

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE
ET POPULAIRE**



**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIER
ET DE LA RECHERCHESCIENTIFIQUE**



**Université Saad Dahleb, Blida I
Faculté des sciences de la nature et de la vie**

Département des

Biotechnologies MÉMOIRE

**De fin d'Etudes en Vue de l'Obtention du Diplôme de
Master en Agronomie**

Spécialité : système de production agro-écologique

Thème

**La Micropropagation et La
Calogènes du Myrte (Myrtus
Communis L.)**

Présenté par : ABDALLAH EL-HIRTSI BESMA

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme Mouas Y..... M.C.B

Examinatrice : Mr Boutahraoui..... M.C.B

Promotrice : Mme Kebour Dj..... Professeur

Année Universitaire : 2019-2020

REMERCIEMENTS

Au terme de cette étude, je remercie avant, Dieu tout puissant de m'avoir guidé de suivre le chemin de la science et m'avoir permis la réalisation de ce présent travail.

Tout d'abord, qui m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.

Je tiens vivement à exprimer mes profondes reconnaissances et gratitude au mon

*Encadreur **Mme. KABOUR DJ**, Professeur à l'université de Blida 1, qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations ainsi que, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche m'ont permis de mener à terme ce projet. Son encadrement était des plus exemplaires.*

*Ma gratitude et mes vifs remerciements vont aussi à **Mell Mouas A** au Département de Biotechnologie de Blida 1 qui n'a pas hésiter à présider le jury de ce mémoire.*

*J'exprime aussi mes vifs remerciements à **Ms Boutahraoui** Docteur à l'Université de Blida 1, de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.*

Enfin, ce travail n'aurait pas été mené à terme sans les concessions et les encouragements de mes parents et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels je dis tout simplement merci.

DEDICACES

A ma mère, A mon père

**...pour leurs sacrifices et leurs efforts consentis,
qu'ils Trouvent ici l'expression de ma profonde
Affection.**

A mes Frères et sœurs

**...pour leurs compréhensions et leurs
encouragements, Qu'ils trouvent ici l'expression de
ma sincère Amitié.**

Mais surtout A toi, Adel mon Ami, mon confident, mon Partenaire.

Merci pour ton soutien, ta patience et tes encouragements.

BESMA

Résumé :

La plante sur laquelle est porte notre choix d'étude est une espèce de plante phytothérapeutique méditerranéenne de la famille des myrtacées le myrte (*Myrtus communis L.*).

Bien que relativement abondant et largement utilisée malgré sa teneur et son rendement en huile essentielle, cette espèce a été peu étudiée et point développée en Algérie.

A présent, l'utilisation de la technique de culture in vitro se justifie par son efficacité dans la production végétative qui ne présente pas ces capacités en conditions classique dans le but d'améliorer la rusticité, l'homogénéité et le potentiel qualitatif d'une bonne variété en une temps plus réduite.

En effet, le travail que j'ai espéré réaliser a pour étudier l'effet de la micropropagation in vitro sur le génotype variétal de le myrtus communis L dans cette optique, j'ai étudié les paramètres morphologique suivants : nombre de feuilles, longueur de la tige et la ramification de la tige, nombre et longueurs de racines de myrte ramené de parc national de chréa secteur El hammdania.

En fin, malheureusement à cause de l'épidémie je n'ai pas pu terminer mon travail, alors je n'ai pas obtenu des résultats pour évoluer cette plante.

Les mots clés

Myrtus communis L, culture in vitro, micropropagation, milieux de culture,

Abstract :

The plant on which we have chosen to study is a species of Mediterranean phytotherapeutic plant from the Myrtaceae family, the myrtle (*Myrtus communis L.*).

Although relatively abundant and widely used despite its content and yield of essential oil, this species has been little studied and not developed in Algeria.

At present, the use of the in vitro culture technique is justified by its efficiency in vegetative production which does not present these capacities in conventional conditions in order to improve the hardiness, the homogeneity and the qualitative potential of a good variety in a shorter time.

Indeed, the work that I hoped to achieve was to study in vitro micropropagation effect on the varietal genotype *myrtus communis L* in this light, j 'have studied the following morphological parameters: number of leaves, length the stalk and branching of the stalk, number and lengths of myrtle roots brought from chréa national park in the El hammdania sector.

In the end, unfortunately because of the epidemic I could not finish my work, so I did not obtain results to evolve this plant.

Keywords

Myrtus communis L, in vitro culture, micropropagation, culture media.

LISTEE DES ABREVIATIONS :

- **%** : Percentage
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **APG** : Angiosperms phylogeny group
- **EDTA** : Fer Ethylène Diamine Tétracétique Acide
- **H.E** : Huile essentielle
- **L** : Litre
- **Lux** : Unité d'éclairement lumineux
- **mg** : Milligramme
- **ml** : Millilitre
- **mm** : Minute
- **MS** : Muraschige et Skoog
- **Ph** : Potentiel hydrogène
- **T** : Température
- **Tab** : Tableau

LISTE DES FIGURES

Figure 1: les tiges de myrtus communis.....	18
Figure 2: les feuilles de myrtus communis.....	19
Figure 3: Les fleurs de myrtus communis	19
Figure 4: Les fruits de myrtus communis.....	20
Figure 5: Les graines de myrtus communis.....	20
Figure 6: Les caractéristiques climatiques de la culture de myrtus communis (ANONYME1)	2
1	
Figure 7: Les caractéristiques édaphiques de la culture de myrtus communis (ANONYME 1)	2
3	
Figure 8: Exemples de produits cosmétiques à base de myrtus communis	27
Figure 9: myrtus communis ' Flore Pleno'	28
Figure 10: Myrtus communis ' Variegata'	29
Figure 11: Myrtus communis ssp. tarentina.	30
Figure 12: Culture in vitro de vigne © INRA, JL Gaignard	37
Figure 13: Exemple de la moutarde © INRA Dijon, E Lionneton	38
Figure 14: Séquence typique de régénération de plantes fertiles par organogenèse à partir de protoplastes chez le pois	

.....3

9

Figure 15: Méristèmes chez Kalanchoe. ©INRA, J Margarat49

Figure 16: Types d'organogénèse contrôlée par les concentrations relatives d'auxine(s) et 51

Figure 17: Embryogenèse somatique et zygotique chez la carotte (Steward et al. 1958)52

LISTE DES TABLEAU

Tableau 1: Dénomination de myrtus (Geotz et Ghedira, 2012).....	16
Tableau 2: Classification botanique de myrtus communis (Grété, 1965).....	17
Tableau 3: Classification phylogénétique de myrtus communis L. (APG III, 2009).....	17
Tableau 4: Principaux constituants biochimiques de l'huile essentielle de myrtus communis (Aiboud, 2012)	2
4	
Tableau 5: La composition volatile de myrtus communis.....	25
Tableau 6: conditions du milieu MS (Murashigue et Skoog 1962).....	59

Table des matières

LISTEE DES ABREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAU	6
<i>Partie bibliographique</i>	
<i>Chapitre I : Description de la plante</i>	
Introduction.....	10
I.1. Généralité sur les Myrtacées.....	14
I.1.1. Position systématique.....	14
I.1.2. Répartition géographique	15
I.2. Présentation de la plante étudiée (Myrtus communis)	15
I.2.1. Définition.....	15
I.2.2.1. Dénomination	16
I.2.2.2. Classification	17
I.2.2.3. Caractéristique morphologique.....	18
I.2.3. Biotope.....	21
I.2.4. Exigences.....	21
I.2.4.1. Exigences climatiques	21
I.2.4.2. Exigences édaphiques	22
I.2.4.3. Exigences nutritionnelles.....	22
I.2.5. Composition.....	23
I.2.5.1. Composants principaux de la plante.....	23
I.2.5.2. Composants principaux de l'huile essentielle.....	23
I.2.5.3. Composition chimique.....	24
I.2.6. Utilisation.....	26
I.2.6.1. Utilisation traditionnelle.....	26
I.2.6.2. Utilisation médicinale	26
I.2.6.3. Utilisation industrielle	27
I.2.6.4. Aujourd'hui.....	27
I.2.7. Les variétés	28

I.2.7.1. <i>Myrtus communis</i> 'Flore Pleno'	28
I.2.7.2. <i>Myrtus communis</i> 'Variegata'	28
I.2.7.3. <i>Myrtus communis</i> ssp. <i>Tarentina</i>	29
I.2.9. Le mode de reproduction	31
I.2.9.1. Reproduction Classique	31
Introduction	33

Chapitre II : La culture In- vitro

II.1. Historique.....	33
II.2. Définition.....	34
II.2.1. La différenciation	35
II.2.2. La dédifférenciation	35
II.2.3. La totipotence.....	35
II.3. Les applications de la culture in vitro	36
II.3.1. Le sauvetage d'embryons.....	36
II.3.2. La micro propagation.....	36
II.3.3. La production de plantes haploïdes	37
II.3.4. Culture et fusion des protoplast	38
II.3.5. La variation soma clonale et la culture in vitro.....	40
II.4. Les bénéfices de la culture in vitro.....	40
II.4.1. Collection des génotype et état physiologique du matériel conservé	40
II.4.2. Obtention de matériels indemnes de maladies.....	41
II.4.3. Développement de méthode de production de plants.....	41
II.4.4. La culture in vitro au service de l'amélioration variétale	42
II.5. Les facteurs de la régénérabilité	42
II.5.1. Effet de l'explant.....	43
II.5.1.1. L'âge physiologique et ontogénique de l'organe	43
II.5.1.2. L'époque de prélèvement.....	43
II.5.1.3. La taille de l'explant.....	43
II.5.2. L'influence de génotype	44
II.5.3. L'influence de milieu de culture.....	44
II.5.4. Les régulateurs de croissance	45
II.5.5. L'influence de la source de carbonée.....	45
II.5.6. La lumière et la photopériode	46

II.5.7. La température	46
------------------------------	----

Chapitre III : La micro propagation

Introduction	48
III.1. Présentation de la micro propagation	48
III.2. Les techniques de la micro propagation.....	48
III.2.1. Cultures de méristème	49
III.2.2. Organogenèse	50
III.2.2.1. Caulogenèse	50
III.2.2.2. Rhizogenèse	50
III.2.3. L'embryogenèse somatique	51
III.2.3.1. La différence entre embryon somatique et embryon zygotique	52
III.3. Intérêt de micro propagation	53
III.4. Les principaux stades de la micro propagation.....	53
III.5. Le milieu de culture	53
III.5.1. Les éléments minéraux	54
III.5.1.1. Les macroéléments.....	54
III.5.1.2. Les microéléments.....	54
III.5.2. Les éléments organiques.....	54
III.5.2.1- Les sucres	54
III.5.2.2- Les vitamines.....	55
III.5.2.3- Les acides aminés.....	55
III.5.3. Les régulateurs de croissance.....	55
III.5.3.1. Les auxines.....	55
III.5.3.2- Les cytokinines.....	56
III.5.3.3- Les gibbérellines	56
III.5.4- Les géloses	56

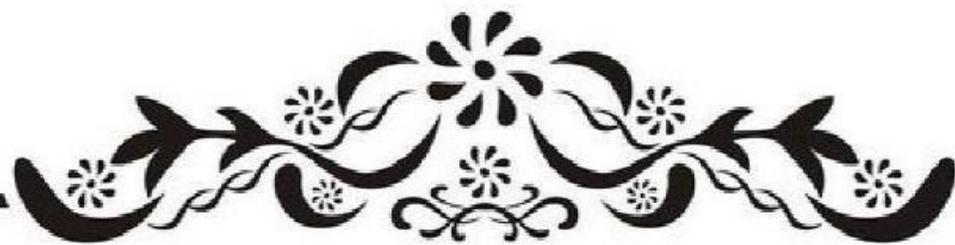
PARTIE 2 : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel

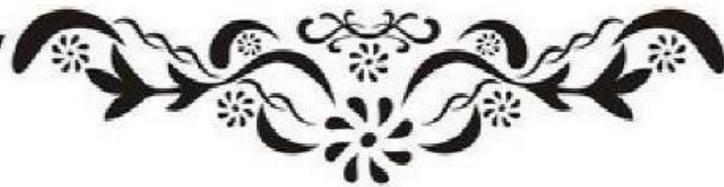
I.1. Matériel végétal	59
I.2. Milieux de culture de micropropagation.....	59

Chapitre II : Méthodes

II.1. Préparation des solutions mères de milieu de culture	62
II.2. Préparation de la solution finale du milieu de culture	63
II.2. Stérilisation	64
II.2.1. Stérilisation du milieu de culture	64
II.2.2. La Stérilisation des instruments.....	64
Conclusion	66
Les références bibliographiques.....	67



Introduction Générale



Introduction

L'Algérie couvre une surface de 2381741 Km ; elle est dotée d'un patrimoine floristique très diversifié, notamment dans le domaine des plantes aromatiques. Deux chaînes montagneuses importantes, l'Atlas tellien au nord et l'Atlas saharien au sud, séparent le pays en trois types de milieux qui se distinguent par leur relief, leur morphologie et leur climat, donnant lieu à une importante biodiversité écologique. De ce fait, on distingue le littoral et la zone tellienne qui bordent la mer méditerranéenne, Dans l'Atlas tellien, caractérisé par un étage climatique per-humide se développent des espèces méditerranéennes comme le myrte commun (*Myrtus communis* L.), le sapin de Numidie (*Abies numidica* de Lannoy ex Carrière), le tremble (*Populus tremula* L.), le chêne liège (*Quercus suber* L.) et le cèdre (*Cedrus atlantica* (Endl.).

En Algérie ; le myrte est connu sous le nom vulgaire de « **EL-RIHAN** ». Il est très répandu en raison de sa tolérance à la sécheresse et sa capacité à se régénérer rapidement.

De cette plante qui pousse spontanément sur tout le pourtour méditerranéen jusqu'à l'Inde, j'ai choisi de vous parler plus spécifiquement de celle que l'on retrouve en Algérie. Comme l'a dit Léon Tolstoï « Si tu veux parler de l'universel, parle de ton village ».

Le myrte commun, *Myrtus communis* L, est un arbuste typique du pourtour méditerranéen qui est bien ancré dans la culture et les croyances des peuples qui bordent le grand bleu. En plus de ces croyances, on lui prête depuis longtemps des propriétés médicinales. Le myrte appartient à la famille des myrtacées.

Le myrte est également utilisé comme plante cultivée en horticulture, en particulier pour la production de plantes ornementales. Le myrte est traditionnellement multiplié à partir de graines et par boutures. Cependant, les deux méthodes présentent des inconvénients : agronomiquement supérieur les clones ne peuvent pas être maintenus par propagation de semences en raison de la variabilité de la descendance, tandis que la multiplication végétative par boutures se propage maladie et est limitée par la réactivité saisonnière à l'enracinement.

Les problèmes peuvent être surmontés en utilisant des techniques de micropropagation. Qui permettent la multiplication rapide ou clones sélectionnés exempts de maladies et fidèles au type.

Introduction Générale

La culture in vitro présente de nombreuses techniques pour l'investigation à la recherche biologique et physiologique végétale. Elle est aussi utilisée pour la propagation de plantes au service de la production. Toutes ces techniques procèdent de la même manière, en essayant de contrôler les facteurs de l'environnement (température, lumière, composition du milieu...). Elles permettent aussi d'analyser la nature de l'explant mis en culture pour mieux connaître son fonctionnement physiologique afin de l'orienter vers un programme déterminé de morphogenèse.

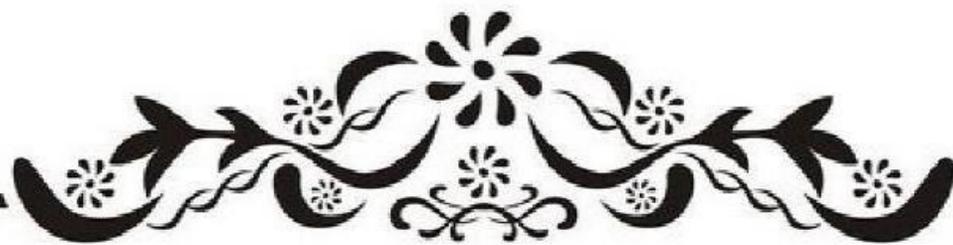
Ce travail est développé en deux parties :

✚ La première partie de ce mémoire nous proposerons une étude bibliographique, qui

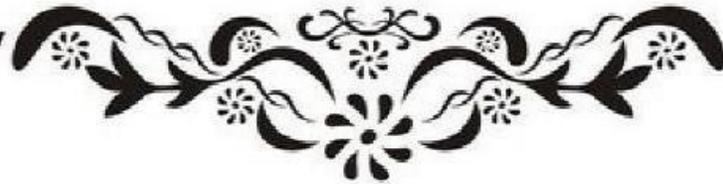
regroupe 3 chapitres :

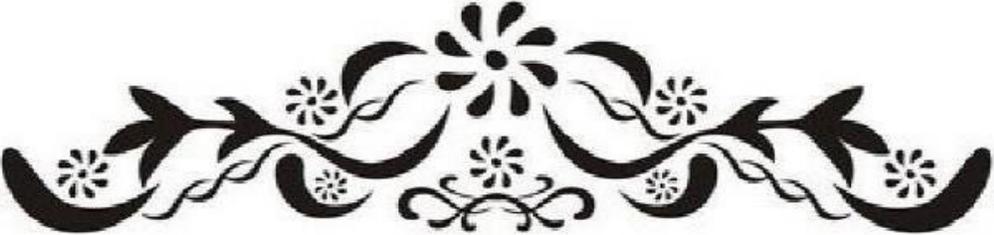
- Le premier chapitre basé principalement sur une étude botanique de *Myrtus communis* L.
- Le deuxième chapitre représente la culture in vitro et ces applications.
- Le troisième chapitre englobe la micro propagation et ces techniques.

✚ La deuxième partie est une partie expérimentale elle est divisé à son tour en deux chapitres qui sont matériel et méthodes. Et on termine à la fin par une conclusion générale.



Partie
Bibliographique





Chapitre I :
Description de la
plante



I.1. Généralité sur les Myrtacées :

La famille des Myrtacées est une famille des plantes dicotylédones qui comprend plus de 5 650 espèces réparties en 48 à 134 genres environ. Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques (**Gevaert et al. 2008**).

Selon **Quézel et Santa (1963)**, les Myrtacées sont des plantes à feuilles entières et opposées. Les fleurs axillaires sont hermaphrodites, à calice cupuliforme. Les étamines sont très nombreuses, insérées avec les pétales au sommet du tube calicinal. Le gynécée est infère ou semi-infère à 5 carpelles uniloculaires, à ovules nombreux et à placentation axile. Les fruits sont bacciformes bleuâtres globuleux, de 5-8 mm de diamètre.

Les Myrtaceae sont économiquement de première importance pour les industries pharmaceutiques, agroalimentaires ou cosmétiques, sans compter les nombreux composés potentiellement bioactifs qu'il reste à analyser et valoriser.

I.1.1. Position systématique :

Afin de classer la famille des Myrtacées, nous allons nous référer à la classification **APG**, qui est une classification botanique des Angiospermes (Angiosperm Phylogeny web site) Elle est basée sur des études moléculaires.

Des séquences de fragments d'ADN sont comparées permettant de mettre en évidence des parentés génétiques. La plus récente des classifications établies par le groupe Angiospermes Phylogeny Group est la classification APG III datant de 2009, qui est une modification de la classification. Cette récente classification est basée sur deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire de ribosome (**APG III, 2009**).

Pour la famille des Myrtacées on va donc avoir :

Embranchement des Spermatophytes

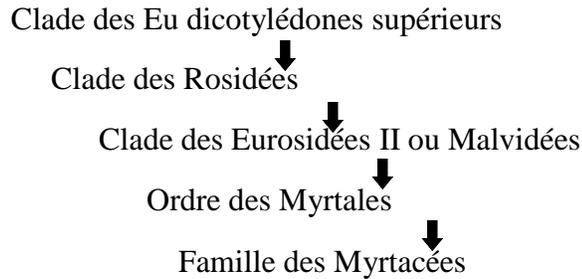


Sous embranchement des Angiospermes



Clade des Dicotylédones vraies (ou Eu dicotylédones ou Eudicots)





Dans la famille des Myrtacées, deux tribus se distinguent :

Les Leptospermoideae : dont le fruit est une capsule loculicide, l'ovule est anatrope, l'androcée est polysadelphie, les feuilles sont alternes ou opposées ; les genres proviennent essentiellement d'Australie. Dans cette tribu nous retrouvons notamment les genres.

Leptospermum, Eucalyptus, Melaleuca, Metrosideros, Callistemon et Darwinia.

Les Myrtoideae : dont le fruit est une baie, l'ovule est campylotrope, l'androcée est méristémone, les feuilles sont toujours opposées ; les genres sont présents en Amérique tropicale, mais aussi en Asie du Sud-Est et en Australie. Dans cette tribu nous retrouvons par exemple les genres Eugenia, Myrcia, Syzygium, Psidium, Calyptranthes et Pimenta. C'est dans cette tribu que l'on retrouve le genre Myrtus dont fait partie le myrte commun.

I.1.2. Répartition géographique :

Les myrtacées se trouvent dans la région méditerranéenne, en Australie, en Amérique tropicale, en Afrique subsaharienne, à Madagascar et dans les régions tropicales et tempérées de l'Asie (Bruneton, 1999).

I.2. Présentation de la plante étudiée (Myrtus communis) :

I.2.1. Définition :

Le terme « *Myrtus* » vient du grec le mot « *Myrtos* » (plante ou arbuste) et « communis » signifie que les plantes communes en groupes (Sumbul et al, 2011).

Myrtus communément appelé myrte, est un aromatique arbuste de la famille des Myrtacées, répandu dans tout le bassin méditerranéen. Il pousse à l'état sauvage dans tout le Tell Atlas et les régions côtières d'Alger et de Constantine (**Quézel et Santa, 1962**).

En Algérie, la plante sauvage connue sous le nom de « Al-Rihan » ou « Halmouche » pousse très bien dans de nombreuses régions, sur des monticules ou des collines, dans des zones côtières ou dans des zones plus reculées. Dans certaines régions, son utilisation est recommandée pour abaisser la glycémie ainsi que pour améliorer la digestion. Cependant, son utilisation principale est conseillée pour le traitement des problèmes respiratoires (**Zougali et al. ,2012**).

I.2.2. Description botanique et morphologique :

I.2.2.1. Dénomination :

Le Myrtus a connu plusieurs appellations présentées dans le tableau 1, chaque pays nomme Cette plante médicinale avec un nom différent, et parmi ces noms, nous trouvons parfois ceux qui se ressemblent :

Tableau 1: Dénomination de myrtus (Geotz et Ghedira, 2012).

Pays	Dénominations
Français	Myrte commun
Anglais	Common myrtle, Greek myrtle, myrtle, sweet myrtle
Arabe	Arrayan, A'as, rihan
Berbère	Tarihant.
Corse	Morta, mortula
Espagnol	Arrayan, mirto, mortella, mortin

I.2.2.2. Classification :

a. Classification botanique :

Tableau 2: Classification botanique de myrtus communis (Grété, 1965).

Règne	Plantae
Sous- règne	Eucaryotes
Embranchement	Spermaphytes
Sous- embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	Myrtus
Espèce	Myrtus Communis L

b. classification phylogénétique :

Tableau 3: Classification phylogénétique de myrtus communis L. (APG III, 2009).

Embranchement	Spermatophytes
Sous- embranchement	Angiospermes
Clade	Dicotylédones varies
Clade	Eudicotylédones supérieurs
Clade	Rosidées
Clade	Eurosidées II ou Malvidées
Ordre	Myrtales

Famille	Myrtacées
Genre	Myrtus
Espèce	Myrtus communis L

I.2.2.3. Caractéristique morphologique :

a. Appareil végétatif:

- **Les rameaux :** D'après **Migliore, (2011)** Le myrte se caractérise par des branches (des tiges) rougeâtres qui sont très ramifiées.

Les rameaux sont quadrangulaires à légère pubescence les deux premières années.



Figure 1: les tiges de myrtus communis.

Les feuilles : Les feuilles sont opposées, ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longues que larges mesurant 20-24 × 4-11 mm (forte variation en fonction de l'exposition), à nervation pennée, munies d'un pétiole très court, à extrémités aiguës-pointues, et un peu convexes, d'une consistance ferme, en étant lisses, coriaces, et d'un vert foncé brillant. Les feuilles renferment de nombreuses petites glandes translucides qui secrètent les huiles essentielles les rendant très aromatiques au froissement (**Quézel et Santa, 1962**).

Chaque feuille possède un grand nombre de cavités sécrétoires, 400 à 1700 par feuille.

Ces cavités sont situées sur l'épiderme des feuilles de *Myrtus communis*.



Figure 2: les feuilles de myrtus communis.

b. Appareil reproducteur :

Les fleurs : Les fleurs grandes (10-15 mm) sont blanches, solitaires sur un long pédoncule à l'aisselle des feuilles, très odorantes et pourvues à la base de bractées très petites. Son odeur aromatique forte et particulière est l'un de ses traits de caractère rapidement caduc (**Quezel et Santa, 1856**).

Comme il a 5 sépales, 5 pétales, un grand nombre d'étamine et 3 carpelles la formule florale de *Myrtus communis* est la suivante : $5S + 5P + nE + 3C$.



Figure 3: Les fleurs de myrtus comminus.

Les fruits : Le fruit de *M. communis* est une baie ovale (7-10 × 6-8 mm), et de couleur noir bleuâtre, quelque fois vert. La pleine maturité de ces fruits est atteinte au mois de novembre. Sous la peau bleu foncé, la chair blanche est plus ou moins épaisse, parfois presque entièrement résorbée, de saveur âpre, résineuse. (Migliore, 2011).

Le fruit est divisé intérieurement en trois loges qui renferment des graines nombreuses courbées en croissant.



Figure 4: Les fruits de myrtus communis.

Les graines : Les graines sont nombreuses avec des irrégularités de formes et de tailles. Elles sont réniformes, luisantes, couleur ivoire, et de saveur résineuse. (Migliore, 2011).



Figure 5: Les graines de myrtus communis.

I.2.3. Biotope :

Myrtus communis L (myrte commun) est une plante médicinale aromatique, endémique à la région méditerranéenne. (Tuberoso et al, 2010).

Il pousse au niveau de la mer à 500-800 m d'altitude. (Migliore, 2011).

Le myrte se développe au sein des matorrals massifs d'arbustes thermophiles. En Algérie, il est commun dans les maquis et les forêts du Littoral. (Kaddem, 1990).

En compagnie d'*Arbutus unedo* L., de *Pistacia lentiscus*, *Quercus suber*, *Quercus ilex*, *Ceratonia siliqua*.

D'après Rameau et al, (2011). *Myrtus communis* peut vivre plus de 300 ans.

I.2.4. Exigences :

I.2.4.1. Exigences climatiques :

- **La température** : thermo-méditerranéennes à subdésertique (inframéditerranéennes) ($T \approx 18^\circ\text{C}$).

C'est une plante qui s'acclimate facilement aux températures élevées et supporte des températures minimales allant de -5 à -10°C .

- **La lumière** : perhéliophiles (75 000 lux).

Myrtus communis a besoin de beaucoup de lumière. Il ne supporte que très peu d'ombre.

- **L'humidité** : intermédiaire (40%).
- **La Continentalité** : hyperocéaniques ($AT \approx 10^\circ\text{C}$).

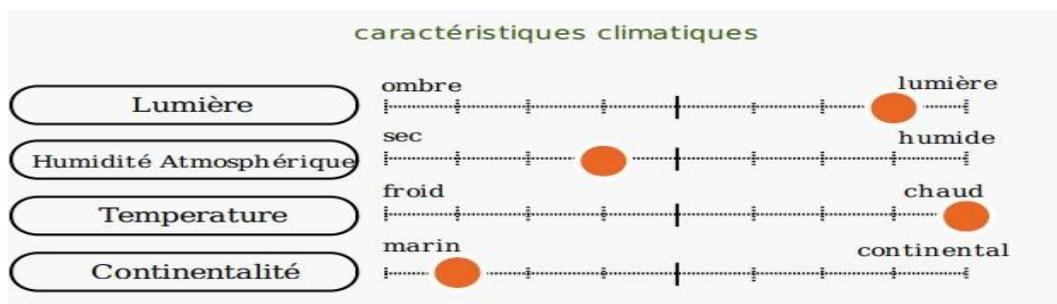


Figure 6: Les caractéristiques climatiques de la culture de *myrtus communis* (ANONYME1)

I.2.4.2. Exigences édaphiques:

- **La nature de sol :** limon.

Il s'adapte au sol siliceux, calcaire, on le rencontre plus sur terrain acide

- **L'humidité sol :** xérophiles (velues, aiguillonnées, cuticule épaisse).

Myrtus communis ne supporte pas les sols humides.

- **Le ph de sol :** neutroclines ($5,5 < \text{pH} < 6,5$).

Le myrte supporte des pH neutres et alcalins mais **Moreno-Jiménez et al. (2011)** montrent que le myrte a une meilleure survie à $\text{pH} < 5$.

- **La salinité :** ne supportant pas le sel.

I.3.4.3. Exigences nutritionnelles:

- **Exigence hydrique :**
- **Exigence en éléments fertilisants :**

Toute terre raisonnablement riche en nutriments réussit au Myrtus communis tant qu'elle est bien drainée.

Matière organiques : mull carbonate

Nutriment : mésotrophiles ($\approx 500 \mu\text{g N/l}$)

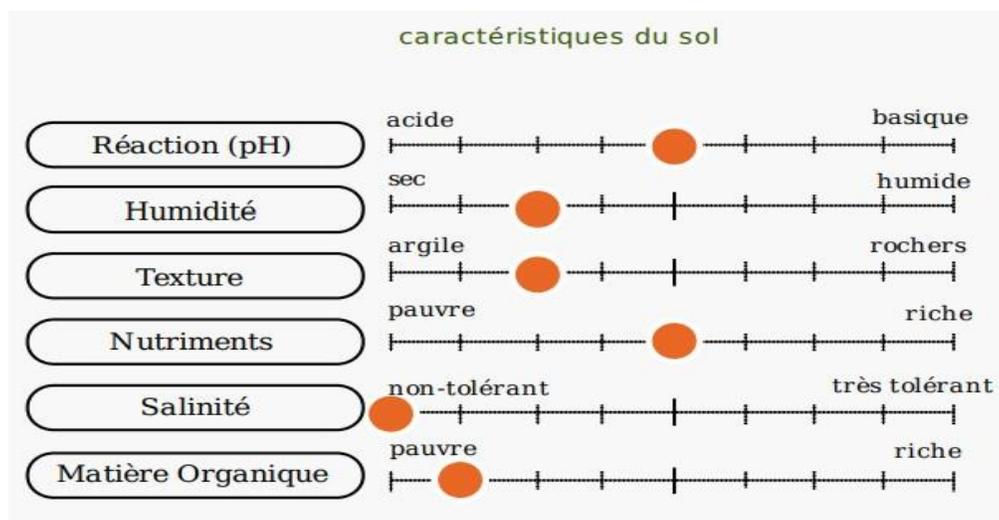


Figure 7: Les caractéristiques édaphiques de la culture de myrtus communis (ANONYME 1).

I.2.5. Composition :

I.2.5.1. Composants principaux de la plante :

- Tanins (14 %) et dérivés phénoliques : gallotannins, acide gallique et acide ellagique, catéchine, myricétol et myricitroside
- Flavonoïdes : myricétine-3-o-galactoside, myricétine-3-o-rhamnoside
- Phloroglucinols complexes : myrtucommulones A et B, semi-myrtucommulone (lactones)
- Huile essentielle (0,3 %) à alpha-pinène, 1,8-cinéole, acétate de myrtényle, myrténol
Acide ursolique
- Baies : anthocyane

I.2.5.2. Composants principaux de l'huile essentielle

:

- Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole (20 - 40 %)
- Monoterpènes : alpha-pinène (8 à 25 %), limonène (8 - 18 %)
- Alcools monoterpéniques : linalol, myrténol, alpha-terpinéol

- Esters terpéniques : acétate de myrtényle (10 - 20 %), acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de bornyle
- Sesquiterpènes : béta-caryophyllène (2 %), alpha-humulène
- Lactones : myrtucommulones A et B
- Aldéhydes : myrténal, trans-2-hexanal
- Deux chémotypes sont décrits :

H.E. Myrte rouge *Myrtus communis* et acétate de myrtényle

H.E. Myrte vert *Myrtus communis* et cinéole (ANONYME 5).

I.2.5.3. Composition chimique :

a. Huile essentielle :

Les différents composés de l'huile essentielle du myrte sont représentés dans le tableau 04.

Tableau 4: Principaux constituants biochimiques de l'huile essentielle de myrtus communis (Aiboud, 2012).

Classe de constituants	Exemple de constituants	Teneur en %
Monoterpènes	Alpha-thujène	0.42
	Béta-pinène	49.17
	Béta-pinène	0.46
	Delta-3-caréne	0.54
	Para-cyméne	1.77
	Limonène	8.33

	Eucalyptol (1,8-cinéole)	24.28
	Linalol	3.37
	Trans Pinocarveol	0.28
Alcools terpéniques	Terpinène	0.35
	Alpha-terpineol	2.37
	Acétate de linalyle	1.06
	Acétate d'alpha-terpène	0.61
	Acétate de géranyle	2.52
	Methyl-Eugénol	0.58
	Béta-caryophyllène	0.69
	Alpha-humulène	0.26
Total		97.56

b. Les compositions volatiles et phénoliques :

- Composés volatiles :

Tableau 5: La composition volatile de myrtus communis.

Les composés	Pourcentage
α -pinéne	8-36%
1,8-cinéole	19-45%
Acétate de	9-36%

myrtényle	
Terpinén-4-ol	8-10%
Linalol	10%
Limonéne	15%

- Composés phénoliques :

Les compositions phénoliques des baies de Sardaigne diffèrent quantitativement de celles de Corse ; notamment au niveau des composés majoritaires avec des teneurs plus importantes en myricétine-3-O-galactoside et en myricétine-3-O-rhamnoside dans celles de Sardaigne et en myricétine, en myricétine-3-O-arabinoside et en épigallocatechine dans celles de Corse.

I.2.6. Utilisation :

Le myrte commun occupe une place importante dans l'histoire, il était réputé pour son action antiseptique. Dioscoride et Pline (médecins latins du 1er siècle ap. J.C.) indiquaient de nombreuses applications médicales. Ainsi, les feuilles écrasées s'appliquaient sur les ulcères.

I.2.6.1. Utilisation traditionnelle :

En Algérie, les feuilles de *Myrtus communis* L. sont utilisées comme remède contre les affections des voies respiratoires. Les préparations à base de plantes sont préconisées contre les bronchites, les sinusites, les otites, les diarrhées et les hémorroïdes. Les fruits constituent un remède contre la dysenterie, l'entérite et les hémorragies. (**Beloued A., 1998**).

Le myrte est connu en Algérie pour ses propriétés anti-inflammatoires et hypoglycémiantes (**Bouzabata A., 2013**).

I.2.6.2. Utilisation médicinale :

Les baies du myrte ont une longue histoire d'application dans les industries pharmaceutiques. Elles sont utilisées pour leurs effets positifs sur la santé humaine, comme antiseptique, astringent, carminative, tonique des cheveux, analgésique, cardiotonique,

diurétique, anti-inflammatoire, stomachique, néphroprotectrice, antidote, hémostatique, tonique du cerveau et antidiabétique (Sumbul et al.2011).

I.2.6.3. Utilisation industrielle :

Les baies du myrte sont utilisées comme essences aromatiques dans la cuisine, mais leur utilisation la plus importante est la production de liqueurs (Mulas et Fadda .2002).

Au cours de ces dernières décennies, les systèmes intensifs de la culture du myrte ont été établis dans diverses régions du monde et particulièrement en Sardaigne (Italie), afin d'assurer à la fois un approvisionnement constant de matériel de bons fruits pour l'industrie de liqueur et la préservation des populations de myrte naturelles (Mulas et Perinu 2002).

I.2.6.4. Aujourd'hui :

De nos jours, le myrte est devenu un produit qui pourrait être qualifié d'identitaire. Il va permettre dans différents domaines, que ce soit l'alimentation ou la cosmétique, de donner un caractère identitaire au produit. C'est pour ces raisons que l'on retrouve en plus de la traditionnelle liqueur de myrte, des cosmétiques à base de myrte, mais également des produits alimentaires tels que pâtés, bières, etc.... aromatisés au myrte.



Figure 8: Exemples de produits cosmétiques à base de myrtus communis.

I.2.7. Les variétés :

I.2.7.1. *Myrtus communis* 'Flore Pleno':

Floraison blanche, fleurs doubles, en fin d'été, suivie de petites baies pruneuses violacées. Pour aromatiser le gibier et les viandes grasses. Utilisé en Sardaigne pour les liqueurs.

Les baies ont un goût proche du genièvre. Les branches, ajoutées aux braises, servent à aromatiser les viandes. Feuilles en infusion : digestif, astringent.

La plante peut supporter jusqu'à -10°C , au sec et sur une courte durée, pour un sujet d'au moins 4-5 ans. Pour un sujet jeune : protéger en hiver (ANONYME 2).



Figure 9: myrtus communis ' Flore Pleno'.

I.2.7.2. *Myrtus communis* 'Variegata' :

Le myrte panaché (*Myrtus communis* Variegata) est un joli arbuste dense au feuillage persistant, fortement aromatique, vert panaché de jaune.

L'arbuste fleurit tout l'été produisant une multitude de petites fleurs odorantes, blanches aux étamines proéminentes.

Les fleurs sont suivies de petites baies bleu marine mûres en hiver, très appréciées des oiseaux. Le myrte supporte très bien les tailles répétées permettant son usage dans l'art topiaire.

Le myrte est utilisé depuis très longtemps tant dans la pharmacopée que dans la parfumerie. Toute la plante est utilisée : les feuilles fraîches ou séchées, les boutons floraux, les fleurs ouvertes, les fruits frais ou séchés, les racines et l'écorce.

Moyennement rustique, il supporte des températures jusqu'à -7°C à condition que ce soit sur une courte période.

Le myrte préfère les sols à tendance sec mais toujours léger et surtout bien drainé. Il tolère les sols calcaires. Plantez-le en plein soleil ou à mi-ombre à l'abri des vents froids (ANONYME 3).



Figure 10: Myrtus communis 'Variegata'.

I.2.7.3. Myrtus communis ssp. Tarentina :

Le Myrtus communis Tarentina, également appelé Myrte de Tarente, Herbe du lagui ou encore Myrte tarentin, est une plante de la famille des myrtacées, que l'on rencontre à l'état sauvage à la lisière des forêts de chênes ou de pin, dans les garrigues et maquis rocaillieux du pourtour méditerranéen, jusqu'au Liban.

C'est un arbuste à croissance lente dont le port est naturellement dense et compact. Il atteindra 1.50 à 2m de hauteur, parfois davantage, pour un diamètre de 1m à 1.50m. Les feuilles, persistantes, ovales à pointe effilée, sont remarquablement aromatiques. On en tire une huile essentielle très utilisée en parfumerie et en aromathérapie. Elles ne mesurent pas plus de 1 cm de long pour 0.5 cm de large, sont brillantes sur les deux faces, et montrent une nervure centrale très marquée.

L'arbuste fleurit en plein été, avec générosité, de juillet à septembre, ce qui est surprenant pour une plante de climat sec. Les petites fleurs blanches à 5 pétales, larges de 1 cm, solitaires, s'ouvrent sur un large bouquet d'étamines saillantes ; elles apparaissent à l'aisselle des feuilles, sur les pousses de l'année. Elles sont suivies en automne par la formation de petits fruits ovoïdes et charnus, pruneux, noir-bleuté, parfois blancs, utilisés en cuisine ou pour la fabrication de liqueurs (ANONYME 4).



Figure 11: Myrtus communis ssp. tarentina.

I.2.9. Le mode de reproduction :

I.2.9.1. Reproduction Classique :

Le myrte a la réputation d'être difficile à multiplier. Il faudra compter environ 4 ans pour obtenir une plante adulte. On opère par semis ou par bouturage.

- Semis :

Semez au printemps, en terrine placée sous châssis froid ou en pépinière bien exposée. Rempotez les plants individuellement un mois après la levée. Cultivez-les en pot pendant un an ou deux avant de les installer en pleine terre.

- Bouturage :

Bouturez le myrte de mai à juillet :

Prélevez des boutures à talon (avec un lambeau d'écorce de la tige principale). Effeuiliez-les sur les deux tiers inférieurs.

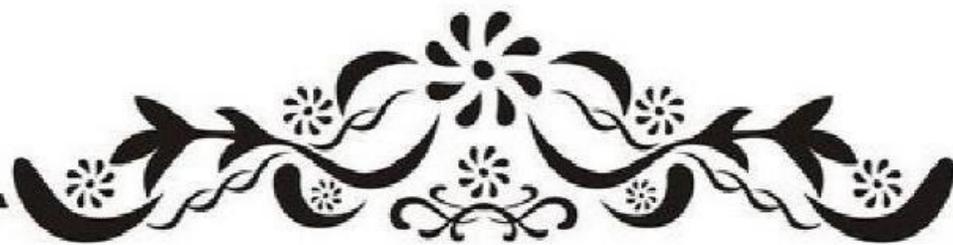
Trempez la base dans de l'hormone de bouturage, retirez l'excédent. Plantez dans un mélange humide de sable et de tourbe.

Recouvrez d'un plastique transparent ou installez dans une terrine de multiplication.

Placez à l'abri du soleil direct, à une température de 18 °C. Aérez tous les jours pour éviter la condensation.

Lorsque les nouvelles pousses apparaissent, au bout de 2 à 3 mois, retirez le plastique.

Rempotez en pots individuels au printemps suivant en pinçant les tiges pour forcer l'arbuste à se ramifier (**ANONYME 6**).



Chapitre II :
La culture In- vitro



Introduction :

La multiplication in vitro est un mode de reproduction asexué (reproduction végétative artificielle) (**BOCCON-GIBBOD, 1989**).

Le terme de culture in vitro est appliqué à toute culture sous verre (tube, bocal, etc..) en milieu aseptique. Le principe général consiste à prélever un fragment de tissu végétal, à le placer sur un milieu nutritif et provoquer grâce à un équilibre adéquat des éléments de culture le développement d'une plantule. L'ensemble des opérations qui se déroulent en condition stériles est suivi d'une acclimatation sur un milieu approprié (**BOUTHERIN et BRON, 2002**).

II.1. Historique :

La culture in vitro est par comparaison, une technique très récente puisqu'elle fut développée seulement au début de ce siècle (**Jay-Allemand et Capelli, 1992**).

Les premiers pas de culture in vitro sont dus à un allemand Haberlandt en 1902. Il obtient ainsi, sur un milieu KNOP amélioré, la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires. Mais il n'y avait pas de multiplication cellulaire (**Augé et al., 1989**).

En 1912 Alexie Carrel réussissait la culture indéfinie de cellules de cœur d'embryon de poulet par repiquages successifs. Il fallut attendre 1922 et les travaux de Rablens pour voir apparaître une croissance chez les pointes de racines isolées sur milieu synthétique. Mais la date qui marque réellement le début de la culture in vitro est 1932 avec les travaux de White au USA sur la croissance indéfinie en milieu liquide de racines de tomates. Ce succès fut sans doute à l'origine du regain d'effort qui se portera sur la culture de tissus végétaux. Dès 1934 Gautheret obtient à partir de prélèvement de tissus cambiaux d'arbre des proliférations de tissus qui malheureusement, ne dépassèrent pas huit mois (**Morel, 1952**) (**Scriban, 1988**).

Après les travaux de White au USA en 1932 sur le Tabac, Nobecourt en France sur la Carotte, Limasset et Cornuet en 1949 qui publiaient leurs observations sur l'absence de virus dans les méristèmes de Tabac virosé. Morel & Martin, en 1952 mirent à profit ces observations et entreprirent de mettre en culture in vitro des méristèmes de Dahlia et de pomme de terre

atteints de maladies à virus. A partir de ces méristèmes, ils obtinrent in vitro des plantes entières qui furent remises en culture normale et se révélèrent saines au contrôle (**Augé et al., 1989**).

C'est ainsi qu'est née en 1952 cette technique universellement employée actuellement pour assainir toutes sortes de plantes virosées.

Un dernier point longtemps contesté, est la possibilité d'obtenir une prolifération de tissus à partir d'une cellule végétale mise en culture in vitro. Torrey, en 1957 réussit à suivre au microscope l'évolution de cellules isolées de pois, mises en culture à proximité d'un tissu nourricier. La culture in vitro de tissus végétaux connaîtra un essor particulier. Aujourd'hui avec l'évolution de la recherche agronomique, la culture in vitro occupe une place importante dans l'agriculture moderne (**Augé et al., 1989**).

II.2. Définition :

De très nombreux ouvrages ont traité de la culture in vitro au cours de la deuxième moitié de ce siècle décrivant toutes les méthodes déployées aussi bien dans le domaine animal que végétal (**Augé et al., 1989 ; Margara, 1989**).

Nous pouvons retenir qu'il s'agit globalement d'une méthode de culture des plantes en conditions aseptiques, c'est à dire sans champignon et sans bactérie, utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés, sels minéraux) qui peuvent être liquides, gélosés, voire même solides avec l'emploi de la vermiculite (**Jay-Allemand et al., 1992**).

La culture in vitro permet de cultiver des tissus ou des fragments d'organes isolés d'une plante tels que des apex, des bourgeons, des nœuds pouvant régénérer des pousses, mais aussi des racines ayant une croissance de type infini, ou encore des feuilles maintenues en survie. Cette technique permet également de cultiver des cellules isolées voire même des protoplastes capables de se diviser, de former des cals, des tissus organisés et même de régénérer une plante entière. La culture in vitro permet donc d'utiliser toutes les potentialités régénératrices d'une plante, jusqu'à la totipotence cellulaire qui peut se traduire suivant cette formule simple : 1 cellule = 1 plante entière (**Jay-Allemand et Capelli, 1997**).

II.2.1. La différenciation :

C'est le processus de transformation d'une cellule méristématique en une cellule spécialisée pour assurer les fonctions permettant la vie de la plante (Ducreux, 2002).

La différenciation est placée sous le contrôle de signaux de position venant, au cours du développement des cellules voisines provoquant la perte progressive des caractères cytologiques et physiologiques des cellules embryonnaires et l'acquisition des caractéristiques des cellules adultes (Peyecru et al., 2007).

II.2.2. La dédifférenciation :

Il est bien évident que le passage d'un état différencié à l'état de cellules méristématiques proliférantes, ne se fait pas sans que des modifications profondes n'apparaissent dans la structure de la cellule. Ces modifications ramènent la cellule adulte à l'état juvénile (recouvrer les caractéristiques cytologiques et les potentialités des cellules embryonnaires), capable de s'orienter vers la formation de n'importe quel organe. Suivant la composition du milieu de culture, les cellules dédifférenciées continueront à proliférer pour ainsi dire à l'infini, elles deviennent parfois capables de poursuivre leur prolifération, même en l'absence de substances stimulantes, telle que les auxines et les cytokinines. Les cellules végétales se dédifférencient et retournent à l'état cellulaire indifférencié (embryonnaire ou méristématique). Cette perte de l'inhibition corrélative permet l'expression de toutes les possibilités embryonnaires (Rajnachel, 1987).

En 1964 l'équipe de Steward obtenait une plantule de carotte à partir d'une seule cellule in vitro en milieu liquide agité. Depuis beaucoup d'autres chercheurs ont obtenu des résultats semblables.

II.2.3. La totipotence :

La théorie de la totipotence énoncée en 1902 par Haberlandt a été reprise et banalisée par Steward (1967). Cette théorie se base sur le fait que toutes les informations génétiques et donc le programme de l'embryogenèse sont présents dans le noyau de chaque cellule vivante (Norreel, 1973).

Un tissu ou une cellule dédifférenciée peut évoluer dans toute sorte de direction cela manifeste la totipotencialité de la cellule végétale. Cette totipotence de la cellule végétale se retrouve aussi au niveau des cellules reproductrices : grains de pollen ou ovules. Elle a été mise à profit avec le succès que l'on connaît depuis 1966, pour obtenir des haploïdes dont on peut ensuite doubler les chromosomes par colchicine. Cette propriété est également à l'origine du succès remporté par l'isolement et la culture des protoplastes. Théoriquement, chaque protoplaste est capable de reproduire une plante parfaitement identique à la plante mère.

Une cellule végétale même très différenciée est souvent capable de revenir à l'état juvénile en se dédifférenciant, elle peut ensuite se diviser pour donner tel ou tel tissu dépendant des circonstances (**Djennane et Klifatti, 1996**).

La totipotence est une dédifférenciation expérimentale qui peut être déclenchée par la perturbation de corrélations organiques, par des traumatismes, de l'action des phytohormones ou par leur suppression (**Demarly et Sibi, 1996**).

II.3. Les applications de la culture in vitro :

La culture in vitro d'explants ou de fragments prélevés sur la plante permet différentes applications :

II.3.1. Le sauvetage d'embryons :

Les embryons obtenus après la fécondation peuvent être prélevés, mis en culture in vitro et donner un nouvel individu. Le sauvetage d'embryons consiste à prélever un embryon précocement, pour le cultiver in vitro, soit pour accélérer les cycles végétatifs, soit parce qu'il ne pourrait pas se développer dans les tissus maternels.

II.3.2. La micro propagation :

Les plantes se multiplient par semis ou par multiplication végétative. Cette dernière est indispensable quand on veut conserver les caractères d'une variété donnée. C'est ce que l'on fait depuis des siècles quand on effectue des boutures, des greffes ou de la division de touffe. Mais le taux de multiplication que l'on peut obtenir par ces méthodes est souvent très faible. La

multiplication végétative in vitro apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles, avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé.

Grâce à cette technique, on part d'une petite quantité de tissu au départ pour produire une infinité de plantes. La vitesse de multiplication est élevée, on propage des plantes identiques à celle du départ, on peut constituer des collections de pieds-mères, des banques de clones, faire de la sauvegarde d'espèces en voie d'extinction, programmer des cultures tout au long de l'année, éviter la dormance, conserver des plantes au froid (Auge et al, 1989).



Figure 12: Culture in vitro de vigne © INRA, JL Gaignard.

II.3.3. La production de plantes haploïdes :

Cette technique présente un grand intérêt pour l'amélioration des plantes (permet d'accélérer les cycles de sélection).

Pour l'androgenèse, on part d'anthères immatures. A partir des microspores, il peut y avoir apparition d'embryons directement ou après formation d'un cal haploïde. Les facteurs ayant une influence sont la saison de prélèvement des anthères, l'état physiologique des plantes mères, le choix de l'inflorescence, le choix du stade morphologique de la fleur (en corrélation avec l'état de maturation des microspores). L'anthère est déposée sans filet (source d'embryon 2n) sur milieu liquide ou solide.

L'obtention de plantes diploïdes (haploïdes doublés) se fait par traitement à la colchicine. Il faut des milliers d'anthères pour avoir des plants haploïdes doublés intéressants. Le premier plant est souvent une chimère (le traitement est très destructeur et seules quelques cellules peuvent être doublées) que l'on fait fructifier pour obtenir des graines.

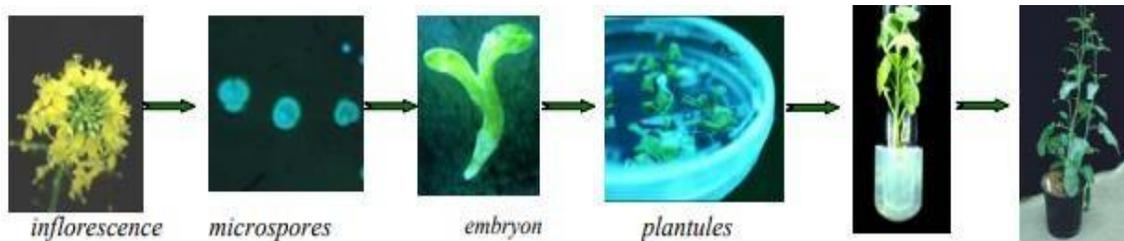


Figure 13: Exemple de la moutarde © INRA Dijon, E Lionneton.

Une autre voie de production de plantes haploïdes est celle qui part des gamètes femelles (ovaires non fécondés), appelée alors gynogénèse. Dans cette approche, la régénération se fait uniquement par embryogenèse somatique, et les embryons haploïdes formés suivent les mêmes étapes de développement que ceux issus des microspores dans l'androgenèse (Auge et al, 1989).

II.3.4. Culture et fusion des protoplast :

Le terme protoplaste désigne une cellule végétale débarrassée de sa paroi : elle apparaît alors sous forme d'une cellule sphérique, limitée par sa membrane plasmique. L'intérêt de ces cellules réside dans le fait qu'il est possible de faire pénétrer dans la cellule des molécules diverses dont de l'ADN, des organites (chloroplaste, mitochondrie), des noyaux (fusion) et effectuer des manipulations génétiques. Toutes les espèces ne peuvent pas régénérer à partir de protoplastes et le rendement est faible (peut se faire par ex chez les rosacées, les composées, les légumineuses, les graminées, les crucifères...).

Par digestion enzymatique (cellulases, pectinases) on obtient le protoplaste sphérique en équilibre osmotique avec le milieu. Mis en culture sur milieu liquide, on observe les premières divisions. Plusieurs milieux sont nécessaires. Au trentième jour, des petites cals sont apparus. Vers 60 jours, apparition de bourgeons et le repiquage pour culture in vitro peut être fait.

La fusion de protoplastes offre de nombreuses possibilités pour le sélectionneur. On peut combiner 3 génomes différents : nucléaire, chloroplastique et mitochondrial. A partir de l'hétérocaryon (noyau mixte, du grec karyon = noyau) obtenu, plusieurs cas sont possibles : division des deux noyaux (chimères), un noyau se retrouve dans un cytoplasme étranger (cybride), les noyaux se sont mélangés par fusion (totale ou partielle) avec un cytoplasme combiné.

Le point le plus important à retenir dans le cadre de l'hybridation somatique est que, à la différence des hybridations sexuées, il n'y a pas ici de recombinaison des caractères : il s'agit d'un phénomène additif puisque les hybrides obtenus auront la somme des deux génomes parentaux et non un mélange de ceux-ci (Auge et al, 1989).

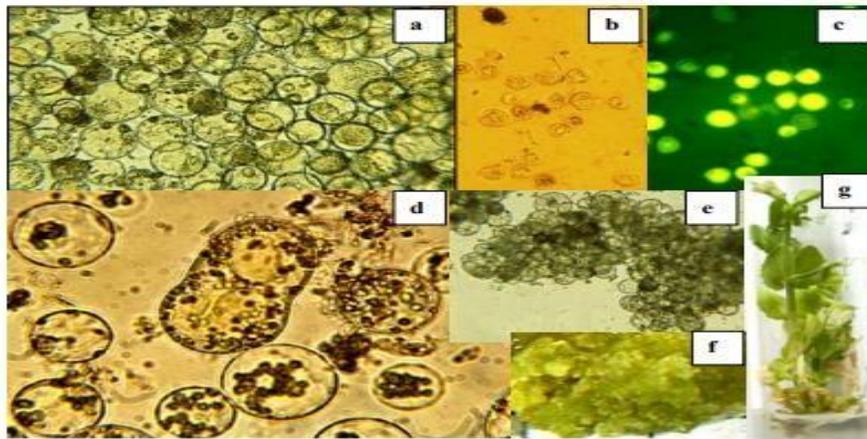


Figure 14: Séquence typique de régénération de plantes fertiles par organogénèse à partir de protoplastes chez le pois :

- a. protoplastes fraîchement isolés ;
- b-c : détermination de la viabilité des protoplastes par observation sous lumière directe (b) et sous UV après coloration avec un marqueur de vitalité (c) ;
- d. premières divisions cellulaires à partir des protoplastes cultivés ;
- e. micro cal visible à l'œil nu (1 mm de diamètre) dérivé des protoplastes ;
- f. cal issue des protoplastes sur milieu de régénération ;
- g. plante fertile (notez la présence de fleurs et de gousses in vitro) dérivée des protoplastes cultivés © INRA Dijon, S Ochatt.

II.3.5. La variation soma clonale et la culture in vitro :

Un taux élevé de variation peut être induit en culture in vitro lorsque les cultures sont réalisées dans des conditions particulières. Plus précisément, les plantes régénérées à partir de cultures initiées d'explants différenciés (ne contenant pas de méristèmes préexistant) ou à partir de cultures de cals présentent des taux parfois importants de non-conformité. Cette variabilité semble de plus être proportionnelle au temps de culture. Des mutations induites pendant la culture ont été détectées chez de nombreuses espèces végétales. L'existence de ces variations spontanées a stimulé l'intérêt de la culture de cellules ou de tissus pour l'isolement de plantes présentant des caractéristiques nouvelles. La majorité des lignées isolées à ce jour se sont toutefois révélées sans intérêt agronomique. Dans quelques cas cependant, l'existence de cette variation somaclonale a permis d'isoler des plantes présentant des caractères intéressants d'un point de vue agronomique. Par exemple, des plants de canne à sucre présentant un taux de sucre plus important ont été isolés. De même, des génotypes résistants à certains virus, ont été obtenus chez la tomate et la pomme de terre (**Evans, 1989**).

II.4. Les bénéfices de la culture in vitro :

II.4.1. Collection des génotype et état physiologique du matériel conservé :

A partir d'un matériel sélectionné en forêt, en verger ou en pépinière, il est possible de produire par culture de nœuds et/ou micropropagation des copies végétatives qui serviront à l'installation de parcs à pieds-mères.

Grâce à la culture d'embryons zygotiques, à la micropropagation et à l'embryogenèse somatique, des génotypes peuvent être conservés in vitro (tubes, bocaux ou boîtes de pétri) sur de longues périodes pouvant dépasser les 10 ans (cas de l'orme, du noyer, des porte-greffes fruitiers...).

Cette technique demande d'importants moyens humains pour entretenir les souches in vitro tout au long de l'année sur la base de repiquages mensuels. Cependant, on peut envisager de conserver les génotypes clonés dans l'azote liquide par cryoconservation (**Engelmann, 1986**) de

méristèmes (cas du merisier et du noyer), d'embryons somatiques (cas du mélèze) et zygotiques (cas du palmier à huile). Enfin, l'application des techniques de culture in vitro (Micropropagation et microgreffage) permet de maintenir le matériel sélectionné dans un état proche de la juvénilité favorable à la multiplication végétative, au bouturage en particulier **(Franclét, 1980)**.

Cette opération est généralement couplée à des techniques dites de rajeunissement (taille sévère, recépage) des pieds-mères ou des arbres âgés sélectionnés qu'il est nécessaire d'utiliser pour obtenir de bons résultats en culture in vitro (prolifération, croissance des pousses feuillées et formation des racines adventives).

II.4.2. Obtention de matériels indemnes de maladies :

Grâce à la culture de méristèmes ou à la technique de microgreffage on peut produire des variétés indemnes de virus en particulier (cas du fraisier, de la pomme de terre, de la vigne et des porte-greffes fruitiers) et éviter ainsi des pertes de productivité voire même la dégénérescence des plants cultivés. Ces variétés peuvent être conservées soit en culture in vitro soit en pépinière. Un suivi de ces variétés peut être effectué grâce à des tests sérologiques attestant la qualité de l'état sanitaire des plants commercialisés.

II.4.3. Développement de méthode de production de plants :

La culture in vitro a depuis longtemps fait ses preuves comme outil de production de plants par sa rapidité à amplifier une variété donnée, par sa capacité à raccourcir les cycles de production et à stocker de grandes quantités de matériel dans un espace réduit, par sa puissance de production en masse sur des temps courts permettant une programmation précise de la sortie des plants commandés. Dans le domaine de l'horticulture, deux principales méthodes sont aujourd'hui utilisées : la micropropagation et l'embryogenèse somatique.

La première est bien adaptée à la production de plantes herbacées, d'arbres fruitiers et de feuillus forestiers, alors que la seconde est performante pour les conifères et certaines monocotylédones telles que le palmier dattier par exemple **(Jay-Allemand et al., 1992)**.

De nombreuses entreprises ou pépinières privées ont intégré cette technique en tant qu'outil de production leur permettant de gérer la quantité de plants selon les commandes.

Mais plus rares sont celles qui l'utilisent comme un outil central de gestion du matériel et de production, situé en permanence à l'interface pieds mères et élevage en serre. C'est le cas de l'entreprise BIOFORESTA située à Oyarzun en Espagne qui a construit son laboratoire au cœur de la pépinière constituée de plus de 250 variétés différentes, toutes élevées en pot.

II.4.4. La culture in vitro au service de l'amélioration variétale :

L'amélioration génétique traditionnelle tient et tiendra encore toute sa place pour les années à venir afin de sélectionner des variétés bien adaptées à l'environnement dans lequel elles seront cultivées, tolérantes aux maladies et possédant des caractéristiques agronomiques intéressantes.

Cependant, là encore la culture in vitro joue et jouera un rôle déterminant à trois principaux niveaux :

- La sauvegarde de génotypes produits par fécondation contrôlée grâce à la culture d'embryons zygotiques ou d'axes embryonnaires.
- La production d'haploïdes par androgenèse (culture d'anthères) ou gynogenèse (sacs embryonnaires, oosphères non fécondés) permettant d'obtenir des lignées homozygotes après diploïdisation, recherchées par les améliorateurs.
- La production de plants génétiquement modifiés via *Agrobacterium tumefaciens* par l'utilisation de techniques de régénération faisant appel à l'embryogenèse somatique au bourgeonnement adventif et à la micropropagation.

II.5. Les facteurs de la régénérabilité :

Les facteurs influant sur la régénérabilité in vitro peuvent être schématiquement répartis en deux groupes. Le premier représente les facteurs internes, (ceux liés à la plante) et concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge ontogénique de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère sur laquelle, l'explant a été prélevé. Le second réunit les différents facteurs externes qui englobent et les milieux (notamment leur composition en régulateurs de croissance et les sucres) et les conditions de cultures.

II.5.1. Effet de l'explant :

Un des atouts majeurs de la culture in vitro est de montrer que des cellules somatiques (à 2n chromosomes), pouvaient produire, soit des structures comparables à des embryons somatiques, soit des bourgeons dont le développement permet de régénérer des plantes conformes à la plante mère. Pratiquement, n'importent quel organe (bourgeon, racine, feuille, anthère, etc.) ou fragment d'organe (explant), prélevé sur celle-ci, peut être cultivé isolément sur milieu nutritif synthétique, mais le choix de celui-ci est d'une importance primordiale. On retiendra cependant que la réponse in vitro est sous la dépendance de nombreux facteurs.

II.5.1.1. L'âge physiologique et ontogénique de l'organe :

Généralement dans les cultures in vitro, on privilégiera les explants les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) car c'est l'état juvénile qui semble offrir le plus de possibilités de régénération

(Davis, 1986 ; Saadi, 1991).

Souvent, ce sont les tissus provenant d'embryons qui expriment le plus souvent, d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à la régénération. C'est le cas par exemple du pois **(Saadi, 1991).**

II.5.1.2. L'époque de prélèvement :

Ce problème se pose surtout pour les espèces vivaces, on peut distinguer un stade de vie active et un stade de vie ralentie de la plante ce qui conduit les explants à développer des réactions différentes en culture in vitro. Cette différence peut être expliquée par la modification des équilibres internes des régulateurs de croissance (auxines, cytokinines, gibbérellines ...) lors des différentes saisons **(Auge et al., 1989).**

II.5.1.3. La taille de l'explant :

Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes. La taille choisie variera selon la nature de l'explant. Si le tissu végétal est de nature organisée, un ensemble assez complet sera nécessaire (soit un nœud, un apex, ou un bourgeon entier) mais dans le cas d'une structure différenciée (éléments de

feuilles, de tige, de racines, inflorescence.) des fragments de 5 à 10 mm suffiront (**Zryd, 1988 ; Auge et al., 1989 ; Hannweg et al., 1996**).

D'une manière générale, il existe des tissus privilégiés appelés « tissus cibles » qui répondent à un stimulus indicateur qui orientera le programme morphogénétique vers une voie particulière de développement contrairement à certains tissus récalcitrants aux manipulations in vitro, due essentiellement à un manque de compétence cellulaire (**Coleman et Ernst, 1990 ; Ronchi, 1995 ; Yadav et Rajam, 1998**).

II.5.2. L'influence de génotype :

La plupart des plantes montrent une régénération génotypique spécifique liée à l'espèce. A l'intérieur d'une même espèce, un génotype donne des bourgeons tandis qu'un autre ne peut fournir que des embryons (**Auge et al. 1989**).

Cependant, plusieurs auteurs mentionnent que seulement certains génotypes paraissent posséder la capacité d'induire une embryogenèse somatique. Cette capacité, chez beaucoup d'espèces semble être génotypiquement contrôlée

(**George et Sherrington, 1984; Brown, 1988; Dodeman et al., 1997**).

II.5.3. L'influence de milieu de culture :

Avec le développement des cultures de tissus, divers milieux de base comprenant des sels inorganiques, des composés organiques (sucres, vitamines et régulateurs de croissances) ont été progressivement utilisés. Certains milieux proposés dans un but donné sont en fait utilisables d'une manière beaucoup plus étendue. Les milieux de culture sélectionnés doivent être le plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante soumise à l'étude afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique. Les principaux constituants d'un milieu de culture sont généralement représentés par les macros et les microéléments, une source carbonée et azotée, des vitamines et des régulateurs de croissance.

Selon **Evans et al, (1981)**, dans 70% des cas, des milieux de culture de base de type Murashige et Skoog (MS) ont été utilisés. Le milieu MS a été employé d'une manière générale pour tous les types de cultures in vitro. Mais c'est essentiellement pour le déclenchement de

l'organogenèse, en particulier pour la néoformation de bourgeons qu'il s'est révélé nettement supérieur à d'autres milieux

(Margara, 1989).

Le milieu de Murashige et Skoog est caractérisé principalement par une très forte teneur en sels minéraux, en particulier en potassium et par une concentration également élevée en azote (sous forme de nitrate et d'ammonium) dont 1/3 apporté sous forme réduite (ionsNH₄⁺); le rapport nitrate / ammonium, dans ce milieu est très favorable à l'induction de l'embryogenèse somatique, en particulier chez *Feijoa sellowiana* **(Delvesco et Guerra, 2001).**

II.5.4. Les régulateurs de croissance :

Un régulateur de croissance, appelé également « phytohormone », est défini comme étant, une substance qui, suivant sa concentration absolue ou relative dans le milieu, peut supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de différenciations **(Vidalis et al., 1989).**

L'influence de ce rapport hormonal n'est, cependant, pas une règle générale pour toutes les espèces végétales. En effet, il suffit, dans certains cas, d'ajouter au milieu de culture l'un ou l'autre des deux régulateurs précités pour parvenir à une réponse morphogénétique **(Dal Vesco et Guerra, 2001).**

II.5.5. L'influence de la source de carbonée :

Les tissus en cultures in-vitro sont largement hétérotrophes via à vis du carbone en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc indispensable d'ajouter une source carbonée (des glucides) au milieu de culture. Les glucides remplissent deux fonctions principales dans les milieux de culture ; ils fournissent de l'énergie nécessaire pour la croissance des tissus et maintiennent une pression osmotique donnée du milieu de culture **(Zryd, 1988).** Cette pression osmotique, appelée aussi effet osmotique, peut avoir diverses actions sur les tissus. Elle agit, dans certains cas, sur l'orientation ou l'expression morphogénétique des tissus **(Belaizi et Boxus, 1995 ; Charniere et al., 1999)**, dans d'autres, sur la maturation des embryons somatiques produits **(walker et Parrott, 2001).**

Les glucides, les plus généralement utilisés sont le saccharose et le glucose (**Margara, 1989 ; Druart et Samyn, 1995**).

Selon certains auteurs, le maltose peut constituer une bonne source carbonée puisqu'il permet, dans certains travaux portant sur l'embryogenèse, d'améliorer à la fois, et la qualité et la quantité des embryons somatiques produits (**Saadi, 1991**).

L'organogenèse ou l'embryogenèse somatique ne semblent pas être influencées uniquement par la nature des sucres mais aussi, et pour un même sucre, par sa concentration dans le milieu de culture.

Généralement, selon Piatti, 1988, les doses employées oscillent entre 2 et 12 %.

L'effet dose peut avoir, comme nous l'avons signalé ultérieurement, une grande influence sur le devenir morphogénétique des cultures. Dans ce cas, l'exemple du tournesol est très significatif, l'usage d'une concentration de 12% en saccharose peut orienter le processus vers la voie de l'embryogenèse somatique, alors qu'une concentration de 3 % conduirait vers la néoformation de bourgeons (**Charniere, 1999**).

II.5.6. La lumière et la photopériode :

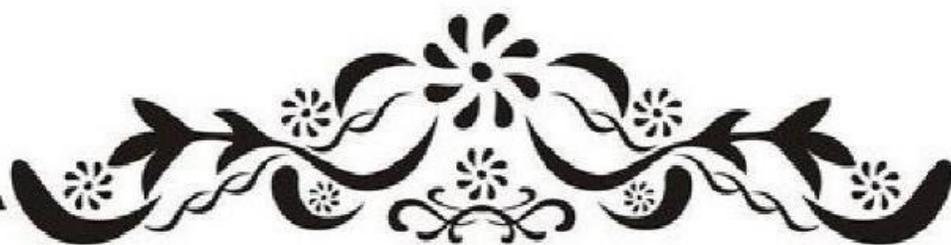
La lumière est un facteur déterminant pour la culture in vitro des plantes, elle a une grande influence de par la durée d'exposition (photopériode).

Selon **Hussey et al, (1981)** d'autre part la longueur de jour qui affecte la vigueur et le développement des proliférations et la croissance des cals, cette dernière pourrait aussi contribuer à la formation des cals (**Briggs ,1964**), de façon général le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes (**Bommeneni et jauhar , 2003**).

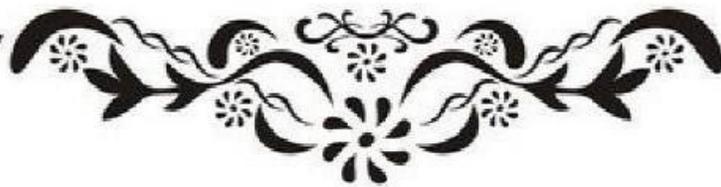
Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au repotage en serre, il apparaît souvent préférable d'augmenter l'intensité de l'éclairage (par exemple 10000 lux) (**Margara ,1989**).

II.5.7. La température :

La température de beaucoup de chambres à culture est constante de l'ordre de 22° à 25° C (**MARGARA, 1984**).



Chapitre III :
La Micro Propagation



Introduction :

La multiplication végétative par culture in-vitro ou micro propagation présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites "conventionnelles" de propagation. Cette technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares, ou présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées.

III.1. Présentation de la micro propagation :

La micro- propagation in vitro apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (Ochatte, 2005).

Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles (Bretaudeau, 2006).

La micro propagation consiste en une prolifération des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère. Ceci offre une grande garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours des repiquages successifs (Zryd, 1988).

L'application de la technique de la micro propagation des plantes ligneuses, fruitiers forestiers, permet l'amélioration de leurs capacités d'enracinement notamment sur le porte-greffe reconnue difficile (LÊ et al. 2005).

Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforesteries,... (Bretaudeau, 2006).

III.2. Les techniques de la micro propagation :

L'une qui utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires) Potentiellement capable de donner suite, au développement normal, d'un individu est appelée micro bouturage (Saadi, 1991) cette technique est souvent appelée "multiplication conforme" car elle part de méristème préexistant dans les quels, les cellules sont génétiquement

(Amato, 1977 in Boxus, 1995) l'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tige, puis son enracinement.

L'autre voie, utilise toute sorte de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, de cotylédons...etc) pour aboutir à la néoformation soit de tiges (caulogenèse) et de racines (Rhizogenèse), c'est l'organogenèse soit d'embryons somatique et c'est l'embryogenèse somatique.

III.2.1. Cultures de méristème :

Dès 1952, Georges Morel de l'INRA de Versailles réussit à obtenir une plante entière à partir d'un méristème (OCHATTE, 2005).

Le méristème étant toujours indemne de virus, on peut obtenir des plantes saines à partir de plantes malades en le cultivant.

Cette technique est donc utilisée pour obtenir des plants sains à partir de plants virosés (Auge, 1992). Sur les pieds mères choisis, on prélève des boutures à l'extrémité des rameaux. Sous une loupe binoculaire et sous hotte stérile, avec des outils stérilisés, la bouture est débarrassée de ses jeunes feuilles. Quand le méristème est visible, on élimine délicatement les dernières ébauches et on délimite un petit cube dont une des faces est constituée par le méristème (0,2 à 0,3 mm de côté) qui est prélevé et repiqué sur un milieu gélosé.



Figure 15: Méristèmes chez *Kalanchoe*. ©INRA, J Margarat.

III.2.2. Organogenèse :

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de méristèmes nouveaux (Margara, 1989).

En partant d'un explant, elle aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (caulogenèse) et de racine (rhizogenèse).

III.2.2.1. Caulogenèse :

La caulogenèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal. Les bourgeons terminaux dérivent de la gemmule de l'embryon. Les bourgeons axillaires sont produits généralement par les deux ou trois assises cellulaires superficielles de la tige. Les bourgeons adventifs à partir d'organes différenciés de la plante (entre nœuds, tubercules, racines). Ils peuvent avoir pour origine des massifs cellulaires restés méristématiques ou bien provenir d'une différenciation de certaines cellules (**Caraglio, 2012**).

Les bourgeons néoformés in vitro peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur un cal, ils peuvent être considérés comme un cas particulier de bourgeons adventifs (Boxus, 1995). Ils sont induits sur tout type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (**Margara, 1989**).

III.2.2.2. Rhizogenèse :

Est le phénomène d'organogenèse le plus généralement impliqué dans la multiplication végétative. L'étude de la rhizogenèse tient de plus en plus compte des interactions complexes de facteurs, mais elle reste dominée par le problème de régulation hormonale et en particulier par le rôle des auxines dans l'organogenèse. Sur le plan fondamental, la rhizogenèse, plus accessible à l'expérimentation que la caulogenèse, demeure une bonne voie d'approche du déterminisme de l'organogenèse, lié aux mécanismes de différenciation et de dédifférenciation cellulaire (**MARGARA, 1984**).

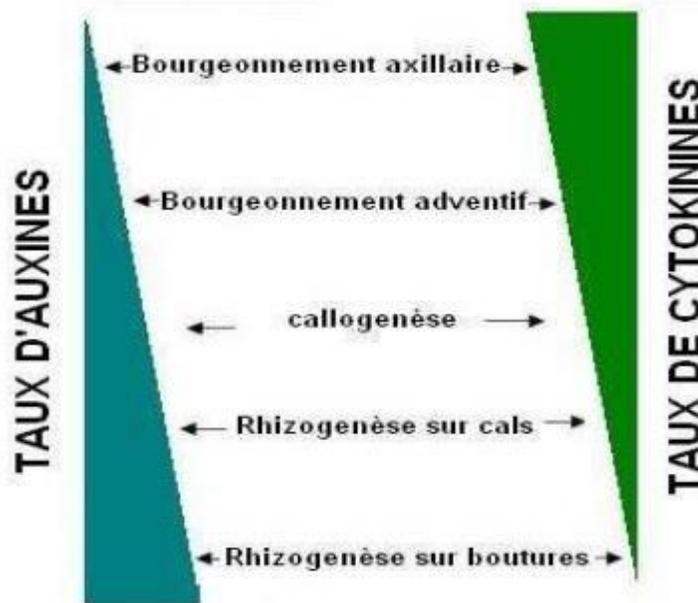


Figure 16: Types d'organogénèse contrôlée par les concentrations relatives d'auxine(s) et

III.2.3. L'embryogenèse somatique :

L'embryogenèse somatique est une particularité des végétaux. C'est le processus par lequel des cellules somatiques, non-gamétiques, produisent des embryons normaux du point de vue morphologique et du développement. Dans ce cas, une cellule diploïde se différencie de sorte que, mise dans un milieu adéquat, elle se développe en un embryon qui donne, par la suite, une plante entière.

La production d'embryons somatiques a été décrite pour la première fois chez la carotte en 1958 (**Steward et al. 1958**). Les explants (morceaux de la plante d'origine) sont cultivés dans un milieu riche en auxine. Les cellules de l'explant se différencient et se divisent, elles deviennent compétentes pour initier un programme embryogène, mais ce n'est que lorsqu'elles sont mises en culture dans un milieu sans auxine que le développement des embryons somatiques a lieu. Depuis, des embryons somatiques ont été obtenus chez différentes plantes en utilisant des techniques très variées et à partir de différents explants : microspores, protoplastes, embryons immatures, explants tissulaires et cellules en culture *in vitro* (**Van Englen et De Vries, 1992 ; De Jong et al., 1993 ; Zimmerman, 1993 ; Mordhorst et al., 1997**).

III.2.3.1. La différence entre embryon somatique et embryon zygotique :

Quelques différences existent entre l'embryogenèse somatique et l'embryogenèse zygotique. Cette dernière débute toujours à partir d'une seule cellule, le zygote, qui se forme à la suite de la fécondation, alors que l'embryogenèse somatique peut être indirecte, c'est à dire d'origine multicellulaire, ou directe lorsqu'elle dérive d'une seule cellule (**Williams et Maheswaran, 1986**).

Une autre différence concerne le suspenseur qui peut soit ne pas se former lors de l'embryogenèse somatique ou bien avoir une morphologie très différente (**Yeung et Meinke, 1993**).

Pour finir, les embryons somatiques ne rentrent pas en dormance. En revanche, l'expression des gènes semble être similaire chez les deux types d'embryons (**Perez-Grau et Goldberg, 1989**

; **De Jong et al. 1993**).

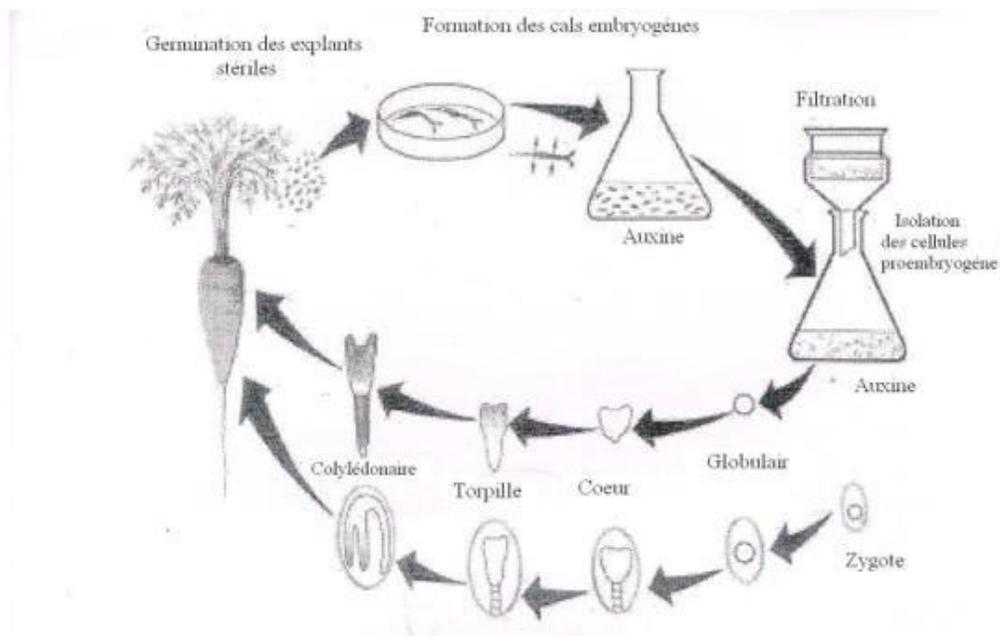


Figure 17: Embryogenèse somatique et zygotique chez la carotte (Steward et al. 1958).

III.3. Intérêt de micro propagation :

La micro propagation est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (plant), l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère (**Ferry et al., 1998 ; Semal, 1998**).

Les plants reproduits ne sont pas seulement conformes mais présentent aussi une grande uniformité

Par ailleurs, l'usage de cette technique nécessite peu d'espace et peut-être programmé indépendamment des saisons. La technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes (**Margara, 1982 ; Boxus, 1995 ; Semal, 1998 ; Skirvin et al. 2000**).

III.4. Les principaux stades de la micro propagation :

Il y a 4 phases de cultures :

- Etablissement de la culture aseptique
- Multiplication : on cherche le maximum d'unités de propagation dans le minimum de temps. Le taux de multiplication moyen est de l'ordre de 200000/an à partir d'une bouture. Dans le milieu, il faut favoriser les cytokinines pour la multiplication cellulaire. La balance hormonale endogène de la plante mère est aussi importante (choix de l'explant).
- Enracinement : étape la plus délicate. On cherche à différencier des initiaux racinaires et provoquer leur développement.
- Acclimatation en serre (10 à 60 jours). On cherche à maintenir une humidité très élevée au début. On réduit ensuite progressivement l'humidité ambiante.

III.5. Le milieu de culture :

Un milieu de culture est une solution aqueuse comprenant des sels minéraux, des éléments organiques (sucres, vitamines, acide aminée) et éventuellement des phytohormones ou régulateurs

de croissance. Cette solution aqueuse est la plupart du temps solidifiée par une substance extraite des algues : agar-agar ou gélose (AUGE, 1989 ; TEOULE, 1993).

L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu, en fait, tout ce que la plante mère peut fournir, par les racines et les feuilles.

III.5.1. Les éléments minéraux :

Les besoins des cultures de tissus en éléments minéraux ont été étudiés par différents auteurs et le fruit de leurs recherches a donné lieu à différentes compositions minérales toujours utilisées aujourd'hui. Ces formulations portent souvent le nom de leurs auteurs tels que Gamborg (Canada), Gautheret (France), Heller (France), Murashige et Skoog (Etats- Unis), White (Etats- Unis), Morel (France), etc. La composition du milieu de culture Murashige et Skoog est sans doute la plus utilisée car elle convient à un très grand nombre de plantes. Ce milieu est très riche en sels minéraux.

III.5.1.1. Les macroéléments :

Il s'agit de 6 éléments présents à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P).

III.5.1.2. Les microéléments :

Appelés parfois oligo-éléments, et bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel. Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le chlore (Cl), le cobalt (Co), le nickel (Ni), etc...

III.5.2. Les éléments organiques :

III.5.2.1- Les sucres :

Dans le cas de tissus végétaux placés en culture in vitro, l'assimilation chlorophyllienne est nulle ou insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant. Dès lors, on ajoute

des sucres, le plus souvent du saccharose, aux milieux de culture pour fournir à l'explant une source de carbone.

III.5.2.2- Les vitamines :

Les vitamines sont des substances organiques reconnues pour stimuler la croissance. Elles sont particulièrement utiles en micro propagation lorsqu'un fragment seulement de la plante est utilisé pour générer la culture de plantes entières. On comprendra que dans ces circonstances, la synthèse endogène (par le tissu végétal lui-même) de vitamines risque d'être insuffisante et que le milieu devra y suppléer en conséquence.

Les vitamines les plus fréquemment utilisées sont la thiamine HCL, la pyridoxine, la biotine, le pantothénate de calcium et le myo-inositol (le myo-inositol est parfois considéré comme un sucre).

III.5.2.3- Les acides aminés :

Il a parfois été observé que l'apport d'acides aminés favorisait la prolifération.

III.5.3. Les régulateurs de croissance :

On les appelle aussi « phytohormones » ou « hormones végétales », mais considérant qu'il s'agit variablement de produits de synthèse ou de produits synthétiques, il est préférable d'utiliser le terme régulateur de croissance. Ces substances sont utilisées à des doses très faibles.

Les trois principaux groupes de régulateurs de croissance d'usage fréquent sont les auxines, les cytokinines et les gibbérellines. Le choix du ou des régulateurs utilisés ainsi que leur quantité est généralement guidé par la littérature.

III.5.3.1. Les auxines :

Elles favorisent la croissance des cals, les divisions cellulaires, l'allongement cellulaire, le développement des bourgeons adventifs ainsi que l'enracinement.

- a. Acide indole-3-acétique (AIA) : L'AIA est une substance naturelle pouvant être obtenue par synthèse chimique.
- b. Acide naphthalène acétique (ANA) : Cette molécule est souvent utilisée pour favoriser la

rhizogenèse.

- c. Acide indole butyrique (AIB).
- d. Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) : Le 2,4-D est largement utilisée comme Herbicide t pour la production de cals surtout.

III.5.3.2- Les cytokinines :

Elles stimulent les divisions cellulaires, la croissance des bourgeons axillaires, régularisent la morphogenèse et contribuent au renouvellement de la chlorophylle.

- a. Zéatine : C'est une substance naturelle.
- b. Isopenthényladéine (2-i-P) : C'est une substance naturelle.
- c. Kinétine : La Kinétine est une substance de synthèse.
- d. benzylaminopurine (BAP) et benzyladénine (BA) : La BAP est une substance de synthèse, largement utilisé en raison de sa grande activité et de son faible coût.

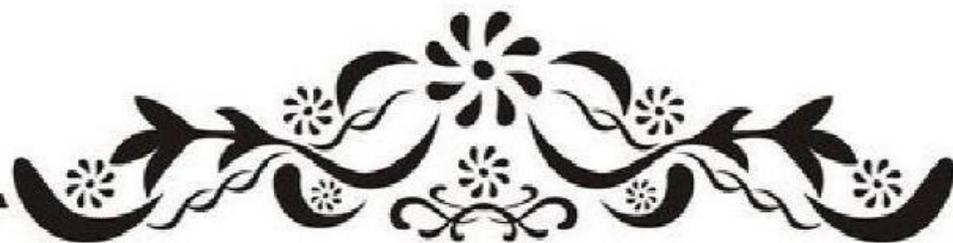
III.5.3.3- Les gibbérellines :

Elles favorisent le grandissement cellulaire, l'allongement des entre-nœuds et lèvent la dormance des graines. Seul l'acide gibbérellique (Ga3) est utilisé.

III.5.4- Les géloses :

La gélose (ou agar) ajoutée au milieu nutritif permet l'obtention d'un milieu semi solide ou solide dans lequel les explants peuvent être repiqués et supportés. La gélose a l'avantage de retenir très peu les ions mais en contrepartie elle fournit un milieu de vie pauvre en oxygène lorsqu'elle est utilisée à forte concentration. La qualité d'un milieu gélosé est donc dépendante d'une part de sa fermeté, indispensable au support des plantes, et d'autre part de sa souplesse, qui facilite la diffusion des éléments nutritifs. La concentration utilisée varie selon le niveau de pureté de la gélose et l'objectif de la culture.

La gélose la plus utilisée c'est l'Agar-agar. Il s'agit d'une substance naturelle extraite de différentes espèces d'algues marines. On la classe parmi les sucres parce qu'elle est identifiée comme un polyside (donc un glucide).



Partie
Expérimentale





Chapitre I :
Matériel



I.1. Matériel végétal :

Le matériel utilisé dans notre expérimentation repose sur une plante aromatique à savoir myrtus communis L. Récolté du parc national de chréa secteur El hammdania.

I.2. Milieux de culture de micropropagation :

Afin de déterminer les conditions nutritives les plus favorables à la croissance des explants nous avons choisi le milieu : MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) (Tab.6).

Les constituants principaux de ce milieu sont l'eau ionisée et les sels minéraux qui se répartissent en deux groupes, les macroéléments (N, P, K, S, Mg, Ca) et micro-éléments (Fe, B, Mn, Zn, Cu, N, Co, Mo, I). La source de carbone est le saccharose. Pour ce milieu, la solidification est réalisée à l'aide de l'Agar.

Tableau 6: conditions du milieu MS (Murashigue et Skoog 1962).

	Ingrédients	Solution mère Mg/l	Volume de prélèvement	
Macroéléments	NH ₄ NO ₃	1650	50ml	A
	KNO ₃	1900		
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440		
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370		
	KH ₂ PO ₄	170		
Microéléments	MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	10 ml	B
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6		
	H ₃ BO ₃	6.2		
	KI	0.83		
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		
Fer-EDTA	Na ₂ -EDTA	37.3	10ml	C

	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8		
Vitamines et acide amines	Glycine	0.2	10ml	D
	Nicotinique	0.5		
	Thiamine-Hcl	0.1		
	Myo-inositol	100		
Sucre	Saccharose	30000mg/l	30000mg	E
Agar	Agar	7mg/l	7g	F



Chapitre II:
Méthodes



II.1. Préparation des solutions mères de milieu de culture :

a. Préparation de la solution mère de macroéléments :

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau déionisée dans un bécher de 1L;
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués (A) en chauffant légèrement au besoin,
- Transférer la solution dans un flacon de 1 litre et compléter à 1 litre avec l'eau distillée,
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

b. Préparation de la solution mère de micro-éléments :

La préparation de la solution mère consiste à :

- Verser 600 ml d'eau déionisée dans un bécher de 1L;
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués (B) en chauffant légèrement au besoin;
- Pour le Cu et le Co peser 10 mg de chaque sel et les dissoudre chacun dans 10 ml d'eau distillée. Prélever 2,5 ml de chaque solution et les ajouter aux autres sels.

- Transférer la solution dans un flacon de 1 litre et compléter à 1 litre avec l'eau distillée;
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

c. Préparation de la solution mère de Fe-EDTA :

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau déionisée dans un bécher de 1L.
- Ajouter quelques gouttes de NaOH et chauffer jusqu'à ébullition.
- Couper la source de chaleur.
- Ajouter le Na₂ EDTA et mélanger jusqu'à dissolution.

- Ajouter $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.
- Transférer la solution dans un flacon de 1 litre et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

Lors de la préparation des solutions mères, les différents éléments sont apportés dans l'ordre décroissant de leur concentration afin d'éviter tout risque de précipitation. Ensuite toutes les solutions mères sont étiquetées, puis conservées au froid (4°C) et à l'abri de la lumière.

d. Préparation de la solution mère des hormones :

- Peser les régulateurs de croissance désirés et les dissoudre dans quelques gouttes (2 ml) de solvant approprié.
- Étendre avec un peu d'eau, vérifier l'état de solution et ajouter un peu de solvant au besoin;
- Transférer la solution dans un flacon de 100 ml et compléter à 100 ml avec

l'eau distillée puis le ranger au réfrigérateur.

II.2. Préparation de la solution finale du milieu de culture :

A partir de la solution mère dont la préparation est citée ci dessus, on a pu préparer la solution finale, avec les concentrations exigées, selon le protocole suivant :

- Verser approximativement 600 ml d'eau déionisée dans un bécher de 1l;
- Peser et dissoudre le saccharose en chauffant légèrement au besoin;
- Ajouter le volume nécessaire de macroéléments, micro-éléments, FE-EDTA;
- Ajuster le pH à 5.7 ± 0.1 avec HCl (10%) ou NaOH (1N);
- Compléter à 1 litre avec l'eau distillée;
- Chauffer puis ajouter l'Agar graduellement en brassant le milieu avec un agitateur. Il

faut réduire la puissance de chauffe pour éviter le débordement et brasser continuellement, la gélose se dissout et le milieu devient limpide au bout de 30 minutes environ ;

- Enfin, le milieu ainsi préparé est transféré dans des tubes de 25 x 150 mm, à raison de 45 ml par tube. Ensuite, les tubes sont hermétiquement fermés avec du coton et du papier aluminium.

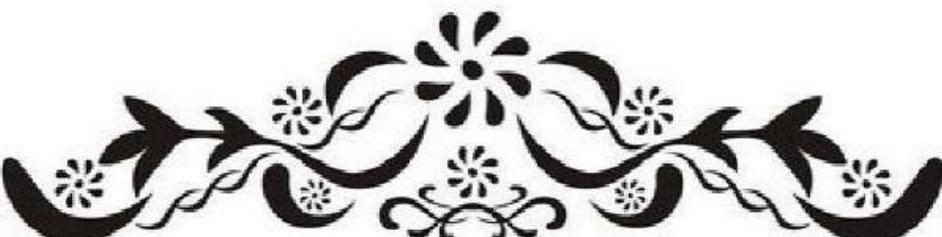
II.2. Stérilisation :

II.2.1. Stérilisation du milieu de culture :

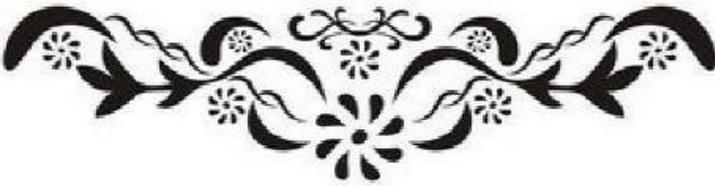
La stérilisation de milieu de culture, est assurée par l'autoclave à une température de 120° C, et une pression de 1 bar pendant 20 minutes, la technique de la culture in vitro exige cette température, afin de s'assurer de la destruction des bactéries.

II.2.2. La Stérilisation des instruments :

Tous les instruments métalliques (pinces, scalpels, bistouris ...) ou verreries (Béchers, boîtes de pétri comprenant du papier buvard et des erlènes...) sont enrobés avec du papier journal avant leur mise en étuve, et sont mis à l'étuve à une température de 170° à 200° C pendant 2 heures de temps, ils ne seront découverts, que sous la hotte, au moment de leur utilisation. Au cours des manipulations les instruments métalliques sont plongés dans l'alcool à 70%, puis passés aux flammes du bec Bénédict afin de brûler l'alcool.



**Conclusion
Générale**



Conclusion Générale

Conclusion :

La récolte et l'utilisation intensive par l'Homme ont provoqué la disparition de certaines espèces (**Boullard, 2001**).

Afin de palier à ce problème, plusieurs techniques de culture in vitro sont d'avantage employées pour satisfaire les besoins en agriculture, en industrie et en horticulture. Elles demeurent un outil très efficace au service de la recherche biologique et physiologique (**Auge et al.1989**).

La famille des myrtacées comprend plus de 5650 espèces réparties en 48 à 134 genres environ distribuées surtout dans les régions méditerranéennes.

Le présent travail a porté sur l'étude de la multiplication en micropropagation et calogènes de la plante *Myrtus communis* L. de la région de Blida. Dans le but de les introduire in vitro et comprendre leur comportement organogène et Callogène Cette étude s'intègre également dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes, ainsi que dans le cadre de la préservation des espèces endémiques en voie de disparition.

Les références bibliographiques :

A

Aiboud, K. (2012). Etude de l'efficacité de quelques huiles essentielles, uni Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 21p.

APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161, 105- 121.

Auge A., 1989. La culture in vitro et ses applications horticoles. Chapitre 2 : les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures in vitro. P 7 – 29. Ed : Lavoisier Tec et Doc. J.B Bailliere. 225 Pages.

Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, J-Cl., Reynoird, J.P., et Strullu, D.G. (1989). La culture in vitro et ces applications horticoles. 3ème édition revue, corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Lavoisier 225p.

B

Belaizi, M., et Boxus, P. (1995). In-vitro shoot multiplication of Cork.oak (*Quercus suber* L.) influence of different carbohydrates. Bull Rech.Agron.Gembloux. 30: 1-2.

Beloued A., 1998. Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger.

Boccon-Gibod J., Jalouzot R., 1989. Les biotechnologies en horticulture, possibilités et perspectives. In La culture in vitro et ces applications horticoles. Ed J.B. Bailliéte. pp 91-131.

Bommineni U R ,Jauhar PP., 2003.Regeneration of plant through isolated scirtelum culture of durum . Wheat .plant sci .116; 197.

Boullard, B. (1988). Dictionnaire de Botanique. Marketing. 398 p.

Boutherin B., Bron G., 2002. Multiplication des plantes horticoles. Ed : 2 tec et doc. 248 pages.

Bouzabata A., 2013. Traditional Treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy 5(1), 12–20.

Boxus, P. (1995). Multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique in biotechnologies végétales. BV 93, Ed Cned. Aupelf- Uref. 191p.

Bretaudeau A., 2006. Les techniques de culture in vitro et la micropropagation des espèces végétales .,IPR/Kolibougou Koulikoro B P 06.

Briggs W B ., 1964. phototropis; in higher plants in physiology academic press :1; 223-271.

Brown, C.W., (1988): Gemplasm of in-vitro somatic embryogenesis in alfalfa.

Bruneton J.,1999. Pharmacognosy Phytochemistrymedical plants Lavoisiepublishing, USA, New York 2:a upplagan s.p 555-558.

C

Caraglio Y., 2012. L'organogenèse. UMR Cirad/Inra de Modélisation des plantes (AMAP). Programme modélisation des plantes du Cirad-amis
<http://amap.cirad.fr/architecture/organo/organo.htm>introduction.

Charniere, F., Sotta, B., Miginiac, E., et Hahne, G. (1999): Induction of adventitious shoots or somatic embryos on in-vitro cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology et Biochemestrie.* 36(9): 81-94.

Coleman, G.D., Ernst, S.G. (1990). Axillary shoot proliferation and growth of *Populus deltoides* shoot cultures. *Plant cell Rep.* 9: 165-167.

D

Dalvesco, L.L., et Guerra, P.M. (2001). The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 64: 19 – 25.

Davies, P.J. (1987). The plant hormones and their role in plant growth. Dordrecht. The Netherlands Flower Academic Press. P1-11.

De Jong, A.J., Heidstra, R., Spaink, H.P., Hartog, M.V., Meijer, E.A., Hendriks, T., Schiavo, F.L., Terzi, M., Bisseling, T., Van Kammen, A., and De Vries, S.C. (1993). Rhizobium Lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell.* 5: 615-620.

Demarly, Y., et Sibi, M. (1996). Amélioration des plantes et biotechnologie. Ed. John Libbey Eurotext. Paris. pp 99-111.

Djennane, S., et Klifatti, A. (1996). Etude de quelque facteur influençant la tubérisation in vitro de trois variétés de pomme de terre. Mémoire en vue d'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Agronomie. Institut national d'Agronomie (INA) Alger. pp 26-37.

Dodeman, V.L., Ducreux, G., et Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 48 (313): 1493 -1509.

Druart, PH., et Samyn, G. (1995). Carbohydrates and in-vitro organogenesis. *Bull.Rech.Agron.Gembloux*. 30 (1-2): 1-3.

Ducreux g., 2002- Introduction à la botanique.Ed.Belin.paris.255p.

E

Engelman, F. (1986). Cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile. Mise au point des conditions de suivi et de reprise. These de doctorat d'université. Univ. Parie 6. 226p.

Evans, D.A., Sharp, W.R., et Flien, C.E. (1989). Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis in Plant tissue culture, méthodes and application agricultures. Throupe T.A. Ed Academic press. pp 45 - 113.

F

Ferry, M., Bouguedoura, N., et El Hadrami, I. (1998). Patrimoine génétique et technique de propagation in-vitro pour le développement de la culture du palmier dattier. Numéro spécial oasis .*Secheresse*. 9 (2) :139-146.

Francllet, A. (1980). Colloque international sur la culture in vitro des essences forestières.

G

George, F., et Sherrington, P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture. *Exegetic*. England. pp 125 -129.

Goetz P., Ghedira K., 2012. *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) : Myrte, in : *Phytothérapie anti- infectieuse*, Collection *Phytothérapie Pratique*. Springer Paris, pp. 313–320.

Govaerts R., Sobral M., Ashton P., Barrie F., Holst B.K., Landrum L.R, Matsumoto K., Mazine F.F., Nic Lughadha E., Proença C., Soares-Silva L.H., Wilson P.G, Lucas E.J. (2008) *World Checklist of Myrtaceae*. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.

Grêté P. (1965) *Précis de botanique, Systématique des angiospermes*. Tome II ; 2ème Édition révisée, Faculté de Pharmacie de Paris, pp. 429.

Guignard, J.L. (1993). Abrégé de botanique. Masson. 274 p.

H

Hannweg, K., Watt, M.P., et Berjak. (1996). A simple methode for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants. Bot.Bull. Acad .Sin. 37: 213 - 217.

Hussey,G et Stacey ,N J .,1981.In vitro propagation of potato (*Solanum teberosum* of potato of photoperiod on in vitro tuberisation of potato- *S tubrerosum*- .JEA Seabrook shirlyn m CD. levey
.1993 .plant cell m tissue and organe culture .1993.34; 43-51.

J

Jay allemend, C., Capelli, P., et Cornu, D; (1992). Root development of in vitro hybrid walnut microcutting in vermiculite containing gelrite medium. Station d'amélioration des arbres forestiers INRA, 45160. Ardon France. Scienda horticultura. 51(3-4) : 335-342.

K

Kaddem. S.E. (1990). Les plantes médicinales en Algérie. Paris, Le monde pharmaciens: 113.

L

LÊ C.L, Julmi C Nowbuth L , Manière M, Thomas D , Joffrey J.P , Tschuy F. , 2005.AgroscopeRAC Changins : 25 ans de culture in vitro .Revue suisse Agric .37(3) :133-136.

M

Margara J., 1984. Base de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. Institut National de la recherche Agronomique (INRA), 262p.

Margara, F. (1982). La multiplication végétative in-vitro. Aspects généraux. Agro. 15:701-711.

Margara, F. (1989). Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Ed INRA, Paris. 262p.

Migliore, J. (2011). Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en méditerranée et au sahara. Thèse de doctorat, Université paul cézanne d'Aix-Marseille III: 66-117.

Mordhorst, A.P., Toonen, M., A, J., et Devries, S. C. (1997). Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 16: 535-576.

Morel, G. (1952). Guérison de dahlias atteints de maladie à virus. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 235 : 1324-1325.

Mulas, M., Francesconi, A. H. D., & Perinu, B. (2002). Myrtle (*Myrtus communis* L.) as a new aromatic crop: cultivar selection. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9, 127–131.

Mulas, M., Francesconi, A.H.D., Perinu, B., & Fadda, A. (2002). ‘Barbara’ and ‘Daniela’: Two Cultivars for Myrtle Berries Production. *Acta Horticulturae*, 576, 169-175.

N

Norrel, B. (1973). Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique. *Soc. Bot mémoire. coll Morphologie*. pp 71 - 98.

O

Ochatte C., 2005. Growth, quality and biotechnology, WFP publisher. Finland.

P

Perez-Grau, L., et Goldberg, R.B. (1989). Soybean Seed Protein Genes Are Regulated Spatially during Embryogenesis. *Plant Cell*. 1: 1095-1109.

Peyecru P., Bechr J. C., Carion F., Crand perrin D. & Perrier C., 2007. *Biologie*. Ed. Dunod. Paris. P 110.

Q

Quézel P., Santa S. (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition, CNRS, Paris, 636- 637.

Quézel, P., Santa, S., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique.

R

Rajnchapel, J. (1987). La pomme de terre fait peau New. In Biofuture, Decembre.p 25 33.

S

Saadi, A. (1991). Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse 121somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon. 162p.

Scriban, R. (1988). Biotechnologie. 3ème édition revue, corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Paris 400p.

Semal, J. (1998). Reproduire à l'identique : Mythe et réalité .Cahier Agriculture. (7) : 6-8.

Simonin G., INRA-Dijon 2006. : La culture in vitro. Dossier de synthèse.

Skirvin, R.M., Cogner, M., Norton, A.M., Motoika, S., et Gorvin, D. (2000). Somaclonal variation: do we know what causes it. AgbiotechNet.V12 ABNO 48.

Steward, F.C., Mapes, M.O., et Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. 45: 693-703.

Sumbul. S; Aftab Ahmad. M; Asif. M; & Akhtar. M. (2011). *Myrtus communis* Linn. A review, Indian Journal of Natural Products and Resources, 2: 395-402.

T

Teoule E., 1993. Biotechnologie.4em Ed : Tec et Doc. 904 Pages.

Tuberoso. C. I. G; Rosa. A; Dessì. M. A et al. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts , Food Chemistry, 123 : 1242- 51.

V

Van Englen, F.A., et de Vries, S.C. (1992). Extracellular proteins in plant embryogenesis. Trends Genet. 8: 66-70.

W

Walker, D.R., et Parrott, A.W. (2001). Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. Plant Cell Tissue and organ Culture. 64: 55 - 62.

Swaminathan, E.G., et Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*. 57: 443-462.

Y

Yadav, J.S., et Rajam, M.V. (1998). Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant physiol.* 116: 617 - 625.

Yeung, E.C., et Meinke, D.W. (1993). Embryogenesis in Angiosperms: Development of the Suspensor. *Plant Cell*. 5 : 1371-1381.

Z

Zimmerman, L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. 5: 1411-1423.

Zryd J P., 1988. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Lausanne, Suisse : Presses Polytechnique Romandes, 305 p.

Zryd, J.P. (1988). Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Ed Press.Polytechniques Romandes Suisse. 308p.

LES LIENS/ SITES Internet :

ANONYME 1: Julve, Ph., 2020 ff. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 27 avril 2020. <http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm>.

ANONYME2 : <https://www.aromaticulture.com/plante-aromatique-MYRTACEAE-Vivace-Myrtus-communis-Flore-Pleno-185.html>.

ANONYME3 : <https://www.bojardin.fr/article/myrte-panache-myrtus-variegata#containerDescription>.

ANONYME4 : <https://www.promessedefleurs.com/arbustes/arbustes-par-variete/myrte/myrtus-communis-subsp-tarentina-myrtus-commun.html>.

ANONYME 5: <http://www.wikiophyto.org/wiki/Myrte>.

ANONYME 6: <https://jardinage.ooreka.fr/plante/voir/515/myrte>.