UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

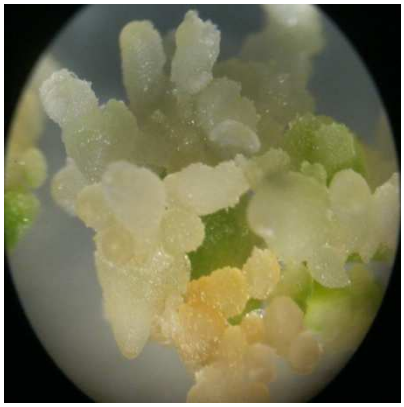
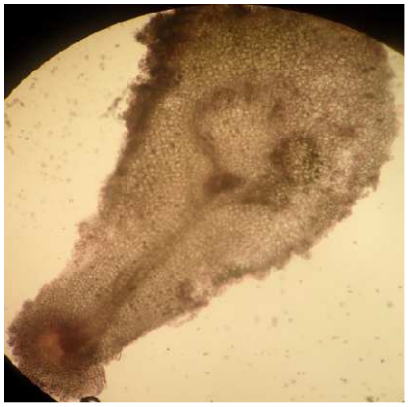
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES (D.E.A)

EN BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES

Option: PHYSIOLOGIE VEGETALE

REGENERATION PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE *Keraudrenia macrantha* (Sterculiaceae), UNE ESPECE ENDEMIQUE MENACEE DU SITE MINIER D'AMBATOVY

Présenté par: **RAZANADRASOA Voahanginirina Julie**

Maître-ès-sciences

Soutenu publiquement le 4 septembre 2014

Devant la commission d'examen composée de:

Président : Professeur Isabelle RATSIMIALA RAMONTA

Rapporteur : Docteur Nivohanintsoa RAMANAMPAMONJY née RAVONIARISON

Examinateur : Docteur Rodolphe RASOLOARIVONY

MCours.com

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS. I
GLOSSAIRES. III
LISTE DES ABREVIATIONS II
INTRODUCTION 1

Première partie: GENERALITES

I. CULTURE *IN VITRO* 3
I.1. DEFINITION 3
I.2. DIFFERENTES TECHNIQUES 3
II. EMBRYOGENESE SOMATIQUE. 3
II.1. DEFINITIONS 3
II.2. ORIGINE ET DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE 4
II.3.TYPE DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE 4
II.4. ETAPES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE 4
II.5. DIFFERENTS FACTEURS INFLUENÇANT LA CULTURE DE L'EMBRYON SOMATIQUE 5
II.5.1.Facteurs internes 5
II.5.2.Facteurs externes 6
III. ORGANOGENESE 9
III.1.CAULOGENESE 9
III.2. RHIZOGENESE 10

Deuxième partie: MATERIEL ET METHODES

I. SITE DE PRELEVEMENT DES EXPLANTS 11
I.1.SITUATION GEOGRAPHIQUE 11
I.2. CLIMAT 11
II. MATERIELVEGETAL 12
II.1. PLANTE MERE 12
II.1.1. Classification botanique 12
II.1.2. Description morphologique 13

II.2. EXPLANTS 12
III. METHODES 13
III.1. RECOLTE ET CONSERVATION DES FRUITS 13
III.2. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE 14
III.2.1. Préparation des solutions mères 14
III.2.2. Ajustage du pH 14
III.2.3. Homogénéisation et coulage 14
III.2.4. Stérilisation du milieu de culture 15
III.3. GERMINATION DES GRAINES 15
III.3.1 Milieu de germination 15
III.3.2. Stérilisation des graines 15
III.3.3. Ensemencement des graines *in vitro* 16
III.3.4. Paramètres étudiés 16
III.4. INDUCTION DES CALS 16
III.4.1. Milieu d'induction 17
III.4.2. Mise en culture 17
III.4.3. Paramètres étudiés 18
III.5. PROLIFERATION DE CALS EMBRYOGENES 18
III.5.1. Paramètre évalué 19
III.6. MATURATION ET REGENERATION DE CALS EMBRYOGENES 19
III.6.1. Milieu de culture 20
III.6.2. Mise en culture 20
III.6.3. Paramètres étudiés 20
III.7. ETUDE HISTOLOGIQUE DES CALS ET DES EMBRYONS SOMATIQUES 21
III.7.1. Préparation de la coupe 20
III.7.2. Paramètres étudiés 22
III.8. CROISSANCE ET ENRACINEMENT DES PLANTULES OBTENUES 22
III.8.1. Milieu de culture 20
III.8.2. Mise en culture 23
III.8.3. Paramètres étudiés 23
III.9. ACCLIMATATION 20
III.9.1. Méthode d'acclimatation 20
III.9.2. Paramètre étudié 20
IV. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS 24

Troisième partie: RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. GERMINATION DES GRAINES 25
I.1. EFFETS DE LA DUREE DE TREMPAGE DE GRAINES DANS LA SOLUTION D'HYPOCHLORITE DE CALCIUM ($CaOCl_2$) 25
I.1.1. Taux de contamination 25
I.1.2. Taux de germination 26
II. INDUCTION DES CALS 20
II.1. EFFETS DES REGULATEURS DE CROISSANCE (2,4-D/ BAP) SUR LA CALLOGENESE A PARTIR DE LA FEUILLE ET DE L'HYPOCOTYLE 27
II.2. MORPHOLOGIE DES CALS 29
II.3. PROLIFERATION DES CALS EMBRYOGENES ISSUS DE LA FEUILLE ET DE L'HYPOCOTYLE 32
III. REGENERATION ET MATURATION DE CALS EMBRYOGENES 34
III.1. INFLUENCE DE LA COMBINAISON D' ANA / BAP SUR LA REGENERATION DES EMBRYONS SOMATIQUES ISSUS DE FEUILLES ET D'HYPOCOTYLES 34
III.2. EVOLUTION DES EMBRYONS SOMATIQUES DU STADE GLOBULAIRE AU STADE COTYLEDONAIRE 35
III.3. COUPES HISTOLOGIQUES AU NIVEAU DES CALS ET DES EMBRYONS SOMATIQUES 36
IV. CROISSANCE ET ENRACINEMENT DE PLANTULES DE *Keraudrenia macrantha* 38
IV.1. CROISSANCE DES PLANTULES 38
IV.2. ENRACINEMENT DES PLANTULES 39
V. ACCLIMATATION 40

Quatrième partie: DISCUSSIONS

DISCUSSIONS 42

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 44
BIBLIOGRAPHIE 46
WEBOGRAPHIES 55

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Carte du site minier d'Ambatovy **.....** i

Annexe II : Variation mensuelle de la précipitation et de la température en 2010 du site minier d'Ambatovy…….....ii

Annexe III : Coordonnées géographiques de *Keraudrenia macrantha* ii

Annexe IV : Composition de milieu de base de murashige et skoog (1962) et des vitamines…… iii

Annexe V : Preparation des colorants (carmino vert de Mirande) iv

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Diagramme ombrothermique du site minier d'Ambatovy 17

Figure 2 : Effet de la durée de trempage de graines de *Keraudrenia macrantha* dans la solution d'hypochlorite de calcium ($CaOCl_2$) 5% sur le taux de contamination 5 jours après le semis 25

Figure 3 : Effet de la durée de trempage de graines de *Keraudrenia macrantha* dans la solution d'hypochlorite de calcium ($CaOCl_2$) sur le taux de germination après 15 jours de semis 27

Figure 4 : Effets des regulateurs de croissance (2,4-D/ BAP) sur la formation des cals à partir de la feuille et de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* après 30 jours .. 29

Figure 5 : Taux de croissance relative des cals issus de la feuille de *Keraudrenia macrantha* après 60 jours sur les milieux de prolifération 32

Figure 6 : Taux de croissance relative des cals issus de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* après 60 jours sur les milieux de prolifération..... 33

Figure 7: Influence des regulateurs de croissance (ANA / BAP) sur la régénération des embryons somatiques issus de la feuille et de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha*..... 35

Figure 8 : Influence du charbon actif sur la croissance *in vitro* des plantules de *Keraudrenia macrantha* après 30 jours de culture 39

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Plant de *Keraudrenia macrantha* 12
Photo 2 : Graines de *Keraudrenia macrantha*..... 13
Photo 3 : Fruits mûrs de *Keraudrenia macrantha* 13
Photo 4 : Solutions mères préparées..... 15
Photo 5 : Ajustage du pH à l'aide du pH mètre..... 15
Photo 6 : Stérilisation des milieux de culture par autoclavage..... 15
Photo 7 : Prélèvement des poids frais initial et final de cals embryogènes..... 19
Photo 8 : Coupe des cals et des embryons à l'aide de microtome Reichert Jung..... 21
Photo 9 : Cals après traitement à l'eau de Javel 21
Photo 10 : Cals après coloration au carmino vert..... 22
Photo 11 : Observation des cals et des embryons à l'aide de microkamlab de Bresser 22
Photo 12 : Graines de *Keraudrenia macrantha* gérmées *in vitro*, 15 jours après le semis 26
Photo 13 : Cals issus de la feuille de *Keraudrenia macrantha* après 20 jours de culture sur le milieu d'induction M4..... 28
Photo 14 : Cals issus de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* après 20 jours de culture sur le milieu d'induction M2 28
Photo 15 : Cals friables blancs embryogènes issus de l'hypocotyle sur le milieu d'induction M2 30
Photo 16 : Cals friables blancs embryogènes issus de la feuille sur le milieu d'induction M3 30
Photo 17 : Cals compacts verts non embryogènes issus de la feuille sur le milieu d'induction M1 31
Photo 18 : Cals compacts verts avec des tâches rougeâtres non embryogènes issus de l'hypocotyle sur le milieu d'induction M4..... 31
Photo 19 : Cals friables jaunâtres non embryogènes issus de la feuille, sur le milieu d'induction M5 31
Photo 20 : Cals compacts verts non embryogenes issus de l'hypocotyle sur le milieu d'induction M6 31
Photo 21 : Cals friables de *Keraudrenia macrantha* 36
Photo 22 : Cals au stade globulaire de *Keraudrenia macrantha* 36
Photo 23 : Embryons bipolaires de *Keraudrenia macrantha* 36
Photo 24 : Plantule de *Keraudrenia macrantha*..... 36

Photo 25 : Structure anatomique de cals non embryogènes colorés au carmino vert 37
Photo 26 : Structure anatomique de cals non embryogènes colorés au lugol 37
Photo 27 : Structure anatomique de cals embryogènes colorés au carmino vert 37
Photo 28 : Structure anatomique de cals embryogènes colorés au lugol 37
Photo 29 : Coupe longitudinale d'un embryon bipolaire coloré au carmino vert 38
Photo 30 : *Vitroplant* de *Keraudrenia macrantha* âgé de 30 jours 39
Photo 31 : Plantules de *Keraudrenia macrantha* acclimatées après 37 jours d'acclimatation……..41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples d'explants régénérés par embryogènèse somatique 5
Tableau 2 : Différents types de milieu d'induction des cals issus de la feuille et de l'hypocotyle de *Keraudenia macrantha*..... 17
Tableau 3 : Différents types de milieu de régénration des embryons somatiques de *Keraudrenia macrantha* 20
Tableau 4 : Nombre et longueur moyens des racines de Keraudrenia macrantha après 30 jours de culture…….40
Tableau 5 : Taux de survie des plantules acclimatées de *Keraudrenia macrantha*…….41

REMERCIEMENTS

J'ai l'occasion d'adresser mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire, particulièrement à :

Madame Isabelle RATSIMIALA RAMONTA, Professeur à la Faculté des Sciences, Responsable de la formation du Troisième Cycle en Physiologie Végétale au Département de Biologie et Ecologie Végétales, qui malgré ses multiples obligations professionnelles, a bien voulu présider le Jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude.

Madame Nivohanintsoa RAMANAMPAMONJY née RAVONIARISON, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, Enseignant-Chercheur au Département de Biologie et Écologie Végétales, mon rapporteur qui a eu l'amabilité de diriger mes travaux. Vos conseils précieux et votre encouragement m'ont permis de terminer ce travail. Trouvez ici Madame ma profonde reconnaissance.

Monsieur Rodolphe RASOLOARIVONY, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, Enseignant-Chercheur au Département de Biologie et Écologie Végétales, qui m'a fait l'insigne service d'examiner ce travail malgré ses multiples responsabilités. Veuillez trouver ici le témoignage de ma haute considération.

Monsieur Vonjison RAKOTOARIMANANA, Professeur à la Faculté des Sciences, Statisticien, Enseignant-Chercheur au Département de Biologie et Écologie Végétales, pour l'aide qu'il m'a offerte dans l'analyse statistique des données. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde considération.

Je tiens à remercier le projet Ambatovy (AMSA) pour l'aide financière et matérielle nécessaire à la réalisation de mes travaux. J'adresse toute ma reconnaissance aux responsables de ce projet : Monsieur Paul ANDRIANAIVOMAHEFA, Surintendant Environnement-Mine ; Monsieur Angelo RAZAFIMAMONJY, Superviseur de la restauration Ecologique au Département Environnement-Mine, et son équipe. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

J’exprime aussi ma gratitude et mes remerciements à tous les personnels au sein du Laboratoire de Physiologie Végétale, unité de Régénération des plantes pour leur amitié chaleureuse, et pour leur critique constructive. Plus spécialement au Docteur Raharitiana RAHELIVOLOLONA, Chercheur, pour son aide technique et ses conseils.

Sans oublier à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire : les techniciens de laboratoires du Département de Biologie et Ecologie Végétales.

J’adresse aussi mes remerciements les plus sincères à ma famille, à mes parents, à mes sœurs et mes frères, qui m’ont soutenu et m’ont encouragé pour la réalisation de ce mémoire.

Légende des photos sur la page de couverture

Cals embryogènes de *Keraudrenia macrantha* (à gauche) ; coupe longitudinale d’un embryon somatique au stade bipolaire (au centre) et plantule au stade cotylédonaire (à droite)

GLOSSAIRES

Acclimatation : adaptation progressive des *vitroplants* aux conditions naturelles.

Cals : amas de cellules indifférenciées résultant de la totipotence des tissus végétaux.

Callogenèse : formation des cals à partir d'explants cultivés.

Caulogenèse : formation des tiges.

Cellule : unité fondamentale d'un organisme vivant capable de se reproduire toute seule

Embryogenèse somatique : formation des embryons à partir d'une cellule ou d'un groupe de cellules somatiques sans fusion des gamètes

Explant : fragment d'organes (apex, tige, feuille, bourgeons, …) ou fragment de tissu, excisé et mis en culture *in vitro*.

Organogenèse : formation des organes.

Phytohormone : régulateur de croissance synthétisé par la plante ou synthétique et qui régit sa croissance et son développement.

Photopériode : alternance de période d'illumination et de période sombre dans le cycle journalier d'une plante.

Régénération : ensemble de tous les processus par lesquels les plantes se reproduisent naturellement (par graine ou par multiplication végétative) «*in situ* » ou hors de son milieu naturel «*ex situ »* par des différentes méthodes (greffage, marcottage, micropropagation, etc.).

Rhizogenèse : formation de racines.

***Vitroplant* :** plantule issue de la culture *in vitro.*

LISTE DES ABREVIATIONS

’ **:** Minute

’’ **:** Seconde

°C **:** Degré Celsius

cm^2 **:** Centimètre carré

ANA **:** Acide Naphtalène Acétique

2,4-D **:** Acide 2-4 dichloro-phénoxy-acétique

BAP **:** 6-Benzylaminopurine

$CaOCl_2$ **:** Hypochlorite de calcium

CO_2 **:** Dioxyde de carbone

g **:** Gramme

h **:** Heure

ha **:** Hectare

HCl **:** Acide Chlorhydrique

km **:** Kilomètre

l **:** Litre

m **:** Mètre

mg **:** Milligramme

mm **:** Millimètre

mn **:** Minute

MS/2 **:** Milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié (1962)

ONE **:** Office National pour l'Environnement

NaOH **:** Soude (hydroxyde de sodium)

INTRODUCTION

Madagascar est un pays riche en biodiversité. Plus de 12 000 espèces de plantes vasculaires supérieures malgaches sont reconnues avec un endémisme compris entre 82 et 90 % (Schatz, 2001 ; Gautier et Goodman, 2003 ; GSPM, 2011a). Selon l'Office National de l'Environnement (1991), 3 317 taxons de macrofaune terrestre correspondant à 90%, sont associés à la forêt. Les 5% des espèces animales et végétales de la planète sont présents à Madagascar (Ravoahangy, 2011).

Malheureusement, ces biodiversités sont soumises à des menaces et à des pressions intenses dues aux activités humaines et aux catastrophes naturelles (cyclones, érosion), ce qui provoque la perte de leur habitat.

Actuellement, le projet d'exploitation de nickel et de cobalt d'Ambatovy touche la forêt dense humide de moyenne altitude de l'Est de Madagascar.

En effet, l'exploitation exige le défrichement total du sol, ce qui entraîne la modification radicale du paysage et le déséquilibre de l'écosystème (Misaintsoa, 2009). Face à ces destructions, le projet a élaboré un programme de gestion de la biodiversité comprenant une zone de compensation et de protection aboutissant à l'absence de perte nette de la biodiversité (Dickinson et Berner, 2010). Concernant la flore, les espèces dites SOCs (*Species Of Concern*) sont identifiées par le MBG (Missouri Botanical Garden). Ce sont des espèces endémiques qui sont rencontrées sur le territoire de la mine sans être présentes dans plus de trois autres sites sur l'ensemble du pays (Phillipson et *al*., 2010). *Keraudrenia macrantha* (Sterculiaceae) (Arènes, 1959), est classée parmi les SOCs. C'est un arbuste, monospécifique et endémique de Madagascar. *Keraudrenia macrantha* est une plante utilisée par la médicine traditionnelle pour soulager les maux de dents (Descheemaeker, 1986). C'est aussi une plante ornementale.

Dans le cadre de la multiplication des espèces SOCs, les méthodes de la culture *in vitro* ou la micropropagation sont adoptées. Elles permettent de produire rapidement une grande quantité de plantules (http://1, Razafimaharo, 2003).

Les techniques de la culture *in vitro* empruntent essentiellement deux voies : le microbouturage (Saadi, 1991) et l'embryogenèse somatique (Margara, 1989). Plusieurs travaux ont déjà été effectués sur la culture *in vitro* de ces espèces «SOCs», entre autres la micropropagation des orchidées «*Aeranthes antennophora*» et «*Bulbophyllum peyrotii*» (Dinaharilala, 2012), la vitropropagation de «*Medinilla mandrakensis*» (Ephrem, 2012), la régénération *in vitro* de «*Dracaena sp. nov. 3»* et de «*Psorospermum sp. nov. B»* (Rakotoarisoa, 2013).

Par ailleurs, la présente étude se focalise sur la technique de l'embryogenèse somatique qui est la formation d'embryons à partir de cellules non issues de la fusion des gamètes (Ammirato, 1983). L'embryogenèse somatique se montre plus séduisante en terme de performance et d'efficacité (Harkman et Arnold, 1985 ; Piatti, 1988). Les taux de multiplication sont généralement importants (Kacem, 2005). L'embryogenèse somatique permet aussi en un temps très court de produire des plantes entières sans passer par les contraintes habituelles de l'organogenèse (phase de caulogenèse et de rhizogenèse) (Daikh et Demarly, 1987 ; Rouget, 1989).

Actuellement, d'après des recherches, aucune étude n'a encore été effectuée sur l'embryogenèse somatique des plantes du genre *Keraudrenia*. C'est pour ces raisons que la présente étude est axée sur « la régénération par embryogenèse somatique de *Keraudrenia macrantha* (Sterculiaceae).

L'hypothèse de cette étude est d'observer la similarité des réactivités des deux types d'explants (feuille et hypocotyle) de *Keraudrenia macrantha* régénérés à partir de la technique de l'embryogenèse somatique vis-à-vis des milieux de culture.

L'objectif global de cette étude consiste à la multiplication de l'espèce endémique *Keraudrenia macrantha* pour sa conservation.

Les objectifs spécifiques sont de :

- déterminer les milieux de culture favorables à l'induction des cals embryogènes, à la régénération des embryons somatiques, à la croissance et à l'enracinement de plantules de *Keraudrenia macrantha* issues de la feuille et de l'hypocotyle ;
- identifier les caractéristiques morphologiques et anatomiques des cals ;
- évaluer l'évolution de l'embryon somatique ;
- optimiser l'acclimatation des *vitroplants*.

Ce travail se divise en quatre parties. La première partie présente les généralités. La seconde décrit le matériel et la méthode. La troisième partie énonce les résultats obtenus et leurs interprétations. La dernière partie comporte les discussions suivies de la conclusion et des perspectives.

Première partie : GENERALITES

I. CULTURE *IN VITRO*

I.1. DEFINITION

La culture *in vitro* est une technique utilisée au laboratoire et qui consiste à cultiver un fragment de plante «explant» sur un milieu artificiel, dans un espace réduit et dans des conditions stériles. Les conditions, comme la température, l'humidité relative ainsi que l'éclairement (photopériode) sont contrôlées au cours du développement de l'explant (Beauchesne et *al.*, 1984; Rasoarantomanana, 2009; El Tahchy, 2010).

La culture *in vitro* est basée sur la totipotence cellulaire c'est-à-dire toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue (Boutherin et Brong, 1989 ; El Tahchy, 2010).

I.2. DIFFERENTES TECHNIQUES

Différentes techniques de culture *in vitro* d'explants végétaux ont été mises au point afin de régénérer une plante entière, parmi lesquelles la culture de méristèmes, l'embryogenèse somatique, le microbouturage, la culture d'anthères et de pollen, et la culture de protoplastes.

II. EMBRYOGENESE SOMATIQUE

II.1. DEFINITIONS

L'embryon est défini comme une plante se trouvant au stade initial de son développement. Il s'agit en fait, d'une structure bipolaire (munie de deux méristèmes : l'un caulinaire et l'autre racinaire) qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante (Norrel, 1973 ; Nuti, 1990).

L'embryogenèse somatique est un processus biologique qui permet d'obtenir un nombre illimité d'embryons à partir d'une cellule ou d'un groupe de cellules somatiques sans fusion de gamètes (Ammirato, 1983; Nzefouo, 2010 ; 2011). Les embryons somatiques ont une structure chromosomique souvent semblable à celle de la plante mère dont ils sont issus.

II.2. ORIGINE ET DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

L'embryogenèse somatique trouve son origine dans une seule cellule jouant un rôle analogue à celui du zygote (Féher, 2006). Elle se forme au sein de masses parenchymateuses (Reinert, 1958). La morphologie et le développement s'effectuent selon une séquence de stades homologues à ceux des embryons zygotiques définis par le stade globulaire, le stade cordiforme ou cœur, le stade torpille, et le stade cotylédonaire (http://2; Rijiven, 1952; Ragavan et Torrey, 1963; Egertsdotter et Arnold, 1998).

II.3. TYPES D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

Sharp et *al*., (1980) in Piatti (1988) ont décrit deux voies pour l'embryogenèse somatique:

- L'embryogenèse somatique indirecte dans laquelle les embryons se développent à l'issue de la prolifération de cals embryogènes ou amas cellulaires indifférenciés. Les cellules embryogènes apparaissent tardivement au sein du cal produit par la réactivation mitotique des cellules différenciées et/ou par la prolifération des cambiums obtenus à partir d'explants de type racines, tige ou de feuille (Jullien, 1991 ; Rugkhla et Jones, 1998).
- L'embryogenèse somatique directe où les embryons sont initiés à partir de tissus en l'absence de prolifération du cal. Les cellules de l'explant deviennent compétentes sans divisions cellulaires ou mitoses successives (Piatti, 1988 ; Rouget, 1989).

II.4. ETAPES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

L'embryogenèse somatique présente deux étapes : la formation du cal embryogène, la régénération des embryons (Tisserat et *al*., 1979; Daikh et Demarly, 1987; Daguin et Letouze, 1988).

-La formation du cal embryogène se fait grâce à la présence d'un agent inducteur ou d'un choc initiateur de l'embryogenèse somatique. Les régulateurs de croissance comme l'auxine présente dans le milieu de culture jouent le rôle prépondérant d'agent inducteur stimulant la totipotence de la cellule somatique (Zryd 1988).

-La régénération des cals embryogènes consiste à transférer les cals embryogènes sur un milieu de régénération solide (Mater, 1986 ; Reveuni, 1979; Zaid et Tisserat, 1983; 1984;

Sharma et *al.*, 1984; 1986; Zaid, 1989) ou liquide (Daguin et Letouze, 1988). Les embryons obtenus ayant une taille convenable c'est-à-dire au stade bipolaire ont été replacés dans un milieu de germination. Il s'en suit des repiquages successifs permettant l'obtention des microplants (Daguin et Letouze, 1988).

II.5. DIFFERENTS FACTEURS INFLUENÇANT LA CULTURE DE L'EMBRYON SOMATIQUE

La production d'embryons somatiques *in vitro* dépend d'un certain nombre de facteurs comprenant les facteurs internes et les facteurs externes.

II.5.1. Facteurs internes

- 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, George et Sherrington, (1984); Brown, (1988); Brown et *al*., (1995) ainsi que Dodeman et *al*.,(1997) ont mentionné que seulement certains génotypes auraient possédé la capacité d'induire une embryogenèse somatique chez beaucoup d'espèces.

- Type d'explant

Plusieurs recherches effectuées sur l'embryogenèse somatique ont montré qu'elle peut être induite à partir d'explants d'origines variées (tableau 2).

Tableau 1 : Exemples d'explants régénérés par embryogenèse somatique

Explants	Espèces	Référence
Bourgeons axillaires	*Ipomoea batatas* L. (Lam)	Triqui, 2009
Entre - nœuds	*Actinidia chinensis*	Chaouia et *al*., 2008
Hypocotyle	*Gossypium hirsutum*	Kouadio et *al*., 2004; Kouakou et *al.*, 2009
Feuille	*Quercus suber* L.	Fernandez-Guijarro et *al*., 1993 et 1995

	Coffea arabica L.	Gatica, 2007
	Baillonella toxisperma	
	Vitellaria paradoxa	Fotso et *al*., 2008
Foliole	*Actinidia chinensis*	Chaouia et *al*., 2008

- Age des explants

Généralement, les explants les plus jeunes sont les plus réactifs, donc les potentialités de ces explants diminuent avec l'âge (Auge et *al.*, 1984).

- Saison de prélèvement des explants

Concernant les espèces vivaces, l'existence de stade de vie active et ralentie de la plante 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, gibbérelline ...) lors des différentes saisons (Auge et *al*., 1989).

- Taille de l'explant

Plus la taille est importante, plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures influentes. La taille choisie variera selon la nature de l'explant. Si le tissu végétal est de nature organisée (un nœud, un apex, ou un bourgeon entier), un ensemble assez complet sera nécessaire mais seulement dans le cas d'une structure différenciée (éléments de feuilles, de tige, de racines, d'inflorescence...) des fragments de 5 à 10mm suffiront (Zryd, 1988, Auge et *al*., 1989; Hannweg et *al*., 1996).

II.5.2. Facteurs externes

a. Milieu de culture

La culture d'embryons somatiques peut se réaliser aussi bien en milieu gélosé qu'en milieu liquide. L'observation des embryons est un peu difficile pour le milieu gélosé tandis que le milieu liquide permet une meilleure observation des embryons (Zryd, 1988).

Pour le développement des cultures de tissus (embryogenèse somatique), divers milieux de base comprenant des sels inorganiques, des composés organiques (sucres, vitamines et

régulateurs de croissances) ont été progressivement utilisés. Parmi ces milieux de base, le milieu Murashige et Skoog (MS) est le milieu d'induction des cals et de régénération des embryons somatiques le plus utilisé (Dalvescoet Guerra, 2001).

❖ Régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance ou les phytohormones ou hormones végétales sont des substances qui jouent une grande importance pour l'embryogenèse somatique. Chez les végétaux, les régulateurs de croissance se répartissent en six groupes : auxines, cytokinines gibbérellines, acides abscissiques, éthylènes et brassinostéroïdes (http:// 3 ; http://4 ; Margara, 1989). Ces régulateurs de croissance agissent principalement sur la division cellulaire (croissance de la plante) et leur différenciation (formation de divers organes). Deux types d'hormones telles que les auxines et les cytokinines sont les plus utilisées en culture de tissus végétaux (Margara, 1989; Ramiliarisoa, 2003).

➢ Auxines

L'acide indolacétique (AIA) est une auxine extraite des végétaux, tandis que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, l'acide indole-3-butyrique(AIB) et l'acide 1-naphtalène acétique (ANA) sont des substances synthétiques. La synthèse d'auxines a principalement lieu dans le méristème apical des pousses. Les auxines stimulent l'élongation de la tige, la différenciation et la croissance des racines. Un bourgeon apical produit de l'auxine qui inhibe la croissance des bourgeons latéraux, c'est la dominance apicale. Les auxines jouent aussi un rôle dans la capacité de la plante de s'orienter vers la lumière (phototropisme des feuilles) ainsi que de se diriger vers le sol (géotropisme des racines).

➢ Cytokinines

Les cytokinines comme la zéatine, le 6-benzylaminopurine (BAP), la kinétine, sont synthétisées dans les tissus en croissance active, plus particulièrement dans les racines, les embryons et les fruits. Elles sont transportées dans les autres organes par la sève brute.

En culture *in vitro*, les effets de cytokinines sont liés à ceux de l'auxine :

- si la quantité de cytokinine est égale à celle de l'auxine, les cellules se divisent mais restent indifférenciées, c'est la callogenèse ;
- si la quantité de cytokinine est supérieure à celle de l'auxine, le cal se différencie et des bourgeons apparaissent, c'est la caulogenèse ;

- si la quantité de cytokinine est inférieure à celle de l'auxine, des racines se forment, c'est la rhizogenèse (http// 5).

❖ Sucres

Les tissus en culture sont largement hétérotrophes du carbone en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc indispensable d'apporter le sucre comme source de carbone dans le milieu de culture. Le sucre occupe deux fonctions principales dans les milieux de culture ; il fournit l'énergie nécessaire pour la croissance des tissus et maintiennent une pression osmotique donnée du milieu de culture (Zryd, 1988). Cette pression osmotique agit, dans certains cas, sur l'orientation ou l'expression morphogénétique des tissus (Belaiziet Boxus, 1995), dans d'autres cas, sur la maturation des embryons somatiques produits (Walker et Parrott, 2001). Parmi les sucres, le saccharose est le plus utilisé en embryogenèse somatique. Il agit sur la formation des cals, sur le développement et sur la régénération des embryons somatiques en plantules (Chen, 1978 ; Brhadda et *al.*, 2008).

❖ Vitamines

Certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus, parmi les principales sont la thiamine, l'acide nicotinique et la pyridoxine (Téoulé, 1993).

❖ Charbon actif

Le charbon actif est une substance adsorbant qui assure la neutralisation et l'inhibition des produits toxiques (phénol) libérés par les explants dans le milieu de culture. Il est favorable à la formation des embryons chez le lierre (forme juvénile) (Zryd, 1988).

b. Conditions de culture *in vitro*

Les conditions environnementales des cultures (lumière, photopériode, température, etc.) peuvent influencer fortement la prolifération cellulaire au cours de la callogenèse ainsi que l'embryogenèse somatique chez diverses plantes (Murashige, 1974; Hughes, 1981 ; Tan et Qian, 1988).

❖ Lumière et photopériode

La lumière est indispensable pour réguler certains processus morphogénétiques (Boccon - Gibord, 1989). La durée d'exposition (photopériode) stimule la prolifération et la croissance des cals (Husseyet Stacey, 1981). Elle pourrait aussi contribuer à la formation des cals (Briggs, 1964 ; Bommeneni et Jauhar, 2003).

❖ Température

La température de la salle de culture est habituellement réglée de façon constante entre 22 et 25°C. Cependant, la température réelle des tissus à l'intérieur des récipients de culture peut être supérieure de 2 à 4°C à celle de la salle (Auge et *al*., 1983).

III. ORGANOGENESE

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative (Margara, 1989). En partant d'un explant, elle aboutit à la formation d'un nouvel individu par élaboration de bourgeons (caulogenèse) et de racines (rhizogenèse).

III.1. CAULOGENESE

La caulogenèse est la formation représentée à la fois de l'initiation et du 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 se forment en des endroits inhabituels à partir d'organes différenciés de la plante (entre - nœuds, tubercules, racines, feuilles). Ils peuvent avoir pour origine des massifs cellulaires restés méristèmatiques ou bien provenir d'une différenciation de certaines cellules (Camefort, 1977).
- Les bourgeons néoformés 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 n'importe quel type d'organe ou de tissu, y

compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (Camefort, 1977 ; Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

III.2. RHIZOGENESE

La rhizogenèse désigne la néoformation et la croissance de racine. En culture *in-vitro,* les racines néoformées au sein d'un cal peuvent être considérées comme des cas particuliers de méristèmes adventifs (rhizogenèse indirecte) ou l'émission de racines sur un explant dans des endroits inhabituels (rhizogenèse directe) (Margara, 1989 ; Boxus, 1995).

Deuxième partie :
MATERIEL ET METHODES

I. SITE DE PRELEVEMENT DES EXPLANTS

I.1.SITUATION GEOGRAPHIQUE

Le site d'exploitation minière d'Ambatovy est situé au cœur de l'une des régions particulièrement riches en espèces, dans l'extrémité Sud du corridor forestier de l'Est (http://6 ; http ://7). Il s'étend sur 1800ha et se trouve à 25km au Nord-Nord-Est de Moramanga. Ce site est localisé entre la longitude Est 48° 18' 00'' et la latitude Sud18° 49' 0,12'' (http:// 8) (carte1 en annexe I).

I.2. CLIMAT

La forêt d'Ambatovy présente un bioclimat oriental humide avec un taux d'humidité relative annuelle moyenne de 95% (http://9). La précipitation moyenne annuelle est de 1400mm dont près de 70% des pluies annuelles tombent entre décembre et mars (Dynatec Corporation, 2006). Concernant la température, le mois le plus chaud est le mois de février tandis que le plus froid est le mois de juillet (http:// 9) (figure 1). La température moyenne annuelle du site d'exploitation minière d'Ambatovy est de 17°C (Dynatec Corporation, 2006). Les variations mensuelles de la précipitation et de la température du site d'Ambatovy sont en annexe II.

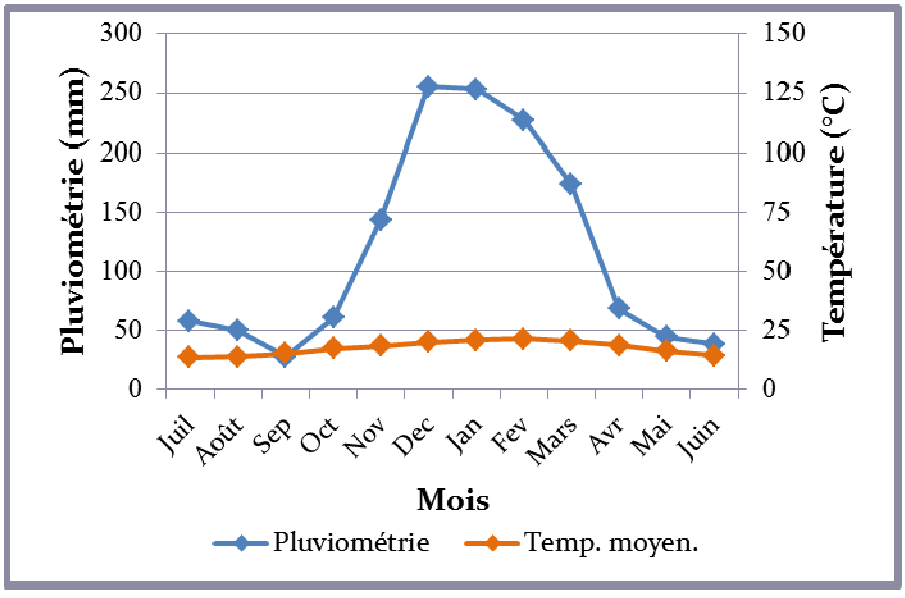


Figure 1 : Diagramme ombrothermique du site minier d'Ambatovy (http:// 9)

II. MATERIELVEGETAL

II.1. PLANTE MERE

La plante mère source d'explants utilisée est *Keraudrenia macrantha*, (photo1). Les codes du pied mère et leurs coordonnées géographiques ainsi que leurs répartitions dans le site d'exploitation minière d'Ambatovy ont été mentionnés en annexe III.

Photo 1 : Plant de *Keraudrenia macrantha* [barre=5mm]

II.1.1. Classification botanique (Arènes, 1959)

REGNE	**: VEGETAL**
EMBRANCHEMENT	**: SPERMAPHYTES**
CLASSE	**: DICOTYLEDONES**
SOUS- CLASSE	**: DILLENIIDAE**
ORDRE	**: MALVALES**
FAMILLE	**: STERCULIACEAE**
Genre	**: *Keraudrenia***
Espèce	**: *macrantha***
Nom vernaculaire	**: Siandahy**

II.1.2. Description morphologique

Keraudrenia macrantha est un arbuste hermaphrodite qui peut atteindre 5m de haut. Les feuilles sont simples, alternées et stipulées très longues atteignant 11,5cm de long et 22mm de large. Les rameaux sont cylindriques. L'inflorescence est en petites cymes composées de deux à trois fleurs. Le fruit est une capsule déhiscente (Arènes, 1959). La fructification se déroule au mois de novembre jusqu'au mois de mars.

II.2. EXPLANTS

- Graines noires (photo2) issues des fruits mûrs de couleur vert jaunâtre (photo 3), de 2 cm de diamètre ;
- Hypocotyles issues des graines germées *in vitro* ;
- Feuilles apparues après les feuilles cotylédonaires de plantules.

Photo 2 : Graines de *Keraudrenia macrantha*

Photo 3 : Fruits mûrs de *Keraudrenia macrantha* [barre=5mm]

III. METHODES

III.1. RECOLTE ET CONSERVATION DES FRUITS

Les fruits mûrs de *Keraudrenia macrantha* ont été récoltés au mois de décembre 2012 dans les zones de défrichement du site d'exploitation minière d'Ambatovy.

MCours.com

Ils ont été coupés avec leur pédoncule. Ensuite, ils sont mis dans un sac plastique sur lequel sont mentionnés la date et la zone de récolte ainsi que le code du pied mère. L'ensemble a été conservé dans une glacière à la température de +5°C jusqu'à la mise en culture.

III.2. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE

Durant toutes les expérimentations, le milieu de base de Murashige et Skoog (1962), dilué de moitié (MS/2), additionné de vitamines, de 30g.l^{-1}de saccharose, et solidifié par 8g.l^{-1}d'agar a été utilisé. Les compositions de ce milieu de base et des vitamines sont enregistrées en annexe IV. La préparation suit les quatre étapes suivantes :

III.2.1. Préparation des solutions mères

Pour faciliter la préparation du milieu de culture, des solutions mères ont été préparées préalablement (photo 4). Les macroéléments, les microéléments, les vitamines et les régulateurs de croissance ont été respectivement concentrés 50, 100, 100 et 100 fois. Puis, ils sont conservés au réfrigérateur à +4°C. Seule, la vitamine myo-inositol a été utilisée au moment de la préparation du milieu de culture.

III.2.2. Ajustage du pH

Le pH du milieu de culture a été ajusté de 5,5 à 5,6 avec une solution normale de NaOH ou HCl, à l'aide d'un pH-mètre (photo 5).

III.2.3. Homogénéisation et coulage

Après l'ajustage du pH, 8g.l^{-1} d'agar ont été additionnés dans le milieu de culture. Le mélange a été porté à l'ébullition jusqu'à ce qu'il présente une solution homogène. Le milieu est réparti dans des bocaux de culture à raison de 12ml/bocal. Puis, les bocaux sont fermés à l'aide de papier aluminium et scellés avec du parafilm. Le coulage a été effectué sous hotte à flux laminaire.

III.2.4. Stérilisation du milieu de culture

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20mn, sous une pression de 1bar (photo 6).

Photo 4 : Solutions mères préparées

Photo 5 : Ajustage du pH à l'aide du pH mètre

Photo 6 : Stérilisation des milieux de culture par autoclavage

III.3. GERMINATION DES GRAINES

III.3.1 Milieu de germination

Le milieu de culture utilisé pour la germination des graines *in vitro* est constitué du milieu de base de Murashige et Skoog dilué de moitié (MS/2), dépourvu des régulateurs de croissance.

III.3.2.Stérilisation des graines

Les graines ont été initialement lavées à l'eau courante et savonneuse. Puis, elles ont été désinfectées par trempage successif dans la solution de mancozèbe (fongicide) 2% additionnée de 2 gouttes de tween 20 pendant 60mn et dans de l'alcool éthylique 70° pendant 1mn. Ensuite, les graines ont été trempées dans la solution d'hypochlorite de calcium ($CaOCl_2$) de concentration 5%. Les durées de trempage 10mn et 15mn sont les mêmes que celles utilisées par Ramamonjiarisoa, (2004) sur *Cinnamomum camphora* (L). Finalement, les

graines ont été rincées 5 fois à l'eau distillée stérile et trempées dans de l'eau distillée stérile pendant 24h.

III.3.3. Ensemencement des graines *in vitro*

Les graines ont été ensemencées dans le milieu de base MS/2 dépourvu de régulateurs de croissance. Pour chaque temps de trempage (10mn et 15mn), dix répétitions ont été faites à raison de 10 graines par bocal. Au total, 200 graines ont été ensemencées. Les suivis ont été réalisés 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention de plantules à feuilles bien formées.

III.3.4. Paramètres étudiés

Deux paramètres ont été évalués pour cette étude :

- taux de contamination correspondant au pourcentage de graines contaminées selon la formule :

$$Tc\ (\%) = \frac{\text{Nombre de graines contaminées}}{\text{Nombre total de graines ensemencées}} X100$$

Tc= taux de contamination

- taux de germination correspondant au pourcentage de graines ayant germé, selon la formule :

$$Tg\ (\%) = \frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Nombre total de graines ensemencées}} X100$$

Tg : taux de germination

III.4. INDUCTION DES CALS

L'objectif de cette expérimentation est d'obtenir le maximum des cals à partir de la feuille et de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha*.

III.4.1. Milieu d'induction

Le milieu d'induction de cals utilisé pour les deux types d'explants a été similaire au protocole utilisé par Fotso et *al*. (2008) sur l'embryogenèse somatique chez *Baillonella toxisperma* et *Vitellaria paradoxa*. L'auxine comme l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et la cytokinine telle que le 6-Benzylaminopurine (BAP) ont été utilisées. Sept types de milieu d'induction ont été étudiés (tableau 2).

Tableau 2 : Différents types de milieu d'induction de cals de la feuille et de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha*

Type de milieu		M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Concentration de régulateurs de croissance ($mg.l^{-1}$)	2,4-D	0	0,5	1	2	3	4	5
	BAP	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ;
BAP : 6-benzylaminopurine ;
M : milieu d'induction

III.4.2. Mise en culture

Deux explants ont été utilisés, la feuille et l'hypocotyle prélevés à partir des plantules de *Keraudrenia macrantha*, germées *in vitro*.

a. Induction des cals à partir de la feuille

Les deuxièmes feuilles néoformées (feuilles formées après les feuilles cotylédonaires) sont prélevées entièrement. Deux feuilles par bocal ont été mises en culture de façon à ce que la face inférieure soit en contact avec le milieu d'induction. Cinq répétitions ont été réalisées avec un total de 70 explants y compris ceux cultivés dans le milieu témoin.

a. Induction des cals à partir de l'hypocotyle

L'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* a été sectionnée en fragment de 1cm de long. Quatre fragments d'hypocotyle ont été placés sur chaque type de milieu d'induction. Le traitement a été répété 5 fois. Au total, 140 explants ont été cultivés.

III.4.3. Paramètres étudiés

Pour les deux types d'explants, deux paramètres ont été évalués :

- paramètre quantitatif : taux de callogenèse correspondant au nombre d'explants produisant des cals sur le nombre total d'explants cultivés ;
- paramètre qualitatif : la couleur et la texture des cals obtenus permettant de distinguer le type de cals (embryogènes ou non embryogènes).

III.5. PROLIFERATION DE CALS EMBRYOGENES

Cette phase consiste en la prolifération des cals embryogènes seulement alors que les cals non embryogènes n'ont pas été considérés à la suite de l'expérimentation.
Les cals embryogènes sont reconnus par leurs couleurs, leurs aspects et leurs caractères histologiques. Ils ont été transférés sur le même milieu d'induction frais après avoir prélevé leur poids frais. Le poids frais initial et le poids frais final des cals ont été mesurés en conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Le poids frais initial prélevé pour les cals issus de la feuille et de l'hypocotyle a été de 0,5g (photo 7). Des suivis par semaine ont été effectués.

Photo 7 : Prélèvement des poids frais initial et final de cals embryogènes

III.5.1.Paramètre évalué

Les taux de croissance relative des cals embryogènes qui représentent leur prolifération ont été calculés sur la base de leur poids frais dans chaque milieu d'induction selon la formule de Bhaskaram *et al.*, (1983).

$$\text{TCR}\ (\%) = \frac{\text{PF final} - \text{PF initial}}{\text{PF initial}} \text{X}\ 100$$

PF : Poids frais

TCR : Croissance relative

III.6. MATURATION ET REGENERATION DE CALS EMBRYOGENES

L'évolution des cals embryogènes, la régénération des cals après les divers stades d'évolutions (à partir de stade globulaire jusqu'au stade cotylédonaire) ont été étudiées.

III.6.1. Milieu de culture

Le milieu de régénération de cals embryogènes est constitué par MS/2 additionné de deux types de régulateur de croissance. Ces régulateurs de croissance sont composés d'une auxine qui est l'Acide Naphtalène Acétique (ANA) et d'une cytokinine constituée de 6-Benzylaminopurine (BAP). Quatre types de milieu de régénération R0, R1, R2, R3, R4, qui diffèrent par leurs concentrations, ont été testés (tableau 3).

Tableau 3 : Différents types de milieu de régénération des embryons somatiques de *Keraudrenia macrantha*

Type de Milieu		R0	R1	R2	R3	R4
Régulateurs de croissance ($mg.l^{-1}$)	ANA	0	0	0	0,1	0,1
	BAP	0	0,5	2	1	2

ANA : Acide Naphtalène Acétique

BAP : 6-Benzylaminopurine

R : milieu de régénération

III.6.2. Mise en culture

Quel que soit le type d'explant utilisé (la feuille ou l'hypocotyle), les cals embryogènes friables, âgés de 60 jours ont été fragmentées en morceaux de $1cm^2$. Puis, ils ont été transférés dans le milieu de régénération. Trois fragments de cals ont été cultivés sur chaque type de milieu de culture avec 5 répétitions.

III.6.3. Paramètres étudiés

Deux paramètres ont été pris en considération :

- Nombre de plantules régénérées à partir des embryons somatiques issus des explants foliaires et hypocotylaires ;
- Evolution des embryons somatiques, du stade globulaire au stade cotylédonaire.

III.7. ETUDE HISTOLOGIQUE DES CALS ET DES EMBRYONS SOMATIQUES

Afin de mieux différencier les cals embryogènes et l'embryon somatique, cette étude consiste à déterminer leurs caractéristiques par le biais des coupes histologiques.

III.7.1. Préparation de la coupe

Les cals compacts et les embryons somatiques ont été tranchés en coupe fine de 10µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome Reichert Jung (photo 8) tandis que les cals friables sont brisés à l'aide d'une pince fine. Les tranches fines ont été blanchies dans l'eau de Javel 100% pendant 3mn pour les embryons et 1mn seulement pour les cals (photo 9). Ensuite, les coupes sont rincées trois fois successives à l'eau distillée. La fixation de colorant a été faite par trempage des échantillons dans l'acide acétique pendant 2mn. Puis, une partie des échantillons est colorée au carmino vert (photo 10) et d'autres parties sont réservées au lugol (eau iodée). La préparation de carmino vert se trouve en annexe V. Enfin, elles sont montées entre lame et lamelle en présence d'une goutte d'eau glycérinée. Les observations ont été effectuées à l'aide de microkamlab de Bresser (photo 11).

Photo 8 : Coupe des cals et des embryons à l'aide de microtome Reichert Jung

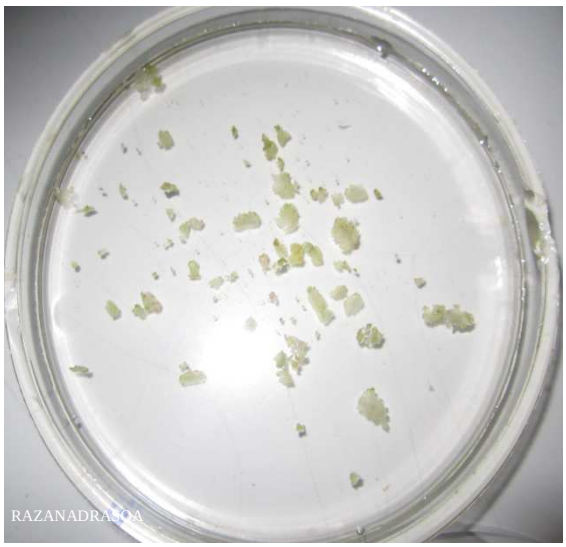


Photo 9 : Cals après traitement à l'eau de Javel

Photo 10 : Cals après coloration au carmino vert

Photo 11 : Observation des cals et des embryons à l'aide de microkamlab de Bresser

III.7.2. Paramètres étudiés

Pour l'étude histologique des cals et des embryons somatiques, la forme, la taille et la couleur de cellules, les vacuoles et le cytoplasme ont été observés**.**

III.8. CROISSANCE ET ENRACINEMENT DES PLANTULES OBTENUES

En vue d'obtenir une meilleure croissance et un enracinement optimal, les plantules régénérées à partir de l'embryogenèse somatique de la feuille et de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* ont été transférées sur le milieu de croissance et d'enracinement.

III.8.1. Milieu de culture

La croissance et l'enracinement du *Keraudrenia macrantha* ont été étudiés simultanément. Le milieu de base MS/2 additionné de $2g.l^{-1}$ de charbon actif et dépourvu des régulateurs de croissance a été choisi d'après l'étude préliminaire sur la croissance et l'enracinement *in vitro* des plantules de *Keraudrenia macrantha.*

III.8.2. Mise en culture

Les plantules possédant des feuilles cotylédonaires issues de la germination d'embryon bipolaire ont été cultivées dans le milieu de croissance et d'enracinement. Quinze bocaux ont été utilisés en raison de deux explants par bocal soit un total de 30 explants y compris ceux cultivés dans le milieu témoin.

III.8.3. Paramètres étudiés

Trois paramètres ont été considérés, la taille moyenne des *vitroplants*, le nombre moyen de racines formées et la longueur moyenne des racines.

III.9. ACCLIMATATION

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à adapter progressivement les *vitroplants* enracinés aux conditions naturelles de culture. Les *vitroplants* de 4cm de longueur, ayant trois à cinq racines ont été acclimatés.

III.9.1. Méthode d'acclimatation

Les racines ont été débarrassées de la gélose, puis elles ont été rincées à l'eau de robinet. Les *vitroplants* ont été repiqués dans des pots remplis préalablement des substrats composés de terre latéritique, de litière et de sable de proportion (1/3, 1/3, 1/3). Chaque pot a été recouvert d'un plastique transparent. Cette technique a été adoptée afin de maintenir une humidité relative élevée avoisinant celle *in vitro* soit environ de 90%. Les observations ont été effectuées pendant 30 jours. L'aération progressive des vitroplants a été faite par perforation de la couverture de 2cm de diamètre après 5 jours. Le diamètre du trou a été augmenté de 2 fois tous les 3 jours jusqu'au $30^{éme}$ jours d'acclimatation. Trente *vitroplants* ont été acclimatés et l'essai a été répété 4 fois, soit au total, 120 *vitroplants*.

III.9.2. Paramètre étudié

Le taux de survie, une semaine après l'enlèvement total de la couverture, a été considéré comme paramètre d'évaluation.

IV. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS

L'analyse des données est réalisée par des analyses de variance en utilisant le logiciel "STATITCF" Version 4. La séparation des groupes homogènes observés entre plusieurs moyennes est faite suivant le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité de 5%.

Tous les résultats exprimés en pourcentage ont été soumis à une transformation angulaire. La transformation angulaire est nécessaire parce que les résultats en pourcentage suivent la loi de Poisson et ne peuvent pas faire l'objet d'une analyse de variance (Dagnelie, 1980).Les formules utilisées pour les transformations angulaires sont les suivantes :

y(x)=2* Arc sinus (racine (x/n))

Lorsque x=0 y(x)=2* Arc sinus (racine (1/4n))

Lorsque x=n y(x)=2* Arc sinus (racine (1-(1/4n))

Exemple : pour le taux de germination

x : le nombre de graines germées ; n : le nombre de graines semées et viables.

Pour chaque traitement, l'hypothèse nulle consiste à considérer que tous les niveaux du facteur étudié ont le même effet (Razanameharizaka, 2002).

Troisième partie :
RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. GERMINATION DES GRAINES

I.1. EFFETS DE LA DUREE DE TREMPAGE DE GRAINES DANS LA SOLUTION D'HYPOCHLORITE DE CALCIUM ($CaOCl_2$)

I.1.1.Taux de contamination

La figure 2 illustre l'effet de l'hypochlorite de calcium ($CaOCl_2$) 5% sur le taux de contamination de graines relevé 5 jours après le semis de *Keraudrenia macrantha.*
D'après les résultats obtenus, le taux de contamination est significativement plus bas avec la durée de trempage de 15mn, que celle de 10mn. Les taux sont respectivement de 34% et 9% pour la durée de 10mn et 15mn.

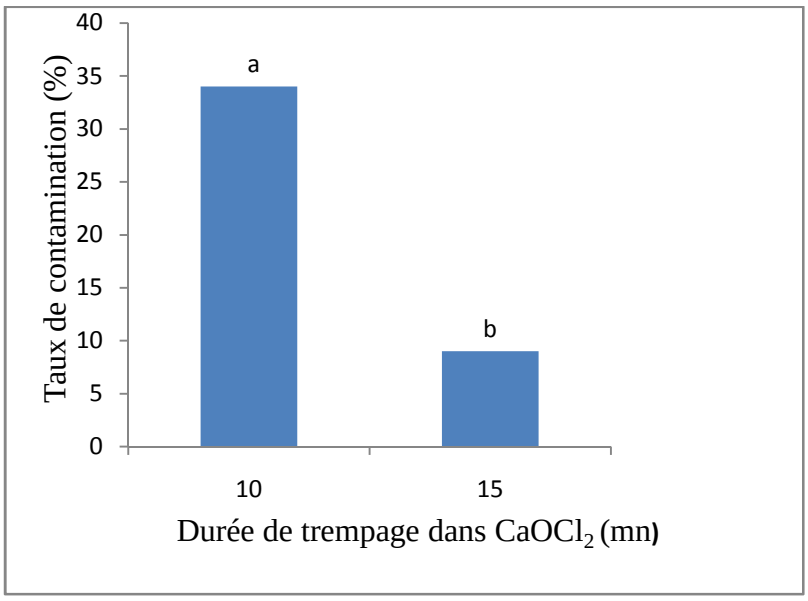


Figure 2 : Effet de la durée de trempage de graines de *Keraudrenia macrantha* dans la solution d'hypochlorite de calcium ($CaOCl_2$) sur le taux de contamination, 5 jours après le semis

Les valeurs suivies de lettres différentes présentent une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

I.1.2.Taux de germination

Les graines de *Keraudrenia macrantha* ont commencé à germer à partir de la deuxième semaine de la date de semis (photo 12).

Photo 12 : Graines de *Keraudrenia macrantha* germées *in vitro*, 15 jours après le semis [barre=5mm]

Le taux de germination de graines de *Keraudrenia macrantha* a varié de façon significative selon la durée de trempage de graines dans 5% de $CaOCl_2$. Sur la figure 3, le taux de germination le plus élevé (63%) a été obtenu pour la durée de trempage de 10mn. Il a diminué à 42% lorsque les graines ont été stérilisées pendant 15mn.

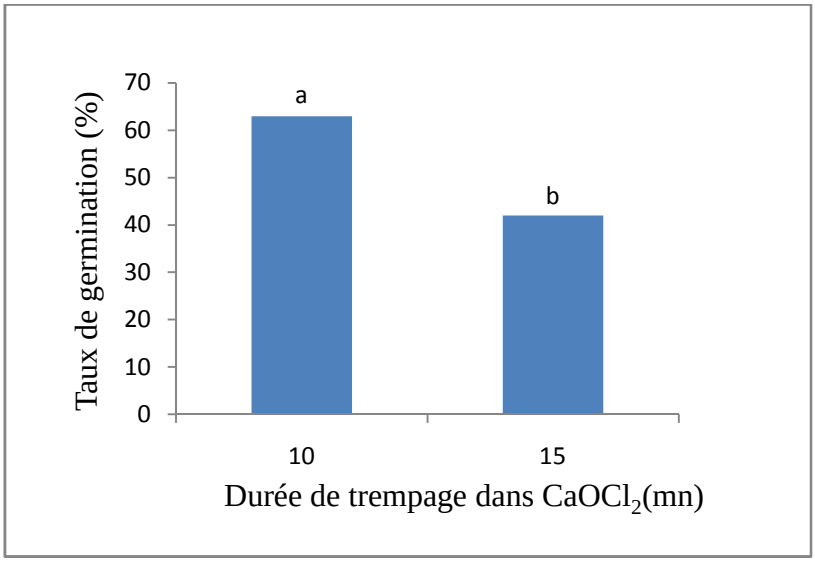


Figure 3 : Effet de la durée de trempage des graines de *Keraudrenia macrantha* dans la solution d'hypochlorite de calcium ($CaOCl_2$) sur le taux de germination après 15 jours de semis

Les valeurs suivies de lettres différentes présentent une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

II. INDUCTION DES CALS

II.1. EFFETS DES REGULATEURS DE CROISSANCE (2,4-D/ BAP) SUR LA CALLOGENESE A PARTIR DE LA FEUILLE ET DE L'HYPOCOTYLE

Pour l'explant foliaire, les cals ont été observés après 7 jours de culture de feuilles sur les milieux d'induction. Les cals sont apparu au niveau du pétiole, puis, ils ont progressé le long des nervures et se sont étalés finalement sur le limbe. Au cours de la callogenèse, une décoloration des feuilles accompagnée de brunissement a été observée (photo 13).

Pour l'explant hypocotyle, sur les milieux d'induction, la callogenèse a été déclenchée après les huit premiers jours de culture. Les explants ont commencé à gonfler légèrement au niveau des zones d'excision. Les cals sont apparus ensuite au niveau de ces zones et se sont développés pour couvrir la totalité de l'explant (photo14).

Photo 13 : Cals issus de la feuille de *Keraudrenia macrantha* après 20 jours de culture sur le milieu d'induction M4 [Barre=5mm]

Photo 14 : Cals issus de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* après 20 jours de culture sur le milieu d'induction M2 [Barre=5mm]

La figure 4 montre les taux de callogenèse issues des explants foliaires et hypocotylaires de *Keraudrenia macrantha*. Pour les deux types d'explants, les cals ont été formés dans tous les milieux additionnés simultanément de 2,4-D et de BAP. Par contre, aucun cal n'a été formé sur le milieu témoin sans régulateur de croissance (M0). En tenant compte de la teneur en 2,4-D, apparemment, les taux de callogenèse ont augmenté avec la concentration jusqu'au seuil de 3mg.l^{-1} pour la feuille et 4mg.l^{-1} pour l'hypocotyle. Ces taux ont diminué lorsque la teneur en 2,4-D a été supérieure à ces seuils.

En ce qui concerne la feuille, il y a une différence significative sur la formation des cals dans les différents milieux notamment pour M1 et M5. Tous les explants foliaires ont produit des cals (100%) sur le milieu additionné de 4mg.l^{-1} de 2,4-D et de 0,5mg.l^{-1} de BAP (M5) alors que le faible taux (50%) a été obtenu dans le milieu contenant la même concentration en 2,4-D et en BAP (0,5/0,5mg.l^{-1}) (M1).

Pour l'hypocotyle, aucune différence significative n'a été observée sur la formation des cals dans tous les milieux additionnés de 0,5mg.l^{-1} à 5mg.l^{-1} de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1} de BAP (M1, M2, M3, M5 et M6). Néanmoins, le taux de callogenèse obtenu a été élevé (100%) dans le milieu additionné de 3mg.l^{-1}de 2,4-D et de 0,5mg.l^{-1}de BAP(M4) tandis que le faible taux (70%) a été enregistré dans le milieu contenant la même concentration en 2,4-D et en BAP (0,5/0,5mg.l^{-1}) (M1).

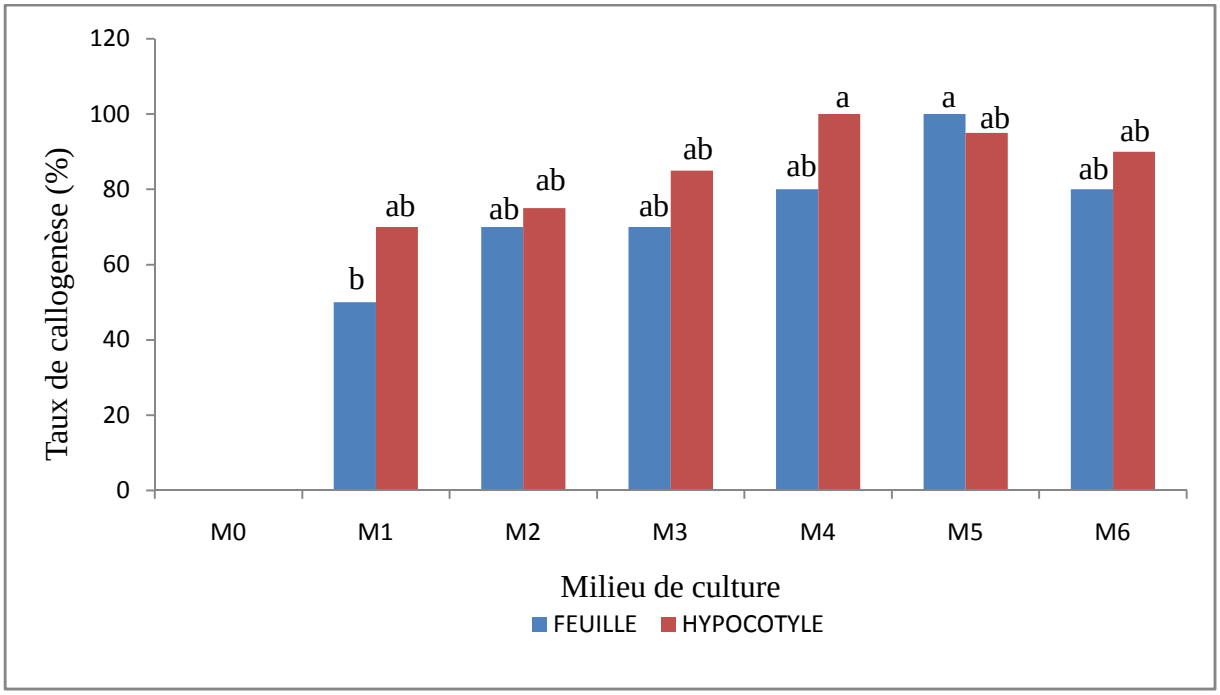


Figure 4 : Effets des régulateurs de croissance (2,4-D/ BAP) sur la formation des cals à partir de la feuille et de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* après 30 jours de culture

M0: témoin; M1: 2,4-D (0,5mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}) ; M2: 2,4-D (1mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}); M3: 2,4-D (2mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}); M4: 2,4-D (3mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}); M5: 2,4-D (4mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}); M6: 2,4-D (5mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1})

Les valeurs suivies de différente lettre présentent une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

II.2. MORPHOLOGIE DES CALS

D'après les résultats obtenus, la combinaison de 2,4-D et BAP ainsi que leurs concentrations ont une influence sur l'aspect morphologique et le caractère embryogénique des cals. Les photos 15, 16, 17, 18, 19, 20 montrent la morphologie des cals obtenus dans les différents types de milieu d'induction. Ces cals sont classés suivant leur texture et leur couleur. Les cals friables blancs sont embryogènes alors que les cals compacts verts, friables jaunâtres, poudreux blancs sont non embryogènes.

- Les cals embryogènes friables blancs sont obtenus dans les milieux contenant de 0,5mg.l^{-1}de BAP additionnés respectivement de 1 à 3mg.l^{-1}de 2,4-D (M2, M3, M4) pour la feuille et de 0,5 à 2mg.l^{-1}de 2,4-D (M1, M2, M3) pour l'hypocotyle.

- Les cals non embryogènes :
  - les cals issus de la feuille sont compacts et verts dans les milieux M1 et M2 contenant 0,5mg.l^{-1}de BAP additionnés respectivement de 0,5 et de 5mg.l^{-1}de 2,4-D. Ils sont friables, jaunâtres dans le milieu additionné de 0,5mg.l^{-1}de BAP avec 4mg.l^{-1} de 2,4-D (M5).
  - Pour l'hypocotyle, les cals compacts verts ou verts avec tâches rougeâtres sont obtenus dans les milieux M4 et M6 contenant 0,5mg.l^{-1}de BAP additionnés respectivement de 3mg.l^{-1} et de 5mg.l^{-1}de 2,4-D. Les cals poudreux blancs ont été formés dans le milieu additionné de 0,5mg.l^{-1}de BAP avec 4mg.l^{-1}de 2,4-D (M5).

- Aucun cal n'a été formé dans le milieu témoin M0 ni à partir de l'hypocotyle ni à partir de la feuille.

Photo 15 : Cals friables blancs embryogènes issus de l'hypocotyle sur le milieu d'induction M2 [barre=5mm]

Photo 16 : Cals friables blancs embryogènes issus de la feuille sur le milieu d'induction M3 [barre=5mm]

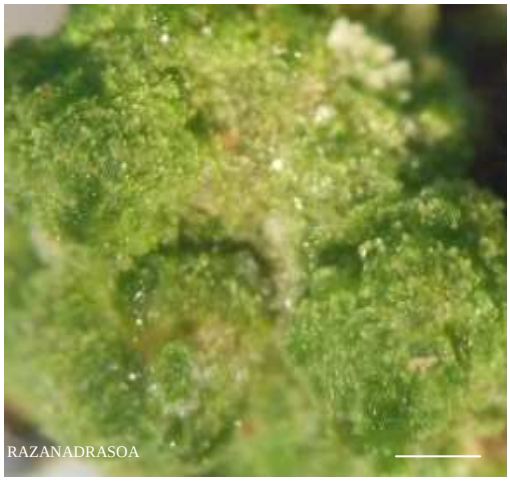


Photo 17 : Cals compacts verts non embryogènes issus de la feuille sur le milieu d'induction M1 [barre=5mm]

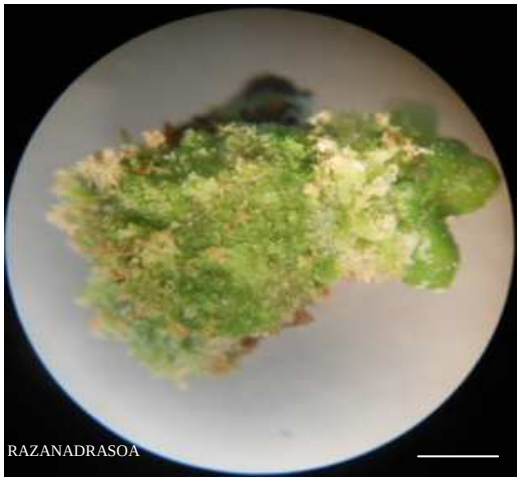


Photo 18 : Cals compacts verts avec des tâches rougeâtres non embryogènes issus de l'hypocotyle sur le milieu d'induction M4 [barre=5mm]

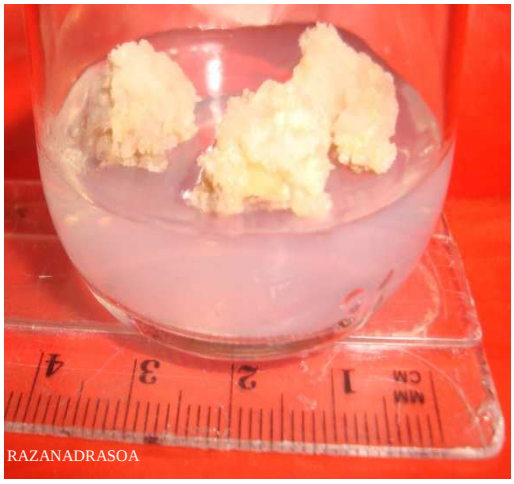


Photo 19 : Cals friables jaunâtres non embryogènes issus de la feuille, sur le milieu d'induction M5 [barre=5mm]

Photo 20 : Cals compacts verts non embryogènes issus de l'hypocotyle sur le milieu d'induction M6 [barre=5mm]

M0: témoin; M1: 2,4-D (0,5mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}) ; M2: 2,4-D (1mg.l^{-1}) + BAP(0,5mg.l^{-1}); M3: 2,4-D (2mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}); M4: 2,4-D (3mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}); M5: 2,4-D (4mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}); M6: 2,4-D (5mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1})

II.3. PROLIFERATION DES CALS EMBRYOGENES ISSUS DE LA FEUILLE ET DE L'HYPOCOTYLE

La prolifération des cals embryogènes a été représentée par le taux de croissance relative qui est obtenu par le rapport du poids frais final et du poids fais initial des cals après avoir transférés ces cals sur le même milieu d'induction frais pendant 60 jours.

- Prolifération des cals embryogènes issus de la feuille

La figure 5 présente le taux de croissance relative des cals issus de la feuille de *Keraudrenia macrantha* pendant 60 jours sur les milieux de prolifération. Le milieu contenant 1mg.l^{-1}de 2,4-D et 0,5mg.l^{-1}de BAP (M2) a représenté une différence significative face aux deux autres milieux additionnés de 2mg.l^{-1}de 2,4-D et de 0,5mg.l^{-1} de BAP pour M3 et de 3mg.l^{-1}de 2,4-D et de 0,5mg.l^{-1}de BAP pour M4. Le taux de croissance relative élevé (46,4%) a été obtenu dans le milieu contenant 3mg.l^{-1} de 2,4-D et 0,5mg.l^{-1}de BAP (M4) tandis que le faible taux de croissance relative (12,8%) a été observé sur le milieu additionné de 1mg.l^{-1}de 2,4-D et de 0,5mg.l^{-1} de BAP (M2).

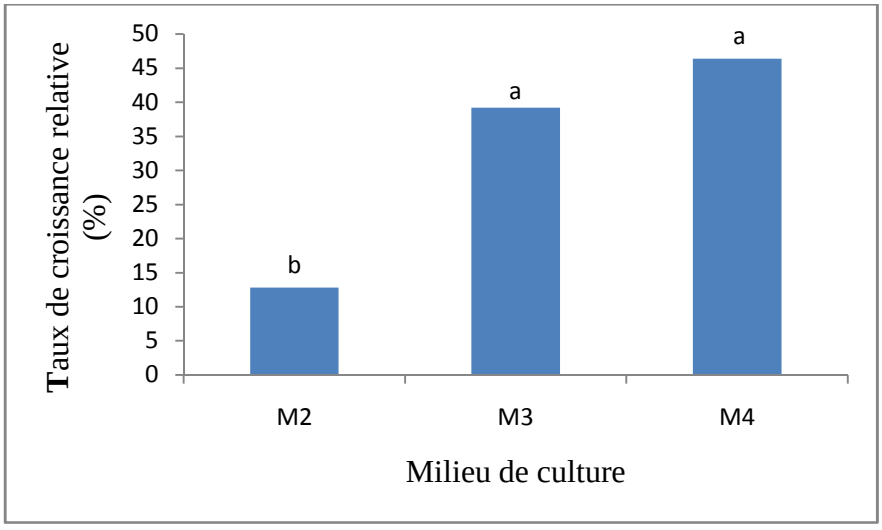


Figure 5 : Taux de croissance relative des cals issus de la feuille de *Keraudrenia macrantha* après 60 jours sur les milieux de prolifération

M2 : 2,4-D (1mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}) ; M3 : 2,4-D (2mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1}) ; M4 : 2,4-D (3mg.l^{-1}) + BAP (0,5mg.l^{-1})

Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

- Prolifération des cals embryogènes issus de l'hypocotyle

La figure 6 illustre le taux de croissance relative moyenne des cals issus de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha*. La prolifération des cals s'est manifestée différemment selon la concentration de 2,4-D, respectivement de 0,5mg.l^{-1}, 1mg.l^{-1} et 2mg.l^{-1} (M1, M2 et M3) dans les trois types de milieux de prolifération. Plus la concentration d'auxine 2,4-D dans le milieu est élevée, plus le taux de prolifération de cals est grand. Les résultats enregistrés après 60 jours sur les milieux de prolifération de cals ont montré que le milieu additionné de 2mg.l^{-1} de 2,4-D et de 0,5mg.l^{-1} de BAP (M3) a présenté le taux de prolifération le plus élevé de 82,8%. Il a été suivi par les milieux renfermant 2mg.l^{-1} de 2,4-D et 0,5mg.l^{-1} de BAP (M2) ; 1mg.l^{-1} de 2,4-D et 0,5mg.l^{-1} de BAP (M1) dont les taux de prolifération ont été respectivement de 46,4% et de 18%.

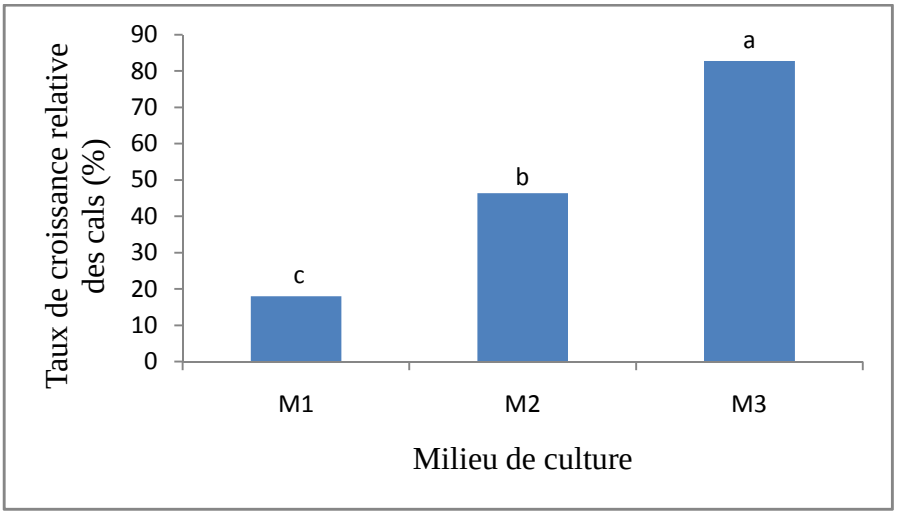


Figure 6 : Taux de croissance relative des cals issus de l'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha* après 60 jours sur les milieux de prolifération

M1 : 2,4-D (0,5mg.l^{-1}) +BAP (0,5mg.l^{-1}) ; M2 :2,4-D (1mg.l^{-1}) +BAP (0,5mg.l^{-1}) ; M3 :2,4-D (2mg.l^{-1}) +BAP (0,5mg.l^{-1})

Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

III. REGENERATIONET MATURATION DE CALS EMBRYOGENES

III.1. INFLUENCE DE LA COMBINAISON D'ANA/BAP SUR LA REGENERATION DES EMBRYONS SOMATIQUES ISSUS DE FEUILLES ET D'HYPOCOTYLES

La figure 7 montre les nombres moyens des embryons somatiques régénérés à partir des explants foliaires et hypocotylaires de *Keraudrenia macrantha* après 80 jours de culture. Ces nombres varient avec la concentration d'ANA et de BAP dans le milieu de régénération. Les deux explants se sont comportés de la même manière vis-à-vis des régulateurs de croissance. En effet, le nombre moyen des embryons somatiques régénérés sur les milieux pourvus à la fois d'ANA et de BAP (R3, R4) est toujours significativement supérieurs à celui du milieu de régénération additionné exclusivement de BAP (R1, R2) et à celui le milieu témoin (R0).

Pour les deux types d'explants, aucune différence significative n'a été observée quant aux nombres moyens des embryons régénérés sur le milieu renfermant 0,1mg.l^{-1} d'ANA et 1mg.l^{-1} de BAP (R3) alors que cette différence devient significative avec le milieu R4. Le nombre de plantules régénérées sont respectivement de 11,2 et de 8,4 pour les feuilles et les hypocotyles.

En ce qui concerne les milieux additionnés exclusivement de 0,5mg.l^{-1} et de 2mg.l^{-1} de BAP (R1, R2), le nombre d'embryons régénérés a augmenté avec la concentration de BAP. Il est en moyenne de 2 à 4,4 pour les explants foliaires et de 1,4 à 3,8 pour ceux de l'hypocotyle.

Dans le milieu sans régulateurs de croissance (M0) le nombre d'embryons somatiques régénérés est très réduit. Ils ont été seulement de 0,6 pour les explants foliaires et de 0,2 pour les hypocotyles.

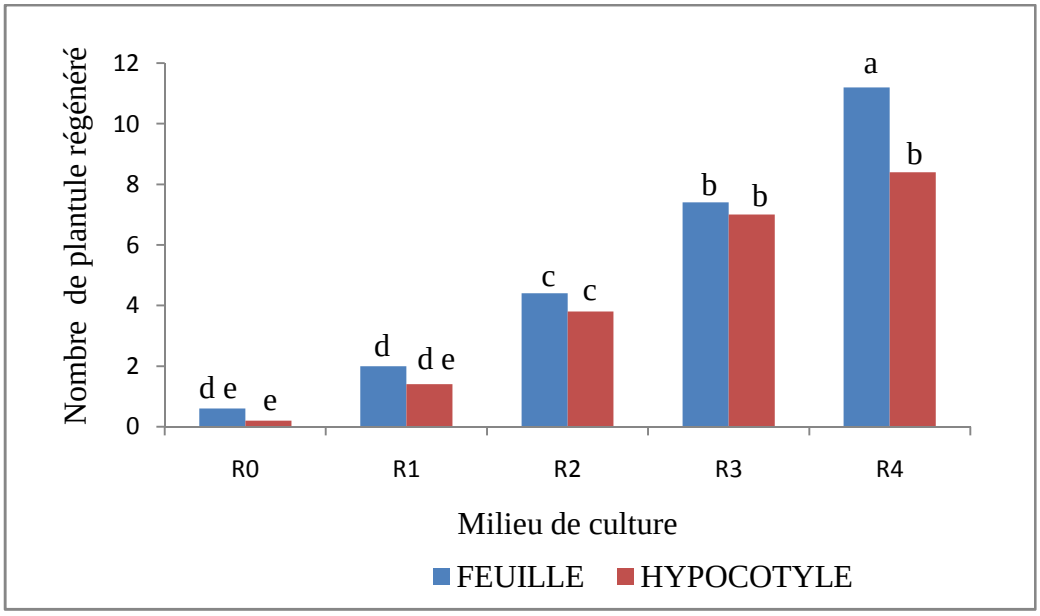


Figure 7 : Influence des régulateurs de croissance (ANA/BAP) sur la régénération des embryons somatiques issus de feuille et d'hypocotyle de *Keraudrenia macrantha*

R0 ; R1 : BAP (0,5mg.l^{-1}) ; R2 : BAP (2mg.l^{-1}) ; R3 : ANA (0,1mg.l^{-1}) + BAP (1mg.l^{-1}); R4: ANA (0, 1mg.l^{-1}) + BAP (2mg.l^{-1})

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type. Les valeurs suivies de différente lettre présentent une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

III.2. EVOLUTION DES EMBRYONS SOMATIQUES DU STADE GLOBULAIRE AU STADE COTYLEDONAIRE

Les cals embryogènes friables (photo 21) provenant des explants foliaires et hypocotylaires, âgés de 60 jours se sont développés puis individualisés pour avoir une forme bien différenciée globulaire ou ovale, 35 jours après la culture (photo 22). La couleur initiale des cals, blanche est devenue verte jaunâtre puis, verte durant la phase de maturation. A partir de 72 jours, l'embryon bipolaire a eu une forme allongée avec deux parties bien distinctes: la partie supérieure verte et la partie inférieure blanche (photo 23). La partie apicale a évolué, puis la feuille cotylédonaire est apparue après 80 jours. De même, la partie basale s'est différenciée en véritable racine. L'entrée en activité des deux parties marque la naissance d'une plantule (photo 24).

Photo 21 : Cals friables de *Keraudrenia macrantha* [barre=5mm]

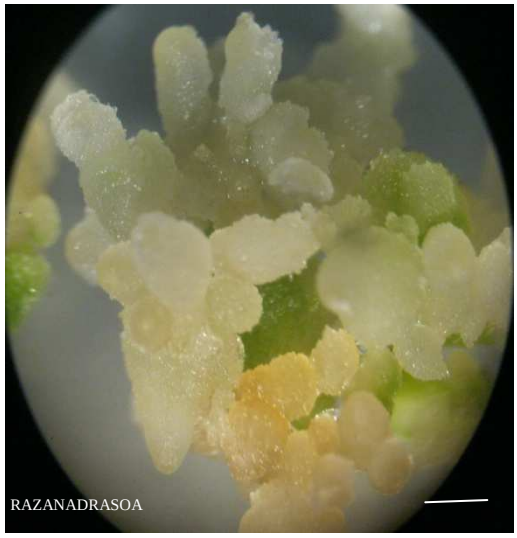


Photo 22 : Cals au stade globulaire de *Keraudrenia macrantha* [barre=5mm]

Photo 23 : Embryons bipolaires de *Keraudrenia macrantha* [Barre=5mm]

Photo 24 : Plantule de *Keraudrenia macrantha* [barre=5mm]

III.3. COUPES HISTOLOGIQUES AU NIVEAU DES CALS ET DES EMBRYONS SOMATIQUES

La taille, la forme, la couleur, la vacuole et le cytoplasme des cellules des cals et des embryons somatiques ont été observés suivant les coupes histologiques. Selon les résultats, deux types des cals ont été obtenus. Ce sont des cals non embryogènes et des cals embryogènes.

Les cellules des cals non embryogènes sont grandes, polyédriques à cytoplasme dépourvu du noyau, coloré au carmino vert et au lugol (photo 25 et photo 26).

Les cellules des cals embryogènes sont de petites tailles, polyédriques pourvues de noyaux bien visibles (indiqués par les flèches) au carmino vert ou au lugol. Les cytoplasmes sont colorés en jaune au lugol (photo 27 et photo 28). Les deux parties, apicale et basale ont été observées sur la coupe longitudinale de l'embryon au stade bipolaire (photo29).

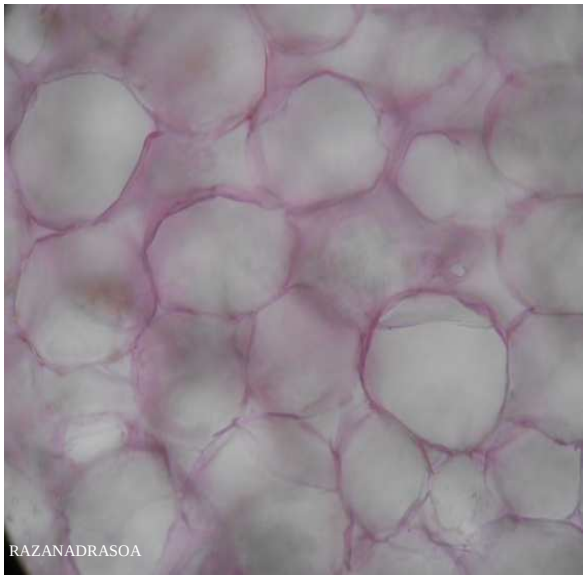


Photo 25 : Structure anatomique de cals non embryogènes colorés au carmino vert (× 100)

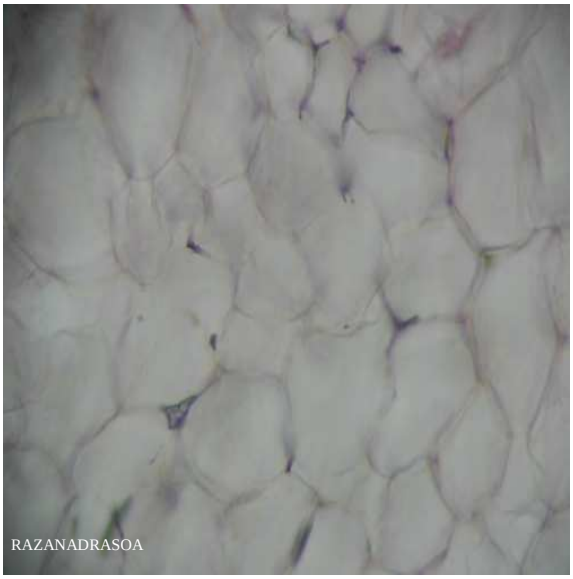


Photo 26 : Structure anatomique de cals non embryogènes colorés au lugol (× 100)

Photo 27 : Structure anatomique de cals embryogènes colorés au carmino vert (× 100)

Photo 28 : Structure anatomique de cals embryogènes colorés au lugol (x100)

Photo 29 : Coupe longitudinale d'un embryon bipolaire coloré au carmino vert (×400)

IV. CROISSANCE ET ENRACINEMENT DE PLANTULES DE *Keraudrenia macrantha*

IV.1. CROISSANCE DES PLANTULES

Les plantules possédant deux feuilles cotylédonaires issues de la germination d'embryons bipolaires ont été cultivées dans le milieu dépourvu des régulateurs de croissance mais additionné de 2mg.l^{-1} de charbon actif. La figure 7 montre la croissance moyenne des plantules de *Keraudrenia macrantha* pendant 30 jours. La présence du charbon actif (C1) dans le milieu de culture a influencé la croissance en longueur des plantules (photo 30). La longueur maximale moyenne des plantules dans ce milieu a été de 5,13cm contre 1,23cm dans le milieu témoin dépourvu de charbon actif (C0).

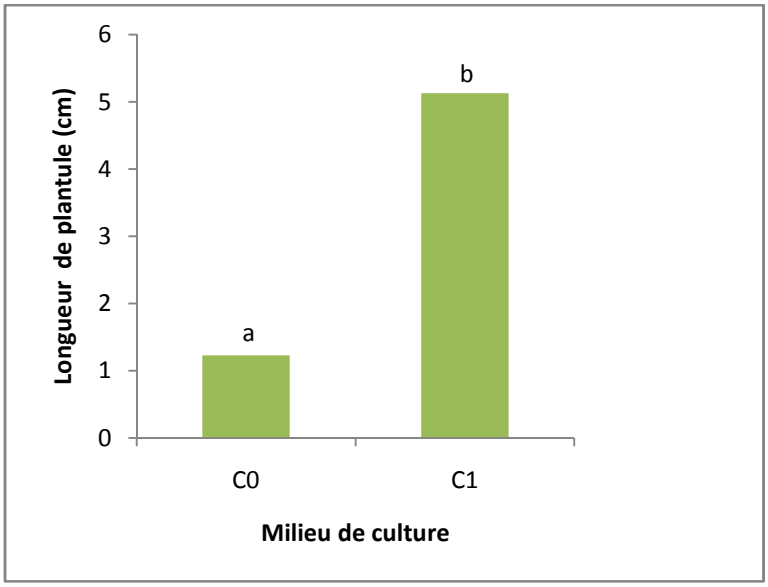


Figure 8 : Influence du charbon actif sur la croissance *in vitro* des plantules de *Keraudrenia macrantha* après 30 jours de culture

C0 : Témoin ; C1 : MS/2 + 2g.l^{-1} du charbon actif

Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

Photo 30 : *Vitroplant* de *Keraudrenia macrantha* âgés de 30 jours [barre=5mm]

IV.2. ENRACINEMENT DES PLANTULES

Le nombre et la taille de racines de *Keraudrenia macrantha* après 30 jours de culture sont présentés dans le tableau 4. Par rapport au milieu témoin, le charbon actif a eu une influence positive significative sur la rhizogenèse des plantules de *Keraudrenia macrantha*. Les racines obtenues sur le milieu de culture additionné de $2g.l^{-1}$charbon actif (C1) ont été plus nombreuses (en moyenne, 3,66 /plantule) par rapport à celles produites sur le milieu (C0) dépourvu de charbon actif (1,36/plantule).

Concernant la longueur des racines, les plantules cultivées sur le milieu additionné de $2g.l^{-1}$ de charbon actif (C2) ont atteint une longueur maximale moyenne de 4,03cm. La longueur des racines a été très réduite (1,7cm) sur le milieu sans charbon actif (C0).

Tableau 4 : Nombre et longueur moyens des racines de *Keraudrenia macrantha* après 30 jours de culture

Type de milieu	Nombre moyen de racines/explant	Longueur moyenne des racines (cm)
C0	1, 37± 0,35 b	1,7± 0,67 b
C1	3,67± 1,35 a	4,03± 1,14a

C0 : Témoin ; C1 : MS/2 + $2g.l^{-1}$du charbon actif

Pour chaque colonne, les valeurs représentent la moyenne ± écart type. Les valeurs suivies de différente lettre présentent une différence significative d'après le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

V. ACCLIMATATION

Le taux de survie de *Keraudrenia macrantha* est enregistré dans le tableau 6. Ce taux s'est élevé jusqu'à 77,5% deux semaines après l'enlèvement total de la couverture en plastique **(**photo 31).

Tableau 5 : Taux de survie des plantules acclimatées de *Keraudrenia macrantha* après 37 jours d'acclimatation

Espèce	**Taux de survie des plantules (%)**
Keraudrenia macrantha	77,5

Photo 31 : Plantules de *Keraudrenia macrantha* acclimatées après 37 jours d'acclimatation [barre=5mm]

MCours.com

Quatrième partie : DISCUSSIONS

Le meilleur taux de germination de graine de *Keraudrenia macrantha* (63%) a été obtenu avec la désinfection des graines dans 5% d'hypochlorite de calcium($CaOCl_2$) pendant 10mn. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Vejsadova (2006) sur la germination des orchidées terrestre.

Ce résultat pourrait être dû d'une part, à l'effet de cette solution désinfectante qui n'a pas gêné le processus de la germination car les cellules n'ont pas été altérées. En effet, l'hypochlorite de calcium ne pénètre pas profondément dans les graines (Boxus, 1995 ; Solofoarivelo, 2000 ; Ephrem, 2012). D'autre part, la germination des graines pourrait être liée aux facteurs favorables à la germination des graines. En effet, une graine doit rencontrer un environnement favorable caractérisé par un taux d'humidité élevé, une plage de température particulière, la présence d'oxygène et la présence ou l'absence de lumière (L'huillier et *al.*, 2010).

En outre, le trempage de graines dans l'eau distillée pendant 24h aurait favorisé le ramollissement du tégument de la graine en le rendant plus perméable à l'eau. La germination n'est pas possible si la structure du tégument inhibe la pénétration de l'eau jusqu' à l'embryon (Haggar et *al*., 1971). Selon L'huillier et *al.* (2010), l'entrée d'eau pourrait stimuler la levée de dormance embryonnaire de la graine.

Selon les résultats obtenus, 100% des explants (foliaire et hypocotylaire) ont généré des cals sur les milieux pourvus de la combinaison de 0,5mg.l^{-1} de BAP avec 3 à 4mg.l^{-1}de 2,4-D. Ces résultats ressemblent à ceux obtenus par Fotso et *al*. (2008) chez *Baillonella toxisperma* et *Vitellaria paradoxa*, à partir des fragments de feuille. L'induction des cals dominerait l'effet synergique ou complémentaire des auxines et des cytokinines. La combinaison cytokinines / auxines pourrait intervenir à la division cellulaire des explants cultivés. En effet, les auxines assurent la duplication des acides désoxyribonucléiques (ADN) et les cytokinines permettent la séparation des chromosomes (Augé et *al*., 1984; Khanam et *al*., 2000; Ramiliarisoa; 2003; Rakotoarisoa, 2013).

Les cals non embryogènes sont caractérisés par des textures compacte de couleur verte, jaune sur les milieux M1, M5 et M6 pour la feuille et pour l'hypocotyle, de couleur jaune sur le milieu M6, verte sur le milieu M4 et verte avec tâche rougeâtre sur le milieu M5. Histologiquement, les cellules non embryogènes ont montré des cytoplasmes dépourvus de noyau. Ces résultats sont en accord à ceux obtenus par Kouadio et *al*. (2004) sur *Gossypium hirsutum* L.

En ce qui concerne les cals embryogènes, ils sont caractérisés morphologiquement par la couleur blanche et la texture friable. Ces cals ont été obtenus sur les milieux ajoutés de 1mg.l^{-1} à 3mg.l^{-1}de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1}de BAP (M2, M3 et M4) pour la feuille et sur les milieux renfermant de 0,5mg.l^{-1}à 2mg.l^{-1}de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1}de BAP (M1, M2 et M3) pour l'hypocotyle. En histologie, les cals ont été caractérisés par des cellules qui ont des noyaux et des cytoplasmes bien visibles au carmino vert ou au lugol. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Kouadio et *al*. (2004) sur *Gossypium hirsutum* L.

Les travaux de Kouakou et *al*. (2009) sur *Gossypium hirsutum* L. ont montré que les cellules embryogènes seraient plus aptes à exprimer leur totipotence à régénérer plus rapidement les embryons somatiques. Ainsi la friabilité des cals indiquerait la réactivité ou la sensibilité différentielle des tissus en embryons somatiques.

Quant à la maturation et à la régénération des embryons somatiques, les cals embryogènes ont évolué au fur et à mesure des subcultures successives. Cela pourrait être dû à l'effet stimulant des régulateurs de croissance qui favorise la multiplication et l'agrandissement des cellules embryogènes. En effet, la maturation des embryons réussirait lorsque les cals embryogènes ont été transférés dans le milieu de culture riche en cytokinine (BAP) et pauvre en auxine (ANA) ou en ajoutant 30g.l^{-1}de saccharose dans le milieu de culture. Cette étape correspond à une succession de transformations physiologiques et biochimiques rendant possible la germination ultérieure de l'embryon.

Le transfert des *vitroplants* de *Keraudrenia macrantha* issus de la régénération des embryons somatiques dans le milieu sans régulateurs de croissance mais pourvu de 2g.l^{-1}de charbon actif a favorisé leur croissance (5,13cm) et leur enracinement (3.66/ plantule et 4,03cm de longueur).

Ces résultats recoupent ceux obtenus par Naydenov et *al*., (2006) sur *Pinus banksiana Lamb*.et par Damiano, (1980) sur la micropropagation de Fraisiers. A part, le saccharose, le charbon actif fournirait une source de carbone nécessaire à la synthèse des substances organiques favorisant la croissance des *vitroplants*. En outre, selon Damiano (1980), l'addition de charbon actif au milieu d'enracinement réduit le temps nécessaire à l'émission des racines et accélère leur croissance.

La présence de bourgeons produisant une grande quantité d'auxines (endogène) circulant de haut en bas pourrait aussi améliorer la rhizogenèse (Von Aderkas et *al*., 2002; NAZ et *al*., 2007; Ephrem., 2012).

CONLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, la régénération de *Keraudrenia macrantha* via la technique de l'embryogenèse somatique a été mise au point. Les explants utilisés (feuille et hypocotyle) au cours de l'expérimentation réagissent à la callogenèse puis cette dernière se régénère en plantule en fonction des différents milieux de culture. D'où la similitude de la réactivité de deux types d'explants vis-à-vis des milieux de culture sur la régénération de *Keraudrenia macrantha* par l'embryogenèse somatique a été vérifiée.

Il ressort de ce travail que la stérilisation de surface des graines de *Keraudrenia macrantha* dans la solution d'hypochlorite de calcium 5% pendant 15mn a permis d'obtenir un taux de contamination le plus faible (9%). Cependant, le taux de germination le plus élevé (63%) a été obtenu avec un trempage dans l'hypochlorite de calcium pendant 10mn.

Concernant la callogenèse, les explants foliaires et hypocotylaires ont engendré 100% de cals sur les milieux renfermant respectivement 4mg.l^{-1}et 3mg.l^{-1}de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1}de BAP (M5 et M4).

L'étude morphologique des cals a permis de mettre en exergue que la combinaison de 2,4-D et BAP ainsi que leurs concentrations ont une influence sur la morphologie et le caractère embryogénique des cals : les cals embryogènes sont de couleur blanche et à texture friable. Pour les explants foliaires, les milieux additionnés de 1mg.l^{-1} à 3mg.l^{-1} de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1} de BAP (M2, M3, M4) ont permis d'obtenir des cals embryogènes. D'un autre côté, pour les hypocotyles, une légère augmentation de la concentration en 2,4-D dans les milieux contenant entre 0,5mg.l^{-1} et 2mg.l^{-1}de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1}de BAP (M1, M2, M3) a engendré des cals embryogènes.

Histologiquement, ces cals embryogènes sont caractérisés par de petites cellules polyédriques à cytoplasme pourvu de noyau bien visible. Alors que les cals non embryogènes se reconnaissent à leur couleur verte ou verte avec tâches rougeâtres et à leur texture compacte ou poudreuse. Ils sont caractérisés par de grandes cellules polyédriques à cytoplasme dépourvu de noyau.

En ce qui concerne la prolifération des cals, elle est représentée par un taux de croissance relative qui augmente avec la concentration de 2,4-D/BAP dans le milieu d'induction frais et selon le type d'explant. Le taux de croissance relative des cals a été maximal (82,8%) pour les hypocotyles dans le milieu ajouté de 2mg.l^{-1} de 2,4-D avec

0,5mg. l^{-1} de BAP. Pour les feuilles, le taux de prolifération le plus élevé (46,4%) a été largement inférieur à celui des hypocotyles. Il a été enregistré dans le milieu contenant 3mg.l^{-1}de 2,4-D et 0,5mg.l^{-1}de BAP.

Quant à la régénération des embryons, la combinaison de deux régulateurs de croissance ANA et BAP a favorisé la régénération des embryons somatiques à l'état bipolaire. Sur les milieux pourvus de 0,1mg.l^{-1}d'ANA avec 2mg.l^{-1}de BAP (R4), les embryons régénérés issus des explants foliaires ont été plus nombreux (en moyenne, 11,2) par rapport à ceux des hypocotyles (en moyenne, 8,4).

Concernant la croissance et l'enracinement des *vitroplants* issus de l'embryogenèse somatique de *Keraudrenia macrantha*, par rapport au milieu témoin, la présence du charbon actif dans le milieu de culture a eu une influence positive sur la croissance en longueur et sur la rhizogenèse. La croissance en longueur des *vitroplants* a été en moyenne de 5,1cm et le nombre moyen de racines a été de 3,6 avec une longueur maximale moyenne de 4cm.

Durant la phase d'acclimatation des plantules de *Keraudrenia macrantha*, le taux de réussite de l'acclimatation enregistré est élevé (77,5%). Ainsi, les conditions d'acclimatation ont été adéquates puisque les plantules acclimatées étaient vigoureuses, saines et ne présentaient aucune anomalie morphologique.

Au terme de cette étude, quelques perspectives de recherche méritent d'être envisagées :

- études moléculaires sur le passage au stade de cals qui provoquerait l'hétérogénéité du patrimoine génétique des plantules régénérées (diversité génétique) ;
- investigations sur les autres techniques de régénération *in vitro* (culture de méristèmes et/ou de protoplasme…), et de conservation *in vitro* (banque de gènes *in vitro* et cryoconservation) ;
- élargissement de la technique de l'embryogenèse somatique sur d'autres explants ou d'autre taxon ;
- mise au point de la technique de la réintroduction *in situ* et suivi comportemental des plants de *Keraudrenia macrantha* issus de la régénération par embryogenèse somatique.

BIBLIOGRAPHIE ET WEBOGRAPHIES

BIBLIOGRAPHIE

- AMMIRANTO, P.V., 1983. Embryogenesis *In*: EVANS, D. A., W.R., SHARP, P.V., AMMIRATO, et Y., AMADA. Handbook of plant cell culture. 1: 82-123.
- ARÈNES, J., 1959. Flore de Madagascar et des Comores (Plante vasculaire). 131ème Famille : Sterculiacées. 537p.
- AUGE, R., G.,J., BEAUCHESNE, L., BOCCON-GIBOD, B., DECOURTYE, J-CL., DIGAT,R., GALANDRIN, J.-CL., MINIER, H. MORAND, et VIDALIE, 1983. La culture *in vitro* et ses applications horticoles.151p.
- AUGE, R., G., BEAUCHESNE, J., BOCCON -GIBBOD, L., DECOURTYE, B., DIGAT, GALANDRIN, J-CL., MINIER, R., MORAND, J-CL. et VIDALIE, H., 1984. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Lavoisier, Paris, 152 p.
- AUGE, R.,G., BEAUCHESNE, J., BOCCON–GIBBOD, L., DECOURTYE,B., DIGAT,R., JALOUZOT, R., MINIER, C. L., MORAND, J. P., REYNOIRD , G., STRULLUD et H., VIDALIE, 1989. La *culture in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Lavoisier, Paris, 225p.
- BEAUCHESNE, G.,R., AUGE,J., BOCCON–GIBBOD,L., DECOURTYE,B., DIGAT,J-CL., GALANDRIN,R., MINIER,J-CL. MORAND, et H., VIDALIE, 1984. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Lavoisier, Paris, 152 p.
- BELAIZI, M. et P., BOXUS, 1995.*In vitro* shoot multiplication of corkoak (*Quercus suber L*.) influence of different carbohydrates. Bull Rech. Agron. Gembloux, 30: 1-2.
- BERNER, P.O., S. DICKINSON and A., ANDRIANARIMISA, 2009. The Ambatovy project, BBOP pilot project, Business and Biodiversity Offsets Program (BBOP) Case Study. 120p.
- BHASKARAM, S., R.H. SMITH, et K. SCHERTZ, 1983. Sodium chloride tolerant callus of *Sorghum bicolor* (L.). Z. *Pflanzenphysiol.*112: 459 – 463.
- BOCCON-GIBOD, J., 1989. La technologie de la culture *in vitro, In*: La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Techniques et documentations Lavoisier, Paris, pp : 37-62.
- BOMMINENI, V. R. et P. P., JAUHAR. 2003. Regeneration of plant through isolated scutellum culture of *Durum*.Wheat. plant sci., 116: 197-277.
- BOUTHERIN, D. et G., BRONG 1989. Multiplication des plantes horticoles Tec. et Doc. Lavoisier, pp : 145-173. Paris. S.N., 221p.

- BOXUS, P., 1995. Multiplication végétative : micropropagation et embryogenèse somatique *In* : Biotechnologies végétales. BV 93, Ed CNED. AUPELF- UREF 191p.
- BRIGGS, W. B., 1964. Phototropis, in higher plants in physiology academic press (1) pp: 223-271.
- BRHADDA, N., D.E.W., LOUDYI et A., ABOUSALIM, 2008. Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) Agron. Soc. Environ. 12 (3) pp: 245-250.
- BROWN, C.W., 1988. Germoplasm of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. Hortscience 23(3): 526 - 531.
- BROWN, D.E.W., K. I., FINSTAD, et E.M., WATSON, E.M., 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic publishers Dordrecht. pp: 345-415.
- CAMEFORT, H., 1977. Morphologie des végétaux vasculaires .Ed DOIN. 418p.
- CHAOUIA, C., V., VALLES,S. A., SNOUSSI, F., SAIDI,F., BENREBIHA,M.S. ABDULHUSSAIN et GHEZALI, H. , 2008. Elaboration d'une technique de régénération de l'*Actinidia chinensis* par embryogenèse somatique. Département d'Agronomie. Faculté des Sciences Agronomiques Vétérinaires et Biologiques. Université Saad Dahlab - Blida, nr. 1(2) pp : 65- 66.
- CHEN, C. C., 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice.Sci.(18) pp: 905-906.
- DAGUIN, F. and R. LETOUZE, 1988 Regenerationof Date Palm (*Phoenixdactylifera*L.) by somatic embryogenesis: improved effectiveness by dipping in a stirred liquid medium. Fruits, 43(3):191-194.
- DAIKH, H. et Y., DEMARLY, 1987. Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons somatiques et la réalisation de semences artificielles de Palmier dattier *(Phoenix dactylifera*L.). Fruit 42 (10) pp : 593-596.
- DAGNELIE, P., 1980. Les transformations des variables. Théories et méthodes statistiques. Vol. 2. Applications agronomiques, Presses Agronomiques de Gembloux. 463p.
- DALVESCO, L.L. et P.M., GUERRA, 2001. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, (64) pp: 19 - 25.
- DAMIANO, C., 1980. Strawberry micropropagation, *In*: Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture: Applications and

feasibility. Beltsville, Maryland, Usdasea, Agricultural Research Results, ARR-NE-11, pp: 11-22.

- DESCHEEMAEKER, A., 1986. Ravi-Maitso. Ed. Imprimerie Saint Paul, Fianarantsoa, 128p.
- DICKINSON, S. et P. O., BERNER, 2010. Ambatovy project: Mining in a challenging biodiversity setting in Madagascar. *In*: Biodiversity, exploitation, and conservation of the natural habitats associated with the Ambatovy project, eds. S. M. Goodman & V. Mass. Malagasy Nature, 3: 2-13.
- DINAHARILALA, M., T., G., 2012. Substitution des phytohormones synthétiques par des additifs organiques sur la micropropagation de *Aeranthes antennophora* et *Bulbophyllum peyrotii* deux espèces d'orchidées endémique, menacées du site minier d'Ambatovy. Mém. D.E.A.en Physiologie Végétale, Dép. Ecologie et Biologie Végétales, Univ. Antananarivo, 47p.
- DODEMAN, V.L., G., DUCREUX et M., KREIS, 1997. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany 48N 313: 1493 - 1509.
- DYNATEC CORPORATION, 2006. Etude d'impact environnemental (EIE) d'Ambatovy. INRA Paris, 262p.
- EGERTSDOTTER, U. et S.V., ARNOLD, 1998. Development of somatic embryos in Norway spruce. Jou. Exp. Bot., 49, 319: 155 - 162.
- EL TAHCHY, A., 2010. Étude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojumaestivum* L. Criblage phytochimique de quelques Amaryllidaceae. Thèse de Doctorat en chimie, Univ. Henri Poincaré, Nancy-Univ., Fac. Des Sciences, École Doctorale S.E.S.A.M.E.S., 245p.
- EPHREM, L. M., 2012. Vitropropagation de *Medinilla mandrakensis* (Melastomataceae), une espèce endémique menacée du site minier d'Ambatovy, en vue de conservation. Mém. D. E. A. en Physiologie Végétale, Dép. Ecologie et Biologie Végétales, Univ. Antananarivo, 57p.
- FEHÉR, A., 2006 .Why somatic plant cells start to form embryos? Plant Cell Monographs. Springer Berlin / Heidelberg. 2: 85 - 101.
- FERNÁNDEZ-GUIJARRO, B., C. CELESTINO et M., TORIBIO, 1993. Somatic embryogenesis in *Quercus suber* L., *In* PARDOS, J. A., AHUJA, M.R., ROSSELLO, *Biotechnology of trees*, Valsain (Spain), pp 105 - 110.

- FERNÁNDEZ-GUIJARRO, B., C. CELESTINO et M., TORIBIO, 1995. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. Plant Cell, Tissue Organ Cult, 41 (2): 99 - 106.
- FOTSO, SANONNE, D., T., NEHEMIA et O., N., DENIS, 2008. Comparaison des premières étapes de l'embryogenèse somatique chez *Baillonella toxisperma* et *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae). Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 12 (2): 131 - 138.
- GATICA, A. M., G., ARRIETA et A. M., ESPINOZA, 2007. Comparison of three in vitro protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of coffea Arabica L. CVS. Caturra and catuai. Agronomia Costarricense, 31 (1): 85-94.
- GAUTIER, L. et S. M., GOODMAN, 2003. Introduction to the flora of Madagascar. *In*: GOODMAN, S. M et J. P, Benstead (eds). The Natural History of Madagascar. The University Chicago Press. Chicago. pp: 229-250.
- GEORGE, F. et P. D., SHERRINGTON, 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetic itd. England, pp: 225 - 129.
- GSPM. 2011a. Liste rouge des plantes vasculaires endémiques de Madagascar. Antananarivo, 188p.
- HAGGAR, R. J., E., AGISHI et G., BOLMALENGA, 1971. Research on seeds germination and management of *Stylosanthesgracils* at Shika (Nigeria).Logos, Agricultural Scientific research, pp: 426-440.
- HANNWEG, K., M.P., WATT et BERJAK, 1996. A simple method for the micropropagation of *Bowieavolubilis* from inflorescence explants. Bot. Bull. Acad. Sin, 37: 213 - 217.
- HARKMAN, V. et S., ARNOLD, 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (*Norway spruce*). Journal plant physiology, 121: 149 - 158.
- HUGHES, K.W., 1981. *In vitro* ecology: Exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *In* CONSTANTIN, M.S., R.R., HENKE, K.W., HUGHES et CONGER, B.V. (eds.). Propagation of higher plants through tissue culture. Emerging Technologies and strategies. Env. Exp. Bot., 21 (3–4), special issue (Conference Proceedings), pp: 281–288.
- HUSSEY, G.et N. J., STACEY, 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum teberosum* of potato of photoperiod on *in vitro* tuberisation of potato- *S tubrerosum*- .JEA. plant cell m tissue and organe culture, 34: 43-51.

- JULLIEN, M., 1991. La multiplication végétative *in vitro*, bases méthodologiques et physiologique. D.E.A. Ressources génétiques et Amélioration des plantes. INA Paris Grignon, 101p.
- KACEM, N. S., 2005. Embryogenèse somatique et variation somaclonale chez le blé dur et tendre (culture d'embryons matures et immatures). Mém. en vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Biotechnologies Végétales. Département des Sciences de la Nature et de la Vie. Univ. Mentouri - Constantine, 144p.
- KHANAM, N., C. KHOO et A. G., KHAN, 2000. Effects of cytokinin/auxin combinations on organogenesis shoot regeneration and torpane alkaloid production in Duboisiamyoporoides. Plant Cell Tiss Organ Cult; 62: 125 - 133.
- KOUADIO, Y.J., M., KONÉ, Y., YAO DJÈ, M. A. D'ALMEIDAetM., ZOUZOU, 2004. L'étiolement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 8 (3): 155–162.
- KOUAKOU, T.H., M., ZOUZOU, Y.J. KOUADIO et A.P., ANNO, 2009. Embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum*L.) : évolution des composés lipidiques au cours de la callogenèse et de la culture de suspensions cellulaires. Afrique Science, 05 (1): 147 - 159.
- L'HUILLIER, T. JAFFRE et A., WULFF, 2010. Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux ultrabasiques et leur restauration. Éditions IAC, Nouméa, Nouvelle- Calcédoine. 412p.
- MARGARA, F., 1989. Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. Ed INRA Paris, 262p.
- MATER, A.A., 1986. *vitro* propagation of *Phoenix dactylifera* L. Date Palm Journal, 4: 137-152.
- MISAINTSOA, A.A., 2009. Place des espèces sensibles dites SOCS (Species Of Concern) dans la trajectoire de la dynamique végétale d'Ambatovy en vue de la restauration. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (DESS) en science de l'environnement. Option : Biologie de conservation, Univ. Antananarivo, 50p.
- MURASHIGE, T.et F., SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol., Plant, 15: 473 - 497.
- MURASHIGE, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol., 25: 135 - 166.

- NAYDENOV, K., F., TREMBLAY, Y., BERGERON et V., GOUDIABY, 2006. Influence du charbon actif sur la croissance primaire des plantules de pin gris. Chaire Conseil national de la recherche scientifique, Univ. Québec en Abitibi-Témiscamingue et Univ. Québec à Montréal (CRSNG–UQAT–UQAM) en aménagement forestier durable, Can. J. For. Res., 36: 761 - 767.
- NAZ, S., A., ALI, F. A., SIDDIQUE et J., IQBAL, 2007. Multiple shoot formation from different explants of chickpea (*Cicerarietinum).* Pak. Bot., 39(6) pp: 2067 –2073.
- NORREL, B., 1973. Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique. Soc. Bot mém. Coll Morphologie, pp. 71 - 98.
- NUTI, R. V., 1990. Organogenesis and embryogenesis: genetic and physiological approaches 1st International symposium *in-vitro* culture and horticultural breeding. Acta Horticulture, 280: 1 - 11.
- NZEFOUO, M. A. L., 2010. Analyses biochimiques des cals embryogènes et non embryogènes de trois clones de *Theobroma cacao* L. (pa150, bbk109, ma12). Mém. DI.P.E.S.II. en Biochimie, Département des sciences biologiques, Unin. Yaoundé I., 68p.
- PIATTI, M.F., 1988. Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Paris VI, 130p.
- PHILLIPSON, P. B., II P. P., LOWRY, L., ANDRIAMAHEFARIVO, P. ANTILAHIMENA et C., BIRKINSHAW, 2010. Floristic inventory of the Ambatovy-Analamay mine site and comparison to other sites in Madagascar. *In* Biodiversity, exploration, and conservation of the natural habitats associated with the Ambatovy project, S. M. GOODMAN & V. MASS. (eds.) Malagasy Nature, 3: 44-76.
- RAGHAVAN, V. et J.G., TORREY, 1963. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture, Amer. J. Bot., 50: 540-551.
- RAKOTOARISOA, J., M., 2013. Régénération *in vitro* et *in vivo* de *Dracaena sp nov. 3* (Dracaenaceae) et de *Psorospermum sp. nov. b* (Clusiaceae), deux espèces forestières menacées du site d'exploitation minière d'Ambatovy. Mém. D. E. A. en Physiologie Végétale, Dép. Ecologie et Biologie Végétales, Univ. Antananarivo, 41p.
- RAMAMONJIARISOA, V.H., 2004. Étude phytochimique et multiplication *in vitro* de *Cinnamonum camphora* (L) Nees et Ebern ou RAVINTSARA (Lauraceae). Mém. D.E.A. en Physiologie Végétale, Département de Biologie et Écologie Végétales, Univ. Antananarivo, 39p.

- RAMILIARISOA, C., 2003. Callogenèse in vitro de *Lantana camara* (Verbenaceae) et étude de l'ADN génomique. Mém. DEA en Biotechnologie – Microbiologie. Dép. de Biochimie Fondamentale et Appliquée. Univ. Antananarivo. Fac. Sciences. 52p.
- RASOARANTOMANANA, F.M., 2009. Ecologie et facteurs prépondérants à la distribution des espèces floristiques sensibles d'Ambatovy en vue d'une éventuelle restauration. Mém. DESS-SE en Biologie de Conservation, Univ. Antananarivo, 69 p.
- RAVOAHANGY, N. A., 2011. Les nouvelles merveilles sombrent dans l'oubli, *In*: L'hebdo de Madagascar. No 0330 : pp. 16-17 (10-16/06/2011).
- RAZANAMEHARIZAKA, J., 2002. Régénération du genre *Adansonia* dans le Sud-Ouest malgache. Mém. D.E.A. en Physiologie Végétale, Département de Biologie et Écologie Végétales, Univ. Antananarivo, 69p.
- RAZAFIMAHARO, C. B., 2003. Régénération *in vitro* de cinq variétés de caféiers (*C.arabica bourbon, C. perrieri, C. racemosa,* Var. AM2, Var. 344 ATo) Extraction d'ADN génomique de *C. arabica bourbon, C. racemosa, C. perrieri*. Mém. DEA. en Biotechnologie-Microbiologie, Dép. Biochimie Fondamentale Et Appliquée, Univ. Antananarivo, 47p.
- REUVENI, O., 1979. Embryogenesis and plantlets growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) derived from callus tissues. Plant Physiol. (Suppl.). 63: 138p.
- RIJIVEN, A.H.G.C., 1952. *In vitro* studies on the embryo of *Capsella bursapastoris*. Acta Bot. Neerl. L., pp: 157-200.
- ROUGET, Y., 1989. Embryogenèse somatique de la laitue *Lactuca sativum* L. Thèse doctorat d'Université d'Orsay. 147p.
- RUGHLA, A. et M.G.K., JONES, 1998. Somatic embryogenesis and plantlet formation in Santalum album and S. spicatum. Jou. Exp Bot., 49, 320: 563 – 571.
- SAADI, A., 1991. Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon. 162p.
- SCHATZ, G. 2001. Flore générique des arbres de Madagascar. Royal Botanic Gardens, Kew et Missouri Botanical Garden. Grande Bretagne. 501p.
- SHARMA, D.R., DAWRASYNITA and J.B., CHOWDURY, 1984: Somatic embryogenesis and Plant Regeneration in Date Palm (*Phoenix dactylifera L.*) CV. "Khadravi" through tissue culture. Indian J. of Exp. Biol., 22: 596-598.

- SHARMA, D.R.,S., DEEPAK and J. B.,CHOWDURY, 1986 Regeneration of plantlets from somatic tissues of the date palm *Phoenix dactylifera* L. Indian J. Exp. Bot., 24: 763-766.
- SHARP, W.R., M.R., SÖNDHAL L.S., CALDAS et W.R., MARAFFA, 1980. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Horticultural reviews. Ed. Jules Janick. Purdue University. Aviublishing Company. INC Westport, Connecticut. pp: 268-310.
- SOLOFOHARIVELO, M. C., 2000. Régénération *in vitro* de variétés locales de manioc et essai d'évaluation somaclonale. Mem. D.E.A. en SBA option Biotechnologie et Microbiologie. Antananarivo. Faculté des sciences, 60p.
- TAN, X.L., et Y.G., QIAN, 1988. Effect of explants sources and Cultural conditions on plant regeneration in *Gossypium gossypioides* (Ulbrich) Standley. Acta Genet. Sin., 15, 2: 473- 497.
- TEOULE, E., 1993. Biotechnologie et Amélioration des plantes in Biotechnologie SERIBAN, R. Ed. TEC.& DOC. pp : 565-589.
- TISSERAT, B., B., ESANE et T., MURASHIGE, 1979.Somatic embryogenesis in Angiosperms. Hort. Rev., 1:1-78.
- TRIQUI, Z.E.A. 2009. Contribution à l'amélioration de la patate douce *(Ipomoea batatas* L. (Lam) par l'application des biotechnologies : embryogenèse somatique et transformation génétique. Thèse de doctorat d'état en Biotechnologie végétale, Univ. Mohammed V-Agdal, Fac. Sciences-Rabat, p 139.
- VEJSADOVA, H., 2006. Factors affecting seed germination and seedling grow of terrestrial orchids cultured *in vitro*. Acta Botanica, 48, 1: 109 - 113.
- VON ADERKAS, P., P., LABEL et M.A., LELU, 2002. Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. Tree Physiol., 22: 431- 434.
- WALKER, D.R .et A.W., PARROTT, 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. Plant Cell Tissue and organ Culture. 64: 55 - 62.
- ZAID, A. and B., TISSERAT, 1983. Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explants tissues of date palms. Bot. Marg., 96: 67-73.
- ZAID, A. and B., TISSERAT, 1984: Survey of the morphogenetic potential of excised palm embryos "i*n vitro*". Crop Res., 24: 1-9.

- ZAID, M., 1989. Embryogenèse somatique chez le Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Thèse de Docteur ès Sciences, Univ. Paris Sud, Centre d'Orsay, 92p.
- ZRYD, J. P., 1988. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Ed. Press. Polytechniques Romandes Suisse, 308p.

WEBOGRAPHIES

1- http : //www. cactuspro. com- images-article 020-01r. jpj

2- http : //www.aspb.org/publications/arabidopsis/

3-http://fr.wikipedia.org /W/index.php?title= phytohormone& action= edit

4 -http ://www.universalis.fr/encyclopedie/ brassinosteroïdes

5 -http : //www. cactuspro. Com- images-article 020-01r. jpj

6-http: //www3. Gaf.de/bpgrm/pages/en geology/geol-hotspots-nickel.htm)

7- http: //www. Ambatovy.com / docs /? lang=fr&p =377

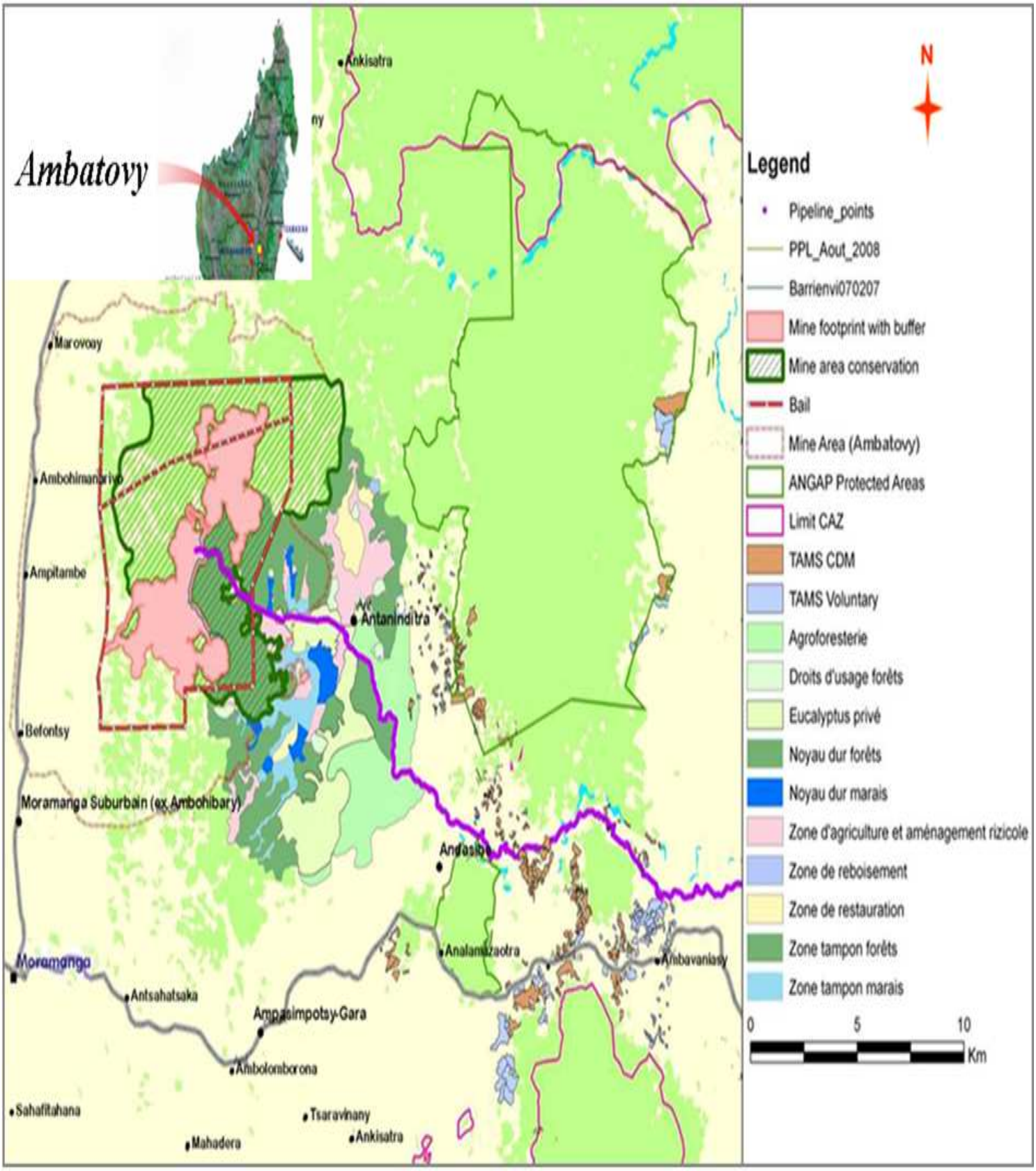
8- http://www.infomine.com/minesite/ambatovy.html

9 -http://fr. getamap.net/cartes/madagascar/toamasina/-ambatovy/

10- http://www.svt.ac-aix-marseille.fr/labosvt/spip php article.83&var recherche=coloration

ANNEXES

ANNEXE I : Carte du site minier d'Ambatovy



Carte 1 : Localisation du site miner d'Ambatovy (Berner et *al.*, 2009)

ANNEXE II : Variation mensuelle de la précipitation et de la température en 2010 du site Ambatovy

Mois	Jan.	Fév.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sep.	Oct.	Nov.	Déc.
Précipitation (mm)	253	227,2	173,4	68,2	44,4	38,4	58	50,2	28	60,9	143,6	255,3
Température moyenne (°C)	21	21,4	20,6	18,7	16,2	14,3	13,6	13,9	15,2	17,3	18,5	20,2

(Source : http: //9)

ANNEXE III : Coordonnées géographiques de *Keraudrenia macrantha*

Code	Taxon	Latitude	Longitude
S49-Ni- AMP-1	*Keraudrenia macrantha*	18° 51’ 45’’	48° 15’ 06,2’’
S49-Ni- AMP-2	*Keraudrenia macrantha*	18° 51’ 23,9’’	48° 15’ 06,3’’
S49-Ni- AMP-3	*Keraudrenia macrantha*	18° 51’ 23,7’’	48° 15’ 06,2’’
S49-Ni- AMP-4	*Keraudrenia macrantha*	8° 51’ 23,5’’	48° 15’ 06,4’’
S49-Ni- AMP-5	*Keraudrenia macrantha*	18° 51’ 23,5’’	48° 15’ 06,4’’
S49-Na-ZANA3-1	*Keraudrenia macrantha*	18° 43’ 41,3’’	48° 19’ 34,4’’
S49-Na-ZANA3-2	*Keraudrenia macrantha*	18° 43’ 41,4’’	48° 19’ 34,3’’
S49-Na-ZANA3-3	*Keraudrenia macrantha*	18° 48’ 39,5’’	48° 19’ 35,4’’
S49-Na-ZANA3-4	*Keraudrenia macrantha*	18° 48’ 39,7’’	48° 19’ 35,6’’
S49-Na-ZANA3-5	*Keraudrenia macrantha*	18° 48’ 39,6’’	48° 19’ 35,5’’
S49-Na-ZANA3-6	*Keraudrenia macrantha*	18° 48’ 23,8’’	48° 19’ 50,3’’

ANNEXE IV : Composition de milieu de base de Murashige et Skoog (1962) et des vitamines

Macroéléments (mg. l^{-1})	
CaCl2, 2H2O	440,00
KH2PO4	170,00
KN03	1900,00
MgSO4, 7 H2O	370,00
NH4NO3	1 650,00
Microéléments (mg. l^{-1})	
CoCl2. 6H2O	0,025
CuSo4. 5H2O	0,025
H3BO3	6,2
Kl	0,83
MnSO4. 4 H2O	22,3
Na2MoO4. 2H2O	0,25
ZnSO4. 7H2O	8,60
Ions chélateurs (mg. l^{-1})	
FeSO4. 7H2O	27,8
Na2EDTA	37,3
Vitamine (mg. l^{-1})	
Glycine	2,00
Myo- inositol	100,00
Acide nicotinique	0,50
Pyridoxine	0,50
Thiamine	0,10

(Source: Murashige et Skoog, 1962)

ANNEXE V : Préparation des colorants (carmino-vert de Mirande)

Dissoudre 6g de carmin+12g d'alun de potassium dans 200ml d'eau distillée ; Chauffer à feu doux Ajouter 0,4g de vert d'iode + 200ml d'eau distillée; Porter à ébullition puis laisser refroidir et filtrer.

(Source: http : //10)

DEA in Plant Biology and Ecology **Option: Plant Physiology**

Title: REGENERATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Keraudrenia macrantha* (Sterculiaceae) AN ENDANGERED, ENDEMICSPECIES, IN AMBATOVY MINING SITE

Author: Voahanginirina Julie RAZANADRASOA

ABSTRACT

Keraudrenia macrantha was regenerated by the method of somatic embryogenesis. This method is an effective mean for the preservation and propagation of endangered species. *Keraudrenia macrantha* is an endemic monospecific shrub of Madagascar. It is listed as SOCs (Species Of Concern) that is only found on the Ambatovy mining footprint or only one or two other sites in Madagascar.

The reactivities of the two types of explants, leaves and hypocotyls, via this technique were studied. A culture medium of Murashige and Skoog half strength (MS/2) supplemented with 8% agar, 2.4-D / BAP for callogenesis and callus proliferation, ANA / BAP for the maturation and the formation of somatic embryos on the callus and $2mg.l^{-1}$of active charcoal for growth and rooting of seedlings was used.

In vitro disinfection and seedling were obtained. Soaking time of 10 min in a calcium hypochlorite solution 5% permitted to obtain the best germination rate 63%. The embryonic callus characterized by white color and brittle texture, large polyhedral cells, cytoplasm provided with visible nucleus were obtained on a medium supplemented by 1 to $3mg.l^{-1}$ 2,4 - D with $0,5mg.l^{-1}$ BAP (M2 , M3 and M4) for the leaves and of 0,5 to $2mg.l^{-1}$ 2,4 - D with $0,5mg.l^{-1}$ l BAP (M1 , M2 and M3) for the hypocotyls after 30 days of culture. Concerning the proliferation of cal, the mediums supplemented with $0,5mg.l^{-1}$ of BAP and $3mg.l^{-1}$ of 2,4-D (M4) for the leaves and $2mg.l^{-1}$ of 2,4-D (M3) from hypocotyls made it possible to obtain the best rates of proliferation of cal embryogenes (respectively of 46,4% and 82,8%). As for the regeneration of the embryos, the medium provided with the combination of $0,1mg.l^{-1}$ of ANA / $2mg.l^{-1}$ of BAP (R4) more improves the numbers of the embryos regenerated as from 80 days for the two types of explants. On average, 11,2 regenerated embryos are obtained for the leavesand8,4 for the hypocotyls explants. The active charcoal $2mg.l^{-1}$ promoted growth in the length of plantlets (5,13cm), root length and number (respectively 4,03cm, 3,66) of *Keraudrenia macrantha* seedlings. During the phase of the acclimatization, the rate of survival of *the vitroplants* is high 77, 5% one week after the total removal of the plastic cover.

The conservation of *Keraudrenia macrantha* starting from somatic embryogenesis is possible. In addition, the reactivity of leaves and hypocotyls explants was similar during the induction and proliferation of cal, the somatic regeneration of the embryos.

Keywords: Ambatovy, somatic embryogenesis, leaves and hypocotyls explants, *Keraudrenia macrantha, vitroplant*.

Advisor: Doctor Nivohanintsoa RAMANAMPAMONJY née RAVONIARISON.

DEA en Biologie et Ecologie Végétales **Option : Physiologie Végétale**

Titre: REGENERATION PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE *Keraudrenia macrantha* (Sterculiaceae), UNE ESPECE ENDEMIQUE MENACEE DU SITE MINIER D'AMBATOVY

Auteur: Voahanginirina Julie RAZANADRASOA

RÉSUME

Keraudrenia macrantha a été régénéré par la technique de l'embryogenèse somatique. Cette méthode constitue un des moyens efficaces pour la conservation et la multiplication des espèces menacées. *Keraudrenia macrantha* est un arbuste monospécifique, endémique de Madagascar. Elle est classée parmi les SOCs (Species Of Concern), espèces n'existant que sur l'empreinte de la mine d'Ambatovy ou seulement sur un ou deux autres sites à Madagascar.

Les réactivités des deux types d'explant, feuilles et hypocotyles, vis-à-vis de cette technique ont été étudiées. Les milieux Murashige et Skoog, dilués de moitié (MS/2) et solidifiés par 8% d'agar, additionnés respectivement de 2,4-D/BAP pour la callogenèse et sa prolifération, ANA/BAP pour la maturation des cals et la régénération des embryons somatiques et de 2g.l^{-1}de charbon actif pour la croissance et l'enracinement des plantules, ont été utilisés.

La désinfection et la germination *in vitro* ont été obtenues. La durée de trempage 10mn dans la solution d'hypochlorite de calcium 5% a permis d'obtenir le meilleur taux de germination 63%. Les cals embryogènes caractérisés par leur couleur blanche et leur texture friable, leurs petites cellules polyédriques à cytoplasme pourvu de noyau, ont été obtenus sur les milieux additionnés respectivement de 1 à 3mg.l^{-1} de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1} de BAP (M2, M3 et M4) pour les feuilles et de 0,5 à 2mg.l^{-1}de 2,4-D avec 0,5mg.l^{-1}de BAP (M1, M2 et M3) pour les hypocotyles après 30 jours de culture. Concernant la prolifération de cals, les milieux additionnés de 0,5mg.l^{-1}de BAP avec 3mg.l^{-1} de 2,4-D (M4) pour les feuilles et de 2mg.l^{-1}de 2,4-D (M3) pour les hypocotyles ont permis d'obtenir les meilleurs taux de prolifération de cals embryogènes (respectivement de 46,4% et 82,8%). Quant à la régénération des embryons, le milieu pourvu de la combinaison de 0,1mg.l^{-1}d'ANA /2mg.l^{-1}de BAP (R4) améliore davantage le nombre des embryons régénérés à partir de 80 jours pour les deux types d'explants. En moyenne, 11,2 embryons régénérés sont obtenus pour les feuilles et 8,4 pour les hypocotyles. Le charbon actif 2g.l^{-1} a aussi favorisé la croissance en longueur des *vitroplants* (5,13cm), la longueur et le nombre racinaire (respectivement de 4,03cm ; 3,66) des plantules de *Keraudrenia macrantha.* Durant la phase d'acclimatation, le taux de survie des *vitroplants* s'est élevé à 77, 5% une semaine après l'enlèvement total de la couverture en plastique.

La conservation de *Keraudrenia macrantha* à partir de l'embryogenèse somatique est donc possible. En outre, la réactivité des explants feuilles et hypocotyles ont été similaires au cours de l'induction et de la prolifération de cals ainsi que lors de la régénération des embryons somatique.

Mots clés : Ambatovy, Embryogenèse somatique, Explants feuilles et hypocotyles, *Keraudrenia macrantha, vitroplant.*

Encadreur : Docteur Nivohanintsoa RAMANAMPAMONJY née RAVONIARISON.

MCours.com