

Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach-Alger
Département de Foresterie et Protection de la Nature et Phytotechnie
Option : Biodiversité, biotechnologie végétales
Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Sciences Agronomique

*Isolement, Purification et culture de protoplastes de *Datura stramonium* L.*

Présenté par :

Mme. Amroune Samia épouse Amdoun

Directeur de thèse Mme. Khelifi M. Professeur ENSA, Alger

Co-Directeur de thèse : M. Khelifi L. Professeur ENSA, Alger

Date de soutenance : 02-06-2011

Président : M. Bellatrache M. Professeur ENSA, Alger Examineurs : M. Boudjeniba M. Professeur
ENS, Kouba-Alger Melle. Zermane N. Maître de conférence, ENSA, Alger

Table des matières

Dédicace . . .	6
REMERCIEMENTS . . .	7
RESUME . . .	8
SUMMARY . . .	9
ص خ لم . . .	10
Liste des abréviations . . .	11
Introduction générale . . .	12
Synthèse bibliographique. . .	13
1. Le <i>Datura stramonium</i> L. . . .	13
1.1. Généralités sur le <i>Datura stramonium</i>	13
1.2. Amélioration du contenu alcaloïdique des <i>Datura</i> par les biotechnologies. . . .	14
1.3. Callogénèse. . . .	15
2. Les protoplastes de cellules végétales. . . .	15
2.1. Utilisation des protoplastes en biotechnologies végétales. . . .	16
2.2. Protoplastes chez le <i>Datura</i>	17
3. Les facteurs influençant l'isolement des protoplastes. . . .	17
3.1. Nature et concentration des enzymes. . . .	18
3.2. Concentration de l'agent plasmolysant. . . .	19
3.3. Temps d'agitation. . . .	20
3.4. PH de la solution de macération. . . .	20
3.5. Âge et nature du tissu. . . .	20
4. Les facteurs influençant la purification des protoplastes. . . .	21
4.1. Nombre de tours et temps de centrifugation. . . .	21
4.2. Concentration du saccharose. . . .	21
5. Les facteurs influençant la culture des protoplastes et la régénération. . . .	21
5.1. Densité de semis. . . .	22
5.2. Composition du milieu de culture	22
5.3. PH du milieu de culture. . . .	23
Matériel et méthodes . . .	24
1. Matériel végétal . . .	24
2. Callogénèse . . .	24
3. Facteurs influençant l'isolement des protoplastes à partir des feuilles de vitrosemis et des cals. . . .	25
3.1. Nature de la cellulase et durée de macération : essai préliminaire. . . .	25
3.2. Concentration de l'agent plasmolysant : le mannitol. . . .	25
3.3. Concentration des enzymes	25
3.4. PH de la solution de macération. . . .	26
3.5. Découpage ou non du matériel végétal. . . .	26
3.6. Nature du tissu et âge des feuilles. . . .	26

4. Etude de quelques facteurs influençant la purification des protoplastes de feuilles de <i>Datura stramonium</i> . . .	26
4.1. Prépuration. . .	27
4.2. Purification finale . . .	27
5. Paramètres mesurés. . .	28
6. Principe du comptage. . .	28
7. Test de viabilité . . .	29
8. Essais de culture des protoplastes de feuilles de <i>Datura stramonium</i> . . .	30
8.1. Etude de quelques facteurs influençant l'entrée en divisions. . .	30
8.2. Paramètres mesurés. . .	32
9. ANALYSES STATISTIQUES. . .	32
Résultats et discussion . . .	33
1. Callogénèse . . .	33
2. Isolement des protoplastes. . .	35
2.1. Nature de la cellulase et durée de macération : essai préliminaire. . .	35
2.2. Concentration du mannitol. . .	38
2.3. Concentration de la cellulase. . .	41
2.4. Concentration de la macérozyme. . .	43
2.5. PH de la solution de macération. . .	45
2.6. Effet des prétraitements : découpage ou non du matériel végétal. . .	47
2.7. Effet de la nature du tissu . . .	48
2.8. Effet de l'âge des feuilles. . .	49
3. Purification des protoplastes. . .	51
3.1. Prépuration. . .	51
3.2. Purification finale. . .	54
4. Culture de protoplastes. . .	56
4.1. Effet de la densité des protoplastes mis en culture. . .	56
4.2. Effet du sucre et du pH du milieu de culture. . .	57
4.3. Effet des hormones. . .	58
4.4. Effet de la concentration du nitrate d'ammonium (NH_4NO_3). . .	58
conclusion générale . . .	61
Références bibliographiques . . .	64
Annexes. . .	73
Annexe 1. Tableau de l'ANOVA de l'effet des balances hormonales sur la surface moyenne des cals issues des feuilles et des cals de <i>D. stramonium</i> au 65 ème jour de culture. . .	73
Annexe 2. Test 95% de Newman et Keuls. . .	73
Annexe 3. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la nature de la cellulase sur le nombre moyen de protoplastes totaux et viables issues des feuilles et des cals. . .	74
Annexe 4. Test 95% de Newman & Keuls. . .	74
Annexe 5. Tableau de l'ANOVA de l'effet des concentrations de mannitol sur l'isolement des protoplastes. . .	76
Annexe 6. Test 95% de Newman & Keuls. . .	76

Annexe 7. Tableau de l'ANOVA de l'effet des concentrations de la cellulase sur l'isolement des protoplastes. . .	77
Annexe 8. Test 95% de Newman & Keuls. . .	78
Annexe 9. Tableau de l'ANOVA de l'effet des Concentrations de la macérozyme sur l'isolement des protoplastes. . .	79
Annexe 10. Test 95% de Newman & Keuls. . .	79
Annexe 11. Tableau de l'ANOVA de l'effet du pH de la solution de macération sur l'isolement des protoplastes. . .	80
Annexe 12. Test 95% de Newman & Keuls. . .	81
Annexe 13. Tableau de l'ANOVA de l'effet des des prétraitements sur l'isolement des protoplastes. . .	81
Annexe 14. Test 95% de Newman & Keuls. . .	81
Annexe 15. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la nature du tissu sur l'isolement des protoplastes. . .	82
Annexe 16. Test 95% de Newman & Keuls. . .	82
Annexe 17. Tableau de l'ANOVA de l'effet de l'âge des feuilles sur l'isolement des protoplastes. . .	83
Annexe 18. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la vitesse et du temps centrifugation sur la purification des protoplastes. . .	83
Annexe 19. Test 95% de Newman & Keuls. . .	84
Annexe 20. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la concentration de saccharose sur la purification des protoplastes. . .	85
Annexe 21. Test 95% de Newman & Keuls. . .	85
Annexe 22. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la densité des protoplastes au 12 ^{eme} jour de culture. . .	85
Annexe 23. Tableau de l'ANOVA de l'effet du sucre et du pH du milieu de culture au 12 ^{eme} jour de culture. . .	86
Annexe 24. Test 95% de Newman & Keuls. . .	86
Annexe 25. Tableau de l'ANOVA de l'effet Effet des hormones au 12 ^{eme} jour de culture. . .	87
Annexe 26. Test 95% de Newman & Keuls. . .	87
Annexe 27. Tableau de l'ANOVA de l'effet Effet des hormones au 12 ^{eme} jour de culture. . .	88
Annexe 28. Test 95% de Newman & Keuls. . .	88
Annexe 29. Composition du milieu Murashige et Skoog (1962). . .	88

Dédicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices. A mon cher mari pour son soutien et ses encouragements. A ma chère fille Selma. A toutes mes sœurs. A toute ma belle famille. A toutes mes amies. Je dédie ce modeste travail.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements et reconnaissances iront à ma Directrice de thèse Madame Khelifi M, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), pour son encadrement, ses orientations et ses encouragements tout au long de ce travail.

Mes remerciements iront également à Monsieur Bellatrache M, professeur à l'ENSA, pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance.

Je tiens à remercier également Monsieur Khelifi L. professeur à l'ENSA, pour son coencadrement, ses précieux conseils et encouragements.

Je remercie aussi Monsieur Boudjeniba professeur à l'ENS-Kouba pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Mes remerciements vont également à Mademoiselle Zermane N, Maître de conférence à l'ENSA, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

A Djamila l'ingénieur du laboratoire L-RGB, ainsi qu'à tous les collègues du laboratoire.

A toute personne ayant participé de près ou de loin à la finalisation de ce travail, quelle trouve ici l'expression de mes reconnaissances les plus sincères.

RESUME

L'objectif de ce travail est l'étude des facteurs influençant l'isolement, la purification et la culture de protoplastes à partir de différents tissus de *D. stramonium*. Les meilleurs résultats d'isolement sont ceux obtenus avec les feuilles de vitrosemis âgées de 04 mois découpées et mises dans une solution de macération contenant le milieu MS additionné de 1,5% de cellulase *Trichoderma longibrachiatum*, 0,02% de macerozyme R-10, 0,5 M de mannitol et ajusté au pH 5 ($9,8 \times 10^6$ proto./ g MF dont 92% sont viables). La purification des protoplastes est réalisée sur monocouche 20% de saccharose avec centrifugation à 80% pendant 8 minutes. La culture des protoplastes purifiés est réalisée à une densité de 10^4 proto./ml dans le milieu MS contenant 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose + 0,2 mg/l ANA + 0.5 mg/l BAP + 0.2 mg/l de 2,4-D ajusté au pH 5 et solidifié avec 3,5 g/l d'agarose. Ces conditions de culture permettent d'avoir les meilleurs taux de viabilité (80%) et d'entrée en divisions (3%) des protoplastes de *Datura stramonium* au 12^{ème} jour de culture.

Mots-clefs : Culture de protoplastes, *Datura stramonium*, Isolement de protoplastes, Purification de protoplastes.

SUMMARY

The objective of this work is to study the factors influencing the isolation, purification and culture of protoplasts from different tissues of *D. stramonium*. The best results are those obtained with isolated from leaves vitrosemis (04 months old) cut and placed in a maceration solution containing MS medium supplemented with 1.5% cellulase *Trichoderma longibrachiatum*, 0.02% macerozyme R-10 , 0.5 M mannitol and adjusted to pH 5 (9.8×10^6 proto. / g MF, which 92% are viable). Purification of protoplasts was performed on monolayer with 20% sucrose and centrifuged to 80% for 8 minutes. The culture of purified protoplasts was carried out at a density of 10^4 proto. / ml in MS medium containing 0.18 M mannitol + 0.18 M glucose + 0.14 M sucrose + 0.2 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP + 0.2 mg/l 2,4-D adjusted to pH 5 and solidified with 3.5 g/l of agarose. These culture conditions allow access to the best viability rates (80%) and entry into divisions (3%) of *D. stramonium* protoplasts on the 12th day of culture.

Keywords : Culture of protoplasts, *Datura stramonium*, protoplast isolation, protoplast purification.

ص خ لم

Liste des abréviations

- **ANA** : Acide Naphtalène Acétique.
- **BAP** : 6-Benzylaminopurine.
- **MF** : matière fraîche.
- **MS** : Milieu de culture Murashige et Skoog.
- **Proto. / g MF** : Protoplastes par gramme de matière fraîche.
- **Proto. / ml** : protoplastes par millilitre.
- **PT** : Protoplastes totaux.
- **PTCD** : Protoplastes totaux issus des cals durs.
- **PTCF** : Protoplastes totaux issus des cals friables.
- **PTFA** : Protoplastes totaux issus des feuilles adultes.
- **PTJF** : Protoplastes totaux issus des jeunes feuilles.
- **PV** : protoplastes viables.
- **PED** : protoplastes entrés en divisions
- **2,4-D**:Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

Introduction générale

Le *Datura stramonium* L. est une solanacée médicinale utilisée depuis l'antiquité en médecine humaine et vétérinaire en raison de sa forte teneur en alcaloïdes tropaniques (Verdrager, 1978 ; Doerk *et al.*, 1991 ; Houmani *et al.*, 1994 ; Houmani, 1999; Houmani et Cosson, 2000). Ces derniers sont des molécules organiques azotées possédant une réaction alcaline, d'où leur nom (Guignard *et al.*, 1985 ; Bruneton, 1987). Les alcaloïdes tropaniques, dont les plus importants sont l'hyoscyamine et la scopolamine sont utilisés surtout pour leurs propriétés sédatives et mydriatiques (Herouart *et al.*, 1991).

L'Algérie importe ces substances alors que de nombreuses espèces de solanacées dont le *D. stramonium* poussent à l'état sauvage, et peuvent être valorisées (Houmani, 1999 ; Amdoun *et al.*, 2005). La production industrielle de ces substances par culture en plein champ, ou sous serre, ou par les biotechnologies doit d'abord passer par l'obtention et la sélection de variétés performantes. Ces dernières peuvent être obtenues par les méthodes d'amélioration biotechnologiques à savoir la transgénèse, la mutagenèse, la polyploïdie et l'hybridation somatique (Zrýd, 1988). Les protoplastes de cellules végétales, qui sont des cellules dépourvues de leurs parois pectocellulosiques (Chupeau et Bourgin, 1980), constituent un outil avéré pour ce type de méthodes.

L'optimisation d'un protocole d'obtention de protoplastes viables et capables de régénérer des plantes entières demeure donc une étape décisive. Ainsi ce mémoire a pour objectif :

- Tout d'abord l'obtention du matériel végétal d'où les protoplastes seront isolés, soit à partir des feuilles issues de vitrosemis, soit à partir de cals issus de fragments de feuilles ou d'hypocotyles de vitrosemis.
- Ensuite l'optimisation des facteurs influençant l'isolement et la purification des protoplastes.
- Enfin quelques essais de mise en culture.

Synthèse bibliographique.

1. Le *Datura stramonium* L.

1.1. Généralités sur le *Datura stramonium*.

Le *Datura stramonium* L. (Planche 1) est une espèce appartenant à la famille des Solanacées (Quezel et Santa, 1963) ayant un caryotype $2n = 24$ (Baiza *et al.*, 1999). Plusieurs appellations sont attribuées au *D. stramonium* dont la Stramoine. C'est une espèce annuelle poussant aux bords des routes ou en mauvaises herbes des cultures de solanacées (Houmani *et al.*, 1994). Le *D. stramonium* est une plante annuelle haute d'environ un mètre. Sa tige cylindrique est ramifiée, les feuilles de forme ovale-triangulaire sont alternes aux bords incisés en plusieurs lobes. Les fleurs sont soit blanches (Var. *eu-stramonium*) ou violettes (Var. *tatula*) insérées de manière solitaire au point de départ des branches (Quezel et Santa, 1963). Le calice de la fleur est tubulé surmonté d'une corolle gamopétale à cinq lobes. Le fruit est une capsule à quatre valves, à maturité il s'ouvre pour libérer plusieurs graines noires, rugueuses et réniformes.

L'origine de *D. stramonium* est discutée, certains botanistes tels que Satina et Avery (1956, *in* Houmani *et al.*, 1999) rapportent qu'elle est originaire du Mexique et du Sud-Ouest des Etats Unis d'Amérique.

Cette espèce trouve plusieurs applications en agriculture biologique et en écologie. Dans le domaine de l'agriculture biologique, le *D. stramonium* est utilisé comme moyen de lutte biologique en tant que culture intercalaire, pour lutter contre les nématodes de la tomate. Elle est également utilisée comme engrais vert, en rotation avec des cultures sensibles et comme mulch (Duval, 1991). Selon le même auteur, les extraits des substances nematicides du *D. stramonium* peuvent être appliqués aux racines de la plante susceptible. L'allélopathie de *D. stramonium* peut être utilisée comme moyen pour le désherbage dans le cadre de l'agriculture biologique, car les racines de cette espèce libèrent des alcaloïdes dans le sol qui inhibent toute germination des graines environnantes (Lovett *et al.*, 1989). Dans le domaine écologique, on peut utiliser le *D. stramonium* pour désinfecter les sols et les eaux polluées par les métaux lourds ; ainsi ces derniers sont concentrés sur les parois cellulaires de la plante (Rolard, 2002).

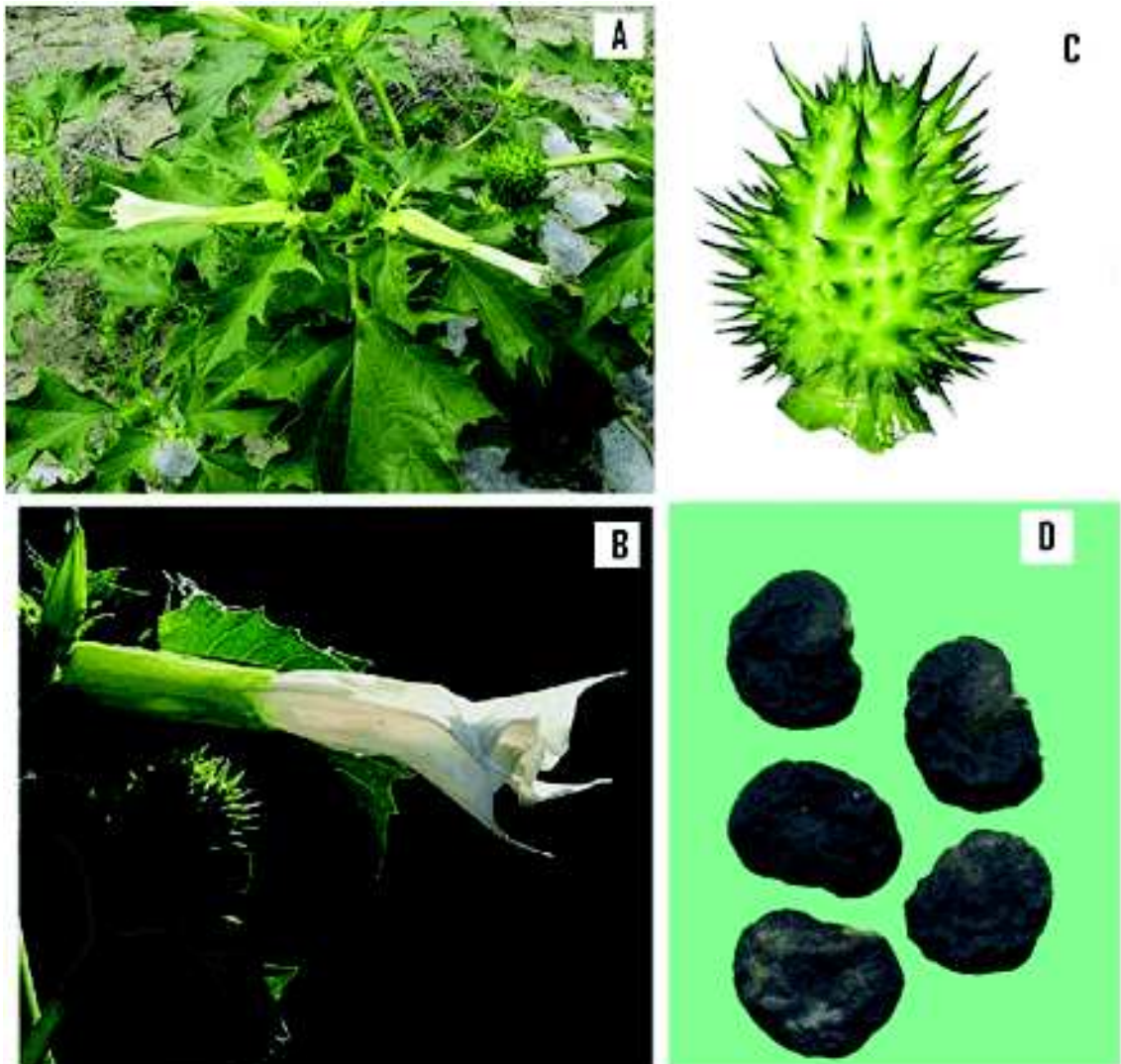


Planche 1. *Datura stramonium* L. :

(A) Aspect global, (B) : la fleur (G : x 1,05), (C) : le fruit (G : x 1,65), (D) : les graines (G : x 7,33).

1.2. Amélioration du contenu alcaloïdique des *Datura* par les biotechnologies.

1.2.1. Mutagenèse.

Des irradiations par les rayons X ont été utilisées par Bouami Guennouni Assimi (1986) dans le but d'obtenir des mutants performants, mais aucune corrélation entre l'irradiation et le contenu alcaloïdique n'a été clairement mise en évidence.

1.2.2. Ploïdie.

Le degré de ploïdie peut influencer les variations de la teneur alcaloïdique. En effet, Mechler et Kohlenbach (1978) ont observé qu'au même stade végétatif les teneurs en alcaloïdes

dans les feuilles des plants haploïdes de *Datura innoxia*, de *Datura meteloides* et de *Datura wrightii* étaient plus faibles que dans les feuilles des plants diploïdes. Il semble que plus le degré de ploïdie augmente, plus la teneur en alcaloïdes tropanique s'accroît. Ainsi, les tétraploïdes montrent un contenu alcaloïdique plus important que les diploïdes (Karnick et Saxena, 1970 in Melcher et Kohlenbach, 1978). Selon Herouart *et al.* (1991), la culture d'anthers de *D. stramonium* a permis d'obtenir spontanément des variants diploïdes avec un contenu alcaloïdique folié élevé, particulièrement en scopolamine.

1.2.3. Transgénèse.

Selon Cosson et Kuntzmann-Cougoul (1979), l'inoculation par *Agrobacterium tumefaciens* (B6 et T37) de plants de *D. metel* et *D. tatula*, a abouti à la formation de tumeurs de Crown-gall, qui ont été isolées et cultivées en 16 heures d'éclairage journalier à 27°C, avec une humidité relative de 50%. Trois à quatre mois après l'infection, les tumeurs extraites des tiges ont présenté un taux d'alcaloïdes 5 à 10 fois supérieur à celui du tissu sain des tiges pour la souche B6, et deux fois plus élevé seulement pour la souche T37. Des plants de *D. stramonium* ont pu être régénérés à partir de tumeurs d'*Agrobacterium tumefaciens* donnant ainsi des variétés théoriquement performantes (Bourgaud *et al.*, 1997).

Par ailleurs, le gène de résistance à la kanamycine a été introduit dans les protoplastes d'une lignée cellulaire de *D. innoxia*, l'étude a montré que ces mutants résistants à la kanamycine pouvaient servir de marqueurs génétiques pour la sélection d'hybrides comportant ce caractère de résistance (Saxena *et al.*, 1990).

Schmidt-Rogge *et al.* (1993) ont montré lors de leurs travaux que la transformation de protoplastes de cals de plantes haploïdes de *D. innoxia* par un plasmide virale entraînait la régénération de 95% des cals des plantes transgéniques et 20% des plantes sont restées haploïdes. D'autres auteurs ont confirmé que plusieurs espèces de solanacées haploïdes (*Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Petunia hybrida*) répondaient bien à ce type de manipulation, car elles représentaient un tissu stable en culture, où d'éventuelles mutations pouvaient être détectées (Vasil, 1984 in Schmidt-Rogge *et al.*, 1993).

1.3. Callogénèse.

Selon Rodrigues *et al.* (1991), des fragments d'hypocotyles de *Datura innoxia* ont présenté les meilleurs pourcentages de callogénèse sur milieu MS contenant 0,25 mg/l de BA et 1 mg/l d'ANA. Pour Demeyer *et al.* (1992), les meilleurs rendements en cals pour la variété *D. stramonium* sont obtenus avec les fragments d'hypocotyles cultivés sur le milieu MS contenant 0,5 mg/l de 2,4-D et 0,1 mg/l de BAP (dans l'obscurité). En outre, Slaoui *et al.* (2006) ont montré que chez *D. stramonium*, les meilleures surfaces moyennes des cals, sont obtenues pour les fragments d'hypocotyles (265 mm²) cultivés sur milieu MS contenant 0,2 mg/l d'ANA, et pour les fragments de feuilles (236 mm²) sur le milieu contenant 0,2 mg/l d'ANA et 1 mg/l de BAP.

2. Les protoplastes de cellules végétales.

Les protoplastes sont des cellules débarrassées de leurs parois pectocellulosiques. Après régénération des parois, ils conservent toutes les potentialités des cellules végétales à se

régénérer et donner des plantes entières (Nassour et Dorion, 2002 ; Davey *et al.*, 2005). Ils sont très utilisés en biotechnologies d'amélioration (mutagenèse, ploïdie et transgénèse) par rapport aux autres types de matériel végétal (organes entiers, cals, cellules végétales). Donc, les protoplastes constituent un outil de choix en biotechnologies (Millam *et al.*, 1995 ; Davey *et al.*, 2005 ; Reddy *et al.*, 2006 ; Ramirez-Benitez *et al.*, 2009).

2.1. Utilisation des protoplastes en biotechnologies végétales.

L'état réellement dissocié et l'absence de la paroi pectocellulosique des protoplastes devraient considérablement augmenter la puissance de certaines techniques classiques afin de régénérer, d'augmenter la variabilité génétique, la production et la sélection de mutants. L'utilisation des protoplastes a offert une nouvelle possibilité d'étendre aux cellules végétales divers procédés « parasexuels » de combinaisons d'information génétiques d'origines diverses tel que l'introduction d'ADN étranger, et la fusion de protoplastes (Chupeau et Bourgin, 1980).

2.1.1. Régénération de plantes.

Plusieurs espèces végétales d'un grand intérêt agronomique étaient récalcitrantes à leur régénération via les protoplastes du parenchyme foliaire surtout les espèces appartenant aux familles des Poacées et des Fabacées (Gamborg *et al.*, 1973 ; Chupeau et Bourgin, 1980). Toutefois, durant ces dernières années, la liste des espèces végétales régénérées à partir de protoplastes ne cesse de se rallonger (Srinivasan et Vasil, 1986 ; Masson *et al.*, 1987 ; Rhodes *et al.*, 1988 ; Makoto et Funatsuki, 1994 ; Sahgal *et al.*, 1994 ; Komai *et al.*, 1996 ; Liu et Zhu, 2000 ; Mizuhiro *et al.*, 2001 ; Davey *et al.*, 2005). Ceci grâce aux milieux de culture optimisant la croissance de la biomasse *in vitro* et les conditions de culture déclenchant la néoformation d'embryons ou de bourgeons à partir des tissus cultivés *in vitro* (Chupeau et Bourgin, 1980). Citons à titre d'exemples les travaux de Von Keller *et al.* (1997) pour le tournesol (Poacées) et Assani *et al.* (2002) pour la banane. Chang et Loesher (1991) sur la pomme de terre et Pan *et al.* (2003) sur les plantes médicinales (*Artemisia judaica* et *Echinops spinosissima*).

2.1. 2. Mutagenèse et sélection *in vitro* de mutants biochimiquement définis.

Chaque protoplaste mis en culture reforme une colonie pluricellulaire. Donc, l'état de cellules « réellement dissocié » n'est qu'un état transitoire. Après un traitement mutagène sur un protoplaste, la descendance de ce dernier comportera à la fois des cellules mutées ou non. Pour éviter ces colonies en chimère, des travaux ont montré la possibilité d'obtenir des mutants biochimiquement définis à partir de protoplastes. Ceci par le traitement des colonies cellulaires issues de protoplastes par un agent mutagène puis le transfert des microcals obtenus sur milieu induisant la régénération. Ainsi, par ce procédé, des plants de tabacs mutants résistants au feu bactérien ont été obtenus par une équipe Américaine en 1973 (Chupeau et Bourgin, 1980). Donc, l'emploi de protoplastes est susceptible de contribuer à faciliter les procédés de production et de sélection de mutants biochimiques (Bourgin, 1978 ; Davey *et al.*, 2005).

2.1.3. Introduction de l'ADN de microorganismes et d'organites étrangers.

En raison de l'absence de leur paroi pectocellulosique, les protoplastes ont la capacité d'absorber de l'ADN sans que celui-ci ne soit trop dégradé (Lurquin, 1977). Les études les plus avancées dans ce domaine sont probablement celles qui font appel à l'ADN

du plasmide de virulence d'*Agrobacterium tumefaciens*. En effet, il est possible de faire absorber à des protoplastes une fraction appropriée d'ADN, en utilisant l'*A. tumefaciens* comme vecteur afin d'introduire dans une cellule végétale n'importe quel gène étranger (Cheng *et al.*, 2004 in Davey *et al.*, 2005). Ainsi, Ellouz *et al.* (1994) ont réussi l'introduction de caractères de résistance à certaines viroses affectant la pomme de terre par le transfert d'ADN dans les protoplastes, puis leur régénération en plantes transgéniques. Aussi, un savoir faire considérable a été acquis par les virologues en utilisant les virus à ADN comme vecteur dans leurs études sur l'infection synchrone de suspensions de protoplastes d'espèces variées par les virus les plus divers (Foxe et Prakash, 1983 ; Schirawski *et al.*, 2000 ; Sarawaneeyaruk *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009 ; Yvon *et al.*, 2009).

2.1.4. Fusion de protoplastes et ses conséquences.

L'intérêt de la fusion des protoplastes, appelée l'hybridation somatique, réside dans la manipulation de l'ADN des organites cytoplasmiques (chloroplastes, mitochondries). Plusieurs travaux comme ceux de De Filippis *et al.* (2000) ont décrit l'intérêt de l'électrofusion (utilisation d'un champ magnétique électrique) comparée à la fusion chimique (polyéthylène glycol).

L'application de la fusion des protoplastes s'est étendue à plusieurs familles d'intérêt agronomique telles que les Poacées (Evans *et al.*, 1973 ; Kihara et Funatsuki, 1995 ; Zhou *et al.*, 2001), les solanacées (Collonnier *et al.*, 2001 ; Fock *et al.*, 2001 ; Collonnier *et al.*, 2003 ; Sun *et al.*, 2005) particulièrement le *D. innoxia* (Du *et al.*, 1991), les *Brassica* (Hu *et al.*, 2002 ; Quian *et al.*, 2003) et les *Citrus* (Guo *et al.*, 2002 ; Liu et Deng, 2002 ; Guo *et al.*, 2004).

2.2. Protoplastes chez le *Datura*.

Les études de Scheider *et al.* (1975) et Widholm *et al.* (1978) rapportées par Furner *et al.* (1978) ont montré que des tissus de plants haploïdes de *D. innoxia* (cals friables, suspensions cellulaires) offraient un modèle pour les manipulations génétiques et somatiques. Les protoplastes des suspensions cellulaires ont été utilisés pour les études de caryologie parce que le degré de ploïdie restait préservé dans ces tissus ainsi que dans les protoplastes qui en dérivent.

Les conditions d'isolement et de culture de protoplastes ont été également étudiées par ces chercheurs, les protoplastes ont été cultivés sur le milieu B5 additionné de 0,3 M de mannitol à une densité variant entre 2×10^{-5} et 5×10^{-5} . Ces protoplastes ont commencé à se diviser après 24 heures et au bout de deux divisions (5 jours) une importante fréquence de formation de colonies cellulaires a été observée ainsi qu'un début d'organogenèse après deux semaines de transfert des colonies cellulaires sur un milieu de régénération (B5 modifié), où une différenciation de tiges à partir de ces cals a été observée.

3. Les facteurs influençant l'isolement des protoplastes.

3.1. Nature et concentration des enzymes.

L'obtention de protoplastes nécessite l'élimination de la paroi pectocellulosique tout en préservant l'intégrité de la cellule ; ceci n'est atteint qu'en optimisant le choix des enzymes (Liu et Zhu, 2000 ; Kamoun-Mehri, 2001), et leurs concentrations (Liu et Zhu, 2000).

3.1.1. Nature des enzymes.

La découverte et la commercialisation d'enzymes spécifiques digérant les parois cellulaires ont entraîné le développement des méthodes enzymatiques qui, peu à peu ont supplanté les méthodes mécaniques (Takebe *et al.*, 1968).

Plusieurs chercheurs ont examiné l'activité enzymatique du suc digestif d'escargot sur les parois des fibres de tabac. Il a été démontré que le suc est un mélange de plus de trente enzymes différentes (Holden et Tracey, 1950 ; Anderson et Millbank, 1966 *in* Harada, 1972). Ainsi, ce suc a été utilisé avec succès pour l'isolement des protoplastes (Robinson et Deacon, 2001).

Deux catégories d'enzymes existent : les cellulases et les pectinases. Les cellulases provoquent la digestion du matériel pariétal cellulosique, elles sont le plus souvent extraites des champignons tel que *Myrothercium verrucacia* et *Trichoderma viride*. Les pectinases extraites de *Rhizopus* (ou macerases ou macérozymes) provoquent la libération des cellules en digérant les composés pectiques de la lamelle moyenne. L'efficacité de ces enzymes est variable selon leur provenance (Eriksson, 1986).

Selon Kanai et Edwards (1973) et Okuno et Furusawa (1977), les protoplastes ont pu être isolés à partir des feuilles de monocotylédones en utilisant des cellulases extraites d'*Aspergillus japonicus*.

La pureté des enzymes représente un facteur important à prendre en compte, car il influe sur l'isolement, la viabilité, la capacité à synthétiser une paroi cellulaire et l'entrée en divisions des protoplastes (Ishii et Mogi, 1983 ; Liu et Zhu, 2000).

3.1.2. Concentration enzymatique.

Les concentrations d'enzymes utilisées dépendent de l'âge (Davey *et al.*, 2005) et de la nature du tissu (Benbadis et Bauman, 1973 ; Kamoun-Mehri, 2001). En effet, les jeunes tissus et explants, extrémités des racines (Xu *et al.*, 1982) ou d'hypocotyles (Glimelius, 1984) nécessitent de basses concentrations d'enzymes et une petite durée de traitement comparés aux larges feuilles des plantes matures (Sinha *et al.*, 2003 *in* Davey *et al.*, 2005).

La concentration des enzymes est étroitement liée au temps d'incubation (Liu et Zhu, 2000 ; Liqing *et al.*, 2005). En effet, les basses concentrations d'enzymes se sont accompagnées de longues durées de traitements que certaines cellules supportaient alors que d'autres ne toléraient pas. Certains auteurs ont recommandé d'ajuster les concentrations des enzymes afin d'optimiser le rendement et la viabilité des protoplastes (Kamoun-Mehri, 2001).

Les conditions favorables à l'isolement de protoplastes des plantes à alcaloïdes cultivées *in vitro* ont été recherchées par Yamada et Nakaminami (1973) entre autre le tabac (*Nicotiana tabacum*) et le *D. tatula*. Les résultats ont montré que les meilleures conditions d'isolement des protoplastes à partir d'anthers de *D. tatula* ont été les mêmes que celles du tabac (parenchyme folié) en utilisant 5% de cellulase *Trichoderma viride* et 0,1% de macérozyme *Rhizopus* sp. Cependant, la B-1,3 glucanase qui a été très efficace pour

l'isolement des protoplastes de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) n'a dégradé la paroi pectocellulosique d'aucune de ces plantes.

Saxena et King (1985), ont isolé des protoplastes de *D. innoxia* à partir de suspensions cellulaires dans une solution enzymatique composée de 1% de cellulase Onozuka RS, 0,5% de cellulase Onozuka R-10 et 0,5% de macérozyme R-10.

Chez les solanacées entre autre la pomme de terre et le tabac la cellulase a été généralement utilisée à la concentration de 1% à 1,5% et la macérozyme entre 0,01% à 0,2% (Kikuta *et al.*, 1983 ; Ellouze *et al.*, 1994).

3.1.3. Action séquentielle et simultanée.

L'action simultanée consiste à soumettre les tissus à l'action des deux enzymes en même temps (Power et Coking, 1970). Dans certains cas on peut dissocier les deux types d'enzymes et effectuer un traitement dit « séquentiel » qui consiste à libérer les cellules en traitant les tissus par la macerase, puis à soumettre les cellules isolées aux effets de la cellulase pour permettre la libération des protoplastes (Takebe *et al.*, 1968 ; Nagata et Takebe, 1970).

L'action simultanée des deux enzymes (cellulase et macerase) a donné des rendements élevés en protoplastes à partir des tissus de feuilles de tabac (Eriksson, 1986). En effet un rendement important en protoplastes provenant de tissus âgés de tige de *Nicotiana glutinosa* a pu être atteint à partir d'une solution enzymatique composée de macérozyme 2% et 5% de cellulase (Gigot *et al.*, 1972).

Kamoun-Mehri (2001) a démontré que chez *Prunus cerasus*, la digestion des tissus du mesophylle foliaire nécessitait l'action simultanée de la cellulase Onozuka RS et pectolyase Y-23, tandis que les protoplastes de cals du même matériel végétal ont pu être isolés avec une préparation de cellulase RS et de macérozyme R-10.

Un mélange d'enzymes dégradant les parois pectocellulosiques est nécessaire pour l'obtention de protoplastes viables, mais l'action de ces enzymes cellulosiques et pectiques dépend de la structure de la paroi et est donc tributaire du tissu source (Assani *et al.*, 2001) et du temps d'incubation (Park et Han, 1986 ; Liu et Zhu, 2000). D'où l'importance des conditions de culture des tissus d'une part, et de la pureté des enzymes utilisées d'autre part (Kamoun-Mehri, 2001).

D'après Ishii et Mogi (1983), la constitution de la paroi cellulaire chez les monocotylédones est différente de celle des dicotylédones. A cet effet la combinaison des pectinases et des cellulases sont essentielles à la dégradation de la paroi chez les dicotylédones. Chez les monocotylédones, seules les cellulases extraites d'*Aspergillus japonicus* sont suffisantes pour isoler les protoplastes à partir du mesophylle foliaire (Geballe et Galston, 1982 in Ishii, 1989).

3.2. Concentration de l'agent plasmolysant.

L'agent plasmolysant provoque des changements de structure du plasmalemme, il ne doit pas être toxique et le moins possible métabolisable (Zryd, 1988). Les agents plasmolysants couramment utilisés sont les oses-alcool : mannitol et sorbitol. Leurs concentrations dépendent généralement de l'âge du tissu (Gamborg et Mailler, 1973 ; Smith *et al.*, 1984). Une concentration supérieure à 0,6 M sur le tabac a entraîné un retard de différenciation cellulaire et une réduction du taux de la prolifération (Meyer et Abel., 1975). Le parenchyme

foliaire de certaines solanacées (pomme de terre, tabac, *D. innoxia*) a commencé à plasmolyser à 0,5 M de mannitol (Furner *et al.*, 1978 ; Chupeau et Bourgin, 1980 ; Smith *et al.*, 1984 ; Saxena et King, 1985; Ellouz *et al.*, 1994).

3.3. Temps d'agitation.

Le temps d'agitation reste un facteur déterminant du rendement en protoplastes (Uchimiya et Murashige, 1974 ; Park et Han, 1986 ; Chabane *et al.*, 2007). En effet chez les plantes médicinales, les protoplastes de cals de *Echinacea augustifolia* ont nécessité huit heures d'agitation à 50 rpm pour atteindre un rendement de 5×10^5 proto./g MF (Liqing *et al.*, 2005). Des rendements maximums en protoplastes viables variant de 70% -75% ont été obtenus après trois heures d'agitation à 100 rpm pour le tabac (*Nicotiana tabacum*), le *D. tatula* (Yamada et Nakaminami, 1973 ; Uchimiya et Murashige, 1974 ; Saxena et King, 1985), et pour la pomme de terre (Kikuta *et al.*, 1983).

3.4. PH de la solution de macération.

Le pH de la solution de macération affecte l'activité enzymatique et donc le rendement en protoplastes (Hohe et Reski, 2002 ; Sinha *et al.*, 2003 ; Chabane *et al.*, 2007). Une étude menée par Park et Han (1986) sur les conditions optimales d'isolement et de viabilité des protoplastes du mesophylle de l'hybride *Populus alba* x *P. glandulosa* a montré que le pH optimal a été de 5,6 , avec un rendement de $2,75 \times 10^6$ proto./g MF avec plus de 93% de protoplastes viables. Pour certaines solanacées (tabac, *Datura*) le pH optimum de la solution de macération a été situé entre 4,7 et 5,8 , les valeurs inférieures ou dépassant cette marge ont été responsables de la diminution des rendements en protoplastes (Uchimiya et Murashige, 1974 ; Saxena et King, 1985).

3.5. Âge et nature du tissu.

L'âge du tissu est un facteur déterminant du rendement et de la viabilité des protoplastes (Shahin, 1985 ; Buiteveld et Creemers-Molenaar, 1994 ; Assani *et al.*, 2002), Celui-ci influence la complexité de la structure de la paroi cellulaire (Eriksson, 1986), la capacité des protoplastes à exprimer leur totipotence (Davey *et al.*, 2005), ainsi que leur développement en plantes fertiles. Ainsi les rendements diminuaient chez les tissus âgés (Liu et Zhu, 2000 ; Nassour et Dorion, 2002). En effet, un tissu âgé avait une faible capacité de totipotence (Davey *et al.*, 2005) ainsi qu'un faible développement. Lorsque la plante du tabac dépassait 20 jours, il était difficile de retirer l'épiderme (Shaskolsayae *et al.*, 1972).

Des tissus de différentes natures peuvent être utilisés pour l'isolement des protoplastes. En effet, ces derniers ont pu être isolés à partir de feuilles, de pétales, de pétioles, de coléoptiles, de nodules, de racines, et de cals. Chez le palmier à l'huile (*Elæis guineensis* J.) les jeunes feuilles ont donné un rendement bas en protoplastes , par contre celui des rachis était meilleur (Vouyouklis, 1981). Chez les jeunes fragments d'épicotyles et d'hypocotyles de *Vigna unguiculata*, les divisions de protoplastes ont été plus rapides que ceux du mesophylle (Roy et De, 1983). Certains auteurs ont recommandé les plants issus de l'*in vitro* comme matériel de choix pour l'obtention de protoplastes (Ellouz *et al.*, 1994). En outre, les suspensions cellulaires restent le matériel préféré pour l'isolement de protoplastes notamment chez le riz (Tang *et al.*, 2001 in Davey *et al.*, 2005) et le *D. innoxia* (Schieder,

1976 ; Mii *et al.*, 1985 ; Saxena et King, 1985 ; Elavumoottili *et al.*, 1988 ; Ando *et al.*, 1989 ; Schmidt-Rogge *et al.*, 1993). Ceci grâce à leur totipotence (Assani *et al.*, 2002) et parce qu'elles représentent déjà un matériel de départ sain et dissocié (Furner *et al.*, 1978 ; Davey *et al.*, 2005).

4. Les facteurs influençant la purification des protoplastes.

4.1. Nombre de tours et temps de centrifugation.

La purification permet de séparer à la fin de l'incubation les protoplastes intacts des débris cellulaires, et le principe de base de la purification des protoplastes par centrifugation repose sur le fait que leur comportement diffère selon leur densité. Les protoplastes fortement vacuolisés sont légers et ont tendance à flotter tandis que les plus denses sédimentent (Zrýd, 1988).

Les protoplastes du parenchyme foliaire (pomme de terre, tabac) ont sédimenté dans un milieu à 8% de mannitol. Ce processus a pu être accéléré par une faible vitesse de centrifugation inférieure à 100 x g (Kikuta *et al.*, 1983 ; Eriksson, 1986). Cette dernière durant 7 à 10 min a donné une bande superficielle de protoplastes contenant très peu de débris.

Chez certaines plantes médicinales (*Artemisia Judaica* L. et *Echinops spinosissimus* Turra.), à une centrifugation de 120 x g /min, les protoplastes viables ont formé une bande à l'interphase entre le mannitol et le saccharose d'où ils ont été récupérés pour être mis en culture (Pan *et al.*, 2003). Chez le *D. innoxia* le même résultat a été obtenu avec 120 x g pendant cinq minutes d'agitation (Saxena et King, 1985 ; Saxena *et al.*, 1990).

4.2. Concentration du saccharose.

La concentration du saccharose influence de manière significative la purification des protoplastes. La plupart des protoplastes vacuolés flottent souvent dans une solution de saccharose à une concentration de 15-20% (Eriksson, 1986). Pour le tabac et le *D. innoxia*, les protoplastes flottent entre 20-22% (Evans *et al.*, 1973 ; Saxena et King, 1985 ; Saxena *et al.*, 1990).

L'effet de différentes concentrations de saccharose sur la densité des protoplastes viables purifiés a été étudié par Park et Han (1986) sur l'hybride *Populus albas x Populus glandulosa*, les résultats ont montré que parmi les concentrations : 0,4 M (13,7%) à 0,8 M (27,4%), l'optimum s'est situé à la concentration de 0,6 M (20,5%) de saccharose. Cette dernière permet l'obtention de $14,1 \times 10^5$ protoplastes avec 96,2 % de protoplastes viables et 2,8 % de débris.

5. Les facteurs influençant la culture des protoplastes et la régénération.

La culture des protoplastes est semblable à celle des cellules végétales. La reformation de la paroi cellulaire commence dès que les protoplastes ne sont plus en contact avec la cellulase (Davey *et al.*, 2005). C'est après la première division cellulaire des protoplastes que la paroi retrouve sa structure normale. Les cellules régénérées ne sont transférées sur un milieu sans agent plasmolysant qu'après deux ou trois semaines de culture. Les protoplastes peuvent être cultivés sur milieu liquide ou semi-solide (Adams et Townsend, 1983 ; Eriksson, 1986). Les protoplastes mis en culture dans un milieu gélosé forment des colonies au bout de quelques semaines, c'est à partir de ces colonies qu'on a pu régénérer des plants entiers (Chupeau et Bourgin, 1980).

Par ailleurs, la culture des protoplastes est influencée par plusieurs facteurs :

5.1. Densité de semis.

Les protoplastes ont été cultivés à des densités variables selon l'espèce et la composition du milieu (Buiteveld et Creemers-Molenaar, 1994 ; Yang et Laliberté, 1996 ; Von Keller *et al.*, 1997 ; Schween *et al.*, 2003 ; Davey *et al.*, 2005). Chez le tabac, le *D. innoxia* et certaines plantes médicinales, il était nécessaire de cultiver les protoplastes à des densités élevées (5×10^4 à 10^5 protoplastes par millilitre de milieu de culture) afin d'atteindre des rendements compris entre 50% et 90% (Chupeau et Bourgin, 1980 ; Saxena et King, 1985 ; Sahgal *et al.*, 1994 ; Pan *et al.*, 2003 ; Sun *et al.*, 2005).

Galbraith *et al.* (1984) ont cultivé des protoplastes de tabac à des densités de 4×10^4 à 4×10^5 . Environ 70% des protoplastes cultivés à des densités allant de 1 à 4×10^4 sont restés viables et ont synthétisé une nouvelle paroi après 48 heures et 65% des cellules sont rentrées en divisions après 7 jours. Les protoplastes cultivés à la densité de 10^5 étaient morts après 24 heures.

5.2. Composition du milieu de culture

5.2.1. Concentration du nitrate d'ammonium.

Meyer et Abel (1975) ont testé deux milieux de culture différents sur les protoplastes du tabac, le premier sans NH_4^+ et le deuxième en est pourvu. Dans le milieu sans NH_4^+ et contenant 1 g/l de saccharose, les protoplastes ont reformé une pseudo paroi et se sont divisés 2 à 3 fois, alors que dans le milieu avec NH_4 et 30 g/l de saccharose, les cellules ont reformé une paroi rigide et se sont divisées.

Eriksson (1986) rapporte que le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) est favorable pour la régénération de la paroi cellulaire des protoplastes de certaines espèces comme *Solanum nigrum* (Nehls, 1978 in Eriksson, 1986). Cependant, il peut être parfois défavorable pour d'autres espèces comme *Solanum tuberosum* (Shepard *et al.*, 1979 in Eriksson, 1986).

5.2.2. Concentration des sucres.

La nature et la concentration des sucres sont un facteur critique pour l'initiation des divisions cellulaires (Nagy et Maliga, 1976).

Rangil et Gordon (1986, *in* Khelifi et Favre, 1995) ont signalé que la combinaison d'un sucre métabolisable tel que le glucose et d'un agent osmotique comme le mannitol constituait une balance glucidique satisfaisante pour les exigences des protoplastes.

Le glucose sert d'osmoticum et de source de carbone, alors que le saccharose, utilisé seul génère un niveau élevé de toxicité dans le milieu (Eriksson, 1986, Medea (1983, *in* Kouider *et al.*, 1984)) ont rapporté que 60 g/l de glucose dans le milieu de culture de protoplastes de *Malus domestica* ont favorisé la division d'un nombre élevé de cellules. Pour la pomme de terre, les divisions ont commencé à partir du quatrième jour dans un milieu contenant 15 g/l de glucose et 5 g/l d'inositol (Eriksson, 1986). Pour les protoplastes du mesophylle de *Nicotiana glauca*, il a été recommandé d'utiliser des concentrations basses de saccharose (9,52 g/l) (Sahgal *et al.*, 1994).

5.2.3. Concentration des hormones.

Certains auteurs ont affirmé que la combinaison des auxines et des cytokinines était nécessaire à la reformation de la paroi et l'induction des premières divisions chez la tomate, le tabac et le *D. innoxia* (Nagata et Takebe, 1970; Saxena et King, 1985; Shahin, 1985).

Pour une meilleure régénération de la paroi, le milieu doit être riche en substances de croissances. Les meilleurs résultats sur le tabac ont été obtenus avec 3 mg/l d'ANA et 1 mg/l de BAP (Nagata et Takebe, 1970 ; Chupeau et Bourgin, 1980 ; Sahgal *et al.*, 1994). Pour le *D. innoxia*, Mii *et al.* (1985) ont utilisé de 1 à 2,5 mg/l de 2,4-D et de 0,01 à 1 mg/l de BAP. Pour la même espèce, Saxena et King (1985) ont recommandé la combinaison de 1 mg/l de 2,4-D, 0,5 mg/l d'ANA et 0,4 mg/l de BAP.

Chez la tomate (Tabaeizadeh *et al.*, 1984 ; Shahin, 1985) et la pomme de terre (Nagata et Takebe, 1970 ; Nagy et Maliga., 1976), ce sont les concentrations d'ANA entre 0,2-1 mg/l et de BAP entre 0,2-0,5 mg/l et de 2,4-D entre 0,5 et 1 mg/l qui ont induit les premières divisions et ont favorisé la formation de microcolonies.

Pan *et al.* (2003) ont rapporté que chez les plantes médicinales, *Artemisia Judaica* L. et *Echinops spinosissimus* Turra., les premières divisions des protoplastes du mesophylle ainsi que la formation de colonies cellulaires réclamaient la présence d'ANA (0,93 mg/l) et de BAP (0,56 mg/l) pour *A. Judaica* et du 2,4-D (1,1 mg/l) et de BAP (0,56 mg/l) pour *E. spinosissimus*.

5.3. PH du milieu de culture.

Les pH compris entre 4,6 et 5,9 ont été recommandés pour les milieux de culture des protoplastes (Uchimiya et Murashige, 1974 ; Eriksson, 1986 ; Sinha *et al.*, 2003).

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire des ressources génétiques et biotechnologie (LGB) du département de phytotechnie de l'ENSA.

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de graines matures d'une population spontanée de *D. stramonium* récoltées en octobre 2003 à l'étage bioclimatique sub humide (Benimessous).

Pour l'obtention de vitrosemis, les graines sont scarifiées avec du papier verre (point 80 mm) selon le protocole adopté par Slaoui *et al.* (2006). Puis elles sont désinfectées à l'éthanol (70%) pendant 30 secondes ; à l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 10 minutes, rincées trois fois à l'eau distillée stérile et enfin séchées sur du papier filtre stérile.

Les graines sont semées dans des tubes contenant chacun 20 ml de milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)(Annexe 29) préalablement stérilisé. Ce milieu contient 20 g/l de saccharose et 7 g/l de gélose (agar-agar).

Les cultures sont mises dans une chambre de culture à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous une photopériode de 16 heures de lumière.

2. Callogénèse

Deux types d'explants : fragments d'hypocotyles et de feuilles, issus de vitrosemis âgés de deux mois sont utilisés pour étudier la callogénèse. Les fragments d'hypocotyles d'environ 0,5 cm de longueur et les fragments de feuilles d'environ 1 cm^2 de surface sont cultivés sur trois milieux de culture MS selon les balances hormonales suivantes utilisées par Saibi (2006) :

- T1 : MS + 0,2 mg/l d'ANA.
- T2 : MS + 0,2 mg/l d'ANA +1 mg/l de BAP.
- T3 : MS + 0,2 mg/l d'ANA +2 mg/l de BAP.

Les explants sont cultivés dans des boîtes de pétri à raison de cinq fragments par explant et par traitement. La callogénèse est réalisée dans l'obscurité totale à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Les paramètres mesurés sont la surface moyenne des cals exprimée en mm^2 (longueur x largeur du rectangle circonscrit à la projection du cal sur le milieu de culture).

3. Facteurs influençant l'isolement des protoplastes à partir des feuilles de vitrosemis et des cals.

Les poids des feuilles et des cals utilisés sont respectivement de 0,5 g pour les feuilles des vitrosemis et 1 g pour les cals.

3.1. Nature de la cellulase et durée de macération : essai préliminaire.

Les feuilles sont prélevées sur des vitrosemis de *D. stramonium* âgés de quatre mois et les cals d'hypocotyles sont âgés de 63 jours.

Selon les travaux sur les solanacées de Kikuta *et al.* (1983) et Ellouze *et al.* (1994), ce sont les concentrations 1,5% et 0,01% pour la cellulase et la macérozyme respectivement qui sont retenues.

Deux types de cellulases sont testées, *Trichoderma longibrachiatum* et *Aspergillus niger* avec une vitesse d'agitation de 100 rpm à $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et pendant une durée de macération de six heures.

La solution de macération contient 10 ml de milieu MS sans saccharose additionnée de 0,6 M de mannitol, 0,01% de macérozyme R-10 (*Rhizopus* sp) et 1,5% de cellulase (*Trichoderma longibrachiatum* ou *Aspergillus niger*) avec un pH de 5 (Kikuta *et al.*, 1983). Les observations sont faites chaque heure afin de dénombrer les protoplastes totaux et viables (1 à 6 heures).

3.2. Concentration de l'agent plasmolysant : le mannitol.

Pour les parties 3.2 ; 3.3 et 3.4 les feuilles utilisées sont prélevées sur des vitrosemis âgés de 1 mois (FJ : feuilles jeunes) et 4 mois (FA : feuilles adultes) ; et les cals friables (CF) et durs (CD) sont âgés de 63 jours.

Du fait que les cellules d'un organe ne réagissent pas de la même façon aux chocs osmotiques, on a testé les concentrations de mannitol de : 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M et 0,8 M.

Les limbes des feuilles de vitrosemis et les cals sont finement coupés et ajoutés dans 10 ml de solution de macération à pH 5 précédemment citée (avec la cellulase *Trichoderma longibrachiatum*), mais avec les différentes concentrations de mannitol. La solution est mise en agitation à 100 rpm pendant trois heures à $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (dans un incubateur).

3.3. Concentration des enzymes

Essai avec la cellulase : Tout en fixant la concentration de la macérozyme à 0,01%, et celle du mannitol à 0,5 M, quatre concentrations de cellulases *Trichoderma longibrachiatum* sont testées : 0,5% - 1% - 1,5% et 2% pour les feuilles et les cals.

Les autres composants de la solution ainsi que les conditions de macération restent les mêmes que précédemment.

Essai avec la macérozyme : quatre concentrations de macérozyme R-10 (*Rhizopus* sp) sont étudiées (0,005% - 0,01% - 0,015% - 0,02%) selon le même protocole utilisé pour

la cellulase (*Trichoderma longibrachiatum*) tout en retenant la meilleure concentration de cette dernière lors du précédent essai sur chaque type de tissu.

Les autres composants de la solution ainsi que les conditions de macération restent les mêmes que précédemment.

3.4. PH de la solution de macération.

Deux pH de la solution de macération : 5 et 5,6 sont étudiés. Les différentes concentrations enzymatiques utilisées (d'après les résultats des parties précédentes) sont :

- 1,5% de cellulase (*T. longibrachiatum*) et 0,02% de macérozyme R-10 pour les feuilles adultes (04 mois)
- 1% de cellulase (*T. longibrachiatum*) et 0,02% de macérozyme R-10 pour les feuilles jeunes (01 mois)
- 1,5% de cellulase (*T. longibrachiatum*) et 0,01% de macérozyme R-10 pour les cals durs.
- 2% de cellulase (*T. longibrachiatum*) et 0,01% de macérozyme R-10 pour les cals friables.

Les autres composants de la solution ainsi que les conditions de macération restent les mêmes que précédemment.

3.5. Découpage ou non du matériel végétal.

Les protoplastes sont isolés à partir de feuilles (âgées de 4 et 1 mois) et des cals (durs et friables âgés de 63 et 21 jours respectivement) découpés ou non découpés.

La solution de macération étant composée du milieu MS à pH 5 et 0,5 M de mannitol. Les concentrations des enzymes ainsi que les conditions de macération restent les mêmes que précédemment (partie 3.4).

3.6. Nature du tissu et âge des feuilles.

Pour la nature du tissu, sont utilisés: des feuilles (découpées) issues de vitrosemis âgés de 04 mois (feuilles adultes) et 1 mois (feuilles jeunes) et des cals durs (découpés) d'hypocotyles (63 jours) ainsi que des cals friables (21 jours).

Pour l'âge des feuilles, sont pris en considération : les feuilles âgées de 4 et un mois.

Les composants de la solution ainsi que les conditions de macération restent les mêmes que précédemment (voire partie 3.4)

4. Etude de quelques facteurs influençant la purification des protoplastes de feuilles de *Datura stramonium*.

Les feuilles âgées de 04 mois découpées sont retenues pour le reste des essais vu la supériorité des rendements en protoplastes totaux et viables obtenus par rapport aux autres types de matériel végétal utilisés.

Aussi la solution de macération retenue est composée du milieu MS ; 0,5 M de mannitol ; 1,5% de cellulase ; 0,02% de macérozyme avec un pH de 5.

La purification des protoplastes de feuilles s'est faite en deux temps : d'abord une prépurification durant laquelle la solution enzymatique est filtrée et débarrassée des gros débris, puis la purification proprement dite sur gradient discontinu ou monocouche de saccharose qui permet la récupération des protoplastes uniquement.

Ces deux opérations se sont déroulées en conditions stériles :

- Stérilisation de la solution de macération : le milieu MS additionné de 0,5 M de mannitol au pH 5 est stérilisé par autoclavage puis, les enzymes sont additionnés par microfiltration, à l'aide du filtre Nalgen 0,22µm, sous hotte.
- Travail réalisé, avec verrerie et matériels stérilisés, sous la hotte à flux laminaire.

4.1. Prépurification.

Durant l'étape de la prépurification, sont étudiés : le nombre de tours et le temps de centrifugation. Trois vitesses de centrifugation sont testées avec une centrifugeuse à rotor conique (120 - 150 et 200 x g) et trois temps (2, 5 et 8 minutes) (Saxena et King, 1985 ; Saxena *et al.*, 1990 ; Pan *et al.*, 2003).

Les protoplastes de feuilles de vitrosemis obtenus après 03 heures de macération selon le protocole précédemment décrit, subissent la prépurification suivante :

- Elimination des gros débris et des fragments de feuilles non encore digérés, par filtration sur un tissu en nylon stérilisé (maille 350 µm).
- Centrifugation du filtrat à différentes vitesses et à différents temps.
- Reprise du culot dans 10 ml de la solution de lavage composée d'un milieu MS additionné de 0,5 M de mannitol et 50 mg/l de CaCl₂, Puis centrifugation de nouveau. Le CaCl₂ sert à stabiliser la membrane des protoplastes (Potrykus *et al.*, 1977 *in* Eriksson , 1986).
- Répétition de l'opération (3) trois fois.
- Reprise du dernier culot dans 10 ml de solution de lavage.

Les protoplastes sont alors prêts pour la purification finale.

4.2. Purification finale

Durant cette étape on a testé trois concentrations de saccharose : 20% - 30% et 40% en gradient discontinu puis sur monocouche.

Sur gradient de saccharose : Deux millilitres de solution contenant les protoplastes prépurifiés sont déposés sur un gradient discontinu de saccharose 20% - 30% - 40% (2 ml pour chaque couche) et centrifugés, avec une centrifugeuse à rotor libre, à 80% durant 8 minutes. Le saccharose étant dilué dans le milieu MS afin d'obtenir la concentration voulue (20, 30 ou 40%).

Sur monocouche de saccharose : La purification des protoplastes sur monocouches de saccharose (20%- 30%- 40%) a été réalisée en essais indépendants selon le protocole suivant : Les 2 ml de solution de protoplastes prépurifiés sont déposés sur la monocouche contenant 2 ml de la solution de saccharose (20% - 30% ou 40%). Le tout est centrifugé (avec une centrifugeuse à rotor libre) à 80% /8 min. Les protoplastes purifiés forment une bande à l'interphase d'où ils sont récupérés à l'aide d'une micropipette pasteur stérile, puis déposés dans une solution de survie de même composition que la solution de lavage.

5. Paramètres mesurés.

Deux paramètres sont considérés : le nombre moyen de protoplastes totaux par gramme de matière fraîche (MF), et le pourcentage de viabilité (nombre de protoplastes viables par rapport au nombre de protoplastes totaux), ce dernier est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \left(\frac{\text{Nombre de protoplastes vivants}}{\text{Nombre de protoplastes totaux}} \right) \times 100$$

Durant l'étape de la purification, le pourcentage de protoplastes récupéré (nombre de protoplastes vivants après purification par rapport au nombre de protoplastes vivants avant purification) est aussi considéré et calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de protoplastes récupérés} = \left(\frac{\text{Nombre de protoplastes vivants après purification}}{\text{Nombre de protoplastes vivants avant purification}} \right) \times 100$$

Les dénombrements des protoplastes sont effectués à l'aide d'une cellule de MALASSEZ.

6. Principe du comptage.

La cellule de MALASSEZ (Figure 1) est un hématimètre qui permet de compter les cellules en suspension dans une solution. Il s'agit d'une lame en verre sur laquelle un quadrillage est gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés.

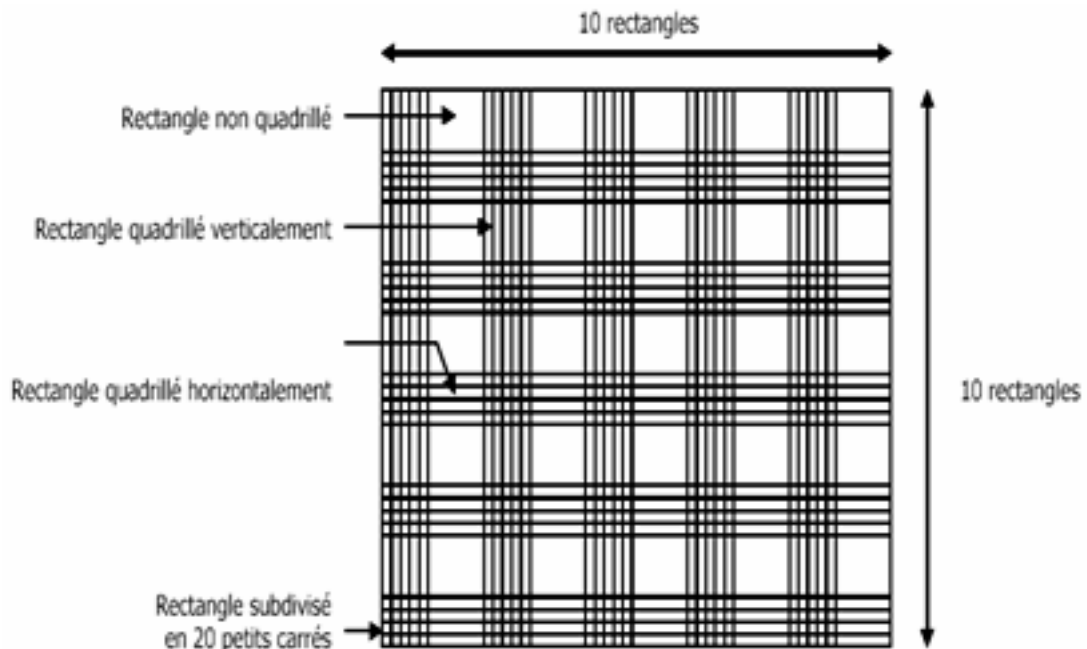


Figure 1. Schéma de la partie graduée de la cellule de malassez.

La totalité de la partie graduée est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont :

- Longueur = 0,25 mm.
- Largeur = 0,20 mm.
- Profondeur = 0,20 mm.

Le volume total de la cellule est de 1 mm^3 , le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales de 0,25 mm de long et de 10 bandes horizontales de 0,20 mm de large, formant ainsi 100 rectangles. On compte les protoplastes dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule (c'est-à-dire 10 répétitions). On ne prend en compte que les protoplastes placés à l'intérieur du rectangle. On a comptabilisé le nombre de protoplastes dans 10 rectangles quadrillés dont le volume d'un seul est de $0,01 \mu\text{l}$. En comptant 10 rectangles, il suffit de multiplier le résultat par 10^5 pour avoir le nombre moyen de protoplastes par ml, et comme le volume utilisé durant l'essai était de 10 ml, on multiplie ce résultat par 10. Par exemple si 30 protoplastes sont observables sur 10 rectangles, on obtient un total de 3×10^6 protoplastes. Comme le poids utilisé pour les feuilles était de 0,5 g il suffit de le rapporter au gramme, donc 6×10^6 proto./g MF.

7. Test de viabilité

Afin d'évaluer l'état des protoplastes à chaque étape du travail on a utilisé le bleu de méthylène à une concentration de 0.01%. Ce dernier indique l'intégrité du plasmalemme (Hooley et McCarthy, 1980 *in* Slaoui, 1990). En effet si les protoplastes sont vivants, il

est réduit et vire du bleu au jaune brillant, sinon si les protoplastes sont non viables, le cytoplasme s'imprègne de la coloration bleu.

8. Essais de culture des protoplastes de feuilles de *Datura stramonium*

Les protoplastes mis en culture proviennent de feuilles de vitrosemis de *D. stramonium* âgés de 04 mois préalablement purifiés sur monocouche de saccharose 20%.

Le milieu de base est composé du milieu MS semi solide, gélifié avec 3,5 g d'agarose + 50 mg/l de CaCl₂ et 292 mg/l de glutamine. Différentes combinaisons hormonales associant ANA, BAP et 2,4-D sont étudiées (Nagata et Takebe, 1970 ; Nagy et Maliga, 1976 ; Tabaeizadeh *et al.*, 1984 ; Shahin, 1985).

Aussi, différentes combinaisons de mannitol, de glucose et de saccharose sont testées. Cette association de sucres a été recommandée pour la culture des protoplastes (Rangil et Gordon, 1986 *in* Khelifi et Favre, 1995), car elle est composée d'un sucre métabolisable le glucose, et d'un agent osmotique le mannitol, et le saccharose comme source de carbone.

Le pH du milieu est ajusté au pH voulu, puis autoclavé à 120°C pendant 20 min. Une fois légèrement tiédi il est coulé dans des boîtes de pétri stérile à raison de 10 ml de milieu par boîte. La solution de protoplastes préalablement diluée avec différentes densités est délicatement prélevée à l'aide d'une pipette pasteur, et ensemencée sur le milieu. Par la suite, les boîtes sont délicatement remuées afin d'homogénéiser et d'imprégner les protoplastes avec le milieu.

Elles sont par la suite scellées avec du papier film et mises dans l'obscurité à 25 ± 2°C. Des observations sont effectuées tous les 4 jours à l'aide d'un microscope inversé.

Après 15 jours de mise en culture, du milieu liquide frais est ajouté avec quelques gouttes de bleu de méthylène afin d'évaluer l'état et la survie des protoplastes. Dans ce nouveau milieu, la combinaison mannitol + glucose et saccharose est remplacée par du saccharose à 0,14 M.

8.1. Etude de quelques facteurs influençant l'entrée en divisions.

L'initiation des premières divisions ainsi que la formation des microcals sont tributaires de plusieurs facteurs dont les plus influents ; la densité de semis et la composition du milieu de culture (Nagy et Maliga, 1976 ; Chupeau et Bourgin, 1980 ; Buiteveld et Creemers-Molenaar, 1994 ; Davey *et al.*, 2005). Durant notre travail, quelques essais de cultures des protoplastes de feuilles de vitrosemis sont réalisés tout en essayant de faire varier quelques facteurs.

8.1.1. Densité de culture

Deux densités de semis sont testées lors de notre travail : la densité 10⁴ et 10⁵ protoplastes/ml. Les protoplastes sont cultivés dans un milieu composé de : milieu de base + 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose + 0,2 mg/l d'ANA + 0,5 mg/l de BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D. Le pH du milieu est ajusté à 5.

Les protoplastes sont mis en culture selon le protocole cité précédemment (voir partie 7).

8.1. 2. Composition et pH du milieu de culture.

a. Concentration des sucres et pH.

Dans un même essai deux pH : 5 et 5,9 sur trois milieux de balances glucidiques différentes sont testés :

- Milieu M0 (témoin) : milieu de base + 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose.
- Milieu M1 : milieu de base + 0,18 M de mannitol.
- Milieu M2 : milieu de base + 0,35 M de mannitol + 0,075 M de glucose + 0,075 M de saccharose.

Les trois milieux contiennent 0,2 mg/l d'ANA + 0,5 mg/l de BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D (Nagata et Takebe, 1970).

Les protoplastes sont cultivés à une densité de 10^4 proto./ml. La mise en culture est réalisée selon le protocole cité précédemment.

b. Concentration des hormones.

Trois milieux différant par leur balance hormonale sont testés :

- Milieu H0 (témoin) : milieu de base + 0,2 mg/l d'ANA + 0,5 mg/l de BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D.
- Milieu H1 : milieu de base + 0,5 mg/l de BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D.
- Milieu H2 : milieu de base + 0,2 mg/l d'ANA + 0,2 mg/l de 2,4-D.

Les trois milieux contiennent 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose.

Le pH de la solution est ajusté à 5. Les protoplastes sont mis en culture selon le même protocole cité antérieurement (partie a).

c. Concentration du nitrate d'ammonium (NH_4NO_3)

Trois milieux différant par la concentration de NH_4NO_3 des macroéléments sont utilisés :

- Milieu N0 (témoin) : milieu de base avec la concentration standard de NH_4NO_3 du milieu MS soit 1650 mg/l.
- Milieu N1 : milieu de base avec la concentration de NH_4NO_3 /2 soit 825 mg/l.
- Milieu N2 : milieu de base avec la concentration de NH_4NO_3 /4, soit 412,5 mg/l.

Le pH du milieu est ajusté à 5. La culture des protoplastes a été réalisée selon le même protocole cité précédemment.

Les trois milieux contiennent 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose + 0,2 mg/l d'ANA + 0,5 mg/l de BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D.

Le milieu de base contient le milieu MS + 50 mg/l de $CaCl_2$ + 292 mg/l de glutamine et 3,5 g/l d'agar.

8.2. Paramètres mesurés.

Les paramètres mesurés durant ces essais de mise en culture, sont le pourcentage de viabilité et la fréquence d'entrée en divisions (cellules ayant donné au moins une mitose), exprimée en % du nombre total de protoplastes mis en culture qui exprime l'aptitude à initier une activité mitotique.

9. ANALYSES STATISTIQUES.

L'analyse de la variance (ANOVA) et le test 95% de Newman & Keuls sont utilisés pour les analyses statistiques de nos résultats.

Résultats et discussion

1. Callogénèse

L'effet de trois balances hormonales sur la croissance des cals issus de fragments de feuilles et d'hypocotyles a été étudié :

- T1 : MS + 0,2 mg/l d'ANA.
- T2 : MS + 0,2 mg/l d'ANA +1 mg/l de BAP.
- T3 : MS + 0,2 mg/l d'ANA +2 mg/l de BAP.

La figure 2 A et B montre que la croissance des cals, traduite par l'augmentation de leur surface, s'active à partir du 35^{ème} jour de culture pour les cals sur fragments d'hypocotyles pour les trois traitements, et à partir du 45^{ème} jour pour les cals sur fragments de feuilles pour le traitement T2.

L'analyse de la variance au 65^{ème} jour de culture révèle un effet très hautement significatif des balances hormonales du milieu MS sur la surface moyenne des cals de *D. stramonium* en fonction du type de tissus (feuilles ou hypocotyles) (Annexe 1). Le test 95% de Newman & Keuls (Annexe 2) montre que c'est la combinaison T1-hypocotyle (group a) qui donne les meilleurs résultats avec une surface moyenne de 382,9 mm², suivie par T3-hypocotyle (groupe b : 248,8 mm²), T2-hypocotyle et T2-feuilles (groupe c : 158,9 mm² et 141,3 mm²), et enfin les combinaisons T1-feuilles et T3-feuilles (groupe d : 67,5 mm² et 59,5 mm²).

Les hypocotyles sont donc plus réactifs aux hormones que les feuilles. En effet, les surfaces moyennes les plus importantes enregistrées concernent les cals obtenus sur fragments d'hypocotyles. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Rodrigues *et al.* (1991), Demeyer *et al.* (1992) et Slaoui *et al.* (2006). En effet, les meilleurs résultats obtenus par ces derniers sont enregistrés, après 75 jours de culture, pour les fragments d'hypocotyles (265 mm²) cultivés sur milieu MS contenant seulement 0,2 mg/l d'ANA (=T1), et pour les fragments de feuilles (236 mm²) sur le milieu MS contenant 0,2 mg/l d'ANA et 1 mg/l de BAP (= T2).

Indépendamment de la balance hormonale, on a observé deux types de cals : des cals friables et des cals durs aussi bien sur les fragments de feuilles que sur ceux des hypocotyles (Planche 2).

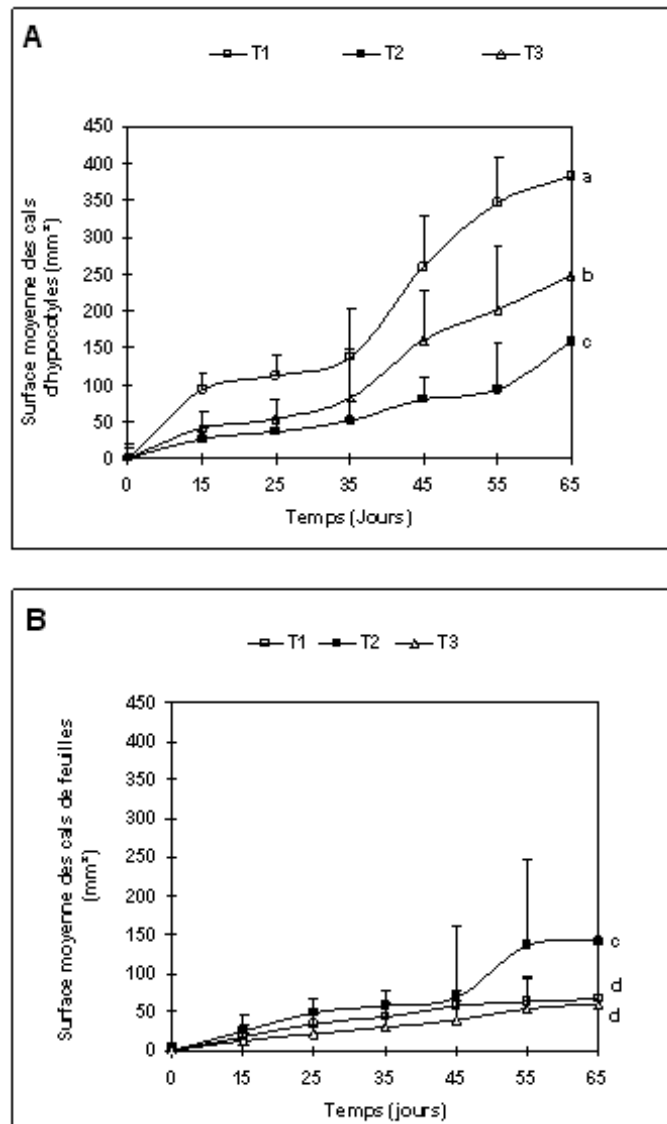


Figure 2. Evolution de la surface moyenne des cals en fonction de la balance hormonale et du temps chez *D. stramonium*.

A : cals d'hypocotyles. **B** : cals de feuilles.

$$[F = 45,8 ; ddl_{48}^5 ; proba. : 0,000***].$$

Planche 2. Callogénèse chez *D. stramonium*. (Après 63 jours de culture).

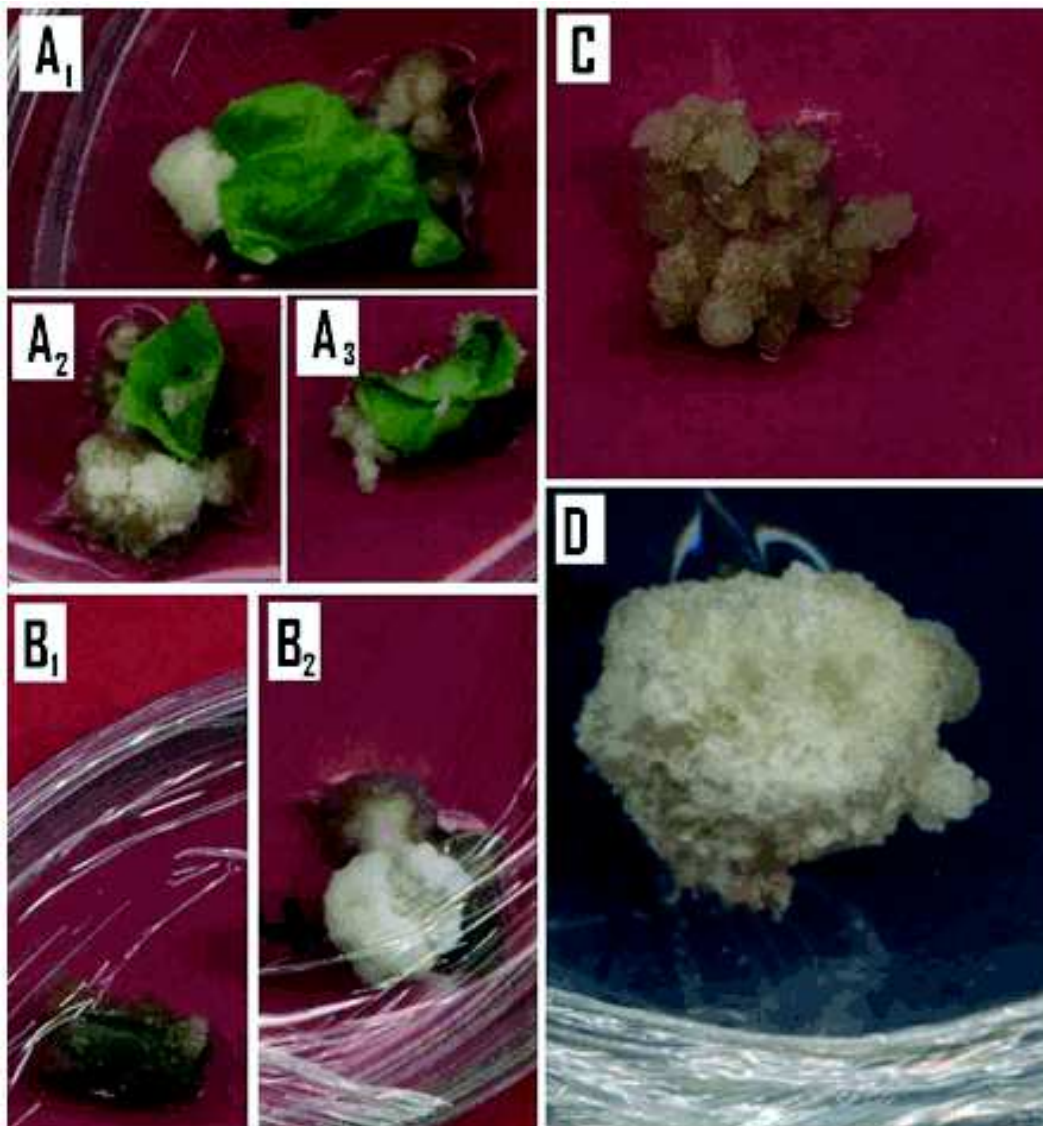


Planche 2. Callogénèse chez *D. stramonium*. (Après 63 jours de culture).

- Cals sur fragments de feuilles de vitrosemis : A1 (G : x 10), A2 (G : x 7), A3 (G : x 4).
- Cals sur fragments d'hypocotyles de vitrosemis : B1 (G : x 5), B2 (G : x 5).
- Cals friables : C (G : x 3).
- Cals durs : D (G : x 2).

2. Isolement des protoplastes.

2.1. Nature de la cellulase et durée de macération : essai préliminaire.

La solution de macération contient 10 ml de milieu MS avec 0,5 M de mannitol, 0,01% de macérozyme, une des deux cellulase et ajusté au pH 5.

La figure 3 I et II montre la supériorité de la cellulase de *Trichoderma longibrachiatum* (1,5%) par rapport à *Aspergillus niger* (1,5%) pour l'isolement des protoplastes. En effet, le nombre moyen en protoplastes est 4 fois plus élevé chez *T. longibrachiatum*. Cette figure révèle que les feuilles sont un matériel végétal très réactif à l'activité enzymatique des cellulases par rapport aux cals.

L'analyse de la variance montre que la nature de la cellulase et la durée de macération ont une influence très hautement significative sur le nombre moyen des protoplastes et leur viabilité (Annexe 3).

Le test 95% de Newman & Keuls révèle que la combinaison *Trichoderma* - 3 à 4 heures de macération (groupe a) donne les meilleurs résultats en terme de viabilité et du nombre moyen des protoplastes chez les feuilles (Annexe 4). En effet, le meilleur nombre moyen en protoplastes est de $7,4 \times 10^6$ proto./g MF avec les feuilles (dont 97% sont viables) alors qu'il est de $2,1 \times 10^6$ proto./g MF (dont 95% sont viables) chez les cals traités avec la même enzyme soit un rapport de 3,5.

La performance de la cellulase de *T. longibrachiatum* est due à l'aptitude à dégrader les liaisons C₁-C₄ qui est caractéristique du groupe *Trichoderma* (Selby et Maitland, 1967).

Le nombre moyen des protoplastes et leur viabilité sont étroitement liés à l'activité spécifique des enzymes (Kamoun-Mehri, 2001). Cette dernière est également en fonction du type de tissus et du temps de macération selon nos résultats. En effet, les protoplastes de feuilles présentent un taux de viabilité de plus de 70% même après 6 heures de macération avec *T. longibrachiatum* et de 0% pour *A. niger*.

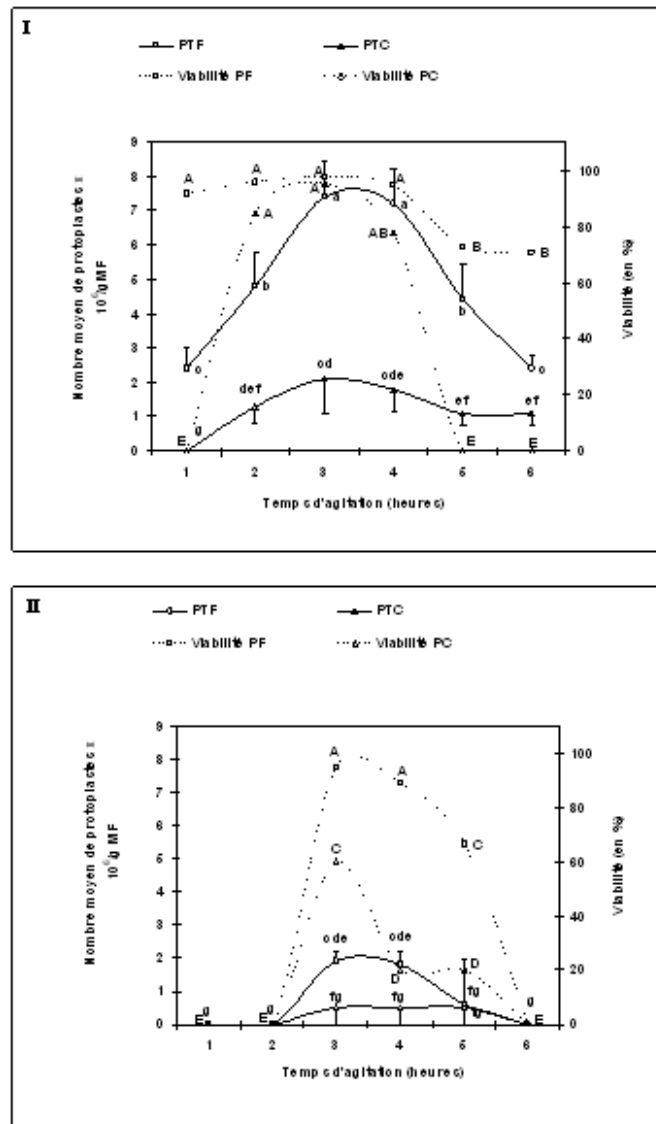


Figure 3. Effet de la nature de la cellulase et du temps d'agitation sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de feuilles et de cal de *D. stramonium*.

I : cellulase de *Trichoderma longibrachiatum* . **II**: cellulase d'*Aspergillus niger*. **PTF**: protoplastes totaux issus des feuilles. **PTC** : protoplastes totaux issus des cals. Protoplastes totaux :

$$[F = 99,3 ; \text{ddl}_{216}^{23} ; \text{proba. : } 0,000 \text{ ***}] ; \text{viabilité} : [F = 138,2 ; \text{ddl}_{216}^{23} ; \text{proba. : } 0,000 \text{ ***}] .$$

Le temps de macération est un facteur déterminant sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes (Uchimiya et Murachige, 1974 ; Park et Han, 1986 ; Chabane *et al.*, 2007). Le meilleur temps de macération pour une viabilité maximale des protoplastes de *D. stramonium* est en générale de 3 heures pour les deux types de tissus. L'agitation permet de séparer les agrégats des tissus mettant ainsi une plus grande surface en contact avec l'enzyme. Les temps en dessous de 3 heures semblent insuffisants, et les temps supérieurs à quatre heures paraissent excessifs (6 heures par exemple), car ils entraînent la destruction des protoplastes.

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par d'autres chercheurs sur plusieurs espèces telles que *Nicotiana tabacum* et *D. innoxia* (Benbadis et Baumann, 1973 ; Yamada et Nakaminami, 1973 ; Uchimiya et Murashige, 1974).

La planche 3 montre l'aspect des protoplastes issus de fragments de feuilles ou de cals selon les deux types de cellulases utilisées.

Ainsi, on a retenu selon cet essai préliminaire la cellulase de *T. longibrachiatum* (1,5%) et une durée de 3 heures de macération pour la suite de l'expérimentation.

2.2. Concentration du mannitol.

En fixant la concentration de la cellulase *T. longibrachiatum* à 1,5% et celle de la macérozyne à 0.01% on a fait varier la concentration du mannitol.

La figure 4 I et II montre que les concentrations en dessous ou au delà de 0,5 M, induisent une diminution du nombre moyen et de la viabilité des protoplastes quelque soit le type de tissus utilisé. On ne note pas une influence importante de la concentration du mannitol entre les cals durs et friables pour les mêmes concentrations du mannitol. Les protoplastes issus de ces deux types de tissus, pourtant de structure différente, semblent avoir un comportement identique vis-à-vis des concentrations du mannitol.

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif des concentrations du mannitol sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes sur l'ensemble des tissus testés (Annexe 5). Le test de Newman & Keuls 95% montre que les feuilles adultes et la concentration 0,5 M donnent statistiquement les meilleurs résultats (Annexe 6). En effet, le nombre moyen de protoplastes est $1,0 \times 10^7$ proto./g MF (groupe a) pour les feuilles adultes (dont 98% sont viables) contre $7,0 \times 10^6$ proto./g MF (dont 86% sont viables) pour les feuilles jeunes (groupe b) soit un rapport de 1,4.

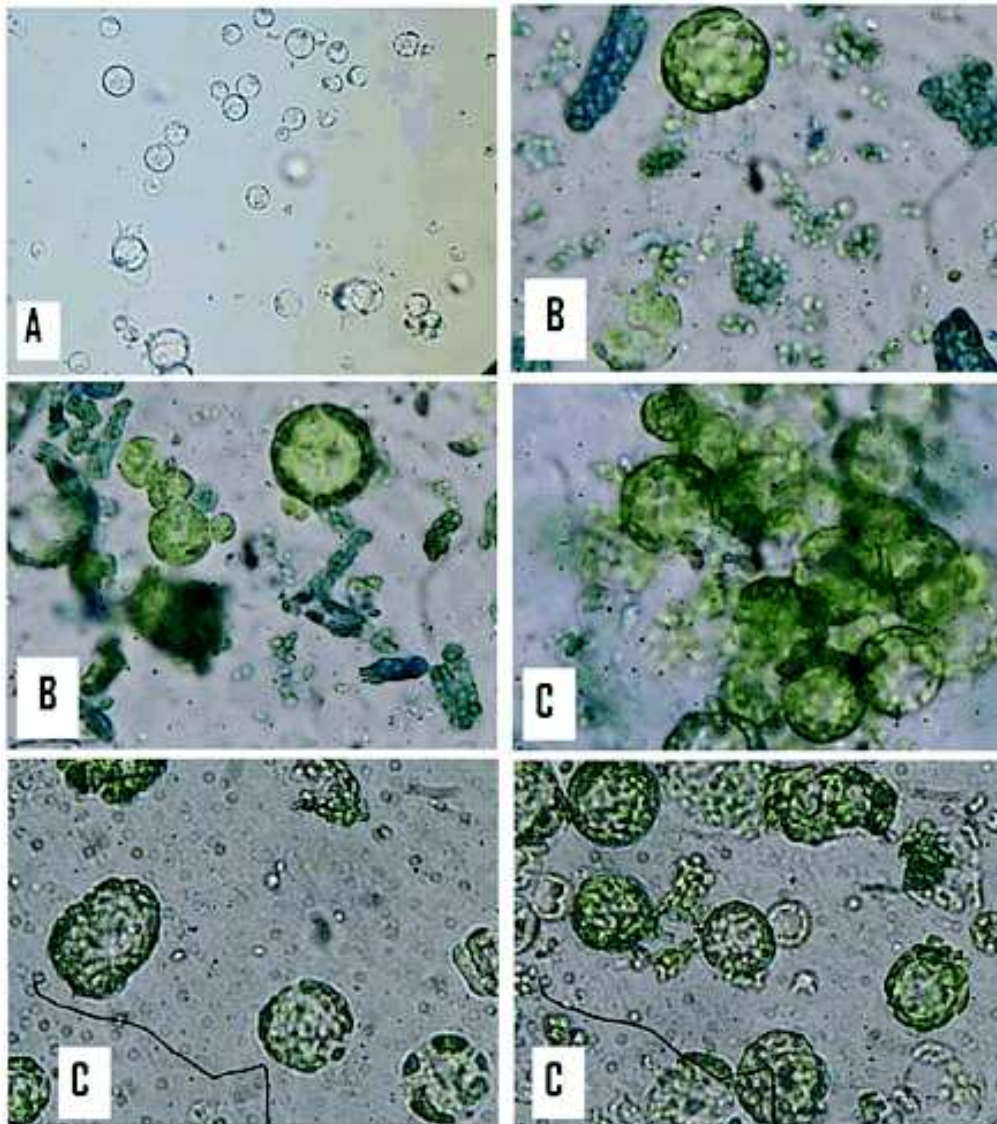


Planche 3. Protoplastes de *D. stramonium*.

- **A** : Protoplastes obtenus à partir de cals durs à l'aide de *Trichoderma longibrachiatum* (G x 200).
- **B** : Protoplastes obtenus à partir des feuilles adultes à l'aide d'*Aspergillus niger* (G x 500).
- **C** : Protoplastes obtenus à partir des feuilles adultes à l'aide de *Trichoderma longibrachiatum* (G x 500).

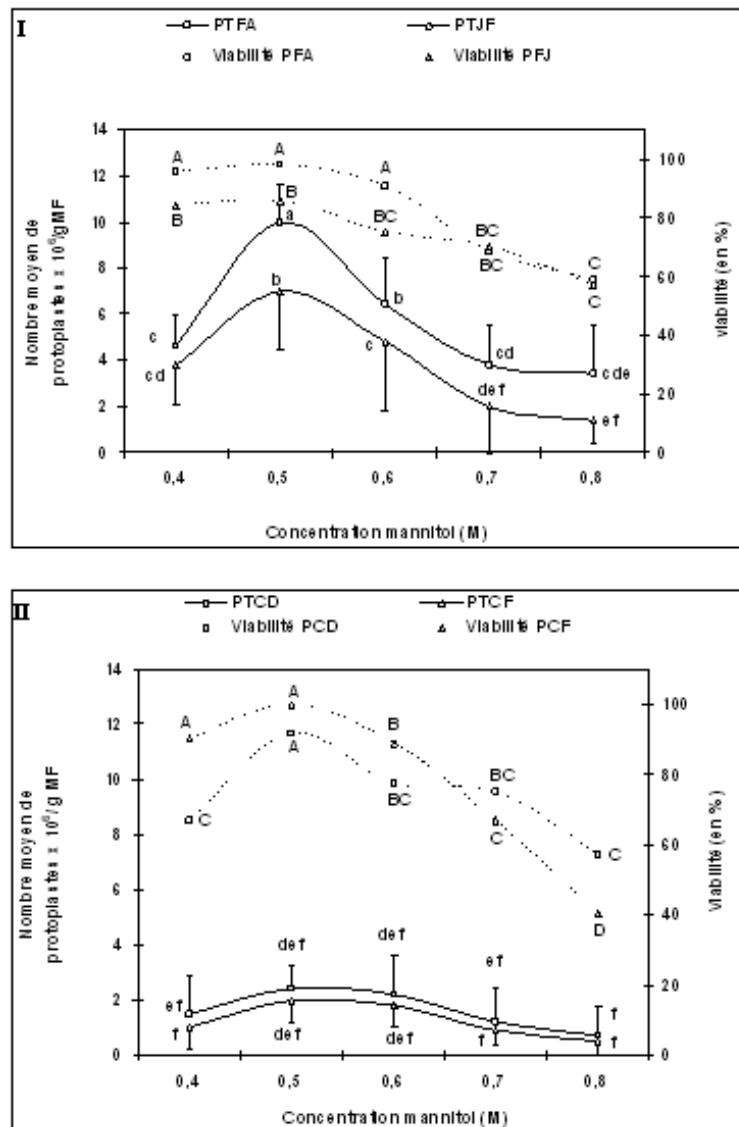


Figure 4. Effet de la concentration du mannitol sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

I : Feuilles jeunes et adultes. **II** : cals durs et friables. **PTFA** : Protoplastes totaux issus des feuilles adultes. **PTJF** : Protoplastes totaux issus des jeunes feuilles. **PTCD** : Protoplastes totaux issus des cals durs. **PTCF** : Protoplastes totaux issus des cals friables. Protoplastes totaux : [F = 24,5 ; adl_{10}^{10} ; proba. : 0,000 ***] ; viabilité [F = 26,6 ; adl_{10}^{10} ; proba. : 0,000 ***].

La concentration du mannitol dépend généralement de l'âge du tissu (Gamborg et Mailler, 1973 ; Smith *et al.*, 1984). Cela ne semble pas être le cas dans nos conditions expérimentales, car les mêmes tendances sont observées entre feuilles adultes et jeunes avec un pic à 0,5 M de mannitol. Toutefois, les feuilles adultes présentent un nombre moyen et une viabilité plus importante que les feuilles jeunes pour la même concentration du mannitol. Les protoplastes issus des jeunes feuilles sont moins viables, ils présenteraient

donc une certaine fragilité par rapport aux phénomènes de la turgescence et de la plasmolyse.

Pour les cals, c'est aussi la concentration de 0,5 M de mannitol qui donne les meilleurs résultats (nombre de protoplastes totaux et viabilité) quelque soit le type de cal.

La concentration 0,5 M a été rapportée par plusieurs auteurs, comme étant l'une des meilleures pour les solanacées (*Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* et *D. innoxia*) (Uchimiya et Murashige, 1974 ; Furner *et al.*, 1978 ; Saxena et King, 1985). En effet, le parenchyme foliaire commence à plasmolyser à partir de 0,5 M de mannitol (Furner *et al.*, 1978 ; Smith *et al.*, 1984 ; Saxena et King, 1985; Ellouz *et al.*, 1994). Ceci expliquerait que les protoplastes éclatent en deçà de cette concentration. Ainsi, le nombre moyen et la viabilité des protoplastes diminuent au delà cette concentration, probablement à cause d'une plasmolyse sévère des protoplastes suivie de leur dégénérescence.

De plus, certains auteurs rapportent qu'une concentration de 0,6 M sur le tabac entraîne un retard de différenciation cellulaire et une réduction du taux de la prolifération cellulaire lorsque les protoplastes sont mis en culture (Meyer et Abel, 1975).

Ainsi, c'est la concentration 0,5 M de mannitol qui est retenue pour la suite de l'expérimentation.

2.3. Concentration de la cellulase.

En fixant la concentration du mannitol à 0.5M et celle de la macérozyme à 0.01% on a fait varier la concentration de la cellulase

La figure 5 I et II montre que des nombres moyens très proches de protoplastes sont observés chez les feuilles adultes et les feuilles jeunes, mais à des concentrations différentes. En effet, les jeunes feuilles semblent réagir à de faibles concentrations de cellulase par rapport aux feuilles adultes. L'analyse de la variance de l'influence de la concentration de la cellulase est statistiquement très hautement significative sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes quelque soit le type de tissu utilisé (Annexe 7).

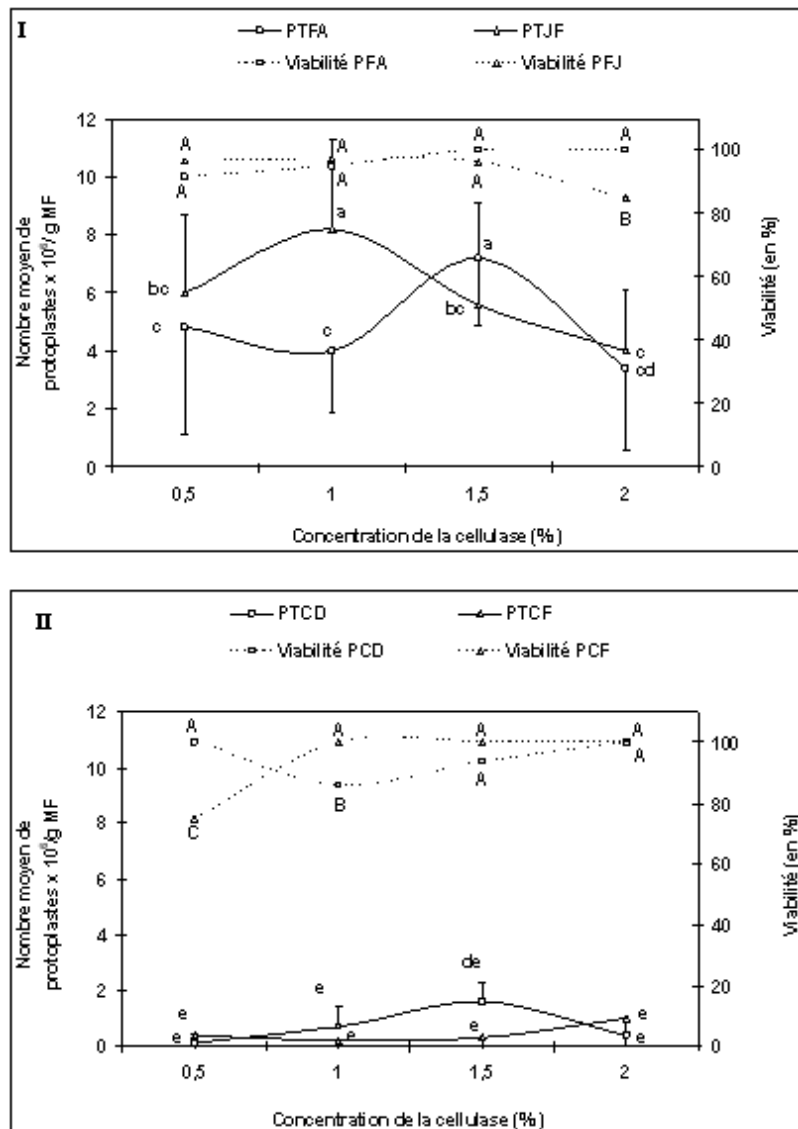


Figure 5. Effet de la concentration de la cellulase sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

I : Feuilles jeunes et adultes. **II** : cals durs et friables. Protoplastes totaux : [F = 18 ; $aa1_{1,44}^5$; proba. : 0,000 ***] ; viabilité : [F = 19,2 ; $aa1_{1,44}^5$; proba. : 0,000 ***].

Le test de Newman & Keuls révèle que les feuilles jeunes traitées avec 1% de cellulase (groupe a) et les feuilles adultes traitées avec 1,5 % de cellulase (groupe a) donnent les meilleurs résultats avec respectivement $8,2 \times 10^6$ proto./g MF (dont 98% sont viables) et $7,2 \times 10^6$ proto./g MF (dont 99% sont viables) (Annexe 8).

Chez les solanacées, la concentration de la cellulase utilisée généralement est de 1% à 1,5% (Uchimiya et Murashige, 1974 ; Kikuta *et al.*, 1983 Ellouze *et al.*, 1994). Ceci est confirmé par nos résultats.

La concentration enzymatique dépend de l'âge du tissu, et ceci est confirmé par nos résultats, car l'âge du tissu influencerait la complexité de la structure de la paroi cellulaire. En effet, chez les tissus âgés la paroi cellulaire se caractérise par la présence d'une paroi secondaire faite de strates plus ou moins épaisses (Eriksson, 1986). Ceci fait que le tissu exigerait une concentration plus élevée de cellulase pour dégrader le matériel pariétal cellulosique comparé au tissus jeunes qui réclament de basses concentrations d'enzymes (Shahin, 1985 ; Buiteveld et Creemers-Molenaar, 1994 ; Assani *et al.*, 2001 ; Assani *et al.*, 2002 ; Sinha *et al.*, 2003 *in* Davey *et al.*, 2005 ; Davey *et al.*, 2005).

Quant aux cals, bien que la concentration de cellulase ne semble pas trop influencer le nombre moyen de protoplastes, ce sont les concentrations 1,5% pour les cals durs et 2% pour les cals friables qui donnent les meilleurs résultats ($1,6 \times 10^6$ et 1×10^6 respectivement).

La viabilité des protoplastes semble très bonne quelques soit le type de tissus et la concentration de cellulase. On note toutefois une diminution de la viabilité chez les protoplastes obtenus à partir des feuilles jeunes pour la concentration 2%.

Ainsi, les concentrations de cellulase retenues pour la suite de l'étude sont :

- 1% pour les feuilles jeunes.
- 1,5% pour les feuilles adultes et les cals durs.
- 2% pour les cals friables.

2.4. Concentration de la macérozyme.

D'après la figure 6I, le nombre moyen des protoplastes obtenu chez les feuilles jeunes et adultes augmente avec la concentration de la macérozyme. Il semblerait que la dose maximale de macérozyme testée qui est de 0,02%, ne permet pas de trancher vis-à-vis des feuilles jeunes et adultes.

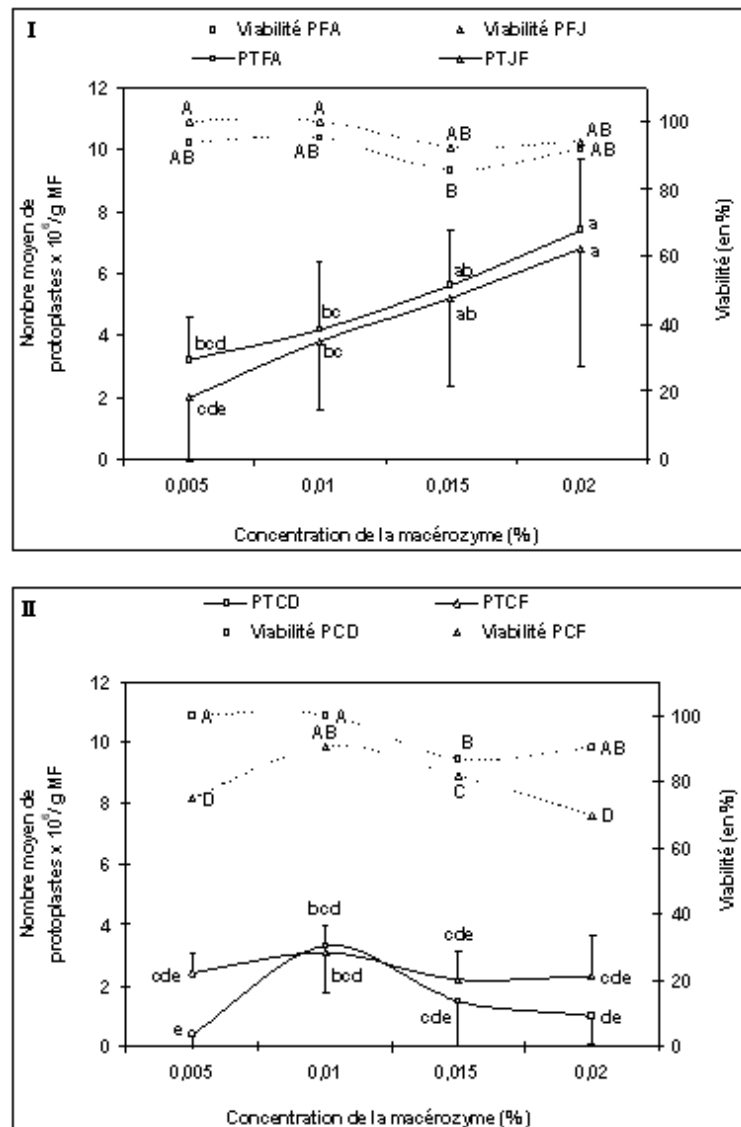


Figure 6. Effet de la concentration de la macérozyme sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

I : Feuilles jeunes et adultes. **II** : cals durs et friables. Protoplastes totaux : $[F = 11,2 ; aat_{1,44}^5 ; proba. : 0,000 ***]$; viabilité : $[F = 9 ; aat_{1,44}^5 ; proba. : 0,000 ***]$.

Par contre, chez les cals durs, on observe un pic à 0,01% puis une diminution au-delà de cette concentration, probablement due à une dégénérescence des protoplastes (Figure 6II). En général, la viabilité des protoplastes semble être légèrement affectée à partir de la concentration de 0,01% de macérozyme (Figure 6 I et II). En effet, lorsqu'elle dépasse ce seuil, dans nos conditions expérimentales, elle porte préjudice à l'intégrité et à la viabilité des protoplastes.

L'analyse de la variance de l'effet de la concentration de la macérozyme sur l'isolement des protoplastes est statistiquement très hautement significative pour l'ensemble des paramètres mesurés (Annexe 9). Le test de Newman & Keuls au seuil de 95% révèle que les

meilleurs résultats sont obtenus avec les feuilles adultes et les feuilles jeunes avec 0,02% de macérozyme (groupe a, Annexe 10). Les feuilles adultes donnent $7,4 \times 10^6$ proto./ g MF (dont 99% sont viables) et les feuilles jeunes donnent $8,2 \times 10^6$ proto./ gMF (dont 99% sont viables).

Le test de Newman & Keuls (95%) révèle que la concentration 0,01% de macérozyme est la meilleure aussi bien pour les cals friables que les cals durs (Annexe 10). Les cals durs et friables donnent respectivement $3,3 \times 10^6$ proto./ g MF (dont 100% sont viables) et $3,10 \times 10^6$ proto./ g MF (dont 90,32% sont viables).

Selon nos résultats, la mécrozyme semble affecter la viabilité des protoplastes même à de faibles concentrations quelques soit le tissus utilisé. Les concertations de macérozyme utilisées chez les solanacées pour un meilleur nombre moyen en protoplastes viables, issues des cals ou des feuilles, varient de 0,01% à 0,2% (Uchimiya et Murashige, 1974 ; Kikuta *et al.*, 1983 ; Ellouze *et al.*, 1994). Certains auteurs rapportent que les jeunes tissus nécessitent de faibles concentrations d'enzymes (Xu *et al.*, 1982 ; Glimelius, 1984 ; Sinha *et al.*, 2003 *in* Davey *et al.*, 2005). Ceci ne ressort pas dans nos résultats car en effet, la même concentration 0,02% de macérozyme s'est avérée meilleure aussi bien pour les feuilles jeunes que les feuilles adultes. La même tendance est observée pour les cals friables et durs. En effet, c'est la concentration 0.01% de macérozyme qui semble être légèrement plus efficace que les autres concentrations pour les deux types de cals. Ainsi, nos résultats ne mettent pas en évidence une nette différence sur l'interaction « macerozyme-âge du tissus » pour les feuilles et l'interaction « macérozyme-structure du tissus » pour les cals.

Pour la suite de l'expérimentation, les concentrations de macérozyme retenues sont :

- 0,01% pour les cals (durs et friables).
- 0,02% pour les feuilles (adultes et jeunes).

2.5. PH de la solution de macération.

Dans les parties précédentes c'est le pH de 5 qui a été utilisé.

D'après la figure 7 I, II, III et IV, il semblerait que le pH influe sur le nombre moyen de protoplastes surtout chez les feuilles. Cet effet n'est pas très marqué pour les cals. Cependant, le taux de viabilité semble être affecté par le pH pour tous les types de tissus testés.

Les nombres moyens pour les feuilles adultes sont de $6,4 \times 10^6$ (dont 81% sont viables) pour le pH 5,6 à 9×10^6 (dont 98% sont viables) pour le pH 5 ; et $2,9 \times 10^6$ (dont 97% sont viables) pour le pH 5 à $1,5 \times 10^6$ (dont 60% sont viables) pour le pH 5,6 concernant les cals durs.

L'analyse de la variance montre que l'effet du pH de la solution de macération est très hautement significatif sur le nombre moyen des protoplastes et leur viabilité (Annexe 11). Le test 95% de Newman & Keuls révèle que les meilleurs résultats sont obtenus avec les feuilles et un pH 5 (groupe a pour les feuilles jeunes et adultes) (Annexe 12).

Selon les travaux de Uchimiya et Murashige (1974) et de Saxena et King (1985) sur le tabac et le *Datura* respectivement, le pH optimal de la solution de macération pour un nombre moyen et une viabilité maximaux se situe entre 4,7 et 5,8. Les valeurs inférieures ou

dépassant cette marge sont responsables de la diminution des rendements en protoplastes et de leur viabilité.

Dans nos conditions expérimentales le pH 5 fournit les meilleurs résultats (nombre moyen de protoplastes et viabilité) par rapport au pH 5,6.

En effet, le pH de la solution affecte aussi l'activité enzymatique et donc le rendement en protoplastes (Hohe et Reski, 2002 ; Sinha *et al.*, 2003 ; Chabane *et al.*, 2007). Ceci dépendrait aussi de la nature du tissu selon nos résultats.

Ainsi, le pH 5 est retenu pour la suite de l'étude.

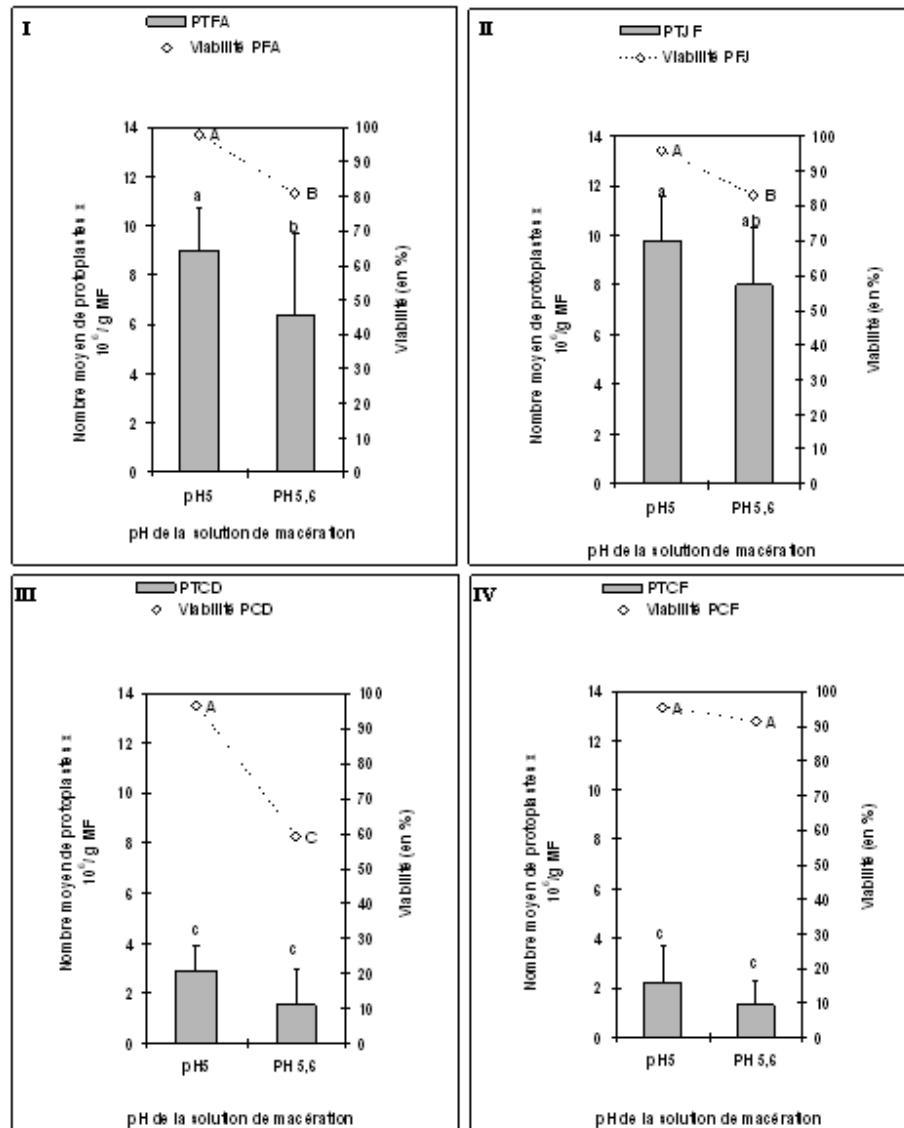


Figure 7. Effet du pH de la solution de macération sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

I : Feuilles adultes. **II** : jeunes Feuilles. **III** : cals durs. **IV** : cals friables.

Protoplastes totaux : [F = 36 ; $aa1_{12}^2$; proba. : 0,000 ***] ; Viabilité : [F = 33 ; $aa1_{12}^2$; proba. : 0,000 ***].

2.6. Effet des prétraitements : découpage ou non du matériel végétal.

Dans les parties précédentes, on a utilisé du matériel végétal découpé.

D'après la figure 8I, II, III et IV, Les tissus découpés donnent de meilleurs résultats par rapport aux tissus non découpés en nombres moyens de protoplastes et de viabilité.

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du découpage du matériel végétal sur le nombre moyen des protoplastes isolés et leur viabilité (Annexe 13). Le test 95% de Newman & Keuls (Annexe 14) révèle que le meilleur nombre moyen des protoplastes est obtenu avec les feuilles adultes découpées (groupe a) : il est de $1,04 \times 10^7$ proto./g MF (dont 87% sont viables).

Le taux de viabilité des protoplastes est meilleur lorsque les tissus sont découpés. Il oscille entre 80% et 90% pour l'ensemble des tissus découpés. Il apparaît que le découpage des feuilles facilite l'action des enzymes pour l'isolement des protoplastes. En effet, il est recommandé de découper le matériel végétal ou d'enlever l'épiderme dans les cas des feuilles des monocotylédones avant les traitements enzymatiques mettant ainsi une meilleure surface du matériel végétal en contact avec les enzymes (Harisha, 2007).

Par contre, l'effet du découpage est non significatif sur l'isolement des protoplastes à partir des cals et surtout ceux qui sont friables car il ne leur est pas nécessaire, vu leur structure (même groupe d).

Ainsi on a retenu le :

- découpage pour les feuilles (adultes et jeunes) et les cals durs.
- Non découpage pour les cals friables.

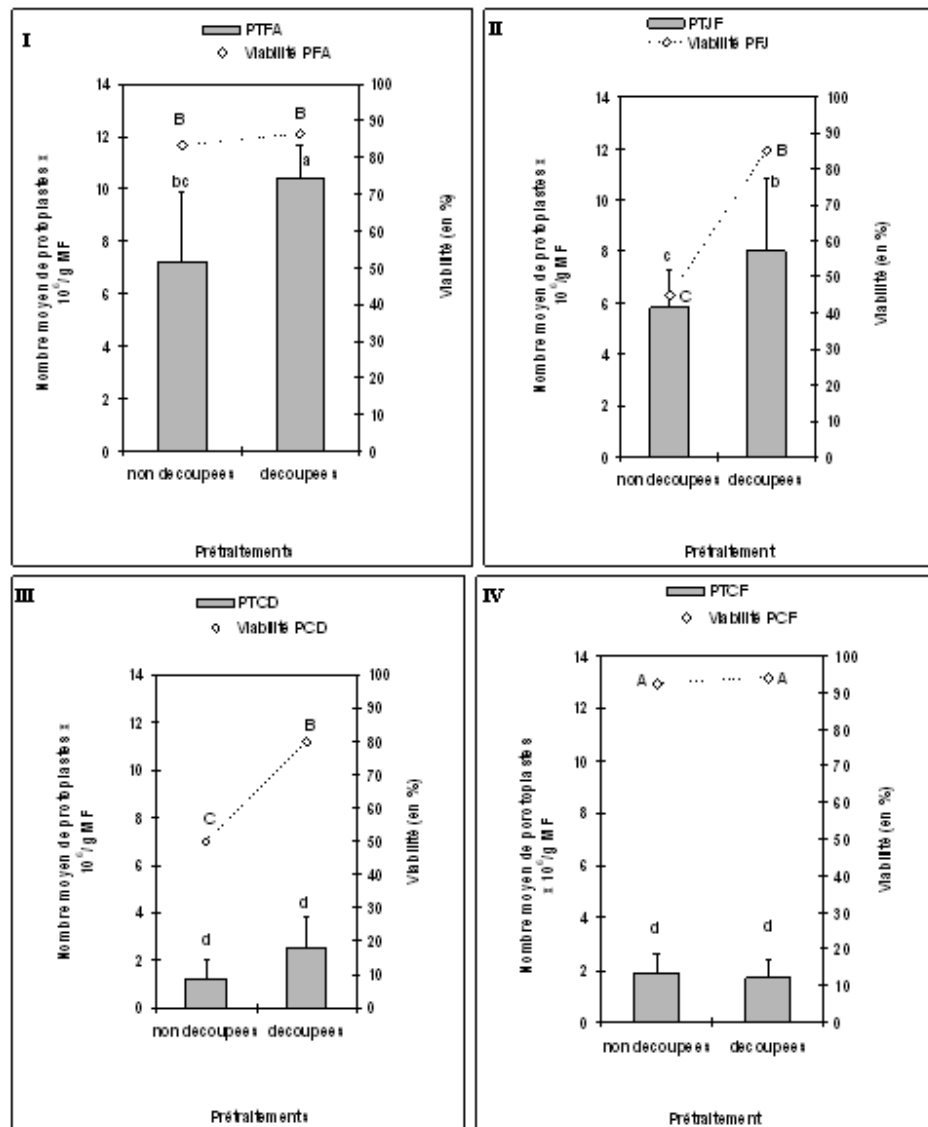


Figure 8. Effet des prétraitements (découpage ou non du tissu) sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

I : Feuilles adultes. **II** : jeunes Feuilles. **III** : cals durs. **IV** : cals friables.

Protoplastes totaux : [F = 43,4 ; $ddl_{2,2}^1$; proba. : 0,000 ***] ; Viabilité : [F = 26,2 ; $ddl_{2,2}^1$; proba. : 0,000 ***].

2.7. Effet de la nature du tissu

La figure 9 montre que les protoplastes des feuilles découpées présentent le nombre moyen et le taux de viabilité le plus élevée (97%, groupe A), elles sont suivi par les cals durs (découpés) et les cals friables (90%, groupe B).

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif de l'effet de la nature du tissu sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes (Annexe 15). Le test de Newman & keuls au seuil 95% révèle l'existence de deux groupes homogènes : les feuilles forment le

groupe a ($8,8 \times 10^6$ proto./g MF) et les cals durs et friables appartiennent au même groupe b ($2,7$ et $1,6 \times 10^6$ proto./g MF respectivement) (Annexe 16).

Les feuilles sont le type de tissus le plus propice pour l'isolement des protoplastes par rapport aux cals durs et friables. Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Roy et De (1973) sur le tabac.

2.8. Effet de l'âge des feuilles.

La figure 10 illustre bien la supériorité des feuilles adultes (issues de vitrosemis âgés de 4 mois) par rapport aux feuilles jeunes (issues de vitrosemis âgés de 1 mois) pour le nombre moyen des protoplastes et le taux de viabilité.

En effet, l'analyse de la variance met en évidence un effet très hautement significatif de l'effet de l'âge des feuilles sur le nombre moyen de protoplastes et leur viabilité (Annexe 17).

Le nombre moyen enregistré est de $9,8 \times 10^6$ et 7×10^6 proto./g MF respectivement pour les feuilles adultes et les feuilles jeunes. Les meilleurs pourcentages de viabilité sont également enregistrés avec les protoplastes issus de feuilles adultes avec une valeur de 92% contre 85% pour les feuilles jeunes.

L'âge du tissu reste un facteur déterminant sur le rendement et la viabilité des protoplastes. Ce sont toujours les jeunes tissus qui fournissent les meilleurs résultats (Shahin, 1985 ; Buiteveld et Creemers-Molenaar, 1994 ; Assani *et al.*, 2002).

Alors que lors de nos observations, les solutions de macération des jeunes feuilles contenaient beaucoup de déchets et de protoplastes éclatés mêlés aux protoplastes intacts, ce qui impliquait un nombre moyen inférieur et une viabilité réduite par rapport aux feuilles adultes. Les protoplastes issus des jeunes feuilles seraient donc plus fragiles que ceux issus des feuilles adultes.

Ainsi, ce sont les feuilles adultes qui sont retenues pour la suite de l'expérimentation.

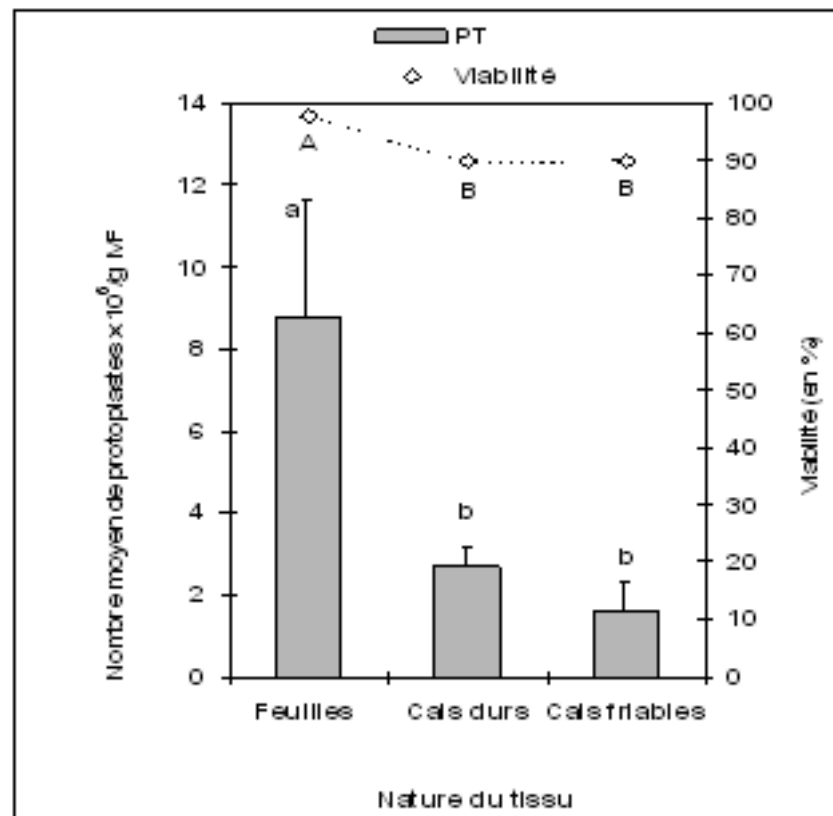


Figure 9. Effet de la nature du tissu sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

PT : Protoplastes totaux. Protoplastes totaux : [F = 50,7 ; $aa_{1,2}$; proba. : 0,000 ***] ; viabilité : [F = 67 ; $aa_{1,2}$; proba. : 0,000 ***].

Figure 10. Effet de l'âge du tissu sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

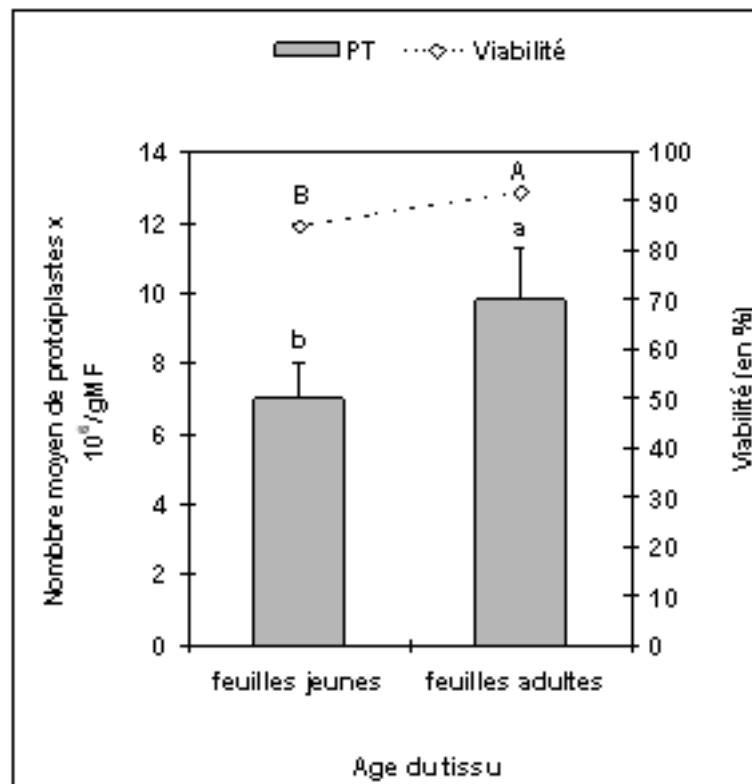


Figure 10. Effet de l'âge du tissu sur le nombre moyen et la viabilité des protoplastes de *D. stramonium*.

PT: Protoplastes totaux. Protoplastes totaux : [F = 24 ; $ad_{1\%}$; proba. : 0,000 ***] ; viabilité : [F = 45 ; $ad_{1\%}$; proba. : 0,000 ***].

3. Purification des protoplastes.

3.1. Prépurification.

Les feuilles issues de vitrosemis âgés de 4 mois découpées sont mises dans la solution de macération composée du milieu MS contenant 0,5 M de mannitol ; 1,5% de cellulase ; 0,02% de macérozyme avec un pH de 5. Après 3 heures de macération à une vitesse d'agitation de 100 rpm, les protoplastes sont prêts pour la prépurification. Trois vitesses de centrifugation (120, 150 et 200 x g) en combinaison avec trois temps (2, 5 et 8 minutes) sont testés.

La figure 11 I révèle qu'avec la vitesse de centrifugation de 120 x g, bien que le nombre de protoplastes récupérés augmente avec le temps de centrifugation, il demeure faible à la 8^{ème} minutes (18%). Concernant la vitesse 200 x g, on assiste à une diminution progressive du nombre de protoplastes récupérés et qui reste faible même pour des temps de centrifugation courts (26,5% dont 33% sont vivants à la 2^{ème} minute de centrifugation) (figure 11 III).

L'effet de la vitesse et du temps de centrifugation sont très hautement significatifs sur la purification des protoplastes selon l'analyse de la variance (Annexe 18). Le test 95% de Newman & Keuls révèle que c'est la combinaison 150 x g et 5 min de centrifugation qui donne les meilleurs résultats pour le nombre de protoplastes récupérés et viables (figure 11 II)(Annexe 19). Elle a permis de récupérer 55,8 % de protoplastes dont 58,5% sont viables.

Chez le *D. innoxia*, Saxena *et al.* (1990) ont obtenu une bonne purification de la solution de protoplastes à 120 x g /5 min de centrifugation.

La centrifugation à faible vitesse (100 x g pendant 7 à 10 min) induit la sédimentation des protoplastes du parenchyme foliaire de solanacées (Kikuta *et al.*, 1983 ; Eriksson, 1986).

Concernant nos résultats, la vitesse de centrifugation 120 x g ne permet pas bien de séparer les débris. Cette vitesse serait insuffisante pour observer une formation efficace du culot afin de récupérer les protoplastes. Le pourcentage des protoplastes récupérés est par conséquent faible quelque soit le temps de centrifugation. La forte vitesse de 200 x g provoquerait l'éclatement des protoplastes, c'est ce qui expliquerait la diminution du pourcentage de protoplastes purifiés au cours du temps de centrifugation.

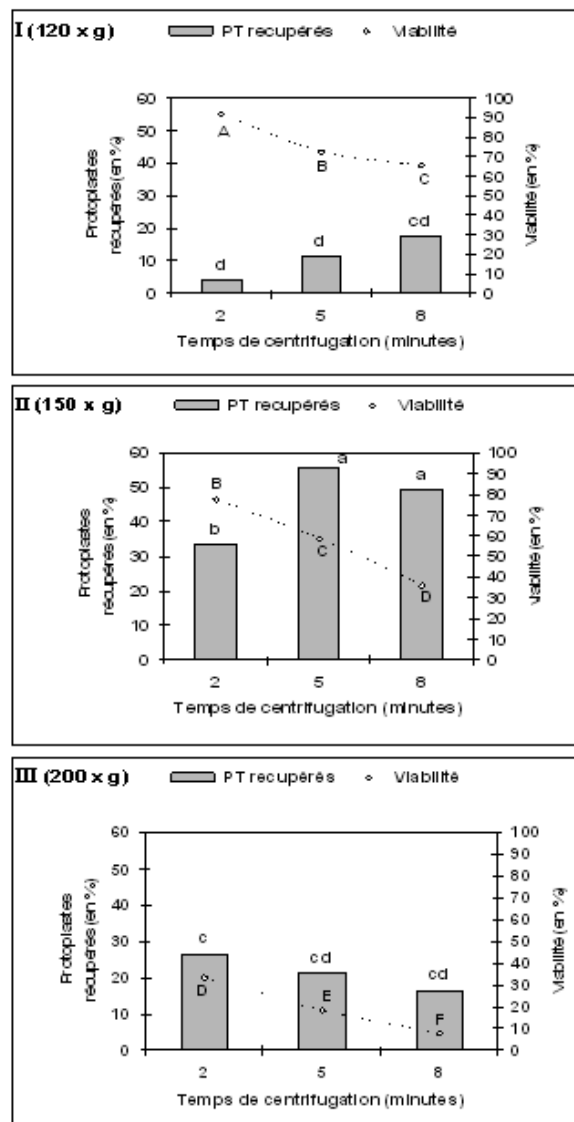


Figure 11. Effet de la vitesse et du temps de centrifugation sur le taux de viabilité et des protoplastes récupérés de *D. stramonium*.

Protoplastes totaux récupérés : [vitesse d'agitation : $F = 4,93$; ad_{15} ; proba. : 0,000 *** ; temps d'agitation : $F = 98,4$; ad_{15} ; proba. = 0,000 *** ; vitesse x temps d'agitation : $F = 7,45$; ad_{15} ; $p = 0,000$ ***]. Viabilité [vitesse d'agitation : $F = 4,34$; ad_{15} ; proba. : 0,01 *** ; temps d'agitation : $F = 91,1$; ad_{15} ; $p = 0,000$ *** ; vitesse x temps d'agitation : $F = 6,75$; ad_{15} ; $p = 0,0001$ ***].

La viabilité des protoplastes diminue en fonction du temps et de la vitesse de centrifugation. Cette diminution serait due à une destruction mécanique des protoplastes.

Ainsi, après trois lavages par centrifugation à 150 x g pendant 5 min, les protoplastes récupérés sont prêts à être purifiés sur gradient ou monocouche de saccharose.

La planche 4 montre l'aspect global des protoplastes de feuilles adultes avant et après prépurification à 150 x g durant 5 min.

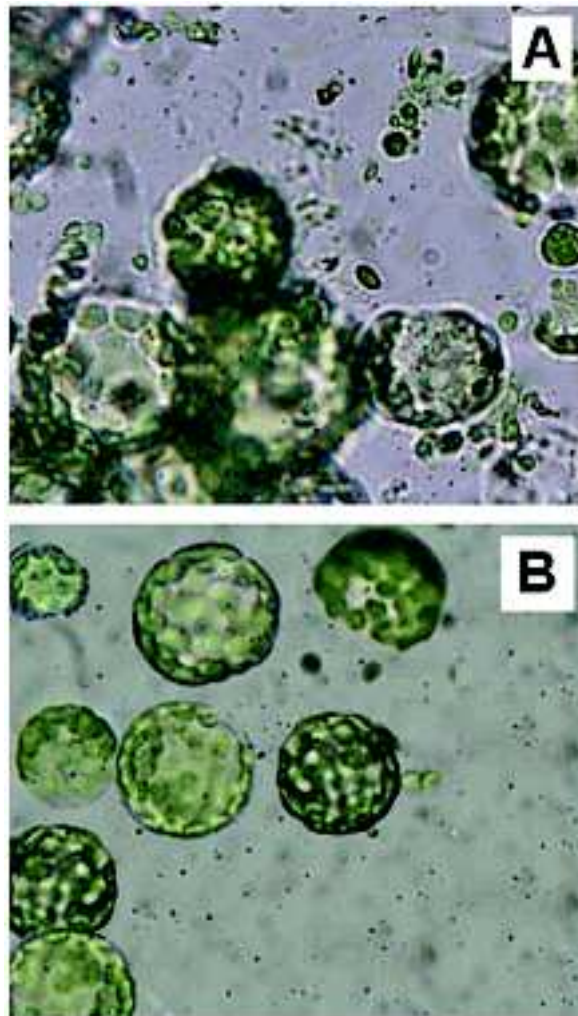


Planche 4. *Prépurification des protoplastes de feuilles adultes de D. stramonium (G x 500).*

A : avant prépurification. **B** : après prépurification à 150 x g durant 5 min.

3.2. Purification finale.

La purification finale des protoplastes sur gradient discontinu 20% - 30% - 40% de saccharose à 80% pendant 8 minutes n'a permis de récupérer que 10% protoplastes. De plus les protoplastes récupérés (entre la couche 20%-30%) sont mêlés à un grand nombre de cellules et de gros débris. Cette méthode de purification a été donc abandonnée.

La purification finale sur monocouche s'est avérée beaucoup plus efficace. A cette étape du travail, on a recherché la meilleure concentration de saccharose qui permet de récupérer un nombre appréciable de protoplastes viables destinés à être mis en culture.

Plus la concentration du saccharose augmente dans le milieu, et plus le pourcentage des protoplastes récupérés après centrifugation à l'interphase de la monocouche diminue. Il en est de même pour la viabilité (figure 12).

L'analyse de la variance de l'effet des concentrations des monocouches de saccharose révèle un effet très hautement significatif sur la purification des protoplastes (Annexe 20).

C'est la monocouche de 20% de saccharose qui donne les meilleurs rendements selon le test 95% Newman & Keuls (groupe a) (Annexe 21). Elle permet aussi de préserver l'intégrité des protoplastes de feuilles de *D. stramonium* lors de la purification (figure 13).

Les protoplastes de tabac et du *D. innoxia* flottent dans une solution de saccharose d'une concentration qui se situe entre 15 et 22% (Evans *et al.*, 1973 ; Saxena et King, 1985 ; Saxena *et al.*, 1990). En effet, la monocouche 20% de saccharose a permis la récupération de 55% de protoplastes avec un taux de viabilité de 71%. Pour les deux autres concentrations testées 30% et 40% de saccharose, les protoplastes dégénèrent probablement à cause d'une forte plasmolyse. Ceci expliquerait la diminution du rendement en protoplastes et de leur viabilité.

Ainsi, c'est la purification sur monocouche de saccharose 20% avec une centrifugation à 80% / 8 minutes qui est retenue pour la suite de l'étude.

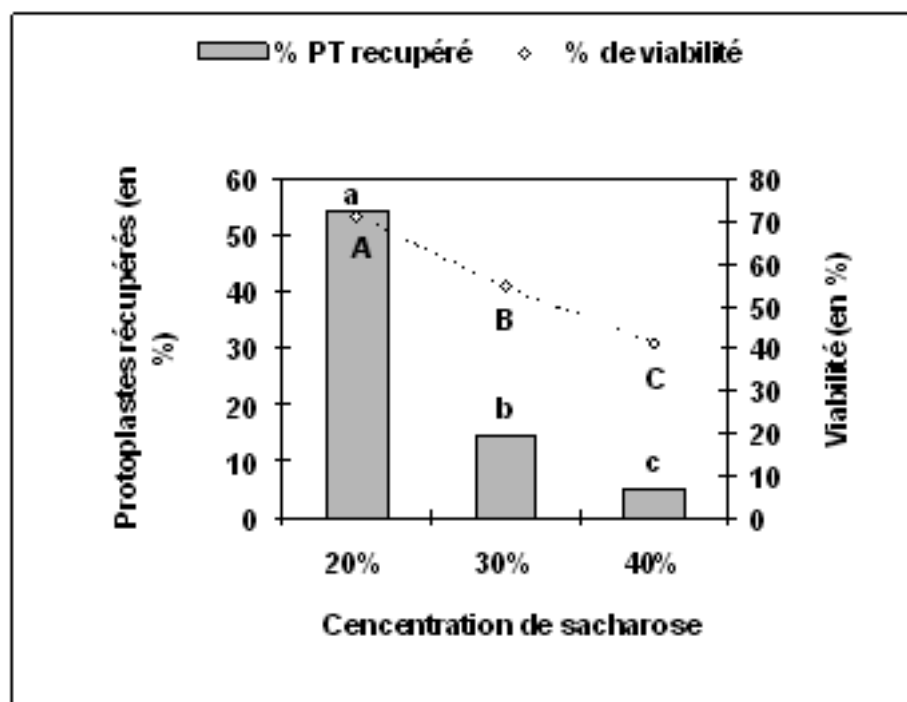


Figure 12. Effet de la concentration de la monocouche de saccharose sur les taux des protoplastes récupérés et de leur viabilité.

Protoplastes totaux récupérés : $[F = 22,50 ; \text{aat}_{37}^2 ; \text{proba.} : 0,000 ***]$;

Viabilité : $[F = 25,02 ; \text{aat}_{37}^2 ; \text{proba.} : 0,000 ***]$.

Figure 13. Purification des protoplastes de feuilles adultes de *D. stramonium* sur monocouche de saccharose 20% avec centrifugation à 80% pendant 8 minutes (G x 500).

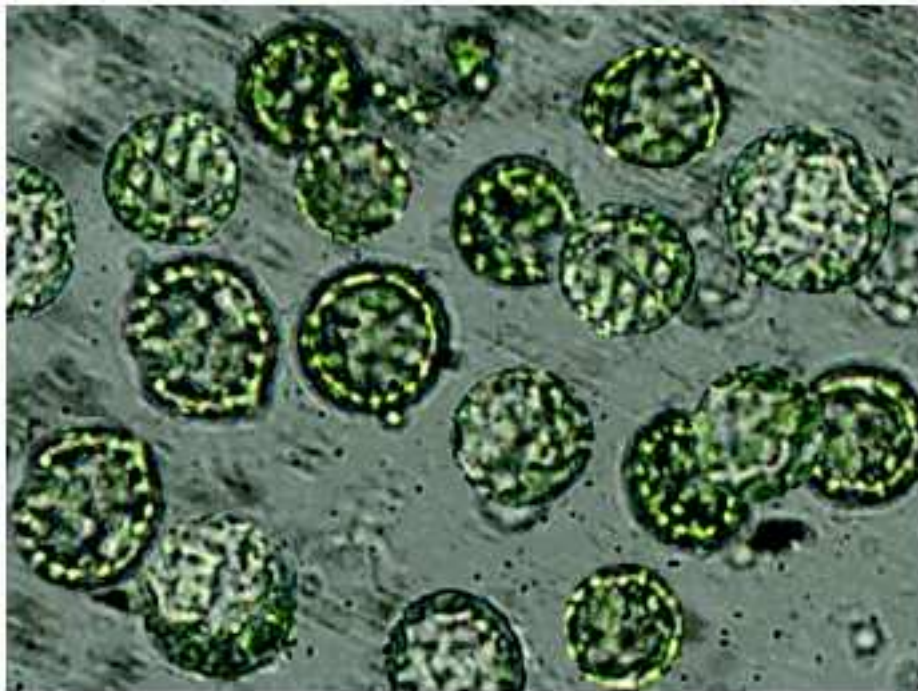


Figure 13. Purification des protoplastes de feuilles adultes de *D. stramonium* sur monocouche de saccharose 20% avec centrifugation à 80% pendant 8 minutes ($G \times 500$).

4. Culture de protoplastes.

4.1. Effet de la densité des protoplastes mis en culture.

Les protoplastes sont isolés à partir des feuilles adultes (4 mois) purifiées (sur monocouche de saccharose 20% à 80%/ 8 min) et cultivés dans le milieu MS solidifié par 3,5 g /l d'agarose et contenant : 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose + 0,2 mg/l d'ANA + 0,5 mg/l de BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D + 50 mg/l de CaCl_2 + 292 mg/l de glutamine.

Deux densités de culture de protoplastes : D1 (10^4 proto./ml de milieu de culture) et D2 (10^5 proto./ml) sont étudiées.

La densité D1 semble être meilleure que la D2. En effet, 80% des protoplastes de la D1 restent viables jusqu'au 12^{ème} jour de culture contre 54% pour la D2. La fréquence d'entrée en divisions des protoplastes de la D2 est faible (0,07%) par rapport à la D1 (3%).

Au 12^{ème} jour de culture, l'analyse de la variance révèle que l'effet de la densité de protoplastes est très hautement significatif (Annexe 22).

Afin de réussir la culture de 50% à 90% des protoplastes de solanacées (tabac, *D. innoxia*), il est nécessaire de les cultiver à une densité de 5×10^4 à 10^5 protoplastes par millilitre de milieu de culture (Chupeau et Bourgin, 1980 ; Saxena et King, 1985 ; Sahgal et al., 1994 ; Pan et al., 2003 ; Sun et al., 2005).

Il semble que pour *D. stramonium* (dans nos conditions expérimentales), les fortes densités ne conviennent pas à la culture des protoplastes. Une forte densité de culture peut donc avoir un effet défavorable au maintien de la viabilité des protoplastes probablement liée à une concurrence nutritionnelle entre les protoplastes. Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par Galbraith *et al.* (1984) concernant le tabac. En effet, des densités de culture allant de 1 à 4×10^4 de protoplastes du tabac par ml de milieu de culture sont suffisantes pour que 70% des protoplastes restent viables et synthétisent une nouvelle paroi après 48 heures de culture.

4.2. Effet du sucre et du pH du milieu de culture.

Les protoplastes de *D. stramonium* isolés à partir de feuilles adultes sont cultivés à une densité de 10^4 proto./ml sur trois milieux avec trois combinaisons glucidiques différentes:

- M0 = MS + 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose.
- M1 = MS + 0,18 M de mannitol,
- M2 = MS + 0,35 M de mannitol + 0,075 M de glucose + 0,075 M de saccharose.

D'après les observations faites au 12^{ème} jour de culture, il apparaît que le milieu MS supplémenté avec seulement du mannitol (M1) est un milieu défavorable pour la viabilité (46,15% pour le pH 5 et 30% pour le pH 5,9) et l'entrée en divisions des cellules (0,71% et 0,4% pour le pH 5 et le pH 5,9 respectivement) par rapport aux deux autres milieux. Bien qu'à des degrés moindres que le milieu M1, des concentrations fortes en mannitol et une réduction des concentrations en glucose et en saccharose (M2) influent aussi négativement sur la viabilité des protoplastes (45,45% et 35,71% pour le pH 5 et le pH 5,9 respectivement) et l'entrée en divisions des cellules (1,17% pour le pH 5 et 0,8% pour le pH 5,9).

L'analyse de la variance, au 12^{ème} jour de culture, révèle que l'effet du sucre et du pH du milieu de culture est très hautement significatif (Annexe 23). Le test 95% Newman & keuls révèle que les meilleures conditions pour la culture de protoplastes de feuilles de *D. stramonium* avec un taux de viabilité et une fréquence d'entrée en divisions maximale est le milieu M0 ajusté à un pH 5 (groupe a) (Annexe 24). Dans ces conditions, le taux de viabilité est de 80% et la fréquence d'entrée en divisions est de 3% des protoplastes des feuilles au 12^{ème} jour de culture.

Les sucres constituent un facteur important pour l'initiation des divisions cellulaires (Nagy et Maliga, 1976). Le saccharose utilisé seul génère un niveau élevé de toxicité dans le milieu et inhibe les divisions cellulaires (Wallin et Eriksson, 1972 ; Eriksson, 1986). C'est pour cela que de basses concentrations de saccharose (0,028 M) sont recommandées pour l'initiation des divisions cellulaires chez *Nicotiana glauca* (Sahgal *et al.*, 1994). Les meilleurs résultats sont obtenus si la source de carbone consiste en une mixture de sucre tel glucose-arabinose et xylose par exemple (Wallin et Eriksson, 1972). Une balance glucidique constituée d'un sucre métabolisable tel que le glucose et d'un agent osmotique comme le mannitol est une condition satisfaisante pour l'initiation des divisions cellulaires (Eriksson, 1986 ; Rangil et Gordon, 1986 *in* Khelifi et Favre, 1995). Ceci est confirmé par nos résultats.

En culture, le pH influe sur la nutrition minérale (Zrýd, 1988 ; Margara, 1989) et donc sur la régénération de la paroi, la viabilité et l'entrée en divisions des cellules. Par conséquent il apparaît que le pH 5 est mieux adapté à la nutrition des protoplastes de *D. stramonium*, leur viabilité et l'entrée des cellules de cette espèce en divisions par la suite.

4.3. Effet des hormones.

Tout en fixant la densité de culture à 10^4 proto./ml ; le pH à 5 et la combinaison des sucres à 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose, dans cette partie, trois balances hormonales pour la culture des protoplastes sont étudiées :

- H0 = MS + 0,2 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D.
- H1 = MS + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D.
- H2 = MS + 0,2 mg/l ANA + 0,2 mg/l de 2,4-D.

Le taux de viabilité le plus élevée est observé pour le milieu H0 avec 80% de protoplastes viables au 12^{ème} jour de culture. Le milieu H1 (sans ANA) présente 64% de protoplastes viables. Ceci révèle l'importance de l'ANA dans la préservation de la viabilité des protoplastes. Bien que la présence de l'ANA soit capitale, la présence de la BAP revêt une plus grande importance concernant la préservation de la viabilité des protoplastes. En effet, on observe seulement 46% de protoplastes viables au 12^{ème} jour de culture dans le milieu H2 (sans BAP).

Au 12^{ème} jour de culture, l'effet des hormones est très hautement significatif sur la culture des protoplastes (Annexe 25). La meilleur fréquence d'entrée en divisions est observée pour le milieu H0 (3%) (groupe a) selon le test 95% Newman & Keuls (Annexe 26). On observe pratiquement les mêmes fréquences d'entrées en divisions pour le milieu H1 (1,19%) et H2 (1,13%) (groupe b) mettant ainsi à égalité l'importance de ces deux hormones par rapport à l'entrée en divisions (Annexe 26). Mais la présence des deux hormones dans le milieu, comme c'est le cas pour le milieu H0, augmente la fréquence d'entrée en divisions ce qui laisse penser à une forte interaction positive entre ces deux hormones.

La majorité des milieux de culture de protoplastes contiennent une ou plusieurs auxines plus une ou plusieurs cytokinines. Ces hormones sont nécessaires à la formation de la paroi cellulaire, les divisions cellulaires et à la différenciation par la suite. Le 2,4-D est remplacé le plus souvent selon les auteurs par l'ANA et la BAP (Nagata et Takabe, 1970 ; Gamborg *et al.*, 1973 ; Mayer et Abel, 1975 ; Chupeau et Bourgin, 1980 ; Saxena et King, 1985 ; Shahin, 1985 ; Masson *et al.*, 1987 ; Sahgal *et al.*, 1994 ; Komai *et al.*, 1996 ; Pan *et al.*, 2003).

Nos résultats montrent, qu'en plus, la balance hormonale influe sur la préservation de la viabilité des protoplastes mis en culture.

Les concentration du milieu H0 sont dans l'intervalle préconisé pour une culture réussie des protoplastes de solanacées avec 0,5 à 2,5 mg/l de 2,4-D ; 0,01 à 1 mg/l de BAP et 0,2 à 1 mg/l d'ANA (Nagata et Takebe, 1970 ; Nagy et Maliga, 1976 ; Mii *et al.*, 1985 ; Tabaeizadeh *et al.*, 1984 ; Saxena et King, 1985 ; Shahin, 1985).

4.4. Effet de la concentration du nitrate d'ammonium (NH₄NO₃).

Trois milieux sont étudiés concernant l'influence de NH₄NO₃ sur la culture des protoplastes de feuilles adultes de *D. stramonium*. Deux dilutions de la concentration de NH₄NO₃ du milieu MS plus un témoin (MS non modifié) sont étudiées:

- N0 (Témoin) = MS (dont NH₄NO₃ = 1650 mg/l) = H0;
- N1 = MS dont NH₄NO₃/2 = 825 mg/l.

N2 = MS dont $\text{NH}_4\text{NO}_3/4 = 412,5 \text{ mg/l}$.

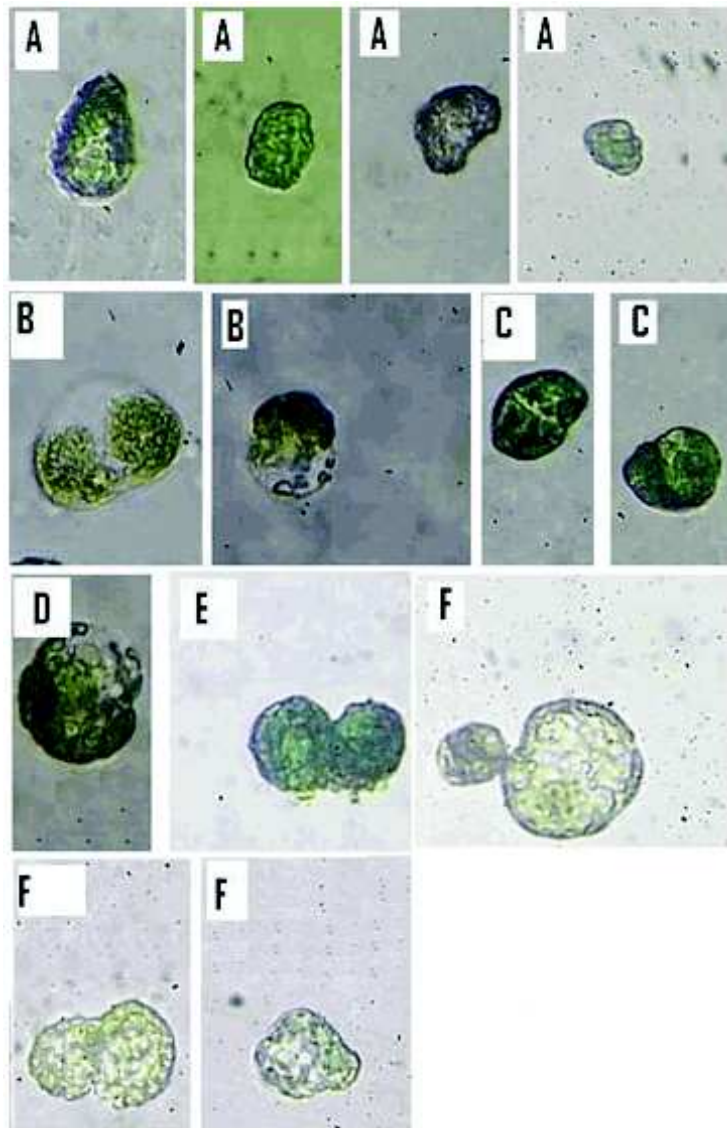
D'après les résultats obtenus au 12^{ème} jour de culture, il semblerait que les protoplastes de *D. stramonium* ne présentent pas une toxicité vis-à-vis du NH_4NO_3 . Les faibles taux de viabilités obtenus avec les milieux N1 (51,85%) et N2 (41,18%) par rapport au milieu N0 (80%) seraient liés à des pertes liées aux conditions du milieu. Donc, ce dernier permet de préserver la viabilité des protoplastes.

L'analyse de la variance de l'effet des concentrations de NH_4NO_3 au 12^{ème} jour de culture révèle un effet très hautement significatif concernant le nombre de protoplastes entrés en divisions (Annexe 27). En effet, les protoplastes cultivés dans le milieu N0 montre une supériorité d'entrée en divisions (3%) (groupe a) par rapport aux deux autres (0,73% pour N1 (groupe b) et 0,13% pour N2 (groupe c)) selon le test 95% Newman & Keuls (Annexe 28).

Le NH_4NO_3 favorise la régénération de la paroi cellulaire (Eriksson, 1986), cependant il est parfois défavorable pour certaines espèces (tomate, tabac et pomme de terre) surtout concernant le NH_4^+ (Bokelmann et Roest, 1983 ; Eriksson, 1986).

La réduction de la concentration en NH_4NO_3 comme c'est le cas pour les milieux N1 et N2, semble affecter négativement l'entrée en divisions des cellules de *D. stramonium*. Les protoplastes de cette espèce seraient donc exigeants en NH_4NO_3 pour l'entrée en divisions des cellules dans nos conditions expérimentales.

La planche 5 montre les aspects de l'allongement, suite à la régénération de la paroi cellulaire, et l'entrée en division des cellules de *D. stramonium* (stade deux cellules) sur milieu N0.



*Planche 5. Différents stades de division des cellules issues de protoplastes de *D. stramonium* sur milieu N0. (G x 500).*

A : Allongement suite à l'initiation de la régénération de la paroi cellulaire (après 4 jours de culture). **B et C** : initiation de la division (après 6 jours de culture). **D et E** : finalisation des divisions (après 8 jours de culture). **F** : bourgeonnement.

conclusion générale

Au terme de notre travail nos conclusions porteront sur l'induction de callogénèse sur fragments d'hypocotyles et des feuilles de vitrosemis de *D. stramonium*, l'isolement des protoplastes des cals issus de ces derniers et des feuilles de vitrosemis, leurs purifications et leurs cultures.

Callogénèse.

Les cals sont induits sur différents explants afin de déterminer lesquels sont les plus propices à fournir de bons rendements en protoplastes. Ainsi, chez le *D. stramonium*, les meilleurs explants à partir desquels on peut obtenir des cals volumineux (et donc de bons rendements en protoplastes) sont les hypocotyles cultivés sur le milieu MS contenant 0,2 mg/l d'ANA. Ces résultats corroborent ceux obtenus en callogénèse par Rodrigues *et al.* (1991), Demeyer *et al.* (1992) et Slaoui *et al.* (2006).

Isolement des protoplastes .

L'objectif de cette partie était d'explorer systématiquement l'importance de certaines conditions pour l'isolement des protoplastes viables de *D. stramonium* à partir de divers tissus : feuilles adultes, feuilles jeunes, cals durs, cals friables.

La cellulase *Trichoderma longibrachiatum* est plus performante. Cette cellulase convient parfaitement aux feuilles de *D. stramonium* qui donnent les meilleurs rendements en protoplastes viables après 3 heures d'agitation comparées aux cals. Les meilleures concentrations de cellulase obtenues en fonction de la nature du tissu et de l'âge varient de 1% pour les feuilles jeunes (1 mois), 1,5% pour les feuilles adultes (4 mois) et les cals durs (63 jours), et 2% pour les cals friables (21 jours). Les meilleures concentrations de macérozymes observées sont 0,02% pour les feuilles (jeunes et adultes) et de 0,01% pour les cals durs et friables.

L'utilisation de mixture d'enzymes (cellulase et macérozyme) donne ainsi de très bons résultats.

La meilleure concentration de l'osmoticum observée dans nos conditions expérimentales est de 0,5 M. Les protoplastes contenus dans une solution d'une concentration de mannitol en dessous ou au dessus de ce seuil (0,5 M) dégèrent soit par éclatement ou par plasmolyse. Pour les travaux futurs, il serait intéressant de travailler sur les osmoticums salins pour évaluer la pertinence de leur utilisation chez le *D. stramonium*. En effet, D'autres auteurs ont satisfait les besoins osmotiques et ont obtenu de très bons résultats avec des sels, tels que KNO₃, KCl et CaCl₂ (Schenk et Hildebrandt, 1969 ; Kameya et Uchimiya, 1972).

L'effet du pH de la solution de macération est variable d'un type de tissu à un autre. Le pH influence significativement l'isolement des protoplastes à partir des feuilles adultes et des cals durs mais pas les feuilles jeunes et les cals friables. Les rendements en protoplastes obtenus avec le pH 5 sont meilleurs que ceux obtenus avec le pH 5,6 aussi bien pour les feuilles adultes que les cals durs. Il apparaît que le pH affecte aussi la viabilité des protoplastes.

Le découpage des feuilles facilite l'action des enzymes. Cependant, ce prétraitement n'est pas nécessaire pour les cals friables vu leur structure. Dans nos conditions expérimentales, les feuilles adultes découpées présentent le meilleur rendement en protoplastes viables.

Chez *D. stramonium*, les feuilles sont le type de tissus le plus approprié pour l'isolement des protoplastes viables par rapport aux cals. Les protoplastes issus des jeunes feuilles seraient plus fragiles que ceux issus des feuilles adultes. Ainsi, ce sont les feuilles adultes qui donnent les meilleurs rendements avec $9,8 \times 10^6$ proto./ g MF dont 92% sont viables.

Purification des protoplastes

La vitesse de centrifugation lors de l'étape de la prépurification est très importante pour séparer les protoplastes des débris. Une faible vitesse de centrifugation (120 x g) ou une vitesse forte (200 x g) affectent négativement la prépurification soit par manque d'efficacité pour séparer les protoplastes des débris ou par leur destruction mécanique. La meilleure combinaison dans nos conditions expérimentales est 150 x g pendant 5 min de centrifugation donnant un rendement de $7,8 \times 10^6$ proto./ ml dont 90% sont vivants.

La purification finale des protoplastes de feuilles de *D. stramonium* sur monocouche 20% de saccharose est plus efficace que la purification sur gradient discontinu de saccharose.

Culture des protoplastes

La culture des protoplastes de *D. stramonium* sur milieu MS à une densité de 10^4 proto./ ml de milieu de culture est convenable pour que les protoplastes régénèrent leur paroi et entrent en divisions.

Le milieu MS contenant 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose et ajusté au pH 5 est le meilleur sur le plan de viabilité et de fréquence d'entrée en divisions (M0).

Nos résultats montrent que la balance hormonale influe sur la préservation de la viabilité des protoplastes mis en culture. La BAP possède un effet plus important que l'ANA concernant le maintien de la viabilité et l'entrée en divisions, au 12^{ème} jour de culture. L'étude de l'interaction de ces deux hormones dans les travaux futures est souhaitable par le test d'autres combinaisons.

Les protoplastes de *D. stramonium* sont exigeants en NH_4NO_3 . En effet, La réduction de la concentration de NH_4NO_3 affecte négativement la régénération de la paroi et l'entrée en divisions des cellules. Le milieu MS contenant la plus forte concentration de NH_4NO_3 testées (1650 mg/l = milieu N0) montre une supériorité par rapport aux deux autres (825 mg/l et 412,5 mg/l). Ce milieu a permis d'obtenir 3% de divisions (stade deux cellules) dont 80% des cellules restent encore vivantes après 12 jours de culture.

Concernant le protocole, d'isolement, de purification et de culture.

Un protocole efficace doit aboutir à un bon rendement en protoplastes viables / g MF. De plus, il doit produire des protoplastes capables de reformer leurs parois cellulaires et de se diviser lorsqu'ils sont mis dans des conditions appropriées de culture. Ainsi selon les résultats obtenus durant cette étude pour l'isolement, la purification et la culture de protoplastes *D. stramonium* on peut adopter le protocole suivant :

Après 04 mois de semis *in vitro* des graines, les feuilles des vitrosemis sont découpés en bandes et mises, durant trois heures, dans une solution de macération MS ajusté à un pH 5 et supplémenté avec 1,5% de cellulase de *Trichoderma longibrachiatum*, 0,02% de macérozyme et 0,5 M de mannitol. Le tout est mis en agitation (100 rpm) à une température de 27°C.

La phase de purification consiste en une préfiltration pour éliminer les débris volumineux avec centrifugation à 150 x g /5 minutes. La purification finale se fait sur monocouche 20% de saccharose avec une centrifugeuse à rotor libre à 80%/ 8 minutes.

Les protoplastes purifiés sont mis en culture à une densité de 10^4 protoplastes/ml dans le milieu MS contenant : 0,18 M de mannitol + 0,18 M de glucose + 0,14 M de saccharose + 0,2 mg/l ANA + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l de 2,4-D + 50 mg de CaCl_2 + 292 mg/l de glutamine et ajusté à pH 5, puis solidifié avec 3,5 g/l d'agarose.

L'étude de l'isolement, de la purification et de la culture des protoplastes de *D. stramonium* devrait être étudiée de manière factorielle à l'avenir afin de mettre en évidence les interactions entre facteurs et de déterminer les optimums. En effet, l'approche adoptée dans ce mémoire, qui consiste à étudier systématiquement chaque facteur à part, est inévitable et préliminaire à une étude factorielle. Ceci permet de mettre en relief les facteurs majeurs les plus influents qui seront pris en considération lors d'un travail factoriel.

Aussi, il serait judicieux de revoir les composantes du milieu de culture surtout les combinaisons des sucres et des hormones, ainsi que l'apport d'autres acides aminés tels que la glycine et la proline, qui sont des constituants des protéines des structure de la paroi primaire des cellules végétales (Calu, 2006).

Références bibliographiques

- Adams T.L. et Townsend J.A. (1983). A new procedure for increasing efficiency of protoplast plating and clone selection. *Plant Cell Reports*, Vol. 2, N° 4 : 165-168.
- Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Amroune S. et Khelifi L. (2005). Ressources génétiques des *Datura* en Algérie. *Acte du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales (INA)*: 212-213.
- Ando A., Itakura M., Yabuki M. et Fujii T. (1989). K^+ and Na^+ uptake activities of suspension culture of *Datura innoxia*. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba. univ.* 42.93-98.
- Assani A., Haïcour R., Wenzel G., Cote F., Bakry F., Foroughi-Wehr B., Ducreux G., Aguillar M.E., Grapin A. (2001). Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa spp.*, *Cavendish sub-group AAA*) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, Vol. 20, N°6 : 482-488
- Assani A., Haïcour R., Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Bakry F., Côte F., Ducreux G., Ambroise A., Grapin A. (2002). Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa spp.*). *Plant science*, 162 (3) : 355-362.
- Baíza A.M., Quiroz-Moreno A., Ruíz J.A. et Loyola-Vargas V.M. (2004). Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol.59, N°1: 9-17.
- Benbadis A. et Bauman F. (1973). Etude comparative de protoplastes obtenus par traitement enzymatique à partir de divers tissus : étude ultrastructurale et culture in vitro. *Colloques internationales C.N.R.S: Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales*. n° 212 : 229–236.
- Bokelmann, G.S. et Roest, S.(1983). Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Plant physiology and biochemistry*, v. 109(3) : 259-265.
- Bouami Guennouni Assimi R. (1986). Comparaison entre la variabilité spontanée et celle provoquée par les rayons X chez le *Datura innoxia* Mill. Multiplié in vitro. *Thèse de Doctorat. Université de paris* .
- Bourgau F., Bouque V., Gontier E. and Guckert A. (1997). Hairy root cultures for the production of secondary metabolites. *AgBiotech News Inf.* 9 (9): 205–208.
- Bourgin J.P.(1978). Isolement de mutants à partir de cellules végétales en culture in vitro. *Physiol.Vég.*, 16(3) : 339-351.
- Bruneton J. (1987). *Elément de phytochimie et pharmacognosie*, Paris : Lavoisier - Tech. & doc., 584 p.
- Buiteveld j., Creemers-Molenaar J. (1994). Plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Plant science*, 100:203-210.

- Calu C. (2006). Constituants de la paroi cellulaire des Végétaux supérieurs. SpectroSciences <http://www.spectrosciences.com/spip.php?article51>.
- Collonnier C., Mulya K., Fock I., Mariska I., Servaes A., Vedel F., Siljak-Yakovlev S., Souvannavong V., Ducreux G., Sihachakr D. (2001). Source of resistance against *Ralstonia solanacearum* in fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Plant science*, vol. 160, no2: 301-313.
- Collonnier C., Fock I., Daunay M.C., Servaes A., Vedel F., Siljak-Yakovlev S., Souvannavong V., Sihachakr D. (2003). Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant science*. vol. 164, n^o 5: 849-861.
- Chabane D., Assani A., Bouguedoura N., Haïcour R., Ducreux G. (2007). Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. *C. R. Biologies*, 330. 392–401.
- Chang M.M. et Loesher W.H.(1991). Effects of preconditioning and isolation conditions on potato (*Solanum tuberosum* L.cv. *Russet Burbank*) protoplast yield for shoot regeneration and electroporation. *Plant Science*, 73:103-109.
- Chupeau Y. et Bourgin J.P. (1980). Les protoplastes de cellules végétales. In Chaussat R. et Bigot C. : la multiplication des plantes supérieures. Ed. Gaultier-Villars, 277 P.
- Cosson L. et Kuntzmann-Cougoul. (1979). La régulation du métabolisme des alcaloïdes tropaniques (hyoscyamine + scopolamine) chez le *Duboisia myoporoides* et les *Datura* cultivées en conditions contrôlées. *Herba Hangarica*, tom.18.n°3 : 135- 141.
- Davey M.R., Anthony P., Power j.B., Lowe K.C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology advances*. 23:131-171.
- De Filippis L.F., Hampp R., Zeigler H.(2000). Membrane permeability changes and ultrastructural abnormalities during protoplast fusion. *J. Plant Physiol.*, 156: 628-634.
- Demeyer K., Vanhaste F., Van de Velde H. and Dejaegere R. (1992). Introductory study for the optimization of growth and alkaloid production by cell cultures of *Datura stramonium* L. *Acta horticultrae* 306:210-218.
- Doerk K., Witte L. et Alfermann W.A.(1991). Identification of tropan alkaloids in hairy root cultures of *Hyoscyamus albus* L. *Z. Naturforsch.* 46c: 519-521.
- Du X.D., Mourad G.S., Williams D. et King J. (1991). Somatic hybrids derived from fusion of a universal hybridizer and a wild type line of *Datura*. *Plant science*.79:111-118.
- Duval J. (1991). Les nématodes de la tomate. Ecological Agriculture Projects :<http://eap.mcgill.ca/agrobio/ab320-01.htm>.
- Elavummoottil O.C., Duret S., Vannereau A., Cosson L. et Mestre J.C. (1988). Selection of lactose-adapted cells in *Vinca minor* and *Datura innoxia* cultures. Location and characterization of 3-Galactosidase and lactase activities. *Plant Science*, 54:83-91.
- Ellouz O., Lakhoua L., Gargouri A. (1994). Polymorphisme de l'AND total des plantes régénérées à partir de protoplastes de pomme de terre .Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? Ed AUPELP-UREF. *John Libbey Eurotext.Paris* :241-249.

- Eriksson T.R.(1986). Protoplast isolation and culture. *in* Fowke L.C. et Constabel F. (1986). Plant protoplasts. CRC Press 2eme edition: 1-20.
- Evans P.K., Woodcock J. et Keates A.G. (1973). Step towards cell fusion: studies on cereal protoplasts and protoplasts of haploid tobacco. *Colloq. Int. C.N.R.S n° 212* : 547-549.
- Fock I., Collonnier C., Luisetti J., Purwito A., Souvannavong V., Vedel F., Servaes A., Ambroise A., Kodja H., Ducreux G., Sihachakr D. (2001). Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant physiology and biochemistry. vol. 39, no10*: 899-908.
- Foxe M. J. and Prakash J. (1983). Use of potato protoplasts in regeneration and virus resistance studies. *6th international protoplast symposium* :168-169.
- Furner I.J., King J. et Gamborg O.L.(1978). Plant regeneration from protoplasts isolated from a predominantly haploid suspension culture of *Datura innoxia* (Mill.). *Plant Science Letters, Vol.11, Issue 2* : 169-176.
- Galbraith D.W., Afonso C.L. et Harkins K.R. (1984). Flow sorting and culture of protoplasts: conditions for high-frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplasts of suspension cultures of *Nicotiana*. *Plant cell reports. 3*:151-155.
- Gamborg O.L. et Mailler R.A. (1973). Isolation, culture, and uses of plant protoplasts. *Canadian journal of botany.51*:1795-1799.
- Gamborg O.L., Kao K.N. , Miller R.A., Fowke L.C. et Constabel F. (1973). Cell regeneration, division and plant development from protoplasts. *Collq. Int. Cent. Nat. Bech. Sci., 212* : 155- 173.
- Gigot C., Schmitt C., Hirth L.(1972). Modifications ultrastructurales observées au cours de la préparation de protoplastes à partir de cultures de tissus de Tabac (*Nicotiana glutinosa* L.). *Journal of Ultrastructure Research, Vol.41, Issue 5* : 418-432.
- Glimelius K.(1984): High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. *Physiologia Plantarum, 61*: 38–44.
- Guignard J.L., Cosson L., Henry M. Abrégé de Phytochimie. Ed. Masson, Paris, 1985, 224p.
- Guo W.W., Cheng Y.J., Deng X.X. (2002).Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata* .*Plant cell rep., 20*: 829-834.
- Guo W.W., Prasard D., Cheng Y.P., Serreno P., Deng X.X., Grosser J.W.(2004). Targeted cybridization in citrus: transfer of satuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant cell rep., 22*:752-758.
- Harada H. (1973). Culture “in vitro” de protoplasts obtenus a partir de tissue foliaire D’ipomoea hederifolia L. et de Calystegia sepium (L.) R.Br. Colloques internationales C.N.R.S: Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales. n° 212 : 127-129.
- Harisha S. (2007). Biotechnology procedures and experiments handbook. Ed. *Infinity Science Press LLC, Engeeniring serie, Hingham, Massachusetts, New Delhi, India, 711 p.*

- Herouart D., Gontier E., Sabgwan R.S. et Sangwan-Norrel. (1991). Analysis of the potential use of androgenic *Datura innoxia* for the development of cell cultures producing high amounts of tropane alkaloids. *J. Exp.Bot.* 12 (241): 1073-1076.
- Hohe A. et Reski R. (2002). Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Science*, 163: 69-74.
- Holden M. et Tracey M.V. (1950). A study of enzymes that can break down tobacco-leaf components. 2. Digestive juice of *Helix* on defined substrates. *Biochem J.*, 47(4): 407-414.
- Houmani, Z. (1999). Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Thèse de Doctorat. INA El-harrach, Algérie, 124p.
- Houmani Z. et Cosson L. (2000). Quelques espèces algériennes a alcaloïdes tropaniques. *Ethnopharmacology. Edt. ERGA.* : 205-219.
- Houmani Z., Cosson L., Corbineau F. et Come D. (1994). Etude de la teneur en hyoscyamine et scopolamine d'une population sauvage de *Datura stramonium* L. en Algérie. *Acta Bot. Gallica.* 141 (1) : 61-66.
- Hu Q., Hansen L.N., Laursen J., Dixelius C., Andersen S.B. (2002). Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding. *Theor. Appli. Genet.*, 105: 834-840.
- Ishii S. et Mogi Y. (1983). Identification of Enzymes That Are Effective for Isolating Protoplasts from Grass Leaves. *Plant Physiology* 72:641-644.
- Ishii S. (1989). Enzymes for the isolation of protoplasts. *biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 8: 24-32.*
- Kameya T. et Uchimiya H. (1972). Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. *Planta, Vol. 103, N°4* : 356-360.
- Kamoun-Mehri R. (2001). Effet de la pectolyase Y-23 et de la cellulose RS sur le rendement en protoplastes viable de *Prunus cerasus* L. *Biotecnol. Agron. Soc. Environ* 5(2) :99-104.
- Kanai R. et Edwards G. E. (1973). Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Plant Physiol.* 51 :1133-1137
- Khelifi L. et Favre j.M. (1995). Facteurs affectant le rendement et le comportement en culture des protoplastes de mélèze d'Europe : *Larix decidua* Mill. *Les Annales de l'Institut National d'Agronomie El-Harrach* 16(1-2) pp160-175.
- Kihara M., Funatsuki H. (1994). Fertile plant regeneration from barley (*Hordeum vulgare* L.) protoplasts isolated from long-term suspension culture. *Breeding science, vol. 44, no2* :157-160.
- Kihara M., Funatsuki H. (1995). Fertile plant regeneration from barley (*Hordeum vuzdgare* L.) protoplasts isolated from primary calluses. *Plant Science* 106: 115-120.
- Kikuta Y., Saito W., Okazwa Y. (1983). Viability and development of potato protoplast culture. *Experientia. Supplementum*, 45 : 56-57.

- Komai F., Masuda K., Harada T., Okuseh I. (1996). Plant regeneration from adventitious roots of spinach (*Spinucicroleracea* L.) grown from protoplasts. *Plant Science*, 120: 89- 94.
- Kouider M., Hauptmann R., M.Widdholm J., Skirvin R.M. et Korban S.S.(1984).Callus formation from *Malus x domestica* cv. 'Jonathan' protoplasts. *Plant cell reports*, 3:142-145.
- Liqing Z., Bochu W., jing Z., Lingxi C., Chuanyun D., Chuanren D.(2005).Protoplasts isolation of callus in *Echinacea augustifo lia*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 44:1-5.
- Liu W., Zhu W.M. (2000). Production and regeneration of *Trichosporon cutaneum* protoplasts. *Process Biochemistry* 35: 659–664.
- Liu JH, Deng XX. (2002). Regeneration and analysis of citrus interspecific mixoploid hybrid plants from asymmetric somatic hybridization.*Euphytica*, 125:13-20.
- Lovett J.V. , Ryuntyu M.Y. et Liu D.L. (1989). Allelopathy, chemical communication, and plant defense. *Journal of Chemical Ecology*, Vol.15, N°4: 1193-1202.
- Lurquin P.F. (1977). Integration versus degradation of exogenous DNA in Plants: an Open Question, in progress in nucleid acid research and molecular biology, 20: 161-207.
- Margara J. (1989).Bass de la multiplication végétative, les méristemes et l'organogenèse. *INRA- versailles*, 262 p.
- Masson J., Lecerf M., Rousselle P., Perennec P. et Pelletier G. (1987). Plant regeneration from protoplasts of diploid potato derived from crosses of *Solanum tuberosum* with wild solanum species. *Plant Science*, 53:167-176.
- Mayer Y et Abel. W.O. (1975). Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo wall and wall formation. *Planta*. 125: 1-13.
- Mechler E. , Kohlenbach H.W. (1978). Alkaloid Content in Leaves of Diploid and Haploid *Datura* Species. *Planta Med*, 33(4): 350-355.
- Meyer Y. et Abel W.O.(1975). Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts. *Planta*, Vol.123, N°1 : 33-40.
- Mii M., Seeni S., Fowke L.C. et King J. (1985). The isolation and cultivation of protoplasts from cell suspensions of a pantothenate-requiring auxotroph of *Datura*. *Can. J. Bot.* 63:779-783.
- Millam S., Payne L.A. et Mackay G.R.(1995).The integration of protoplast fusion-derived material into a potato breeding programme –a review of progress and problems. *Euphytica* 85:451-455.
- Mizuhiro M., Kenichi Y., Ito K., Kadowaki S., Ohashi H., Mii M. (2001). Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Primula malacoides* and *Primula obconica*. *Plant Science*, 160: 1221–1228.
- Murashige M. and Skoog T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: pp. 473–497.
- Nagata T. et Takebe I. (1970). Cell wall regeneration and cell division in isolated Tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92:301-308.

-
- Nagy J.I. et Maliga P. (1976). Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Z.Pflanzenphysiol.* 78:453-455.
- Nassour M., Dorion N. (2002). Plant regeneration from protoplasts of Micropropagated *Pelargonium x hortorum* 'Alain'; effect of some environmental and medium factors of protoplasts plant efficiency. *Plant science.*163:169-176.
- Okuno T. et Furusawa I. **A. (1977). Simple method for isolation of intact mesophyll protoplasts from cereal plants.** *Plant Cell Physiol* , 18: 1357-1362.
- Pan Z.G., Liu C.Z., Murch S.J., El-Demerdash M., Saxena P.K. (2003). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* L. and *Echinops spinosissimus* Turra .*Plant Science* 165: 681-687.
- Park Y.G., Han K.H. (1986). Isolation and culture of mesophyll protoplasts from in vitro cultured *Populus alba* x *P. glandulosa*. *journal Korean for soc*, 73: 33-42.
- Power J.B. et Coking E.C.(1970). Isolation of leaf protoplasts: macromolecule uptake and growth substance response. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 21, N°: 64-70.
- Quezel P. et Santa C. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2, CNRS, Paris, 1170 P.
- Quian W., Liu R., Meng J.(2003).Genetic effects on biomass yield in interspecific hybrids between *Brassica napus* and *B. rapa* .*Euphytica*, 134: 9-15.
- Ramírez-Benítez J., Hernández-Sotomayor S., Muñoz-Sánchez J. (2009). The location of aluminium in protoplasts and suspension cells taken from *Coffea arabica* L. with different tolerance of Al. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 103, Issue 11: 1491-1496.
- Reddy C.R.K., Dipakkore S., Kumar G.R., Jha B., Cheney D.P., Fujita Y. (2006). An improved enzyme preparation for rapid mass production of protoplasts as seed stock for aquaculture of macrophytic marine green algae. *Aquaculture*, 260: 290–297.
- Rhodes C.A., Lowe K.S. et Ruby K.L. (1988). Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Bio/Technology*, vol. 6, n^o 1: 56-60.
- Robinson H.L. et W.Deacon J. (2001). Protoplasts preparation and transient transformation of *Rhizoctonia solani*. *Mycol.Res* 105(11): 1295-1303.
- Rodriguez B., figueiredo S.F.L. et Esquibel M.A. (1991). Callogenesis and micropropagation of *Datura insignis*. *R.Bras. Fisiol. Veg.*3(2) :63-68.
- Rolard B. (2002). Pollution chimique et radioactive: les plantes au secours de l'homme. <http://perso.club-internet.fr/phyto200/pollution.html>
- Roy S.C. et De K.K. (1983). Study of hypocotyl and mesophyll protoplasts. *Experientia Supplementum*, vol. 45 : 22-23.
- Sahgal P., Martinez G.V., Roberts C., Tallman G. (1994). Regeneration of plants from cultured guard cell protoplasts of *Nicotiana glauca* (Graham). *Plant Science*, 97: 199-208.
- Saibi L. (2005). Callogénèse induite sur différents types d'explants prélevés sur des vitrosemis de *Datura stramonium* L.Thèse d'ingénieur, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach.
-

- Sarawaneeyaruk S., Iwakawa H.O., Mizumoto H., Murakami H., Kaido M., Mise K., Okuno T. (2009). Host-dependent roles of the viral 5' untranslated region (UTR) in RNA stabilization and cap-independent translational enhancement mediated by the 3' UTR of Red clover necrotic mosaic virus RNA1. *Virology*, Vol.391, Issue 1: 107-118.
- Saxena P.K. et King J. (1985). Reuse of enzymes for isolation of protoplasts. *Plant Cell Reports*. vol4, N° 6:319-320.
- Saxena P.K., Hammerlindl J., Crosby W.L., King J. (1990). Introduction of resistance to kanamycin into the protoplasts from a pantothenate-requiring auxotrophic cell line of *Datura innoxia* Mill. via direct gene transfer. *Plant science*, vol. 70, n° 1 : 105-114.
- Schenk, R.U. et Hildebrandt A.C. (1969). Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases. *Crop Sci.* 9: 629–631.
- Schieder O. (1976). Isolation of Mutants with Altered Pigments after Irradiating Haploid Protoplasts from *Datura innoxia* Mill. with X-Rays. *Molec. gen. Genet.* 149: 251-254.
- Schirawski J., Planchais S., Haenni A.L. (2000). An improved protocol for the preparation of protoplasts from an established *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture and infection with RNA of turnip yellow mosaic tymovirus : a simple and reliable method. *Journal of virology methods* 86: 85-94.
- Schmidt-Rogge T., Meixner M., Srivastava V., Guha-Mukherjee S. et Schieder O. (1993). Transformation of haploid *Datura innoxia* protoplasts and analysis of the plasmid integration pattern in regenerated transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 12:390-394.
- Schween G., Hohe A., Koprivova A., Reski R. (2003). Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplasts regeneration and early protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of plant physiology*, 212: 209-213.
- Selby K. et Maitland C.C. (1967). The cellulase of *Trichoderma viride*: Separation of the components involved in the solubilization of cotton. *Biochem. J.*, 104(3): 716–724.
- Shahin. E.A. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theor. Appl. Genet.*, 69:235-240.
- Schaskolskaya, N.D., Sacharovskaya G.N. et Sacharova E.V. 1973. The optimal conditions for isolation and incubation of barley mesophyll protoplasts. In *Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales : introduction d'information génétiques dans des protoplastes, fusion de cellules somatiques de plantes. Colloques internationaux C.N.R.S N° 212* :93 - 98.
- Sinha A., Wetten A.C. et Caligari P.D.S. (2003). Optimisation of protoplast production in white lupin. *Biologica plantarum* 47(1).21-25.
- Slaoui M., Khelifi L, Rezine R, Amdoun R, Morsoli A. et Amroune S. (2006). Embryogenèse somatique et bourgeons néoformés induits sur explants issus de vitrosemis de *Datura stramonium* L. d'origine algérienne. *Rev. Biotechnologies. Végétales*, 00:33-36.
- Slaoui M. (1990). Préparation et culture de protoplastes à partir de différents types de matériel chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) : feuilles de semis, feuilles et calcs de vitroplants. Comparaison de deux clones d'âge et de provenance différent. Thèse de Doctorat, Université de Nancy (France), 220 p.

- Smith M.A.L., Plata J.P. et McCown B.H.(1984). The measurement of osmotic balance in plant protoplast manipulations. *Plant Science letters* 33:249-258.
- Srinivasan C. et Vasil I.K.(1986). Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J. Plant physiol.*, 126: 41-48.
- Sun Y.H., Xue Q.Z., Ding C.M., Zhang X.Y., Zhang L.L., Wang W.F., Ali S. (2005). Somatic cybridization between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* based on a single inactivation procedure of nuclear donor parental protoplasts. *Plant Science*, 168 : 303–308.
- Tabaeizadeh Z., Bunisset-Bergounioux C., Perennes C. (1984). Environmental growth conditions of protoplast source plants: effects on subsequent protoplast division in two tomato species. *Physiologie végétale*, vol. 22, no2, pp. 223-229.
- Takebe I., Otsuki Y. et Aoki, S. (1968). Isolation of tobacco mesophyll cells intact and active state. *Plant Cell Physiol.*, Vol. 9, No. 1 : 115-124.
- Uchimiya H. et Murashige T. (1974). Evaluation of Parameters in the Isolation of Viable Protoplasts from Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 54: 936-944.
- Verdrager J.(1978). Ces médicaments qui nous viennent des plantes, ou les plantes médicinales dans les traitements modernes. Ed. Maloine, 233 p.
- Von Keller A., Coster H.G.L., Schnabl H., Mahaworasilpa T.L. (1997). Influence of electrical treatment and cell fusion on cell proliferation capacity of sunflower protoplasts in very low density culture. *Plant science* 126:79-86.
- Vouyouklis G.V. (1981). Une méthode d'isolement de protoplastes du palmier à huile *Elaeis guineensis*. *Jacq. Phytol.*, 4 : 169-178.
- Wallin A. et Eriksson T.(1972). Protoplast Cultures from Cell Suspensions of *Daucus carota*. [Physiologia Plantarum](#) , [Vol. 28, Issue 1](#) : 33 – 39.
- Wang J., Turina M., Medina V., Falk B.W.(2009). Synergetic interaction between the *potyvirus turnip*, mosaic virus and the *crinivirus* Lettuce infections yellows virus in plants and protoplasts. *Virus research* 144(1-2): 163-170.
- Xu Z.H., Davey M.R. et Cocking E.C.(1982). Callus formation from root protoplasts of *Glycine max* (soybean). *Plant Science Letters*, Vol.24, Issue 1 : 111-115.
- Yamada Y. et Nakaminami M. (1973). The isolation and fusion of protoplasts from alkaloid plant cells cultured in vitro. In Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales : introduction d'information génétiques dans des protoplastes, fusion de cellules somatiques de plantes. *Colloques internationaux C.N.R.S N° 212* : 373-383.
- Yang Q. et Laliberté S. (1996). Cell division and microcolony formation in protoplasts from mature material of hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry). *Plant science*, 117: 159-165.
- Yvon M., Monsion B., Martin J.F., Gutiérrez S., Blanc S.(2009). PCR-based amplification and analysis of specific viral sequences from individual plant cells. *Journal of virology methods*, 159(2): 303-307.
- Zhou A., Xia G., Chen H. and Hu H. (2001). Comparative study of symmetric and asymmetric somatic hybridization between common wheat and *Haynaldia villosa*. *Science in China Series C: Life Sciences*, Vol. 44, N° 3 : 294-304.

Zrýd J.P. (1988). Culture de cellules, tissus et organs végétaux: fondements théoriques et utilisations pratiques. *Presses polytechniques romandes. CH-1015, Lausanne, 308p.*

Annexes.

Les moyennes suivies par la même lettre alphabétique sont statistiquement semblables selon les Test 95% de Newman & Keuls.

1. Partie Callogénèse.

Annexe 1. Tableau de l'ANOVA de l'effet des balances hormonales sur la surface moyenne des cals issues des feuilles et des cals de *D. stramonium* au 65^{ème} jour de culture.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	1,12399E6	5	224798,	45,80	0,000***
Intra-groupes	412333,	84	4908,72		
Total (Corr.)	1,53632E6	89			

Annexe 2. Test 95% de Newman et Keuls.

Traitements	Moyenne
T1 - Feuilles	67,5 d
T1 - Hypocotyle	382,8 a
T2 - Feuilles	141,3 c
T2- Hypocotyle	158,8 c
T3 - Hypocotyle	248,8 b
T3- Feuilles	59,4 d

2. Isolement des protoplastes.

2.1. Nature de la cellulase et durée de macération.

Annexe 3. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la nature de la cellulase sur le nombre moyen de protoplastes totaux et viables issues des feuilles et des cals.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	1,07438E15	23	4,67123E13	99,31	0,0000***
Intra-groupes	1,016E14	216	4,7037E11		
Total (Corr.)	1,17598E15	239			
Viabilité					
Inter-groupes	1.00856E15	23	4.38505E13	138.27	0.0000***

Annexe 4. Test 95% de Newman & Keuls.

Niveau	Nombre moyen de protoplastes totaux (x 10 ⁶)	Viabilité (%)
Aspergillus 1-PC	0,0 ^g	0,0 ^E
Aspergillus 1-PF	0,0 ^g	0,0 ^E
Aspergillus 2-PC	0,0 ^g	0,0 ^E
Aspergillus 2-PF	0,0 ^g	0,0 ^E
Aspergillus 3-PC	0,5 ^{fg}	60 ^C
Aspergillus 3-PF	1,9 ^{cde}	94,7 ^A
Aspergillus 4-PC	0,5 ^{fg}	20 ^D
Aspergillus 4-PF	1,8 ^{cde}	88,9 ^A
Aspergillus 5-PC	0,5 ^{fg}	20 ^D
Aspergillus 5-PF	0,6 ^{fg}	66,6 ^C
Aspergillus 6-PC	0,0 ^g	0 ^E
Aspergillus 6-PF	0,0 ^g	0 ^E
Trichoderma 1-PC	0,0 ^g	0 ^E
Trichoderma 1-PF	2,4 ^c	91,6 ^A
Trichoderma 2-PC	1,3 ^{def}	84,6 ^A
Trichoderma 2-PF	4,8 ^b	95,8 ^A
Trichoderma 3-PC	2,1 ^{cd}	95,2 ^A
Trichoderma 3-PF	7,4 ^a	97,3 ^A
Trichoderma 4-PC	1,8 ^{cde}	77,7 ^{AB}
Trichoderma 4-PF	7,2 ^a	94,4 ^A
Trichoderma 5-PC	1,1 ^{ef}	0 ^E
Trichoderma 5-PF	4,4 ^b	72,7 ^B
Trichoderma 6-PC	1,1 ^{ef}	0 ^E
Trichoderma 6-PF	2,4 ^c	70,8 ^B

2.2. Concentration en Mannitol.

Annexe 5. Tableau de l'ANOVA de l'effet des concentrations de mannitol sur l'isolement des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	1,16142E15	19	6,11274E13	24,47	0,0000
Intra-groupes	4,496E14	180	2,49778E12		
Total (Corr.)	1,61102E15	199			
Viabilité					
Inter-groupes	1,0851E15	19	5,71103E13	26,61	0,0000

Annexe 6. Test 95% de Newman & Keuls.

Niveau	Nombre moyen de protoplastes totaux (x 10 ⁶)	Viabilité (%)
0,4-PCD	1,5 ^{ef}	66,6 ^C
0,4-PCF	1 ^f	90 ^A
0,4-PFA	4,6 ^c	95,6 ^A
0,4-PJF	3,8 ^{cd}	84,2 ^B
0,5-PCD	2,4 ^{def}	91,6 ^A
0,5-PCF	2, ^{def}	100 ^A
0,5-PFA	10 ^a	98 ^A
0,5-PJF	7 ^b	85,7 ^B
0,6-PCD	2,2 ^{def}	77,2 ^{BC}
0,6-PCF	1,8 ^{def}	88,8 ^B
0,6-PFA	6,4 ^b	90,6 ^A
0,6-PJF	4,8 ^c	75 ^{BC}
0,7-PCD	1,2 ^{ef}	75 ^{BC}
0,7-PCF	0,9 ^f	66,6 ^C
0,7-PFA	3,8 ^{cd}	68,4 ^{BC}
0,7-PJF	2 ^{def}	70 ^{BC}
0,8-PCD	0,7 ^f	57,14 ^C
0,8-PCF	0,5 ^f	40 ^D
0,8-PFA	3,4 ^{cde}	58,8 ^C
0,8-PJF	1,4 ^{ef}	57,1 ^C

2.3. Concentration de la cellulase.

Annexe 7. Tableau de l'ANOVA de l'effet des concentrations de la cellulase sur l'isolement des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	1,14149E15	15	7,60996E13	17,98	0,0000
Intra-groupes	6,095E14	144	4,23264E12		
Total (Corr.)	1,75099E15	159			
Viabilité					
Inter-groupes	1,08458E15	15	7,2305E13	19,20	0,0000

Annexe 8. Test 95% de Newman & Keuls.

Niveau	Nombre moyen de protoplastes totaux (x 10 ⁶)	Viabilité (%)
0,5-PCD	0,1 ^e	100 ^A
0,5-PCF	0,4 ^e	75 ^C
0,5-PFA	4,8 ^c	91,6 ^A
0,5-PJF	6 ^{bc}	96,6 ^A
1-PCD	0,7 ^e	85,7 ^B
1-PCF	0,2 ^e	100 ^A
1-PFA	4 ^c	95 ^A
1-PJF	8,2 ^a	97,5 ^A
1,5-PCD	1,6 ^{de}	93,75 ^A
1,5-PCF	0,3 ^e	100 ^A
1,5-PFA	7,2 ^{ab}	100 ^A
1,5-PJF	5,6 ^{cb}	96,4 ^A
2-PCD	0,4 ^e	100 ^A
2-PCF	1 ^e	100 ^A
2-PFA	3,4 ^{cd}	100 ^A
2-PJF	4 ^c	85 ^B

2.4. Concentration de la macérozyme.

Annexe9. Tableau de l'ANOVA de l'effet des Concentrations de la macérozyme sur l'isolement des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	6,056E14	15	4,03733E13	11,25	0,0000
Intra-groupes	5,168E14	144	3,58889E12		
Total (Corr.)	1,1224E15	159			
Viabilité					
Inter-groupes	5.40094E14	15	3.60062E13	8.89	0.0000

Annexe 10. Test 95% de Newman & Keuls.

Niveau	Nombre moyen de protoplastes totaux (x 10 ⁶)	Viabilité (%)
0,005-PCD	0,4 ^e	100 ^A
0,005-PCF	2,4 ^{cde}	75 ^D
0,005-PFA	3,2 ^{bcd}	93,5 ^{AB}
0,005-PJF	2 ^{cde}	100 ^A
0,01-PCD	3,3 ^{bcd}	100 ^A
0,01-PCF	3,1 ^{bcd}	90,3 ^{AB}
0,01-PFA	4,2 ^{bc}	95,2 ^{AB}
0,01-PJF	3,8 ^{bc}	100 ^A
0,015-PCD	1,5 ^{cde}	86,6 ^B
0,015-PCF	2,2 ^{cde}	81,8 ^C
0,015-PFA	5,6 ^{ab}	85,7 ^B
0,015-PJF	5,2 ^{ab}	92,3 ^{AB}
0,02-PCD	1 ^{de}	90 ^{AB}
0,02-PCF	2,3 ^{cde}	69,5 ^D
0,02-PFA	7,4 ^a	91,8 ^{AB}
0,02-PJF	6,8 ^a	94,1 ^{AB}

2.5. PH de la solution de macération.

Annexe 11. Tableau de l'ANOVA de l'effet du pH de la solution de macération sur l'isolement des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	8,80388E14	7	1,2577E14	36,06	0,0000
Intra-groupes	2,511E14	72	3,4875E12		
Total (Corr.)	1,13149E15	79			
Viabilité					
Inter-groupes	8,37188E14	7	1,19598E14	32,90	0,0000

Annexe 12. Test 95% de Newman & Keuls.

Niveau	Nombre moyen de protoplastes totaux (x 10 ⁶)	Viabilité (%)
pH 5-PTCF	2,2 ^c	95,4 ^A
pH 5-PTCD	2,9 ^c	96,5 ^A
pH 5-PTFA	9,0 ^a	97,7 ^A
pH 5-PTJF	9,8 ^a	95,9 ^A
pH 5,6-PTCF	1,3 ^c	91,3 ^A
pH 5,6-PTCD	1,5 ^c	59,2 ^C
pH 5,6-PTFA	6,4 ^b	80,7 ^B
pH 5,6-PTJF	8 ^{ba}	83 ^B

2.6. Effet des prétraitements : découpage ou non du matériel végétal.

Annexe 13. Tableau de l'ANOVA de l'effet des des prétraitements sur l'isolement des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	8,46188E14	7	1,20884E14	42,94	0,0000
Intra-groupes	2,027E14	72	2,81528E12		
Total (Corr.)	1,04889E15	79			
Viabilité					
Inter-groupes	6,78688E14	7	9,69554E13	26,27	0,0000

Annexe 14. Test 95% de Newman & Keuls.

Niveau	Nombre moyen de protoplastes totaux (x 10 ⁶)	Viabilité (%)
decoupees-PTCD	2,5 ^d	80 ^B
decoupees-PTCF	1,7 ^d	94,1 ^A
decoupees-PTFA	10 ^a	86,5 ^B
decoupees-PTJF	8 ^b	85 ^B
non decoupees-PTCD	1,2 ^d	50 ^C
non decoupees-PTCF	1,9 ^d	92,4 ^A
non decoupees-PTFA	7,2 ^{cb}	83,3 ^B
non decoupees-PTJF	5,8 ^c	44,8 ^C

2.7. Effet de la nature du tissu

Annexe 15. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la nature du tissu sur l'isolement des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	3,00867E14	2	1,50433E14	50,71	0,0000***
Intra-groupes	8,01E13	27	2,96667E12		
Total (Corr.)	3,80967E14	29			
Viabilité					
Inter-groupes	13 398E14	2	11 699E14	166 5810	00000***

Annexe 16. Test 95% de Newman & Keuls.

Type de tissu	PT ($\times 10^6$)	Viabilité (%)
feuilles	8,8 ^a	97,73 ^A
cals durs	2,7 ^b	90,0 ^B
cals friables	1,6 ^b	90 ^B

2.8. Effet de l'âge des feuilles.

Annexe 17. Tableau de l'ANOVA de l'effet de l'âge des feuilles sur l'isolement des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	3,92E13	1	3,92E13	23,84	0,0001***
Intra-groupes	2,96E13	18	1,64444E12		
Total (Corr.)	6,88E13	19			
Viabilité					
Inter-groupes	4.5E13	1	4.5E13	45.00	0.0000***

3.Purification des protoplastes.

3.1. prépurification : Effet de la vitesse et du temps centrifugation.

Annexe 18. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la vitesse et du temps centrifugation sur la purification des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux récupérés					
A : Vitesse de centrifugation	2,1689E+13	2	1,0844E+13	4,9348314	0.0095**
B : Temps de centrifugation	4,3262E+14	2	2,1631E+14	98,433707	0.0001***
A x B	6,5511E+13	4	1,6378E+13	7,4528089	0.0001***
Viabilité					
A : Vitesse de centrifugation	1,9467E+13	2	9,7333E+12	4,3414096	0.0162*
B : Temps de centrifugation	4,088E+14	2	2,044E+14	91,160602	0.0001***

Annexe 19. Test 95% de Newman & Keuls.

vitesse et du temps de centrifugation	PT récupérés (%)	Viabilité (%)
120 x G-2 min	3,9 ^d	91,4 ^A
120 x G-5 min	11,1 ^d	75,2 ^B
120 x G-8 min	17,6 ^{cd}	65,6 ^C
150 x G-2 min	33,4 ^b	77,3 ^B
150 x G-5 min	55,7 ^a	58,5 ^C
150 x G-8 min	49,6 ^a	36,0 ^D
200 x G-2 min	26,5 ^c	33,2 ^D
200 x G-5 min	21,2 ^{cd}	18,0 ^E
200 x G-8 min	16,4 ^{cd}	7,7 ^{CD}

3.2. Purification finale : Effet de la concentration de saccharose.

Annexe 20. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la concentration de saccharose sur la purification des protoplastes.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Protoplastes totaux					
Inter-groupes	1,26667E14	2	6,33333E13	22,50	0,0000***
Intra-groupes	7,6E13	27	2,81481E12		
Total (Corr.)	2,02667E14	29			
Viabilité					
Inter-groupes	1.28267E14	2	6.41333E13	25.02	0.0000***

Annexe 21. Test 95% de Newman & Keuls.

concentration de saccharose	PT récupérés (%)	Viabilité (%)
20%	54,5 ^a	71,3 ^A
30%	14,7 ^b	54,6 ^B
40%	4,9 ^c	41,1 ^C

4. Culture de protoplastes.

4.1. Effet de la densité des protoplastes.

Annexe 22. Tableau de l'ANOVA de l'effet de la densité des protoplastes au 12^{eme} jour de culture.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Viabilité					
Inter-groupes	338000,	1	338000,	147,67	0,0000***
Intra-groupes	41200,0	18	2288,89		
Total (Corr.)	379200,	19			
Protoplastes entrés en divisions.					
Inter-groupes	1,07013E10	1	1,07013E10	7704954,6	0,0000***

4.2. Effet du sucre et du pH du milieu de culture.

Annexe 23. Tableau de l'ANOVA de l'effet du sucre et du pH du milieu de culture au 12^{eme} jour de culture.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Viabilité					
A:milieu	491430,	2	245715,	206,68	0,0000***
B:pH	64681,7	1	64681,7	54,41	0,0000***
INTERACTIONS					
AB	31163,3	2	15581,7	13,11	0,0000***
Protoplastes entrés en divisions.					
A:milieu	2,45921E8	2	1,22961E8	69709,97	0,0000***

Annexe 24. Test 95% de Newman & Keuls.

Sucre x pH	Viabilité (%)	Pourcentage de protoplastes entrés en divisions (%)
M0 - pH 5	80 ^a	3 ^A
M0 - pH 5,9	60 ^b	2,2 ^B
M1 - pH 5,9	30 ^d	0,4 ^D
M1 - pH 5	46,15 ^c	0,71 ^D
M2 - pH 5	45,4 ^c	1,17 ^C
M2 - pH 5,9	35,7 ^d	0,8 ^D

4.3. Effet des hormones.

Annexe 25. Tableau de l'ANOVA de l'effet Effet des hormones au 12^{eme} jour de culture.

Source	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Viabilité					
Inter-groupes	2,99556E13	2	1,49778E13	6,37	0,0026**
Intra-groupes	2,04533E14	87	2,35096E12		
Total (Corr.)	2,34489E14	89			
Protoplastes entrés en divisions.					
Inter-groupes	3 31556E13	2	1 65778E13	6 91	0 0016**

Annexe 26. Test 95% de Newman & Keuls.

Balance hormonale	Viabilité (%)	Pourcentage de protoplastes entrés en divisions (%)
H0	80 ^a	3 ^a
H1	64 ^b	1,19 ^b
H2	46 ^c	1,13 ^b

4.5. Effet de la concentration de NH_4NO_3 .

Annexe 27. Tableau de l'ANOVA de l'effet Effet des hormones au 12^{eme} jour de culture.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Viabilité					
Inter-groupes	567127,	2	283563,	186,74	0,0000***
Intra-groupes	41000,0	27	1518,52		
Total (Corr.)	608127,	29			
Protoplastes entrés en divisions.					
Inter-groupes	7.79083E7	2	3.89542E7	210352.48	0.0000***

Annexe 28. Test 95% de Newman & Keuls.

NH_4NO_3	Viabilité (%)	Pourcentage de protoplastes entrés en divisions (%)
N0	80 ^a	3 ^A
N1	51,8 ^b	0,73 ^B
N2	41,1 ^c	0,13 ^C

Annexe 29. Composition du milieu Murashige et Skoog (1962).

Éléments minéraux	concentration
Nitrate d'ammonium (NH_4NO_3)	1650 mg/l
Acide borique (H_3BO_3)	6,2 mg/l
Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, \text{H}_2\text{O}$)	440 mg/l
Chlorure de cobalt ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025 mg/l
Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	370 mg/l
Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	0,025 mg/l
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	170 mg/l
Sulfate de fer ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	27,8 mg/l
Nitrate de potassium (KNO_3)	1.900 mg/l
Sulfate de manganèse ($\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$)	22,3 mg/l
Iodure de potassium (KI)	0,83 mg/l
Molybdate de sodium ($\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	0,25 mg/l
Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	8,6 mg/l
EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA}, 2\text{H}_2\text{O}$)	37,2 mg/lb
Additifs organiques communs	concentration
i-Inositol	100 mg/l
Acide nicotinique	0,5 mg/l
Pyridoxine / HCl	0,5 mg/l
Thiamine / HCl	0,1 mg/l