002**)

Les agents plasmolysants les plus couramment utilisés et qui fournissent les meilleurs résultats sont le mannitol et parfois le sorbitol. Le mannitol est considéré comme métaboliquement inerte, il s'infuse très lentement à l'intérieur du protoplaste (**TAGE, 1986**). Il est généralement utilisé à une concentration allant de 0.4 à 0.8 moles (**ARTHUR et al, 1988**).

Lorsque la plasmolyse est complète, les protoplastes prennent une forme arrondie à l'intérieur du cadre pectocellulosique, ils peuvent alors être libérés.

3-2 Traitements permettant l'isolement des protoplastes

3-2-1- Traitement mécanique

Selon **ARTHUR et al (1988)** le traitement mécanique est basé sur l'ouverture des parois cellulaires par une section. Pour **CHAWLA (2002)** le choix du matériel végétal est toutefois limité, les tissus méristimatiques peu vacuolisés ne se prêtent pas à cette technique, la forme des cellules est déterminante et l'utilisation de cellules allongées est nécessaire afin que l'espace de rétraction soit important aux extrémités cellulaires.

Les cellules de feuilles d'Elodée, le parenchyme cortical de racines de bulbes d'oignon, l'épiderme interne d'écailles de bulbes d'oignon se prêtent très bien à ce type d'expérimentations (**ARTHUR et al, 1988**).

D'après (**CHAWLA, 2002**) cette technique présente l'avantage de fournir des protoplastes dont la physiologie n'est pas perturbée par une macération dans des solutions concentrées d'enzymes exogènes, mais qui sont peu nombreux.

3-2-2- Traitement enzymatique

La plupart des études se sont intéressées à l'isolement des protoplastes par voie enzymatique (**DAVEY et al, 2005**). L'isolement par cette voie inclue l'utilisation d'enzymes extraites de différentes sources (champignons, escargot, termites ...etc). D'après **TAGE (1986)** ces enzymes sont classées en deux catégories selon leur action. Les pectinases dissolvent la lamelle moyenne et permettent de séparer les cellules les unes des

autres. La seconde catégorie inclue les cellulases et les hémicellulases qui dégradent la paroi cellulaire proprement dite et permettent ainsi l'obtention des protoplastes.

Il est important d'utiliser des enzymes purifiées afin d'éviter leur contamination par des ribonucléases, des protéases et des peroxydases, qui peuvent par leur effet être responsables de la baisse du taux de viabilité des protoplastes (**TAGE, 1986**).

La digestion enzymatique peut s'opérer en une ou deux étapes.

RUDRA (1995) stipule que dans certains cas on peut dissocier les deux types de digestion, en effectuant un traitement dit séquentiel qui consiste à libérer les cellules, en traitant les tissus par la pectinase puis à soumettre les cellules ainsi isolées aux effets de la cellulase qui permet l'obtention des protoplastes. **POWER** et **COCKING (1968)** in **RAZDAN (2003)** ont pu isoler des protoplastes par traitement simultané des deux types d'enzymes, la plasmolyse des tissus est réalisée en présence des enzymes (cellulase et pectinase). Ceci provoque une séparation des cellules concomitantes à la dégradation de leur paroi pectocellulosique en réalisant directement des protoplastes en une seule étape.

Dans la majorité des travaux, c'est cette dernière méthode qui est utilisée, elle présente les avantages suivants :

- Temps de macération raccourci ;
- Réduction de chances de contaminations microbiennes, en éliminant certaines étapes.

Le choix des facteurs affectant le rendement, la stabilité et d'avantage la croissance des protoplastes tel que la concentration en enzymes, en agents plasmolysants, la température, la durée d'incubation, le pH de la solution de macération et selon **ARTHUR (1988)** la présence ou non d'ions Ca^{+2} ; est guidé par la nature des tissus (origine, compacité). Ainsi, pour chaque type de matériel végétal une technique particulière doit être mise au point (**SINHA et al, 2003** in **DAVEY et al, 2005**).

4- Purification des protoplastes libérés

A la fin de la digestion enzymatique un mélange de protoplastes, de cellules isolées, et de débris végétaux non digérés est généralement obtenu. Ce mélange doit être purifié afin d'obtenir une solution de protoplastes de bonne qualité (**CHAWLA, 2002**).

Pour ce faire une combinaison d'un ensemble d'opérations (filtration, centrifugations et lavages) doit être réalisée (**RUDRA, 1995**).

Le principe de base de la purification des protoplastes par centrifugation repose sur le fait que leur comportement sera différent en fonction des paramètres suivants (**MOY et al, 2005**) :

4-1 Origine des protoplastes

La densité d'un protoplaste dépend de son origine et de l'importance de sa vacuole ; ceux fortement vacuolisés sont légers et ont tendance à flotter, ceux plus denses sédimentent.

4-2 Nature de l'agent de purification

La différence du poids moléculaire des agents de densité fait en sorte à ce que les protoplastes flottent ou sédimentent à une même pression osmotique et à même nombre de tours/mn.

Selon **CHAWLA (2002)** le saccharose, le ficoll, le percoll, le mannitol, et le CaCl_2 peuvent être utilisés à différentes concentrations. Ceux les plus préconisés sont le ficoll et le percoll, ils sont considérés comme osmotiquement inertes, leur utilisation peut être préférée à celle du saccharose.

5- Culture de protoplastes

Plusieurs techniques ont été utilisées pour la culture de protoplastes, les plus communes sont les milieux liquides, les milieux semi solides ou leurs combinaisons (**EVANS and BRAVO 1983, in DAVEY et al, 2004**).

5-1 Milieux liquides

Les milieux liquides sont assez souvent utilisés dans les premières étapes de la culture, car les protoplastes de certaines espèces ne se divisent pas sur milieux solides (**CHAWLA, 2002**).

Pour **TAGE (1986)** les protoplastes peuvent être maintenus dans une couche peu profonde, approximativement 1mm, afin de permettre une oxygénation adéquate.

Ce type de milieux présente l'avantage de permettre un changement graduel de la pression osmotique, la réduction de la densité des cellules après quelques jours de leur

mise en culture en pratiquant des dilutions ; et l'inconvénient de ne pas permettre l'isolement d'une colonie cellulaire dérivant d'une cellule unique (**CHAWLA, 2002**).

Selon **DAVEY (2004)** La culture peut être conduite sur papier filtre, utilisé comme support, ce dernier facilite le transfert des protoplastes sur d'autres milieux.

5-2 Milieux semi solides

A part l'agar, ils existent différents agents gélifiants tel que l'agarose, l'alginate, la gélatine et le polyacrylamide qui sont de plus en plus utilisés pour la culture de protoplastes. L'agarose représente le meilleur agent gélifiant, cela est dû à l'absence de substances toxiques, et à sa neutralité, l'agar étant plus négativement chargée (**TAGE, 1986**).

La culture sur milieu semi solide peut être conduite sous deux formes :

- La suspension de protoplastes peut être distribuée sous forme d'une fine couche à la surface du milieu semi solide (**RAZDAN, 2003**). Cette méthode stimule la formation de colonies cellulaires, surtout lorsqu'un papier filtre est intercalé entre les deux couches semi solide et liquide (**DAVEY, 2004**).

- La solution de protoplastes doublement concentrée est délicatement mélangée à un même volume (généralement 2 ml) d'un milieu de culture comprenant deux fois sa concentration finale en agent gélifiant (**CHAWLA, 2002**).

L'agarose est généralement la plus utilisée, son avantage majeur réside dans sa température de gélification (approximativement 45°C) qui est inférieure à celle de l'agar, évitant ainsi aux protoplastes cultivés de subir un choc thermique (**DAVEY, 2005**).

L'utilisation des milieux semi solides permet la fixation des protoplastes et donc l'obtention de clones issus de cellules individuelles, ceci se traduit par un coefficient de division plus réel (**CHAWLA, 2002**).

Toutefois la combinaison de milieux liquide et semi solide peut être envisagée. Le milieu gélifié dans lequel sont incrustés les protoplastes peut être coupé en petits blocs que l'on peut placer dans un milieu liquide de même constitution, l'ensemble étant soumis à une faible agitation, selon **TAGE (1986)** ceci stimule le développement des protoplastes.

Cette méthode permet aussi de réduire la pression osmotique en changeant le milieu liquide où baignent les blocs de milieux solidifiés contenant les protoplastes ou cellules (DAVEY et al, 2005).

5-3 Techniques de couches nourrices

La division cellulaire est connue comme stimulatrice de la division des cellules avoisinantes, ceci est probablement dû à la libération dans le milieu de culture les entourant de facteurs de croissance, particulièrement les acides aminés. Ce phénomène a été exploité afin de réaliser des cultures de protoplastes par l'utilisation de protoplastes/cellules nourrices qui peuvent provenir de la même ou d'une espèce différente (DAVEY et al, 2004).

Les protoplastes isolés peuvent être cultivés dans un milieu liquide sur papier filtre ou sur une membrane en nitrate de cellulose que l'on peut déposer à la surface du milieu semi solide contenant les cellules nourrices. L'utilisation de cette membrane facilite le transfert des cellules et tissus dérivant des protoplastes sur de nouveaux milieux (TANG et al, 2000 in DAVEY et al, 2005).

D'après la même source, les protoplastes cibles sont cultivés à différents rapports en présence de couche nourrice de protoplastes ou de cellules. Ces couches nourrices peuvent être irradiées aux rayons X afin d'inhiber leurs divisions. CHEN et al (2004) in DAVEY (2005), ont pu obtenir des divisions cellulaires qui ont aboutit à la régénération de plantes entières à partir de protoplastes d'hypocotyle de *Brassica olearacea*, mélangés à rapport égal 1 :1 à des protoplastes nourrices provenant de tubercule de moutarde (*B. juncea*).

Selon CHAWLA (2002), il s'agit de co-cultiver deux types de protoplastes à croissance rapide et ceux à croissance lente (récalcitrants). Les protoplastes à croissance rapide sécrètent des facteurs de croissance qui aident à régénérer la paroi cellulaire et l'entrée en division des protoplastes provenant d'espèce récalcitrante.

6- Milieux de culture

Les milieux de base utilisés pour la culture de protoplastes ne diffèrent pas essentiellement des milieux de culture des cellules isolées. Ainsi les milieux les plus couramment utilisés sont MS (Murashige et skoog, 1962) et B5 (Gamborg et al, 1968),

KM (Kao et Michayluk, 1975) avec parfois des modifications mineurs selon la réponse des protoplastes en culture (**SIHACHAKR et al, 1995, 1996 in HAICOUR, 2002**).

Parmi les modifications apportées, on peut citer la concentration en ion Ca^{++} qui est deux à quatre fois plus élevée que celle des milieux destinés aux cultures cellulaires (**RAZDAN, 2003 ; CHAWLA ,2002**).

SIHACHAKR et al (1995, 1996) in HAICOUR (2002) stipulent que l'omission d'ions ammonium dans le milieu de culture est déterminante pour la prolifération des protoplastes de plusieurs plantes (pomme de terre, tomate, tabac et quelques ligneuses).

D'après **HAICOUR (2002)** la différence majeure avec les milieux de culture de cellules est la nécessité de maintenir un potentiel hydrique assez bas, afin d'éviter l'éclatement des protoplastes. Cet abaissement du potentiel hydrique peut être assuré par du glucose pour les protoplastes d'aubergine et de patate douce, ou d'un mélange de glucose et de mannitol pour la pomme de terre ou d'un mélange de mannitol et de NaCl pour les algues marines.

Les vitamines utilisées pour la culture des protoplastes sont identiques à celles présentes dans les milieux de culture de tissus standards (**RAZDAN, 2003**).

Selon **CHAWLA (2002)** L'azote est souvent rajouté sous sa forme organique, il est bénéfique de rajouter de l'hydrolysate de caséine à (0.2 à 1 g/l), ce dernier peut être remplacé par la L-glutamine à 150 mg/l. Les acides aminés doivent être utilisés avec précaution à de faibles concentrations (glycine 2 mg/l, asparagine 100 mg/l et tyrosine 100 mg/l) ainsi que l'adénine sulphate 2 à 120 mg/l, pour l'organogénèse.

Selon le même auteur, le glucose est peut être la source de carbone la plus préférée, les cellules en culture croissent mieux à concentrations égales de glucose et de saccharose, mais le saccharose seul ne donne pas toujours des résultats satisfaisants pour la culture de protoplastes. D'autres oses tels que le lactose, le maltose et le galactose peuvent être utilisés comme source de carbone mais leur efficacité est inférieure à celle du glucose et du saccharose.

Afin de stimuler la division et la croissance des protoplastes la majorité des milieux de culture contiennent une auxine ou plus et une ou deux cytokinines. En général les hormones de croissance utilisées sont l'ANA, le 2-4-D, la BAP et la zéatine (**CHAWLA ,2002**). La combinaison des deux types d'hormones (auxine/cytokinine) et leurs concentrations varient en fonction de l'espèce (**RAZDAN, 2003**).

Enfin l'ajustement des protoplastes à une densité élevée est nécessaire pour induire les premières divisions cellulaires. Généralement une densité de 5×10^4 protoplastes/ml est utilisée mais certaines espèces exigent une densité beaucoup plus élevée (10^5 à 5×10^5 protoplastes/ml) pour le bananier et le manioc afin d'obtenir un taux de divisions cellulaires correct ($\geq 5\%$) (HAICOUR, 2002). Ce taux de division est variable selon les espèces, il peut atteindre 83% chez *Sesbania rostrata* (JANINA et al, 1986) et 20% à 30% chez la pomme de terre (SHEPARD et TOTTEN, 1977).

Selon MICHAEL et al (1999) le coefficient de division peut varier de 0.1 à 80%. Cependant un pourcentage de 20 à 30% est plus commun. La division des protoplastes est affectée par le milieu de culture, l'agent osmotique, la densité de culture, et la source de tissus utilisés.

III - OBJECTIF DU TRAVAIL

Vu l'intérêt qu'apportent les protoplastes pour l'amélioration des espèces végétales à travers la variation somaclonale, notamment par leurs cultures et leurs fusions permettant ainsi l'élargissement de la variabilité génétique, nous avons jugé intéressant de compléter par une étude portant sur ces derniers, les différents travaux réalisés sur la pomme de terre au laboratoire des ressources génétiques et des biotechnologies de l'INA sur :

- La micropropagation et la microtubérisation (DJENNANE et KHELIFATTI, 1996 ; LOUGHRAIEB et MAHMOUDIA, 1997 ; OULD LAHLAH, 1997 ; AL AMIR et ALI BENALI, 1998 ; YAHIA MESSAOUD, 1998 et DJEMEL, 2005) ;
- La microtubérisation et la levée de dormance des microtubercules (TOUBAL, 1997 ; BENALIA, 2004 ; TITOUH, 2006 ; ZEKHOUNI, 2008, HADJ MOUSSA et IMINE, 2009).
- La micropropagation, la callogenèse et l'organogenèse (BENKORTEBY et RAHMOUNI, 1999 ; YAMOUNE, 2006 et KACI, 2007) ;

La réussite d'une hybridation somatique est tributaire de la maîtrise de plusieurs facteurs, entre autres, l'isolement de protoplastes en bon état et en grandes quantités et leur régénération en plantes entières.

Ainsi notre travail consiste en la mise au point d'un protocole d'isolement, de purification et d'essais de culture de protoplastes de pomme de terre (variété Désirée).

MATERIEL ET METHODES

Notre expérimentation a été réalisée au Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies (L-RGB) de l'Institut National Agronomique, EL-HARRACH, Alger.

I ORIGINE DU MATERIEL VEGETAL

Des tubercules de pomme de terre, variété Désirée, nous ont été soigneusement fournis par le Centre national de contrôle et de certification des plants et semences (CNCC).

Ces tubercules ont été placés dans la chambre de culture dans l'obscurité à une température de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 15 jours afin de permettre l'étiollement des bourgeons puis, ils ont été exposés à la lumière. De jeunes germes chlorophylliens ont été ainsi obtenus après 2 semaines. Ces derniers ont été destinés à la micropropagation.

II CONDITIONS DE TRAVAIL

La première condition de la réussite d'une culture in vitro est l'asepsie (**AUGE, 1989**). Pour cela certaines précautions doivent être prises en considération afin d'éviter les contaminations :

- Toutes les manipulations sont réalisées dans des conditions d'asepsie sous hotte à flux laminaire préalablement désinfectée à l'eau de javel 12° et à l'éthanol 70%.
- Le bec benzène et la hotte sont allumés pendant 30 à 45 minutes avant d'entamer le travail.
- Les outils (pinces, lames bistouris ...etc) sont essuyés à l'éthanol, mis dans une boîte métallique et sont étuvés pendant 02 heures à une température de 180°C .
- Le matériel végétal est découpé sur papier buvard stérilisé au paravent dans des boîtes de pétri à une température de 180°C pendant 30 minutes.

- Les mains sont lavées au savon et à l'eau de javel avant chaque manipulation, et sont continuellement désinfectées avec de l'éthanol dilué durant toute la manipulation.
- Travail près du bec bunsen pour éviter les contaminations de l'air.

III CULTURE PROPREMENT DITE

1- Micro propagation du matériel végétal

1-1 Milieu de micropropagation

Le milieu de culture utilisé est celui de **MURASHIGE et SKOOG (1962)** (annexe 1) simple sans hormones de croissance. Ce milieu étant réputé pour son efficacité pour la culture *in vitro* de la pomme de terre (**ZRYD et al, 1988 ; AUGÉ et al, 1989 ; MARGARA, 1989 et GONBORG et al, 1976 cité par KHELIFI, 2008**) ; et également dans la plus part des travaux de culture *in vitro* sur la pomme de terre réalisés à l'**INA (YAMOUNE, 2006 ; TITOUH, 2006 ; KACI, 2007)**.

Le milieu de micro propagation (1000 ml) a été préparé comme suit :

- 50 ml de macro-éléments prélevés d'une solution mère MS concentrée 20 fois ;
- 10 ml de micro-éléments prélevés d'une solution mère MS (sans Fe-EDTA) concentrée 100 fois ;
- 10 ml de Fe-EDTA prélevés d'une solution mère MS concentrée 100 fois;
- 1 ml de vitamines prélevés d'une solution mère MS (sans myo-inositol) concentrée 1000 fois;
- 0.1 g de myo-inositol ;

A ce milieu de culture (MS) nous rajoutons :

- 20 g/l de saccharose (sucre de commerce) ;
- le pH étant ajusté entre 5.6 à 5.8 avec soit l'HCl (0.1 N) et/ou le NaOH (0.1 N);
- 07 g d'Agar sont rajoutés au mélange qui sera bien agité puis porté à ébullition jusqu'à la dissolution de l'Agar.

Le milieu a été versé dans des tubes à essai à raison de 20 ml / tube, fermés hermétiquement avec du coton hydrophile et autoclavés pendant 20 minutes à une température de 120° C.

1-2 Méthode de micropropagation

Des germes de 1 à 3 cm prélevés sur les tubercules germés ont été rincés à l'eau du robinet, ensuite ils sont :

- Désinfectés à l'éthanol 70° pendant quelques secondes ;
- Rincés à l'eau distillée stérile, puis désinfectés à l'eau de javel 12° pendant 6 à 7 minutes ;
- Rincés trois fois à l'eau distillée stérile, puis ils ont été découpés en explants contenant chacun un bourgeon axillaire. Ces explants ont été mis en culture dans des tubes à essai contenant 20 ml de milieu de micropropagation **MS**.

Les tubes contenant les explants ont été placés dans une salle de culture à une température de 25 ± 2 °C sous une photopériode de 16 h de lumière et 08 heures d'obscurité.

Après 04 semaines de culture des vitroplants de 1^{ère} génération ont été obtenus; ils étaient destinés à :

- l'isolement de protoplastes dont la méthodologie sera détaillée ultérieurement ;
- La micropropagation par microbouturage axillaire pour l'obtention de vitroplants de troisième génération qui seront utilisés comme matériel de base pour l'essai de callogenèse et de caulogenèse.

2- Aptitude de la variété Désirée à la callogénèse et à l'organogénèse

2-1 Callogenèse

Selon les travaux de **BENKORTBY (1999)** nous avons procédé à la micropropagation de la G1 par microbouturage axillaire sur le même milieu de culture (MS) simple sans hormones (additionné de 20g/l de saccharose et de 7 g/l d'agar, pH fixé à 5.6) jusqu'à l'obtention de vitroplants de 3^{ème} génération.

2-1-1 Milieux de culture

Le 2-4-D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique) qui est une auxine très callogène a été testé avec la BAP qui est une cytokinine de synthèse.

Suivant les résultats de **YAMOUNE (2006)** nous avons choisi de tester les balances hormonales suivantes (**Tableau 4**)

Tableau 4 : Composition hormonale des différents milieux de callogenèse

<i>Milieux</i>	<i>MS + 20g/l sucre</i>	
	<i>2,4 -D mg/l</i>	<i>BAP mg/l</i>
<i>M 1</i>	<i>2</i>	<i>1</i>
<i>M 2</i>	<i>2</i>	<i>0.5</i>
<i>M 3</i>	<i>3</i>	<i>1</i>
<i>M 4</i>	<i>2</i>	<i>0.66</i>

Ainsi des fragments d'entre nœuds et de feuilles d'environ 0.5 cm de longueur ont été prélevés sur des vitroplants de 3^{ème} génération âgés de 5 semaines. Ils ont été déposés à raison de 4 fragments par boîte de petri et de 4 boîtes de pétri par milieux de callogenèse. Le nombre final de répétition a été de 16.

L'essai a été réalisé dans l'obscurité.

2-1-2 Observations réalisées

Pour cet essai nous avons pris en considération les paramètres suivants :

- Taux de réactivité exprimé en pourcentage, qui représente le nombre total d'explant ; présentant un gonflement pour les entre nœuds et une décoloration pour les feuilles suivi d'un début de callogenèse au niveau des cotés sectionnés, et/ou de la nervure principale ; par rapport au nombre total d'explant mis en culture.
- Le pourcentage des cals exprimant une rhizogenèse qui représente le nombre total de cals présentant des néoformations de racines par rapport au nombre total de cals après 9 semaines de mise en culture.
- Nombre moyen de racines néoformées qui représente le nombre total de

racines néoformées qui apparaissent sur le nombre total de cals après 9 semaines de mise en culture.

2-2- Organogenèse

MARGARA (1989) stipule que l'utilisation d'association équilibrée de cytokinine et d'auxine et de milieux minéraux adaptés, type milieu **MURASHIGE et SKOOG (1962)** permettent la néoformation de bourgeons après dédifférenciation cellulaire poussée.

Afin de tester le potentiel de la variété « Désirée » à l'organogenèse deux essais ont été lancés :

2-2-1 À partir de cals

Une partie des cals obtenus sur le milieu M4 ont été utilisés.

Les balances hormonales appliquées ont été inspirées des résultats d'**ELLOUZ et al (1997)**, où des plantules de pomme de terre ont pu être régénérées à partir de cals issus de protoplastes, en utilisant les concentrations hormonales suivantes 2 mg/l de zéatine additionnée de 0.1 mg/l d'AIA

A défaut de disponibilité de zéatine, nous avons testé deux autres cytokinines de synthèse à savoir la kinétine et la BAP aux concentrations suivantes (**Tableau 5**) :

Tableau 5 : Composition hormonale des milieux d'organogenèse (essai 1)

	<i>MS + 20g/l sucre + 7g/l d'aggar</i>		
<i>Milieux</i>	<i>AIA mg/l</i>	<i>BAP mg/l</i>	<i>Kinétine mg/l</i>
<i>M5</i>	<i>0.1</i>	-	<i>2</i>
<i>M6</i>	<i>0.1</i>	<i>2</i>	-

Les cals de feuilles et d'entre nœuds débarrassés des racines néoformées et des cotés brunis ont été fragmentés suivant leur grosseur en trois ou en quatre petits fragments d'environ 0.25 cm², pour être transférés par la suite sur milieux d'organogenèse à raison d'un fragment par tube à essai (partie excisée en contact du milieu de culture).

Le nombre de répétition a été de 15 par type d'explant et par traitement.

L'essai a été réalisé sous une photopériode de 16 heures de lumière.

2-2-2 À partir de fragments de feuilles et d'entre nœuds

Selon les travaux de MARGARA (1989), de BENKORTEBY et RAHMOUNI, (1999), nous avons appliqué à des fragments de feuilles et d'entre nœuds prélevés sur des vitroplants de 3^{ème} génération âgés de 5 semaines les balances hormonales sous citées (Tableau 6)

Tableau 6 : Composition hormonale des milieux d'organogénèse (essai 2)

	<i>MS + 20g/l sucre + 7g/l d'aggar</i>		
<i>Milieux</i>	<i>BAP mg/l</i>	<i>AIA mg/l</i>	<i>GA₃ mg/l</i>
<i>M7</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>M8</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>-</i>

Le nombre de répétition a été de 20 pour chaque type d'explant à raison de 5 explants par boîte de pétri. Les boîtes ont été placées dans l'obscurité pendant 25 à 30 jours, puis elles ont été exposées à la lumière.

2-2-3 Observations réalisées

Pour les deux essais (1 et 2) nous avons pris en considération les paramètres suivants :

- Taux de cals organogènes exprimé en pourcentage qui représente le nombre total de cals exprimant une néoformation de bourgeons par rapport au nombre total de cals.
- Nombre moyen de bourgeons adventifs ou néoformés qui représente le nombre total de bourgeons qui apparaissent sur le nombre total de cals.

IV LES PROTOPLASTES

1- Isolement

1-1 Matériel végétal utilisé

D'après **TAGE (1986)** Les protoplastes peuvent être isolés à partir de différents types de tissus et organes incluant, les graines, pétales, pétioles, tiges, racines, fruits, coléoptiles, hypocotyles, anthères, ovules, microspores, cals, cellules en suspension...etc.

Pour notre expérimentation les différents tissus utilisés sont :

- Feuilles issues de vitroplants de G1 à différents âges (4, 7 et 12 semaines) ;
- Feuilles issues de vitroplants de G2 et de G3 âgés de 7 à 10 semaines ;
- Cals durs (âgés de 9 semaines) et friables (âgés de 5 semaines) issus de fragments de feuilles et d'entre nœuds.

1-2 Composition de la solution de macération

1-2-1 Milieu minéral

Plusieurs solutions minérales ont été utilisées afin de dissoudre les enzymes, entre autre nous citerons la solution CPW (**MEHRI et al, 1997**), le milieu VKM (**BINDING et al, 1978 in HAICOUR, 2002**) et le milieu MS sans NH_4NO_3 et dont la concentration en KNO_3 est réduite à 1/10 (**JAMES et al, 1977**).

Pour notre travail toutes les manipulations ont été réalisées à base de la solution minérale et vitaminique MS liquide sans saccharose (**DODDS, 1985**).

1-2-2 Enzymes

Les protoplastes isolés sont obtenus à partir de cellules dont les parois ont été éliminées par des moyens mécanique ou enzymatique, cette dernière a été la plus utilisée vu les rendements importants qui en résultent.

La paroi des cellules végétales est principalement constituée de cellulose d'hémicellulose et de matière pectique.

Plusieurs enzymes (cellulases, hémicellulases et pectinases) sont connues actuellement pour leur efficacité dans la dégradation de la paroi végétale : l'hémicellulase R-10, la cellulysine, la pectinase, l'hémicellulase HP-150 rhozyme...etc.

Dans notre travail deux enzymes ont été testées à différentes concentrations : la cellulase de **Trichoderma longibrachiatum** et la **macerozyme R 10** issue de **Rhizopus sp** comme pectinase.

Les concentrations testées sont :

➤ Pour les feuilles : la concentration de la cellulase a été fixée à 1% (**TAVAZZA** et **ANCORA, 1986** in **EHSANPOUR** et **JONES, 2001**), celles de la pectinase étant de 0.1%, 0.2%, 0.3% et 0.4% ;

➤ Pour les cals : quatre différentes combinaisons de cellulase/pectinase, dont les concentrations sont indiquées dans le **tableau 7**.

Tableau 7: Concentrations enzymatiques appliquées aux cals

<i>Traitements enzymatiques</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum %</i>	<i>macerozyme R10 %</i>
<i>T1</i>	<i>0.5</i>	<i>0.05</i>
<i>T2</i>	<i>1</i>	<i>0.3</i>
<i>T3</i>	<i>2</i>	<i>0.3</i>
<i>T4</i>	<i>3</i>	<i>0.3</i>

1-2-3 Agent palsmolysant

Suite à sa digestion enzymatique, la protection osmotique que procure la paroi cellulaire n'existe plus, ainsi la membrane plasmique est la seule limite séparant le contenu cellulaire du milieu extérieur.

Pour compenser son absence un agent osmotique doit être inclus dans la solution de macération afin de maintenir les protoplastes dans un état d'isotonie entre le milieu externe et interne évitant leur éclatement.

Plusieurs agents osmotiques sont actuellement disponibles (mannitol, sorbitol, saccharose).

Le saccharose présente l'inconvénient d'être métabolisable par le cytoplasme cellulaire, ce qui diminue sa concentration dans le milieu, et ceci réduit sa valeur en tant qu'agent osmotique (DODDS, 1985).

En ce qui nous concerne c'est le mannitol qui a été utilisé à des concentrations différentes (0.3, 0.4, 0.5, 0.6, et 0.7 mole).

1-2-4 pH

L'efficacité des enzymes à produire des protoplastes est influencée par le pH de leur milieu de dissolution, l'optimum étant compris entre 4.7 et 5.7 (HIROFUMI et TOSHIO, 1974) ou encore entre 4.7 et 6 (CHAWLA, 2002).

En plus du pH 5.6 que nous avons utilisé dès le début de notre travail, nous avons testé le pH 5, compris dans la fourchette précitée.

1-2-5 Effet du CaCl_2

D'après TAGE (1986), le calcium sous forme de CaCl_2 peut être rajouté à la solution de macération et/ou à la solution de lavage à une concentration allant de 0.05 à 0.1 mole, et cela afin de renforcer la structure de la membrane plasmique.

Ainsi, nous l'avons testé à une molarité de 0.05 mole soit 5g/l, en plus de la concentration présente dans la solution minérale MS.

Tous les autres paramètres sont maintenus fixes

1-2-6 Effet de la solution CPW

Aussi nous avons testé la solution CPW comme milieu de macération, qui a été utilisée par plusieurs auteurs HAICOURS (2002) sur feuilles de pomme de terre, DIXON (1995) sur l'orge et le colza et MEHRI et al (1997) sur feuilles de cerisier.

Cette solution est plus de trois fois plus concentrée en CaCl_2 que la solution MS.

Elle est composée selon le tableau 8.

Tableau 8 : Composition minérale de la solution CPW (HAICOUR, 2002)

	<i>Composition chimique</i>	<i>Concentration mg/l</i>
<i>Stock A</i>	KH_2PO_4	27.2
	KNO_3	101
	MgSO_4	246
	KI	0.16
	CuSO_4	0.025
<i>Stock B</i>	CaCl_2	1480

1-3 Conditions physiques de macération

Nous avons utilisés 0.45 g de matériel végétal qui ont été découpés avec une lame bistouri en petites lamelles pour les feuilles et en petits dés pour les cals. Ils ont été ensuite placés dans 10 ml de solution de macération.

La macération a été réalisée dans des flacons de 20 ml, sur un agitateur réglé à une vitesse de 100 tours / mn, et à une température de $27 + 4^{\circ}\text{C}$.

1-4 Test de viabilité

La viabilité des protoplastes a été estimée par le bleu de méthylène qui est un colorant vital. Il a été dilué à une concentration de 0.01% dans une solution de Mannitol.

Il met en évidence l'intégrité du plasmalemmes (**RENDENBAUGH, 1981 in SLAOUI M, 1986**). En effet si les protoplastes sont viables, il est réduit et vire du bleu au jaune brillant ; s'ils sont non viables le cytoplasme s'imprègne de la coloration bleu

Le taux de viabilité a été estimé comme suit :
$$\frac{\text{Nb de protoplastes viables} \times 100}{\text{Nb de protoplastes totaux}}$$

Le nombre de répétition a été de 10.

1-5 Dénombrement des protoplastes

Le dénombrement des protoplastes (cals et feuilles) (nombre moyen total de protoplastes et nombre moyen de protoplastes viables) a été réalisé à l'aide d'une cellule de MALASSEZ dont le volume d'un carré élémentaire est de $5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ ($25 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \times 0.2 \text{ mm}$). Dix dénombrements ont été effectués dans 10 différents rectangles choisis aléatoirement (chaque rectangle comporte 20 carrés élémentaires).

Un nombre moyen est obtenu dans un volume final de 10^{-2} mm^3 , ce résultat est ramené au gramme de masse fraîche.

Ainsi deux paramètres ont été mesurés : le nombre moyen total de protoplastes /g-MF et le nombre moyen de protoplastes viables /g-MF.

2 Purification

A la fin de la macération, les protoplastes libérés dans la solution sont mêlés aux cellules et débris qui résultent de la digestion enzymatique du matériel végétal et aux tissus non digérés.

Afin de débarrasser les protoplastes de ces impuretés et des enzymes, deux étapes ont été effectuées :

➤ Une prépurification pour éliminer les gros débris et les fragments de tissus non digérés : la solution de macération a été filtrée à travers une toile dont la maille est de 350 μm .

Afin d'éliminer les enzymes, le filtrat a été récupéré dans des tubes à centrifuger, et a subis trois rinçages par centrifugation à l'aide d'une centrifugeuse à rotor libre (à 75% pendant 3 minutes). A chaque fois le surnageant a été éliminé à l'aide d'une pipette pasteur stérile, le culot a été repris dans 10 ml de solution de lavage constituée de la même solution de macération sans enzymes.

➤ Une purification proprement dite :

Le dernier culot obtenu après 3 lavages a été repris dans 2 ml de solution de rinçage.

La solution de protoplastes a été ensuite purifiée (des fins et moyens débris qui échappent à la filtration) par centrifugation sur un gradient monocouche de saccharose (6 ml) à l'aide d'une centrifugeuse à rotor libre.

Deux concentrations de saccharose ont été testées 21%, et 30%.

Après purification on a procédé au dénombrement des protoplastes totaux et viables récupérés dans 1 ml de solution de rinçage.

3 Culture

La culture a été réalisée uniquement à partir de protoplastes issus du mésophylle foliaire, après leur purification.

Selon les observations de **TAGE (1986)** la source et la quantité d'azote, et celle des ions calcium des milieux destinés à la culture de protoplastes sont souvent variées. En conséquent une modification du milieu MS ; en diminuant la concentration des ions ammonium, ou en les éliminant en totalité et en augmentant celle des ions calcium, la réduction des concentrations des autres macroéléments à la moitié ou au quart sont souvent recommandés.

Ainsi en se basant sur les différents travaux réalisés sur les protoplastes de pomme de terre (**JAMES et al, 1977 ; ELLOUZ et al, 1994 ; HAICOUR, 2002 ; ESPEJO et al, 2008**), nous avons choisi de tester quatre milieux de culture dont les compositions

minérales sont inspirées de celles des milieux MS et VKM (**BINDING et al, 1978**) avec quelques modifications (**Tableau, 9**).

Aussi différents additifs et différentes combinaisons de sucres (dont la somme est équivalente en poids à 0.5 mole de mannitol) ont été testés.

Tableau 9 : Compositions des milieux de culture de protoplastes utilisées (pour 1 litre de solution)

<i>Eléments</i>	<i>Composition chimique</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>MS(1962)</i>
<i>Macroéléments</i>	NH ₄ NO ₃ K NO ₃ Mg SO ₄ , 7H ₂ O Ca Cl ₂ , 2H ₂ O K H ₂ PO ₄	0 800 mg 185 mg 720 mg 85 mg	0 800 mg 185 mg 720 mg 85 mg	0 800 mg 185 mg 720 mg 85 mg	0 800 mg 185 mg 720 mg 85 mg	1650 mg 1900 mg 370 mg 440 mg 170 mg
<i>Microéléments</i>	H ₃ BO ₃ Mn SO ₄ , 4H ₂ O Zn SO ₄ , 4H ₂ O KI Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O Cu SO ₄ , 5H ₂ O CaCl ₂ , 6 H ₂ O Fe SO ₄ , 7H ₂ O Na ₂ EDTA	6,20 mg 22,30 mg 8,60 mg 0,83 mg 0,25 mg 0,025 mg 0,025 mg 27,85 mg 37,25 mg	6,20 mg 22,30 mg 8,60 mg 0,83 mg 0,25 mg 0,025 mg 0,025 mg 27,85 mg 37,25 mg	6,20 mg 22,30 mg 8,60 mg 0,83 mg 0,25 mg 0,025 mg 0,025 mg 27,85 mg 37,25 mg	3.1 mg 11.15 mg 4.3 mg 0.41 mg 0.125 mg 0.0125 mg 0.0125 mg 13.92 mg 18.62 mg	6,20 mg 22,30 mg 8,60 mg 0,83 mg 0,25 mg 0,025 mg 0,025 mg 27,85 mg 37,25 mg
<i>Vitamines</i>	Glycine Acide nicotinique Pyridoxine HCl Thiamine HCl Myoinositol	2,00 mg 0,50 mg 0,50 mg 0,10 mg 0.10 g	2,00 mg 0,50 mg 0,50 mg 0,10 mg 0.10 g	2,00 mg 0,50 mg 0,50 mg 0,10 mg 0.10 g	2,00 mg 0,50 mg 0,50 mg 0.10 mg 0.10 g	2,00 mg 0,50 mg 0,50 mg 0.10 mg 0.10 g
<i>Hormones de Croissances</i>	ANA 2,4-D BAP	3 mg - 1 mg	3 mg - 1 mg	1 mg 0.2 mg 0.5 mg	3 mg - 1 mg	
<i>Additifs</i>	Glutamine Biotine PEG Acide citrique Acide ascorbique Agarose Cellobiose Mannitol Glucose saccharose	250 mg 0.001 mg 250 mg 10 mg 1 mg 4 g 200 mg 0.18 mole 0.18 mole 0.07 mole	250 mg 0.001 mg 250 mg 10 mg 1 mg 4 g 200 mg 0.25 mole 0.25 mole -	250 mg 0.001 mg 250 mg 10 mg 1 mg 4 g 200 mg 0.18 mole 0.18 mole 0.07 mole	250 mg 0.001 mg 250 mg 10 mg 1 mg 4 g 200 mg 0.18 mole 0.18 mole 0.07 mole	

Pour cette étape les paramètres pris en considération ont été :

- Taux de viabilité (en %), estimé après 4 et 7 jours de mise en culture.
Les protoplastes viables présentent un aspect bien plasmolysé, une membrane plasmique continue, un cytoplasme bien structuré et clair, les protoplastes morts se nécrosent et brunissent, des fois avec une rupture de la membrane plasmique.

- Taux de protoplastes ayant régénérés leur paroi (en %), estimé après 4 et 7 jours de mise en culture, qui représente le nombre de protoplastes qui ont perdu la forme sphérique par rapport au nombre de protoplastes viables.

- Coefficient de division, estimé après 15 jours de mise en culture qui représente le nombre de protoplastes ayant subi au moins une division par rapport à l'ensemble des protoplastes viables observés.

Les observations ont été réalisées sous microscope inversé au grossissement (x 40) sur dix champs différents choisis aléatoirement. Pour chaque milieu trois répétitions ont été réalisées.

V- Protocole experimental

Le protocole experimental utilisé est représenté dans la figure 2:

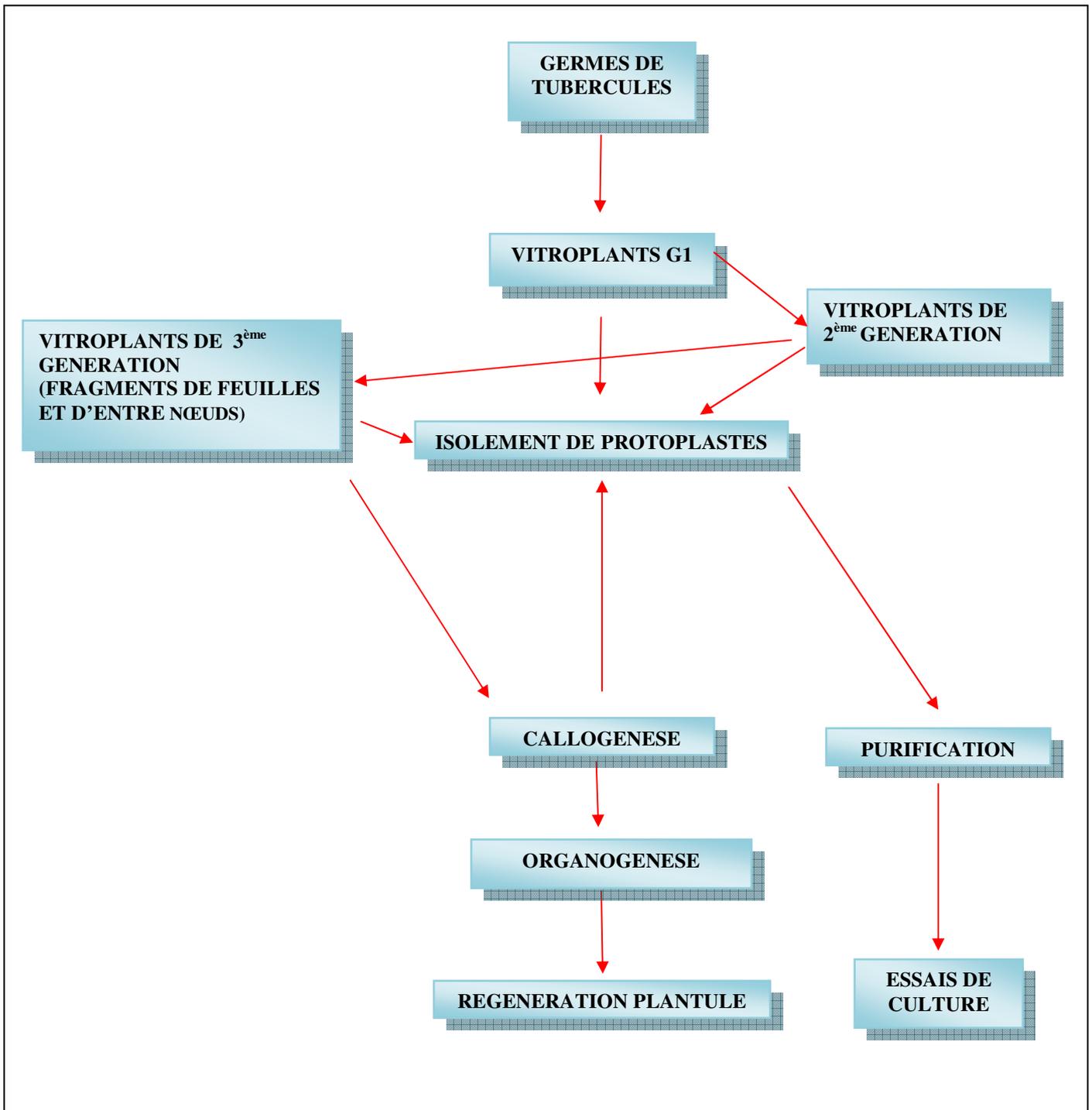


Figure 2 : Protocole expérimental adopté

VI- ANALYSE STATISTIQUE ET REPRESENTATION GRAPHIQUE

Les résultats obtenus ont été représentés graphiquement à l'aide du logiciel *EXCEL*.

L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un seul critère de classification, si l'effet est significatif, elle est complétée par la comparaison des moyennes deux à deux par le test de la **ppds** afin de faire ressortir les groupes homogènes.

Cette analyse a été utilisée à chaque étape:

- La callogenèse pour comparer l'effet des différents milieux testés sur
 - La rhyzogenèse après 9 semaines de mise en culture (avec 4 traitements M1, M2, M3 et M4);
 - l'organogenèse (bourgeons néoformés et adventifs) avec 2 traitements (M5 et M6) pour l'essai à partir des cals après 13 semaines de mise en culture et (M7 et M8) pour l'essai à partir des fragments de feuilles et d'entre nœuds après 50 jours de mise en culture.

- Les protoplastes :
 - L'isolement : pour les rendements en protoplastes vivants après 3 heures de macération en fonction des différents paramètres étudiés;
 - La culture : pour les pourcentages de viabilité, de régénération des parois après 7 jours de mise en culture, et les fréquences d'entrée en division après 15 jours de mise en culture. Cela selon les différents milieux de culture (S1, S2, S3, S4)

Le logiciel utilisé pour l'analyse statistique est **STATGRAPHICS Plus version 5**.

RESULTATS

I- CALLOGENESE ET CAULOGENESE

1- Callogenèse

Deux types d'explants, fragments d'entre nœuds et de feuilles prélevés sur des vitroplants de la 3^{ème} génération âgés de 5 semaines ont servi pour l'induction des cals. Pour cela quatre milieux de callogenèse (M1, M2, M3, et M4) différant entre eux par le rapport hormone 2,4-D / BAP compris entre 2 et 4 ont été testés.

1-1 Réactivité

1-1-1 Fragment d'entre nœuds

Au bout du 7^{ème} jour de mise en culture et quelque soit le milieu utilisé, tous les explants ont présenté un léger gonflement au niveau des extrémités, il s'est étendu progressivement pour atteindre l'ensemble de l'explant.

L'induction de cals a pu être observée après le 15^{ème} jour de mise en culture sur le milieu M4 avec un taux de 12.5 %, et après le 25^{ème} jour pour les autres milieux M1, M2 et M3 avec respectivement des taux de 12.5%, 56.25% et 18.75%. Ces taux ont augmenté progressivement pour atteindre 100% de réactivité après le 45^{ème} jour de mise en culture (**Figure 3**).

Les premières formations callogènes avaient un aspect de duvet blanchâtre, elles ont pris naissance au centre des fragments. Des amas callogènes plus compacts d'un vert très clair translucide se sont formés par la suite aux extrémités pour couvrir l'ensemble des explants. Ces derniers ont pris une couleur beige brune après environ 2 mois de culture. Les cals formés sur les quatre milieux de culture ont été de nature dure et consistante.

1-1-2 Fragment de feuilles

Dès les premiers jours de culture les fragments de feuilles ont présenté une légère décoloration (sous forme de mosaïque d'une couleur vert pâle et jaune) sur presque toute la surface de l'explant. Ensuite des amas callogènes sont apparus au niveau des cotés excisés au bout du 20^{ème} jour de culture pour l'ensemble des milieux testés. Ces taux ont été de l'ordre de 6.25%, 18.75% pour les milieux M1 et M2 respectivement et de 12.5% pour les deux milieux M3 et M4. Ces derniers ont évolué pour atteindre 100% de réactivité après 45 jours de mise en culture (**Figure 4**).

Les cals issus des feuilles ont présenté le même aspect que ceux obtenus à partir des fragments d'entre nœuds (durs et compacts).

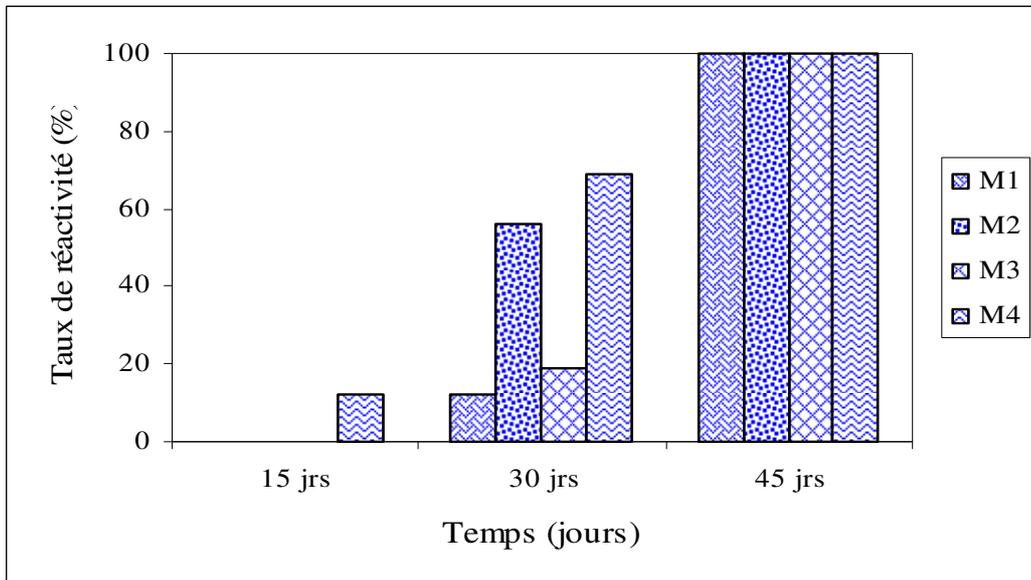


Figure 3 : Evolution du taux de réactivité des fragments d'entre nœuds en fonction du temps et des différents milieux testés

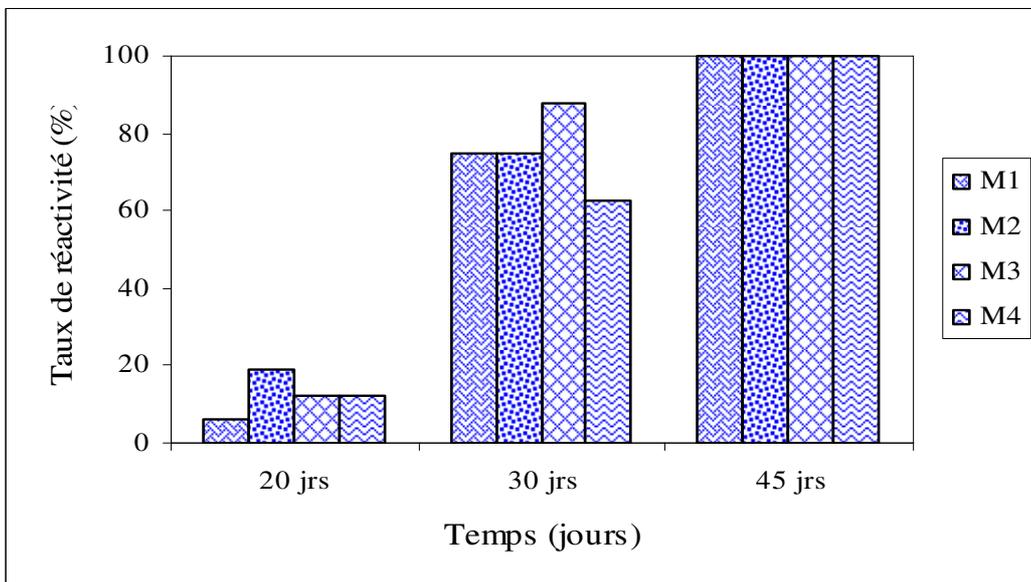


Figure 4 : Evolution du taux de réactivité des fragments de feuilles en fonction du temps et des différents milieux testés

1-2 Racines néoformées

1-2-1 Sur cals d'entre nœuds

Quelque soit la balance hormonale testée, nous avons observé des néoformations racinaires à partir du premier mois de culture.

Les taux de cals présentant une rhizogenèse après 9 semaines de mise en culture ont été de l'ordre de 44%, 62.5%, 81% et 88% respectivement pour les milieux M3, M1, M2, et M4.

L'analyse de la variance a montré un effet significatif des différents milieux testés. La comparaison des moyennes a fait ressortir deux groupes homogènes distincts qui se chevauchent (a) formé par les milieux M2 et M4 et (b) par le milieu M3, (annexe 1-1-a) (Figure 5).

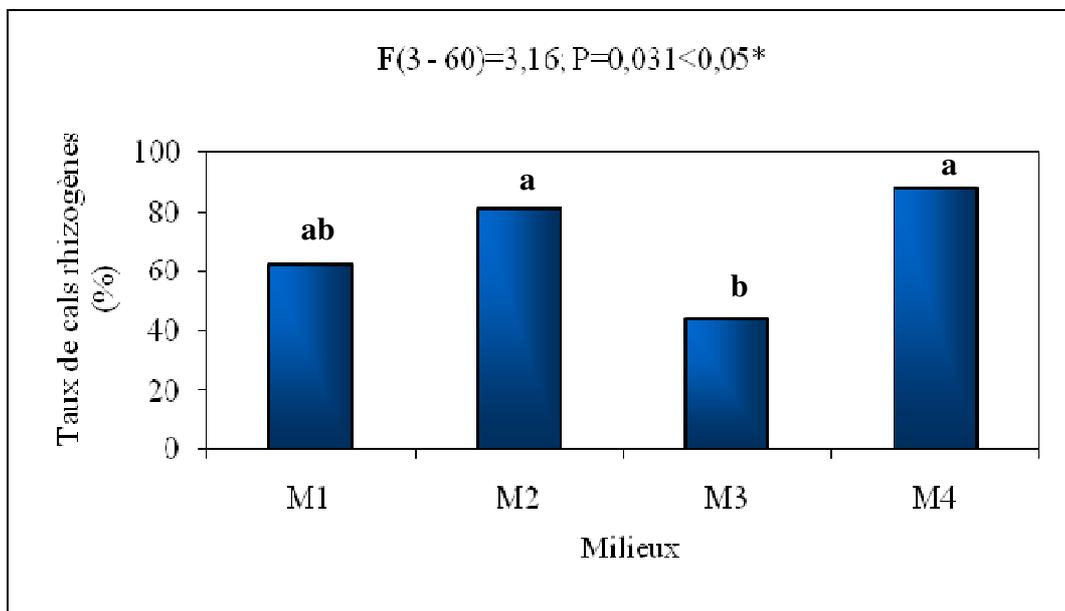


Figure 5 : Taux de cals rhizogènes issus de fragments d'entre nœuds après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés

La figure 6 montre que ce sont les milieux M2 et M4 qui ont donné les nombres moyens de racines néoformées les plus élevés avec respectivement 3.38 et 3.81 obtenus après 9 semaines de culture.

En effet, l'analyse de la variance a révélé l'existence d'un effet hautement significatif, et le test de la ppds a indiqué deux groupes distincts **a** (M2, M4) et **b** (M1 et M3), (annexe 1-1-b).

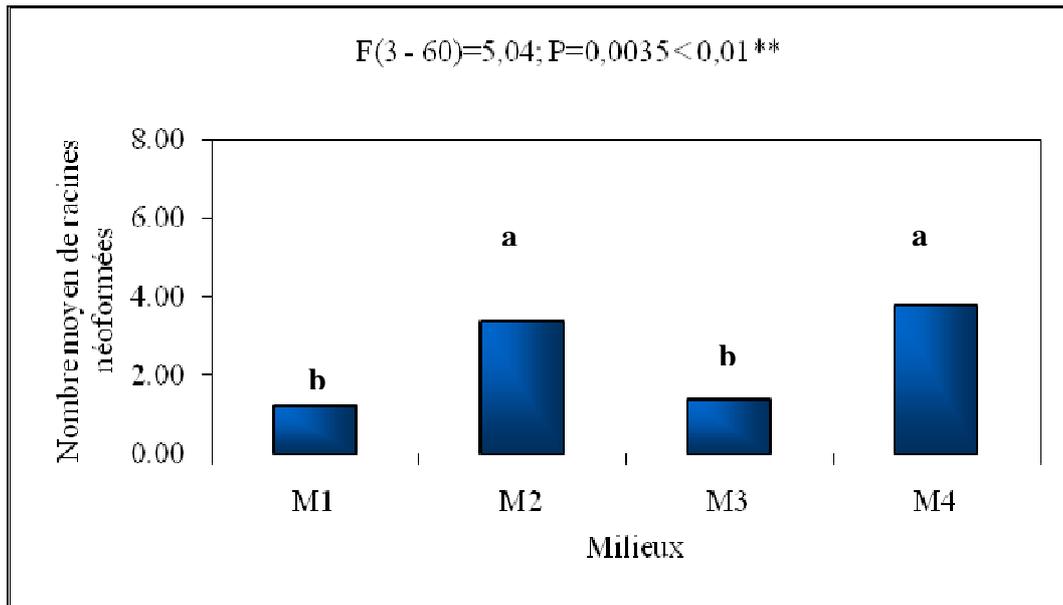


Figure 6 : Nombre moyen de racines néoformées sur cals d'entre nœuds après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés.

La planche 1 illustre l'aspect des cals d'entre nœuds après 5 semaines de culture sur les différents milieux.

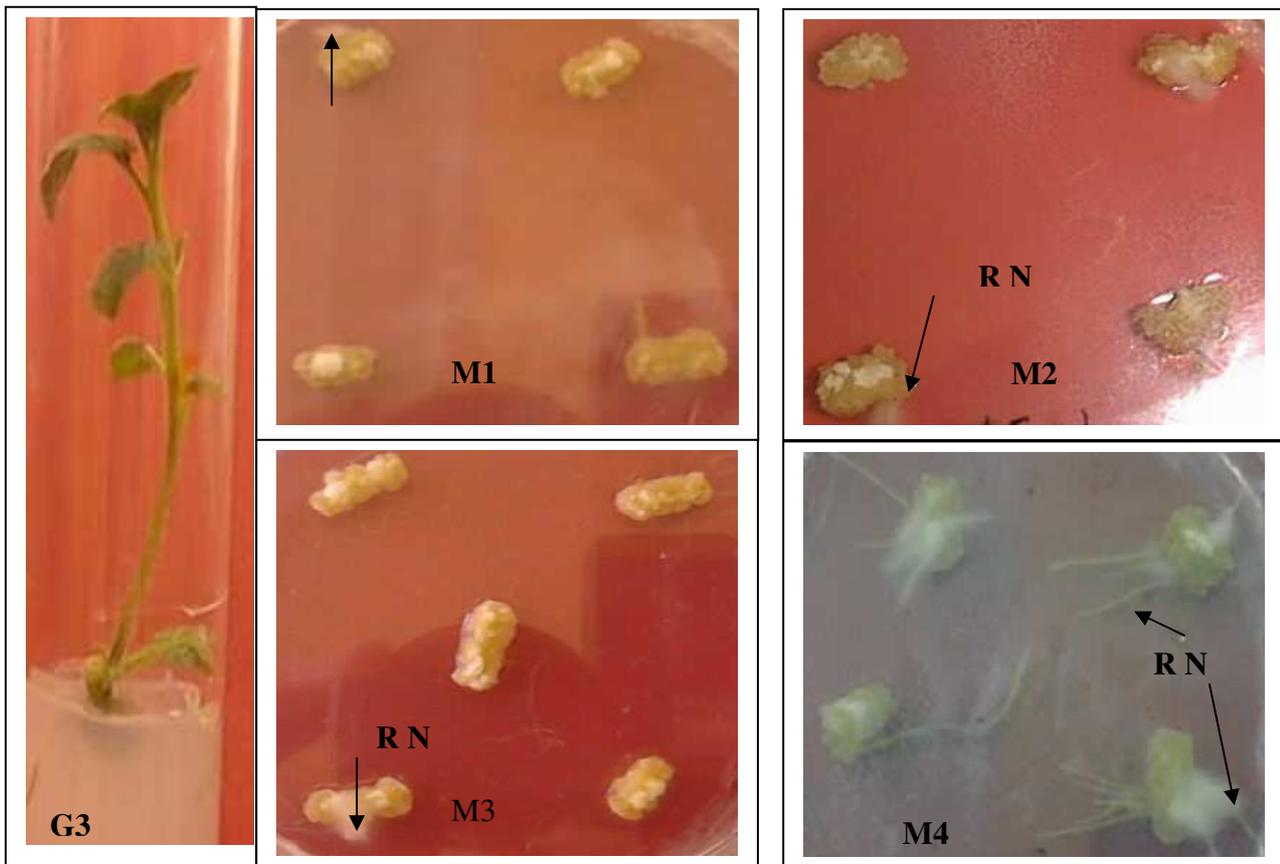


Planche 1: Aspect de vitroplant de 3^{ème} génération, (G3), (G x 1)
Cals d'entre noeuds après 5 semaines de culture selon les 4 milieux testés (M1, M2, M3 et M4) ; RN : racine néoformée, (G x 0,9)

1-2-2 Sur cals de feuilles

Après 9 semaines de mise en culture le taux de cals rhizogènes le plus élevé 88% a été obtenu avec le milieu M4. Les autres milieux M1, M2, et M3 ont atteint respectivement des taux de 25%, 44% et 50%. L'analyse de la variance a indiqué un effet hautement significatif. Effectivement la comparaison des moyennes deux à deux par le test de la pps a montré l'existence de deux groupes distincts : **a** représenté par le milieu M4 et **b** qui regroupe les milieux M1, M2, et M3, (annexe 1-1-b) (**Figure 7**).

C'est également avec le milieu M4 que nous avons obtenu le nombre moyen de racines néoformées le plus élevé avec une moyenne de 2.50 suivi, des milieux M1, M2 et M3 avec respectivement des moyennes de 1.13, 0.88 et 1.50 racines néoformées par explant (**Figure 8**). L'analyse de la variance quant à elle, n'a révélé aucun effet significatif (annexe 1-1-b).

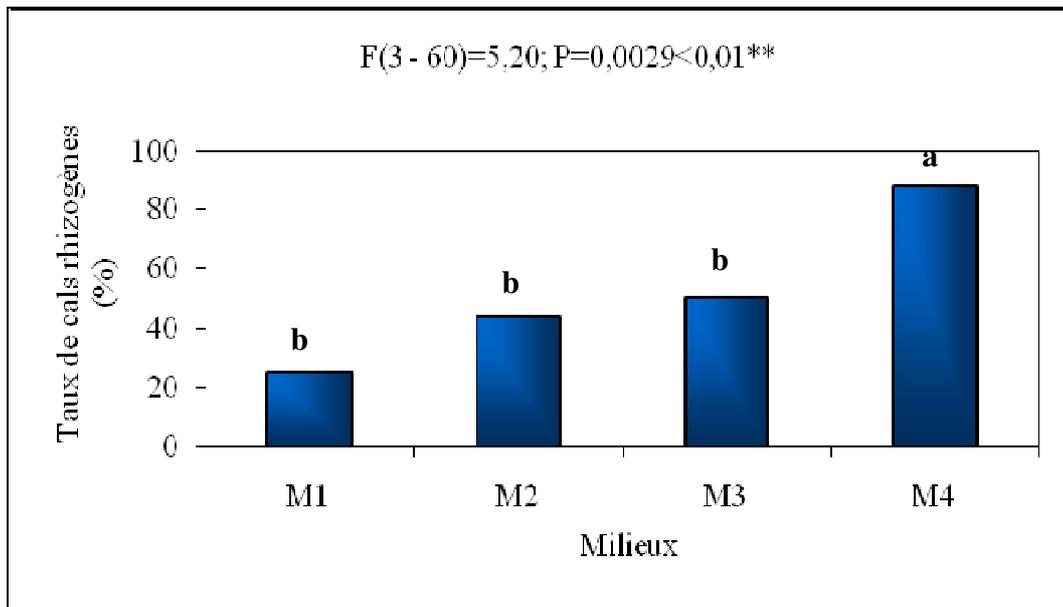


Figure 7 : Taux de cals rhizogènes issus de fragments de feuilles après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés

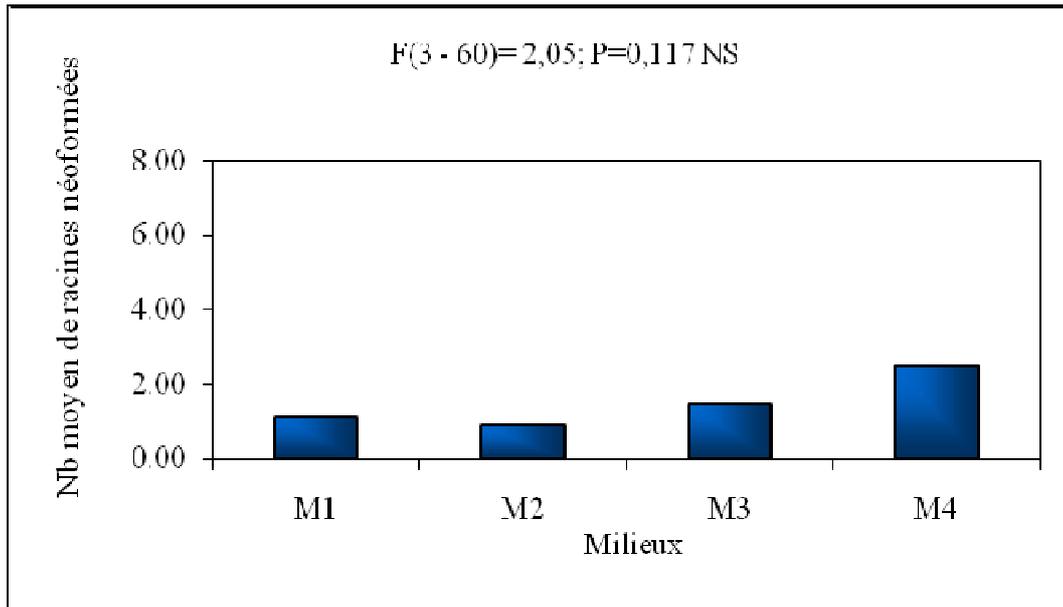


Figure 8 : Nombre moyen de racines néoformées par cals de feuilles après 9 semaines de culture en fonction des milieux de culture testés.

La planche 2 montre l'aspect des cals de feuilles et les racines néoformées, après 5 semaines de culture sur les différents milieux.

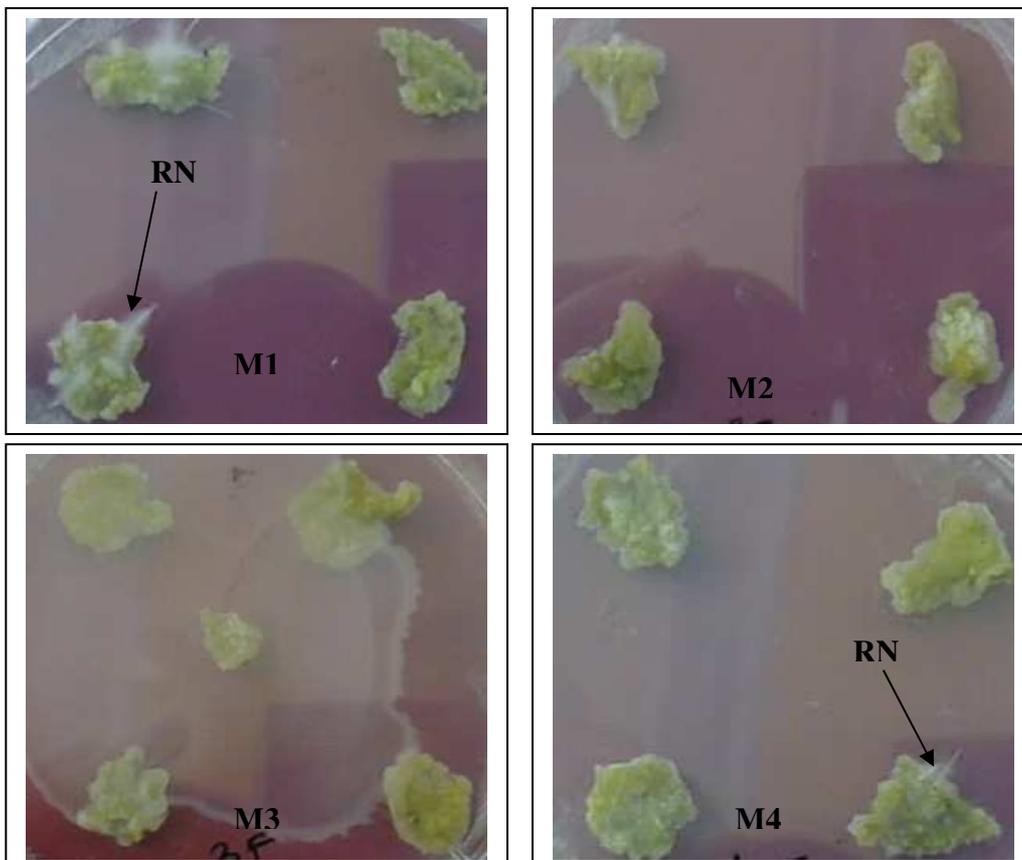


Planche 2 : Aspects des cals de feuilles après 5 semaines de leur mise en culture selon les 4 milieux testés(M1, M2, M3, et M4), RN: racine néoformée (G x0,9).

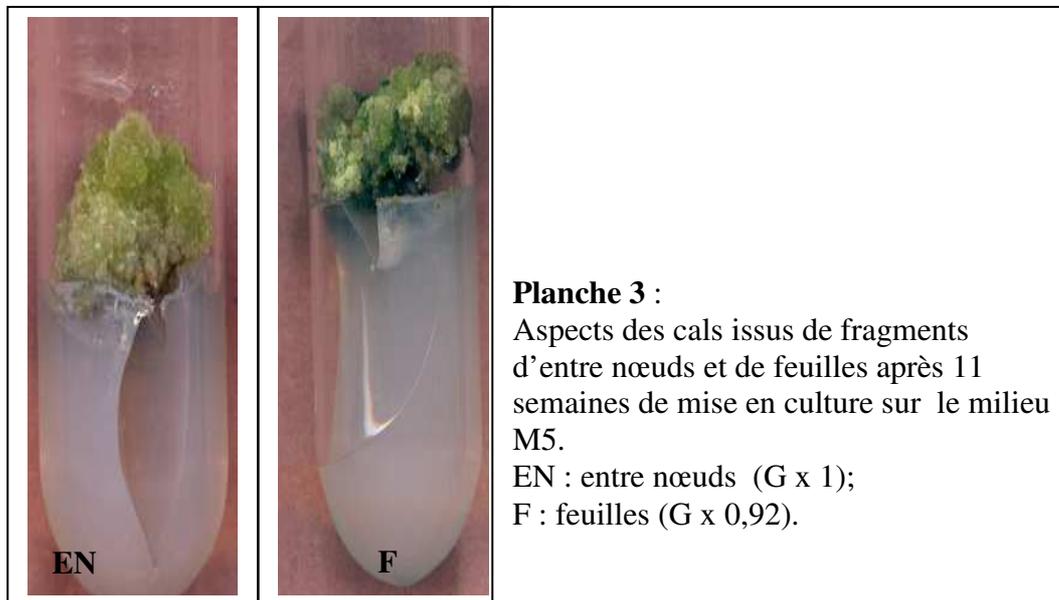
2- Caulogenèse

2-1 Sur les cals précédemment obtenus

Les cals précédemment obtenus avec les milieux M1, M2, M3 et M4, n'ont formé aucun bourgeon néoformé même après leur exposition à la lumière. Nous avons alors transféré une partie des cals obtenus sur le milieu M4 (qui ont été de nature consistante) sur deux autres milieux M5 (MS +0.1 mg/l AIA+2 mg/l kénétine+ 20 g/l saccharose) et M6 (MS +0.1 mg/l AIA+2 mg/l BAP+ 20 g/l saccharose). L'essai a été mené directement à la lumière.

Les cals transférés sur le milieu M5 ont augmenté de volume jusqu'à couvrir toute la surface du milieu de culture à l'intérieur du tube à essai, ils sont devenus progressivement verdâtres, et ils sont restés chlorophylliens jusqu'à la fin de la culture (**Planche 3**).

Ceux mis en culture sur le milieu M6 se sont nécrosés et sont devenus totalement bruns, mais sur la partie inférieure en contact du milieu de culture il y'a eu apparition d'un petit bouton verdâtre qui a donné par la suite naissance à un ou à plusieurs bourgeons néoformés et cela quelque soit l'origine du cal.



2-1-1 Cals issus d'entre noeuds

Sur le milieu M6, les premiers bourgeons ont été apparus après 9 semaines de mise en culture des cals issus d'entre nœuds, avec un taux de 6.67%. Ce taux a évolué pour atteindre 13.33% après 11 semaines et est resté stationnaire jusqu'à la 13^{ème} semaine de mise en culture (**Figure 9**).

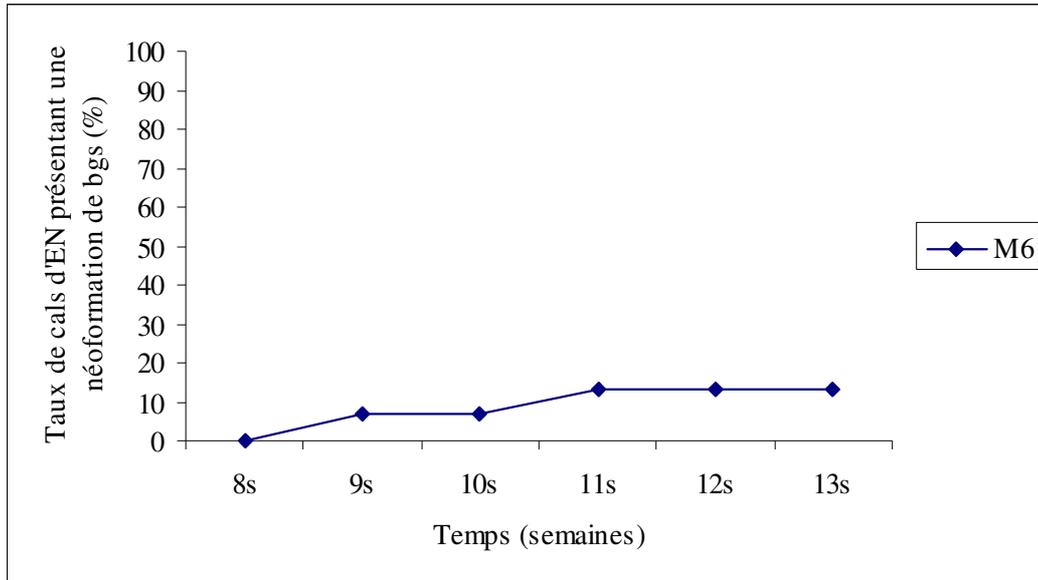


Figure 9 : Evolution du taux de cals issus d'entre nœuds présentant une néoformation de bourgeons sur le milieu M6 en fonction du temps

Le nombre moyen de bourgeons néoformés par cal a été très faible, il n'a été que de 0.07 à la 9^{ème} semaine puis de 0.13 à la 11^{ème} (**planche 4, a**). Ce chiffre est resté constant jusqu'à la 13^{ème} semaine de mise en culture (**Figure 10**). Après les bourgeons néoformés ont été transférés sur le milieu MS simple sans hormone afin d'initier leur enracinement. Ainsi après 15 jours de culture, des vitroplants enracinés ont été obtenus (**Planche 4, b et c**)

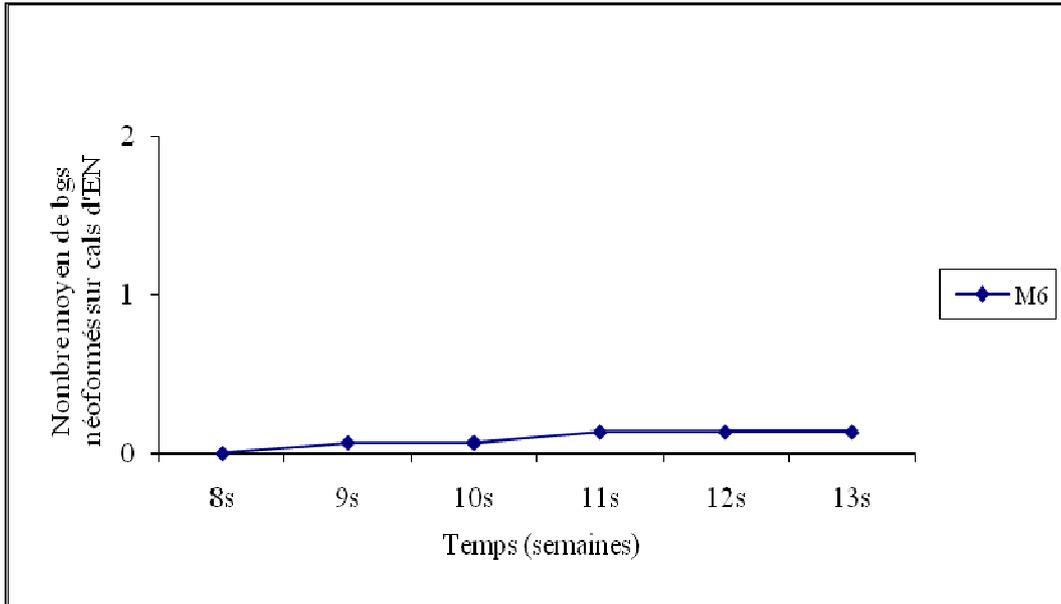


Figure 10: Evolution du nombre moyen de bourgeons néoformés sur cals d'entre nœuds sur le milieu M6 en fonction du temps

2-1-2 Cals issus de feuilles

Des bourgeons néoformés ont été observés à partir de la 8^{ème} semaine de leur transfert, avec un taux de 6.67%. Ce dernier progresse pour atteindre 40% après la 13^{ème} semaine de mise en culture (**Figure 11**).

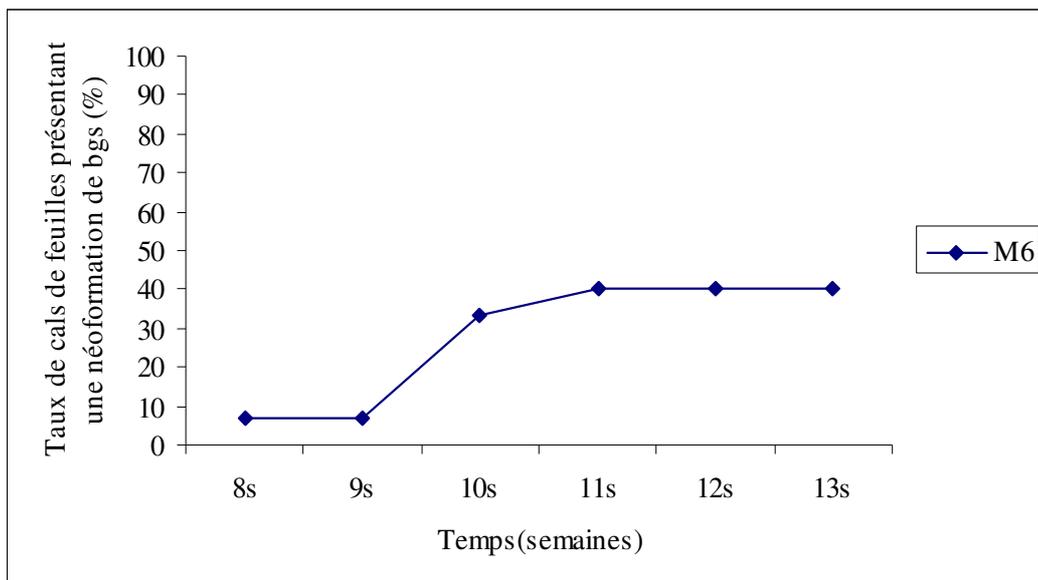


Figure 11: Evolution du taux de cals issus de feuilles présentant une néoformation de bourgeons sur le milieu M6 en fonction du temps.

Le nombre moyen de bourgeons néoformés sur les cals issus de feuilles transférés sur le milieu M6 a évolué de 0.07 à la 8^{ème} semaine à 1.07 bourgeons néoformés par cal au bout de la 13^{ème} semaine de mise en culture (**planche 4 ; d, e et f**), (**Figure 12**). Après 15 jours de culture sur le milieu MS sans hormones de croissances des vitroplants enracinés ont été obtenus (**planche 4 ; g et h**)

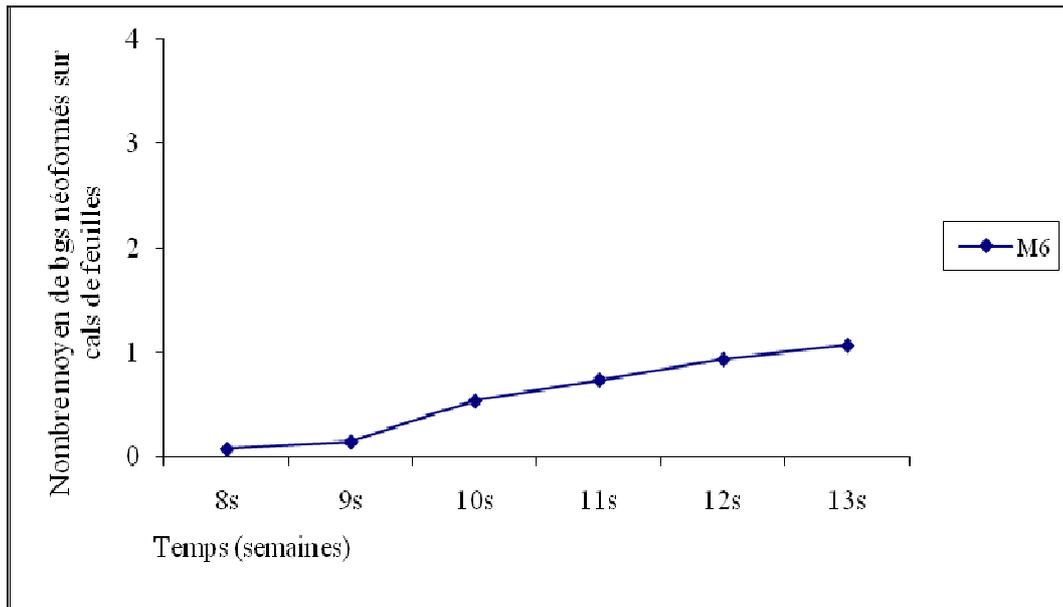


Figure 12: Evolution du nombre moyen de bourgeons néoformés sur cals de feuilles sur le milieu M6 en fonction du temps



Planche 4 : Bourgeons néoformés après transfert sur milieu MS et les vitroplants qui en dérivent

a : Touffe de bourgeons néoformés à partir de cals issus d'entre nœuds transférés sur milieu M6 après 10 semaines de mise en culture (G x 1).

b, c : Vitroplants issus de cals d'entre nœuds obtenus après 15 jours de cultures sur milieu MS simple sans hormones (G x 1).

d, e, f : Bourgeons néoformés à partir de cals issus de feuilles transférés sur milieu M6 après respectivement 9, 10 et 11 semaines de mise en culture (G x 0,88 à 1).

g, h : Vitroplants issus de cals de feuilles obtenus après 15 jours de cultures sur milieu MS simple sans hormones (G x 0,96 à 1).

2-2 Sur les fragments de feuilles et d'entre nœuds

Selon les travaux de **BENKORTBY (1999)** et **KACI (2007)** nous avons testé deux autres balances hormonales représentées par les milieux M7 (MS + 1mg/l BAP + 1mg/l AIA + 1mg/l GA3 + 20g/l saccharose) et M8 (MS + 1mg/l BAP + 1mg/l AIA + 20g/l saccharose), en utilisant directement des fragments de feuilles et d'entre nœuds issus de vitroplants de 3^{ème} génération âgés de 5 semaines.

Les explants d'entre nœuds et de feuilles se sont montrés très réactifs dès les premiers jours de mise en culture.

Sur le milieu M7, les entre nœuds ont montré un gonflement des extrémités. Une induction de petits amas callogènes a pu être observée dès le 15^{ème} jour de mise en culture. Les feuilles ont présenté une légère décoloration, un léger gigantisme et une nécrose de la partie excisée (**Planche 5 a et b**).

La réactivité des explants sur le milieu de culture M7 a été de 100% quelque soit leur origine.

Sur le milieu M8, les fragments de feuilles n'ont montré aucune réactivité, elles se sont nécrosées. Les fragments d'entre nœuds ont montré un léger gonflement des extrémités dès les premiers jours de mise en culture avec apparition de quelques amas callogènes (**Planche 5 c et d**).

Des bourgeons néoformés sur cals d'entre nœuds et des bourgeons adventifs directement sur les fragments de feuilles ont été observés uniquement sur le milieu M7.

Après apparition des premiers bourgeons à l'obscurité, l'essai a été ensuite conduit à la lumière.

2-2-1 Les entre nœuds

Les premiers bourgeons néoformés (sur cals) d'entre nœuds sont apparus sur le milieu M7, à l'obscurité après 30 jours de mise en culture avec un taux de 11.11%. Ces bourgeons ont pris naissance au niveau des extrémités présentant des fissurations. Ce taux a évolué pour atteindre au bout du 50^{ème} jour de culture 38.89% bourgeons néoformés sur le milieu M7 à la lumière (**Figure 13**). Sur le milieu M8 nous n'avons obtenu aucune formation de bourgeons.

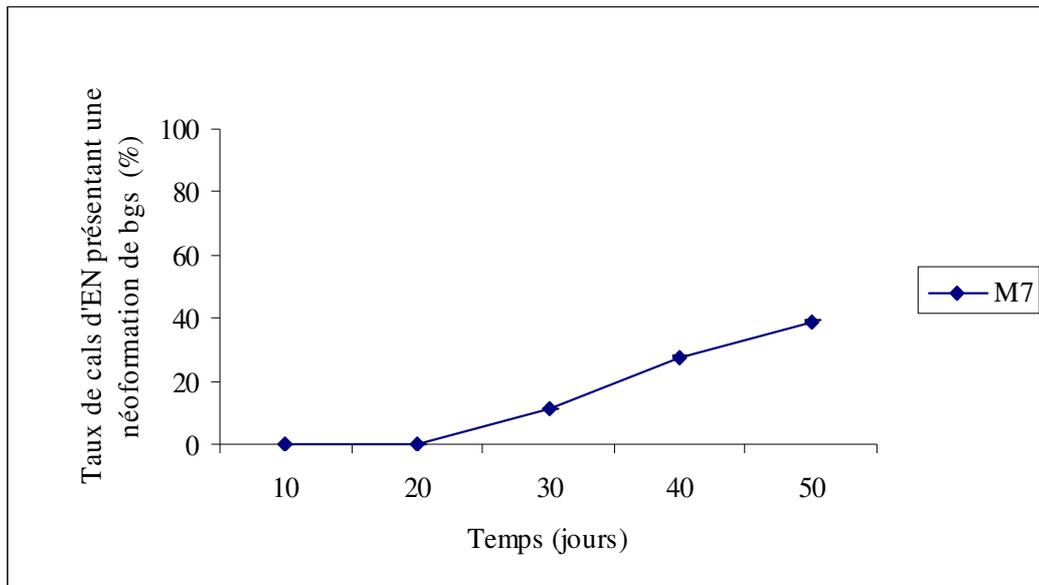


Figure 13 : Evolution du taux de cals d’entre noeuds présentant une néoformation de bourgeons sur le milieu M7 en fonction du temps

Après 50 jours de mise en culture le nombre moyen de bourgeons néoformés a été de 1.78 sur le milieu M7 (**Figure 14**), (**planche 5 a**).

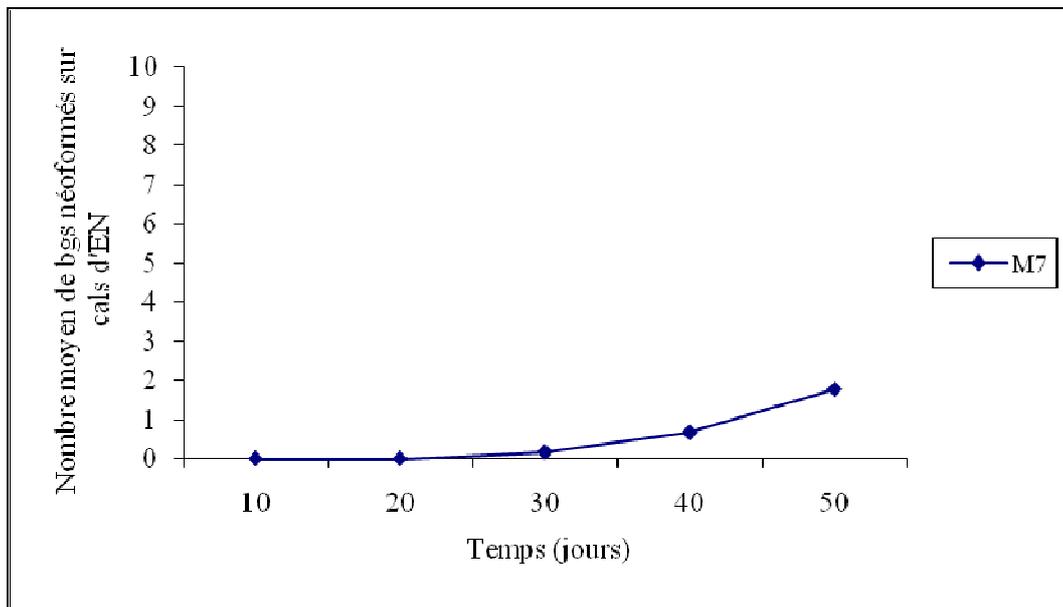


Figure 14 : Evolution du nombre moyen de bourgeons néoformés sur cals d’entre noeuds sur le milieu M7 en fonction du temps

2-2-2 Les feuilles

Après 20 jours de mise en culture, nous avons observé l’apparition des premiers bourgeons adventifs sur le milieu M7 avec un taux de 10%. Les bourgeons ont pris

naissance au niveau des nervures principales. Au bout du 50^{ème} jour de culture, le taux de fragments de feuilles formant des bourgeons adventifs a atteint 55% (**Figure 15**).

Le milieu M8 n'a eu aucun effet sur la caulogénèse.

Le milieu M7 a donné le meilleur nombre moyen de bourgeons néoformés 2.55, il a été obtenu après 50 jours de mise en culture (**Figure 16**).

Pour les deux essais de caulogénèse aucune formation rhyzogène n'a pu être observée quelque soit l'explant utilisé.

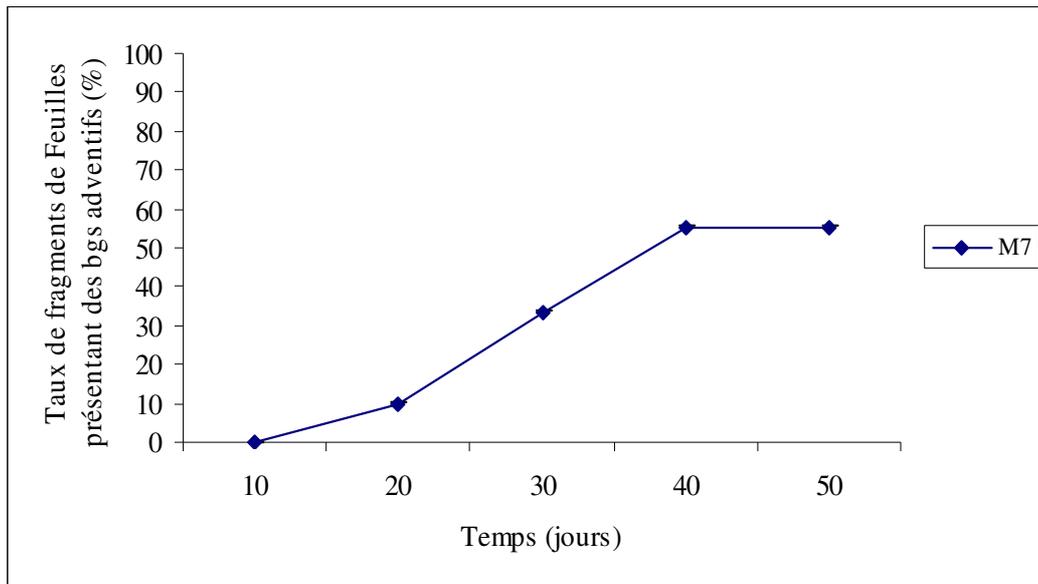


Figure 15 : Evolution du taux de fragments de feuilles présentant des bourgeons adventifs sur le milieu M7 en fonction du temps

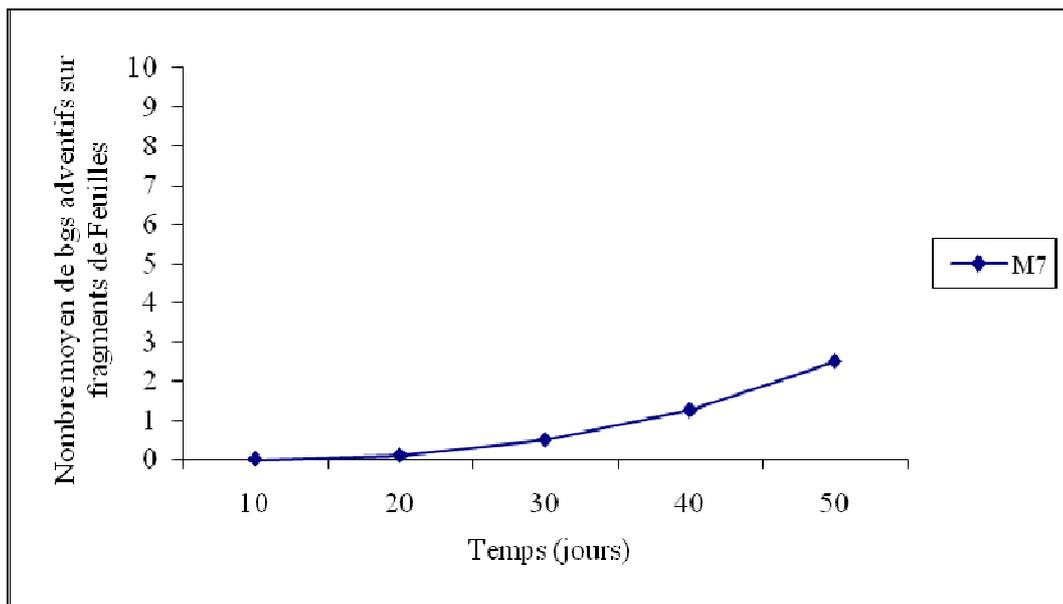


Figure 16 : Evolution du nombre moyen de bourgeons adventifs sur fragments de feuilles sur milieu M7 en fonction du temps

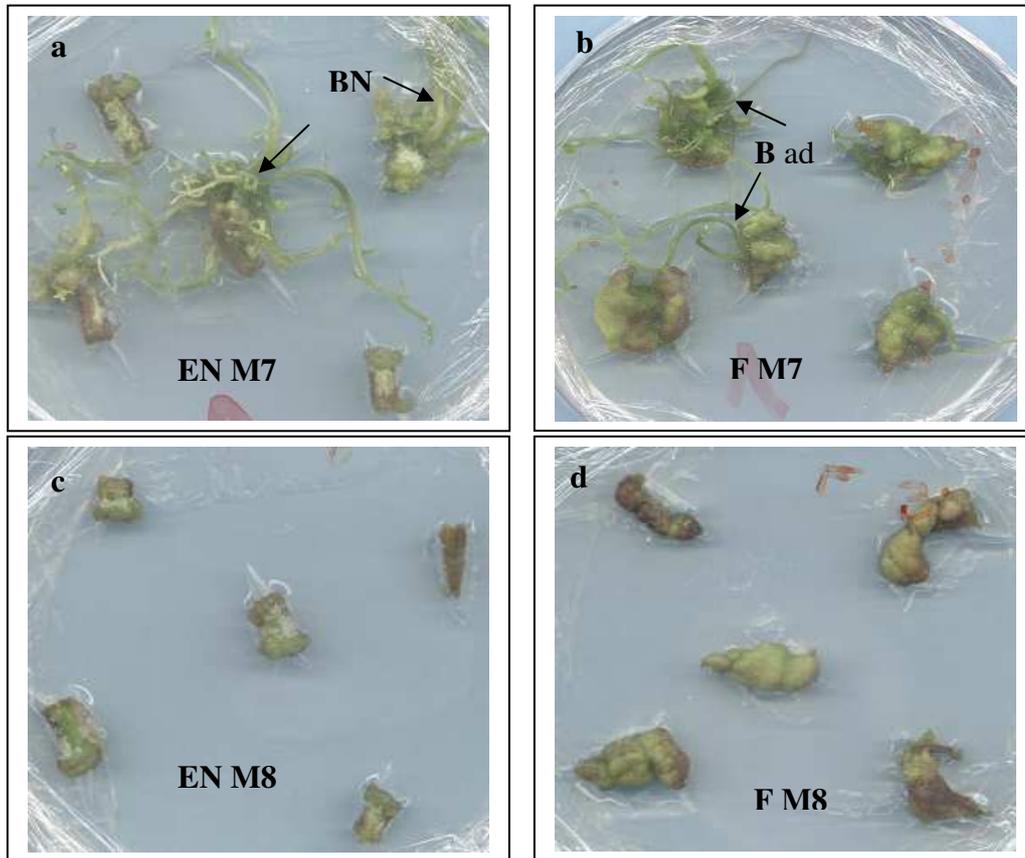


Planche 5 : Comportement des explants de feuilles et d'entre nœuds sur les milieux M7 et M8 (**a, c** : entre nœuds ; **b, d** : feuilles) après 1 mois et 25 jours de mise en culture ($G \times 0,66$).
BN : bourgeons néoformés ; **B ad** : bourgeons adventifs
EN : entre nœuds ; **F** : feuilles

II- PROTOPLASTES

1- Isolement

1-1 À partir du mésophylle foliaire

1-1-1 Vitro plants de 1^{ère} génération (G1)

a- Effet des différentes composantes de la solution de macération

Les feuilles issues de vitroplants présentent une fine cuticule ce qui permet une attaque facile des enzymes, tout en évitant les problèmes que peut provoquer une stérilisation de la surface des feuilles (DODDS, 1985)

a-1 Concentration en enzymes

Plusieurs concentrations de macérozyme (0.1%, 0.2%, 0.3% et 0.4%) ont été testés, celle de la cellulase étant fixée à 1%. Ces enzymes sont dissoutes dans 10 ml de milieu MS liquide sans saccharose mais additionné de 0.5 mole de mannitol. Après sa dissolution le pH a été ajusté à 5,6.

Les feuilles ont été coupées en petites lamelles d'environ 1mm de largeur, elles ont été rajoutées à la solution enzymatique qui a été par la suite placée sur un agitateur dont le nombre de tours et la température ont été fixés respectivement à 100 trs/ mn et 27 + 4 °C.

La libération des protoplastes a débuté dès la première heure de macération.

Les figures 17 et 18 montrent que les meilleurs nombres moyens de protoplastes totaux et viables ont été enregistrés avec la concentration 0.2% après 4h30 de macération avec respectivement 6.44×10^6 protoplastes/ g-MF et 5.33×10^6 protoplastes/ g-MF (soit 83% de viabilité).

Néanmoins, nous avons constaté que pour l'ensemble des concentrations utilisées, les protoplastes obtenus après 3h00 de macération ont été de qualité meilleure que ceux observés ultérieurement. En plus, au-delà de 3h30 de macération, les protoplastes ont commencé à perdre leur rétraction ainsi que l'intégrité de leur membrane plasmique. A ce stade les protoplastes sont restés viables, cependant au-delà de 4h30 de macération les pourcentages de viabilité des protoplastes ont baissé.

Ainsi, nous avons retenu les résultats obtenus après 3h00 de macération, où c'est la concentration 0.3% qui a donné les meilleurs nombres moyens. Ils ont été de l'ordre de 6.22×10^6 protoplastes totaux/g-MF et 5.11×10^6 protoplastes viables/g-MF. (soit 82% de viabilité).

L'analyse de la variance (annexe 2-1-1-a) après 3h00 de macération n'a révélé aucun effet significatif entre les différentes concentrations de macérozyyme appliquées, sur les rendements en protoplastes viables.

Nous avons donc fixé les concentrations des enzymes à :

- 1% pour la cellulase trichoderma ;
- 0.3% pour la pectinase macérozyyme R-10.

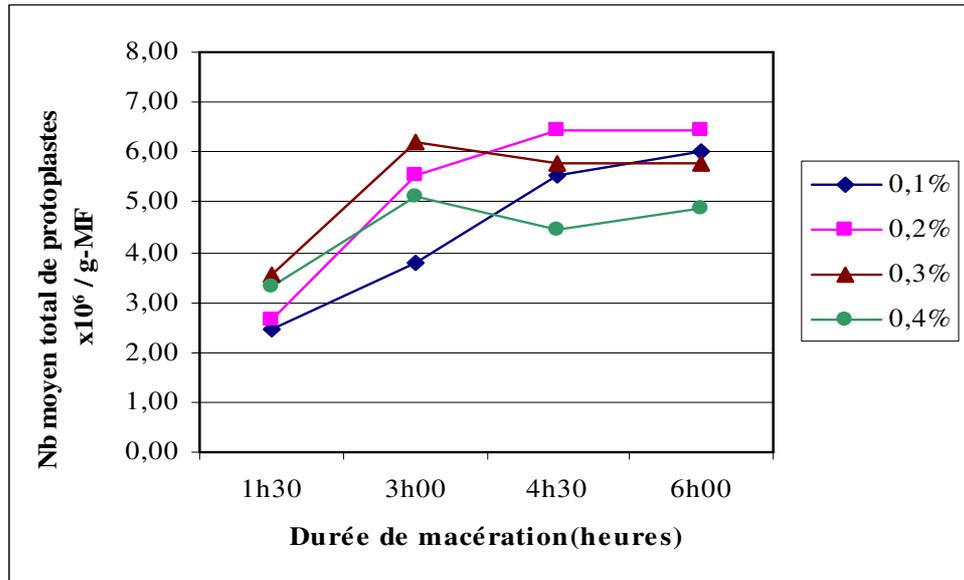


Figure 17 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, selon les différentes concentrations de macérozyyme R-10 et en fonction du temps.

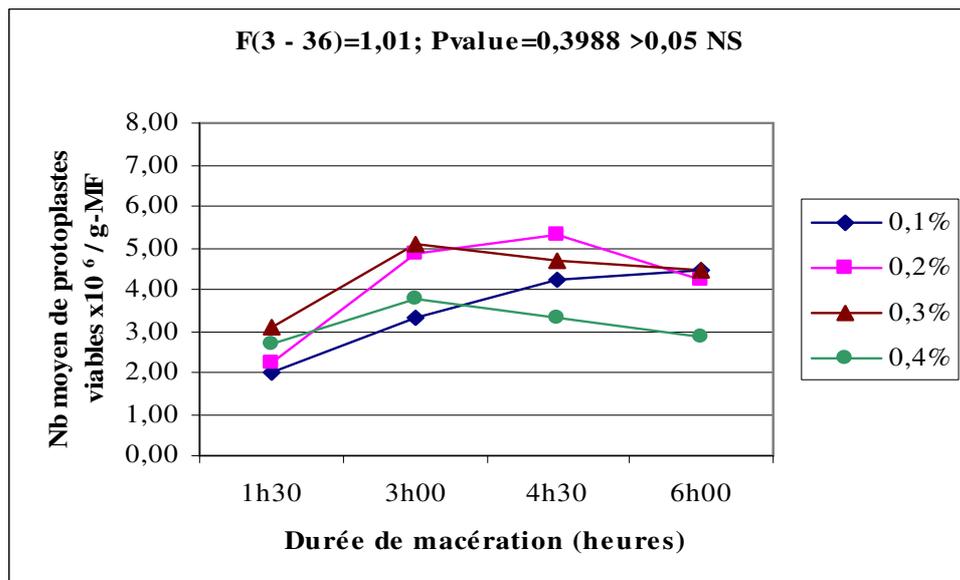


Figure 18 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, selon les différentes concentrations de macérozyyme R-10 et en fonction du temps.

a-2 Concentration de mannitol

Cinq concentrations de mannitol (0.3, 0.4, 0.5, 0.6 et 0.7 mole) ont été testées. Les autres conditions de macération sont restées inchangées.

Après 3h00 de macération c'est la concentration 0.5 mole qui a donné les meilleurs résultats 5.30×10^6 protoplastes totaux /g-MF et 4.65×10^6 protoplastes viables / g-MF, le pourcentage de viabilité étant de 88%. Aussi après 4h30 de macération c'est toujours la concentration 0.5 mole qui a donné les meilleurs nombres moyens avec respectivement 5.10×10^6 protoplastes totaux/g-MF et 4.64×10^6 protoplastes viables/ g-MF (**figures 19 et 20**).

L'analyse de la variance a indiqué un effet très hautement significatif après 3h00 de macération et significatif après 4h30 entre les différentes concentrations de mannitol appliquées sur les nombres moyens en protoplastes viables (annexe 2-1-1-b).

Effectivement, après 3h00 de macération, la comparaison des moyennes deux à deux à l'aide du test de la ppds, a révélé l'existence de trois groupes homogènes, dont b et c se chevauchent. Le groupe a étant représenté par la meilleure concentration, 0.5 M.

Aussi après 4h30 de macération, le test de la ppds montre que le meilleur groupe (a) a été représenté par la concentration 0.5 mole (**figures 19 et 20**).

Ainsi la concentration de mannitol maintenue pour le reste des essais a été de 0.5 mole.

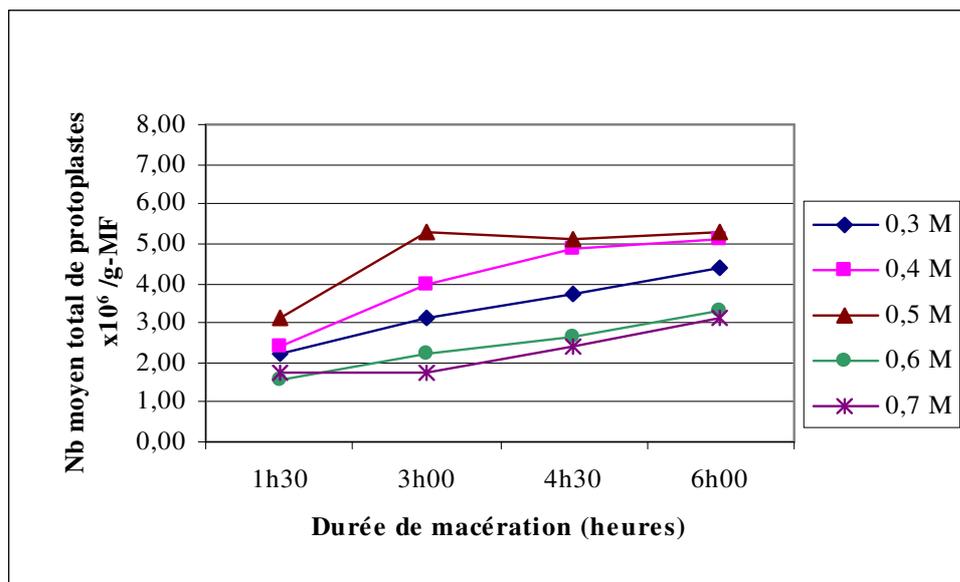


Figure 19 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, selon les différentes concentrations de mannitol et en fonction du temps.

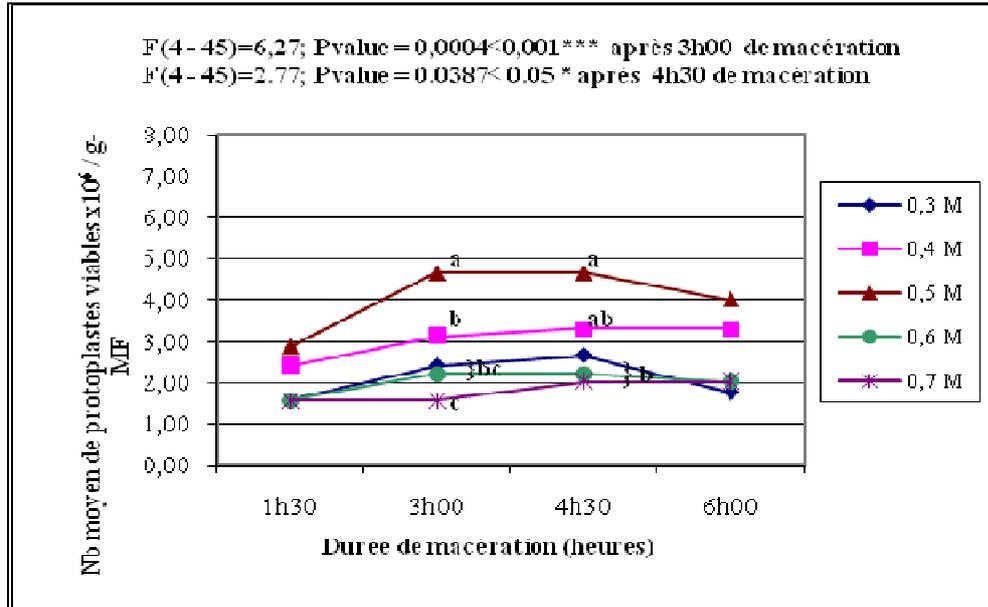


Figure 20 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, selon les différentes concentrations de mannitol et en fonction du temps.

a-3 pH

Les figures 21 et 22 montrent qu'après 4h30 de macération les nombres moyens en protoplastes totaux et viables obtenus avec les deux pH testés (5 et 5.6) n'ont pas été significativement différents. Après 6h00 de digestion enzymatique, en présence du pH (5) les nombres moyens ont été les meilleurs, avec 6×10^6 protoplastes totaux/g-MF et 4.40×10^6 protoplastes viables/g-MF.

De plus, nous avons observé que les protoplastes obtenus avec le pH (5) après 6h00 de macération ont été de meilleur aspect que ceux obtenus avec le pH 5.6.

L'analyse de la variance à un seul facteur de variation après 6h00 de macération n'a révélé aucun effet significatif du pH sur le nombre moyen de protoplastes viables (annexe 2-1-1-c). Ainsi le pH maintenu pour la suite de l'expérimentation a été celui de 5.

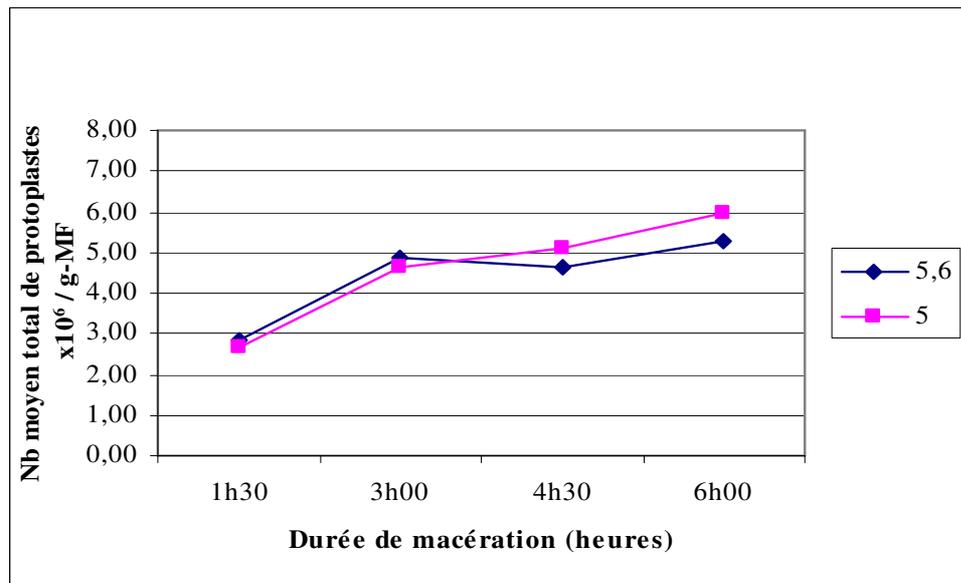


Figure 21 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, selon le pH et en fonction du temps.

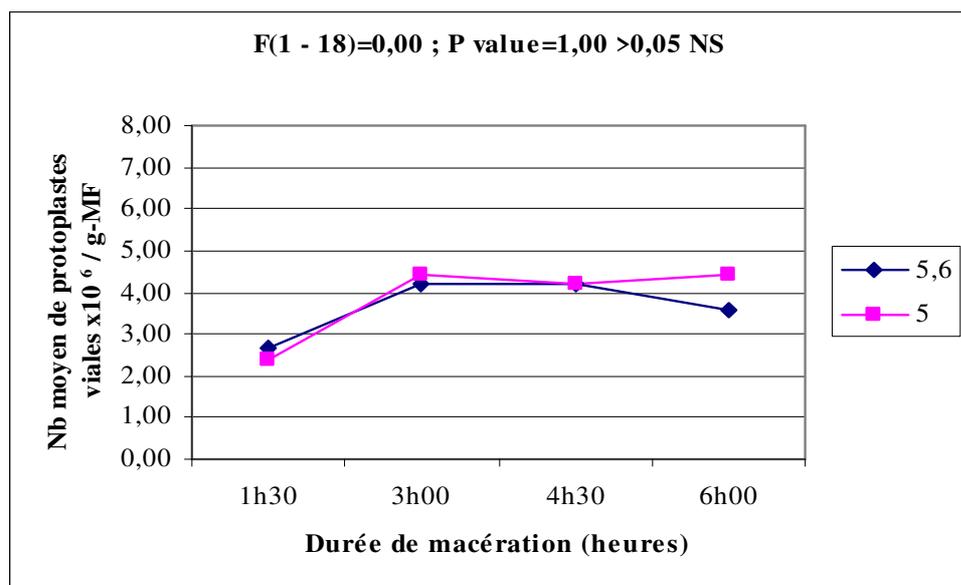


Figure 22 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, selon le pH et en fonction du temps.

Au terme de ces premiers essais nous avons pu obtenir des protoplastes avec des pourcentages de viabilité satisfaisants dans les conditions suivantes :

- Feuilles coupées en petites lamelles ;
- Milieu de macération MS liquide sans sucre ;
- Macération avec agitation à 100 trs/ mn ;
- 1% de trichoderma et 0.3% de macérozyme R-10;

- 0.5 mole de mannitol;
- pH : 5 ;
- Durée de macération de 3h00 à 3h30.

Durant les essais précédents, nous avons été confronté au phénomène d'agglutination des protoplastes (**Planche 6 a et b**).

Les centrifugations (100 trs/ mn et 75 trs/ mn) au cours des essais ultérieurs de purification n'ont fait qu'aggraver le phénomène, les protoplastes s'agglutinaient de plus en plus sous l'effet de la centrifugation en formant des amas de protoplastes collés (**planche 6 c**).

Il est à noter que la centrifugation a eu comme conséquences deux effets négatifs sur le comportement des protoplastes :

- Agglutination ;
- Fragilisation de la membrane plasmique et leur éclatement.

Ceci nous a poussé à tester l'effet du CaCl_2 et de la solution CPW (voire matériel et méthodes).

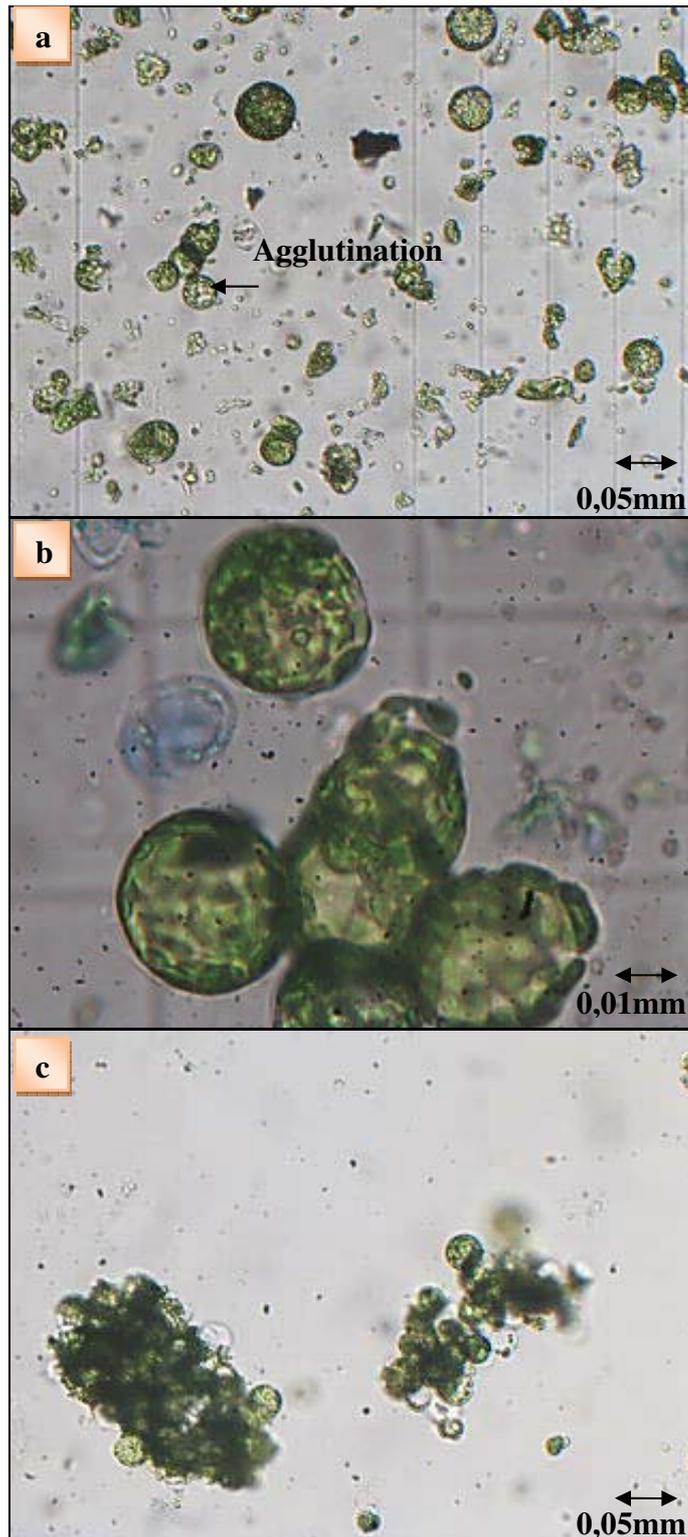


Planche 6 :Protoplastes issus du mésophylle foliaire de vitroplants de 1^{ère} génération âgés de 6 semaines
a : Après 3h00 de macération ;
b : Agglutination des protoplastes durant la macération ;
c : Agglutination des protoplastes après centrifugation.

a-4 CaCl₂

Le CaCl₂ a été rajouté à la solution minérale MS à une concentration de 0.05 mole (5 g/l), les autres conditions ont été maintenues fixes.

Après 3h00 de macération nous avons obtenus 5.77x10⁶/g-M-F et 4.66x10⁶/g-MF respectivement pour les nombres moyens en protoplastes totaux et viables (**Figures 23 et 24**). Le taux de viabilité a été de 81%.

L'analyse de la variance après 3h00 et 4h30 de macération n'a révélé aucun effet significatif entre les nombres moyens en protoplastes viables obtenus avec la solution MS simple et ceux obtenus avec la solution MS additionnée de 0.05 mole de CaCl₂ (annexe 2-1-1-d).

Cet élément minéral n'a pas permis d'améliorer les nombres moyens en protoplastes viables. Cependant son addition s'est montrée très avantageuse sur l'intégrité et la stabilité de la membrane plasmique des protoplastes surtout après 4h30 de macération, ce qui n'était pas le cas auparavant. Nous avons également remarqué que les protoplastes ne s'agglutinaient plus durant la macération et supportaient très bien la centrifugation.

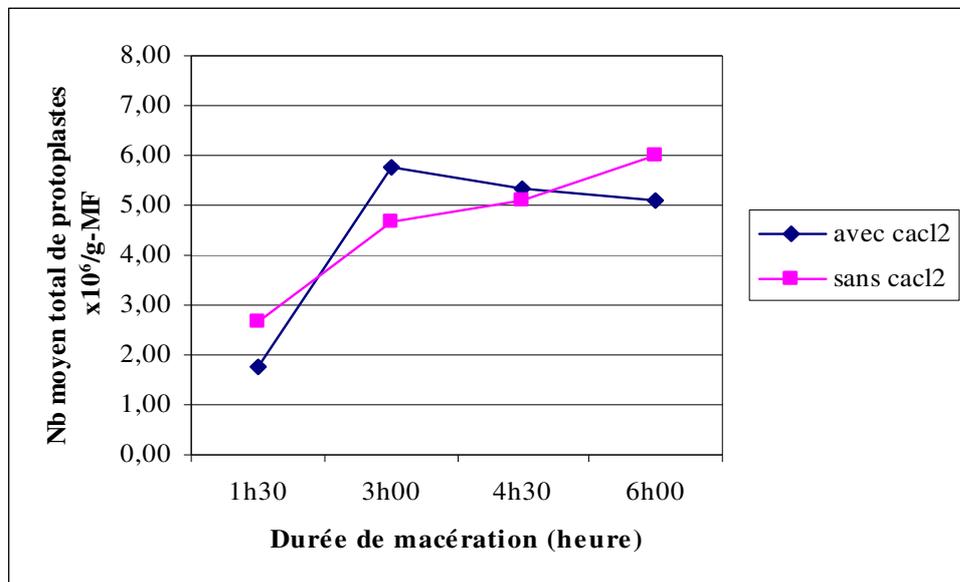


Figure 23 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, avec ou sans CaCl₂ en fonction du temps.

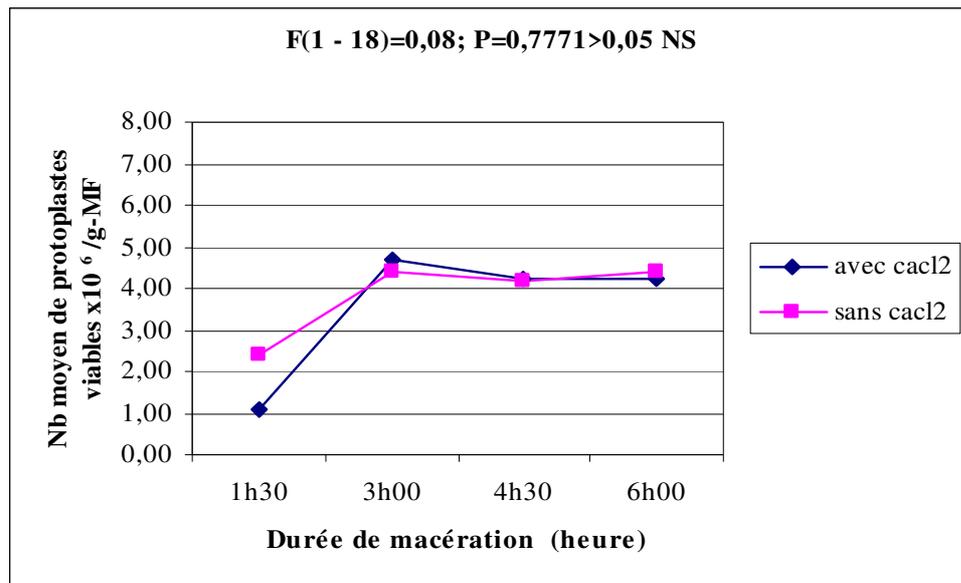


Figure 24 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, avec ou sans CaCl_2 en fonction du temps.

a-5 Solution CPW

La macération dans la solution CPW (sans addition de 0.05 mole de CaCl_2) a permis la libération des protoplastes dès la 1^{ère} heure de macération. Le maximum étant atteint après 4h30 de macération, avec 6.66×10^6 protoplastes totaux/g-MF et 4.44×10^6 protoplastes viables/g-MF. Ces derniers ont baissé légèrement pour atteindre après 6h00 de macération 6×10^6 et 4×10^6 respectivement pour les nombre moyens de protoplastes totaux et viables /g-MF (**Figure 25 et 26**).

La solution CPW nous a permis d'obtenir des nombres moyens se rapprochant étroitement de ceux obtenus avec la solution minérale MS sans saccharose. L'analyse de la variance après 3h00 et 4h30 de macération n'a révélé aucun effet significatif entre les solutions MS et CPW sur les rendements en protoplastes viables (annexe 2-1-1-e).

Avec la solution CPW, le taux de viabilité a toujours été meilleur après 3h00 de macération, il a été de 85.53%, puis a baissé pour atteindre 67% après 4h30 de macération.

Nous avons noté que les protoplastes ont présenté une meilleure structure membranaire par rapport à ceux obtenus avec la solution minérale MS et ont mieux supporté la centrifugation dans la solution CPW, cependant ils s'agglutinaient toujours (**Figure 27**).

Ainsi, nous ne l'avons pas retenu pour la suite des expériences.

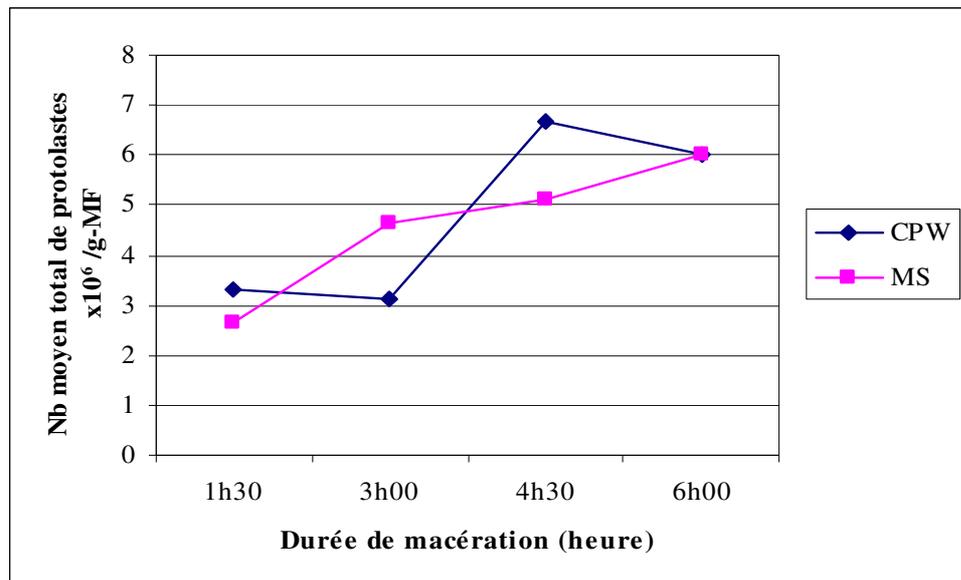


Figure 25 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, avec la solution MS et CPW en fonction du temps.

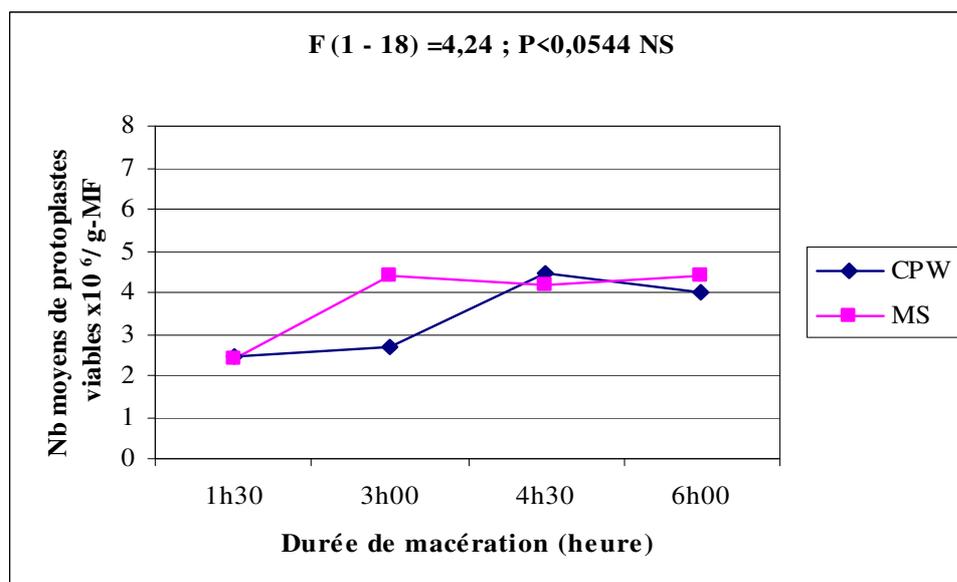


Figure 26 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, avec la solution MS et CPW en fonction du temps.



Figure 27 : Protoplastes issus du mésophylle foliaire de vitroplants de 1^{ère} génération obtenus après 4h30 de macération dans la solution CPW.

b- Age des vitroplants (G1)

Les vitroplants âgés de 6 à 7 semaines à partir desquels ont été prélevées les feuilles utilisées durant nos précédentes expériences, nous ont permis d'obtenir des résultats satisfaisants de l'ordre de 10^6 protoplastes viables /g-MF.

Cependant, afin de déterminer si ce paramètre influençait significativement les nombres moyens en protoplastes, trois âges de vitroplants 12, 7, et 4 semaines ont été testés, les autres paramètres sont maintenus comme dans les précédents essais, la solution de macération retenue est celle de MS additionnée de 0.05 mole de CaCl_2 .

Les figures **28** et **29** montrent que ce sont les feuilles issues des vitroplants âgés de 6 à 7 semaines qui ont libéré plus de protoplastes après 3h00 de macération, avec 4.65×10^6 protoplastes totaux/g-MF et 4.40×10^6 protoplastes viables/ g-MF avec un pourcentage de viabilité de 94%.

Le maximum de protoplastes issus de feuilles de vitroplants âgés de 12 semaines a été atteint après 6h00 de macération avec 3.3×10^6 protoplastes totaux /g-MF et 1.55×10^6 protoplastes viables /g-MF. Les protoplastes issus de ce matériel se trouvaient mêler à un nombre important de cellules. Cependant l'augmentation de la concentration de la cellulase à 1.5 et 2% n'a pas pu améliorer les nombres moyens en protoplastes et diminuer l'abondance des cellules libérées (**Figure 30**).

L'analyse de la variance après 3h00 de macération a fait apparaître un effet très hautement significatif, la comparaison des moyennes deux à deux a fait ressortir deux groupes homogènes, (a) formé par les vitroplants âgés de 6 à 7 semaines, les vitroplants âgés de 12 et 4 semaines forment le deuxième groupe (b), (annexe 2-1-1-f).

Nous avons donc maintenu l'âge des vitroplants (G1) de 6 à 7 semaines.

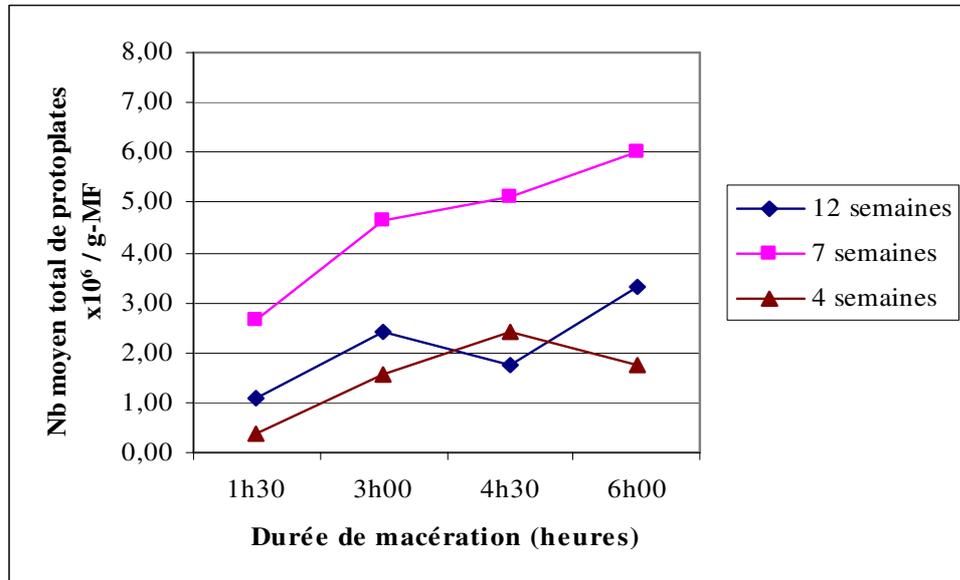


Figure 28 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux, en fonction de l'âge et en fonction du temps.

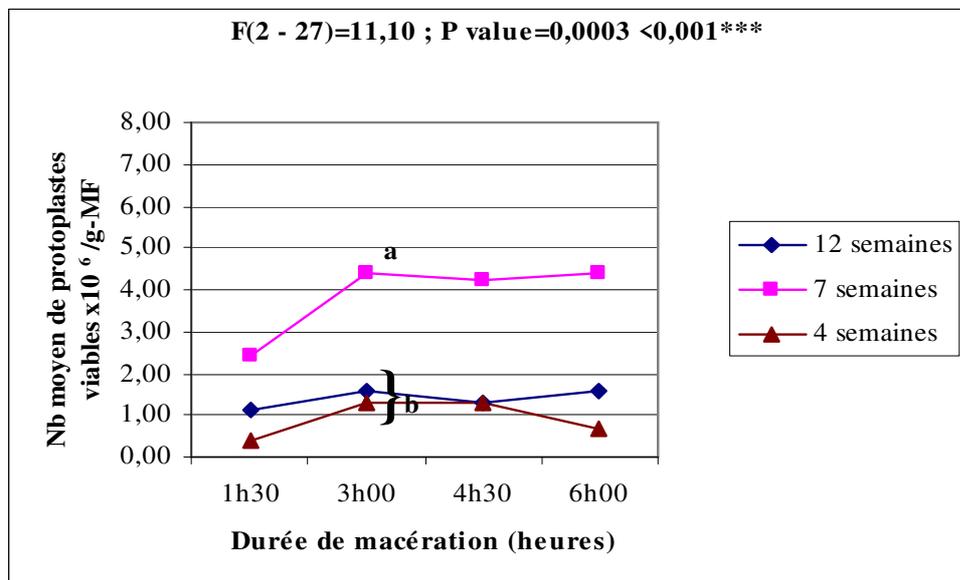


Figure 29 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables, en fonction de l'âge et en fonction du temps.



Figure 30 : Protoplastes de mésophylle foliaire issus de vitroplants de la G1 âgés de 12 semaines après 4h30 de macération

1-1-2 Vitroplants de G2 et G3

Il est à signaler que pour les deux générations G2 et G3 l'effet âge n'a pas été constaté. Les feuilles issues de vitroplants âgés de 7 jusqu'à 10 semaines ont donné des rendements en protoplastes sensiblement identiques quelque soit l'âge des vitroplants.

Deux essais ont été ainsi lancés à partir de feuilles issues de vitroplants âgés de 7 à 10 semaines des deux générations (G2 et G3) : macération avec CaCl_2 (0.05 mole) ou sans CaCl_2 . Les autres paramètres ont été maintenus fixes.

Quelque soit la génération testée, ce sont les essais avec CaCl_2 qui ont donné les meilleurs résultats (**Planches 7a et 7b**).

Pour la G2 les meilleurs nombres moyens totaux et viables ont été de 5.56×10^6 protoplastes totaux/ g-MF et 3.78×10^6 protoplastes viables /g-MF obtenus respectivement après 6h00 et 4h30 de macération (**figures 31 a et 32 a**).

Le pourcentage de viabilité a été de 81% après 4h30 de macération, puis a baissé pour atteindre 48% après 6h00.

La G3 a donné les meilleurs rendements après 4h30 de macération pour les protoplastes totaux et viables avec respectivement 3.78×10^6 proto/ g-MF et 2.67×10^6 proto/ g-MF (**figures 31 b et 32 b**), le pourcentage de viabilité a été de 70%.

Le nombre moyen de protoplastes viables a baissé par la suite pour atteindre après 6h00 de macération 2.67×10^6 et 0.89×10^6 proto / g-MF respectivement pour la G2 et la G3 (**figures 32 a et 32 b**).

L'analyse de la variance après 4h30 de macération, de l'effet du CaCl_2 sur le nombre moyen en protoplastes viables a montré un effet significatif pour les deux générations G2 et G3, avec deux groupes homogènes **a** (avec CaCl_2) et **b** (sans CaCl_2), (annexe 2-1-2 et 2-1-3).

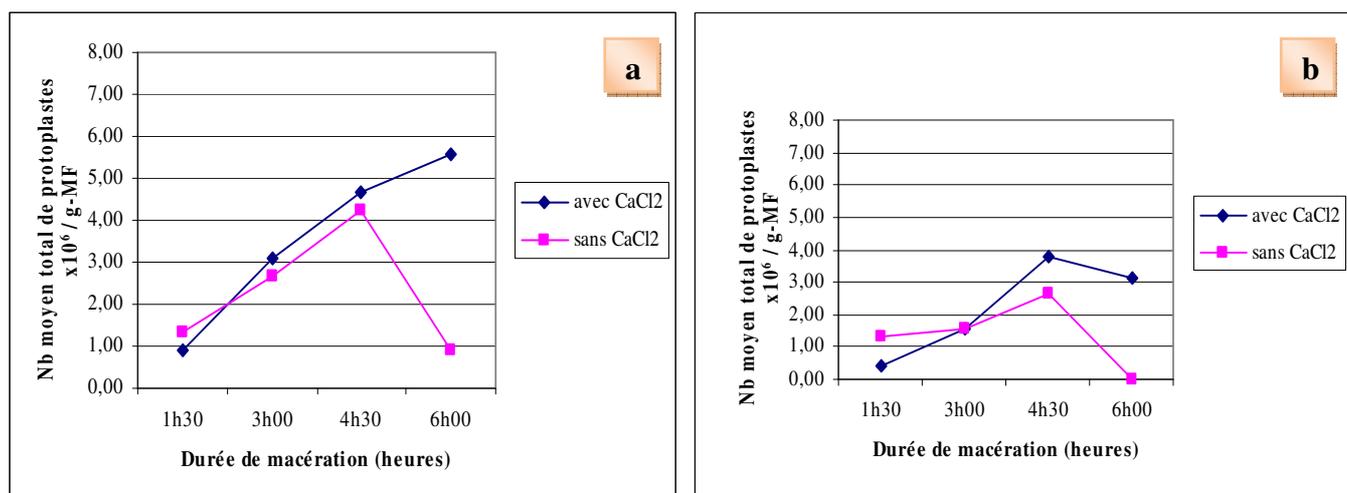


Figure31 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux issus de feuilles de vitoplants (de **a** : G₂ ; **b** : G₃) avec ou sans CaCl_2 en fonction du temps.

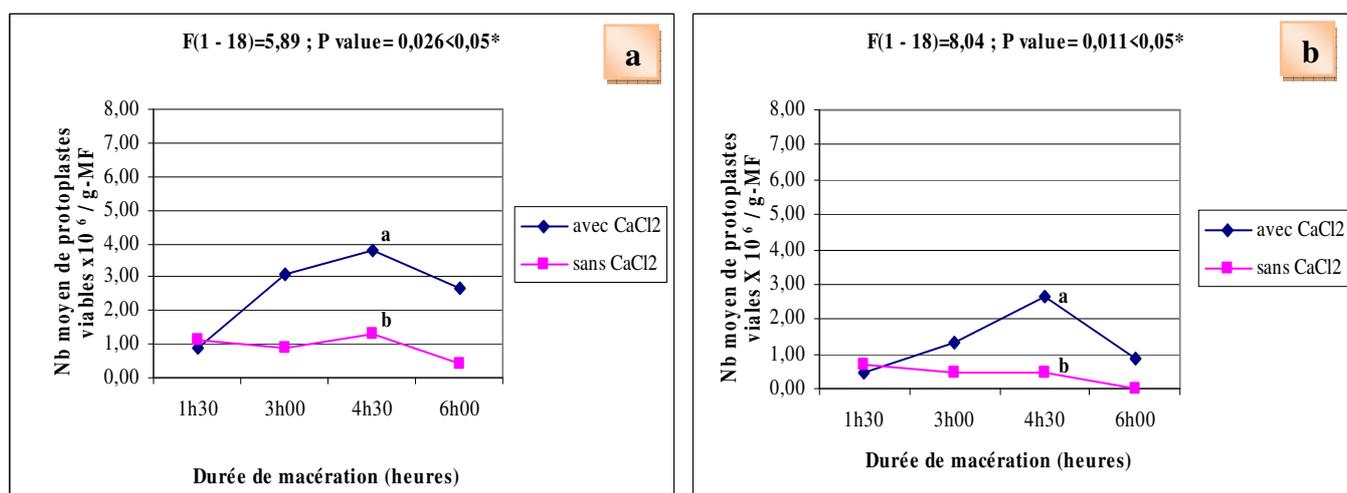


Figure 32 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables issus de feuilles de vitoplants (de **a** : G₂ ; **b** : G₃) avec ou sans CaCl_2 en fonction du temps.

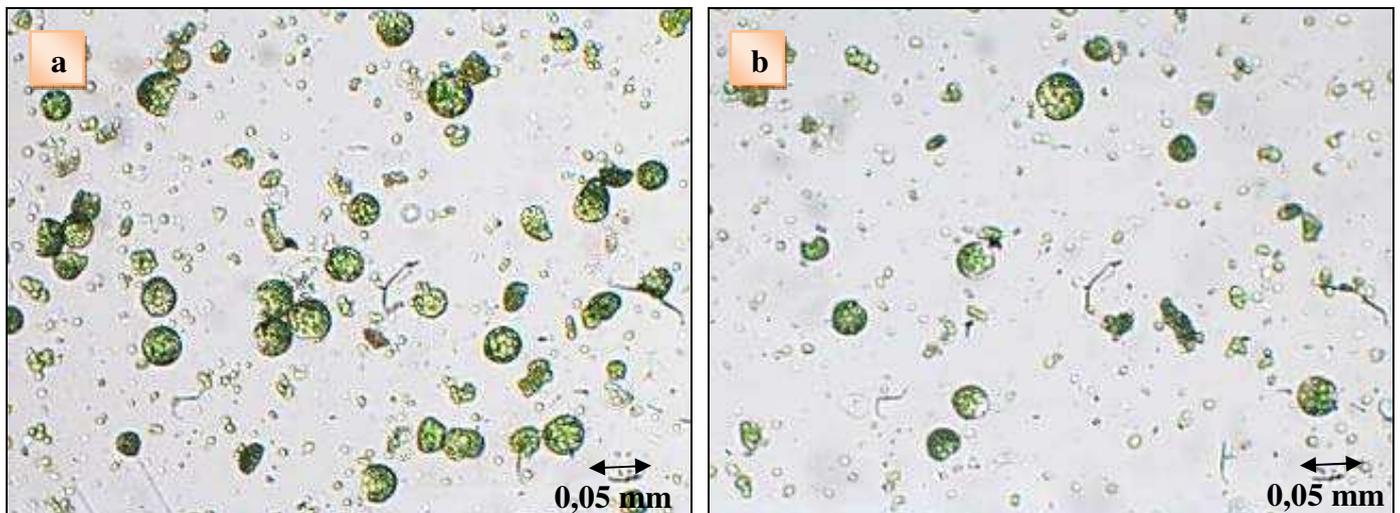


Planche 7 : Protoplastes issus du mésophylle foliaire de vitroplants (de **a** : G₂ ; **b** : G₃) obtenus après 4h30 de macération dans la solution MS additionnée de 0.05 mole de CaCl₂

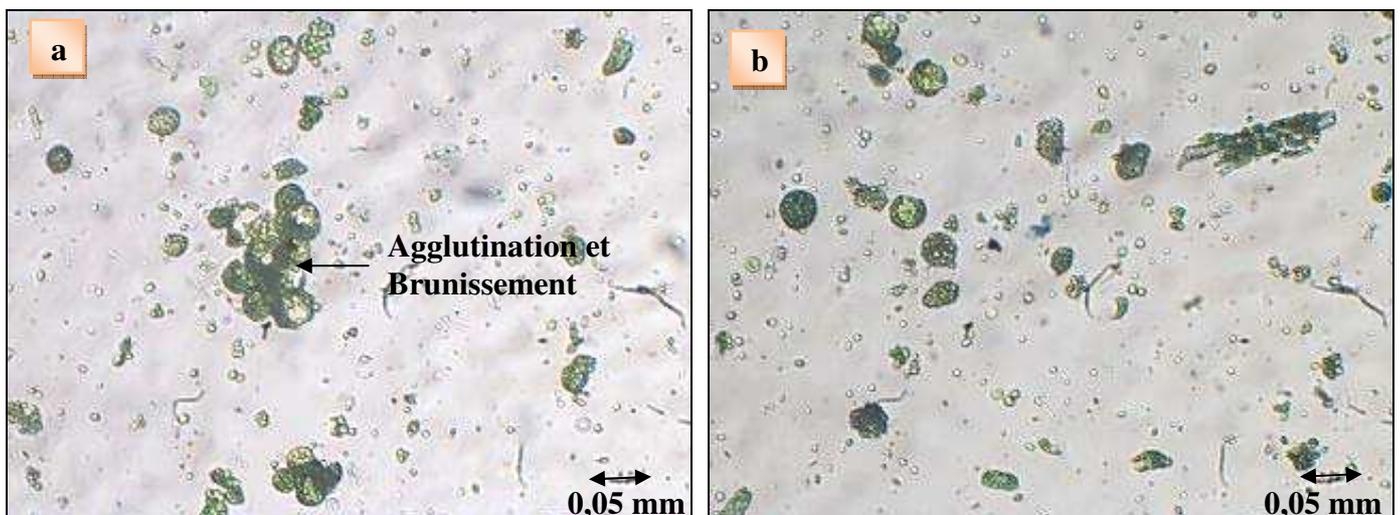


Planche 8 : Protoplastes issus du mésophylle foliaire de vitroplants (de **a** : G₂ ; **b** : G₃) obtenus après 4h30 de macération dans la solution MS sans CaCl₂

1-1-3- Effet des générations

L'analyse de la variance après 3h00 de macération a révélé un effet génération hautement significatif sur les nombres moyens en protoplastes viables obtenus à partir de feuilles issues de vitroplants des trois générations.

Le meilleur groupe a été formé par la G1 et le deuxième par la G3 ; la G2 étant chevauchant. Après 4h30 de macération, il n'y a eu aucun effet significatif, (annexe 2-1-4) (figures 33 et 34).

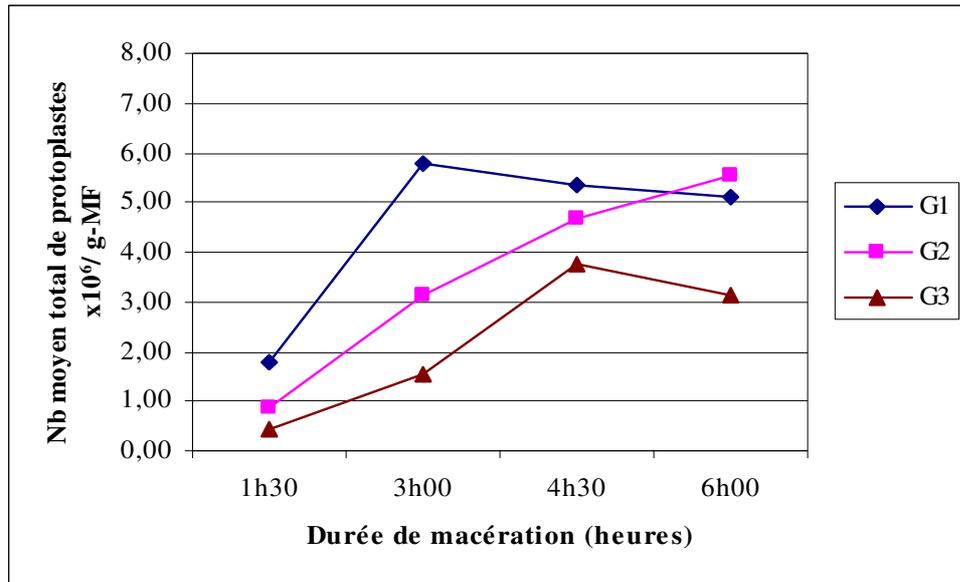


Figure 33 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux issus de feuilles de vitroplants en fonction des générations et du temps

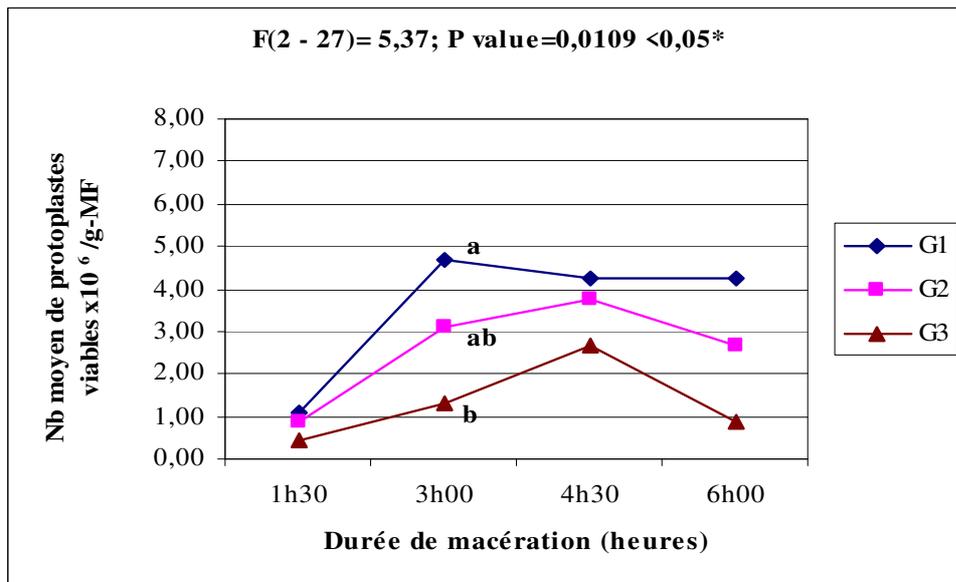


Figure 34 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables issus de feuilles de vitroplants en fonction des générations et du temps

1-1-4 Bilan

Ainsi nous avons fixé les paramètres d'isolement des protoplastes de mésophylle foliaire comme suit :

- Vitroplants de la G1 ou de la G2 âgés de (6 à 7 semaines) et de (7 à 10 semaines) respectivement ;
- Feuilles coupées en petites lamelles (0.45 g);
- Milieu de macération MS liquide sans sucre (10 ml) ;
- 0.05 mole de CaCl_2 ;
- Mannitol : 0.5 mole ;
- pH : 5 ;
- 1% trichoderma et 0.3% macérozyme R-10;
- Agitation à 100 trs/ mn ;
- Durée de macération est de 3h00 à 3h30 ;
- Isolement réalisé à la lumière.

1-2 À partir des cals d'entre nœuds et de feuilles

1-2-1 Cals durs

Les protoplastes ont été isolés à partir de cals durs et consistants issus de fragments d'entre nœuds et de feuilles (âgés de 9 à 10 semaines) dans les conditions d'isolement suivantes :

- 0.45 g de cals (âgés de 9 à 10 semaines) débarrassés des racines néoformées et finement coupés;
- Solution de macération : milieu MS liquide sans saccharose (10 ml);
- Concentration du mannitol : 0.5 mole;
- pH fixé à 5 ;
- la macération a été réalisée sous agitation à 100 trs/mn.

Le dénombrement des nombres moyens des protoplastes totaux et viables a été réalisé chaque 1h30 jusqu'à 6h00 de macération, un dernier dénombrement a été fait après 15h00 de macération.

Quatre différentes combinaisons entre cellulase de trichoderma et macérozyme R-10 (T1, T2, T3 et T4), (voire tableau n° 7, matériel et méthodes) ont été testées.

Aussi bien les cals d'entre nœuds ou de feuilles se sont avérés très récalcitrants à la digestion enzymatique (**Planche 9**).

Les nombres moyens obtenus ont été faibles pour les deux types de cals, quelque soit la combinaison enzymatique appliquée.

Pour les cals d'entre noeuds c'est le traitement T3 (2% trichoderma et 0.3% macérozyme) qui a permis d'obtenir les nombres moyens les plus élevés, après 6h00 de macération, avec 1.55×10^6 protoplastes totaux/g-MF et 1.33×10^6 protoplastes viables /g-MF (**Figures 35 a et 36 a**).

Alors que pour les cals issus de feuilles, ce sont les traitements T4 (3% trichoderma et 0.3% macérozyme) et T2 (1% trichoderma et 0.3% macérozyme) qui ont donné les meilleurs nombres moyens en protoplastes, avec respectivement 1.11×10^6 protoplastes totaux/ g-MF, et 0.66×10^6 proto viables/ g-MF, atteints au bout de 6h00 de macération (**Figures 35 b et 36 b**).

Après 15h00 de digestion enzymatique le nombre de protoplastes viables a baissé beaucoup pour l'ensemble des traitements quelque soit le type de cals

En outre, l'analyse de la variance après 6h00 de macération n'a montré aucun effet significatif entre les différentes combinaisons enzymatiques appliquées, quelque soit l'origine des cals (entre nœuds ou feuilles), (annexe 2-1-5).

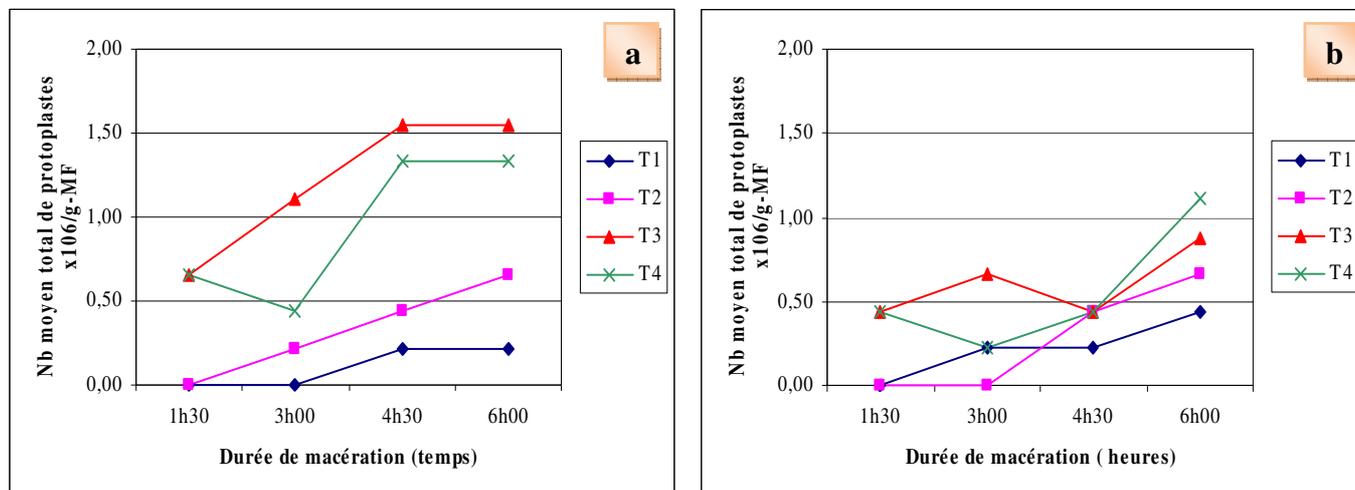


Figure 35 : Evolution du nombre moyen de protoplastes totaux issus de cals durs (de **a** : entre nœuds ; **b** : feuilles) en fonction des différentes combinaisons enzymatiques et du temps de macération

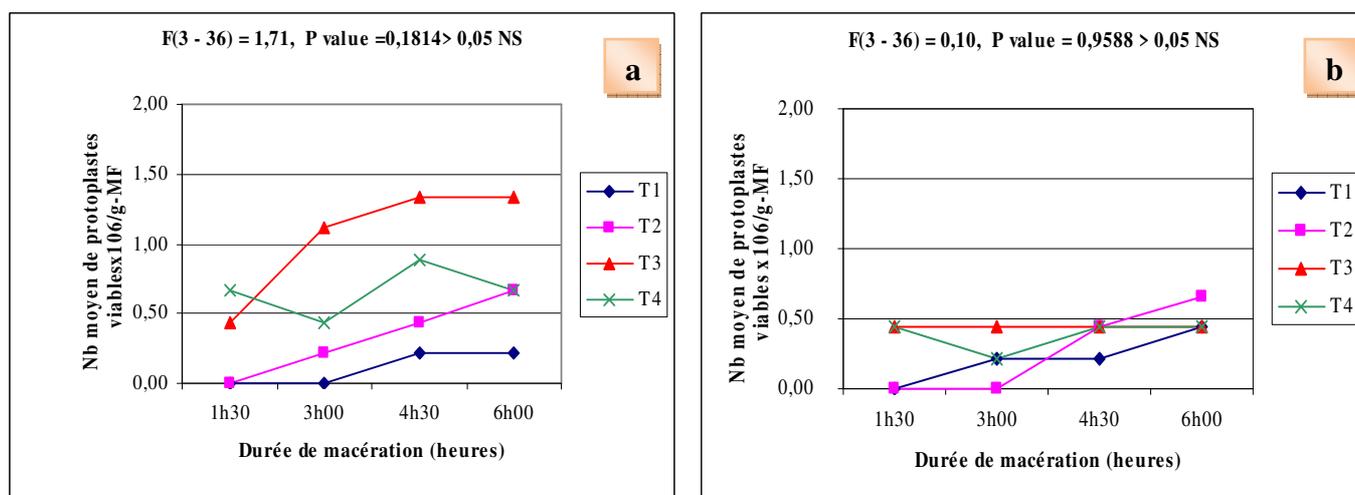


Figure 36 : Evolution du nombre moyen de protoplastes viables issus de cals durs (de **a** : entre noeuds ; **b** : feuilles) en fonction des différentes combinaisons enzymatiques et du temps de macération

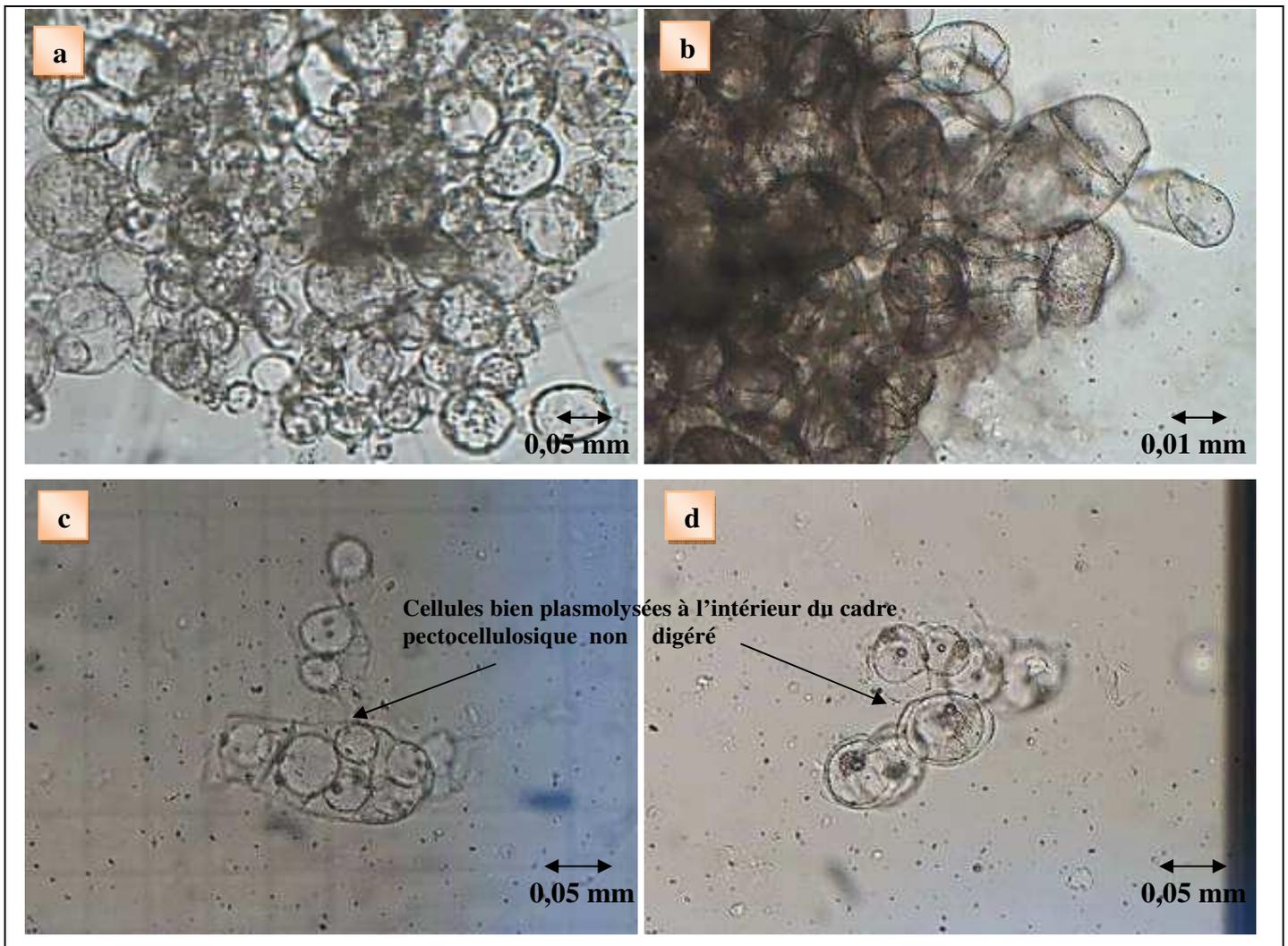


Planche 9 : Tissus de cals durs récalcitrants à la digestion enzymatique
a :cals d'entre nœuds ; b, c et d :cals de feuilles

1-2-2 Cals friables

Des cals friables moins consistants que ceux précédemment testés ont pu être obtenus au bout de 4 à 5 semaines de culture, après fragmentation et repiquage des cals durs sur le milieu de callogenèse M4 (MS + 2mg/l 2,4-D + 0.66 mg/l BAP + 20 mg/l saccharose) (**figure 37**).

Les cals friables obtenus après un ou deux repiquages (4 à 5 semaines pour chacune des cultures) ont été utilisés pour l'isolement des protoplastes dans les mêmes conditions précitées, avec trychoderma à 1% et macérozyme R10 à 0.3%.

Ce type de cals a permis d'obtenir des nombres moyens très satisfaisants (**Figure 38**).

Les meilleurs nombres moyens ont été obtenus après 6h00 de macération avec 5.7×10^6 et 5.3×10^6 protoplastes totaux /g-MF, et 5.4×10^6 et 4.9×10^6 protoplastes viables /g-MF respectivement pour les cals d'entre nœuds et les cals issus de feuilles (**Figure 39**).

Après 15h00 de macération ces rendements ont beaucoup baissé. En outre le problème d'agglutination n'a pas été constaté pour ce type de protoplastes (cals durs ou friables d'entre nœuds et de feuilles).

La comparaison de ces résultats à ceux obtenus avec les quatre traitements appliqués aux cals durs par l'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif avec les meilleurs résultats qui ont été obtenus avec les cals friables (annexe 2-1-5).

Il est à noter que la macération a été faite dans la solution MS simple sans CaCl_2 supplémentaire, suite aux résultats satisfaisants obtenus avec cette dernière.

Après 6h00 de macération le pourcentage de viabilité a été meilleur par rapport à celui obtenu avec le mésophylle foliaire (81% à 88%), il a été de 94% pour les protoplastes issus de cals friables d'entre nœuds et de 92% pour les protoplastes issus de cals friables de feuilles.

Nous avons remarqué que la membrane plasmique des protoplastes issus de cals durs et friables d'entre nœuds et de feuilles a été plus stable et intègre par rapport à celle des protoplastes issus du mésophylle foliaire avec la solution MS sans CaCl_2 supplémentaire.

1-2-3 Bilan

Ainsi, nous avons retenu pour les protoplastes de cals friables d'entre nœuds et de feuilles les paramètres suivants :

- cals friables (âgés de 5 semaines) coupés en petits dés (0.45 g);

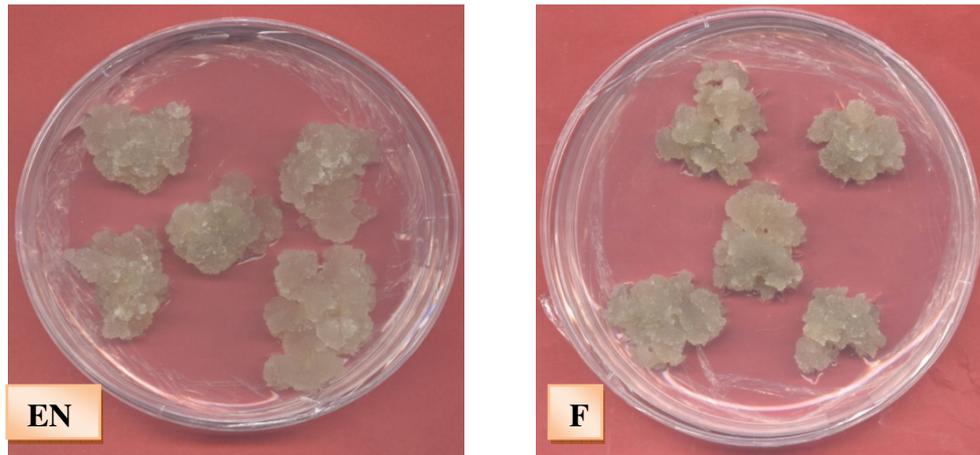


Figure 37 : Cals friables obtenus, 5 semaines après fragmentation et repiquage des cals durs sur milieu de callogénèse M4 (EN: entre nœuds, F: feuilles), (G x 0,52)

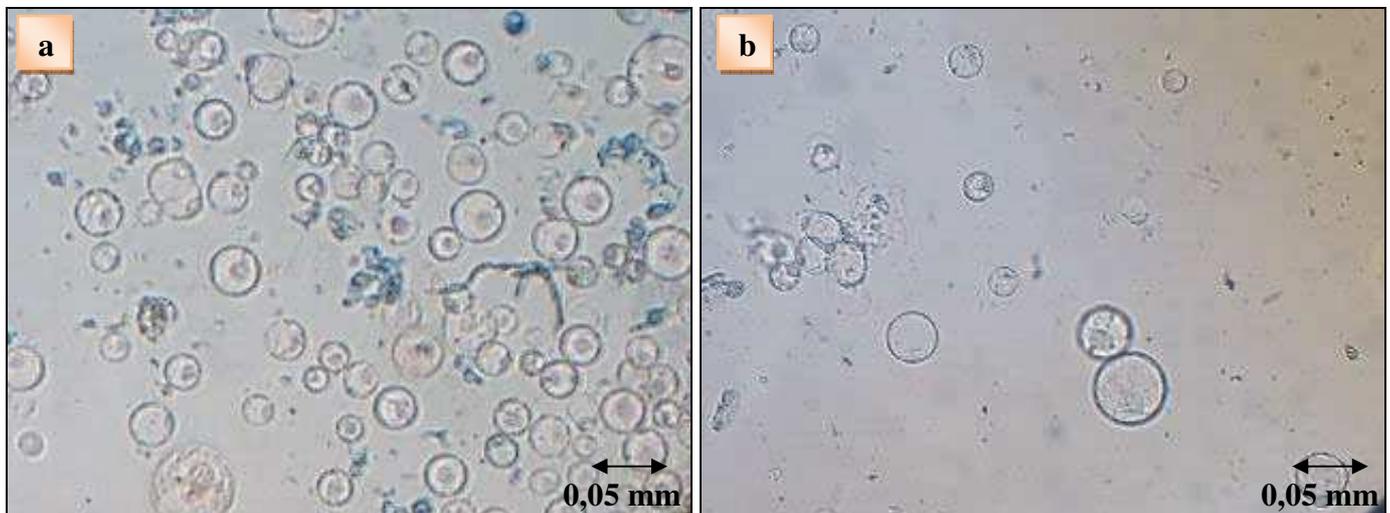


Figure 38 : Protoplastes issus de cals friables
a : entre nœuds après 6h00 de macération ; **b** : feuille après 4h30 de macération

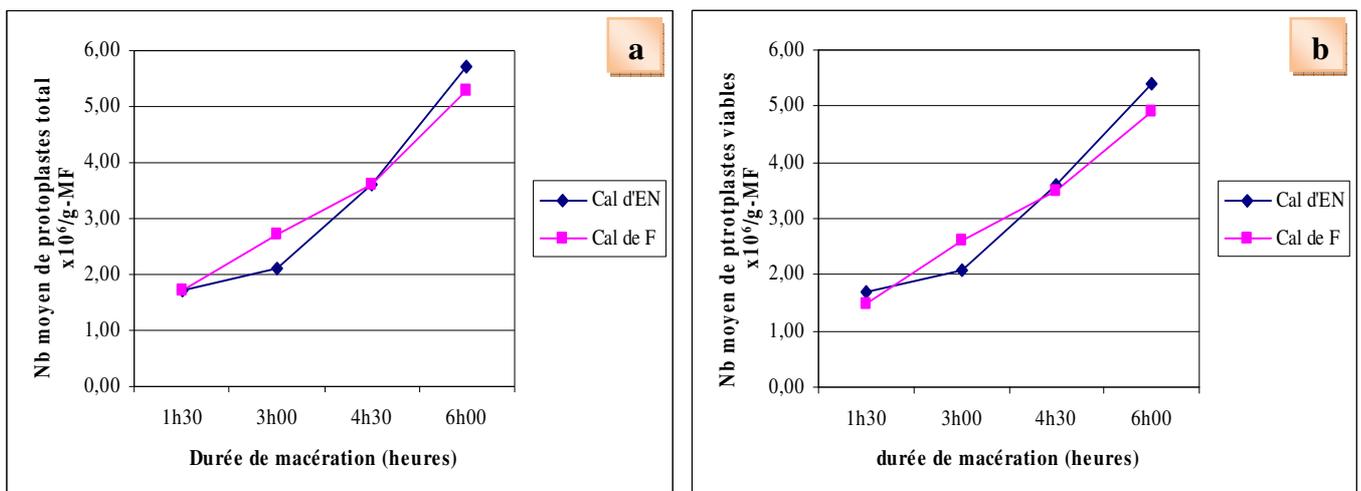


Figure39 : Evolution du nombre moyen de protoplastes (**a** : totaux ; **b** : viables) issus de cals friables d'entre nœuds et de feuilles en fonction du temps de macération

- Milieu de macération MS liquide sans sucre (10 ml) et sans CaCl₂ supplémentaire;
- Mannitol : 0.5 mole ;
- pH : 5 ;
- 1% trichoderma et 0.3% macérozyme R-10;
- Agitation à 100 trs/ mn ;
- Durée de macération est de 6h00 ;
- Isolement réalisé à la lumière.

2- Purification

2-1 Purification de protoplastes issus du mésophylle foliaire

Des protoplastes de mésophylle foliaire obtenus après 3h00 à 3h30 de macération suivant le protocole précédemment décrit, subissent la purification suivante :

2-1-1 Pré purification

La solution de protoplastes a été filtrée à travers une toile dont la maille a été de (350 µm) afin de la débarrasser des gros débris, et des tissus non digérés.

Le filtrat a été versé dans un tube à centrifuger (**Planche 10 c**) et a subi une centrifugation dans une centrifugeuse à rotor libre (**Planche:10 b**).

Les protoplastes et déchets ont sédimenté dans le culot (**Planche 10 d**). Le surnageant a été éliminé à l'aide d'une pipette pasteur stérile, le culot ainsi récupéré a été repris à nouveau dans 10 ml de solution de lavage (la solution de lavage est la même que la solution de macération mais sans enzymes), puis a subi une nouvelle centrifugation à 75% pendant 3 minutes.

Cette opération de lavage a été répétée deux fois. Ainsi les protoplastes ont subi trois lavages successifs qui ont servi à éliminer les enzymes.

2-1-2 Purification finale sur gradient monocouche de saccharose

Le dernier culot récupéré a été repris dans 2 ml de solution de lavage, ainsi les protoplastes prépurifiés étaient prêts pour une purification finale sur monocouche de saccharose.

Cette méthode de purification sur monocouche de saccharose a été utilisée par **HAICOUR (2002)** et **ELLOUZ et al (1997)** avec des protoplastes issus du mésophylle foliaire ou de cals de pomme de terre.

Les 2 ml de solution de protoplastes ont été délicatement déposés à l'aide d'une pipette pasteur stérile sur une couche de saccharose (6 ml) (**Planche 10 e**), puis ont subi des centrifugations

Deux concentrations de saccharose ont été testées :

➤ **Gradient monocouche de saccharose à 21 % (0.61 mole)**

Pour cette concentration deux vitesses de centrifugation ont été testées (100% et 75%) pendant 5 minutes.

C'est la vitesse de centrifugation 75% qui a permis d'obtenir une mince couche de protoplastes à l'interphase de la couche de saccharose et de la solution de rinçage. Ces derniers étaient mêlés à un nombre important d'impuretés tels que les nervures et les fins déchets (dégagés de la digestion enzymatique). Les nombres moyens en protoplastes obtenus ont été de l'ordre de 1.8×10^5 protoplastes totaux/ ml et 1.7×10^5 protoplastes viables/ ml, (le pourcentage de viabilité a été de 94%).

Avec la vitesse de centrifugation 100% pendant 5 minutes aucune couche de protoplastes n'a été formée, mais uniquement un culot qui a été obtenu au fond de la solution de saccharose.

➤ **Gradient monocouche de saccharose à 30 % (0.87 mole)**

Afin d'améliorer la qualité de purification et réduire l'importance des déchets, nous avons augmenté la concentration du saccharose à 30% (0.87 mole) en testant deux différentes vitesses de centrifugation :

➤ 100% pendant 1 et 2 mns ;

➤ 75% pendant 15 mns.

La vitesse de centrifugation 100% pendant 1 mn, a permis de récupérer 5.25×10^5 protoplastes totaux/ ml et 3.6×10^5 protoplastes viables/ ml, (le poucentage de viabilité a été de 68%), Les protoplastes étaient toujours mêlés à des impuretés (nervures et organites cellulaires dégagés suite à l'éclatement des protoplastes) (**Planche 11 a**).

Aussi le temps de centrifugation a été augmenté à 2 minutes, mais ceci n'a pas pour autant ,améliorer la qualité de purification. La couche de protoplastes récupérée comportait toujours une bonne quantité d'impuretés. Cela était accompagné par une baisse du nombre moyen de protoplastes viables à 2.7×10^5 protoplastes viables/ml, celui des protoplastes totaux est resté stationnaire 5.25×10^5 proto total/ml, (le pourcentage de viabilité a été réduit à 50%) (**Planche 11 b**).

Quant à la vitesse de centrifugation 75% pendant 15 minutes, elle a permis d'obtenir de meilleurs résultats, avec 4.35×10^5 protoplastes totaux/ ml et 3.3×10^5 protoplastes

viables/ ml (**Planche 10 f et 11 c**). Cette dernière vitesse a permis un meilleur compromis entre une bonne qualité de purification et la conservation d'un bon nombre moyen en protoplastes viables (le pourcentage de viabilité a été de 75%).

La quantité d'impuretés et nervures a été considérablement réduite.

Les résultats obtenus avec cette dernière purification (75% pendant 15 minutes) ont été satisfaisants, nous l'avons donc adoptée pour la suite de l'expérimentation.

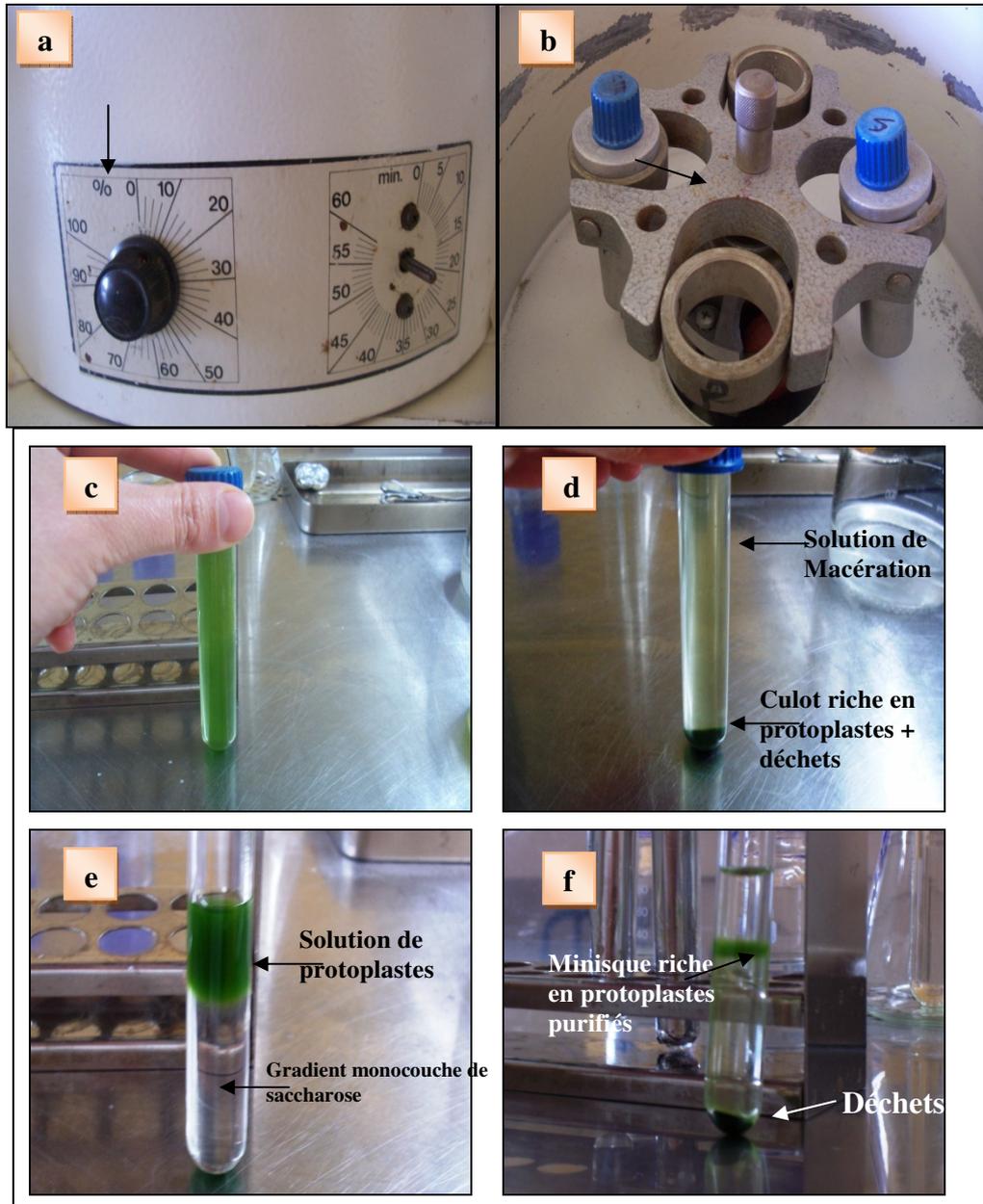


Planche 10 : Centrifugeuse, **a** : vitesses en pourcentage, **b** : rotor libre
 Différentes étapes de purification des protoplastes issus du mésophylle foliaire
c : Filtrat prépurifié (G x 0,35);
d : Culot formé après centrifugation à 75% pendant 3 minutes (G x 0,46);
e : Purification sur monocouche de saccharose (G x 0,6);
f : Protoplastes purifiés après centrifugation à 75% pendant 15 minutes (G x 0,53)

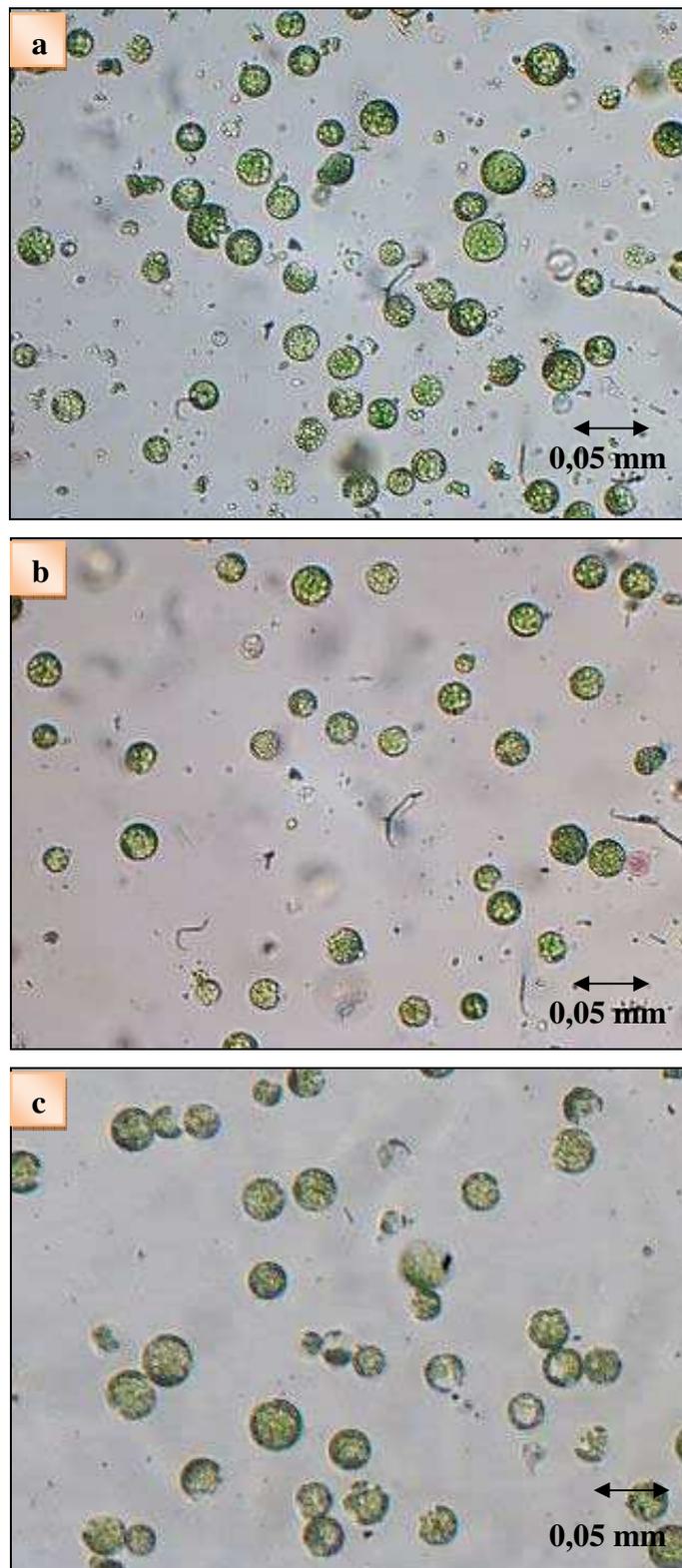


Planche 11 : Protoplastes issus du mésophylle foliaire après purification sur gradient monocouche de saccharose 30%

- a** : centrifugation à une vitesse de 100% pendant 1 minute ;
- b** : centrifugation à une vitesse de 100% pendant 2 minutes ;
- c** : centrifugation à une vitesse de 75% pendant 15 minutes

2-1-3 Bilan

Le tableau 10 résume les résultats de purification des protoplastes du mésophylle foliaire.

Tableau 10 : Résultats de la purification sur monocouche de saccharose 21% et 30%

<i>Vitesse de centrifugation</i>	<i>Gradient monocouche de saccharose 21%</i>		<i>Gradient monocouche de saccharose 30%</i>		
	<i>100% pendant 5 mns</i>	<i>75% pendant 5 mns</i>	<i>100% pendant 1 mn</i>	<i>100% pendant 2 mns</i>	<i>75% pendant 15 mns</i>
<i>Nombre moyen total de protoplastes / ml</i>	-	1.8x10 ⁵	5.25x10 ⁵	5.25x10 ⁵	4.35x10 ⁵
<i>Nb moyen de protoplastes viables /ml</i>	-	1.7x10 ⁵	3.6x10 ⁵	2.7x10 ⁵	3.3x10 ⁵
<i>% de viabilité</i>	-	94%	68%	51%	75%
<i>Abondance des déchets</i>	-	+++	+++	++	+

Importance des déchets : +++ : très abondants, ++ : moyennement abondants
+ : insignifiants.

2-2 Purification des protoplastes issus de cals : friables de feuilles et d'entre-noeuds

Les protoplastes issus de cals friables étaient moins denses que ceux obtenus à partir du mésophylle foliaire.

La purification des protoplastes des cals friables de feuilles a été réalisée sur un gradient monocouche de saccharose 21%.

Ainsi les protoplastes obtenus après 6h00 de macération selon le protocole d'isolement prédécrit, ont suivi le même procédé de purification que ceux du mésophylle foliaire. La solution de protoplastes a été filtrée à travers une toile de 350 µm, puis le filtrat a été rincé trois fois par centrifugations répétées à une vitesse de 100% pendant 2 minutes.

La solution de lavage consiste en la solution de macération sans enzymes.

Le dernier culot a été récupéré dans 2 ml de solution de lavage, puis une purification finale a été réalisée sur gradient monocouche de saccharose 21%, à une vitesse de centrifugation de 75%.

Trois durées de centrifugation ont été testées 10, 15, et 20 minutes, les nombres moyens respectifs en protoplastes ont été les suivants :

- 4.4×10^5 protoplastes totaux/ ml et 4.1×10^5 protoplastes viables/ ml, (pourcentage de viabilité de 93%) avec présence d'impuretés et de tissus non digérés ;
- 2.8×10^5 protoplastes totaux/ ml et 2.7×10^5 protoplastes viables/ ml (pourcentage de viabilité de 96%) avec présence d'impuretés et de tissus non digérés avec une moindre importance;
- 1.7×10^5 protoplastes totaux/ ml et 1.5×10^5 protoplastes viables/ ml (88% de protoplastes viables).

C'est la dernière durée de centrifugation qui a donné la meilleure qualité de purification par rapport aux deux premières. La couche de protoplastes récupérée au niveau du minisque ne contenait pas d'impuretés (**Figure 40**).

Nous l'avons aussi appliquée aux protoplastes issus de cals friables d'entre nœuds, obtenus après 6h00 de macération (75% durant 20 mns). Les nombres moyens en protoplastes obtenus ont été de 2×10^5 protolastes totaux/ ml, et 1.8×10^5 protoplastes viables/ ml. Le pourcentage de viabilité a été identique à celui des protoplastes de cals de feuilles, il a été de 88%.

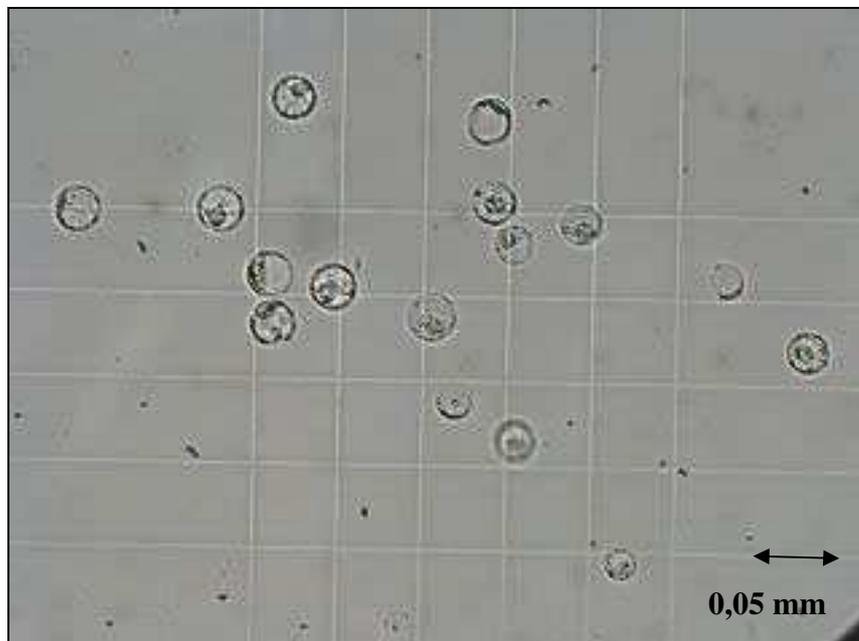


Figure 40 : protoplastes issus de cals friables de feuilles après purification sur gradient monocouche de saccharose à 21% à une vitesse de centrifugation de 75% pendant 20 minutes.

3- Culture de protoplastes de mésophylle foliaire

Seuls les protoplastes issus du mésophylle foliaire, obtenus selon le protocole d'isolement prédéfini ont été mis en culture.

Les cultures ont été lancées à partir de protoplastes du mésophylle foliaire issus de vitroplants de la G1, sauf pour le milieu S3, où les protoplastes ont été isolés du mésophylle foliaire de vitroplants de G2.

0.45 g de feuilles ont été découpées en fines lamelles et mises en incubation dans la solution de macération préalablement stérilisée par filtration à travers un filtre stérile dont la maille est de 0.2 μm .

Après 3h00 à 3h30 de macération, les protoplastes ont été prépurifiés, lavés trois fois par centrifugation à 75% pendant 3 minutes, ensuite purifiés dans des conditions stériles sur monocouche de saccharose 30% à une vitesse de centrifugation de 75% pendant 15 mns.

Les protoplastes récupérés ont subi une dilution, afin d'atteindre une concentration finale de culture de 10^4 protoplastes/ ml (KIKUTA et *al*, 1986). La solution de dilution a été le même milieu de culture sans agar. La culture a été réalisée sur milieu semi solide (4g/l d'agarose).

1 ml de la solution de protoplastes diluée a été déposée à la surface de 10ml du milieu de culture semi solide, préalablement autoclavé et versé dans des boîtes de pétri. La solution de protoplastes a été rajoutée à la surface du milieu de culture avant solidification finale afin de permettre une bonne répartition des protoplastes dans l'agarose. Les boîtes ont été ensuite scellées et mises dans l'obscurité pendant les dix premiers jours de culture, par la suite elles ont été exposées progressivement à une faible intensité lumineuse.

Les milieux de cultures testés ont consisté au milieu de culture MS avec quelques modifications, ce sont les milieux S1, S2, S3 et S4 (voire **tableau 5, matériel et méthodes**).

Après 4 jours de mise en culture, les taux de viabilité estimés ont été de 81%, 88%, 70.40% et 82% respectivement pour les milieux S1, S2, S3, et S4. Ces taux ont légèrement diminué pour atteindre après 7 jours de mise en culture 79%, 84%, 58.68% et 78% respectivement pour les milieux précités.

L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif (annexe 3), avec deux groupes distincts **(a)** formé par les milieux S1, S2 et S4, le milieu S3 a formé le deuxième groupe **(b)**.

Quant aux protoplastes ayant régénérés leur paroi, nous avons pu observer un changement de la forme sphérique des protoplastes qui commençaient légèrement à s'allonger dès le 2^{ème} jour de mise en culture pour l'ensemble des milieux de culture testés.

Après 4 jours de mise en culture, les taux des protoplastes ayant présenté une forme allongée, estimés par rapport à l'ensemble des protoplastes viables a été de l'ordre de 70%, 67.24%, 51.56%, 69.52% respectivement pour les milieux S1, S2, S3 et S4. Au bout du 7^{ème} jour de mise en culture ces taux ont augmenté pour atteindre respectivement 76%, 72%, 59% et 74.20%.

Aussi pour ce paramètre, l'analyse de la variance a révélé l'existence d'un effet très hautement significatif, avec deux groupes distincts **(a)** formé par les milieux S1, S2, et S4, et le groupe **(b)** formé par le milieu S3.

Les premières divisions ont été observées dès le 4^{ème} jour de mise en culture pour les milieux **S1** et **S2**, et après le 5^{ème} jour pour les milieux **S3** et **S4** (**Planche 12, A1, B1, C1 et Planche 13 a**).

Des structures de 3 et 4 cellules ont été observées au bout du 7^{ème} jour de mise en culture pour les milieux S1 et S4 (**Planche 12, A3 et A4 et Planche 13 b, c**), après le 10^{ème} jour pour le milieu S2 (**Planche 12, B2**) et après le 15^{ème} jour pour le milieu S3 (**Planche 12, C2**).

Les stades de plus de 4 cellules ont été observés après le 15^{ème} jour de culture pour les milieux S1, S2 et S4. C'est uniquement sur le milieu S4 où le stade micro colonies a été atteint (**Planche 13 e**).

Après 15 jours de mise en culture, le coefficient de division qui représente le nombre de protoplastes ayant subis au moins une division, estimé par rapport au nombre de protoplastes viables a été de l'ordre de 12.7%, 9.20%, 5.85%, et 21.22% respectivement pour les milieux S1, S2, S3 et S4.

L'analyse de la variance pour ce paramètre a indiqué l'existence d'un effet hautement significatif (annexe 3), avec l'existence de deux groupes distincts, le meilleur est le groupe **(a)** formé par les milieux **S1** (macroéléments MS sans $\text{NH}_4\text{NO}_3/2$ + microéléments MS + 3mg/l d'ANA+ 1mg/l BAP+ 0.18 mole de mannitol et de glucose+ 0.07 mole de

saccharose) et **S4** (macroéléments MS sans $\text{NH}_4\text{NO}_3/2$ + microéléments MS/2 + 3mg/l d'ANA+ 1mg/l BAP+ 0.18 mole de mannitol et de glucose+ 0.07 mole de saccharose) , et le groupe (**b**) formé par le milieu **S3** (macroéléments MS sans $\text{NH}_4\text{NO}_3/2$ + microéléments MS + 1mg/l d'ANA+ 0.2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l BAP+ 0.18 mole de mannitol et de glucose+ 0.07 mole de saccharose), le milieu S2 (macroéléments MS sans $\text{NH}_4\text{NO}_3/2$ + microéléments MS + 3mg/l d'ANA+ 1mg/l BAP+ 0.25 mole de mannitol et de glucose) est chevauchant.

Au-delà du 15^{ème} jour, les cultures se sont nécrosées pour l'ensemble des milieux testés, on a observé un brunissement et un arrêt de divisions des cellules.

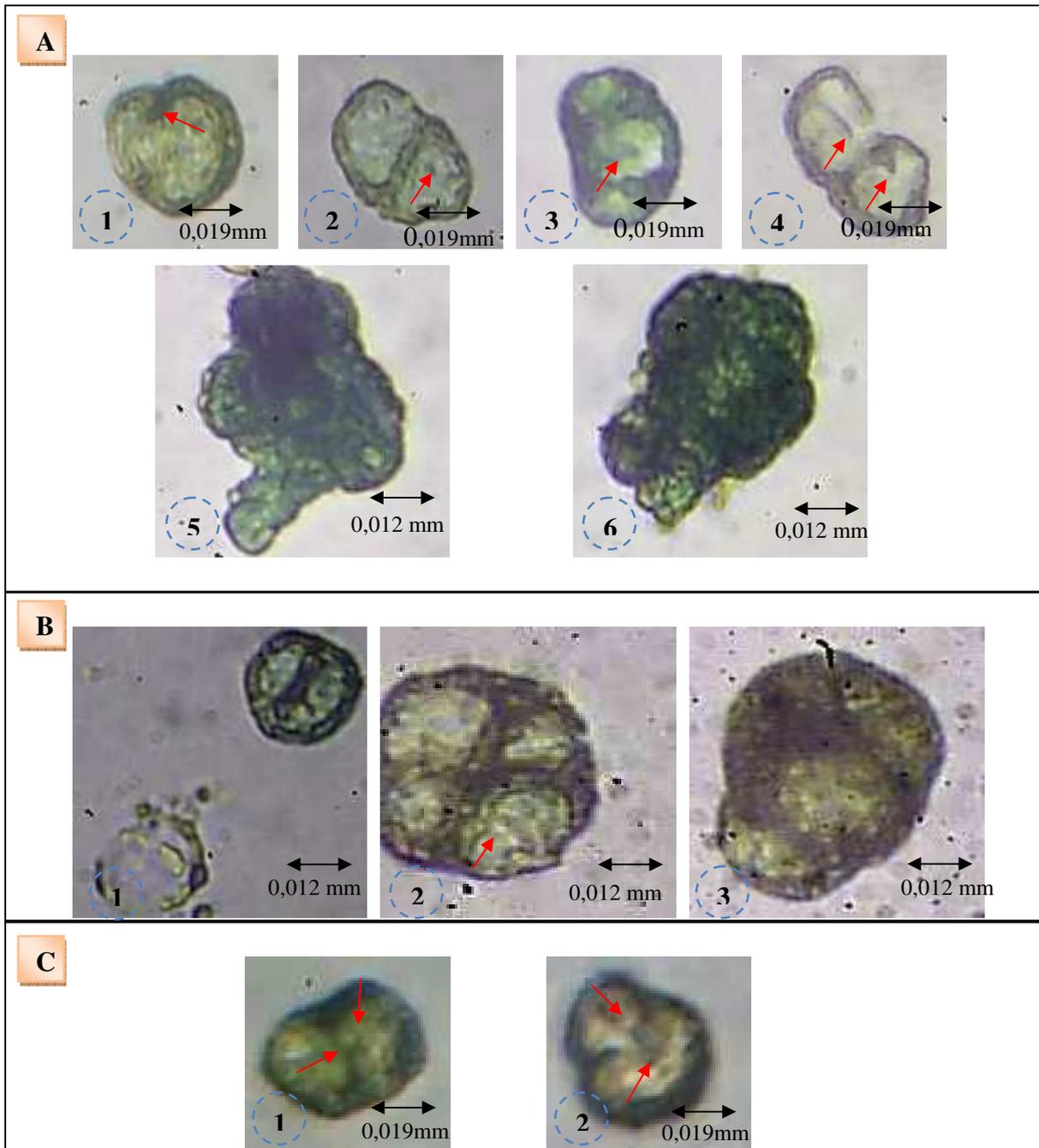


Planche 12 : Différents stades de divisions cellulaires.

A : Sur milieu S1 (1: début stade 2 cellules ; 2 : début stade 3 cellules ; 3 : stade 3 cellules, début stade 4 cellules ; 4 : début stade 4 cellules ; 5 et 6 : plus de 4 cellules) **G40**

B : Sur milieu S2 (1 : stade 2 cellules, 2 : stade 4 cellules, 3 : stade 6 cellules) **G40**

C : Sur milieu S3 (1 : stade 2 cellules, 2 : début stade 4 cellules) **G40**

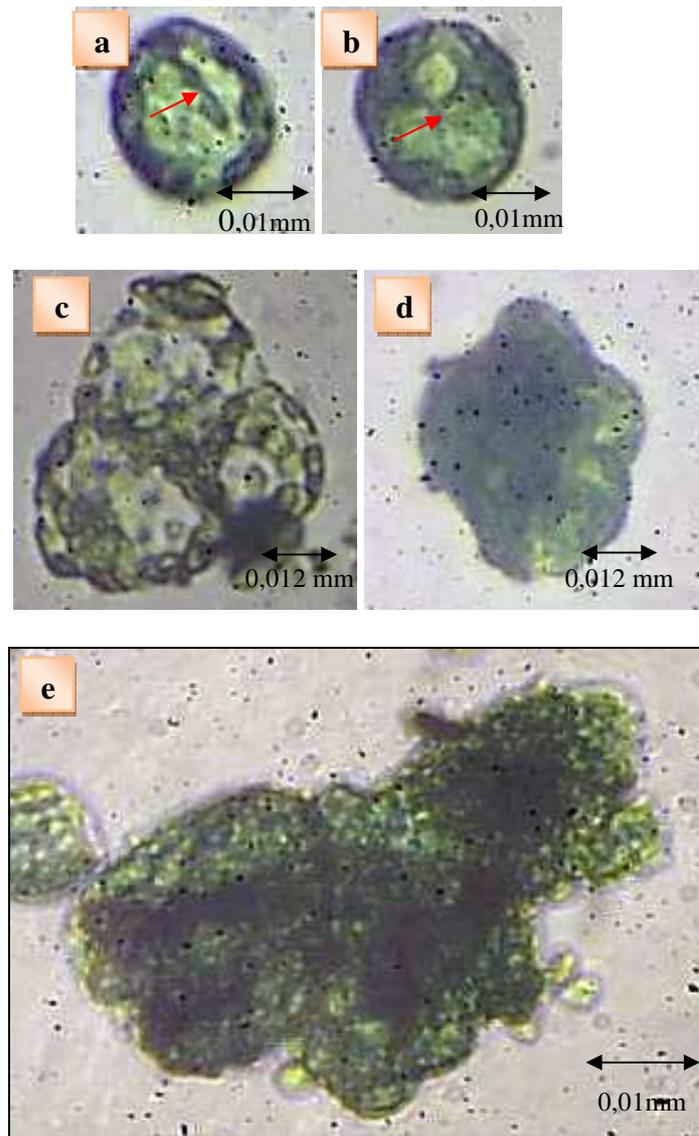


Planche 13 : Différents stades de divisions cellulaires sur milieu S4.

a : début stade 2 cellules, **b** : début stade 3 cellules, **c** : stade 3 ou 4 cellules, **d** : plus de 4 cellules, **e** : micro colonie

DISCUSSION

I- Callogenèse

Plusieurs auteurs ont noté l'importance de la culture des cals pour l'élargissement de la variabilité génétique, comme la résistance aux agents pathogènes, augmentation de la productivité, amélioration de la fertilité...etc (**LARKIN et SCOWCROFT, 1981** in **AUGE, 1989**).

Selon **AUGE (1989)** l'exploitation de la variation somaclonale a permis la création variétale chez différentes espèces tel que la pomme de terre et la canne à sucre.

Chez beaucoup d'espèces, comme chez la pomme de terre l'induction de cals a été possible grâce à l'utilisation de différents types d'explants. Ainsi plusieurs chercheurs ont pu réaliser des cultures de cals de pomme de terre avec induction de néoformation de bourgeons à partir de fragments de feuilles et de pédoncules (**TICAN, 2008**), de fragments de feuilles prélevées sur vitroplantules issues de culture de méristèmes (**KHATUN et al, 2003**), et sur fragments de tige et de feuilles (**BENKORTBI et RAHMOUNI, 1999 ; ANJUM et HAKOOMAT, 2004**).

Dans cette première partie de notre travail, nous avons fixé comme objectifs de tester l'aptitude de la variété Désirée à la callogenèse afin de fournir un matériel de base (cals) qui sera destiné à l'isolement des protoplastes, et à l'organogenèse car il est important d'utiliser un matériel végétal à génotype organogène.

Pour ce faire deux types d'explants : fragments de tige et de feuilles prélevés sur des vitroplants de 3^{ème} génération âgés de 5 semaines, combinés à différentes balances de régulateurs de croissance de synthèse, ont été testés.

1 Réactivité

Dès les premiers jours de mise en culture les explants se sont montrés très réactifs quelque soit la balance hormonale testée. Les entrenœuds ont présenté un léger gonflement au niveau des extrémités pour gagner par la suite la totalité des fragments. Ceci a été observé également par **YAMOUNE (2006)** ; **BESSAIAH (1992)** et **YAHIA MESSAOUD (1998)** sur des milieux dont le rapport auxine/cytokinine était élevé. Ces observations rejoignent les nôtres où toutes les balances hormonales testées sont en faveur de l'auxine.

Selon **AUGE (1989)** l'auxine intervient dans plusieurs phénomènes physiologiques, elle a une action nette sur l'élongation cellulaire, suite à l'augmentation de la plasticité de la paroi squelettique et à une pénétration d'eau dans la cellule, la résistance de la paroi diminue et la cellule s'allonge.

Chez les fragments de feuilles et quelque soit la balance hormonale (auxine/ cytokinine) testée, nous avons observé une perte progressive de la couleur verte, probablement due à l'effet de l'obscurité.

L'apparition des cals a été observée chez les entre noeuds au niveau de la surface des explants sous forme d'un fin duvet blanchâtre, puis au niveau des extrémités. D'autres amas cellulaires sont apparus pour couvrir l'ensemble des explants. Pour les feuilles les cals ont pris naissance au niveau des sections excisées puis à la surface. Ces observations rejoignent celles de plusieurs auteurs **GAUTHERET (1959)**, **QURASHI et al (1987)**, **BESSAIAH (1992)**, **YAHIA MESSAOUD (1992)**, **BENKORTBY et RAHMOUNI (1999)**, **KHATUN et al (2003)**, **YASMIN et al (2003)**, **YAMOUNE (2006)** et **KACI (2007)**.

Les cals sont apparus en premier lieu chez les entre nœuds au 15^{ème} jour de culture, et au bout du 20^{ème} jour pour les fragments de feuilles quelque soit la balance hormonale testée. En effet **YAMOUNE (2006)** et **KACI (2007)** ont eu les mêmes résultats avec les taux de réactivité les plus rapidement obtenus avec les entre nœuds.

Pour la plus part des tissus cultivés, l'initiation de la callogenèse exige l'addition d'un ou de plusieurs régulateurs de croissance (**DODDS, 1995**).

Pour notre expérimentation l'utilisation des deux types d'hormones de croissance (auxine, cytokinine) a permis d'obtenir 100% d'explants callogènes après 45 jours de culture pour l'ensemble des milieux de callogenèse testés quelque soit le type d'explant utilisé. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **YAMOUN (2006)** qui a obtenu 100% de réactivité sur les deux types d'explants issus de la variété Désirée, les milieux qui lui ont permis de réaliser ces résultats avaient des rapports (2,4 – D /BAP) ou (AIA/BAP) de 1, 1.5, 2, 2.5 et 3 respectivement. Ces rapports hormonaux rejoignent les nôtres, ils sont de l'ordre de (2, 3 et 4).

2 Développement des cals

La callogenèse a été régulière, les traitements hormonaux appliqués ont permis de réaliser 100% de cals compacts et durs, à croissance moyenne qui couvraient toute la surface de l'ensemble des explants. Le développement des cals a été identique pour l'ensemble des traitements appliqués quelque soit le type d'explant.

Cela rejoint les résultats de **YAMOUNE (2006)** qui a obtenu le meilleur développement des cals avec les traitements contenant le 2,4 – D combiné à la BAP, particulièrement le traitement (2,4 – D/ BAP= 2.5) ; elle a également noté la supériorité des

traitements contenant le 2,4 –D sur ceux contenant de l’AIA. Cette dernière est une auxine relativement faible (MARGARA, 1989). Dans le même contexte BESSAIAH (1992) et YAHIA MESSAOUD (1998) ont obtenu des cals qui couvraient toute la surface de l’explant au bout d’un mois de culture avec 2 mg/l de 2,4 – D et 0.5 mg/l de BAP sur les feuilles de la variété Diamant.

En effet d’après OKAZAWA et al (1967) l’application exogène d’auxine provoque une formation de cals sur toute la surface de l’explant, et la présence de cytokinine favorise un bon développement des cals.

Selon MARGARA (1989) le 2,4 – D est considéré comme une auxine très forte, GAUTHERET (1959) estime que parmi les hormones de synthèse, le 2,4 – D est l’auxine dont l’activité callogène est la plus grande. En effet KHATUN (2003) a obtenu les meilleurs taux d’induction de cals 90% en utilisant 2.5 mg/l de 2,4 – D seul sur des fragments de feuilles de la variété Diamant.

3 Organogenèse

Selon SKOOG (1957) in AUGE (1989) l’interaction entre auxines et cytokinines orientent les tissus, tantôt vers la néoformation de racines, tantôt vers le développement continu de tissus indifférenciés, tantôt vers la néoformation de bourgeons.

3-1 Rhizogenèse

D’après les mêmes auteurs un rapport auxine/cytokinine élevé favorise l’apparition de racines.

En effet, dans notre étude, les quatre traitements hormonaux appliqués dont le rapport auxine/ cytokinine était en faveur du 2,4 – D n’ont exprimé qu’une néoformation de racines et cela quelque soit la nature de l’explant testé. Ceci rejoint aussi les observations de YAMOUNE (2006) et de KACI (2007) qui ont obtenu les plus grands nombres de racines néoformées avec les balances auxine/cytokinine supérieurs à l’unité.

Le milieu M4 a permis d’obtenir les meilleurs taux de cals rhizogènes 88% pour les deux types d’explants avec des nombres moyens de racines par explant de 3.81 et 2.50 respectivement pour les cals d’entre nœuds et ceux des feuilles.

Aucune néoformation de bourgeons n’a été observée sur les deux types d’explants quelque soit le milieu de culture testé.

Pour MARGARA (1989) le 2,4 – D favorise la callogenèse et peut induire dans certaines conditions, la production d’embryons somatiques, mais son action sur la

néoformation de bourgeons semble très faible. En outre la néoformation de bourgeons exige un rapport cytokinine/ auxine élevé.

Selon **DODDS (1995)** et **ANJUM et HAKOOMAT (2004)** l'addition des auxines dans les milieux sert à initier la formation de racines, alors que celle des tiges est inhibée, l'induction de ces dernières exige la présence d'une cytokinine.

3-2 Caulogenèse

3-2-1 Sur les cals

Des bourgeons néoformés ont été observés sur les cals précédemment obtenus sur milieu de callogenèse **M4** et transférés sur le milieu **M6** dont la balance hormonale est en faveur de la BAP (0.1 mg/l AIA+ 2 mg/l BAP), après la 8^{ème} et la 9^{ème} semaine de culture respectivement pour les cals issus d'entre nœuds et ceux issus des feuilles.

En effet pour **MARGARA (1989)** la néoformation de bourgeon peut ne pas apparaître sur le cal initial, mais peut être obtenue secondairement sur un cal plusieurs fois repiqué :

- Le premier milieu : apport d'une auxine forte (ex : 2,4 – D, 10^{-7} à 10^{-6} M), ou d'une auxine plus faible à forte concentration (AIB ou ANA 10^{-6} à 10^{-5}) associée éventuellement à une cytokinine à faible concentration;

- Le second milieu : suppression de l'auxine ou diminution de sa concentration et apport d'une cytokinine ou augmentation de la concentration.

ELLOUZ et al (1997) ont pu initier des bourgeons néoformés à partir de cals développés sur milieu riche en auxine (0.2 mg/l 2.4 – D+1 mg/l ANA+ 0.5 mg/l zéatine), puis transférés sur milieu à balance hormonale en faveur de la cytokinine (0.1 mg/l AIA + 2 mg/l zéatine) après 2 mois de culture.

WHEELER et al (1985) ont obtenu des néoformations de bougeons sur des entre-nœuds et des feuilles.

En effet, pour notre travail nous avons obtenu des néoformations de bourgeons sur les deux types de cals. Nous avons noté la supériorité des cals de feuilles sur ceux des entre nœuds, les taux de cals caulogènes ont été de l'ordre de 13.33% et 40%, les nombres moyens de bourgeons néoformés par cal sont de 0.13 et 1.07 respectivement pour les cals d'entre nœuds et les cals de feuilles.

La supériorité des cals de feuilles à l'organogenèse a été citée par plusieurs auteurs. **CEBALLOS et al (1998)** ont constaté que les cals de feuilles présentent la meilleure

aptitude à la néoformation de bourgeons. La même observation a été faite par **BENKORTBY et RAHMOUNI (1999)**.

Le transfert des bourgeons néoformés à partir des cals d'entre nœuds et ceux de feuilles sur le milieu MS simple sans hormones a permis leur développement en plantules racinées

Les cals caulogènes ont complètement noircis, et les bourgeons ont pris naissance sur la partie excisée du cal en contact du milieu de culture. Selon **(DODDS., 1995)** les bourgeons formés sur les cals les épuisent, ils utilisent les substances nutritives du milieu pour leur propre croissance, c'est peut être la raison pour laquelle les cals organogènes se nécrosent.

Quant à l'addition de la kinétine, plusieurs auteurs ont noté son effet sur l'organogenèse, particulièrement, la caulogenèse. **LAM (1975)** a obtenu une néoformation de bourgeons à partir de cals de pomme de terre, en utilisant 0.8 mg/l de kinétine et 0.4 mg/l de BAP. En outre, selon les travaux d'**OKAZAWA et al (1967)** lorsque les concentrations de kinétine dans le milieu augmentent, le taux de callogenèse augmente simultanément. Pour nous les cals transférés sur le milieu **M5** (0.1mg/l AIA + 2 mg/l Kinétine) ont présenté un meilleur aspect que ceux obtenus sur le milieu **M6** (0,1 mg/l AIA + 2 mg/l BAP), ils ont grossi jusqu'à atteindre les parois des tubes à essai, ils étaient chlorophylliens jusqu'à la fin de la culture, et n'ont présenté aucune néoformation de bourgeons pour les deux types de cals.

D'après **RANCILLAC (1981)** la présence d'une cytokinine est déterminante pour induire la caulogenèse, mais il a noté la supériorité de la benzyladénine sur la kinétine. Ceci a été observé dans notre travail où les cals transférés sur milieu contenant la BAP ont présenté un meilleur pouvoir à la caulogenèse que ceux transférés sur milieu avec kinétine (avec un effet nul).

3-2-2 Sur fragments de feuilles et d'entre noeuds

Selon **MARGARA (1989)** l'utilisation d'association équilibrée de cytokinine et d'auxine et de milieux minéraux adaptés, type milieu **MURASHIGE et SKOOG (1962)** permettent la néoformation de bourgeons après dédifférenciation cellulaire poussée.

En effet **BENKORTBY et RAHMOUNI (1999)**, et **KACI (2007)** ont obtenu des néoformations de bourgeons avec : 1mg/l de BAP, 1mg/l d'AIA et 1mg/l de GA3 sur les entre nœuds et les feuilles.

La même constatation a été faite durant notre travail sur les fragments d'entre nœuds et de feuilles cultivés sur le milieu **M7** (1mg/l BAP+ 1mg/l d'AIA+ 1mg/l GA3), où nous avons obtenu un taux de cals organogènes de 38.89% et 55%, avec un nombre moyen de bourgeons néoformés ou adventifs par explants de 1.87 et 2.55 respectivement pour les entre nœuds et les feuilles. Là aussi on a constaté la supériorité des feuilles sur les entre nœuds.

Pour **CEBALLOS et al (1998)** les feuilles présentent la meilleure aptitude à la néoformation de bourgeons.

D'après **HAMOUI et al (1999)**, il est nécessaire de combiner entre cytokinine, auxine et gibbérelline pour la différenciation des cals en bourgeons. En effet sur le milieu M8, les fragments d'entre nœuds et de feuilles n'ont présenté aucune formation caulogène, l'effet de la balance hormonale (1mg/l BAP+ 1mg/l d'AIA) était nul sur l'organogenèse.

Selon **MARGARA (1989)** les gibbérellines à faible concentration sont souvent utilisées pour favoriser la reprise de croissance des méristèmes, en culture d'apex. **MOREL et MULLER (1964)** in **MARGARA (1989)** avaient les premiers montré l'action des gibbérellines dans le cas de la culture des méristèmes de pomme de terre in vitro.

II- PROTOPLASTES

1- Isolement

1-1 À partir du mésophylle foliaire

1-1-1 Durée de macération et Concentration en enzymes

L'isolement des protoplastes nécessite l'utilisation d'enzymes hydrolytiques afin de dégrader la paroi pectocellulosique et libérer les protoplastes.

Selon **COMPTON (1999)** les protoplastes sont obtenus au bout d'une période de 3 à 8 heures de digestion enzymatique. **DIXON (1995)** stipule que l'isolement des protoplastes peut être réalisé durant une courte période (de 2 à 6 heures de macération), ou durant toute une nuit (12 à 20 heures de macération).

Selon **RICHARD et al (2004)** l'incubation enzymatique peut être conduite durant une durée de macération allant de 3 heures à 4 heures et à une température de 25 à 30°C, le temps de macération et la température d'incubation varient en fonction des espèces et des tissus.

Pour nous l'optimum en nombres moyens de protoplastes totaux et viables ont été obtenus au bout de 3 à 3 heures 30 minutes de macération, il s'agit d'une attaque à courte durée.

Selon **TAGE (1986)** l'utilisation d'une seule enzyme paraît des fois efficace, la driselase, avec ses activités cellulotiques et pectolytiques peut être utilisée seule avec succès pour l'isolement des protoplastes, cependant un cocktail de deux enzymes ou plus est plus fréquemment utilisé.

ESPEJO et al (2008) ont obtenu des rendements optimums (10^5 à 10^6 protoplastes /g-MF) en protoplastes issus du mésophylle foliaire de vitroplants de pomme de terre, variété Désirée, âgés de 4 à 6 semaines en les incubant durant toute une nuit dans une solution enzymatique de 0.25% de macérozyme R-10 et 1% de cellulase R-10. Par contre **EHSANPOUR et JONES (2001)** en utilisant un mélange d'enzyme de 0.7% de cellulase R-10, et 0.15% de macérozyme R-10, ont isolé après 4 à 5 heures de macération 2 à 2.5×10^6 protoplastes/ g-MF à partir du mésophylle foliaire de vitroplants de la variété Delaware âgée de 4 à 5 semaines.

Pour notre travail les deux enzymes (trychoderma et macérozyme) utilisées pour l'isolement des protoplastes ont donné des rendements optimums en protoplastes viables (allant de $3,5 \times 10^6$ à plus de 5×10^6 protoplastes /g-MF) au bout de 3 heures à 3 heures 30 minutes de macération, avec 1% de cellulase trychoderma, et avec les concentrations de

macérozyme R-10 de 0.1%, 0.2%, 0.3% et 0.4%. Cependant l'analyse statistique n'a pas révélé de différence significative entre les différentes concentrations.

Selon **TAVAZZA** et **ANCORA (1986)** in **EHSANPOUR** et **JONES (2001)** une solution enzymatique de 1% de cellulase R-10 et 0.25% de macérozyme R-10 donne des rendements de 1.56×10^6 et 1.21×10^6 protoplastes /g-MF respectivement pour les variétés Désirée et Kenebec.

Nos résultats ($3,5 \times 10^6$ à plus de 5×10^6 protoplastes /g-MF) rejoignent ceux avancés par ces auteurs.

D'après **AUGE (1989)** quand la digestion est réussie entre 3 heures et 24 heures de macération en moyenne, les protoplastes donnent à la suspension une teinte verdâtre. En effet, après 3 à 3 heures 30 minutes de macération nous avons obtenu une solution dense riche en protoplastes qui s'imprègne de la couleur verdâtre de la chlorophylle.

1-1-2 Concentration de mannitol

La plasmolyse des tissus destinés à l'isolement des protoplastes, avant leur incubation dans la solution enzymatique est l'un des paramètres qui améliore la viabilité, et réduit les altérations et les fusions spontanées des protoplastes adjacents. Une solution minérale, et/ou un sucre alcool, sont souvent utilisés (**FREARSON et al, 1973** ; **ORTIN et BURGOS, 2003** in **DAVEY et al, 2005**).

Pour la plupart des travaux réalisés sur les protoplastes, les deux phases, plasmolyse et digestion enzymatique sont conduites en même temps **POWER** et **COCKING (1968)** in **RAZDAN (2003)**. Selon **CHAWLA (2002)** le mannitol représente l'agent osmotique le plus utilisé et le plus préféré pour l'isolement des protoplastes du mésophylle foliaire.

D'après **RICHARD et al (2004)** et **CHAWLA (2002)** une concentration en agent osmotique allant de 0.3 à 0.7 mole peut générer un potentiel osmotique approprié.

En effet, plusieurs auteurs ont pu obtenir de bons rendements en utilisant du mannitol ou du sorbitol dont les concentrations sont comprises dans la fourchette précitée.

Effectivement, **KIKUTA et al (1986)**, **ELLOUZ et al (1997)**, **EHSANPOUR** et **JONES (2001)** et **ESPEJO et al (2008)** ont obtenu des rendements optimaux de protoplastes issus du mésophylle foliaire de pomme de terre, en utilisant respectivement, 0.44 mole de mannitol ; 0.5 mole de mannitol dans une solution composée de sels minéraux (Frearson et al, 1973) ; 0.4 mole de mannitol dans la solution minérale de Fish et Karp et 0.5 mole de sorbitol.

Cette différence des concentrations en agents plasmolysants est peut être due aux différentes solutions minérales utilisées comme milieux de macérations. En effet, certains éléments minéraux tels que le KNO_3 , le KCl et le CaCl_2 , sont souvent utilisés comme agent osmotique, **HIROFUMI et TOSHIO (1974)**.

Selon **TAGE (1986)** la stabilité, la viabilité et la réussite d'une culture ultérieure de protoplastes sont étroitement liées au maintien de conditions osmotiques appropriées durant l'isolement et la culture. D'après le même auteur, lorsqu'un milieu minéral est inclus dans la solution enzymatique, une réduction de la concentration des sucres est recommandée.

D'après **EHSANPOUR et JONES (2001)** la pression osmotique optimum de la solution d'isolement des protoplastes varie avec les génotypes et les espèces de pomme de terre.

Par exemple des concentrations de 0.3 mole et 0.4 mole de mannitol sont recommandées respectivement pour *Solanum chacoense* et *Solanum tuberosum* (**GRUN et CHU, 1978**).

Pour notre travail, les meilleurs résultats réalisés ont été obtenus avec des concentrations de mannitol identiques à celles utilisées par les différents auteurs précités.

La concentration 0.5 mole suivie de la concentration 0.4 mole ont donné les meilleurs rendements, avec respectivement 4.65×10^6 et 3.10×10^6 protoplastes viables/ g-MF.

1-1-3 pH

D'après **DAVEY et al (2005)** le pH de la solution enzymatique influence fortement les rendements des protoplastes.

Pour **CHAWLA (2002)** l'activité enzymatique dépend du pH, ce dernier est généralement indiqué par le fabricant et est généralement compris entre 4.7 et 6.

Selon **VOET (2005)** les enzymes étant des protéines, ont des propriétés sensibles au pH. La plupart des protéines ne sont actives, en fait que pour une zone de pH étroite, généralement comprise entre 5 et 9. Ceci parce que le pH agit sur plusieurs facteurs : (1) la liaison du substrat à l'enzyme, (2) l'activité catalytique de l'enzyme, (3) l'ionisation du substrat, et (4) les variations de la structure des protéines (qui ne sont généralement importantes qu'aux pH extrêmes).

Selon **HIROFUMI et TOSHIO (1974)** l'efficacité de la cellulase et de la macerozyme à produire des protoplastes de tabac est dépendante du pH de la solution de macération. Ainsi des rendements optimums sont obtenus avec un pH compris entre 4.7 et 5.7. Ces rendements sont plus faibles en dehors de cette fourchette. Ceci prouve que les

enzymes n'agissent que pour une fourchette de pH bien précise qui peut varier d'une enzyme à une autre.

Pour notre travail, les rendements en protoplastes viables ont été de l'ordre de 4.20×10^6 et 4.40×10^6 /g-MF respectivement pour les deux pH testés 5.6 et 5. Ces derniers sont compris dans les fourchettes citées plus haut. En effet l'analyse de la variance n'a révélé aucun effet significatif entre les deux pH.

1-1-4 Age des vitroplants

Pour la plupart des travaux réalisés sur la pomme de terre, les feuilles sont prélevées sur des vitroplants âgés de 3 à 8 semaines. Ainsi **TAYLOR** et **SECOR (1988)**, **HAICOUR (2002)** et **ESPEJO et al (2008)** ont utilisé des vitroplants âgés de 4 à 6 semaines, **ELLOUZ et al (1994)** des vitroplants âgés de 3 semaines, et **VANEVERDINK** et **PIJNACKER (1994)** des plants âgés de 4 à 8 semaines.

Durant notre travail, nous avons constaté l'existence d'un effet âge qui a influencé les rendements en protoplastes totaux et viables. Ainsi les vitroplants jeunes âgés de 4 semaines ont donné des nombres moyens de l'ordre de 1.50×10^6 protoplastes viables/g-MF après 3h00 de macération (la solution de macération était chargée d'organites cellulaires suite à l'éclatement des protoplastes).

Ceux âgés de 12 semaines présentent des rendements identiques aux vitroplants âgés de 4 semaines, obtenus après 6h00 de macération. Une quantité importante de cellules étaient mêlées aux protoplastes, même après 6h00 de macération. L'augmentation de la concentration de la cellulase à 1.5% et à 2% n'a apporté aucune amélioration.

DAVEY et al (2005) stipulent que plusieurs facteurs influencent l'isolement des protoplastes, notamment l'épaississement de la paroi cellulaire.

D'après **RAZDAN (2003)** les enzymes commerciales sont capables d'isoler des protoplastes de tissus issus de n'importe quelle espèce dont les cellules n'ont pas encore acquis le stade de lignification.

Selon **TAGE (1986)** l'âge des cultures influence la complexité de la structure des parois cellulaires, et réduit les rendements en protoplastes des cultures âgées.

En outre, l'effet âge a été mentionné chez d'autres espèces que la pomme de terre. Chez (*Lactuca sativa*), **CHAIPAKDEE (2007)** a montré que ce sont les feuilles prélevées sur des vitroplants âgés de 30 jours qui ont donné les meilleurs rendements et les meilleurs taux de viabilité par rapport à celles prélevées sur des vitroplants âgés de 25, 40, et 50 jours. L'âge des feuilles affecte l'isolement des protoplastes, les faibles rendements

obtenus avec les feuilles âgées sont dû à la complexité des constituants de la paroi pectocellulosique des cellules (tel que les pectines, la lignine, la subérine, et la cutine).

SALLY et al (1985) ont aussi mentionné l'effet de l'âge et de l'état physiologique de la plante sur les rendements en protoplastes.

Dans notre étude, ce sont les vitroplants âgés de 6 à 7 semaines qui ont donné les meilleurs résultats. Ceci rejoint la fourchette d'âge des vitroplants utilisés pour l'isolement des protoplastes de pomme de terre par la plupart des auteurs précités.

1-1-5 Effet du CaCl₂ et de la solution CPW

Plusieurs auteurs ont mentionné l'intérêt du CaCl₂ pour la stabilité de la membrane plasmique des protoplastes.

En effet, selon **MARSCHNER (1998)** le rôle fondamental du calcium, est le maintien de la stabilité membranaire et l'intégrité cellulaire. Les tissus déficients présentent une désintégration de la membrane plasmique et une perte de la compartimentation du contenu cellulaire.

Effectivement, pour notre travail, les protoplastes obtenus dans les solutions sans CaCl₂ (G1, G2, G3) ont tous présenté une perte de la compartimentation et de l'intégrité de leurs membranes plasmiques.

D'après **MARSCHNER (1998)** le calcium stabilise la membrane cellulaire en créant des ponts calciques entre les protéines et les groupements phosphates et carboxylates des phospholipides membranaires.

Selon **Wyn et Lunt (1967)** et **Burstrom (1968)** le calcium en se liant aux phospholipides stabilise la bicouche lipidique tout en assurant une intégrité structurale à la membrane cellulaire.

L'addition du CaCl₂ à une concentration de 0.05 mole, à la solution de macération et à la solution de rinçage a également permis de résoudre le problème d'agglutination et de brunissement observé chez les protoplastes isolés dans la solution MS simple sans CaCl₂. Cela, surtout après 3h00 de digestion enzymatique pour les protoplastes issus de vitroplants de G1, et dès la première heure de macération pour les vitroplants de G2 et de G3 ; et après leur centrifugation dans les solutions MS et CPW.

D'après **CIOCI (2006)** l'agglutination ou la précipitation des cellules indique que la solution contient une (ou parfois plusieurs) molécules agglutinantes.

Selon **LARKIN (1977)** ce phénomène d'agglutination serait lié à la présence de molécules agglutinantes à la surface de la membrane plasmique des protoplastes. Elles sont dites les β -lectines.

Ces dernières sont des protéines ou des glycoprotéines dont la spécificité s'exprime par des associations réversibles à de petites molécules de sucre ou des oligosaccharides, aboutissant à des réactions d'agglutination de cellules végétales ou animales (**SHARON, 2003 in CIOCI, 2006**).

VEILLEUX et al (2004) stipulent qu'une déficience en ions calcium peut provoquer une agrégation et un brunissement rapide des protoplastes.

En se basant sur ces observations, nous pensons que les ions calcium peuvent agir comme agents anti-adhésion et cela en masquant les sites de reconnaissance des β -lectines membranaires.

De même, il est à noter que pour la plupart des travaux, et quelque soit le milieu minéral utilisé comme solution de macération, cette dernière est toujours supplémentée de CaCl_2 à différentes concentrations.

En effet **ESPEJO et al (2008)** ont pu isoler des protoplastes (de l'ordre de 10^6 protoplastes/ g-MF) du mésophylle foliaire de la variété «Désirée» prélevés sur des vitroplants âgés de 4 à 6 semaines en les incubant durant toute une nuit dans **10 ml** de solution enzymatique contenant 0.25% de macérozyme R-10, 1% de cellulase R-10, **700 mg** de CaCl_2 , 1% de MES (methyl ethyl sulfide) et 0.5 mole de sorbitol.

Quant à l'utilisation de la solution CPW, celle-ci a donné de bons rendements après 4h30 de macération, ils ont été de l'ordre de 6.66×10^6 et 4.44×10^6 protoplastes totaux et viables/g-MF. Bien que nous n'avons obtenu aucune amélioration des rendements par rapport à ceux obtenus avec la solution MS, mais les protoplastes présentaient une meilleure stabilité membranaire, et le contenu cytoplasmique une meilleure structure.

Cette solution a été utilisée avec succès par **ELLOUZ et al (1994)** et **HAICOUR (2002)** qui ont pu isoler des protoplastes à partir du mésophylle foliaire de pomme de terre en utilisant cette solution (CPW) comme milieu de macération.

Dans notre cas l'amélioration de la structure membranaire et cytoplasmique des protoplastes est peut être liée à la concentration du CaCl_2 qui est 3 fois plus élevée dans la solution CPW par rapport à la solution MS. Cependant les protoplastes présentaient toujours des agglutinations surtout après centrifugation dans cette même solution. Pour cela nous avons retenu le milieu MS additionné de 0.05 mole de CaCl_2 .

1-1-6 Etat du matériel végétal utilisé

Tout au long de notre expérimentation, les vitropants utilisés pour l'isolement des protoplastes ont été obtenus à partir de bourgeons prélevés sur des tubercules pré germés.

Ces tubercules ont été utilisés pendant une durée de 4 à 5 mois maximum. Au-delà de cette période, ces tubercules ont donné un matériel végétal de base (vitroplants) qui a présenté des caractéristiques de juvénilité.

Les tiges étaient grêles avec de petites feuilles, les calcs d'entre nœuds et de feuilles issus des vitroplants de 3^{ème} génération ont été très friables et hyper hydriques.

L'utilisation de ce matériel (feuilles ou calcs) issu de vieux tubercules pour l'isolement des protoplastes a donné de très mauvais rendements, voire insignifiants. En conséquence un renouvellement des tubercules chaque 5 mois maximum est préconisé.

Le matériel végétal issu de ces tubercules de différentes origines dont les conditions de culture et l'état sanitaire ne sont pas identiquement maîtrisés peut affecter les rendements et même les cultures de protoplastes.

Selon **DAVEY (2005)** l'état physiologique du matériel végétal influence fortement l'obtention de protoplastes viables.

D'après **SHEPARD** et **TOTTEN (1977)** les conditions environnementales et nutritives sous lesquelles les plantes sources du matériel végétal se développent constituent un aspect critique pour l'isolement des protoplastes. Il est par exemple bénéfique d'exposer les plantes à une courte photopériode afin d'obtenir des rendements élevés de l'ordre de 2 à 3×10^6 protoplastes viables/ g-MF.

De même **RADKE** et **GRUN (1986)** ont utilisé pour l'isolement des protoplastes des plantules de pomme de terre arrosées avec la solution MS doublement concentrée en CaCl_2 et en KH_2PO_4 .

Selon **RAZDAN (2003)** les feuilles de vitroplants âgés de 3 à 4 semaines issus de culture de méristèmes indemnes de virus forment une importante source de matériel végétal offrant de bons rendements en protoplastes viables, capables de régénérer des plantules entières de pomme de terre.

1-2 À partir des calcs d'entre nœuds et de feuilles

Les calcs représentent l'un des tissus les plus fréquemment utilisés pour l'isolement des protoplastes.

Nous avons utilisé deux types de calcs, durs âgés (9 à 10 semaines) et friables jeunes (4 à 5 semaines).

Les cals friables ont été obtenus 4 semaines après fragmentation et repiquage des cals durs sur le même milieu de callogenèse (M4). Ces cals friables ont permis l'obtention de 5.4×10^6 et 4.9×10^6 protoplastes viables/ g-MF respectivement pour les cals d'entre noeuds et les cals de feuilles. Alors que pour les cals durs issus d'entre noeuds et de feuilles, ils ont donné respectivement 1.33×10^6 et 0.66×10^6 protoplastes viables/ g-MF après 6h00 de macération.

En effet comme pour les feuilles âgées, les faibles rendements obtenus avec les cals durs sont probablement dus à la lignification des parois cellulaires qui paraissent foncées.

D'après **CHAWLA (2002)** les tissus et les cultures cellulaires destinés à l'isolement de protoplastes doivent être jeunes, les cals friables donnent généralement les meilleurs résultats.

D'après **RAOUDHA (1994)** les cals de feuilles et de racines de *Prunus cerasus L* âgés de 10 à 15 jours de culture donnent des rendements plus élevés que ceux cultivés pendant 20 et 30 jours. La paroi cellulaire devient plus complexe chez les cals âgés.

Les observations faites par ces auteurs témoignent de l'existence d'un effet âge des tissus qui peut influencer les rendements en protoplastes.

Pour **RAZDAN (2003)** les jeunes cultures de cals constituent un matériel idéal pour l'isolement d'une grande quantité de protoplastes, les cals plus âgés tendent à former des cellules géantes, avec une paroi cellulaire épaisse qui est habituellement difficile à digérer. Par conséquent leur repiquage donne naissance à des cals actifs plus jeunes utilisables après approximativement 15 jours de leur subculture pour l'isolement de protoplastes.

De même **ARTHUR (1988)** stipule que la lignification des parois cellulaires peut rendre difficile l'isolement des protoplastes, mais on peut résoudre ce problème en pratiquant des repiquages successifs des cultures âgées, et en choisissant les tissus exprimant une croissance rapide. De même selon **EL METILI (1993)** l'aspect friable des cals s'obtient après un certain nombre régulier de repiquage.

Effectivement, dans notre expérimentation, on a remarqué la croissance rapide des cals repiqués (friables) par rapport à ceux obtenus à partir de fragments d'entre noeuds et de feuilles de vitroplants de 3^{ème} génération. Des cals friables bien développés ont été obtenus au bout de 4 semaines de leur repiquage, tandis qu'à partir des fragments d'entre noeuds et de feuilles, les cals n'étaient obtenus qu'après 9 semaines de culture, ce qui permet un durcissement des parois qui deviennent difficiles à dégrader.

Selon **RAOUDHA (2001)** l'action des enzymes cellulases et pectiques dépend de la structure de la paroi et est donc tributaire du tissu source, d'où l'importance des conditions de culture des tissus.

CHAWLA (2002) stipule que certaines enzymes telles que l'helicase, colonase, cellulysin, glusulase, zymolyase, meicelase, pectolyase, sont assez souvent utilisées pour le traitement des tissus récalcitrants. Donc il est peut être recommandé de tester d'autres enzymes que celles que nous avons testé afin de digérer efficacement ce type de cals durs récalcitrants.

De même selon **TAGE (1986)** la source du matériel végétal utilisée pour l'isolement des protoplastes est déterminante pour le choix des concentrations enzymatiques ainsi que pour la durée de macération.

2- Viabilité

Les taux de viabilité des protoplastes observés 82 à 87% pour les protoplastes du mésophylle foliaire, 94% et 92% respectivement pour les protoplastes de cals d'entre nœuds et de cals de feuilles peuvent être considérés comme satisfaisants.

En effet chez la pomme de terre, un bon système d'isolement doit permettre d'enregistrer un taux supérieur à 80% de viabilité (**HAICOUR, 2002**).

EHSANPOUR et JONES (2001) ont isolé des protoplastes (2 à 2.5×10^6 / g-MF) du mésophylle foliaire de *Solanum tuberosum* var Delaware au bout de 4 heure de macération. Leur viabilité était de 80 à 95%.

3- Purification

Une bonne purification consiste en la récupération d'un bon rendement en protoplastes viables.

Selon **CHEPARD et TOTTEN (1977)** et **ESPEJO et al (2008)**, les rendements obtenus après purification respectivement pour les variétés (Russet Burbank) et Désirée sont compris entre 10^5 et 10^6 protoplastes / ml.

Dans notre cas la purification adoptée sur monocouche de saccharose, 21% (à une vitesse de centrifugation de 75% pendant 20 minutes) et 30% (à une vitesse de centrifugation de 75% pendant 15 minutes) respectivement pour les protoplastes de cals de feuilles et du mésophylle foliaire ont permis d'obtenir des rendements satisfaisants compris dans la fourchette précitée avec une bonne qualité de purification.

Ces rendements ont été de l'ordre de :

- 3.3×10^5 protoplastes viables/ ml pour le mésophylle foliaire ;
- 1.5×10^5 et 1.8×10^5 protoplastes viables/ ml respectivement pour les cals friables de feuilles et d'entre nœuds.

4- Culture

Selon **CHEPARD** et **TOTTEN (1977)** les milieux de culture les plus communément utilisés pour la culture des protoplastes de pomme de terre, consistent en une modification du milieu minéral de Murashige et Scoog (1962). La suppression ou la réduction de NH_4NO_3 est très favorable pour la viabilité des protoplastes.

Selon **HAICOUR (2002)** la concentration en ions calcium doit être augmentée de 2 à 4 fois par rapport à celle normalement utilisée pour les cultures de cellules.

CHEPARD et **TOTTEN (1977)** et **HAICOUR (2002)** ont utilisé pour la culture de protoplastes de pomme de terre des milieux de culture dont la concentration du CaCl_2 est respectivement de 440 et 660 mg/l, avec réduction des concentrations des autres macroéléments à moitié ou au quart.

En se basant sur ces différents travaux, nous avons testé pour la culture de protoplastes le milieu de Murashige et Scoog (1962) avec modification des concentrations des macroéléments et avec les vitamines de Morel. Les additifs organiques ont été inspirés du milieu VKM (**(BINDING et al, 1978)**, (voire matériel et méthodes).

D'après **CHAWLA (2002)** les premières divisions cellulaires sont obtenues entre le 2^{ème} et le 7^{ème} jour de culture, la 2^{ème} division est obtenue au bout d'une semaine. Après 15 jours de culture, de petits agrégats cellulaires peuvent être observés.

Selon **EHSANPOUR** et **JONES (2001)** les premières divisions cellulaires de la variété Delaware ont été observées entre le 6^{ème} et le 10^{ème} jour d'incubation.

Ceci rejoint nos résultats où les premières divisions ont été observées entre le 4^{ème} et 5^{ème} jour de culture pour l'ensemble des milieux testés. La 2^{ème} et 3^{ème} divisions ont été obtenues après le 7^{ème} jour pour les milieux S1 (macroéléments/2 sans NH_4NH_3 et dont la concentration du CaCl_2 est augmentée + 3 mg/l ANA + 1 mg/l BAP+0.18 mole de mannitol et de glucose+ 0.07 mole de saccharose) et S4 (microéléments/2 + macroéléments/2 sans NH_4NH_3 et dont la concentration du CaCl_2 est augmentée + 3mg/l ANA + 1 mg/l BAP+0.18 mole de mannitol et de glucose+ 0.07 mole de saccharose) et au bout du 10^{ème} et 15^{ème} jour de culture respectivement pour les milieux S2 (macroéléments/2 sans NH_4NO_3 et dont la concentration du CaCl_2 est augmentée+ microéléments MS + 3mg/l d'ANA+ 1mg/l BAP+ 0.25 mole de mannitol et de glucose) et S3 (macroéléments/2

sans NH_4NO_3 et dont la concentration du CaCl_2 est augmentée + microéléments MS + 1mg/l d'ANA+ 0.2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l BAP+ 0.18 mole de mannitol et de glucose+ 0.07 mole de saccharose).

Au bout du 15^{ème} jour de culture, on a observé des structures de plus de 4 cellules pour les milieux S1, S2 et S4. Sur le milieu S3 c'est uniquement le stade 4 cellules qui a été atteint.

Au bout du 15^{ème} jour de culture, les taux de divisions étaient de l'ordre de 5.85%, 9.20%, 12.7%, et 21.22% respectivement pour les milieux S3, S2, S1 et S4.

Selon **SHEPARD et TOTTEN (1977)** les taux de division des protoplastes de la variété Russet Burbank cultivés sur milieu MS modifié (dont NH_4NO_3 a été supprimé, les concentrations des macro et microéléments ont été réduits de moitié, et en présence des deux hormones de croissance, ANA : 1mg/l et BAP : 0.5 mg/l), ont été de 20 à 30%. **EHSANPOUR et JONES (2001)** ont obtenu des taux de 13% et 28% respectivement avec les milieux VKM (1mg/l ANA + 0.5 mg/l BAP + 0.2 mg/l 2,4-D) et MS (1mg/l ANA + 0.5 mg/l BAP).

Cependant pour **VANEVERDINK et PIJNACKER (1994)** l'utilisation du milieu KM8p (**KAO et MICHAYLUK, 1975**) additionné de 3 mg/l D'ANA et 1mg/l de BAP a donné des taux de division élevés.

Pour notre travail ce sont les milieux S1 (macroéléments/2 sans NH_4NO_3 et dont la concentration du CaCl_2 a été augmentée) et S4 (macroéléments/2 dont la concentration du CaCl_2 est augmentée, microéléments /2) avec (3mg/ ANA + 1mg/l BAP) qui ont donné les meilleurs taux de division par rapport au milieu S3 (1mg/l ANA + 0.5 mg/l BAP + 0.2 mg/l 2,4-D).

En effet selon **MICHAEL et al (1999)** le taux de division peut varier de 0.1 à 80%. Cependant un pourcentage de 20 à 30% est plus commun. La division des protoplastes est affectée par le milieu de culture, l'agent osmotique, la densité de culture, et la source des tissus utilisés.

Dans notre cas, au-delà du 15^{ème} jour de culture, il y a eu un arrêt de la croissance et un brunissement des cultures. Ces dernières dégénèrent pour l'ensemble des milieux testés.

Selon **EHSANPOUR et JONES (2001)**, le brunissement représente un sérieux problème pour la culture des protoplastes de la variété Delaware. Ce phénomène réduit la fréquence des divisions. En conséquence la plus part des protoplastes ne montrent que 3 à 4 divisions.

D'après **BINDING** et *al* (1978), **TAVAZZA** et **ANCORA** (1986) in **EHSANPOUR** et **JONES** (2001) et **GURI** et *al* (1987), les cultures de protoplastes des clones dihaploïdes et des variétés commerciales de pomme de terre montrent le même phénomène de brunissement.

D'après **EHSANPOUR** et **JONES** (2001) le brunissement est éventuellement dû aux produits phénoliques sécrétés suite aux activités métaboliques des cellules et/ou par les protoplastes endommagés ; au changement du pH local des protoplastes ou à l'altération des éléments, particulièrement les ions Fe^{2+} dans le milieu de culture.

En effet le milieu de culture M4 dont les concentrations du fer (Fe-EDTA) et des microéléments sont réduits de moitié a donné le meilleur taux de division 21.22%, et est le seul milieu qui a permis l'obtention de microcolonies cellulaires. Néanmoins au-delà du 15^{ème} jour de culture, les protoplastes et cellules ont dégénéré sur l'ensemble des milieux testés.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Au cours de ce présent travail nous avons étudié quelques facteurs susceptibles d'influencer l'isolement, la purification et la culture de protoplastes de pomme de terre, variété « Désirée ».

Pour cela différents types d'explants ont été utilisés :

- feuilles de vitroplants ;
- cals durs et friables d'entre nœuds et de feuilles.

A l'isolement les nombres moyens de protoplastes totaux et viables obtenus ont été influencés par :

- La concentration de l'agent osmotique, où la molarité de 0.5 mole de mannitol s'est avérée la meilleure ;
- Les concentrations d'enzymes, où 1% de cellulase trichoderma et 0.3% de macerozyme R-10, ont permis l'obtention des meilleurs résultats pour le mésophylle foliaire de vitroplants et les cals friables d'entre nœuds et de feuilles ;
- La présence du CaCl_2 dans la solution de macération (milieu MS) a eu un effet bénéfique sur la stabilité membranaire, l'intégrité cellulaire et a empêché l'agglutination des protoplastes issus du mésophylle foliaire. Par contre les protoplastes issus de cals durs ou friables d'entre nœuds et de feuilles ont présenté une meilleure stabilité des membranes en l'absence du CaCl_2 ;
- L'âge des vitroplants à partir duquel ont été prélevées les feuilles a influencé les rendements, les deux enzymes utilisées à différentes concentrations deviennent moins actives avec des feuilles prélevées sur des vitroplants âgés, les vitroplants âgés de 6 à 7 semaines ont donné les meilleurs résultats;
- L'âge et la nature des cals (durs ou friables) ont aussi affecté les rendements des protoplastes. Les cals durs sont impropres à l'isolement

des protoplastes. L'épaississement de la paroi cellulaire des cals durs et âgés inhibe l'action des enzymes hydrolytiques ;

Quant à la purification des protoplastes, elle a été influencée par :

- La concentration de l'agent de purification (saccharose) ;
- La vitesse et le temps de centrifugation ;

Ces deux paramètres dépendent du matériel végétal utilisé pour l'isolement des protoplastes. Ceux issus du mésophylle foliaires sont denses et ont donc nécessité une concentration plus élevée en saccharose et un temps de centrifugation plus bas (30% pendant 15 minutes) par rapport à ceux issus de cals friables de feuilles et d'entre noeuds qui sont moins denses (21% pendant 20 minutes).

Le choix de la composition minérale et des concentrations des hormones de croissance des milieux de culture est déterminant pour la réussite d'une culture de protoplastes. Une réduction de la proportion des macroéléments et notamment celle des microéléments, dont le fer semble bénéfique. Le meilleur taux de division 21,22% a été obtenu sur le milieu MS dont les macroéléments et microéléments ont été dilués de moitié, avec 3 mg/l d'ANA et 1mg/l de BAP, (les macroéléments ne contiennent pas l' NH_4NO_3 , et comportent 3,5 fois plus de CaCl_2 par rapport au milieu MS)

Au terme de ce travail, nous souhaitons que ce dernier soit poursuivi et complété par d'autres études afin d'optimiser d'autres paramètres permettant l'amélioration :

- Des rendements à l'isolement notamment ceux des protoplastes issus de cals durs en testant d'autres enzymes connues pour leur efficacité sur des tissus récalcitrants, telles que l'helicase, colonase, cellulysin, glusulase, zymolyase, meicelase ou la pectolyase à différentes concentrations.
- De la qualité de purification, en utilisant d'autres agents de purification tel que le ficoll ou le percoll. Ces derniers sont considérés comme osmotiquement inertes, leur utilisation peut être préférée à celle du saccharose.

- De la culture des protoplastes, en étudiant d'autres facteurs qui peuvent influencer la régénération de la paroi pectocellulosique, l'entrée en division des cellules et la formation des micro cals et cals, comme à titre d'exemple la :
 - L'amélioration du milieu de culture M₄ dont les résultats ont été les meilleurs ;
 - Nature du milieu (liquide ou semi solide) de culture;
 - Densité des protoplastes en culture ;
 - Types et concentrations des hormones de croissance ;
 - Nature et proportion des additifs organiques ;
 - Origine des protoplastes (cals).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1-AL AMIR et ALI BENALI, 1998 – Etude et analyse de quelques facteurs influençant la micropropagation la microtubérisation de trois variétés de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) (Cardinal, Désirée et Elvira). Thèse Ing.Agr., INA, Alger. 121p.

2-ANJUM M A et HAKOOMAT A; 2004: Effect of Culture Medium on Direct Organogenesis from Different Explants of Various Potato Genotypes. Biotechnology, 3 (2): 193 p. In <http://www.ansijournals.com/biotech/2004/187-193.pdf>

3-ARTHUR GEOFFREY NORMAN et NYLE C. BRADY., 1988 –*Advances in agronomy, volume 28, 411 p.*

4-AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., JALONZOT R., MINIER R., MORAND J.-CL., REYNOIRD J.P., STRULLUL D.G. et VIDALIE H., 1989 – la culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. J.B BAILLIERE, Paris.225 p.

5-BENALIA., 2004 - Contribution à l'étude de la levée de dormance des tubercules de pomme de terre produits *in vitro* (variété Désirée). Thèse Ing.Agr., INA, Alger. 53p.

6-BENKORTBY H et RAHMOUNI Z., 1999 – Etude des facteurs influençant la micropropagation et la régénération (vitroplants et microtubercules) à partir de cals chez trois variétés de pomme de terre (Cardinal, Désirée et Elvira). Thèse Ing.Agr., INA, Alger. 78p.

7-BESSAIAH C., 1992 - Aptitude à la micropropagation et la callogénèse *in vitro* de la pomme de terre variété Désirée. Thèse Ing. Agr, Univer. Blida. 61 p.

8- Binding H, Nehls R, Shieder O, Sopory SK, Wenzel G., 1978 - Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*. *Physiol plant* 43.

9- BOUZNAD Z, AIT OUADA M, KEDAD A, MOKABLI A, SIAFA A et YAHIAOUI S., 2008- Principaux ravageurs et maladies de la pomme de terre : Agents

responsables, dégâts, conditions de développement et méthodes de lutte. Journée d'étude sur la filière pomme de terre, situation actuelle et perspectives. INA El Harrach. 18 juin 2008. 16 p

10- CEBALLOS M, HAMDI M, PITTER E, GALARRETA J L., 1998 - Evaluation of regeneration in *Solanum tuberosum L.* Investigcion Agraria, 13 (1/2), 166 p.

11- CHAIPAKDEE WITTOOL, 2007- Isolation and culture of protoplast from leaves of *Lactuca sativa* Songklanakar J. Sci. Technol., 2007, 29(4).

12- CHAWLA H. S, 2002 – Introduction to Plant biotechnology. Publié par Science publishers, 528 p.

13- CHEHAT M., 2008 - La filière pomme de terre algérienne : une situation précaire. Journée d'étude sur la filière pomme de terre, situation actuelle et perspectives. INA El harrach, le 18 juin 2008. pp 1-13

14- CIOCI GIANLUCA., 2006 – Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Ecole doctorale chimie et sciences du vivant, 81p.

15- CIP (Centre International de Pomme de terre), 1979 – La pomme de terre maladies et nématodes, 67p.

16- COMPTON MICHAEL E., JAMES A SAUNDERS., ET RICHARD E VEILLEUX., 1999 – Use of protoplasts for plant improvement, publié par CRC press.

17- CORNUET P., 1959- Maladies à virus des plantes cultivées et méthodes de lutte. 440p

18- CORNUET P., 1987 –Elément de virologie végétale, INRA. 206p.

19- DAVEY MICHAEL. R., PAUL ANTHONY., BRIAN POWER. J et KENNETH C. LOWE., 2004 – Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives.

20- DAVEY MICHAEL. R., PAUL ANTHONY., BRIAN POWER. J et KENNETH DAVEY MICHAEL. R., PAUL ANTHONY., BRIAN POWER. J et KENNETH C. LOWE., 2005 – Plant protoplasts technology: current status. ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM. Vol. 27. N° 1. 2005.

21- DIXON R. A., 1995 – Plant cell culture. Oxford University Press. 256 p

22- DJEMEL A., 2005 – Effet génération sur la micro propagation et la micro tubérisation chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée). Thèse Ing.Agr., INA, Alger. 47 p.

23- DJENNANE S et KHELIFATTI N., 1996 – Etude de quelques facteurs influençant la tubérisation *in vitro* de trois variétés de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) : Cardinal, Désirée et Elvira. Thèse Ing.Agr., INA, Alger. 107 p.

24- DODDS JHON H, 1985 – Plant genetic engineering – Cambridge university press.ed, 320 p.

25- DODDS., 1995 - Experiments in plant tissue culture. 3^{ème} édition, Lorin Robert.

26- DSA., 2008- Direction des services agricoles. Journée d'étude sur la filière pomme de terre, situation actuelle et perspectives. INA El Harrach. 18 juin 2008.

27- DUCREUX G., ROUSSIGNOL L et ROUSSIGNOL M., 1986 – La pomme de terre. La recherche. 174. pp 193-203.

28- EHSANPOUR A A et JONES M G K., 2001 – Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L) cultivars Delaware using silver thiosulphate (STS) J. Sci.I. Iran, vol 12, No.2,

29- ELLOUZ O., LAKHOUA L et GARGOURI A., 1994 - Polymorphisme de l'ADN total chez des plantes régénérées à partir de protoplastes de pomme de terre. Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Ed. AUPELF-UREF ,Paris.

- 30- ELLOUZ O., LAKHOVA L., JADARI R., MUSSIO I., SERVAES A., AMBROISE A., DUCREUX G et SIHACHAKR D., 1997** - Utilisation de l'électrofusion de protoplastes pour l'amélioration de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L). Textes et résumés des affiches de la section E.
- 31- EL METILI N., 1993** – Mise en place d'un protocole de régénération de plantes à partir de protoplastes chez le mil (*Pennisetum americanum* L.) : impact génotypique, Ed AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp 237-247.
- 32- ESPEJO R., CIPRIANI G., GENOVEVA R., GOLMIRZAIE A et ROCA W., 2008** – Somatic hybrids obtained by protoplast fusion between *Solanum tuberosum* L subsp. *Tuberosum* and the wild speice *Solanum circaefolium* BITTER. *Rev. peru. Boil* 15 (1), (Julio 2008).
- 33- FAO, Food and Agriculture Organization., 2008** - <http://www.fao.org>
- 34- GACEM F., 2008** – Production de plants de pomme de terre. Agriculture et développement, n° 8, numéro spécial pomme de terre, INVA, décembre, 2008.
- 35- GALLAIS A et H BANNEROT., 1992** – Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection. 768 p.
- 36- GAUTHRET R., 1959** - Culture de tissus végétaux. Éd Masson et Cie Paris. 863 p.
- 37- GRUN P et CHU L J., 1978** – Développement of plants from protoplasts of *Solanum* (Solanaceae). *Am. J. Bot* ; 65 : 538-43.
- 38- GURI A., VOLKITA M., et SINK K C., 1987** – Plant regeneration from leaf protoplats of *Slanum turvum*. *Plant Cell Rep*; 6: 302 p.
- 39- HADJ MOUSSA KH et IMINE K., 2009** - Influence du milieu de microtubérisation sur la dormance des microtubercules de la pomme de terre var. Désirée, thèse ing agr, INA Alger, 70 pages
- 40- HAICOUR R, 2002** – Biotechnologies végétales, techniques de laboratoires. Ed Tec et Doc, Lavoisier.

- 41- HAMOUI M, KAAKA F., 1999** : L'embryogénèse et la régénération de pomme de terre. Sem. Arb. Sur l'application des biotechnologies à l'agriculture. 5-7 Avril, SFAKS.
- 42- HIROFUMI UCHIMIYA et TOSHIO MURASHIGE., 1974** – Evaluation of Parameters in the Isolation of Viable Protoplasts from Cultured Tobacco Cells. *Plant physiol.* (1974) 54, 936-944.
- 43- ITCMI (Institut technique des cultures maraichères et industrielles) ., 2008** – Production de la pomme de terre en Algérie. *Agriculture et développement*, n° 8, numéro spécial pomme de terre, INVA, décembre, 2008.
- 44- JAMES F.SHEPARD et ROGER E.TOTTEN., 1977** – Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant physiol.*(1977) 60, 313-316.
- 45- Janina Hanower, Geneviève Cas et Philippe Bouvet., 1986** - Culture de tissus et de protoplastes de *Sesbania rostrata*. C. R. Acad. Sc. Paris, t. 303, Série III, no 10.
- 46- JHON P., 1983** – Use of tissue culture and protoplasts in plant pathologie, copyright by academic press Australia.
- 47- KACI MABROUK ASSYLES., 2007-** Induction de bourgeons néoformés chez la pomme de terre (variété Spunta). Thèse Ing. Agr, INA, Alger, 96 p.
- 48- KHATUN N, BARI M A, SLAM R; HUDA S, SIDDIQUE N A, RAHMAN M H ET MOLLAH M U., 2003:** Callus Induction and Regeneration from Nodal Segment of Potato Cultivar Diamant. *Journal of Biological Sciences* 3 (12): pp: 1101-1106. *In*
- 49- KHELIFI L., KHELIFI-SLAOUI M., OULHA D., LAHMISSI A., OULD KIAR R., OUSSERIR S., TITOUH K., BENALIA S., DJEMEL A., ZEKHOUNI A., ALI BEN ALI M., EL AMIR H., DJENANE S., KHELIFATI N., LOUGHREIB H., MAHMOUDIA F., BENKORTEBY H., RAHMOUNI H., KACI A., OULD RAMOUL A., YAHIA MESSAOUD F., YAMOUN A.,**

TOUBAL N ET ZAOUI D., 2008 – Production de semences de pomme de terre : de la sélection classique aux biotechnologies. Journée d'étude sur la filière pomme de terre, situation actuelle et perspectives. INA El Harrach. 18 juin 2008, 23 p.

50- KIKUTA Y, FUJINO K, SAITO W, MASUDA K et OKAZAWA Y., 1986 – Protoplasts culture of potato: Improved procedure for isolating viable protoplasts (J. Fac. Agr. Hokkaido Univer., Vol.62, Pt. 4, 1986).

51- LAFON J.P., 1987 – Biologie des plantes cultivées. Tome 2, physiologie, génétique et amélioration. Coll C – E.R.L.A, ed A.R.P.E.P.S. 172 p.

52- LAHMISSI A., 2004 – Assainissement de deux variétés de pomme de terre *Solanum tuberosum* L. (Diamant et Désirée) par culture de méristème et thermothérapie. Thèse. Magister en sciences agronomiques. INA, Alger. 123 p.

53- LAM SL., 1975 - Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. Amer Potato Journal; 52: pp: 103-106.

54- LARBI Z S., 1988 – Contribution à l'étude des mauvaises herbes, réservoirs à virus dans les champs de pomme de terre dans l'Algérois, Thèse Ing.Agr., INA, Alger. 39 p.

55- LAURENT F., 1997 – Fertilisation : au plus près des besoins de la plante, collection ITCF – ITPT, pp 6-8.

56- LEPOIVRE PHILIPPE., 2003 –Phytopathologie, 285p.

57- LOUANCHI M., 1988 – Contribution à l'étude des virus de la pomme de terre dans la région d'Alger .Thèse Ing. Agr., INA, Alger.

58- LOUGHRAIEB H et MAHMOUDIA F ; 1997 – Micropropagation et microtubérisation de trois variétés de pomme de terre « CARDINAL, DESIREE et ELVIRA ». Thèse Ing. Agr., INA, Alger. 106 p.

- 59- MADR** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural., **2006** – Statistiques agricoles, série B.
- 60- MADR** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural., **2007** – Statistiques agricoles, série B.
- 61- MADR** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural., **2008** - Statistiques agricoles, série B
- 62- MARGARA J., 1989** – Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse. Ed. INRA, Paris.262 p.
- 63- MARSCHNER H., 1998** – Mineral nutrition of higher plants, Ed academic press. 889 p.
- 64- MEHRI-KAMOUN R., LEPOIVRE Ph et BOXUS Ph., 1997** – Relation entre l'activité spécifique des enzymes et la digestion de la paroi pour l'obtention de protoplastes de *Prunus cerasus* L. « Montmorency ». pp 513-518 Scientifique du Réseau Biotechnologies Végétales AUPELF. UREF, Orsay, juillet 1997
- 65- MOUHOUCHE B ET BAZOUCHE M., 2008** – Etude de l'effet combiné du régime hydrique et de la fertilisation minérale sur la production de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Journée d'étude sur la filière pomme de terre, situation actuelle et perspectives. INA El Harrach. 18 juin 2008, 23 p.
- 66- MOY M., P.FLEURAT LESSART et E AUGÉ., 2005** : <http://www.univer-orleans.fr>
- 67- MURASHIGE et SKOOG; 1962**: Revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 15. pp: 473-497.
- 68- OKAZAWA Y, KATURA N et TAGAWA T., 1967** - Effect of auxine and kinetine on the development and differentiation of potato tissue cultured *in vitro*. *Physiol plant* 20, pp: 862-669.

69- OUDIN Y., 1982 – Semences et vitroplants. Les cultures végétales in vitro. Conférences colloque APRIA (Mai, 1982) :19-25.

70- OULD KIAR R., KHELIFI L., KHELIFI-SLAOUI M. et HAMACH M., 2005 - Optimisation de quelques facteurs influençant la production de semence de pomme de terre, pp : 310. Actes du séminaire international sur l'amélioration des production végétales -APV 2005-, Alger (Algérie) du 5 au 7 décembre 2005.

71- OULD LAHLAH M., 1997- Micropropagation et microtubérisation de la variété de pomme de terre Red Pontiac. Thèse Ing.Agr., INA, Alger. 61p.

72- OULHA D ; 2005 – Mise au point d'un procédé de production de semences de pomme de terre : depuis le méristème jusqu'aux générations de plein champ. Thèse Magister en sciences agronomiques. Université de Blida. 192 p

73- PETERS R D., STURZ A V., CARTER M R et SANDERSON J B., 2004 – Crop rotation can confer resistance to potatoes from *Phytophthora erythroseptica* attack, Canadian journal of plant science, 85 pp 523-528.
Physiol plant 43: 52-54.

74- QURAIISHI A, JOHN I, ROSSIGNOL-BACILHON L et NOZERAN R., 1987 - Effect of the origin of explants on the callus initiation and differentiation in potato. Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 3; potato. Éd Y.P.S BA.JA.J.

75- RADKE S et GRUN P., 1986 – Isolation, culture, and regeneration of leaf mesophyll protoplasts of selected clones of *Solanum*, Potato research n° 29 (1986) 451-462.

76- RANCILLAC., 1981- Perspectives d'application des cultures d'organes in vitro à la multiplication végétative du pin maritime, *Pinus pinaster* sol. Ann. Sci. Forest, N° 38 (1) pp 55 – 70.

77- RAOUDHA, KAMOUN-MEHRI J, PHILLIPE LEPOIVRE et PHILLIPE BOXUX., 1994 – Isolement de protoplastes à partir de mésophylle, de cals de feuilles et de cals de racines de *Prunus cerasus* L., var « Montmorency ». Laboratoire de phytopathologie, faculté des sciences agronomiques Gembloux, Belgique.

- 78- RAZDAN M. K., 2003** – Introduction to plant tissue culture, science publishers, 375 p.
- 79- ROUSSELLE F BOURGEOIS et P ROUSSELLE., 1992** –Création et sélection de populations diploïdes de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L). *Agronomie*(1992) N° 12. pp 59-67.
- 80- RICHARD E., VEILLEUX, MICHAEL E et JAMES A SAUNDERS., 2004** – Use of protoplasts for plant improvement, CRC press, 358 p.
- 81- ROUSSELLE P., ROBERT Y. et CROSNIER J.C., 1996** - La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Ed. INRA, ITPT, ITCF, Paris. 607 p.
- 82- RUDRA P. SINGH., 1995** – Molecular methods in plant pathology, 523 p.
- 83- RUIZE J I DE GALARETTA., CARRASCO A., SALAZAR A., BARRENA I., ITURRITXA E., MARQUINEZ R., LEGORBURU F J et RITTER E., 1998** – Wild *Solanum* species as resistance sources against different pathogens of potato. *Potato Research* n° 41 (1998) pp, 57-68.
- 84- SALLY E. ADAMS., R. A. C. JONES et R. H. A. COUTTS., 1985** - Infection of Protoplasts Derived from Potato Shoot Cultures with Potato
- 85- SLAOUI M., 1986** – Premiers essais de préparation de protoplastes à partir de feuilles chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L). DEA de biologie végétale et forestière Nancy. 36p.
- 86- SLAOUI M., 1990** ; - Préparation et culture de protoplastes à partir de différents types de matériel chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* l). Thèse de doctorat, université de Nancy I. 220p.
- 87- TAGE R ERICSSON., 1986** – Protoplasts isolation and culture. Plant protoplasts, 2^{ème} édition. CRC Press, pp 1-20.
- 88- TAYLOR R J et SECOR G A., 1988** – A shoot induction procedure for increased

shooting efficiency of potato protoplast-derived calli (cvs. Crystal and Norgold Russet), Potato research n° 31 (1988) 651-658.

89- TICAN ANDREEA., GHEORGHE CAMPEANU., NICOLETACHIRU et DIANA IVANOVICI., 2008 – Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. Roumanian Biotechnological letters, Vol. 13, No. 4 pp. 3791-3798

90- TITOUH K., 2006 - Etude de quelques facteurs influençant la dormance des microtubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L) Var. Spunta. Thèse Ing.Agr., INA, Alger., 74p.

91- TOUBAL N., 1997 – Microtubérisation des variétés de pomme de terre (CARDINAL, DESIREE et ELVIRA), étude de l'effet des facteurs inducteurs de la tubérisation sur la dormance des microtubercules et essai de levée expérimentale de la dormance. Thèse Ing. Agr., INA, Alger., 90 p.

92- TRIGIANO ROBERT NICOLAS et DENNIS JOHN GRAY., 1999 – Plant tissue culture Concepts and laboratory excercises, publié par CRC Press, 454 p.
Virus X *J. gen. Virol.* (1985), 66, 1341 1346.

93- VANEVERDINK W J et PIJNACKER L P., 1994 – Initial acytokinesis durig leaf protoplast culture of dihaploid and tetraploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. bulbocastanum*. Potato Research n° 37 (1994) 413-421.

94- VEILLEUX R E., MICHAEL E COMPTON et JAMES A SAUNDERS., 2004
Use of protoplasts for plant improvement, publié par CRC press,

95- VOET D et VOET J G., 2005 – Biochimie, édition de coeck université, Bruxelles, 2^{ème} édition.

96- WHEELER V.A, EVANS N.E, FOULGER D, WEBB K.J, KARP A, FRANKLIN J et BRIGHT SWJ., 1985 - Shoot formation from explants cultures of

fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants. *Ann. Bot.*, 55. pp: 309-320.

97- YAHIA MESSAOUD L., 1998 – Etude de la production de semence de pomme de terre *Solanum tuberosum* L. variété Nicola par microtubérisation et micropropagation. Thèse. Magister en sciences agronomiques, INA, Alger. 79 p.

98- YAMOUNE A., 2006 - Callogénese et régénération de bourgeons néoformés chez la pomme de terre var. Désirée. Thèse Ing; INA, Alger. 68p.

99- YASMIN S; NASIRUDDIN K.M; BEGUM R et TALUKDER S.K., 2003 - Regeneration and Establishment of Potato Plantlets Through Callus Formation with BAP and NAA. [Asian Journal of Plant Sciences](http://ansinet.org/fulltext/ajps/ajps212936-940.pdf) 2(12). Pp 936-940. In: <http://ansinet.org/fulltext/ajps/ajps212936-940.pdf>

100- ZRYD J.P., 1988 – Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Ed. Presses Polytechniques Romandes. 1^{ère} édition, Lausanne. 308 p.

ANNEXES

I- Composition du milieu MS (1962), et des solutions mères.

Eléments	Composition chimique	Concentration en mg/l	Concentration des solutions mères
Macroéléments	NH ₄ NO ₃	1650	Concentré 20 fois
	K NO ₃	1900	
	Mg SO ₄ , 7H ₂ O	370	
	Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	440	
	K H ₂ PO ₄	170	
Microéléments	H ₃ BO ₃	6,20	Concentré 100 fois
	Mn SO ₄ , 4H ₂ O	22,30	
	Zn SO ₄ , 4H ₂ O	8,60	
	KI	0,83	
	Na ₂ 2Mo O ₄ , 2H ₂ O	0,25	
	Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0,025	
	Ca Cl ₂ , 6 H ₂ O	0,025	
Fer (Fe-EDTA)	Fe SO ₄ , 7H ₂ O	27,85	Concentré 100 fois
	Na ₂ EDTA	37,25	
Vitamines	Glycine	2,00	Concentré 1000 fois
	Acide nicotinique	0,50	
	Pyridoxine HCl	0,50	
	Thiamine HCl	0,10	
	Myoinositol	100	

II- Analyse de la variance**1- Callogenèse****1-1 Rhyzogenèse****a- Entre nœuds**

Taux de cals rhyzogènes **F (3 - 60)=3.16 ; P<0.0311***

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	1.875	3	0.625	3.16	0.0311
Résiduelle	11.875	60	0.197917		
Total	13.75	63			



Nombre moyen de racines néoformées **F (3 - 60)=5.04 ; P<0.0035****

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	84.9219	3	28.3073	5.04	0.0035
Résiduelle	336.938	60	5.61562		
Total	421.859	63			

b- FeuillesTaux de cals rhyzogènes **F (3 - 60)=5.20 ; P<0.0029****

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	3.29688	3	1.09896	5.20	0.0029
Résiduelle	12.6875	60	0.211458		
Total	15.9844	63			

Nombre moyen de racines néoformées **F (3,60)=2.05 ; P<0.1170 NS**

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	24.5	3	8.16667	2.05	0.1170
Résiduelle	239.5	60	3.99167		
Total	264.0	63			

1-2 Caulogènèse**1-2-1- A partir des cals****a- Entre nœuds**Taux de cals caulogènes **F (1 - 28)=2.15 ; P<0.1534 NS**

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	0.133333	1	0.133333	2.15	0.1534
Résiduelle	1.73333	28	0.0619048		
Total	1.86667	29			

Nombre moyen de bourgeons néoformés **F (1 - 28)=2.15 ; P<0.1534 NS**

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	0.133333	1	0.133333	2.15	0.1534
Résiduelle	1.73333	28	0.0619048		
Total	1.86667	29			

b- FeuillesTaux de cals caulogènes **F (1 - 28)=9.33 ; P<0.0049****

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	1.2	1	1.2	9.33	0.0049
Résiduelle	3.6	28	0.128571		
Total	4.8	29			



Nombre moyen de bourgeons néoformés **F (1 - 28)=3.19 ; P<0.0850 NS**

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	8.53333	1	8.53333	3.19	0.0850
Résiduelle	74.9333	28	2.67619		
Total	83.4667	29			

1-2-2 A partir de fragments d'entre nœuds et de feuilles

a- Entre nœuds



Taux de cals caulogènes **F (1 - 36)=12.06 ; P<0.0014 ****

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	1.43275	1	1.43275	12.06	0.0014
Résiduelle	4.27778	36	0.118827		
Total	5.71053	37			



Nombre moyen de bourgeons néoformés **F (1 - 36)=8.48 ; P<0.0061****

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	29.9415	1	29.9415	8.48	0.0061
Résiduelle	127.111	36	3.53086		
Total	157.053	37			

b- Feuilles



Taux de cals caulogènes **F (1 - 38)=23.22 ; P<0.0000 *****

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	3.025	1	3.025	23.22	0.0000
Résiduelle	4.95	38	0.130263		
Total	7.975	39			



Nombre moyen de bourgeons adventifs **F (1 - 38)=10.26 ; P<0.0028****

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	65.025	1	65.025	10.26	0.0028
Résiduelle	240.95	38	6.34079		
Total	305.975	39			

2- Isolement de protoplastes

2-1 A partir du mésophylle foliaire

2-1-1 Vitroplants de 1^{ère} génération

a- Enzymes



Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 3h00 de macération

F (3 - 36)=1.01 ; P<0.3988 NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	4.275	3	1.425	1.01	0.3988
Résiduelle	50.7	36	1.40833		
Total	54.975	39			

b- Mannitol



Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 3h00 de macération

F (4 - 45)=6.27 ; P<0.0004***

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	11.32	4	2.83	6.27	0.0004
Résiduelle	20.3	45	0.451111		
Total	31.62	49			



Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 4h30 de macération

F (4 - 45)=2.77 ; P<0.0387*

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	9.32	4	2.33	2.77	0.0387
Résiduelle	37.9	45	0.842222		
Total	47.22	49			

c- pH



Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 6h00 de macération

F (1 - 18)=00 ; P<1 NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
Résiduelle	11.8	18	0.655556		
Total	11.8	19			

d- Effet du Cacl₂**Après 3h00 de macération**

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche

F (1 - 18) = 0.08; P= 0.7771 >0.05 NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	0,05	1	0,05	0,08	0,7771
Résiduelle	10,9	18	0,605556		
Total	10,95	19			

**Après 4h30 de macération**

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche

F (1 - 18) = 0.00 ; P = 1.0000 > 0.05 NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
Résiduelle	15,8	18	0,877778		
Total	15,8	19			

e- Effet de la solution CPW

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 3h00 de macération

F (1 - 18)=4.24 ; P<0.0544 NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	3.2	1	3.2	4.24	0.0544
Résiduelle	13.6	18	0.755556		
Total	16.8	19			

f- Age

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 3h00 de macération

F (2 - 27)= 11.10; P = 0.0003 <0.001***

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	11.2667	2	5.63333	11.10	0.0003
Résiduelle	13.7	27	0.507407		
Total	24.9667	29			

2-1-2 Vitroplants de 2^{ème} génération



Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 4h30 de macération

F (1 - 18)=5.89 ; P<0.0260*

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	6.05	1	6.05	5.89	0.0260
Résiduelle	18.5	18	1.02778		
Total	24.55	19			

2-1-3 Vitroplants de 3^{ème} génération



Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche après 4h30 de macération

F (1 - 18)=8,04 ; P<0.0110*

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	5	1	5	8.04	0.0110
Résiduelle	11.2	18	0.622222		
Total	16.2	19			

2-1-4 Effet génération



Après 3h00 de macération

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche

F (2 - 27)=5,37; P = 0.0109 <0.05*

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	9.86667	2	4.93333	5.37	0.0109
Résiduelle	24.8	27	0.918519		
Total	34.6667	29			



Après 4h30 de macération

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche

F (2 - 27)=1.15; P = 0.3326 > 0.05 NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	2.6	2	1.3	1.15	0.3326
Résiduelle	30.6	27	1.13333		
Total	33.2	29			

2-1-5 A partir de cals

a- Cals durs



Cals d'entreoeuds

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche, après 6h00 de macération

F (3 - 36) = 1.71; P<0.1814 NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	1.8	3	0.6	1.71	0.1814
Résiduelle	12.6	36	0.35		
Total	14.4	39			



Cals de feuilles

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche, après 6h00 de macération

F (3 - 36) = 0.10; P< 0.9588NS

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	0.075	3	0.025	0.10	0.9588
Résiduelle	8.9	36	0.247222		
Total	8.975	39			

b- Cals friables



Cals d'entreoeuds

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche, après 6h00 de macération

F (4 - 45) = 36.33; P<0.0000***

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	209.88	4	52.47	36.33	0.0000
Résiduelle	65.0	45	1.44444		
Total	274.88	49			



Cals de feuilles

Nombre moyen de protoplastes viables par g de masse fraîche, après 6h00 de macération

F (4 - 45) = 70.79; P<0.0000***

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	174.92	4	43.73	70.79	0.0000
Résiduelle	27.8	45	0.617778		
Total	202.72	49			

3- Culture



Taux de viabilité, estimé après 7 jours de mise en culture

F (3 - 116) = 7.90; P < 0.0000***

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	117,825	3	39,275	7,90	0.0001
Résiduelle	576,767	116	4,97213		
Total	694,592	119			



Taux de régénération de la paroi, estimé après 7 jours de mise en culture

F (3 - 116) = 9.02; P < 0.0000***

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	81,6333	3	27,2111	9,02	0.0000
Résiduelle	350,067	116	3,01782		
Total	431,7	119			



Fréquence d'entrée en division, estimée après 15 jours de mise en culture

F (3 - 116) = 9.02; P < 0.0000**

Source de variation	SCE	DDL	CM	F	Proba
Factorielle	3.15833	3	1.05278	4.09	0.0084
Résiduelle	29.8333	116	0.257184		
Total	32.9917	119			