

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
<u>PREMIERE PARTIE</u> : Généralités	
A-CULTURE <i>IN-VITRO</i>	3
1-Historique.....	3
2-Méthodes d'obtention de cellules libres	4
2-1-Dissociation mécanique : obtention de cellules d'origine secondaire.....	4
2-1-1-Production de cellules libres à partir de cals friables.....	4
2-1-2-Caractéristiques des cellules séparées de cals friables	5
2-2-Dissociation du tissu assimilateur foliaire : obtention de cellules d'origine primaire.....	4
2-2-1-Méthodes mécaniques.....	5
2-2-2-Méthodes enzymatiques.....	6
3-Méthodes de culture des cellules libres.....	6
3-1-Les microcultures.....	6
3-2-Les cultures en milieu gélosé.....	7
3-3-Les cultures en milieu liquide.....	7
B-MATERIEL VEGETAL : <i>Lantana camara</i>	8
1-Classification	8
2-Description botanique.....	9
2-1-Appareil végétatif.....	9
2-2-Appareil reproducteur.....	10
3-Composition chimique de <i>L. camara</i>	12
4-Utilisations de <i>L. camara</i>	13

a-Utilisations médicales.....	13
b- Autres utilisations.....	14
C-Applications des cultures de cellules végétales.....	
.....	15
1-Multiplication végétative.....	15
2-Amélioration des plantes.....	15
3-Biotechnologie et les cultures de cellules végétales.....	15
3-1-Production de métabolites secondaires par les cultures de cellules.....	15
3-2-Biotransformations réalisées par les cultures de cellules	16

DEUXIEME PARTIE : Callogenèse

A-Matériels.....	17
1-Matériel végétal.....	17
2-Milieus de culture.....	17
2-1-Milieus de base.....	18
2-1-1-Macroéléments	18
2-1-2-Oligo-éléments.....	18
2-1-3-Vitamines.....	18
2-2-Composition des milieux de base.....	18
2-3-Préparation des milieux.....	20
2-3-1-Solutions- mères.....	20
2-3-2-Source de carbone.....	21
2-3-3-Gélification du milieu	21
2-4- Stérilisation du milieu.....	21
2-5-Hormones végétales.....	21
2-6-Conditionnement du milieu de culture.....	
.....	21

B-Méthodes de culture	
24	
1-Méthodes expérimentales	24
2-Multiplication par microbouturage.....	24
2-1-Stérilisation des explants	24
2-1-1-Stérilisation à l'hypochlorite de sodium.....	25

2-1-2-Stérilisation au bichlorure de mercure.....	25
2-1-3-Combinaison de ces deux agents stérilisants.....	25
2-2-Mise en culture	26
2-3-Conditionnement d'environnement de la culture.....	26
3-Callogenèse (embryogenèse somatique indirecte).....	26
3-1-Initiation de cals à partir de lobes de feuilles	27
3-2-Initiation de cals à partir de méristèmes ou apex de tige	27
3-2-1-Rappel.....	27
3-2-2-Mise en culture.....	27
3-2-3-Transfert des cals sur le milieu de maturation GD6.....	28
3-2-4-Evaluation des traitements.....	28
C-Résultats et discussions	29
1-Stérilisation des explants	31
2-Production des cals à partir de lobes de feuilles.....	31
3-Production de cals à partir de l'apex de tige.....	32
4-Transfert des cals sur le milieu de maturation GD6.....	33
5-Conclusion.....	34
<u>TROISIEME PARTIE</u> : Extraction de l'ADN génomique	
A-Matériels.....	38
B-Méthodes.....	38
1-Préparation du phénol.....	38
2-Extraction d'ADN génomiques de <i>L. camara</i>	39
3-Analyse de l'ADN en gel d'agarose.....	40
4-Digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction	40
5-Coloration et révélation de l'ADN.....	41
C-Résultats et discussions.....	42
1-Analyse de la quantité de l'ADN génomique.....	42
2-Digestion de l'ADN génomique.....	42
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	45-46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	47
ANNEXES.....	52

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFLP : Amplified fragment length polymorphism

AIA : Acide indolylacétique

AIB : Acide indolylbutyrique

BAP : Benzyl aminopurine

BET : Bromure d'éthidium

DRA : Département de recherches agronomiques

DRFP : Département de recherches forestières et piscicoles

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

EDS : Eau distillée stérile

FOFIFA: Foibe momba ny Fikarohana ho Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra

GD6 : milieu Gresshoff et Doy (1974) , avec 60 g/l de saccharose

Hg Cl₂ : Bichlorure de mercure

MS4 : milieu de Murashige et skoog (1953) , avec 40 g/l de saccharose

Na₂-EDTA : Ethylène diamine tétra acétique disodique

Na O Cl : Hypochlorite de sodium

P/V : poids par volume

PCR : Polymerase chain reaction

RFLP : Restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction)

rpm : Rotation par minute

SDS : Sodium dodécyl sulfate

TAE : Tris-H Cl acide acétique-EDTA

TE : Tris-H Cl EDTA

UV : Ultraviolet

V/V : Volume par volume

LISTE DES TABLEAUX

Tableau. 1 : noms vernaculaires Malagasy.

Tableau. 2 : noms vernaculaires étrangers.

Tableau. 3 : composition du milieu MS.

Tableau. 4 : composition du milieu GD.

Tableau. 5 : résultats de la stérilisation.

Tableau.6 : initiation de cals à partir des fragments de feuilles de *L. camara* du groupe A et B sur différents milieux.

Tableau. 7 : initiation de cals à partir de l'apex de tige de *L. camara* du groupe A et B.

Tableau. 8 : évolution de cals de *L. camara* sur le milieu de maturation GD6.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de β - caryophyllène

Figure 2 : Structure chimique de Δ^3 -carène

Figure 3 : Acide indolyl butyrique

Figure 4 : Acide indolyl acétique

Figure 5 : Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique

Figure 6 : 6-furfuryl amino purine (kinétine)

Figure 7 : benzyl amino purine

Figure. 8 : schémas récapitulatifs des procédés de stérilisation.

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : *L. camara* à fleurs rose violacées (groupe A).

Photo 2: *L. camara* à fleurs jaune orangées (groupe B).

Photo 3 : fragments de feuilles de *L. camara* du groupe A cultivés sur MS4 avec AIB (2 mg/l) et kinétine (8 mg/l) après 6 jours de culture.

Photo 4 : fragments de feuilles de *L. camara* du groupe A cultivés sur MS4 avec AIB (1 mg/l) et BAP (8 mg/l) après 21 jours de culture.

Photo 5 : fragments de feuilles de *L. camara* du groupe B cultivés sur MS4 avec AIB (2 mg/l) et kinétine (8 mg/l).

Photo 6 : microboutures de *L. camara* sur MS4 avec AIB (0,6 mg/l) et kinétine (6 mg/l).

Photo 7 : microboutures de *L. camara* sur MS4 avec AIB (0,2 mg/l) et kinétine (0,1 mg/l).

Photo 8 : cals transférés sur GD6 avec AIB (2 mg/l) et kinétine (8 mg/l).

Photo 9 : cals issus de l'apex caulinaire sur MS4 avec AIB (1 mg/l) et kinétine (2 mg/l).

Photo 10 : microboutures présentant des néoformations sur MS4 avec 2,4-D (8 mg/l).

Photo 11 : Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* (groupe A et B).

Photo 12: Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* (groupe A et B) après la reconcentration.

Photo 13: Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* du groupe A digérés par les enzymes de restriction.

Photo 14 : Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* du groupe B digérés par les enzymes de restriction.

GLOSSAIRE

- Antiseptique**: qui détruit les microbes, pathogènes ou non et empêche leur développement.
- Antifongique** : qui détruit les champignons, la mycose (antimycotique).
- Antalgique** : qui supprime la douleur.
- Arbrisseau** : petit arbre.
- Astringent** : qui resserre les tissus, modère les excréments.
- Apex caulinaire** : le terme apex est parfois utilisé par les histologistes dans l'acceptation restreinte de l'extrémité apicale du méristème dans le présent ouvrage, comme dans la pratique courante de la multiplication végétative «apex caulinaire» désigne, à l'inverse, l'ensemble constitué par le méristème et des tissus sous-jacents, sans préjuger les dimensions.
- Axillaire** : qui a rapport à l'aisselle.
- Bullée** : scellé avec une bulle.
- Cal** : ensemble des cellules végétales inorganisées c'est à dire, amas de cellules indifférenciées.
- Capité** : qui est au-dessus.
- Cicatrisant** : qui aide à la cicatrisation des plaies.
- Corolle** : partie de la fleur qui enveloppe les étamines et le pistil.
- Drupe** : se dit des fruits charnus qui ont un seul noyau.
- Dédifférenciation cellulaire** : retour progressif de cellules différenciées vers l'état méristématique primaire.
- Étamine** : appareil reproducteur mâle de la fleur.
- Explant** : fragment d'organismes (apex, organe, fragment d'organes ou fragment de tissu, excise et éventuellement mis en culture *in vitro*).
- Glabre** : qui est sans poil.
- Inflorescence** : disposition des fleurs sur la tige qui les porte.
- Ladder** : ADN marqueur de taille.
- Lancéolé** : qui a la forme d'un fer de lance.
- Néoformation** : formation de structures nouvelles
- Oblongue** : plus long que large.
- Opprimé** : celui, celle qui souffre l'oppression.
- Papyracé** : mince et sec comme du papier.
- Paniculé** : qui a les fleurs ou les fruits disposés en panicules.

- Photopériode** : alternance de période d'illumination et de période sombre dans le cycle journalier d'une plante.
- Pubescent** : se dit des plantes garnies de poils fins.
- Purgatif** : laxatif puissant, diastique.
- Quadrangulaire** : qui a quatre angle.
- Rameau** : petite branche d'arbre.
- Réticulé** : qui a des lignes entrecroisées en forme de réseau.
- Rugueux** : qui représente des aspérités à sa surface.
- Scabre** : âpre au toucher.
- Sédatif** : calmant des douleurs, de la nervosité, etc.
- Stimulant** : qui excite ou dynamise.
- Tonique général** : qui provoque un état de tension involontaire des tissus vivants et spécialement du tissu musculaire (on parle de tonicité ou de tonus musculaire).
- Totipotence cellulaire** : aptitude des cellules à exprimer la totalité des potentialités du génome.

INTRODUCTION

De tout temps, l'homme a eu recours aux végétaux pour sa subsistance ou pour sa survie. Il a tout naturellement étendu leur emploi pour résoudre tous ses problèmes.

Ainsi est né l'ancêtre de notre phytothérapie ou thérapie à base de plantes. Les feuilles, les fleurs, l'écorce, les racines sont prises en infusion, en décoction ou en macération, sous forme d'extraits alcoolique, œnologique, huileux ou autres solvants (JOUHANNEAU, 1991).

Ainsi est né également, par incidence, l'ancêtre de notre aromathérapie ou thérapie par les huiles essentielles des plantes aromatiques ou essences de plantes. En effet, un certain nombre de plantes guérissent ou apportent à l'homme un soulagement par le fait de leurs composantes aromatiques. Les plantes aromatiques ont d'ailleurs, pour la plupart, la caractéristique de croître sous les climats chauds, tempérés chauds ou tropicaux (JOUHANNEAU, 1991).

Madagascar se trouve particulièrement privilégié par la nature, car pratiquement, tous les végétaux des climats tropicaux aux climats tempérés poussent sur l'île. Les plantes aromatiques constituent l'une de ses ressources naturelles, avec les multiples espèces qu'elles renferment.

L'exploitation de ces plantes par la science et la technologie des huiles essentielles connaît un essor considérable ces dernières décennies. Concrètement, la majeure partie de ces substances odorantes est destinée à l'exportation et constitue une source importante de devises pour le pays.

Actuellement, la filière huile essentielle occupe une place importante dans la vie économique de Madagascar. En effet, les opérateurs en exportent une quantité non négligeable vers les pays occidentaux. Les huiles essentielles sont présentes dans des domaines aussi divers que la pharmacie, les cosmétiques, les arômes, les pigments, les additifs et les pesticides. Ces potentialités d'utilisations nécessitent la connaissance parfaite de leurs constituants et de la plante. Aussi, nous nous proposons d'étudier : "La callogénèse *in vitro* de *Lantana camara* et étude de l'ADN génomique" afin de permettre une meilleure exploitation de leurs vertus. L'objectif est de produire de métabolites secondaires par la culture cellulaire.

Lantana camara fait partie des plantes médicinales encore peu exploitée à Madagascar. Il se développe dans les forêts denses humides sempervirentes de basse et de moyenne altitude (1000-1200 m). Il se rencontre surtout dans la végétation secondaire (forêts dégradées) et aux lisières des forêts. A Madagascar, il est très présent sur la côte est et sur les

hauts plateaux : Antananarivo, Toamasina, Ivoloina, Tampina, Mananjary. Son huile essentielle est surtout destinée à l'exportation, à un prix de 1200 FF/kg (ANDRIANAIVO, 1999) .

Le présent document se subdivise en trois grandes parties :

La première partie est consacrée aux généralités sur *Lantana camara* et la culture cellulaire.

La deuxième partie porte sur la callogenèse ;

- microbouturage
- culture de fragments de feuilles
- culture de méristèmes
- transfert des cals sur un milieu neuf

Enfin, l'étude de l'ADN génomique de *Lantana camara* sera présentée.

A-CULTURE *IN VITRO*

La culture *in vitro* n'est possible que grâce à une propriété des cellules végétales appelée totipotence cellulaire par laquelle toute cellule végétale vivante, possédant un noyau, est capable, quelle que soit sa spécialisation, de reproduire fidèlement la plante entière dont elle provient. Chaque cellule possède donc entre autre la totalité du patrimoine génétique de la plante.

La manière de procéder et les buts recherchés étant très différents, les cultures *in-vitro* se présentent sous quatre aspects :

- culture de méristèmes
- les cultures d'anthere, de grain de pollen et d'ovules
- la culture de protoplastes
- les cultures de cals et de suspensions cellulaires

1-Historique

La culture *in vitro* d'organes isolés de plante date du début du siècle avec les travaux d'HEBERLANDT en 1902. Mais les travaux de WHITE aux Etats-Unis en 1922, sur la croissance indéfinie en milieu liquide de racines de tomate, marquent réellement le début de la culture *in vitro*.

Dès 1934, GAUTHERET obtient, en France, une prolifération cellulaire à partir de prélèvement de tissus cambiaux d'arbres. Avec les résultats de NOBERCOURT en France et de WHITE aux Etats-Unis en 1939 sur les tissus tumoraux de tabac, la culture *in-vitro* va prendre un formidable essor et ouvrir d'extraordinaires potentialités dans de nombreux domaines de la recherche.

Les observations sur l'absence de virus dans les méristèmes de tabac virosé ont été faites par LIMASSET ET CORNUET en 1949. MOREL ET MARTIN (1952) , ont mis à profit ces observations et ont entrepris de mettre en culture *in vitro* des méristèmes de dahlia et de pomme de terre atteints de maladies à virus. A partir de méristèmes, ils ont obtenu des plantes entières qui, remises en culture normale, se sont révélées saines au contrôle.

Dans un tout autre domaine, la culture *in vitro* a permis de faire des progrès considérables dans la connaissance des tumeurs végétales, en particuliers le "*crown gall*" . BRAUN (1941) fut l'un des premiers à aborder l'étude de ce phénomène. C'est, en partie,

grâce à ces recherches sur le *crown gall* que les premiers essais de manipulation génétique ont pu être réalisés.

Un point longtemps contesté est la possibilité d'obtenir une prolifération de tissus à partir d'une cellule végétale mise en culture *in vitro*. TORREY, en 1957, réussit à suivre sous microscope l'évolution de cellules isolées de tissus de pois, mises en culture à proximité d'un tissu "nourricier".

Les tissus compacts, normaux ou tumoraux, méristèmes, bourgeons, racines et enfin cellules isolées sont devenus, grâce aux techniques de culture *in vitro*, le matériel de choix pour les physiologistes végétaux et les botanistes.

2-Méthodes d' obtention de cellules libres

Les cellules libres peuvent être obtenues par :

- des techniques mécaniques (agitation ou broyage ménagé des tissus en milieu liquide)
- des techniques enzymatiques (action d'enzymes pectocellulolytiques).

Lorsqu'on applique ces techniques à des tissus provenant directement du végétal comme le tissu foliaire, on obtient des suspensions cellulaires dites primaires.

Lorsqu'on les applique à des tissus néoformés résultant de la prolifération *in-vitro* d'un explant prélevé sur le végétal, on obtient des suspensions cellulaires dites secondaires.

2-1-Dissociation mécanique : obtention de cellules d'origine secondaire

2-1-1-production de cellules libres à partir de cals friables

L'essor des cultures de tissus végétaux, qui a suivi les premiers travaux de WHITE (1934) , GAUTHERET et NOBECOURT (1977), a apporté une contribution considérable aux cultures de cellules en permettant la mise au point d'une méthode commode d'obtention de cellules libres.

Les tissus de carotte cultivés en présence d'auxine (AIA : acide indolyl acétique) ont une texture si friable qu'ils peuvent se dissocier spontanément en cellules séparées (GAUTHERET, 1934) . L'aptitude à la dissociation d'une culture de tissus dépend de l'espèce choisie, du type de tissu et de la composition du milieu de culture. La présence d'auxine à forte dose est souvent un facteur très favorable. Les suspensions de cellules libres, à partir

d'agrégats cellulaires de taille variable, sont obtenues en transférant des cals friables en milieu liquide agité (MUIR et col, 1954) .

La filtration des suspensions obtenues sur des tamis de mailles convenables a permis, par la suite, d'augmenter la proportion de cellules libres.

2-1-2-Caractéristiques des cellules séparées de cals friables

Les suspensions d'origine secondaire ne sont jamais constituées exclusivement de cellules séparées, malgré des filtrations répétées. En effet, les dimensions cellulaires sont très hétérogènes dans les cals. Les hasards de la dissociation peuvent fournir des agrégats de quelques cellules dont la taille est peu différente de la moyenne des cellules libres. En conséquence, les filtrats contiennent toujours un pourcentage très variable de colonies cellulaires de petite taille mélangées aux cellules libres. D'autre part, au moment de la séparation, toutes les cellules d'un cal ne sont pas dans le même état physiologique. Elles peuvent, par exemple être d'âges variés, se trouver à diverses étapes du cycle cellulaire et même posséder des propriétés métaboliques différentes (JULIEN, 1980).

2-2-Dissociation du tissu assimilateur foliaire: obtention de cellules d'origine primaire

2-2-1-méthodes mécaniques

Les premières cellules séparées ont été obtenues par HEBERLANDT (1902) grâce à une méthode mécanique qui a nécessité la pratique de dissections fines des feuilles. Cette méthode, délicate à mettre en œuvre, a permis l'obtention de cellules viables, mais en petites quantités.

RACUSEN et ARONOFF (1953) ont eu les premiers l'idée de remplacer ces dissections par un broyage modéré réalisé au moyen d'un homogénéisateur manuel dans une solution tampon.

D'autres méthodes de dissections mécaniques du tissu foliaire non pratiquées aseptiquement, ont été utilisées lors d'études relatives au métabolisme photosynthétique. Elles semblent très spécifiques et sont d'emploi plus délicat, ce qui limite leur intérêt.

2-2-2-Méthodes enzymatiques

Les techniques de dissociation enzymatique se sont essentiellement développées après les travaux de TAKEBE et coll. (1968) sur la feuille de tabac. Leur principe consiste à faire

agir des enzymes pectolytiques et cellulolytiques sur le tissu foliaire fortement plasmolysé. On obtient d'abord des cellules séparées, puis des protoplastes.

Il faut souligner que le champ d'application des méthodes enzymatiques est beaucoup plus large que celui des méthodes mécaniques. L'utilisation de diverses combinaisons d'activités enzymatiques dégradant la parois cellulaire devrait permettre d'obtenir des cellules et plus facilement encore des protoplastes à partir de n'importe quel tissu foliaire.

3-Méthodes de culture de cellules libres

Le développement des cultures de tissus s'est réalisé grâce à la mise au point de milieux nutritifs de mieux en mieux adaptés aux besoins. La composition du milieu Murashige et Skoog (1962) qui, bien qu'élaboré initialement pour la moelle de tabac, s'est révélé ensuite convenir à beaucoup d'autres espèces. Ce milieu comprend des sels minéraux, macro et oligo-éléments, une source de carbone (saccharose) , des vitamines du groupe B et des régulateurs de croissance de type auxine (AIA) et cytokinine (kinétine) .

3-1-Microcultures

Elles consistent en la culture d'un très petit nombre de cellules (parfois une seule) dans des microvolumes de solution nutritive. Ces petits volumes peuvent être enfermés dans une microchambre ou déposés en groupe sur le couvercle d'une boîte de pétri ou encore dans les puits d'une boîte cuprak (JULIEN, 1980) .

3-2-Cultures en milieu gélosé

Il est possible de diluer une suspension de cellules libres dans un milieu gélosé maintenu en fusion à une température relativement basse, s'inspirant des techniques de microbiologie. BERGMANN (1960) a, ainsi, réalisé les premiers étalements de cellules végétales en boîte de pétri. Cette méthode a été depuis très largement utilisée car elle permet l'obtention commode de colonies cellulaires répiquables après un délai de croissance variant de un à deux mois. Pendant la culture, les cellules peuvent être observées au travers des parois de la boîte pourvu qu'elles soient incluses dans une couche de milieu gélosé suffisamment mince.

3-3-Les cultures en milieu liquide agité

C'est la technique la plus simple et la plus efficace pour cultiver de grandes quantités de cellules végétales. On peut aisément réaliser des cultures variant de 10 à 2000 ml sur une simple table d'agitation à vitesse réglable.

Les cellules sontensemencées à une concentration déterminée. La croissance cellulaire est suivie au moyen de prélèvements de parties aliquotes.

Les valeurs caractéristiques de la croissance les plus couramment mesurées sont le nombre de cellules et le volume sédimenté par millilitre; les poids frais et sec ramenés au volume ou au nombre de cellules.

Le dénombrement de cellules produites dans les cultures exige que soient dissociées les colonies cellulaires qui se forment à partir des cellules libres. On utilise le plus souvent une solution d'oxyde de chrome (CrO_3) qui tue les cellules et dissout leur lamelle moyenne (JULIEN, 1980)

B-Matériel végétal : Lantana camara

1-Classification

La corbeille d'or ou *Lantana camara* a été introduite à Madagascar comme plante ornementale (ANDRIANAIVO, 1999) .

Sa classification botanique se présente comme suit:

REGNE	:VEGETAUX
EMBRANCHEMENT	: SPERMAPHYTES
SOUS-EMBRANCHEMENT	: ANGIOSPERMES
CLASSE	: DICOTYLEDONES
SOUS-CLASSE	: GAMETOPETALES
ORDRE	: PERSONALES
FAMILLE	: VERBENACEAE
Genre	: <i>Lantana</i>
Espèce	: <i>camara</i>

Le nombre de sous-espèce de *L. camara* est mal défini. D' après PIERI BATTESTI (1982) , il y a deux groupes dans l'espèce.

- **groupe A** : la corolle est jaune avec une gorge jaune d'or. Elle devient rose violacée claire à la périphérie et rose violacée plus sombre au centre sur les fleurs âgées.

(Photo 1)

- **groupe B** : l'anthere et la corolle, d'un jaune soutenue uniforme, virent à un orangé profond pour les fleurs âgées. (Photo 2)

L'existence de ces formes est contredite par certains auteurs. Ainsi, d'après SAMYN (1999), les fleurs sont de couleur rose violacée et se décolorent en jaune orangée en vieillissant. Par ailleurs, SALEH (1974) a étudié cinq variétés de *L. camara* : *aculeata*, *hybrida*, *flavia*, *nivéa*, et *mista*.

Les noms utilisés pour *L. camara* à Madagascar varient suivant les régions. Les différents noms vernaculaires employés sont donnés dans le tableau 1, tandis que le tableau 2 présente les noms étrangers.

Tableau 1 : noms vernaculaires malagasy

Ethnie	Noms vernaculaires
Merina	Voamasonomby, Taindelontsinoa
Betsileo	Fotatra, Radreka, Felamena ,Felanjirika, Radredreka
Antemoro	Rajejeka, Rajejika
Zafimaniry	Radredreka
Antesaka	Ramity
Bezanozano	Radriaka
Betsimisaraka	Fankatavinakoho

Tableau 2 : noms vernaculaires étrangers

Ile de la Réunion	Corbeille d'or, Thé de gambie, Galabar
Ile Maurice et France	Corbeille d'or
Angleterre	Golden basket
Allemagne	Wandellröschen

2-Description botanique

L. camara est un arbrisseau à moitié grimpant ou à port de vigne, atteignant parfois 3 m. Il possède des tiges, branches et branchettes portant des piquants apparents, volumineux et recourbés (HUMBERT, 1956).

2-1-Appareil végétatif

L'appareil végétatif est constitué de tiges et de rameaux secondaires quadrangulaires, plus ou moins glabres, volumineux et recourbés. Les feuilles sont simples, opposées et décussées. Elles présentent une forme ovale à ovale-oblongue. Elles sont aiguës ou courtement acuminées, presque lancéolées (2-12 cm de long) et dentées régulièrement. La base est brusquement rétrécie ou arrondie. Le limbe des feuilles est papyracé. La face supérieure est plus ou moins réticulée, rugueuse et nettement scabre. La face inférieure est bullée, plus ou moins densément pubescente. La pubescence est courte, et plus souvent sur les nervures existent des poils blanchâtres ou brunâtres.(Photo 1 et 2)

2-2-Appareil reproducteur

Les inflorescences sont axillaires, en pannicule capitée, dense et courte. Elles égalent les feuilles sous-jacentes ou elles sont plus longues (longueur de 2-8 cm, largeur de 2 cm) . Elles sont hémisphériques, constituées de 30 à 50 petites fleurs. Les bractéoles sont oblongues à lancéolés, d'une longueur de 4-7 mm et d'une largeur de 1-1,5 mm. Elles sont égales et ont des poils opprimés dont la longueur est généralement la moitié de celle du tube de la corolle. Les étamines sont insérées sur un tube à deux niveaux différents. La floraison et la fructification durent toute l'année. Les drupes ont une couleur variante : du noir ou bleu noir au bleu profond avec un diamètre d'environ 3 mm.

L. camara est très largement répandu en Amérique tropicale et subtropicale (de la Floride et du Mexique jusqu'au nord de l'Argentine). Il a été introduit en Espagne, à Madagascar, aux îles Seychelles, aux îles du Pacifique et en Asie (PERRIER DE LA BATHIE, 1933).

A Madagascar, cette espèce, très nouvellement introduite, a envahi la région de Maroantsetra et tout le bassin du Mangoro sur plus de cent mille hectares. Elle y couvre rapidement les savoka, dont elle tue la végétation, mais ne pénètre pas dans les formations autochtones vierges. Les sols riches et humides cultivables de la région, sont particulièrement envahies par cette plante. Sur les collines sèches, *Lantana* disparaît heureusement devant les feux de prairie. Cet arbuste est une de ces plantes à croissance rapide qui, dans les pays d'origine servent à la régénération des formations forestières brusquement et violemment détruites (PERRIER DE LA BATHIE, 1933).



Photo 1 : *L. camara* à fleurs rose violacées (groupe A)



Photo 2 : *L. camara* à fleurs jaune orangées (groupe B)

3-Composition chimique des huiles essentielles de *L. camara*

Quantitativement, les teneurs en huile essentielle sont plutôt faibles, souvent inférieures à 10 ml/kg. Des teneurs fortes comme celle du bouton floral du giroflier (150 ml/kg et plus dans la drogue sèche) sont exceptionnelles (BRUNCTON, 1999).

En 1974, SALEH et coll ont analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) 5 variétés de *L. camara* d'Egypte : Ils ont trouvé 32 composants dans la variété aculeata et la variété hybrida, et respectivement 31, 29 et 2 pour les variétés flava, nivea et mista. Le constituant majoritaire est le citral pour les 5 variétés avec des composants importants comme le β -phellandrène et le géraniol

En 1975, LOPES et coll ont montré que le γ -humulène est le composant majeur de l'huile essentielle de *L. camara*.

PIERI BATTESTI, en 1982, a montré qu'il y a 3 formes d'huiles essentielles de *L. camara* :

- L'huile essentielle forme « normale » riche en davanone (10 % à 15 %)
- L'huile essentielle forme « orange » sans davanone
- L'huile essentielle forme « intermédiaire » .

Les composants chimiques principaux de l'huile essentielle du *L. camara* sont : le β -caryophyllène, le davanone, le sabinène, le β -bisabolène, le germacrène-D, le linalol, le 1,8-cinéole, le γ -terpinéol et le δ -élémane. Toutefois, les avis divergent quant aux constituants majeurs.

Le groupe A, correspondant au *Lantana camara* à fleurs rose violacé, est caractérisé par une forte teneur relative en davanone (22,94 %), en linalol (5,03 %), 1,8-cinéol (3,90%), en γ -muurolène (1,46%), et en epi-cubénol (0,2%).

Le groupe B correspond au *Lantana camara* à fleurs jaune-orangé. Il est caractérisé par une forte teneur relative en β -caryophyllène (30,85%), en β -bisabolène (14,68%) et en δ -élémane (0,85%).

En 1997, MOLLENBECK et coll ont fait l'étude de la composition chimique et l'analyse de l'huile essentielle de *L. camara* de Madagascar. L'analyse montre 3 composants majeurs dont le β -caryophyllène (19 %) , un sesquiterpène inconnu (16 %) et le Δ^3 -carène (10 %) (figure 2) et 19 composants mineurs. Le davanone est absente dans cet échantillon.

En 1999, NGASSOUN et coll ont comparé les huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *L. camara* du Cameroun et de Madagascar. Ces huiles essentielles sont toutes les

deux caractérisées par une teneur élevée en sesquiterpènes : Pour le Cameroun, les composants principaux sont l' α -curcumène (25 %), le β -caryophyllène (13 %) (figure 1) et l'époxyde de caryophyllène (7 %). Pour Madagascar, le davanone (15 %) et β -caryophyllène (12%) sont prépondérants. Les monoterpènes sont en faible quantité : pour les deux huiles essentielles, le sabinène (1%-9%), le γ -pinène (2% -4%), le linalol (1%-3%) et le 1,8-cinéole (1%-3%).

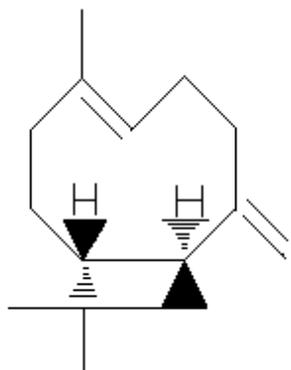


Figure 1: Structure chimique de β -caryophyllène

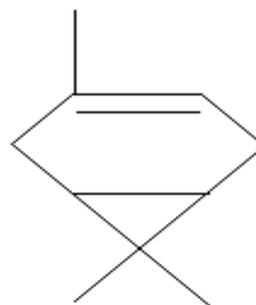


Figure 2: Structure chimique de Δ^3 -carène

4-Les utilisations de *L. camara* (ANDRIANAIVO, 1999)

a) Utilisations médicinales

L'huile essentielle de *L. camara* a la réputation de faire céder les accès de paludisme les plus rebelles, même à la quinine. Elle possède des propriétés stimulantes, laxatives et antisyphilitiques.

Les feuilles contiennent de la lantanine, une substance proche de la quinine. Elles sont utilisées pour la prévention de la toux et de la fièvre. Le suc d'expression des feuilles est aussi employé pour la cicatrisation des plaies. La feuille pilée est conseillée pour le traitement des caries dentaires. De plus, elle a des propriétés antalgiques, astringente, tonifiante, hémostatique, désinfectante, antiseptique.

Les tiges possèdent des principes actifs, ayant comme propriété de faire baisser la tension artérielle.

Les racines, outre leur action fébrifuge, ont une action tonique. Elles sont préconisées contre les maux d'estomac et contre les coliques. Elles sont aussi utilisées comme désintoxiquant. L'infusion de racines est plus efficace que la quinine sur les accès palustres.

Les extraits aqueux des feuilles, des racines et des tiges ont été testés positifs pour des activités antibiotiques vis à vis de bacilles gram (-) et gram (+) .

En préparation aqueuse, les inflorescences ont des vertus anti-asthmatiques et calmantes dans les crises de suffocation.

Par contre, chez l'enfant, *L. camara* présente une certaine toxicité. En plus, une expérience alimentaire a montré que la plante provoque une photosensibilisation et des troubles gastro-intestinaux.

b) Autres utilisations

L. camara est employé comme plante ornementale parce que ses fleurs ont des couleurs variées (blanche, jaune, orange, rose, rouge, violette, mauve) et sont mellifères.

Il est utilisé également dans la parfumerie, dans la composition des lotions de toilette et d'autres produits cosmétiques.

C- Application des cultures de cellules végétales

1-Multiplication végétative

L'utilisation de cellules séparées, en particulier de cellules foliaires comme point de départ d'une multiplication végétative se révèle prometteuse. Mais il faut être conscient des risques de plantes non conformes, risques qui varient beaucoup avec les espèces.

2-Amélioration des plantes

Les cultures de cellules offrent de larges possibilités dans le domaine de l'amélioration des plantes. Elles permettent de manipuler de grandes populations cellulaires qui constituent un matériel de choix pour la production et la sélection de mutants ou variants. En effet, toute cellule séparée portant une mutation (spontanée ou induite) donne une colonie de cellules mutées qu'il est théoriquement possible de cultiver sans risque de mélange avec des cellules

sauvages jusqu'à lui faire produire une plante complète fertile qui pourra transmettre la mutation par voie sexuée.

3-La biotechnologie et les cultures de cellules végétales

3-1-Production de métabolites secondaires par les cultures de cellule

Les cultures de tissus ou de cellules contiennent le plus souvent moins de métabolites secondaires que la plante mère. Mais, au moins dans quelques cas, les cultures de cellules fournissent spontanément des teneurs en métabolites secondaires supérieures à celles de la plante (ZENK, 1978) . Les suspensions cellulaires issues de *Coleus blumei*, par exemple, contiennent cinq fois plus d'acide rosmarinique que la plante. Le choix du milieu de culture, sa composition, en particulier la quantité de sucre fournie et la nature des auxines incorporées, peuvent grandement influencer la croissance des suspensions.

En général, un choix judicieux du milieu de culture permet des productions *in vitro* au moins égales à celles de la plante cultivée dans un milieu favorable. Certaines souches cellulaires produisent, dès leur obtention, les composés spécifiques recherchés et toutes les cellules en sont productrices.

Toutefois, l'obtention spontanée de cultures à haut potentiel de production demeure un événement relativement rare. Le plus souvent les premières cultures établies produisent peu de métabolites secondaires, mais offrent par contre une bonne illustration de l'hétérogénéité déjà signalée des suspensions cellulaires d'origine secondaire.

3-2-Les biotransformations réalisées par les cultures de cellules

Les cultures de cellules végétales sont également capables de réaliser *in vitro* la modification chimique de composés naturels ou artificiels qui leur sont fournis. Ces processus sont appelés biotransformations et comprennent une large gamme de réactions chimiques : glycosylation, hydroxylation, hydrogénation ou déshydrogénation, addition d'atomes de carbone, ouverture de cycle.

Pour les biotransformations, comme pour la production de métabolites secondaires, l'obtention de bons rendements est souvent dépendante de la sélection et de la purification de souches à hautes capacités.

Les techniques de culture *in vitro* d'explants végétaux représentent un très bon outil de travail en biotechnologie. Elles ont rapidement trouvé des utilisations pratiques à partir du moment où ont été obtenues des plantules en tube qui pouvant être acclimatées sur un substrat et un environnement normal.

Chronologiquement, c'est la culture de méristème qui est à l'origine des premières applications de culture *in vitro* dans le but de produire des plantes saines. Les recherches actuelles visent à faire produire des composés particuliers (de nature aromatique ou médicinale) par des cellules plutôt que de les extraire de la plante entière.

Cette partie concerne la production de cals de *L. camara* par la mise en culture *in vitro* de microboutures, de fragments de feuilles et d'apex caulinaires sur un milieu nutritif artificiel.

Les étapes suivies sont :

- l'établissement de cultures aseptiques par la mise en culture *in vitro* de microboutures.
- la production de cals par la mise en culture des explants
- le transfert des cals sur le milieu de multiplication

A-Matériels

1-Matériel végétal

Les explants utilisés sont issus de boutures installées dans une serre de FOFIFA d'Ambatobe et n'ayant subi aucun traitement sanitaire préalable.

2-Milieus de culture

Les cultures de tissus se sont développées grâce à la mise au point de milieux nutritifs de mieux en mieux adaptés. Ces milieux sont constitués de sels (macroéléments, microéléments), d'une source de carbone et éventuellement de vitamines et de régulateur de croissance.

2-1-Milieux de base

2-1-1-Macroéléments

Il existe deux catégories de macroéléments : les éléments métalliques ou métaux, qui ont en commun un ensemble de propriétés physiques et chimiques. Les éléments métalliques sont absorbés sous forme de cations : K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , et ils interviennent dans la cellule sous forme libre ou complexée. et les éléments non métalliques ou métalloïdes. Parmi les macroéléments, le potassium, le sodium, le calcium et le magnésium, appartiennent à la première catégorie : l'azote, le phosphore, le soufre, le chlore, et le silicium à la seconde. Les éléments non métalliques sont présents généralement sous forme d'anions.

2-1-2-Oligo-éléments

Les oligo-éléments interviennent à des concentrations de l'ordre de quelques milligrammes par litre : fer, cuivre, molybdène, manganèse, zinc, bore, cobalt, nickel et aluminium.

2-1-3-Vitamines

Les vitamines favorisent le développement des plantes *in vitro*. En général, les vitamines du groupe B (thiamine, biotine, myo-inositol, pyridoxine) sont indispensables car les cellules végétales *in vitro* sont incapables de les synthétiser. Elles sont utilisées à des doses très faibles.

2-2-Composition des milieux de base

Le milieu de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG (MS) (1962) (tableau 3) . Ce milieu a été mis au point pour la croissance optimale de cals de tabacs. Nous avons également utilisé le milieu mis au point par GRESSHOFF et DOY (GD) (1974) pour la culture de tissus de tomates (tableau 4).

Tableau 3 : Composition du milieu Murashige Skoog (MS)

Macroéléments (sels)	Quantité (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650,00
KNO ₃	1900,00
CaCl ₂ , 2H ₂ O	332,02
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370,00
KH ₂ PO ₄	170,00
Oligoéléments (sels)	Quantité (mg/l)
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ , 4H ₂ O	16,90
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
FeNa-EDTA	36,0
Suppléments organiques (Vitamines)	Quantité (mg/l)
Glycine	2,00
Myo-inositol	100,00
Acide nicotinique	0,50
Pyridoxine-HCl	0,50
Thiamine-HCl	0,10
Saccharose	40 g/l
pH	5,7
Agar	7-10 g/l

Tableau 4 : Composition du milieu GREYSSHOFF et DOY (GD)

Macroéléments (sels)	Quantité (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1000,00
KNO ₃	1000,00
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	347,00
MgSO ₄	17,09
KH ₂ PO ₄	300,00
KCl	65,00
Oligoéléments (sels)	Quantité (mg/l)
KI	0,80
H ₃ BO ₃	0,30
MnSO ₄ , H ₂ O	1,00
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,30
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
FeNa-EDTA	36,70
Suppléments organiques (Vitamines)	Quantité (mg/l)
Glycine	4,00
Acide nicotinique	1,00
Myo-inositol	100,00
Pyridoxine H Cl	1,00
Thiamine H Cl	10,00
Saccharose	60 g/l
pH	5,7
Agar	7-10 g/l

2-3-Préparation des milieux

2-3-1-Solutions-mères

Les solutions sont préparées sous forme concentrée (solutions mères) :

Les macroéléments sont concentrés 10 fois:

- Une solution-mère de sels de calcium, concentrée 10 fois, est préparée à part pour éviter les précipitations.

Les oligo-éléments sont concentrés 1000 fois:

- Le chélate de fer Fe-EDTA, à 20 mM, est préparé à part, pour éviter les précipitations.

Les vitamines du groupe B sont concentrées 1000 fois; sauf le myo-inositol qui est préparé extemporanément.

2-3-2-Source de carbone

Du fait de la faible assimilation photosynthétique en culture *in vitro*, les explants sont hétérotrophes et ils ont besoin d'une source de carbone. Le saccharose est la source de carbone la plus efficace et est un élément indispensable au métabolisme selon le type du milieu (GAUTHERET, 1959) bien que d'autres sucres aient montré des effets favorables. On apporte du saccharose de l'ordre de 20 à 60 g/l.

2-3-3-Gélification du milieu

L'intérêt de gélifier le milieu avec de l'agar est de constituer un complexe colloïdal laissant circuler les ions. Par contre, le problème majeur est une aération insuffisante du milieu, néfaste à la croissance de certains tissus (DEMARLY,1988). La concentration de l'agar est variable suivant la pureté du produit et de l'objectif de la culture (en moyenne de 7 à 10 g/l) .

2-4-Stérilisation du milieu

La stérilisation des milieux de culture et de la verrerie sont effectuées par autoclavage à une température de 120°C pendant 20 min sous une pression de 1 bar.

2-5-Hormones végétales

Les hormones sont définies comme étant des composés chimiques agissant à distance, à très faible dose, en réponse à une situation interne (corrélation bourgeon-bourgeon) ou à un stimulus externe (photopériode, thermopériode, stress...) . Elles peuvent, chacune indépendamment, contrôler plusieurs facteurs (dominance apicale, dormance, croissance) . Leur association peut être indispensable pour agir sur un facteur déterminé (CHAUSSAT,1983). Les hormones végétales les mieux connues à l'heure actuelle sont les auxines, les cytokinines, la gibbéreline, l'acide abscissique, l'éthylène et très récemment les oligosaccharides. Les auxines et les cytokinines sont les plus couramment employées en culture *in vitro*.

Dans notre cas, les auxines employées sont :

- l'AIA (acide indolyl acétique) (figure 4) qui, naturellement synthétisé par les plantes, peut être obtenu par synthèse. Il est parfois le seul à pouvoir être utilisé sans risque,

- l'AIB (acide indolyl butyrique) (figure 3) qui manifeste une action soutenue sans risques de détériorer le système aérien des organes bouturés,

- le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) (figure 5) qui fait partie des auxines de synthèse.

Les auxines interviennent dans les phénomènes de la croissance à la fois en favorisant le grandissement cellulaire ou auxèse au niveau des entre-nœuds jeunes, mais aussi en stimulant les mitoses. L'acide indolyl acétique peut être un des éléments intervenant dans l'inhibition de croissance imposée aux bourgeons axillaires par le bourgeon apical d'une pousse herbacée (dominance apicale). De même, l'auxine synthétisée dans l'apex et distribuée dans l'ensemble de la plante pourrait être avec celle fabriquée dans les feuilles ou les fruits, un des éléments régulateurs de l'abscission (CHAUSSAT, 1983).

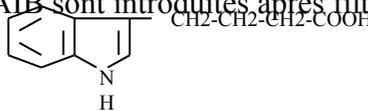
Parmi les cytokinines nous avons utilisé :

- la kinétine (6-furfuryl aminopurine) (figure 6) qui est utilisée à très faible dose (10^{-10} mg/ml),

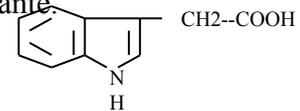
- le BAP (benzylaminopurine) (figure 7) qui, cytokinine de synthèse, est le plus utilisé en culture *in vitro*.

Les cytokinines, *in vitro*, interviennent dans la régulation de l'activité mitotique en étroite relation avec l'auxine. Cette propriété est exploitée dans les cultures des tissus ou de cellules isolées. Elles interviennent également dans des processus tels que la cicatrisation des blessures, le grossissement des tubercules et des fruits. Les cytokinines lèvent la dominance exercée par le bourgeon apical sur les méristèmes axillaires. Elles stimulent l'organogenèse ainsi que les effets "antisénescences".

Les auxines sont pré-dissout dans de faibles quantités de méthanol ou éthanol (96°). La kinétine et le BAP sont pré-dissout dans quelques gouttes de Na OH. Les cytokinines et l'AIA résistent bien à l'autoclavage (CHAUSSAT, 1980). Par contre, certaines hormones comme le 2,4-D, et l'AIB sont introduites après filtration stérilisante.

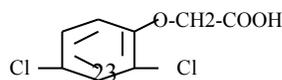


AIB



AIA

LES AUXINES



2.4-D

Figure 3: AIB

Figure 4: AIA

Figure 5: 2,4-D

LES CYTOKININES

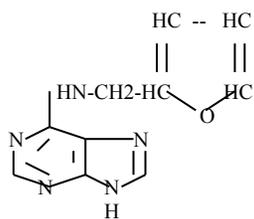


Figure 6: Kinétine

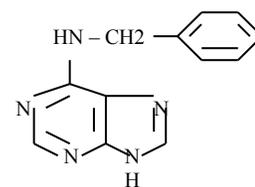


Figure 7: BAP

2-7-Conditionnement du milieu de culture

Le milieu est coulé sous hotte dans des tubes ou des boîtes de pétri. Après solidification du milieu, les récipients sont scellés à l'aide de film alimentaire pour éviter qu'ils ne soient trop exposés aux germes de l'atmosphère et à la dessiccation.

B-Méthodes de culture

1-Méthodes expérimentales

Toutes les manipulations doivent être effectuées en milieu aseptique pour éviter la contamination des cultures. Tous les matériels : récipients, instruments, milieu de culture doivent être soigneusement stérilisés. Les explants quant à eux sont désinfectés par des produits appropriés. Lorsque les explants sont en culture, les principaux facteurs de l'environnement sont: la température, la lumière et le degré hygrométrique. Dans notre cas, la température est de 25 °C, la photopériode de 12 h, le degré hygrométrique est celui du milieu ambiant.

2-Multiplication par microbouturage

Cette technique demeure la méthode la plus utilisée et la plus sûre pour éviter l'apparition de "variants" et assurer la reproduction de "copies conformes" (MARGARA, 1989) . Des boutures à un nœud de *L. camara* avec un bourgeon axillaire sont mises en culture sur un milieu solide comportant des hormones végétales. Le repiquage sur une séquence de milieu de culture est nécessaire suivant le but à atteindre (multiplication ou rhizogène) (MONTEUUIS, 1985) .

2-1-Stérilisation des explants

Les explants doivent être indemnes de toutes sortes de contaminations que ce soit bactérien ou fongique. Les expérimentations nécessitent une maîtrise de la stérilisation dont la technique est basée sur la combinaison de différents stérilisants à différents temps de trempage selon le cas (RAHELIVOLOLONA, 1999) .

Toutes les manipulations s'effectuent dans des conditions de stérilité absolue. Trois méthodes de stérilisations sont utilisées : les deux premiers consistent en l'usage de l'hypochlorite de sodium ou de la bichlorure de mercure uniquement tandis que le troisième

consiste en l'usage successif des deux stérilisants (figure 8). La littérature conseille d'utiliser le bichlorure de mercure à concentration très faible de 0,01 à 0.05% pour tuer les microorganismes fongiques et bactériens (BOCCON-GIBOD, 1989) . Nous avons utilisé une solution à 1‰ (P/V) .

2-1-1-Stérilisation à l'hypochlorite de sodium

Les explants sont stérilisés par trempage dans une solution d'eau de javel 10° additionnée de quelques gouttes de tween 80 pendant 15 min sous agitation, puis rincés à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 5 min. Le tween 80 est un détergeant non ionique, qui sert d'agent mouillant pour que la solution désinfectante pénètre plus profondément dans l'explant

2-1-2-Stérilisation au bichlorure de mercure

Après trempage des explants dans de l'eau distillée sous agitation, les explants sont mis dans la solution de bichlorure de mercure 1‰ pendant 2 min puis rincés à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 5 min.

2-1-3-Combinaison des deux agents stérilisants

Les explants stérilisés à l'hypochlorite de sodium sont rincés puis traités au bichlorure de mercure comme précédemment.

Le figure ci-après montre les trois procédés de stérilisation des explants.

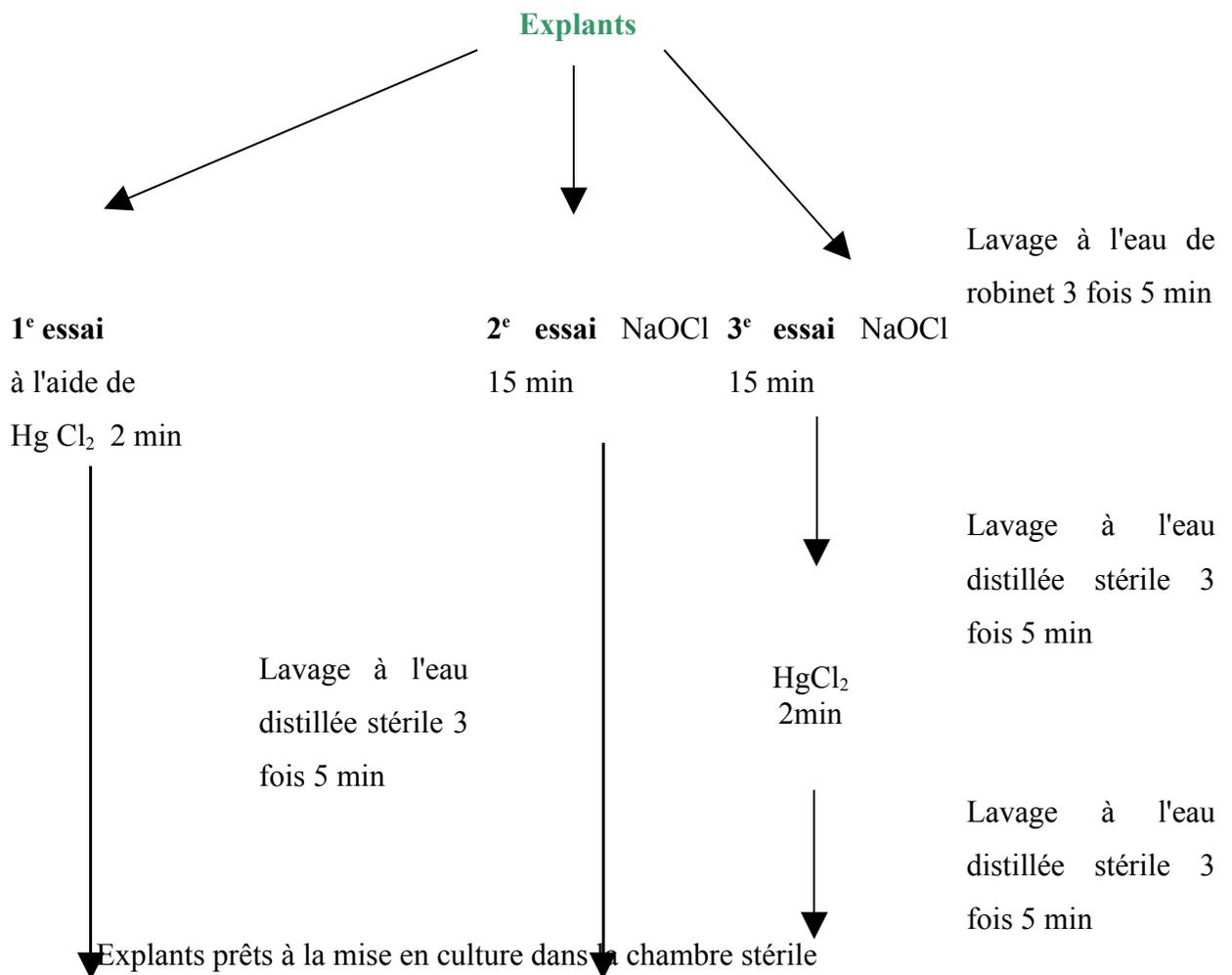


Figure 8 : Schéma récapitulatif des procédés de stérilisation

2-2-Mise en culture

Les explants sont découpés au niveau de chaque nœud avec un bourgeon axillaire, débarrassés de leurs préfeuilles. Les nœuds sont installés sur le milieu de culture coulé dans des tubes. Ce milieu solidifié avec 10g/l d'agar est constitué des éléments de base de MS, de 40 g de saccharose, des hormones végétales. Les microboutures sont placés dans une chambre de culture avec une photopériode de 12 h, à une température de 25 °C.

3-Callogenèse

L'embryogenèse somatique, par définition, est la production *in vitro* d'embryons comparables à ceux que renferment les graines, ce qui conduirait à la production de "semences artificielles".

On peut distinguer deux types d'embryogenèse somatique:

-l'embryogenèse somatique directe provient de cellules proembryogéniques.

-L'embryogenèse indirecte ou callogenèse qui nécessite la redifférenciation de cellules différenciées et le passage par un stade cal (SHARP et col, 1980) .

Les explants utilisés lors de l'induction de cals *in vitro* sont composés d'apex caulinaire et des feuilles. Ce matériel est prélevé sur les cultures aseptiques établies à partir des bourgeons.

3-1-Initiation de cals à partir de lobes de feuilles

Après un mois de culture des microboutures, des lobes de feuilles de deux variétés de *L. camara* (groupe A et groupe B) sont sectionnés et isolés. Les feuilles très jeunes (proche des bourgeons) sont fragmentées en petites portions et ensuite déposées, la face inférieure en contact avec le milieu contenant 40g/l de saccharose, de l'AIB (2 mg/l) et de la kinétine (8 mg/l). Les milieux supplémentés par AIB (1 mg/l) et par BAP (8 mg/l) ne sont utilisés que pour la variété du groupe A. Les fragments de feuilles contenus dans les boîtes de pétri sont placés dans une chambre de culture à 25° C avec une photopériode de 12 h

3-2-Initiation de cals à partir de méristèmes ou d'apex de tige

3-2-1-Rappel

Le terme " méristèmes" désigne un ensemble de cellules indifférenciées qui ont une capacité de division très élevée. Ils sont situés dans différents sites tels que les bourgeons apicaux, axillaires, racinaires et sont responsables de la croissance en longueur des tiges et racines (méristèmes apicaux). Dans le cas de la culture de méristèmes, seuls les méristèmes caulinaires, situés à l'extrémité des tiges, sont utilisés.

L'expression "culture de méristèmes", généralement employée, est le plus souvent inexacte, car l'explant mis en culture n'est presque jamais le méristème seul. Il est donc préférable, en règle générale, de parler de "culture d'apex", le terme "apex" désignant sans précision l'extrémité de la tige.

3-2-2-Mise en culture

Sur les microboutures mis en culture dans les tubes, quelques fragments de rameau sont prélevés avec le bourgeon terminal à l'aide d'une lame stérile. Les feuilles épanouies sont ôtées. Le dégagement des méristèmes se fait sous loupe binoculaire en enlevant une à une les

dernières ébauches de feuilles. Il se présente généralement sous forme d'un petit dôme très brillant. On le prélève sur la pointe d'une aiguille et on le met immédiatement en culture sur milieu gélosé contenant 40 g / l de saccharose, 1mg / l de l'AIB et 2mg / l de BAP .

Les cultures sont placées dans une chambre de culture sous une photopériode de 12 h à une température de 25°C. Toutes les opérations précitées doivent se faire rapidement afin d'éviter le dessèchement du méristème.

3-2-3-Transfert des cals sur milieu de maturation GD6

Après l'initiation des cals à partir de lobes de feuilles sur un milieu d'induction, les cals formés sont fragmentés et repiqués sur milieu GD6. Ce dernier est riche en élément carboné (60 g/l de saccharose) et potassique.

3-2-4-Evaluation des traitements

Des observations hebdomadaires sont effectuées régulièrement pour relever la contamination au niveau de chaque tube ou bocal. Le pourcentage de contamination est évalué en dénombrant les explants contaminés. Les paramètres biologiques tels que : verdissement, augmentation de taille, apparition de bourgeons, apparition de cals sont soigneusement notées.

C-RESULTATS ET DISCUSSIONS

1-Stérilisation des explants

Les résultats sont consignés dans le tableau 5

Tableau 5 : Résultats de la stérilisation

	Numéro d'essai	1^{er} essai	2^{ème} essai	3^{ème} essai	
Traitement 1	Agent stérilisant	Hgcl ₂	NaOCl	NaOCl	
	Durée	2 min	15 min	15 min	
Traitement 2	Agent stérilisant			HgCl ₂	
	Durée			2 min	
Résultats	Nombre de culture préparée	20	20	20	
	Nombre de culture aseptique obtenue après	2 jours	11	14	20
		7 jours	5	11	18
		15 jours	3	6	15
		un mois	1	4	12

Les chiffres indiquent le nombre de culture non contaminée après quelques jours de la mise en culture des explants.

Les résultats de la stérilisation indiquent que l'hypochlorite de sodium est plus efficace que le bichlorure de mercure s'ils sont utilisés séparément. Mais signalons que le traitement à l'hypochlorite de sodium à un temps de trempage prolongé ou au-delà de 15 min fait brunir les explants et les laisse mourir. Ce qui indique que l'hypochlorite de sodium pourrait être absorbé à l'intérieur de cellules et devient toxique (BOCCON-GIBOD, 1989).

L'utilisation combinée de l'hypochlorite de sodium et du bichlorure de mercure permet d'obtenir un taux élevé de cultures aseptiques. Nous avons retenu cette méthode pour la suite de nos expérimentations.

La technique de la vitropropagation part généralement de nombre restreint d'explants stériles pour les multiplier à une vitesse très élevée. La sauvegarde d'un nombre restreint d'explant sain est alors suffisant pour démarrer une multiplication à grande échelle du matériel.

Après 2 jours de mise en culture des microboutures, des bourgeons de 1 mm apparaissent sur le milieu contenant de l'AIB (0,2 ou 0,6 mg/l) et de la kinétine (0,1 ou 6 mg/l) (photo 6 et 7). Après 13 jours ces bourgeons atteignent 2 cm de longueur. Ce résultat indique que la néoformation de bourgeons est déjà favorisée par de faible teneur en cytokinine.

Les microboutures, cultivés sur le milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG avec seulement du 2,4-D (8 mg/l) produisent d'abondantes néoformations. Ce sont des proliférations correspondant des cals compacts et de couleur marron formé à partir des aisselles des nœuds (photo 10). Ces résultats rejoignent ceux de GAUTHERET (1959) sur les tissus de carotte et de SOFIARI (1996) chez le manioc.

2-Production des cals à partir de lobes de feuilles

Les résultats de l'induction de la callogenèse sur *L. camara* du groupe A et B sont consignés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Initiation de cals, à partir de fragments de feuilles de *L. camara* du groupe A et B

Explants	Nombre de culture	Milieu de culture	Résultats	Début de la callogenèse	Vitesse de multiplication du cal	Couleur du cal
Fragments de feuilles du groupe A	40	MS4+AIB (2 mg/l) + kinétine(8mg/l)	Explants présentant une forte callogenèse	2 jours	rapide	Blanche verdâtre
Fragments de feuilles du groupe A	40	MS4+AIB (1mg/l)+ BAP (8 mg/l)	Callogenèse moyenne	4 jours	lente	Blanche verdâtre
Fragments de feuilles du groupe B	55	MS4+AIB (2mg/l)+ kinétine (8mg/l)	Explants présentant une forte callogenèse	2 jours	rapide	Blanche verdâtre

Les fragments foliaires restent toujours verts tout au long de l'expérience. Ces observations montrent l'effet anti-sénescence du cytokinine.

Au bout de 6 jours de culture, de petits amas cellulaires blancs verdâtres apparaissent le long des nervures des jeunes lobes de feuilles sur les deux variétés de *L. camara*. Les fragments de feuilles des groupes A et B cultivés sur un milieu MS additionné de AIB (2 mg/l) et de la kinétine (8 mg/l) présentent des cals de 1 à 2 mm de diamètre après 6 jours de culture (photo 3) . Respectivement, cette dimension n'est atteinte qu'au bout de 21 jours pour le groupe B sur le milieu MS4 additionné de 1 mg/l d'AIB et de 8 mg/l de BAP (photo 4).

L'usage de la kinétine est plus favorable à la callogenèse que celui de BAP. Les auxines et les cytokinines sont utilisées ensembles puisqu'en association avec les auxines, les cytokinines interviennent dans la régulation de l'activité mitotique.

Durant l'expérimentation, cette propriété est alors exploitée dans les cultures des tissus ou de cellules isolées ; c'est le cas de notre expérience.

Dans le cas de la culture des tissus de moëlle de tabac, on obtient la formation d'un cal très important présentant des divisions cellulaires nombreuses en y ajoutant une base purique (soit kinétine, soit BAP) alors que l'AIB, seul, ne permet qu'un simple grandissement cellulaire et que l'adénine provenant du cytokinine sans AIB ne donne aucune croissance.

D'après nos résultats, on n'observe plus de zones méristématiques alors que les cals de carotte initiés sur un milieu d'induction contenant de l'auxine (2,4-D à 1 mg/l) et riche en azote présentent de zones méristématiques différenciées au bout d'un certain temps (AUGE, BOCCON-GIBOD, 1989) .

3-Production de cals à partir de l'apex de tige

Le tableau 7 résume les résultats de l'induction de la callogenèse à partir de l'apex des tiges

Tableau 7 : Initiation de cals à partir de l'apex de tige de *L. camara* du groupe A et B

Explants	Nombre de culture	Milieu	Résultats
Apex de tige du groupe A	8	MS4+AIB (1 mg/l)+kinétine (8 mg/l)	Forte callogenèse
Apex de tige du groupe B	8	MS4+AIB (1 mg/l)+kinétine (8 mg/l)	Forte callogenèse

L'apex de tige est cultivé dans un milieu MS contenant 40 g/l de saccharose. Pour ce type de culture, on utilise l'AIB (1 mg/l) et de la kinétine (2 mg/l) . Mais pour d'autres expériences réalisées avec le cultivar *Grant Indianapolis White*, l'induction du développement d'un cal sur milieu solide de Murashige et Skoog est en présence de 2 mg/l de kinétine et 0,02 mg / l d'ANA (CHAUSSAT, 1980) .

Au bout de 4 jours de culture, les méristèmes se développent et s'agrandissent progressivement et atteignent 5 mm de diamètre. Après 21 jours de culture, les cals formés mesurent de 12 mm de diamètre (photo 9), le milieu MS4 additionné de 1 mg/l AIB et de 8

mg/l de kinétine est donc favorable à la formation de cals à partir de l'apex de tige de *L. camara*

Les méristèmes de la plupart des monocotylédones et dicotylédones ont besoin de milieux spéciaux qu'il faut déterminer par tâtonnement car un milieu favorable à une espèce ne convient pas forcément à une autre, même très voisine. Il peut également y avoir des différences considérables de réponses entre variétés ou cultivars (GAUTHERET, 1977) .

L'utilisation d'hormones est beaucoup plus délicate. Si l'addition de gibbérelline, à la concentration 10^{-6} ou 10^{-7} accélère presque toujours la différenciation du méristème en plantule, celle de molécules à action auxinique ou de kininique conduit à des réponses très variées. L'ANA ou le 2,4-D sont parfois nécessaires. La kinétine est souvent toxique ; il est préférable d'utiliser la benzyl adénine. L'addition d'auxines et de kinines est souvent favorable au cours des 3 ou 4 premières semaines de culture (GAUTHERET, 1977) .

4-Résultats du transfert des cals sur le milieu de maturation GD6

Les résultats sont donnés par le tableau 8.

Tableau 8 : Evolution des cals de *L. camara* sur le milieu de maturation GD6

Explants	Nombre de culture	Milieu	Vitesse de multiplication	Taille du cal	Couleur du cal
Cals obtenus sur MS4 +AIB (2 mg/l)+kinétine (8 mg/l)	10	GD6+AIB (2mg/l)+kinétine (8 mg/l)	rapide	grande	Verdâtre Blanchâtre Marron
Cals obtenus sur MS4+AIB (1 mg/l)+BAP(8mg/l)	10	GD6+AIB (2 mg/l)+kinétine (8mg/l)	rapide	grande	Verdâtre Blanchâtre marron

Après une semaine de culture sur milieu GD6, supplémentée par 2 mg/l d'AIB et 8 mg/l de kinétine, le diamètre est environ 5 mm. Au bout d'un mois environ, il atteint 1,5 cm de diamètre.

Les cals fragmentés se sont différenciés les uns des autres après plusieurs semaines de culture (photo 8). La différence porte sur l'aspect et la couleur des cals. Il existe des cals de couleur

blanche, un peu translucide de structure friable ; des cals marron qui ne s'agrandissent plus par rapport aux autres ; des cals de couleur blanc verdâtre.

Ces observations rejoignent celles de TAYLOR, en 1995, puisqu'il a identifié quatre types de tissus sur les cals induits au cours de l'embryogenèse primaire :

- des structures embryogéniques organisées en amas cellulaires dont la surface est lisse et le développement très poussé. Ces structures régénèrent des embryons somatiques.
- des structures friables, désorganisées, non embryogènes, constituées de cals translucides. Elles sont constituées de cellules à large vacuole et à croissance rapide.
- des cals de couleur marron avec des cellules vacuolées de différentes tailles.
- des cals friables embryogéniques dont les cellules sont formées par des embryoïdes globulaires de diamètre de 50 à 100 μm , de couleur blanchâtre ou jaune pâle dépendant du milieu d'induction de l'embryogenèse somatique.

5-Conclusion

D'après notre étude, la recombinaison de l'hypochlorite de sodium et du bichlorure de mercure est efficace pour l'obtention d'explants sains. La callogenèse, en utilisant les fragments de feuilles et l'apex caulinaire comme explant, est facile à obtenir. Les cals obtenus sont faciles à entretenir sur un milieu autre que le milieu d'initiation. Cette technique peut être améliorée en vue de produire en grande quantité des cals de cette plante.

Les photos ci-après illustrent les résultats de la production des cals ainsi que leur transfert sur un milieu neuf, de la mise en culture des microboutures.



Photo 3 : FRAGMENTS DE FEUILLES DE *L. CAMARA* DU **GROUPE A** CULTIVÉS SUR MS4 AVEC AIB (2 MG/L) ET KINÉTINE (8 MG/L) APRÈS 6 JOURS DE CULTURE



Photo 4 : FRAGMENTS DE FEUILLES DE *L. CAMARA* DU **GROUPE A** CULTIVÉS SUR MS4 AVEC AIB (1 MG/L) ET BAP (8 MG/L) APRÈS 21 JOURS DE CULTURE



Photo 5 : FRAGMENTS DE FEUILLES DE *L. CAMARA* DU **GROUPE B** CULTIVÉS SUR MS4 AVEC AIB (2 MG/L) ET KINÉTINE (8 MG/L)

GROUPE A : VARIÉTÉ À FLEUR ROSE VIOLACÉE

GROUPE B : VARIÉTÉ À FLEUR JAUNE-ORANGÉE



Photo 6 : MICROBOUTURES DE *L. CAMARA* SUR MS4 AVEC AIB (0,6 MG/L) ET KINÉTINE (6 MG/L) APRÈS 13 JOURS DE CULTURE



Photo 7 : MICROBOUTURES DE *L. CAMARA* SUR MS4 AVEC AIB (0,2 MG/L) ET KINÉTINE (0,1 MG/L)



Photo 8 : CALS TRANSFÉRÉS SUR GD6 AVEC AIB (2 MG/L) ET KINÉTINE (8 MG/L)

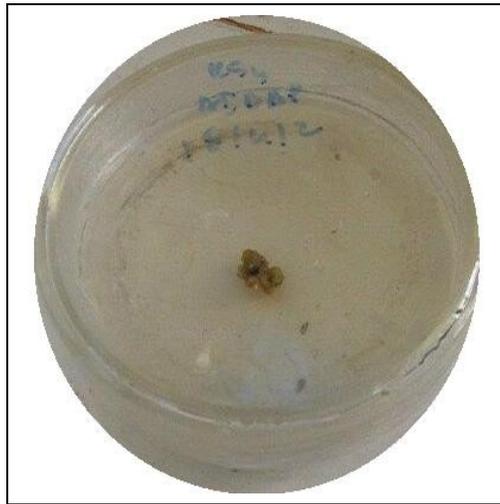


PHOTO 9 : CALS ISSUS DE L'APEX CAULINAIRE SUR MS4 AVEC AIB (1MG/L) ET KINÉTINE (2 MG/L)



PHOTO 10 : MICROBOUTURE PRÉSENTANT DES NÉOFORMATIONS SUR MS4 AVEC 8 MG/L DE 2,4 -D

Le dénombrement et la délimitation des sous espèces de *L. camara* restent flou à ce jour. L'utilisation de marqueurs moléculaires tels que RAPD, RFLP, AFLP ou microsatellites est un moyen très puissant pour déterminer le polymorphisme de l'espèce et de préciser le niveau de parenté des sous espèces et/ou variétés de *L. camara*.

Pour contribuer à la résolution de ces problèmes, il nous a paru pertinent d'aborder l'étude de l'ADN génomique de *L.camara* par son extraction et l'analyse de son profil de restriction.

D'autre part, des variations somaclonales peuvent apparaître tant dans les cultures de cals et de suspensions cellulaires que dans les tissus organisés de type méristème (WALBOT et CULLIS,1985).

A-Matériel

De très jeunes feuilles et des bourgeons de deux variétés de *L. camara* sont utilisées.

B-Méthodes

1-Préparation du phénol (SAMBROOK et col, 1989)

Le phénol cristallisé est fondu à 65 °C. De l'hydroxyquinoléine 0,1% est additionné. Ce composé est un antioxydant, un inhibiteur partiel des Rnases et un agent chélatant faible d'ions métalliques. De plus, sa couleur jaune permet d'identifier la phase organique. Un volume égal de Tris-HCl 0,5 M, pH 8 à température ambiante est ajouté. Le mélange est agité vigoureusement pendant 15 min. La phase aqueuse est retirée. Cette étape est répétée avec du Tris-HCl 0,1 M, pH 8, jusqu'à ce que le pH soit supérieur à 7,8. Lorsque le phénol est équilibré et que la phase aqueuse a été retirée, 1 volume de TE x 1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) est ajouté.

La solution de phénol/chloroforme est obtenue par addition d'un volume de chloroforme, après retrait de la phase aqueuse (WALLACE, 1987).

2-Extraction de l'ADN génomique de *L. camara*

La technique que nous avons retenue permet d'obtenir de l'ADN qui peut être utilisé pour des analyses de type RFLP, pour l'amplification par PCR ou la construction d'une banque génomique (CNRS, 1995) .

De très jeunes feuilles (1g environ) de *L. camara* sont broyées, au froid, dans un mortier avec du tampon d'extraction (annexe I) et en présence d'une petite quantité de sable fin. Après filtration à travers quatre épaisseurs de gaze, le broyat est centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. Le culot est remis en suspension dans du tampon d'extraction puis centrifugé comme précédemment. Cette étape est répétée jusqu'à l'obtention d'un culot blanc.

Le culot est repris dans un volume minimal de tampon d'extraction. De la protéinase K (10 mg/ml) et du SDS (30%) sont ajoutés. Le mélange est incubé à 50 °C pendant 3 h. Le SDS, un détergent ionique, favorise la dissociation des protéines et des acides nucléiques. L'ADN est alors libéré de sa gangue de chromatine sous l'action de la protéinase K qui est une protéase à large spectre. Un volume égale de phénol/chloroforme est ajouté. Le mélange s'effectue par inversion des tubes pour éviter les cassures mécaniques de l'ADN.

Après centrifugation à 13000 rpm, la phase aqueuse est récupérée. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une interphase propre. A un pH supérieur à 7,8 l'ADN se trouve dans la phase aqueuse. Il est préférable d'associer le phénol et chloroforme (V/V) pour réaliser l'extraction car la déprotéinisation est plus efficace lorsque deux solvants organiques sont employés en même temps. L'adjonction de chloroforme offre deux avantages : la haute densité du chloroforme améliore la séparation des phases et permet l'élimination des lipides. Par ailleurs, le phénol dénature efficacement les protéines mais n'inhibe pas complètement les Rnases. L'élimination des résidus de phénol dans la phase aqueuse se fait grâce à une extraction par un volume de chloroforme.

L'ADN est précipité, au froid (-20 °C), en présence de 2,5 volumes d'éthanol absolu et de 0,04 volume de NaCl 5 M. Après centrifugation (13000 rpm, 15 min), le culot d'ADN est lavé par de l'éthanol 70° puis recentrifugé. L'alcool étant éliminé, le culot est laissé sécher à l'air puis repris dans de l'eau distillée stérile.

3-Analyse de l'ADN en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode extrêmement puissante pour séparer des molécules d'acides nucléiques (OGDEN, ADAMS, 1987) . A un pH proche de la neutralité, l'ADN est chargé négativement et migre de la cathode vers l'anode avec une vitesse qui dépend essentiellement de sa taille. Des gels d'agarose non dénaturants sont utilisés pour des fragments entre 70 pb (3% d'agarose) et 800000pb (0,1% d'agarose) (annexe IV) .

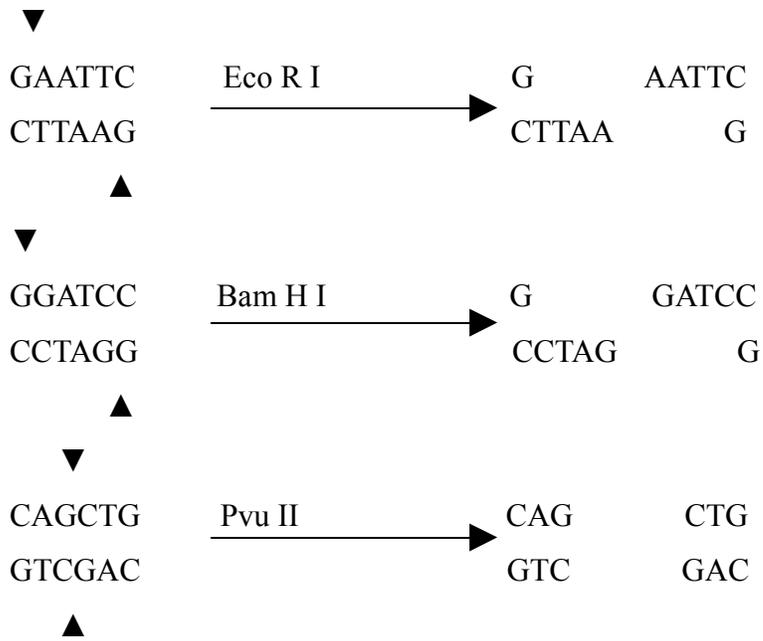
La séparation de fragments d'ADN est effectuée par électrophorèse horizontale dans un tampon TAE x 1 (annexe II). On fait fondre l'agarose, au bain-marie bouillant dans le tampon de migration. Avant de le couler dans le support d'électrophorèse, du BET (Bromure d'éthidium) est ajouté. Les molécules de BET s'intercalent entre les bases de l'ADN et grâce à leur propriété de fluorescer sous lumière UV, permettent de visualiser l'ADN. Les échantillons (10 µl) à analyser, additionnés de 2 µl de tampon de charge (annexe II), sont mis à migrer en même temps qu'un ADN marqueur de taille (1 kb ladder, allant de 75 à 12214 paires de bases).

4-Digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction

Les endonucléases de restriction utilisées sont d'origine commerciale. Les conditions expérimentales recommandées par le fabricant pour l'obtention d'une activité optimale ont été suivies. L'ADN phagique ou plasmidique est généralement digéré à raison d'une unité d'enzymes par µg d'ADN. Dans le cas d'ADN génomique nucléaire ou mitochondrial, 3 à 5 unités d'enzyme sont utilisées par µg d'ADN (CNRS, 1995).

Le choix de l'enzyme de restriction peut être lié à la connaissance de sites de restriction particuliers dans le gène d'intérêt, par exemple lorsqu'une séquence d'ADNc ou d'ADN génomique est disponible. Cependant, il convient de choisir des enzymes ne coupant pas trop fréquemment l'ADN, c'est à dire des enzymes dont les sites de reconnaissance comportant 6 nucléotides plutôt que 4. Toutefois, ce choix doit tenir compte d'une particularité du génome végétal, c'est à dire de son fort degré de méthylation (GRUENBAUN, NAVEH-MANY, CEDAR, RAZIN, 1981).

Les enzymes de restriction ont été découvertes dans diverses espèces bactériennes. Elles servent à dégrader tout ADN étranger qui aurait pénétré dans la cellule. Ces enzymes coupent les molécules d'ADN bicaténaires au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques caractérisées par une symétrie et une complémentarité (PROMEGA. C, 1996). Lors de notre étude, nous avons utilisé les enzymes de restriction suivantes : Bam H I, Eco RI et Pvu II. Les séquences palindromiques reconnues par ces enzymes sont les suivantes :



La réaction enzymatique a lieu dans un tampon spécifique (annexe III) , à 37 °C pendant au moins 3 h d'incubation.

5-Coloration et révélation de l'ADN

Après la migration, le gel est plongé dans une solution de BET (5 mg/ml) pendant 15 min sous agitation. Les ADN, révélés sous lumière UV, sont photographiés.

C-Résultats et discussions

1-Analyse de la qualité de l'ADN génomique

Sous lumière UV, des quantités importantes d'ADN sont observées dans les puits de dépôt pour les deux variétés de *L. camara* (Photo 11) . En effet, du fait de son haut poids moléculaire (supérieur à 10^9 pb) , l'ADN ne migre pratiquement pas. La taille de l'ADN observée sur l'électrophorégramme d'ADN de *L. camara* présente une légère différence entre les deux groupes. Ces résultats nous indiquent que l'ADN obtenu appartient à des variétés différentes.

L'électrophorégramme des ADN totaux ne présentent aucune traînée. L'ADN n'est pas dénaturé au cours de la manipulation et aucune trace d'ARN ne contamine les extraits.

2-Digestion de l'ADN génomique

Les résultats observés sur l'électrophorégramme des ADN digérés montrent des traînées et de petites quantités d'ADN (Photo 13 et 14). En principe, l'électrophorégramme devrait présenter de bandes séparées suivant le poids moléculaire des fragments d'ADN digérés par les enzymes de restriction.

La présence des traînées indique la dénaturation des ADN. Cela pourrait être dû par la reconcentration des extraits (Photo 12).

L'existence d'ADN restées dans les puits nous indique qu'ils n'ont pas été digérés par les enzymes. Elles auraient été endommagées au cours de leur conservation.

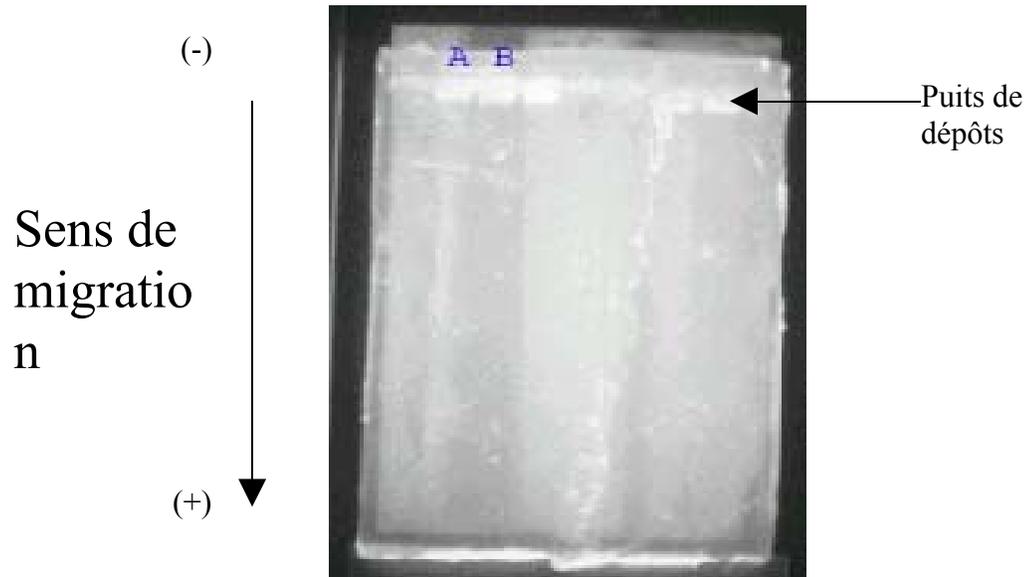


Photo 11: Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* (groupe Aet B)

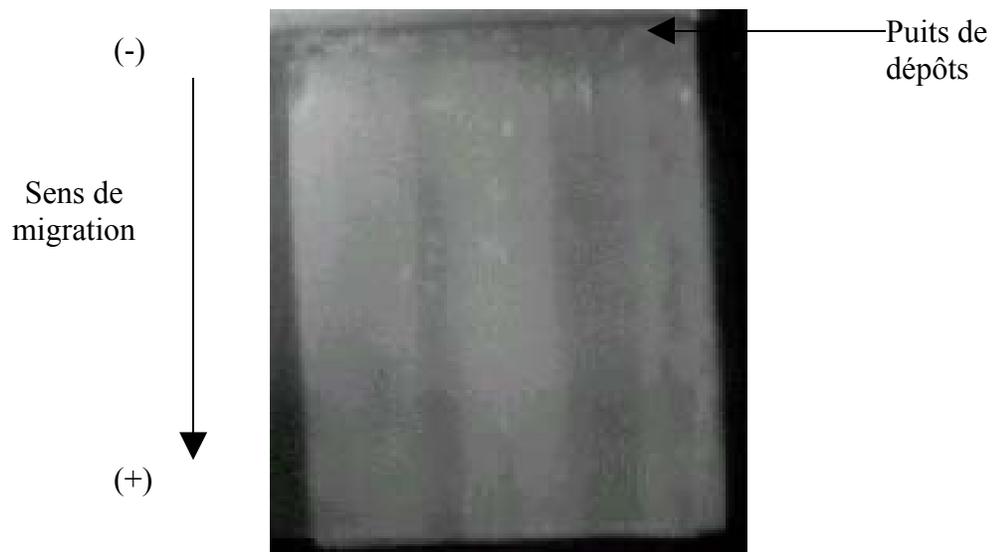


Photo 12: Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* (groupe Aet B) après la reconcentration

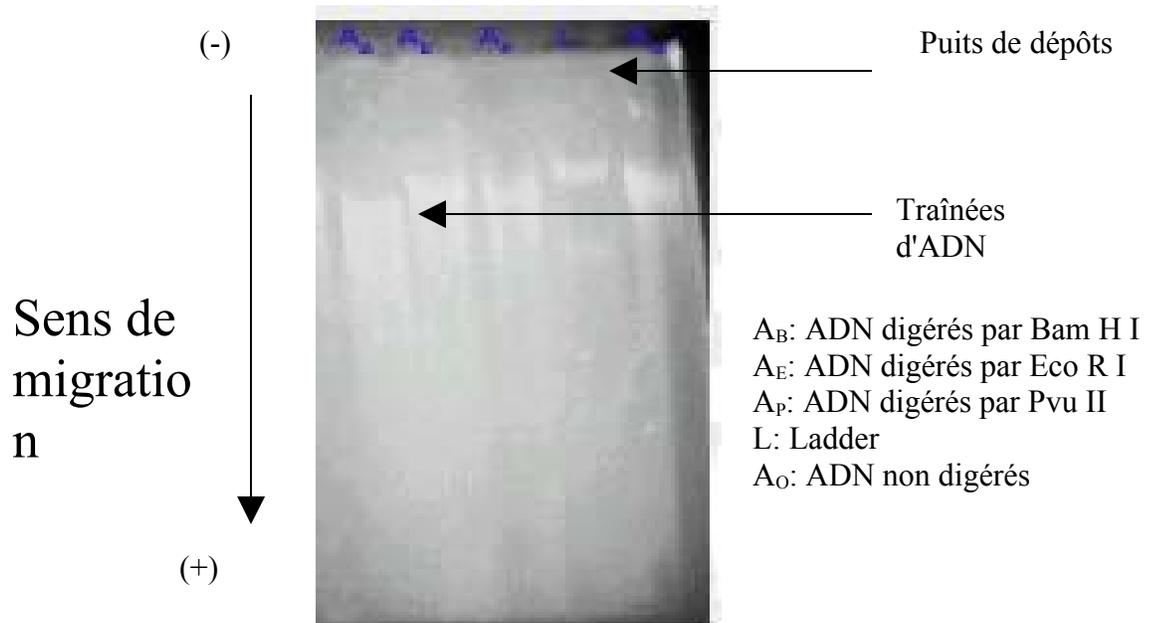


Photo 13: Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* du groupe A digérés par les enzymes de restriction

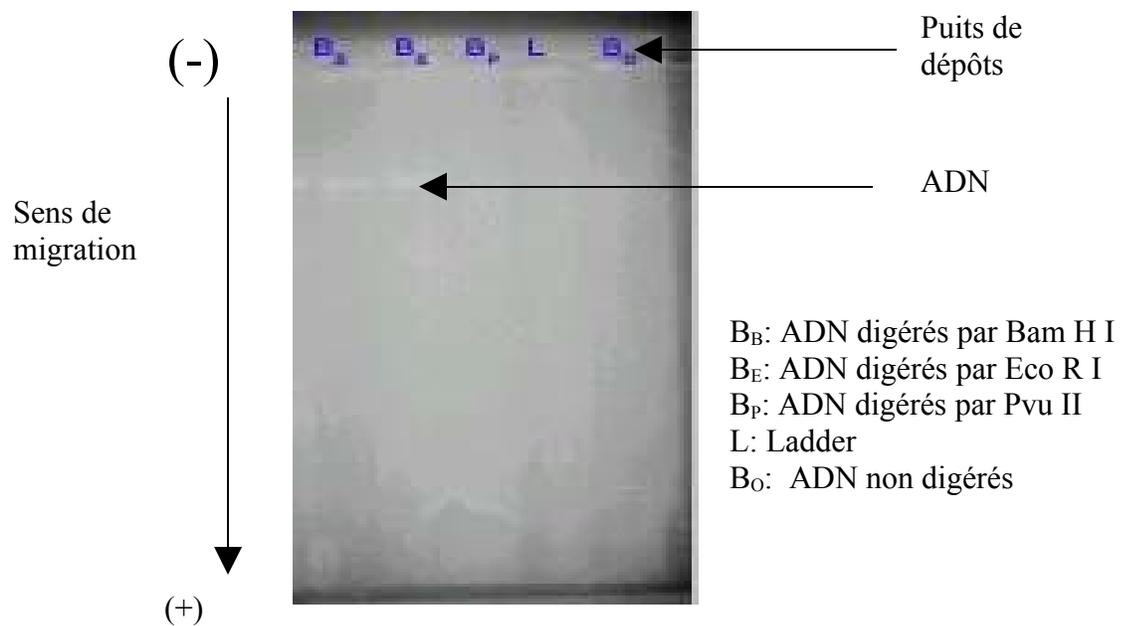


Photo 14: Electrophorégramme d'ADN de *L. camara* du groupe B digérés par les enzymes de restriction.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L. camara, famille des verbénacées est une plante tropicale qui a été introduite à Madagascar. Nous avons observé une différence de point de vue entre différents auteurs, concernant leur classification. Les travaux antérieurs sur l'huile essentielle de *L. camara*, ont montré qu'il y a aussi une différence sur les constituants majoritaires de l'huile trouvés par divers auteurs.

Eu égard à son importance en tant que plante industrielle, la multiplication en masse de variétés intéressantes s'avère nécessaire afin d'obtenir une production homogène d'huiles essentielles.

Cette étude, bien que préliminaire, a permis de dégager un certain nombre de résultats :

- la combinaison de différents agents stérilisants est efficace pour la décontamination des explants,
- l'induction de cals, sur milieu MS4 contenant de l'AIB et de la kinétine, est facile aussi bien à partir de fragments de lobes de feuilles que de l'apex caulinaire,
- le milieu GD6 est favorable pour le maintien et la multiplication des cals lors de leur transfert,
- la mise au point d'une technique simple d'extraction et d'analyse de l'ADN génomique. La différence des résultats observés sur l'électrophorégramme d'ADN de *L. camara* lors de son extraction et de sa digestion par les enzymes de restriction (Bam HI, Eco R I, Pvu II) reflète l'existence de polymorphisme entre ces deux groupes.

Ce travail est une contribution à la valorisation technologique des substances d'origine végétale. Dans un tel contexte, valoriser correspond à la mise en évidence des potentialités végétales en visant la qualité du produit fini dans une optique thérapeutique, cosmétique, aromatique, nutritif, en tenant compte des aspects réglementaires et économiques (JACOB, 1989).

La valorisation conduit souvent à l'innovation par l'emploi de techniques qui ne sont pas habituelles, mais qui permettent :

- Soit l'amélioration des conditions de production de substances connues et d'aménager des données thérapeutiques et économiques.
 - Soit la création de substances nouvelles ou mieux maîtrisées dans leur caractéristique.
- Transformer une matière première, c'est passer d'un état donné, d'un produit ayant des

caractéristiques physiques, chimiques ou biologiques, à un autre état différent du premier, aboutissant à une substance ou composition ayant des caractéristiques proches ou différentes des premières.

Pour ce faire, nos travaux ultérieurs seront axés sur :

- l'obtention de cals embryogènes friables de *L. camara* pour une culture en milieu liquide.
- l'optimisation des conditions de culture cellulaire.
- la production de son huile essentielle par culture cellulaire dans un fermenteur.
- les possibilités d'améliorer le rendement de son huile essentielle par les voies nouvelles de la biotechnologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDRIANAIVO R. (1999). Caractérisation de l'huile essentielle du *L. camara* de Madagascar, précision des caractéristiques de deux groupes d'essence par l'analyse multidimensionnelle. [Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur agronome]. 99p.

AUGE, G. BEAUCHESNE, J. BOCCON-GIBOD, L.DECOURTYRE, B.DIGAT, R. JALOUZOT, R. MINIER, J. MORAND, J. P. REYNOIRD, D.G. STRULLU, H VIDALIE. (1989) . La culture *in vitro* et ses applications horticoles. 3^e ed. Paris. 152p.

BERGMANN. (1960) . Growth and division of single cells of higher plants *in-vitro* .43, 841-851p.

BOCCON-GIBOD. (1980) . Régénération du crosne du Japon (*Stachys neboldii* meq) par culture de méristèmes : multiplication et conservation *in vitro* des clones. In : congrès sur l'application de la culture *in vitro* a l'amélioration des plantes potagères. 31-41p.

BRAUN, WHITE. (1941) . *Crown gall* production by *bacteria* free timor tissues. Sciences. **94**, 239-241p.

BRUNCTON. (1999) . Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales. 3^e édition. Paris.209p.

BUVAT.R. (1944) . Recherche sur la dédifférenciation des cellules végétales, plantes entières et boutures. **5**, 1-130p.

CHAUSSAT. R, BIGOT. C. (1980) . La multiplication végétative des plantes supérieures. Ggauthier-villers Edit. 277p.

CHAUSSAT. R. (1980) .Régulateurs de croissance et multiplication végétative. In : La multiplication des plantes supérieures. Paris: bordas. 277 p.

CNRS. (1995) . Protocoles (partie II) . In: stage d'initiation aux techniques de la biologie moléculaires. Institut de biologie moléculaire des plantes. Strasbourg. 61p.

DAVID. (1977) . La culture des tissus de deux gymnospermes Pins pinaster sol et taxus baccata L In : La culture des tissus et des cellules des végétaux. Résultats généraux et réalisation pratiques. Travaux dédiés à la mémoire de George morel réunis par R. J Gautheret. 93-99p .

DEMARLY. Y, SIBI. M. (1989). Amélioration des plantes et biotechnologies. Paris. 152p .

ELISABETH. J. (1995) .Méthodes d'extraction et d'analyse d'ADN génomiques et d'ARN totaux de plantes. D1-D21 (méthodes générales pour l'isolement et la caractérisation d'acides nucléiques) . Strasbourg. CNRS. Stage d'initiation aux techniques de la biologie. Partie I. Exposes. Institut de biologie moléculaire des plantes.

EVANS, SHARP FLICK. (1981) . Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: thorpe, T. A (Eds) . Plant tissue culture: methods and applications in agriculture. Proc of UNESCO symposium, Sao Paulo, acad press, N-Y. 45-113 p.

FRANCOIS.W, ROLLAND. B. (1997) . Aide-mémoire de biochimie et de biologie moléculaire. Editions technique et documentation. Editions médicales internationales. 220p.

GAUTHERET. (1959) . La culture des tissus végétaux. Paris. 863 p.

GAUTHERET. RJ. (1977). La culture des tissus et des cellules de végétaux : résultats généraux et réalisations pratiques, travaux dédiés à la mémoire de George morel. 261 p.

GRUENBAUN. Y, F. NAVEH-MANY, H. CEDAR, A. RAZIN. (1981) . Sequence specificity of methylation in higher plant DNA nature **292** : 860-862p.

HUMBERT. H (1956) . Flore de Madagascar et des Comores, 174^{ème} familles verbénacées.

JACOB. M. (1989) . Valorisation technologique des substances d'origine végétale. n° 8. In : Archives du centre national de recherches pharmaceutiques. Mémoire de la recherche scientifique. 133p.

JOUHANNEAU. (1991) . La médecine des plantes aromatiques. Phyto-aromathérapie et huiles essentielles de l'océan indien.

JULIEN, M. (1980). Les cultures de cellules chez les végétaux supérieurs et leurs applications. In : La multiplication végétative des plantes supérieures, Gauthier-villars. 161-185p.

LIMASSET. P , CORNUET. P.(1949) . Recherches du virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes des plantes infectées. 228 p.

LOPES, MANCINI M, MNCINI. B. (1975) .Chemical composition of essential oils of *L. camara*. **9**, 199p.

MARGARA. J. (1981) . Bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogenèse. Editions. INRA, Paris. 262 p.

MARIE CHRYSTINE SOLOFOHARIVELO. (2000) . Régénération *in vitro* de variétés locales de manioc ; essai d'évaluation de la variation somaclonale. [Mémoire de DEA] .Antananarivo : université d'Antananarivo. 52p.

MARTIN. C. (1977) . La culture de méristèmes et la multiplication végétative *in-vitro*. **5**, 11-14p.

MILLER. O. K , HUGHES. K. W. (1980) . Selection of paraquat-resistant variants of tobacco from cell cultures *in-vitro*. **16**, 1085-1091p.

MOLLENBECK. S, KONIG. T, SCHREIR. P, SCHWAB. W, RAJAONARIVONY.J, RANARIVELO. L. (1997) . Chemical composition and analysis of enantiomers of essential oils from Madagascar-flavour and fragrance journal. **12**, 63-69p.

MOREL. G, MULLER. J. F . (1964) .La culture *in vitro* de méristème apical de la pomme de terre. **258**, 5250-5252p.

MOREL. G. (1964) . Régénération des variétés virosées par la culture des méristèmes apicaux Revue horticole,2,261p.

MOREL. G. (1965) . La culture des méristèmes caulinaires. Tome 11, n° 3.

MOREL.G, MARTIN. C. (1952) . Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. 41,472-475p.

MUIR.W. H, HILDEBRANDT. A. C, RIKERA. J. (1958) . The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants.45, 589-597p.

MURASHIGE. T, SKOOG. F. (1960) . A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. 15, 473- 497p.

NGASSOUN. M .B, YONKEU. S, JIROVETZ. L, BUCHBAUER. G, SCHMAUS. G, HAMMER, SHMIDT. E. J. (1999) . Chemical composition of essential oils of *L. camara* leaves and flowers from Cameroun and Madagascar flavour and eragance journal. 14, 245-250p.

OGDEN, D. A. ADAMS. (1987) . Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. Methods Enzymol. 152 : 61-87p.

PERRIER de la BATHIE. (1933) .Les plantes introduites à Madagascar. Listes des plantes cultivées, rudérales, messicoles ou naturalisées croissant dans l'île, suivi d'un aperçu sur les plantes autochtones devenues anthropophiles. (Extrait de la revue de botanique appliquée et d'agriculture tropicale, vol 12. n° 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 127, 128, 129, 130, 131).

PIERI BATTESTI. J. C. (1982) . Contribution à l'étude de quelques huiles essentielles de la Réunion. [Thèse de doctorat ès Sciences physiques], université d'Aix Marseille. 125p.

PROMEGA. C. (1996) .Restriction. Protocols and applications guide. Third edition. The source for discovery. Biological research products. USA. 3-24p.

RAHELIVOLOLONA Raharitiana. (1999) . Contribution à l'étude de conservation des orchidaceae de Madagascar ; mise au point de la technique de vitropropagation. [Mémoire de DEA en physiologie végétale]. Antananarivo : université d'Antananarivo. 82p.

SALEH. M. (1974) . Gas chromatographic analysis of the essential oil of *Lantana camara*. Linn varieties planta Med. **25**, 373-375p.

SAM BROOK, E.F. FRITSCH, T. MANIATIS. (1989). Molecular cloning : A laboratory Manual. Cold spring harbor laboratory press. Cold spring harbor.

SAMYN. J. M. (1999) .Plantes utiles des hautes terres de Madagascar. Graphoprint, Madagascar, 68p.

SASSON. (1992) . Production of useful biochemical by higher-plant cell cultures : biotechnological and economic aspect. In options méditerranéennes. Place et rôle des biotechnologies dans le systèmes de recherche agronomiques des pays méditerranéens (Place and rôle of biotechnologies in the agricultural research systems of the mediterranean countries) . Série A séminaires méditerranéens. 188p.

SCHENK. R. V, HILDEBRANDT. A. C. (1972) .Medium and technics for induction and growth of monocotyledones and dicotyledones plant cell cultures. **50**, 99-101p.

SHARP. W. R, SOHNDAL. M .R, EVANS. A. E, CALDA. L. A, MARAFFA. S. B. (1980) .The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis horticultural review's. 2, 268-310p.

SOFIARI. E. (1996) .Regeneration and transformation of Cassava (*Manihot esculanta* crantz) . [Thèse de doctorat] . Wageningen agricultura. University Hollande. 135 p.

TAKEBE. I, OTSUKI. Y, AOK. S. (1968) . Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. plant and physiol, **9**, 115- 124p.

TEISSON. C.(1994). La culture *in vitro* de plantes tropicales. Montpellier : CIRAD.

85 p.

TORREY. J. G. (1958) . Endogenous bud and root formation by isolated roots of convolvulis grown *in vitro*, plant Physiol. **33**, 258-263p.

WALBOT, CULLIS. (1985) .Rapid genomic change in higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. **36** : 367-396p.

WALLACE. (1987) . Large and small-scale phenol extraction. Methods Enzymol.**152** : 33-41p.

WALLACE. (1987) . Precipitation of nucleic acids. Methods Enzymol **152** : 41-48p.

WHITE. P. (1934) . Multiplication of the viruses of tobacco and Aucuba mosaic in growing excised tomato roots.

WITT. (1985) .Brief book : Biotechnology and genetic diversity. California agricultural lands project, San Francisco.

ZENK. M. H. (1978) .The impact of plant cell culture on industry. In frontiers of plant tissue culture. Thorpe Edit. Calgary, 1-13p.

ANNEXE I

Tampons d'extractions

CH3 COO Na	100 mM	pH	4,8
EDTA	50 mM	pH	8
Na Cl	500 mM		
Pvp	2%		
Cystéine	60 mM		

Tampon TE

Tris-H Cl	10 mM	pH	8
EDTA	1 mM		

ANNEXE II

Tampon de charge pour le gel d'agarose

Glycérol	50% (V/V)
SDS	1% (P/V)
Xylène cyanol	0,1% (P/V)
Bleu de bromophénol	0.1% (P/V)
EDTA	100 mM
pH	8

Tampon TAE 50 x

Tris-H Cl	242 g
Acide acétique	57,1 ml
EDTA	18,6 g
Eau	qsq
pH	8

ANNEXE III

Tampon E pour Bam H I et Eco R I

pH	7,5 a 37 °C
tris-H Cl	6 mM
Mg Cl ₂	6 mM
Na Cl	100 mM

Tampon B pour Pvu II

pH	7,5 a 37 °C
tris-H Cl	6 mM
Mg Cl ₂	6 mM
Na Cl	50 mM

Tampon de restriction

Tampon B	16 µl
EDS	48 µl
Pvu II	16 µl

Tampon E	16 µl
EDS	48 µl
Bam H I ou Eco R I	16 µl

Milieu réactionnel

Tampon de restriction	2 µL
EDS	6 µl
Enzyme	2 µl
ADN	10 µl

ANNEXE IV

Domaine de séparation de fragments d'ADN sur gel d'agarose

Concentration en agarose du gel (%[P/V])	Domaine de résolution optimal de molécules d'ADN linéaires (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

ANNEXE V

Concentration d'une solution d'ADN

- Estimer le volume de la solution d'ADN
- Centrifuger au moins 10 min à vitesse maximale
- Récupérer le surnageant
- Ajouter à la solution d'ADN 0,04 volume Na Cl 5 M et 2,5 volumes d'éthanol absolu à froid (-20 °C)
- Maintenir à -20 °C
- Centrifuger au moins 10 min à vitesse maximale
- Éliminer le surnageant
- Rincer le culot (ADN) avec de l'éthanol 70° pour éliminer l'excès de sels
- Centrifuger au moins 5 min
- Éliminer le surnageant
- Sécher le culot à l'air ambiante
- Reprendre le culot dans de l'eau distillée
- Conserver à -4 °C avant l'usage