

**UNIVERSITE MOHAMMED V-AGDAL
FACULTE DES SCIENCES-RABAT**



N° d'ordre: 2455

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

Présentée par

ZINE EL ABIDINE TRIQUI

Discipline: Biologie
Spécialité: Biotechnologie végétale

**CONTRIBUTION A L'AMELIORATION DE LA PATATE
DOUCE (*Ipomoea batatas* L. (Lam)) PAR L'APPLICATION
DES BIOTECHNOLOGIES : EMBRYOGENESE SOMATIQUE
ET TRANSFORMATION GENETIQUE**

Soutenu le 03 Juillet 2009

Devant le jury :

Président :

Pr. CHLYAH Hassan

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat-Agdal

Examineurs :

Pr. CHLYAH Bouchra

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat-Agdal

Pr. SIHACHAKR Darasinh

Maître de conférences à l'Université de Paris-Sud XI

Pr. HAICOUR Robert

Maître de conférences à l'Université de Paris-Sud XI et Paris VI

Pr. FILALI-MALTOUF Abdelkarim

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat-Agdal

Pr. CHERKAOUI Souad

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat-Agdal

Dédicaces

Je dédie ce travail

A la mémoire de mon père

A ma chère mère que dieu lui accorde longue vie

A ma femme bien aimée

A mon fils Badr

A mes frères et leurs familles

A toute ma famille

A tous mes amis.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences de Rabat sous la co-direction de Monsieur le professeur H. CHLYAH, Madame le professeur Mme Chlyah et de Monsieur le professeur D. Sihachakr du Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale de l'Université de Paris-Sud.

Au terme de ce travail, je voudrais exprimer mes remerciements et ma profonde reconnaissance à :

Monsieur H. CHLYAH Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, qui m'a accueilli dans son laboratoire depuis plus de vingt ans. Il m'a toujours fait bénéficier de son large savoir et de ses conseils judicieux ainsi que d'une sollicitude quasi paternelle. Qu'il soit aussi vivement remercié pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury de thèse.

Monsieur D. Sihachakr Maître de conférence à l'Université de Paris-Sud XI, qui m'a accueilli et encadré durant les nombreux stages effectués dans son laboratoire et qui a mis beaucoup de moyens à ma disposition. Ses compétences scientifiques, ses qualités humaines et sa disponibilité ont été très précieuses dans l'accomplissement de cette thèse. Il m'est aussi agréable de lui témoigner ma grande gratitude pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury.

Madame B. CHLYAH professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, pour les longues années où elle m'a fait bénéficier de son large savoir et n'a ménagé aucun effort pour me faciliter la tâche. Je suis aussi reconnaissant pour le temps qu'elle a consacré à la correction de ce manuscrit. Qu'elle soit vivement remerciée d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Monsieur R Haicour Maître de conférence à l'Université de Paris-Sud XI, qui m'a accueilli durant les nombreux stages effectués dans son laboratoire et qui m'a fait bénéficier de ses compétences scientifiques. Son aide précieuse a été bénéfique dans l'accomplissement

de ce travail. Il m'est aussi agréable de lui témoigner ma grande gratitude pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury.

Monsieur A. FILALI-MALTOUF vice président de l'Université Mohammed V-agdal et professeur à la Faculté des Sciences de Rabat qui m'a honoré en acceptant de faire partie du jury de cette thèse malgré ses nombreuses occupations.

Madame S. CHERKAOUI professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, pour l'intérêt qu'elle a manifesté à ce travail. Il m'est aussi agréable de lui témoigner ma grande gratitude pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury.

Monsieur F. VEDEL professeur à l'Université de Paris-Sud et Mme M. Cerbah, qui m'ont apporté une aide précieuse en particulier dans l'identification des plantes transformées par biologie moléculaire.

Monsieur A. Guédira, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, pour son aide précieuse dans toutes les étapes de la réalisation de cette thèse, son soutien et pour ses encouragements constants. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance et mon amitié.

Tous mes collègues du Laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences de Rabat auprès desquels j'ai constamment trouvé un esprit d'équipe et de bonne camaraderie.

L'ensemble des membres du Laboratoire d'Orsay en particulier Madame AMBROISE, Madame SERVAES et Madame FORCHIONI pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apporté lors de mes stages à Paris.

Ma collègue et amie N. Sekkak et mes étudiants Rachid Naoufal, Ichrak El idrissi et Jamila Boukmou pour leur contribution dans la réalisation de certaines parties de ce travail.

Abréviations

1/2MS: Milieu de Murashige et Skoog avec macro-éléments dilués de moitié
2,4,5-T: Acide 2,4,5 trichlorophénoxyacétique
2,4-D: Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique
A_{0,4}B_{0,5}: milieu avec AIA et BAP à 2,2 µM.
ABA : acide abscissique.
ABA1,5 : milieu comprenant 5,6 µM d'ABA.
ABA2,5 milieu comprenant 9,5 µM d'ABA.
ABA4 milieu comprenant 15 µM d'ABA.
ABA4G1 milieu comprenant 15 µM d'ABA et 1 µM de GA₃.
AFLP : polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
AGPs : protéines arabinogalactanes
AIA: Acide indole-3- acétique
ANA: Acide 1-naphtalène acétique
BAP: 6-benzylaminopurine
DAF : DNA Amplification fingerprinting
Dicamba: Acide 3,6-dichloro-2-méthoxybenzoïque
DK (2,4-D et kin à 1µM chacun)
FAO: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization)
ISSR: Simple sequence repeats ou microsatellites
Kinétine ou Kin : 6-furfurylaminopurine ou N⁶-furfuryladénine
Ma2 : milieu des suspensions cellulaires (Ma, 1991)
MS: Milieu minéral de Murashige et Skoog (1962).
Piclorame: Acide 4-amino-3, 5, 6-trichloro-2-pyridinecarboxylique
RAPD : amplification aléatoire de l'ADN polymorphe
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
SERK (somatic embryogenesis receptor kinase) VM30 Assani et al. (2002)
SPCLV: Sweet potato Caulimo-Like Virus
SPCSV: Sweet potato chlorotic stunt virus.
SPFMV: Sweet potato feathery mottle virus.
SPLV: Sweet potato Latent Virus.
SPVD: sweet potato virus disease.
Thidiazuron : 1-phényl-3-(1, 2, 3 thiadiazol-5-yl)
VM30 : milieu sans régulateurs de croissance (Assani et al., 2002)

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
Introduction	8
Synthese bibliographique	12
1. Présentation du matériel végétal	12
1.1. Systématique	12
1.2. Origine géographique	13
1.3. Evolution	14
1.4. Caractéristiques morphologiques	15
1.5. Exigences écologiques et culture	16
1.6. Intérêts et importance économique	17
1.6.1. Valeur nutritionnelle	17
1.6.2. Importance économique	17
a. Dans le monde	17
b. Au Maroc	18
1.7. Principales maladies et ravageurs de la patate douce	18
1.7.1. Les ravageurs	19
1.7.2. Les maladies	19
a. Les maladies post récolte	19
➤ Infection avant la récolte	19
➤ Infection au moment de la récolte	20
➤ Infection au stade post-récolte	21
b. Maladies virales	21
2. Amélioration génétique chez la patate douce	23
2.1. Amélioration classique	23
2.2. Amélioration par les méthodes de biotechnologie	25
2.2.1. Culture de nœuds et d’apex	25
2.2.2. Culture de méristèmes	25
2.2.3. Organogenèse	25
2.2.4. Culture et fusion des protoplastes	26

3. Embryogenèse somatique chez la patate douce	28
3.1. Généralités sur l'embryogenèse somatique	28
3.1.1. Définitions	28
3.1.2. Les principales étapes de l'embryogenèse somatique	29
3.1.3. Origine cellulaire de l'embryon somatique.....	29
3.2. Mécanismes cellulaires de l'embryogenèse somatique	30
3.2.1. Expression des gènes.....	33
3.2.2. Marqueurs moléculaires.....	35
3.3. Embryogenèse chez la patate douce	37
3.3.1. Intérêt de l'embryogenèse somatique pour la patate douce	37
3.3.2. Phase d'induction.....	37
a. Explant initial	39
b. Composition du milieu de culture.....	39
c. Effet du génotype.....	39
3.3.3. Caractéristiques des cals embryogènes	40
3.4. Entretien des cultures embryogènes.....	40
3.4.1. Milieu solide.....	40
3.4.2. Suspensions cellulaires.....	41
3.5. Développement et maturation des embryons	41
3.6. Automatisation de la production des embryons.....	43
4. Transformation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
4.1. Généralités sur la transformation	43
4.1.1. Principe de la transformation	43
4.2. Les techniques de transformation	43
4.3. Transformation par les agrobactéries.....	44
4.3.1. Caractéristiques du genre <i>Agrobacterium</i>	44
4.3.2. Structure du plasmide Ti.....	44
4.3.3. Processus de l'infection et de la transformation.....	45
a. Colonisation bactérienne.....	45
b. Induction de la virulence bactérienne.....	45
c. Formation du complexe de transfert de l'ADN-T	45
d. Les modèles de transfert du complexe ss-ADN-T.....	46
e. Intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante	47
4.3.4. Principe de la méthode.....	47
4.3.1. Identification des plantes transgéniques	49
4.3.2. Variabilité des plantes transgéniques et perspectives	49
4.4. Transformation chez la patate douce.....	50

4.4.1. Principaux objectifs de la transformation	50
a. Stress biotiques	54
b. Stress abiotiques	54
c. Qualité de l'amidon	55
d. Objectifs thérapeutiques.....	55
4.4.2. Facteurs affectant l'efficacité de la transformation par <i>Agrobacterium</i>	56
a. Explant initial	56
b. Type de plasmide	56
c. L'acetosyringone.....	57
<i>Objectifs du travail</i>	58
<i>Matériels et méthodes</i>	60
1. Matériel végétal	60
2. Induction des cals embryogènes	60
3. Entretien des cals embryogènes	61
4. Traitement des résultats.....	61
5. Etablissement de suspensions cellulaires.....	61
5.1. Initiation des suspensions cellulaires.....	61
5.2. Dynamique de croissance	62
5.3. Etude histologique.....	62
6. Régénération d'embryons somatiques.....	63
6.1. Régénération à partir de cals	63
6.1.1. Expériences préliminaires	63
6.1.2. Effet des séquences de milieux	63
a. Milieu de prématuration.....	63
b. Milieux de maturation.....	64
c. Milieux de germination	64
6.2. Régénération à partir de suspensions cellulaires	65
6.3. Observations et traitement des résultats.....	66
6.4. Détermination du niveau de ploïdie par cytométrie en flux.....	66
7. Transformation.....	67
7.1. Souches bactériennes	67
7.1.1. Préparation des souches bactériennes	68
7.1.2. Infection et coculture	68
7.1.3. Culture et repiquages.....	70
7.1.4. Régénération.....	70
7.2. Observations.....	70
7.3. Test à la kanamycine	70

7.4. Test Gus	70
7.5. Analyse moléculaire	71
7.5.1. Extraction de l'ADN total.....	71
7.5.2. Composition du milieu réactionnel.....	72
7.5.3. Amplification de l'ADN	72
7.5.4. Analyse des produits d'amplification :	72
<i>Résultats et discussion</i>	74
1. Induction de cals embryogènes.....	74
1.1. Evolution des explants en culture.....	74
1.2. Effet de l'agent gélifiant	76
1.3. Effet de l'auxine et du génotype	77
1.4. Induction de cals embryogènes chez le clone Marocain	78
1.5. Entretien des cals embryogènes.....	78
1.6. Discussion	81
2. Les suspensions cellulaires embryogènes	82
2.1. Mise en place et évolution des suspensions cellulaires.....	82
2.2. Structure cellulaire des suspensions embryogènes	86
2.2.1. Cinétique de croissance.....	88
2.3. Discussion	88
3. Régénération à partir de cals embryogènes et de suspensions cellulaires.....	90
3.1. Régénération à partir de cals embryogènes.....	90
3.1.1. Effet de différentes séquences de milieux.....	90
3.1.2. Effet du milieu de germination des embryons	95
3.2. Régénération à partir de suspensions cellulaires	96
3.2.1. Autres séquences de milieux de régénération	102
3.3. Détermination du niveau de ploïdie	104
3.4. Discussion	105
4. Transformation par <i>Agrobacterium</i>	108
4.1. Transformation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1 (GV2260).....	108
4.1.1. transformation avec strain GV3101—pTHW136	111
4.1.2. transformation avec <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain C58C1RifR (pGV2260).....	113
4.2. Discussion	113
<i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i>	116
<i>Références Bibliographiques</i>	121
<i>ANNEXES</i>	139

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : HISTORIQUE DE LA DISPERSION DE LA PATATE DOUCE AU DEPART DE L'AMERIQUE (DIAGRAMME DE WINIFRED MUMFORD ; D'APRES YEN (1982).....	14
FIGURE 2: MODELE HYPOTHETIQUE DES EVENEMENTS A L'ORIGINE DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE (FEHER, 2006).....	31
FIGURE 3 : STRUCTURE DE L'ADN-T DE LA SOUCHE GV 3101-pTHW136	67
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA TRANSFORMATION GENETIQUE DE LA PATATE DOUCE. A: PLANTULES AGEES D'ENVIRON 8 SEMAINES. B, C ET D: DISSECTION DANS DES CONDITIONS ASEPTIQUES. E : INCISION AU NIVEAU DU BOURGEON AXILLAIRE. F : IMMERSION DANS LA SOLUTION BACTERIENNE. G : AGITATION AU VORTEX PENDANT 10 SECONDES. H : SECHAGE ENTRE DEUX FEUILLES DE PAPIER FILTRE.	69
FIGURE 5: EXPLANT INITIAL AU MOMENT DE LA CULTURE(A) DEBUT DE FORMATION DU CAL EMBRYOGENE ROUGEATRE AU SEIN D'UNE MASSE MUCILAGINEUSE LAITEUSE CV ZHO (B) STRUCTURES EMBRYOGENES ROUGES EMERGEANT A PARTIR LA MASSE LAITEUSE CVZHO (C) CAL EMBRYOGENE NODULAIRE ROUGE DU CV ZHO. LES FLECHES INDIQUENT LES PARTIES COMPACTES EMBRYOGENES.....	75
FIGURE 6 : LES CALS EMBRYOGENES CHEZ CV ZHO (A ET C), 90 (B), CALS DE CV 865 AVEC DEBUT D'APPARITION DE CALS NON EMBRYOGENES (D), CALS AVEC NECROSES (E) ET CALS AVEC UN DEBUT DE DEVELOPPEMENT D'EMBRYONS SOMATIQUES (G).....	80
FIGURE 7 : MISE EN PLACE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENES. A ; PETITS CALS BLANCS AVEC DES POINTS ROUGES. B ; SUSPENSION DE CVZHO AVEC DES AGREGATS ROUGES. C : SUSPENSION DE CV865 AVEC DES AGREGATS JAUNES. D : ASPECT DES AGREGATS SOUS LA LOUPE.	84
FIGURE 8 : STRUCTURE DES SUSPENSIONS NON EMBRYOGENES CHEZ CV865 ; A : ASPECT GENERAL DENSE ET TROUBLE. B : AGREGATS CELLULAIRES FINS ET CELLULES ISOLEES. C ; ASPECT GENERAL DES CELLULES SOUS MICROSCOPE X200.	85
FIGURE 9 : SRUCTURE HISTOLOGIQUE DES AGREGATS CELLULAIRES EMBRYOGENES : VUE D'ENSEMBLE DE LA COUPE X 10 (A), LES PARTIES CENTRALES CLAIRES ET LES PARTIES PERIPHERIQUES PLUS SOMBRES X 40 (B), CELLULES VACUOLISEES AVEC NOYAU PERIPHERIQUE AU NIVEAU DE LA PARTIE CENTRALE X 100 (C) ET CELLULES TRES JEUNES AVEC CYTOPLASME GRANULEUX DENSE ET UN GROS NOYAU CENTRAL X 100 (D).	87
FIGURE 10: CINETIQUE DE CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE EMBRYOGENE DU CV 865 (mL).....	88
FIGURE 11: DIFFERENTES ETAPES DE LA REGENERATION A PARTIR DE CALS EMBRYOGENES. ASPECT DES CALS (FLECHE) (A) EMBRYONS DE DIFFERENTES TAILLES (B) EMBRYONS TRES AVANCES (C) ET PLANTES DEVELOPPEES (D).....	91
FIGURE 12 : EVOLUTION DU NOMBRE MOYEN D'EMBRYONS SOMATIQUES PAR FRAGMENT DE CAL EN FONCTION DU TEMPS. A : EMBRYONS ROUGES DE PETITE TAILLE, CV 865 ; B : EMBRYONS ROUGES CV ZHO ; C : EMBRYONS VERTS DE PETITE TAILLE, CV 865 ; D : EMBRYONS VERTS DE PETITE TAILLE, CV ZHO ; E : EMBRYONS	

VERTS DE GRANDE TAILLE, CV 865 ET F : EMBRYONS VERTS DE GRANDE TAILLE, CV ZHO.....	93
FIGURE 13 : EFFET DU MILIEU DE GERMINATION SUR LA CONVERSION DES EMBRYONS EN PLANTULES ENRACINEES 15 JOURS APRES LE REPIQUAGE. A : CV ZHO. B : CV 865.....	96
FIGURE 14 : EVOLUTION DES AGREGATS CELLULAIRES EMBRYOGENES APRES ETALEMENT DE LA SUSPENSION CELLULAIRE SUR DES SEQUENCES DE MILIEUX SOLIDES DE REGENERATION SOLIDES. A : JUSTE APRES L'ETALEMENT DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DU CV ZHO SUR MILIEU A _{0,4} B _{0,5} . B: APRES TROIS SEMAINES DE CULTURE. C: APRES 6 SEMAINES. D: EMBRYONS DEVELOPPES.....	97
FIGURE 15: COMPARAISON DE L'ASPECT DES SUSPENSIONS ETALEES DE ZHO SUR QUATRE MILIEUX DE MATURATION APRES PREMATURATION SUR LE MILIEU A _{0,4} B _{0,5}	99
FIGURE 16: PAQUETS D'EMBRYONS TRES DEVELOPPES APRES REPIQUAGE EN TUBES (A) ET DEVELOPPEMENT EN PLANTES ENTIERES (B).	101
FIGURE 17 : EVOLUTION DU NOMBRE D'EMBRYONS SOMATIQUES ROUGES (A), PETITS VERTS (B) ET GRANDS VERTS (C) PAR AGREGAT CELLULAIRE ISSU DE SUSPENSION CELLULAIRE EMBRYOGENE DU CV 865.	103
FIGURE 18 : DEVELOPPEMENT DES NŒUDS EBOURGEONNES PENDANT LA TRANSFORMATION PAR <i>AGROBACTERIUM</i> . A : NŒUDS EBOURGEONNES MIS EN CULTURE. B : DEBUT D'EVOLUTION DES L'EXPLANT AVEC EMISSION DE RACINES. C : BOURGEONS BLANCS SENSIBLES DEVELOPPES EN PRESENCE DE KANAMYCINE. D : BOURGEONS VERTS DEVELOPPES EN ABSENCE DE KANAMYCINE.	110
FIGURE 19 : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE DES SEQUENCES GUSINT ET NPTII AMPLIFIEES PAR PCR CHEZ LES CLONES TRANSFORMES (1 A 6), TEMOIN NEGATIF (T) ET TEMOIN POSITIF. (B).	112

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : STATISTIQUES DE LA PRODUCTION DE PATATE DOUCE (D'APRES FAOSTAT, 2008).....	18
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX TRAVAUX REALISES DANS LE DOMAINE DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ LA PATATE DOUCE.....	38
TABLEAU 3: PRINCIPAUX TRAVAUX REALISES DANS LE DOMAINE DE LA TRANSFORMATION GENETIQUE CHEZ LA PATATE DOUCE (D'APRES SHIMADA ET OTANI, 2007 AVEC MODIFICATIONS).	52
TABLEAU 4: COMPOSITION DU MILIEU MA ₂ (MA, 1991).....	62
TABLEAU 5 : COMPOSITION DES MILIEUX DE MATURATION.....	64
TABLEAU 6 : COMPOSITION DES MILIEUX DE GERMINATION.....	65
TABLEAU 7 : COMPOSITION DES MILIEUX A _{0,4} B _{0,5} , ET VM30 ET ABA 1,5	65
TABLEAU 9: EFFET DES AUXINES (2,4-D, 2,4,5-T ET PICLORAME) SUR L'INDUCTION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ 6 CULTIVARS DE PATATE DOUCE. LA REPONSE EMBRYOGENE (%) A ETE OBSERVEE APRES 10 SEMAINES DE CULTURE DANS LE MILEU D'INDUCTION SOLIDIFIE PAR 7G/L D'AGAR. LES VALEURS SUIVIES DE LA MEME LETTRE NE SONT PAS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES A P=0,05.	77
TABLEAU 10 : EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'AUXINE SUR LA REPONSE EMBRYOGENE CHEZ LE CLONE MAROCAIN.	78
TABLEAU 11 : EFFET DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE MATURATION SUR LE NOMBRE D'EMBRYONS SOMATIQUES PRODUITS PAR LES CALS EMBRYOGENES CHEZ LE CV 865 APRES 3 SEMAINES DE CULTURE.....	94
TABLEAU 12 : EFFET DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE MATURATION SUR LE NOMBRE D'EMBRYONS SOMATIQUES PRODUITS PAR LES CALS EMBRYOGENES CHEZ LA VARIETE ZHO APRES 3 SEMAINES DE CULTURE.	95
TABLEAU 13 : EFFET DES MILIEUX D'ETALEMENT ET DE MATURATION SUR LE NOMBRE MOYEN DE PLANTES OBTENUES PAR AGREGAT CELLULAIRE EMBRYOGENE	100
TABLEAU 14 : EFFET DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE MATURATION SUR LE NOMBRE D'EMBRYONS SOMATIQUES PRODUITS PAR LES AGREGATS CELLULAIRES ISSUS DE SUSPENSIONS CELLULAIRES APRES 3 SEMAINES DE CULTURE.	104
TABLEAU 15: ESTIMATION DU NIVEAU DE PLOÏDIE POUR UN ECHANTILLON DE 10 CLONES DE PATATE DOUCE CV ZHO DERIVANT DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE. LA VALEUR MOYENNE DU PIC DOMINANT D'UN ECHANTILLON DE 50 CLONES ANALYSES A ETE ESTIMEE A 82,5 ± 0,6, LA VALEUR DE LA PLANTE TEMOIN CV ZHO ETANT AU CANAL 83±0,56.	105
TABLEAU 16 : POURCENTAGE D'EXPLANTS AYANT REGENERE DES BOURGEONS POUR 3 TYPES D'EXPLANTS EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE KANAMYCINE SUITE A L'INFECTION PAR C58C1 (GV2260).....	108
TABLEAU 17: RESULTATS DE LA REGENERATION DE BOURGEONS A PARTIR DE NŒUDS EBOURGEONNES TEMOINS OU INFECTES DU CULTIVAR ZHOUNANG13.	111

INTRODUCTION

La patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.) est une plante à racines tubérisées qui présente une grande importance économique dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées douces (Sihachakr et al., 1997). C'est la septième plus importante culture dans le monde après le blé, le riz, le maïs, la pomme de terre, l'orge et le manioc. Sa production mondiale est estimée à 124 Mt en 2007 dont plus de 88 % en Asie particulièrement en Chine avec 100Mt (FAOSTAT, 2008). Les racines tubérisées contiennent de grandes quantités d'amidon qui peut atteindre 30% de la masse fraîche chez certains cultivars. Elle est utilisée pour l'alimentation humaine, la production d'alcool et la nutrition animale. Les tiges et le feuillage sont utilisés comme fourrage (Cavalcante-Alves, 1996).

Malgré les progrès réalisés dans l'amélioration de la patate douce par les méthodes conventionnelles (Sihachakr et al., 1997), le processus de sélection est long et exige l'utilisation d'un grand nombre d'individus et des systèmes d'amélioration élaborés à cause de l'état hexaploïde de cette espèce ($2n=6x=96$) (Srisuwan et al., 2006). En plus, les efforts d'amélioration génétique sont sérieusement affectés par les difficultés dans les croisements sexués à cause essentiellement des problèmes d'incompatibilité et de la stérilité au sein des espèces d'*Ipomoea* (Martin, 1970a et 1970b), et des exigences physiologiques spécifiques pour la floraison (Martin et Jones, 1971).

Par conséquent, la biotechnologie a été développée en complément des méthodes classiques afin d'aboutir à des protocoles d'amélioration plus efficaces pour cette plante.

Malgré les progrès récemment obtenus dans le domaine de la biotechnologie, les applications biotechnologiques chez la patate douce sont encore limitées et peu de travaux ont été réalisés notamment dans l'exploitation de la variation somaclonale (Sihachakr et al., 1997), l'hybridation somatique (Belarmino et al., 1996) et la transformation génétique (Shimada et Otani, 2007). La cause principale réside probablement dans le manque de maîtrise de la régénération pour laquelle la patate douce est considérée comme une espèce récalcitrante (Sihachakr et Ducreux, 1993).

Parmi les différents systèmes de régénération, l'embryogenèse somatique est fortement convoitée parce qu'elle assure régulièrement des taux de multiplication élevés qui peuvent être maintenus longtemps. En plus, cette technique est très convoitée pour la

transformation génétique (Shimada et Otani, 2007). Cependant, la patate douce est considérée comme récalcitrante pour cette technique. Le génotype est un facteur limitant pour l'induction des cultures embryogènes dans la mesure où plusieurs cultivars ont donné une réponse embryogène faible ou pas de réponse (Jarret et al., 1984; Cavalcante-Alves et al., 1994; Desamero et al., 1994). Une réponse embryogène rapide et répétitive a été observée chez une seule variété PI318846-3 (Zheng et al., 1996). De même, le type d'auxine utilisé s'est montré crucial pour l'induction efficace de l'embryogenèse somatique (Otani et Shimada, 1996; Al-Mazrooei et al., 1997).

L'agent gélifiant est un paramètre souvent négligé dans la recherche de la réponse désirée, comme l'induction de l'embryogenèse somatique ou la formation de bourgeons (Hadelier et al., 1995; Lainé et al., 2000). Les deux agents qui sont les plus utilisés sont l'agar et son dérivé purifié l'agarose extrait à partir d'algues rouges, comme *Gracilai*, *Gelidium* ou *Chondres*, et le gel rite ou phytigel qui est un polysaccharide extracellulaire produit par la bactérie *Sphingomonas elodea* (Silva et al., 2005). Malgré le fait qu'il a été montré que différents facteurs sont impliqués dans l'induction de l'embryogenèse somatique et la régénération, dans la plupart des études expérimentales, les effets étaient examinés séparément ce qui provoque la perte d'information cruciale sur d'éventuelles interactions possibles entre les facteurs dans la réponse embryogène. En plus, la présence d'une phase de callogenèse en culture *in vitro*, et particulièrement après la culture des protoplastes de patate douce, peut aboutir à l'apparition de variants avec des anomalies morphologiques et physiologiques reflétant une instabilité génétique (Sihachakr et Ducreux, 1993 ; Sihachakr et Ducreux, 1987a).

La transgenèse offre un potentiel intéressant pour l'amélioration de la patate douce par l'introduction de gènes étrangers intéressants (Yu et al., 2007). Cependant, l'application de cette technologie pour la patate douce nécessite la mise en place d'un système de transformation efficace et reproductible.

Nous avons effectué ce travail de recherche sur la Patate douce, en collaboration avec le laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale de l'Université Paris XI dans le cadre d'un projet Européen (contrat EU N°: ICA4CT2000-30005) visant à développer, par transformation génétique, des variétés de patate douce résistantes au complexe de potyvirus (sweet potato feathery mottle virus SPFMV ; potato latent virus SPLV et le virus G SPVG). Ces attaques virales dues aux potyvirus occasionnent des chutes considérables de rendement allant jusqu'à 60% (Feng et al., 2000). La technique de transformation proposée prévoit l'intégration du gène de résistance aux potyvirus dans le plasmide Ti d'*Agrobacterium*

tumefaciens et sa transmission à la plante par agroinfection. La réalisation de cet objectif nécessite la maîtrise d'un système de régénération performant.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Présentation du matériel végétal

1.1. Systématique

La patate douce (*Ipomoea batatas* L.(Lam.)) est une Dicotylédone gamopétale appartenant à l'ordre des polémoniales et à la famille des convolvulacées (Cavalcante-Alves, 1996).

Des études basées sur le nombre de chromosomes, l'analyse du génome et les possibilités de croisements ont permis de classer la patate douce et les espèces apparentées en trois groupes (Jones, 1965; Jones et Deonier, 1965; Martin et Jones, 1972; Nishiyama et al., 1975).

Le premier groupe (A) comprend des espèces diploïdes ($2n=2x=30$) ; *I. triloba*, *I. cordatotriloba*, *I. cynanchifolia*, *I. grandifolia*, *I. lacunosa*, *I. tricocarpa* et *I. ramosa*. Les espèces de ce groupe ont la même formule génomique AA, et sont autocompatibles et interfertiles.

Le deuxième groupe (B) comprend des espèces diploïdes et autoploïdes ($2x$, $4x$, $6x$) par doublement du génome B, avec *Ipomoea batatas* ($4x$, $6x$) et d'autres espèces sauvages, *I. trifida* ($2x$, $4x$, $6x$), *I. littoralis* ($2x$, $4x$), *I. tiliacea* ($2x$) et *I. leucantha* ($2x$, $4x$). Les espèces de ce groupe sont toutes autoincompatibles, mais compatibles entre elles (Jones et Deonier, 1965).

Le troisième groupe (X) est composé de deux espèces tétraploïdes, *I. gracillis* et *I. tiliacea*, dont la composition génomique n'est pas encore bien déterminée.

Il faut signaler aussi qu'il y a très peu de connaissances sur les différences entre les génomes du groupe A et ceux du groupe B au niveau chromosomique. La grande différence entre les deux groupes est leur caractère autocompatible vs autoincompatible. Les espèces des différents groupes sont incompatibles.

Il faut noter que *I. leucantha* a été classée dans le groupe A par Jarret et al. (1992), par contre, Nishiyama (1971) l'a classée dans le groupe B. *Ipomoea tiliacea* a été classée dans trois groupes différents (groupe A, B et X) respectivement par Ting et al. (1957), Jarret et al. (1992) et Nishiyama (1971).

1.2. Origine géographique

Il est généralement admis que la patate douce est originaire de l'Amérique (Huamàn et al., 1999). Austin (1988) a postulé que l'origine d'*Ipomoea batatas* serait quelque part entre la péninsule de Yucatan au Mexique et l'embouchure de la rivière Orinoco au Venezuela.

Les populations indigènes locales auraient découvert et domestiqué la patate douce. A partir de 2500 av. JC, la culture a probablement été disséminée par les Incas et les Mayas sur la plus grande partie des zones de culture connues au moment de l'arrivée des européens (Huamàn et al., 1999).

Le centre primaire de diversification se trouve au nord-ouest de l'Amérique latine (Colombie, Equateur et Pérou) et certaines parties de l'Amérique centrale comme le Guatemala où existent une grande diversité de patates douces autochtones, de mauvaises herbes et d'espèces sauvages. Des centres de diversification secondaires existent en Chine, dans le sud-est Asiatique, en Nouvelle guinée et dans l'est Africain (Huamàn et al., 1999).

La patate douce a été introduite en Europe de l'ouest à partir des Indes occidentales après le voyage de Christophe Colomb en 1492 (Srisuwan et al., 2006). Cependant, d'après les différents mémoires ethnohistoriques, la patate douce était, bien avant 1492, largement répandue dans les tropiques américains (Yen, 1982). Grâce aux preuves linguistiques, les voies de transmission peuvent être tracées comme suit (Figure 1):

- La voie « batatas » : les explorateurs portugais ont transféré les clones antillais cultivés en Europe de l'ouest méditerranéenne vers l'Afrique, l'Inde et l'Indonésie.
- La voie « kamote » : les galions de commerce espagnols reliant Acapulco à Manille propagèrent les clones de patate douce à partir du Mexique.
- La voie suivant le tracé «kumara ». Ici, un litige important et non encore tranché concerne l'identification des transporteurs de la plante d'Amérique du Sud en Polynésie orientale. Des analogies lexicales entre un nom quechua et le mot polynésien kumara suggèrent un transfert par l'homme, mais on ignore toujours si les responsables en étaient des voyageurs péruviens ou polynésiens.

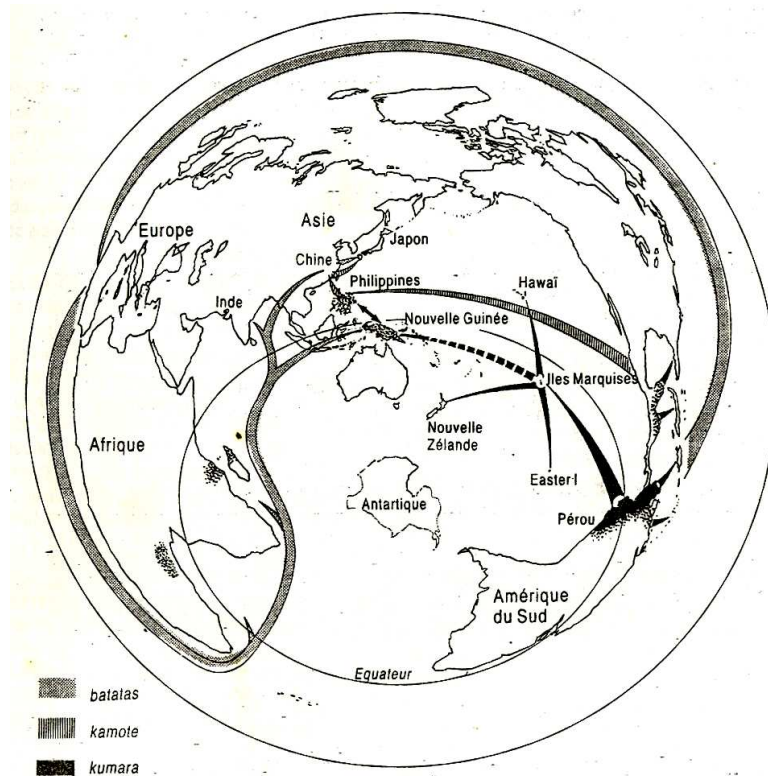


Figure 1 : historique de la dispersion de la patate douce au départ de l'Amérique (Diagramme de Winifred Mumford ; d'après Yen (1982))

1.3. Evolution

Ipomoea batatas n'est pas connue à l'état sauvage (Huamàn et al., 1999). Parmi les espèces du genre *Ipomoea* série batatas, treize sont considérées comme voisines de la patate douce mais l'ancêtre sauvage de cette plante n'est pas encore identifié (Srisuwan et al., 2006). Plusieurs hypothèses ont été émises dans le but d'expliquer l'origine de la patate douce (Srisuwan et al., 2006).

Il n'est pas encore précisé si cette espèce est allopolyploïde ou autopolyploïde. Mais la production de gamètes non réduits aurait pu faciliter l'évolution de la patate douce vers le niveau hexaploïde. La formation de pollen non réduit a déjà été observé chez *Ipomoea trifida* (Orjeda et al., 1990), chez certains *Ipomoea batatas* tetra et hexaploïdes (Bohac et al., 1992) et chez *Ipomoea trifida* triploïdes qui génèrent des génotypes 6x dans leur progéniture. Nishiyama (1971) et Austin (1988) ont suggéré une origine allopolyploïde et que *Ipomoea trifida* est l'une des espèces étroitement liée à la patate douce (Freyre et al., 1991). Nishiyama (1971) a proposé que la patate douce aurait pu provenir de *Ipomoea leucantha* 2x qui aurait

produit *Ipomoea littoralis* 4x et puis les croisements entre *Ipomoea leucantha* 2x et *Ipomoea littoralis* 4x seraient à l'origine de d'*Ipomoea trifida* 3x qui aurait donné *Ipomoea trifida* 6x. Des sélections supplémentaires et des domestications auraient abouti à *Ipomoea batatas* 6x. Nishiyama et al. (1975) ont signalé des similitudes dans les caractères de la plante, la compatibilité sexuelle, et le comportement entre la patate douce et des hybrides artificiels 6x produits entre *Ipomoea leucantha* et *Ipomoea littoralis*. En se basant sur des analyses numériques des caractères morphologiques clés, Austin (1988) a émis l'hypothèse que *Ipomoea triloba* et *Ipomoea trifida* seraient les espèces qui ont contribué au génome d'*I. batatas*. Il a aussi considéré que *Ipomoea tiliacea* aurait été impliqué dans l'origine de la patate douce. Par des études cytogénétiques, Shiotani (1988) a proposé que le génome de la patate douce a la même structure autohexaploïde que le génome B qui existe dans les autotétraploïdes et diploïdes du complexe *Ipomoea trifida*.

Les études moléculaires menées récemment sur la patate douce et les espèces diploïdes voisines par l'utilisation de marqueurs RAPD (Jarret et Austin, 1994), d'ISSR et des variations dans des sites de restriction de régions non codantes d'ADN chloroplastiques (Haung et Sun, 2000) montrent qu'*Ipomoea trifida* est la plus étroitement liée à la patate douce. De même, la construction de caryotypes cytogénétiques moléculaires basés sur la distribution de loci d'ARNr 18s et 5s et les régions riches en G et C (Srisuwan et al., 2006) aboutit à la même conclusion.

1.4. Caractéristiques morphologiques

C'est une plante herbacée rampante. Les tiges, plus ou moins poilues, sont un peu volubiles et mesurent de 50 cm à plus de 3m de long. Les feuilles, de forme variable, possèdent de longs pétioles et leur phyllotaxie est alterne spiralée de type 2/5 (Bouhassan, 1984).

Les racines sont de plusieurs types (Bouhassan, 1984):

- les racines adventives : ce sont des racines qui se développent directement sur la tige. Elles comprennent les racines à géotropisme positif ou racines porteuses de tubercules (thin roots, thick roots, string roots) dont certaines peuvent accumuler des réserves pour former les racines tubérisées. Il y a aussi les racines agéotropes qui restent fines.
- Les racines latérales qui apparaissent sur des racines déjà existantes.
- Les racines de tubercule qui prennent naissance sur les tubercules.

Les racines adventives qui apparaissent sur des boutures de tige sont de deux types :

➤ Les racines nodales: ce sont des racines préformées présentes en nombre variable au niveau de chaque nœud de part et d'autre de l'insertion du pétiole.

➤ Les racines internodales : ce sont des racines fines néoformées se développant le plus souvent à la base de la bouture.

Les fleurs, hermaphrodites et actinomorphes, sont en forme de cloche. Leur couleur dépend du clone: elle peut être violette, rouge ou blanche. Chez la patate douce, la floraison est rare et les fleurs sont souvent stériles. Toutefois, lorsque la fécondation a lieu, on obtient un fruit à péricarpe sec et déhiscent que l'on nomme capsule. Cette capsule est formée d'au moins deux carpelles soudés (Bouhassan, 1984).

1.5. Exigences écologiques et culture

La patate douce est propagée exclusivement par voie végétative, soit à partir de tubercules entiers ou de fragments de ceux-ci, soit à partir de portions de tiges de 20 à 50 cm de long comportant 3 à 4 nœuds (Cavalcante-Alves, 1996). Elle a un cycle court entre 120 et 210 Jours (Gura, 1991).

Sur le plan climatique, la patate douce est une plante extrêmement flexible (Cheikh, 1984). Elle peut être cultivée à des altitudes comprises entre le niveau de mer et des élévations allant jusqu'à 2500 m, et entre les latitudes 40°N et 32°S. Elle a besoin d'une pluviométrie abondante et bien répartie d'environ 600 mm/an, et sous un ensoleillement abondant. Elle exige une saison de croissance présentant 4 à 5 mois sans gel pour produire des racines tubérisées de gros calibre. Des températures de 15°C ou moins donnent une croissance faible ou nulle (Chée et al., 1992).

C'est une plante de jours courts et la photopériode de moins de 11 heures peut stimuler l'induction de la floraison. Par contre, si la photopériode dépasse les 13h30, la floraison est inhibée (Sihachakr et al., 1997).

Elle est cultivable même sur les sols pauvres, mais elle préfère un sol profond, frais et riche en humus (Cavalcante-Alves, 1996) et pousse mieux sur des sols aérés de type sableux avec des pH oscillant entre 5 à 7,8 (Chée et al., 1992). Elle n'exige pas beaucoup de fertilisants et autres intrants et elle est relativement résistante aux stress environnementaux (Shimada et Otani, 2007).

Cependant, le mode de propagation exclusivement végétatif, qui garantit la stabilité et la conformité des plantes propagées, présente en même temps de nombreux problèmes liés aux difficultés de conservation des racines tubérisées, à l'hétérogénéité de la plantation due à des gradients morphologiques et anatomiques le long des racines tubérisées et surtout aux

nombreuses maladies essentiellement virales transmises par les semences (Cavalcante-Alves, 1996).

1.6. Intérêts et importance économique

1.6.1. Valeur nutritionnelle

La patate douce est utilisée essentiellement pour l'alimentation humaine à cause de sa valeur nutritive élevée. Elle contient approximativement 20 % d'amidon et 5% de sucres simples (Huang, 1982). C'est aussi une bonne source de protéines (1,3 à 12,1 %), vitamine A, riboflavine, et calcium (Cavalcante-Alves, 1996). Les cultivars à chair tachetée d'orange sont particulièrement riches en vitamine A (Moyer, 1982a). Dans beaucoup de pays, les racines et le feuillage sont utilisés pour l'alimentation des animaux. La patate douce peut aussi fournir de l'énergie issue de la biomasse avec à peu près 782 galons d'alcool/acre (Cavalcante-Alves, 1996). Elle est considérée comme un aliment hautement énergétique avec approximativement 100 cal/100 g.

Au Japon, des recherches sont menées afin de développer des utilisations alternatives de la patate douce. De nouveaux cultivars ont été développés comme par exemple un cultivar permettant l'utilisation des parties apicales comme légumes pour l'alimentation humaine et des cultivars à tubercules comprenant une teneur élevée en carotène et anthocyanines (Shimada et Otani, 2007).

1.6.2. Importance économique

a. Dans le monde

La patate douce, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. est la septième plus importante culture dans le monde et la cinquième dans les pays en voie de développement après le riz, le blé, le maïs et le cassava (Shimada et Otani, 2007).

Le tableau 1 résume les statistiques concernant la production de la patate douce de différentes régions du monde (FAOSTAT, 2008). La production mondiale de la patate douce s'élevait en 2006 à 123.509.771 tonnes sur une surface totale cultivée de 8.996.472 Ha (FAOSTAT, 2008). Le plus grand producteur est la Chine avec plus de 100 millions de tonnes sur une surface de 4708503 Ha soit environ 81% de la production mondiale et 53 % des surfaces cultivées. En Afrique, la production totale est de 8,5 millions de tonnes ce qui correspond à moins de 7% de la récolte mondiale. Les pays en voie de développement produisent 98,5 % de la production mondiale ce qui justifie son statut de culture des pauvres.

Les rendements varient largement en fonction des zones géographiques et oscillent entre plus de 21 tonnes/ha en Chine et seulement 4 tonnes/ha en Afrique.

Tableau 1 : Statistiques de la production de patate douce (d'après FAOSTAT, 2008).

	Production (tonnes)	Surface cultivée (Ha)	Rendement par hectare (kg/Ha)
Monde	123509771	8996472	13728,69
Asie	107319707	5465917	19634,35
Afrique	12903597	3154247	4090,86
Amérique Nordique	737101	35139	20976,72
Amérique Centrale	62967	3144	20027,67
Amérique Latine et Caraïbes	1846094	221490	8334,89
Europe	77342	6479	11937,34
Monde Pays Développés	1826680	83843	21786,91
Monde Pays en voie de Développement	121683091	8912629	13652,88
Pays les moins développés	8766401	2032034	4314,10
Chine	100222120	4708503	21285,35
Maroc	10120	565	17911,50

b. Au Maroc

Les principales variétés utilisées au Maroc sont : Reine du sud et Rose de molorga. La culture de cette plante est pratiquée surtout dans les plaines du Nord-ouest : Saïs, Salé, Casa et Doukkala (Skiredj et al., 2007).

La production nationale en 2006 (tableau 1) était de 10120 Tonnes sur une surface totale de 565 Ha soit un rendement de 17.9 T/Ha (FAOSTAT, 2008).

1.7. Principales maladies et ravageurs de la patate douce

Malgré la nature rustique de la patate douce, elle est menacée par plusieurs types de stress biotiques et abiotiques, surtout les nombreux dommages causés par les maladies virales, bactériennes et les ravageurs (Shimada et Otani, 2007). Dans ce paragraphe, nous présenterons les problèmes les plus fréquents et qui sont omniprésents dans les programmes d'amélioration génétique.

1.7.1. Les ravageurs

Les charançons (*Cylas formicarius elegantulus* (Summers), Curculionidae, Coléoptères) et leurs larves sont les plus destructeurs parmi les ravageurs de la patate douce (Dhakhwa, 2008). Les dommages occasionnés peuvent réduire la croissance dès le premier mois de plantation mais d'autres dommages ne sont pas visibles avant la récolte. Les insectes s'attaquent aux racines de la patate douce dans le champ et pendant la conservation (Talekar, 1982). Les larves et les adultes vivent sur le feuillage mais préfèrent attaquer les tiges et les parties souterraines (Dhakhwa, 2008). Les larves creusent des galeries dans les tiges et les racines et les remplissent avec leurs excréments qui dégagent une odeur caractéristique de terpène perceptible même dans les racines endommagées, ce qui les rend impropres à la consommation humaine (Talekar, 1982). Il est difficile de lutter contre le charançon malgré l'utilisation des insecticides (Talekar, 1982).

1.7.2. Les maladies

La patate douce est attaquée par de nombreuses maladies d'origines diverses. Les plus importantes sont celles qui se répercutent directement sur la qualité de la récolte et qu'on appelle les maladies post récolte et qui sont en particulier provoquées par des agents viraux.

a. Les maladies post récolte

Ce sont des maladies qui touchent les racines récoltées. Les plus dévastatrices apparaissent quelques heures après l'arrachage (Moyer, 1982a). Certaines de ces maladies qui apparaissent pendant la conservation sont en fait présentes avant la récolte. D'autres maladies peuvent également provenir des semences utilisées pour la multiplication (Moyer, 1982a).

Il est possible de classer les maladies en trois catégories, d'après la position de l'infection initiale par rapport au moment de la récolte on distingue: les maladies contractées avant la récolte, les maladies contractées pendant le déroulement de la récolte et les maladies contractées pendant la conservation et l'expédition.

➤ Infection avant la récolte

Les germes pathogènes responsables de ces maladies sont fréquemment introduits lorsque l'on utilise des semences infectées pour la multiplication. Ainsi, la pourriture noire,

causée par *Ceratocystis fimbriata* provoque des lésions circulaires de couleur sombre visibles sur les tiges et les racines souterraines et peuvent pénétrer vers l'anneau vasculaire. L'envahissement secondaire peut aboutir au dépérissement de la racine entière. L'agent pathogène est propagé sur les semences et jeunes rejets chez lesquels les symptômes sont indiscernables, et il est capable de survivre sur les débris abandonnés au champ. Il sporule sur les racines pendant la conservation. Les mites peuvent propager l'inoculum ce qui augmente l'incidence de la maladie. Par contre, les pellicules, causées par *Monilochaetes infuscans* Ell et Halst ex Harter, sont essentiellement une maladie cosmétique. La colonisation est limitée au périoderme et n'affecte pas la partie comestible de la racine, mais les taches superficielles brun foncé à noir de la peau de la racine déplaisent aux consommateurs. De plus, un rapetissement marqué se produit pendant la conservation, dû à la perte excessive d'eau des zones éclatées du périoderme. Les lésions grandissent pendant la conservation. Les conidies sont produites en longues chaînes sur la surface de la racine d'où elles peuvent gagner d'autres racines et propager l'infection. Contrairement à beaucoup de germes pathogènes de la racine de la patate douce, *Monilochaetes infuscans* n'infecte pas à la faveur d'une blessure. Les appressoria se forment sur la surface de la racine à partir de tubes à germes et le périoderme est ensuite colonisé de façon intracellulaire (Moyer, 1982a).

Le nématode *Meloidogyne spp*, peut être l'origine des craquelures ou d'autres blessures susceptibles de faciliter l'entrée d'autres germes pathogènes. De plus, des amas d'œufs sont quelquefois trouvés dans le périoderme ou l'écorce des racines cultivées dans des champs fortement infestés (Moyer, 1982a).

Les maladies virales appelées généralement SPVD (sweet potato virus disease) entrent aussi dans cette catégorie. Une vingtaine de types de virus ont été signalés chez la patate douce dans le monde (Salazar et Fuentes, 2001). L'infection par les virus est la première cause de déclin des variétés (Daifu et al., 2001), et les chutes de rendement suite à l'infection peuvent être considérables. Elles peuvent atteindre la totalité de la récolte. Les virus sont transmis soit par les pucerons, soit par les aleurodes (Salazar et Fuentes, 2001) mais proviennent aussi des semences infectées (Fajardo et al., 2002).

➤ Infection au moment de la récolte

Les maladies de cette catégorie sont habituellement causées par des organismes du sol, qui infectent les racines de patate douce à travers les blessures fraîches. Même la plus

petite éraflure, en enlevant un peu de "peau ", peut fournir l'entrée nécessaire à l'infection (Moyer, 1982a). Dans cette catégorie, on peut citer la pourriture de surface causée par le champignon *Fusarium oxysporum* Schlert. Elle provoque des lésions circulaires qui deviennent visibles 3 à 4 semaines après la récolte. La pourriture noire de Java, causée par *Diplodia tubericola* (EII et Ev) Taub, et la pourriture charbonneuse, causée par *Macrophomina phaseoli* (Tossi) Goid sont également d'importants pathogènes pouvant infliger des pertes sévères pendant la conservation (Moyer, 1982a).

➤ Infection au stade post-récolte

Ce sont surtout les maladies qui provoquent la pourriture des racines quelques heures ou jours après l'infection, ce qui les rend impropres à la vente ou à la consommation. Ces maladies sont fréquemment observées immédiatement après la récolte. Les petites blessures infligées aux racines au cours du nettoyage, l'eau de lavage contaminée et l'emballage de racines humides, constituent des conditions quasi optimales pour l'infection au moment où les racines sont enlevées du lieu de stockage et conditionnées pour être expédiées sur le marché. La production par la plante d'enzymes pectolytiques, après l'infection, entraîne une dissolution rapide des parois cellulaires et l'apparition d'une maladie caractérisée par la pourriture molle des tissus (Moyer, 1982a).

Une des pourritures molles est causée par *Rhizopus stolonifer* (Ehr ex Fr) Und. Les tissus infectés par ce champignon sont mous, humides et filandreux. Ils dégagent une odeur douceâtre caractéristique. Un élément diagnostique de la maladie est la présence de mycélium dense, aérien à spores brun foncé, souvent appelé «favoris ». Une seule racine tubérisée infectée peut, si elle est introduite dans un réservoir de lavage, contaminer toutes les racines qui seront nettoyées avec cette eau. La bactérie *Erwinia chrysanthemi* provoque une autre pourriture qui peut être confondue avec la précédente dans sa phase racinaire. La maladie est classée comme maladie post-récolte à cause de ses effets dévastateurs sur les racines. Cependant, elle pourrait tout aussi bien être classée dans les deux autres catégories, puisque les plants sont aussi infectés au champ (Moyer, 1982a).

b. Maladies virales

Les maladies virales appelées généralement SPVD (sweet potato virus disease) sont les maladies les plus importantes en Afrique et probablement dans le monde (Gibson et al.,

2004). Elles sont considérées comme la principale cause d'extinction de variétés (Salazar et Fuentes, 2001).

Une vingtaine de types de virus ont été signalés chez la patate douce dans le monde dont trois ont été trouvés en Chine: « Sweetpotato feathery mottle virus” (SPFMV), “Sweet potato latent virus” (SPLV) et “Sweet potato caulimo-like virus” (SPCLV) (Feng et al. 2000). Ils sont transmis soit par les pucerons soit par les aleurodes (Salazar et Fuentes, 2001).

Les symptômes des virus occasionnant des maladies chez la patate peuvent être classés en six catégories: des étiolements en spots sur les feuilles, des feuilles tachetées (mottled leaves), des feuilles enroulées, des feuilles plissées ou froissées, des feuilles jaunes et des racines tubérisées craquelées (Feng et al., 2000).

Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) est le plus fréquent dans le monde et le plus caractérisé parmi les virus infectant la patate douce (Moyer et Abad, 2001). Il est responsable de la maladie dite craquelure rousse. Cependant, l'infection par ce seul virus ne donne pas de symptômes en Afrique (Gibson et al., 2004). Les atteintes virales sont souvent dues à des complexes de virus (Salazar et Fuentes, 2001) qui diffèrent d'une zone géographique à une autre. Ainsi, en Afrique, les symptômes sont fréquemment dus aux virus Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) et Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) (Gibson et al., 2004) alors qu'en Chine, les principaux virus sont Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) et Sweetpotato Latent Virus (SPLV) suivis par Sweetpotato Caulimo-Like Virus (SPCLV) (Feng et al., 2000). La symptomatologie semble varier en fonction du complexe de virus à tel point qu'elle devient difficile à distinguer pour les observateurs non expérimentés (Salazar et Fuentes, 2001).

L'infection par les virus est la première cause de déclin des variétés (Daifu et al., 2001), et les chutes de rendement suite à l'infection sont considérables et peuvent atteindre 99% du rendement.

En absence de chimiothérapie pour traiter ces maladies, la culture de méristèmes était devenue la technique la plus efficace pour éliminer les virus de la patate douce (Feng et al. 2000). L'utilisation de plants indemnes de virus peut restaurer les excellents rendements d'origine et augmente la résistance à d'autres pathogènes comme *Monilochaetes infuscans* et *Ceratocystis fimbriata* et le nématode *Pratylenchus coffeae* (Feng et al. 2000). Cependant, plusieurs problèmes limitent la bonne utilisation de cette technologie comme le coût élevé des semences saines, des systèmes de distribution de semences mal organisés et une technologie de détection peu fiable (Daifu et al., 2001). En plus, le rendement diminue graduellement au cours des plantations successives suite à la réinfection par les virus. Le potentiel

d'augmentation du rendement pour les plants indemnes de virus peut être maintenu pendant 3 à 4 ans (Feng et al., 2000).

2. Amélioration génétique chez la patate douce

2.1. Amélioration classique

La patate douce est menacée par de nombreux stress biotiques et abiotiques, en particulier les dommages sévères causés par les maladies virales et bactériennes et les parasites (Shimada et Otani, 2007), ce qui explique le besoin persistant d'amélioration de cette culture.

La constitution d'une large base génétique est un préalable important à toute amélioration génétique. Plusieurs centres ont constitué des banques de gènes. D'après un rapport préparé pour la Conférence technique internationale sur les ressources phylogénétiques organisée à Leipzig en Allemagne en 1996 (FAO, 1996), le nombre d'obtentions de patate douce et espèces voisines collectionnées dans le monde est estimé à 31796 dont 40% dans des centres internationaux ou régionaux. La collection la plus importante se trouve au CIP (International potato center – Pérou) avec 21% des obtentions.

La multiplication végétative, qui présente le risque de transmission de maladies virales, limite l'échange de matériel végétal au niveau international (Fajardo et al., 2002).

Le succès de toute conservation ou programme d'amélioration dépend de la compréhension de la distribution de la diversité génétique au sein du pool génétique (Zhang et al., 2000). La caractérisation des collections de germplasmes était basée traditionnellement sur des caractères morphologiques (Fajardo et al., 2002) et/ou agronomiques (Huamàn et al., 1999). Cependant, dans la mesure où le degré d'expression de certains caractères morphologiques varie avec l'environnement, il peut s'avérer difficile de déterminer certains caractères avec exactitude. L'utilisation des marqueurs génétiques pour établir les relations génétiques et l'ampleur de la diversité des collections de germplasmes assure un moyen alternatif pour la caractérisation des collections comme base pour la sélection au sein de la collection (Brown, 1989). Les marqueurs moléculaires ne sont pas soumis aux effets de l'environnement, ils sont virtuellement en nombre illimité et leur analyse peut être automatisée (Fajardo et al., 2002).

Différents marqueurs moléculaires ont été utilisés pour caractériser la patate douce et ses espèces voisines comprenant notamment la variation des sites de restriction de chloroplastes (McDonald et Mabry, 1992), RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (Jarret et al., 1992), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

(Williams et al., 1990 ; Gichuki et al., 2003a), La DAF (DNA Amplification fingerprinting) (Caetano Annollés et al., 1991) et plus récemment les SSRs (simple sequence repeats) (Hwang et al., 2002) et l' AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Huang et al., 2002, Zhang et al., 2004, El Ameen et al., 2008).

La constitution d'un pool génétique a stimulé l'effort d'amélioration chez la patate douce. Des progrès ont été réalisés par l'utilisation des méthodes de sélection classiques pour l'introduction des caractères de résistance aux maladies (Terry, 1981; Arrendell et Collins, 1986; Clark, 1986), aux nématodes (Jones et Dukes, 1980) et aux insectes (Jones et Cuthbert, 1973), ainsi que pour l'amélioration de la teneur en protéines et de la qualité du tubercule (Water et al. 1984), notamment suite à l'hybridation avec l'*Ipomoea trifida* (Iwanaga et al., 1991). Cependant ces efforts sont sérieusement handicapés par la reproduction sexuée défectueuse chez la patate douce. En effet, en plus d'une floraison souvent faible (Van Reennen, 1965), plusieurs auteurs font état de faiblesses au niveau de la fructification et la grenaison chez la patate douce (Van Reennen, 1964 ; Van Reennen, 1965), chez les espèces voisines (Wedderburn, 1967) et leurs hybrides (Martin, 1970a). Ces faiblesses sont dues à deux phénomènes distincts : l'auto-incompatibilité et la stérilité (Martin, 1970b). En plus, il est souvent nécessaire de stimuler la floraison par des méthodes comme l'accrochage à des supports ou tuteurage et le greffage sur différentes espèces d'*Ipomoea*, qui ont donné des résultats satisfaisants (Van Rheenen, 1965).

L'auto-incompatibilité existe chez la patate douce, et beaucoup d'espèces primitives du genre *Ipomoea* ainsi que chez d'autres genres de la famille des convolvulacées (Martin, 1982). Ce phénomène se retrouve même chez des espèces sauvages diploïdes comme *Ipomoea trichocarpa* et *Ipomoea gracilis* (Wedderburn, 1967) et *Ipomoea setifera* (Martin, 1982). C'est un système d'auto-incompatibilité double ou triple de type sporophytique multi-allèles (Martin, 1982).

La stérilité de la patate douce et de ses hybrides avec des espèces voisines résulte de plusieurs phénomènes comme l'avortement du pollen, l'échec de la germination du pollen, la faiblesse de croissance du tube pollinique et la formation de petites graines immatures (Martin, 1970). Cette stérilité s'exprime donc à de nombreux stades et serait due à un déséquilibre génétique accompagnant l'hexaploïdie (Martin, 1982).

L'amélioration classique de la patate douce basée sur l'hybridation sexuée se trouve donc limitée par la stérilité et l'auto-incompatibilité de cette plante (Otani et Shimada, 2002; Shimada et Otani, 2007). En plus, le processus de sélection est un travail de longue haleine et exige la manipulation d'un grand nombre d'individus et des systèmes d'amélioration

sophistiqués à cause de l'état hexaploïde de la patate douce et aussi de la différence de niveau de ploïdie avec les espèces apparentées, notamment *Ipomoea trifida* (Srisuwan et al., 2006 ; Cavalcante-Alves, 1996). Il était donc devenu impératif de faire appel à des techniques modernes de biotechnologie comme la culture *in vitro* et la transformation génétique.

2.2. Amélioration par les méthodes de biotechnologie

2.2.1. Culture de nœuds et d'apex

L'ensemencement de fragments de tige de 1 cm de long comprenant un nœud permet une multiplication efficace et conforme. Le milieu de culture comprend en général la composition minérale de Murashige et Skoog (1962) additionnée de 0,5 à 1 mg/L d'AIA (Cavalcante-Alves, 1996).

2.2.2. Culture de méristèmes

Plusieurs travaux ont été réalisés dans le but d'obtenir des plants indemnes de virus. En général, des dômes méristématiques de 0,2 à 0,5 mm sont prélevés à partir de bourgeons axillaires (Feng et al., 2000). Ces méristèmes sont cultivés sur milieu MS additionné de 1 mg/L de BAP, 0,01 mg/L d'ANA et 1 mg/L de GA₃. La détection des virus peut se faire soit par indexage en greffant la plante supposée infectée sur des plantes indicatrices sensibles telles que *Ipomoea setosa* ou par détection sérologique de type ELISA ou Dot-ELISA (Feng et al., 2000).

2.2.3. Organogenèse

L'application de techniques d'amélioration de la patate douce incluant la variation somaclonale, le transfert de gènes par transformation génétique et l'hybridation somatique exigent la maîtrise de la régénération de plantes par culture *in vitro* (Sihachakr et al., 1997).

La patate douce est considérée comme récalcitrante pour la régénération à cause de la faible fréquence et l'effet du génotype (Shimada et Otani, 2007).

Plusieurs travaux ont montré la capacité de fragments de tige à régénérer des pousses (Sihachakr, 1982; Bouhassan, 1984; Houndonougbo, 1989). Les bourgeons se développent sur les explants, soit au niveau des cals cicatriciels, soit directement sur les explants à proximité des zones lésées, soit sur les racines néoformées (Sihachakr, 1982 ; Houndonougbo, 1989). Le résultat optimal est obtenu sur un milieu comprenant une combinaison de 2,4D et de kinétine à 0,01 mg/L chacune (Sihachakr, 1982 ; Houndonougbo, 1989) mais avec un effet à la fois de la variété et de la polarité sur la réponse (Houndonougbo, 1989).

Des explants foliaires ont aussi permis la régénération de plants. Ainsi, Wang et al. (1999) rapportent que la combinaison de 0,05 mg/L de 2.4D et 0,5mg/L de kinétine était utile pour une régénération efficace à partir de cals issus de pétioles. De même, Le thidiazuron a permis la régénération de pousses à partir de fragments de pétiole du cultivar PI318846-3' dont plus de 77% des explants cultivés ont formé des pousses (Gosukonda et al., 1995 a et b). Des plants ont aussi été régénérés à partir d'explants foliaires selon le même protocole en utilisant la zéatine riboside à la place du thidiazuron (Porobo Dessai et al., 1995). Des pousses adventives ont été régénérées directement à partir d'explants de pétioles ou de limbe chez 18 parmi 27 géotypes testés.

Otani et al. (1996) rapportent que la présence d'ABA ou de nitrate d'argent (AgNO_3) dans le milieu d'induction de cals stimule la formation de pousses et l'optimum de concentration était de 2 mg/L. La fréquence de régénération était de 70 et 73,3% pour les explants issus de feuilles.

Chez la patate douce, des fragments de racines régénérées peuvent être induits à former des pousses. Cette forme de régénération a été obtenue par Pido et al. (1995) sur milieu MS additionné de 0,2 mg/L d'ANA seul ou combiné avec 0,1 mg/L de BAP alors que Carsweell et Lucy (1984) ont utilisé 1mg/L d'ANA et 0,1 mg/L d'AIB. Cette caractéristique a été exploitée par Sihachakr et al. (1997) pour régénérer des pousses à partir des cultures de protoplastes.

2.2.4. Culture et fusion des protoplastes

L'isolement, la culture des protoplastes et la régénération de plantes constituent un préalable nécessaire pour réaliser le transfert de gènes par l'hybridation somatique ou la transformation génétique (Sihachakr et al., 1997).

Chez la patate douce, les protoplastes constituent une source intéressante pour la production d'hybrides somatiques avec les cultivars et les espèces apparentées sexuellement incompatibles, et aussi pour la transformation génétique (Shimada et Otani, 2007). En plus, l'hétérogénéité cellulaire des populations de protoplastes est particulièrement intéressante pour l'isolement de variants somaclonaux avec des caractères améliorés tels qu'une meilleure performance ou une meilleure qualité des racines tubérisées (Sihachakr et al., 1997).

Des travaux sur l'isolement des protoplastes chez la patate douce ont été publiés dès les années 80. Les tissus sources de ces protoplastes étaient souvent constitués de fragments de pétiole (Bidney et Shepard, 1980 ; Sihachakr et Ducreux, 1987a et 1987b ; Sihachakr et al., 1997 ; Perra et Ozias-Akins, 1991; Belarmino et al., 1994 ; Dhir et al. ; 1998), de fragments

de tige (Sihachakr et al., 1997 ; Belarmino et al., 1994), de cals riches en anthocyanes (Nishimaki et Nozue, 1985; Sihachakr et al., 1997) ou de cals et suspensions embryogènes (Sihachakr et al., 1997).

Des rendements en protoplastes similaires ont été obtenus chez les plantes donneuses cultivées sous serre et *in vitro* (Sihachakr et Ducreux, 1987a, 1987b, 1993).

Le mesophylle foliaire est en général résistant à la digestion enzymatique (Bidney et Shepard, 1980; Sihachakr et Ducreux, 1987a et 1987b). Cependant, Otani et al (1987) ont isolé des protoplastes à partir du mesophylle de la variété Jewel par l'utilisation d'un fragment apical représentant environ le quart des feuilles complètement étalées qui avaient été incubées au préalable dans l'eau stérile avant d'être traitées avec une solution enzymatique.

La régénération de plantes à partir de culture de protoplastes a rencontré des difficultés. Ainsi, dans certains cas, les protoplastes ont donné seulement des cals (Nishimaki et Nozue, 1985) ou des cals avec racines (Otani et al., 1987). Sihachakr et al. (1997) ont obtenu des cals organogènes avec des zones vertes donnant des pousses chez seulement deux variétés alors que les huit autres variétés formaient seulement des racines. Ils ont obtenu des bourgeons après le repiquage de fragments de racines sur un milieu de régénération approprié. Un protocole similaire a été réalisé par Perra et Ozias-Akins (1991).

L'utilisation de cals ou de suspensions cellulaires embryogènes n'a pas permis de régénérer des plantes à partir de protoplastes et donc la capacité embryogène n'est pas maintenue Sihachakr et al. (1997). Cependant, la régénération par embryogenèse somatique à partir de protoplastes issus de pétiole a été réussie par Dhir et al., (1998) et Belarmino et al. (1994).

La conformité des plants régénérés à partir de protoplastes varie d'un travail à un autre. Dhir et al. (1998) et Perra et Ozias-Akins (1991) ont obtenu des plants phénotypiquement normaux alors que Sihachakr et al. (1997) ont obtenu à la fois des plantes phénotypiquement normales et des plantes montrant des anomalies morphologiques: fasciculées, abondamment ramifiées et naines.

Peu de travaux ont été signalés dans le domaine de la fusion somatique chez la patate douce (Shimada et Otani, 2007). Wang et al. (1997) ont obtenu des hybrides somatiques entre deux cultivars incompatibles Koganesengan et Bitambi et l'hybride obtenu avait le nombre de chromosomes prévisible ($2n = 12x = 180$) et montrait une croissance lente et une faible fertilité pollinique. Liu et al. (1993a) ont réussi à produire un hybride interspécifique entre la patate douce cv. 'Kokei 14' et *Ipomoea triloba* mais le caractère hybride n'a pas été confirmé. Une fusion interspécifique entre la patate douce cv. 'Bitambi' et *Ipomoea triloba* a

donné des plants hybrides possédant une morphologie intermédiaire et un nombre de chromosomes compris entre 45 et 65 (Wang et al., 1998).

En plus, Belarmino et al. (1996) ont réalisé une fusion asymétrique entre la patate douce et *Ipomoea trifida* ou *Ipomoea lacunosa* irradiés avec les rayons X. Ils ont obtenu des plants hybrides pour la combinaison cv. « Shirosumata » et *Ipomoea trifida*. L'état hybride des plantes a été confirmé par l'analyse isoenzymatique.

Les hybrides somatiques n'ont pas été analysés en détail pour leurs caractères tels que le système racinaire et la descendance. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour l'obtention d'hybrides somatiques entre des génotypes sexuellement incompatibles (Shimada et Otani, 2007).

3. Embryogenèse somatique chez la patate douce

3.1. Généralités sur l'embryogenèse somatique

3.1.1. Définitions

L'embryogenèse somatique est la formation d'embryons à partir de cellules non issues de la fusion des gamètes (Ammirato, 1983).

Le développement de l'embryon somatique ressemble étroitement à celui de l'embryon zygotique à la fois morphologiquement et physiologiquement (Zimmerman, 1993). Il est caractérisé par l'existence d'un axe polarisé terminé par un méristème de tige et un méristème de racine et son développement s'effectue selon une séquence de stades définis dont les principaux sont: le stade globulaire, cordiforme, torpille, et cotylédonaire (Margara, 1982).

L'embryogenèse somatique est donc utilisée par extension comme un système expérimental pour examiner les événements morphologiques, physiologiques et biochimiques durant l'embryogenèse (Zimmerman, 1993). Cependant, Il y a quelques différences entre les deux types d'embryogenèse dont les principaux caractères sont l'absence de différenciation d'albumen, développement absent ou retardé, l'absence de dessiccation et de dormance et l'acquisition de la compétence avant le développement des embryons dans l'embryogenèse somatique (Féher et al., 2003).

3.1.2. Les principales étapes de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est un processus de régénération qui, d'après Von Arnold et al. (2008) se déroule en 5 étapes essentielles qui sont :

- ◆ Initiation des cultures embryogènes (PEMs) par culture de l'explant initial sur un milieu contenant des régulateurs de croissance surtout l'auxine avec souvent des cytokinines. Cette transition de la cellule somatique à l'état embryogène est un processus complexe comprenant la dédifférenciation, la réactivation des divisions cellulaires et une reprogrammation du développement (Féher et al., 2003). L'initiation de la voie de l'embryogenèse est limitée à certaines cellules de l'explant (Von Arnold, 2008) qui subissent un ensemble de modifications et se transforment en cellules dédifférenciées compétentes pour l'embryogenèse.

- ◆ Prolifération des cultures embryogènes sur milieu solide ou liquide contenant une composition en régulateurs de croissance similaire à celle de l'étape précédente. Pour la propagation à grande échelle, il est souvent préférable d'établir des suspensions cellulaires (Von Arnold et al., 2002).

- ◆ Prématuration des embryons somatiques sur milieu généralement dépourvu de régulateurs de croissance ce qui inhibe la prolifération cellulaire mais stimule la formation des embryons et le début du développement (Von Arnold et al., 2002). L'élimination ou la réduction de l'auxine dans le milieu de culture est en général préconisée durant cette phase. Avec cette réduction, le blocage de l'expression des gènes nécessaires au passage au stade cordiforme est levé (Zimmerman, 1993).

- ◆ Maturation des embryons somatiques par culture sur un milieu contenant l'ABA et/ou un faible potentiel osmotique.

- ◆ Développement de plants sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance.

3.1.3. Origine cellulaire de l'embryon somatique

L'embryon somatique peut avoir une origine unicellulaire (Sharp et al. 1980; Wann, 1988 ; Féher, 2006 ; Samaj et al., 2006). Il est largement admis que les cellules embryogènes compétentes peuvent être reconnues morphologiquement comme des cellules de petite taille arrondies, avec un cytoplasme riche, un gros noyau central et de petites vacuoles. Elles sont ainsi similaires aux cellules méristématiques ou au zygote et cette ressemblance est renforcée par la division inégale (Féher, 2006). En plus, elles sont couvertes par un réseau de matériel fibrillaire formant la couche la plus externe de la paroi appelée ECMSN (the extracellular

matrix surface network) qui a été trouvée chez plusieurs espèces végétales Dicotylédones, Monocotylédones et Gymnospermes (ˆSamaj et al., 2006). ECMSN est observée dans les premiers stades embryonnaires dont le stade globulaire et disparaissent quand le protoderme est formé (Dubois et al. 1992; ˆSamaj et al. 1995). Ces cellules sont aussi entourées de callose et isolées des autres cellules par obturation des plasmodesmes (Suprasanna et Bapat, 2006). La cutine forme aussi une couche continue et homogène dans les régions embryogènes et sur les embryons (Tchorbadjieva, 2006). Elle isole physiologiquement les cellules compétentes de leurs voisines et protège l'embryon contre la perte d'eau et l'action des enzymes hydrolytiques de la paroi (Tchorbadjieva, 2006).

Ces cellules compétentes peuvent être aussi caractérisées par la position centrale du noyau et présentent des particularités relatives à l'organisation de leur cytosquelette (ˆSamaj et al. 2006).

Plusieurs auteurs ont aussi suggéré que l'embryon somatique peut avoir une origine multicellulaire (Hamama, 2002). Ainsi, chez le cocotier, Verdeil et al. (1994) ont conclu que l'initiation des embryons est d'origine pluricellulaire et que cette voie est le plus souvent à l'origine de structures embryonnaires incomplètes et sans méristème caulinaire. De même, chez le bananier, Lee et al. (1997) ont montré que l'embryon somatique issu de sections de rhizome peut être d'origine unicellulaire à partir du tissu vasculaire ou d'origine multicellulaire à partir de tissus périvasculaires.

Des coupes réalisées à différents niveaux des amas cellulaires de *Daucus carotta* ont permis de mettre en évidence, au microscope électronique, la présence de régions méristématiques, où les cellules se recloisonnent pour former des groupes bien individualisés de cellules à cytoplasme dense (Benbadis, 1973). Leur paroi épaisse rappelle l'épaississement de la paroi des embryons zygotiques, et le non fonctionnement d'un grand nombre de plasmodesmes montre qu'il y a suppression de certaines communications et corrélations avec les cellules avoisinantes.

3.2. Mécanismes cellulaires de l'embryogenèse somatique

Le processus de l'embryogenèse somatique débute par l'acquisition de la compétence embryogène. Cette acquisition exige à la fois la présence d'un potentiel génétique et l'optimisation des conditions de culture (ˆSamaj et al. 2006).

La figure 2 présente un modèle hypothétique des événements cellulaires qui sont à l'origine de l'embryogenèse somatique (Fehér, 2006). Selon ce modèle, des cellules de l'explant reçoivent une multitude de signaux parallèles qui permettent leur transformation en

cellules dédifférenciées compétentes pour l'embryogenèse. Ces cellules seront effectivement embryogènes si les conditions cellulaires et externes permettent l'expression du programme embryogénique qui est, dans la plupart des cas, antérieur ou en parallèle avec les divisions cellulaires (Fehér, 2006). Quand l'embryon est d'origine unicellulaire, une division inégale se produit, il en résulte une cellule terminale dont le cytoplasme est riche et une cellule basale très vacuolisée et large. Des divisions supplémentaires accompagnées par l'établissement de la polarité et la formation du modèle aboutissent au développement de l'embryon (Fehér, 2006).

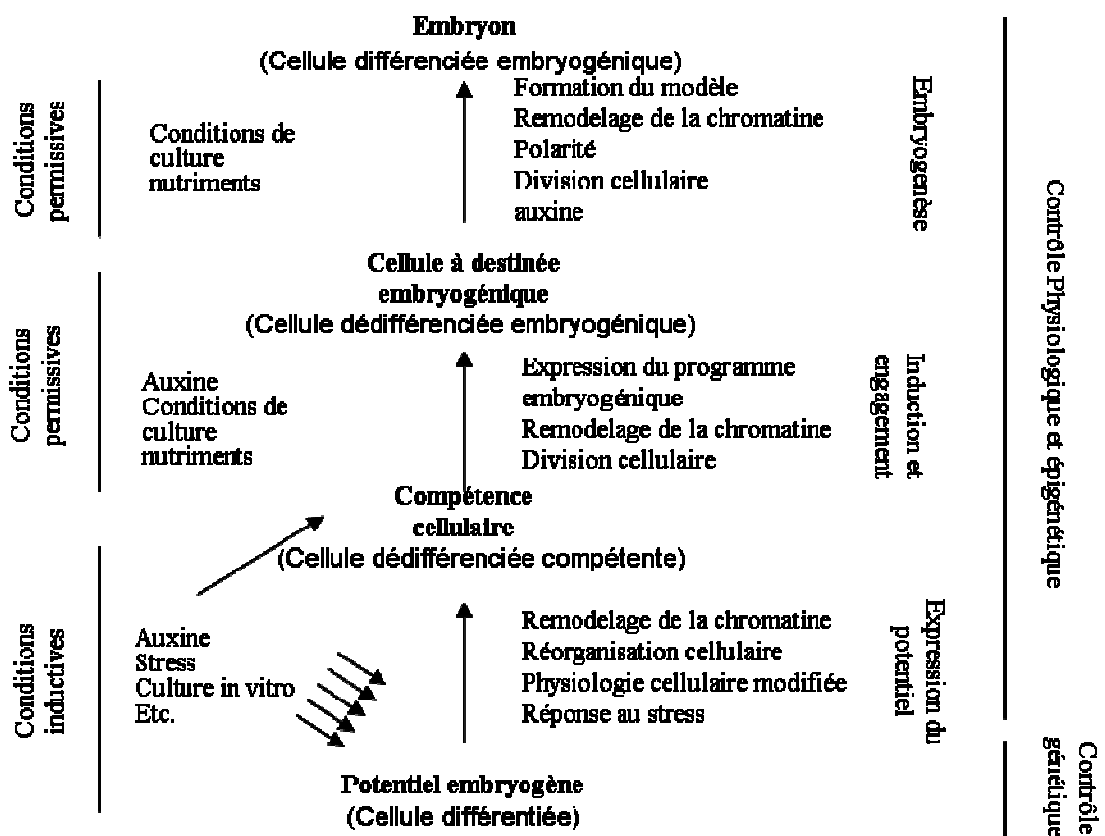


Figure 2: modèle hypothétique des événements à l'origine de l'embryogenèse somatique (Fehér, 2006)

L'initiation de la voie de l'embryogenèse est limitée à certaines cellules de l'explant (Von arnold, 2008). D'après Féher et al. (2003). Parmi les auxines synthétiques utilisées pour induire l'embryogenèse somatique, le 2,4D est de loin le plus efficace et il est utilisé dans la majorité des cultures embryogènes. Cependant, l'induction ne peut pas être considérée comme une simple réponse à des régulateurs de croissance appliqués compte tenu de la grande diversité des facteurs d'induction comprenant notamment d'autres régulateurs de croissance tels que les cytokinines. L'ABA et des traitements non hormonaux comme le

stress osmotique, des ions de métaux lourds ou des températures élevées peuvent, dans certains cas, induire l'embryogenèse somatique. Le stimulus constitué par le stress semble plutôt déterminant dans ce phénomène (Féher et al., 2003).

La réponse au stress est représentée par un ensemble de réactions en cascades assurant la transduction du signal (Suprasanna et Bapat, 2006). Le calcium sous forme activée Ca-calmoduline (Ca-M) semble jouer le rôle de second messenger dans ce processus (Féher et al., 2003; Suprasanna et Bapat, 2006). En effet, la dépendance de l'embryogenèse somatique des concentrations internes et externes en Ca^{++} a été démontrée dans différents systèmes. Des variations caractéristiques du pH intracellulaire semblent aussi associées avec cette transition (Féher et al., 2003) ainsi que des flux d'AIA endogène. Des données supplémentaires laissent penser que des protéines kinases calcium dépendantes sont impliquées dans la voie de transmission du signal durant l'embryogenèse somatique (Féher et al., 2003).

La polarité au sein de l'embryon est établie par l'intermédiaire d'un modèle contrôlé de divisions des cellules embryonnaires, d'élongation du suspenseur et des cellules du cal (Samaj et al., 2006). Le développement polarisé du zygote et de l'embryon impliquent la formation de méristèmes caulinaire et racinaire. La division initiale chez les plantes supérieures est asymétrique. Cet événement établit la polarité et détermine le modèle de développement ultérieur. (Féher et al., 2003). Cette division asymétrique existe dans l'embryogenèse somatique mais son rôle dans l'établissement de la polarité est encore sujet à controverses (Féher et al., 2003). Le cytosquelette et les parois cellulaires paraissent jouer ensemble un rôle régulateur essentiel durant les étapes initiales et tardives du développement de l'embryon (Samaj et al., 2006). Il semble que la polarité et la morphogenèse soient contrôlées via des fonctions coordonnées de ces deux structures qui sont apparemment interconnectées et forment une structure supracellulaire appelée continuum paroi squelettique-membrane plasmique-cytosquelette (cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum) mais les molécules qui assurent la liaison ne sont pas encore déterminées (Samaj et al. 2006). Chez le maïs, par exemple, les cellules compétentes présentent un abondant cytosquelette endoplasmique arrangé sous forme de microtubules et des filaments d'actine périnucléaires rayonnants. En plus, des réarrangements aboutissant à un cytosquelette cortical plus abondant semblent nécessaires à l'adhésion cellulaire, la polarisation et le développement des embryons somatiques (Samaj et al. 2006). En plus, ce processus est aussi contrôlé par des molécules de la paroi cellulaire ayant des propriétés signalétiques comme les protéines arabinogalactanes (AGPs) et les pectines (Samaj et al., 2006). En effet, des expériences menées sur différents systèmes expérimentaux montrent que les AGPs jouent un rôle important dans

l'embryogenèse somatique et d'autres AGPs sont associées avec la mort cellulaire programmée ou apoptose (cf. Samaj et al., 2006). Par exemple, les AGPs libérées ou ajoutées dans le milieu de culture étaient capables d'induire l'embryogenèse somatique chez différentes espèces végétales. Il a aussi été découvert qu'un épitope appelé JIM8 se transmet, de manière asymétrique, pendant la division cellulaire, à une cellule JIM8⁻ embryogène et une cellule JIM8⁺ apoptotique (Tchorbadjieva, 2006)

3.2.1. Expression des gènes

Les cellules somatiques des plantes contiennent toute l'information génétique nécessaire à la création de plants complets fonctionnels. L'induction de l'embryogenèse somatique consiste en la terminaison (ou l'interruption) du modèle d'expression génétique en cours et son remplacement par le programme d'expression génétique de l'embryogenèse (Von Arnold et al., 2008). L'initiation du développement embryonnaire au niveau de cellules différenciées exige une reprogrammation cellulaire complète (Féher, 2006). Cette reprogrammation implique, pendant la dédifférenciation, l'élimination ou la modification des profils transcriptionnels et traductionnels de l'état différencié afin de permettre aux cellules de mettre en place un nouveau programme développemental (Féher et al, 2003).

Plusieurs gènes avec expression modifiée durant l'embryogenèse somatique ont été identifiés mais la plupart concernent les stades tardifs du développement (Féher et al., 2003). Il s'agit des gènes qui codent pour les protéines LEA (late-embryogenesis abundant proteins) qui sont très hydrophiles et sont exprimés abondamment dans la phase tardive de l'embryogenèse zygotique (Ikeda et Kamada, 2006) et leur expression est régulée par l'ABA (Zimmerman, 1993). Leurs mécanismes de régulation semblent similaires entre les deux types d'embryogenèses (Ikeda et Kamada, 2006).

A part les protéines LEA, l'effort des chercheurs s'est focalisé sur l'identification des gènes qui sont activés durant la première phase de l'embryogenèse somatique. Il ont insisté sur ceux qui sont impliqués dans et l'acquisition de la compétence embryogène et la réponse aux régulateurs de croissance. Ces études qui sont détaillées dans certains articles (Féher et al., 2003; Thomas et Jiménez, 2006), ont permis de mettre en évidence plusieurs gènes. Il s'agit d'une part de gènes qui sont régulés par l'auxine comme parA, parB et parC, qui ont été détectés de manière transitoire durant la reprise de l'activité méristématique dans les protoplastes du mésophylle de tabac et d'autre part des gènes codant pour des protéines de choc thermique (heat shock). En revanche, SERK (somatic embryogenesis receptor kinase) est le seul gène connu qui joue un rôle dans l'acquisition de la compétence dans les cellules

végétales (Fehér et al., 2003). Ce gène a été identifié chez la carotte et code pour une protéine réceptrice riche en leucine (Schmidt et al, 1997). Des homologues de ce gène ont été par la suite isolés chez d'autres espèces (cf. Tchorbadjieva, 2006). Son expression était caractéristique des cultures cellulaires embryogènes et cesse après le stade globulaire chez la carotte (Schmidt et al, 1997).

La structure de la chromatine semble jouer un rôle déterminant dans ce processus. Des changements dynamiques de la structure de la chromatine sont influencés à la fois par des modifications post traductionnelles des extrémités N-terminales des histones et par des modifications directes de l'ADN comme les méthylations (Thomas et Jiménez, 2006). Des résultats expérimentaux laissent supposer que le remodelage de la chromatine aboutit à la libération du programme de l'embryogenèse qui est réprimé dans les cellules végétatives par les mécanismes « chromatin-based silencing » (Fehér, 2006). En effet, un grand nombre de gènes connus, chez la drosophile, sous le nom de groupe Polycomb (Pc) régulent l'accessibilité/inaccessibilité de régions de chromosomes particuliers et des gènes similaires jouent un rôle dans la suppression du développement d'ovules non fécondés (Féher et al, 2003).

Ce remodelage de la chromatine semble jouer deux rôles principaux durant les premiers stades de l'embryogenèse somatique: le déploiement de la chromatine à structure superenroulée et l'activation spécifique d'un groupe de gènes exigés par le développement embryonnaire (Féher et al, 2003). Cependant, la question qui reste posée est la nature du signal principal et comment il provoque le remodelage de la chromatine et la reprogrammation de l'expression des gènes durant l'embryogenèse somatique (Fehér, 2006).

En plus de l'organisation de la chromatine, la régulation directe des gènes implique des facteurs de transcription spécifiques (Fehér, 2006). Les progrès dans les protocoles de transformation des plantes et la disponibilité de nouveaux mutants ont permis la caractérisation de gènes qui régulent la transition de l'état végétatif à l'état embryogénique (Thomas et Jiménez, 2006). Quatre facteurs de transcription principaux ont été isolés à partir d'embryons mutants défectueux (LEC1, LEC2, FUS3 et ABI3) et 3 facteurs ont été isolés par « differential screening » au niveau de cultures embryogènes (SERK, AGL15 et BBM), tous sont exprimés durant le développement à la fois des embryons somatiques et zygotiques (Ikeda et Kamada, 2006). Les mécanismes de régulation de l'expression de gènes par ces facteurs de transcription pourraient être similaires (Ikeda et Kamada, 2006). L'expression ectopique de ces gènes (expression forcée dans une autre plante par transgénèse) peut à la fois améliorer l'embryogenèse somatique *in vitro* et provoquer une formation spontanée

d'embryons sur des plantes intactes. Le nouveau défi est d'identifier la présence de liens possibles entre les régulateurs de croissance/phytohormones avec les gènes qui influencent la transition de l'état végétatif à l'état embryogène (Thomas et Jiménez, 2006). Ainsi, l'analyse d'embryons mutants défectueux (LEC1, FUS3, LEC2 et ABI3) a montré que LEC1, FUS3, LEC2 et ABI3 régulent l'expression de plusieurs gènes durant l'embryogenèse et la germination des graines et ces mécanismes de régulation sont en relation avec la production de phytohormones, le métabolisme des carbohydrates, les photoréactions et la division cellulaire (Ikeda et Kamada, 2006). Par contre, au niveau de l'embryogenèse somatique, il y a peu d'information sur les mécanismes de régulation des expressions de gènes. L'expression de LEC1, ABI3, FUS3 et LEC2 est similaire dans les 2 types d'embryogenèses et, par conséquent, des mécanismes de régulation pourraient être communs (Ikeda et Kamada, 2006).

3.2.2. Marqueurs moléculaires

D'après Tchorbadjieva (2006), la caractérisation et l'analyse fonctionnelle de marqueurs protéiques pour l'embryogenèse somatique offre la possibilité de déterminer le potentiel embryogène des cellules végétales en culture longtemps avant la mise en place de tout changement morphologique. Elles peuvent aussi permettre de marquer les différentes phases du développement de la plante et offrent aussi la possibilité d'obtenir une information supplémentaire sur la base moléculaire de l'induction et la différenciation des cellules végétales. En plus, une meilleure compréhension des processus fondamentaux qui déclenchent et contrôlent l'embryogenèse somatique devrait aboutir à des protocoles de régénération plus rationnels. Les marqueurs protéiques sont aussi des sondes utiles pour la définition du potentiel embryogène et pour marquer les différentes phases de développement de la plante.

L'approche classique dans ce domaine consiste en l'analyse des profils de protéines totales entre cellules embryogènes et non embryogènes. Des changements dans des profils isoenzymatiques sont parfois détectés entre cals embryogènes et non embryogènes dans plusieurs systèmes dont les estérases et les peroxydases chez la patate douce (Cavalcante-Alves et al., 1994). Cependant, ce genre d'études aboutit à un grand nombre de protéines spécifiques difficiles à utiliser comme marqueurs (Tchorbadjieva, 2006).

Les nouvelles techniques utilisées ces dernières années ont permis de meilleures approches. Ainsi, plusieurs gènes induits durant l'embryogenèse somatique et pouvant servir de marqueurs ont été détectés par la technique « cDNA differential screening » dont les LEA (late embryogenèses abundant proteins). De même, les anticorps monoclonaux contre les

protéines marqueurs ont été utilisés aussi bien pour élucider le complexe structural de la surface que pour marquer les cellules destinées pour le développement d'embryons somatiques (Tchorbadjieva, 2006). En plus, Differential display est une technique adaptée aux gènes impliqués en embryogenèse somatique et qui ont une faible expression (Tchorbadjieva, 2006).

Des protéines secrétées dans le milieu de culture ont été rapportées chez plusieurs espèces (Von Arnold, 2008). Des observations semblent indiquer que ces protéines extracellulaires sont indispensables pour la différenciation et la morphogénèse de cellules végétales et leur nombre limité, fait d'elles des candidates appropriées comme marqueurs de l'embryogenèse somatique (Tchorbadjieva, 2006). Parmi les protéines secrétées ayant un effet positif sur l'embryogenèse somatique est l'endochitinase IV (EC.3.2.1.14). Cet enzyme hydrolyse les liaisons β 1-4 dans la chitine et les protéines arabinogalactanes (AGPs) (Tchorbadjieva, 2006). Ces AGPs se distinguent par leur haut rapport carbohydrate/protéines dépassant souvent les 90%. Ils sont présents dans la paroi, la membrane plasmique et se retrouvent souvent dans le milieu de culture (Von Arnold, 2008). Comme signalé auparavant, Elles jouent un rôle important dans l'embryogenèse somatique et d'autres AGPs sont associées avec la mort cellulaire programmée ou apoptose (Samaj et al., 2006).

Parmi les autres protéines détectées existent des estérases acides, des protéines acides de transfert de lipides (acidic lipid transfer protein-like proteins), et des endochitinases acides qui ont été identifiées dans les premiers stades (Tchorbadjieva, 2006).

Des résultats expérimentaux montrent que certains composants associés à la paroi comme les pectines, la callose et des protéines riches en glycine pourraient aussi constituer des marqueurs de l'embryogenèse somatique (Samaj et al., 2006).

3.3. Embryogenèse chez la patate douce

3.3.1. Intérêt de l'embryogenèse somatique pour la patate douce

Le développement d'un système performant de régénération via l'embryogenèse somatique présente un grand intérêt chez la patate douce. Il offre des possibilités de régénération bien supérieures et complémentaires du système de régénération via l'organogenèse, facilitant ainsi l'accès à des techniques nouvelles qui peuvent être utilisées en complément des méthodes conventionnelles de sélection chez cette plante. De plus, d'après Cavalcante-Alves (1996), la production d'embryons somatiques peut être utilisée dans un schéma de sélection de patate douce pour :

- Multiplier en peu de temps et d'espace un individu repéré pour ses hautes performances. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où la multiplication sexuée chez la patate douce pose problème.

- Conserver et multiplier la structure génétique d'un hybride dont l'obtention par fécondation est difficile due à l'existence d'une incompatibilité parmi les différentes variétés de patate douce ou entre la patate douce et les espèces voisines apparentées, et aussi à celle d'une faible fertilité des hybrides obtenus.

- Multiplier et conserver des individus obtenus par diverses techniques de culture *in vitro*, plantes haploïdes, somaclones, hybrides somatiques issus de la fusion de protoplastes ou plantes transformées chez qui la multiplication sexuée est difficile à réaliser comme chez la patate douce

En plus, de nombreux travaux montrent que les cultures embryogènes constituent un matériel de choix pour la régénération de plantes transgéniques (Shimada et otani, 2007)..

3.3.2. Phase d'induction

L'embryogenèse somatique chez la patate douce semble avoir été initiée à partir de cals de culture d'anthères (Tsai et Tseng, 1979). Cependant, ce sont les travaux de Liu et Cantliffe (1984) et de Jarret et al. (1984) qui constituent le point de départ de succès importants dans ce domaine. Le tableau ci-après présente les principaux travaux réalisés chez cette espèce et les principales conditions qui ont permis d'aboutir à des réponses embryogènes. L'analyse de ce tableau permet de mettre en évidence un ensemble de facteurs qui se sont avérés cruciaux pour le succès de l'induction.

Tableau 2 : principaux travaux réalisés dans le domaine de l'embryogenèse somatique chez la patate douce.

Génotype	Explant	Milieu de base	Auxine Type et concentration (mg/L)	Pourcentages d'induction	Référence
'White Star', 'GaTG 3'	Apex, fragments de feuilles, tiges et racines	LS	2,4-D (1)	22–23%	Liu et Cantliffe(1984)
9 cultivars 'PI8458', etc.)	Apex	MS	2,4-D (0,3 ou 3)	10–31%	Jarret et al. (1984)
'White Star'	Dômes apicaux (0,2–1 mm)	MS modifié	2,4-D (2,2)	>80%	Cantliffe (1993)
7 cultivars ('Kokei 14', etc.)	Apex (0,5 mm)	MS	2,4-D (0,2)	0–70%	Liu et al. (1993b)
7 cultivars ('Yu shu 34', etc.)	Apex	MS	2,4-D (0,5–5)	20.0–37.5%	Tan et al. (1993)
10 cultivars ('Duclos 11', etc.)	bourgeons axillaires (0,5–1 mm)	MS	2,4-D (2,2)	0–17.0%	Cavalcante et al.(1994)
Regal	Apex				Desamero et al. (1994)
	Morceaux de limbe et de pétiole				Zheng et al.(1996)
11 cultivars ('Kokei 14', etc.)	Apex (0,5–0,7 mm)	LS	Dicamba (0,5–1)	50.0–94.5%	Otani et Shimada (1996)
			4FA (0,5–1)		
			picloram (0,5–1)		
9 cultivars ('Hi-Starch', etc.)	Apex (0,3–0,5 mm)	MS	NAA (1–5)+GA3 (1 à 10)	EC	Shimonishi et Karube (1996)
			2,4-D (0,05–1)		
			piclorame (0,5–2)		
	Bourgeons axillaires 0,5-1 mm	MS	1,1 à 2,2 de 2.4D ou 2.4.5T		Al-Mazrooei et al. (1997)
14 cultivars	Apex	LS	2,4-D (1)	78–86%	Kwon et al. (2002)
4 cultivars ('Zami', etc.)	Apex	MS	2,4-D (2)	Faible à nul	Sim et Cardoso (2005)

a. Explant initial

La plupart des travaux réalisés chez la patate douce utilisent des explants de nature méristématique comme les apex ou les nœuds pour l'initiation de cultures embryogènes (Liu et Cantliffe, 1984 ; Jarret et al., 1984; Chée et cantliffe, 1988; 1989 a; Shultheis et al. 1990; Desamero et al. 1994 ; Cavalcante-Alves et al.,1994 ; Cavalcante-Alves, 1996). Toutefois, l'embryogenèse à partir d'explants non méristématiques a été rapportée dans plusieurs travaux comme ceux de Zheng et al. (1996) qui ont obtenu des cals embryogènes à partir de culture de morceaux de limbe ou de pétiole et ceux de Sawada et al. (1990) avec des fragments de tige.

b. Composition du milieu de culture

Le milieu de base utilisé chez la patate douce comprend généralement les macro et microéléments MS (Murashige et Skoog, 1962) avec différentes compositions de vitamines MS ou LS (Linsmaier et Skoog, 1965). L'initiation de cals embryogènes exige aussi la présence d'auxines synthétiques dans le milieu à des concentrations de 5 à 10 μM . Il s'agit par exemple du 2,4-D (Cavalcante et al. 1994 ; Chée et Cantliffe, 1988), du 2,4,5-T (Al-Mazrooei et al., 1997), du piclorame ou de l'acide 4-fluorophenoxyacétique (4FA) (Otani et Shimada, 1996). Plusieurs travaux ont montré que l'efficacité de la stimulation auxinique dépend aussi du génotype.

c. Effet du génotype

L'embryogenèse somatique est considérée comme génétiquement déterminée. Il y a de grandes différences entre génotypes et cultivars pour ce caractère (Von Arnold, 2008). Ce fait est clairement prouvé chez la patate douce où plusieurs études ont montré que la réponse embryogène dépend du génotype. Ainsi, Jarret et al. (1984) ont obtenu des cals embryogènes chez 9 génotypes à partir d'apex caulinaires sur des milieux contenant le 2,4-D avec des pourcentages allant de 10 à 31 %. De même, Cavalcante et al. (1994) ont trouvé des pourcentages allant de 0 à 17 % suivant les génotypes. Une régénération rapide et répétitive par embryogenèse somatique a été réussie par Zheng and al., (1996) chez le génotype PI318846-3 mais pas chez PI 531143. Desamero et al. (1994) ont obtenu des cultures embryogènes chez Regal mais pas chez Jewel. L'effet du génotype est parfois plus prononcé et se manifeste par l'existence de génotypes complètement récalcitrants dans les conditions employées : trois sur six pour Triqui et al. (2008) et huit sur douze pour Sim et Cardosa (2005).

Al-Mazrooei et al. (1997) ont réussi à induire ou améliorer la réponse embryogène en utilisant le 2.4.5-T à la place du 2.4-D. En plus, Otani et Shimada (1996) ont obtenu des cals embryogènes pour 11 cultivars à des pourcentages relativement élevés (50–94,5%) en utilisant différentes auxines synthétiques dont les plus efficaces étaient l'acide 4-fluorophenoxyacétique (4FA), le piclorame et le dicamba de 0,5 mg.l⁻¹ à 1,0 mg.l⁻¹. Shimonishi et Karube (1996) signalent que l'ANA à 2 mg.l⁻¹ était efficace pour des génotypes récalcitrants en présence de 2,4-D.

L'effet de l'auxine sur l'induction de cals embryogènes dépend donc du génotype et le 2,4-D est efficace pour certains cultivars alors que c'est le piclorame, le dicamba ou le 4FA qui sont efficaces pour d'autres. L'utilisation d'une auxine adéquate semble importante pour surmonter l'effet du génotype chez la patate douce (Otani et Shimada, 2007).

3.3.3. Caractéristiques des cals embryogènes

Les cals embryogènes tels qu'ils ont été décrits par plusieurs auteurs (Cavalcante-Alves, 1996 ; Sim et Cardosa, 2005 ; Triqui, 2008) sont jaunâtres compacts, nodulaires à croissance relativement lente avec des cellules isodiamétriques à cytoplasme dense et un rapport nucléoplasmique élevé. Ils peuvent présenter, chez certains génotypes comme Zho une coloration rouge (Cavalcante-Alves, 1996 ; Liu et al., 2001 ; Triqui, 2008).

3.4. Entretien des cultures embryogènes

Il s'agit du repiquage et de la multiplication des cals embryogènes sans perte de leur capacité embryogénétique. Cette phase peut se faire en milieu solide ou en suspensions cellulaires.

3.4.1. Milieu solide

Les cals embryogènes sont généralement entretenus dans un milieu similaire à celui utilisé pour leur initiation (Von Arnold et al. 2002). Le résultat optimal est obtenu par l'utilisation d'un milieu contenant à la fois le 2.4D à 10µM et la BAP à 1µM (Cavalcante-Alves, 1996 ; Zheng et al., 1996; Chée et Cantliffe, 1988). L'addition du KCl à 30 mM a un effet positif sur la croissance des cals embryogènes et le maintien de leurs caractéristiques embryogènes (Chée al., 1992).

Les cultures embryogènes de certaines espèces et certains génotypes peuvent être cultivés pendant de longues périodes sur des milieux contenant des régulateurs de croissance sans perdre leur potentiel embryogène comme la capacité de produire des embryons aptes à

évoluer en plantes (Von Arnold et al. 2002). Cependant, les variations somaclonales s'accumulent avec la durée de la culture et chez la plupart des cultures, le potentiel embryogène diminue et peut être perdu. Ainsi, chez cv. White star, le potentiel morphogénétique de lignées de cal diminue avec la durée de la culture (Padmanabhan et al., 2001). Cette diminution se manifeste par une diminution de la conversion des embryons en plantes et la production d'embryons peut cesser entièrement.

3.4.2. Suspensions cellulaires

L'entretien des cultures embryogènes sous forme de suspensions cellulaires est souvent préférable (Von Arnold et al., 2002). En effet, au niveau du cal intact, la croissance est relativement lente car seule une partie du cal est en contact avec le milieu, l'oxygénation est relativement lente et des gradients peuvent s'établir au sein du cal menant à une différenciation anticipée (Pierick, 1984). Par contre, au niveau des suspensions cellulaires, le taux de prolifération est meilleur et les cultures deviennent plus synchronisées. En plus, les cellules et les agrégats cellulaires se développent en structures séparées qui peuvent être aisément manipulées en fonction des besoins (Von Arnold et al., 2002).

Une prolifération sélective de matériel embryogène d'*Ipomoea batatas* cv White star en milieu liquide a été obtenue en présence de 5 µm de 2,4-D (Chée et Cantliffe, 1988). La croissance des suspensions cellulaires de patate douce, mesurée par poids frais, a montré un modèle sigmoïde classique. La phase de latence et la croissance exponentielle étaient suivies au bout de 4-7 jours d'une augmentation linéaire de la masse fraîche pendant une semaine. La phase stationnaire est atteinte à la troisième semaine (Chée et Cantliffe, 1989a).

Une étude cellulaire détaillée a montré que la majorité du matériel des suspensions embryogènes était composé d'unités cellulaires larges. La fraction embryogène était limitée aux cals et agrégats cellulaires de taille minimale de 355 µm (Chée et Cantliffe, 1989a)

La prolifération du matériel embryogène se fait essentiellement par des cycles comprenant le détachement d'agrégats cellulaires discrets à partir des cals et la formation de nouveaux cals à partir de ces unités plutôt que par la formation *de novo* de cals à partir de cellules isolées ou d'agrégats cellulaires non embryogènes (Chée et Cantliffe, 1989a).

3.5. Développement et maturation des embryons

Les cals embryogènes produisent beaucoup d'embryons globulaires pendant la phase d'initiation et de prématuration. Cependant, l'évolution de ces embryons vers les stades avancés et leur conversion en plantes semblent poser beaucoup de problèmes. En effet,

d'après Cavalcante Alves (1996), seuls 5% des embryons réussissent la conversion en plantes. Un résultat similaire a été rapporté récemment par Sim et Cardoso (2005). Le transfert des cals embryogènes sur un milieu sans régulateurs de croissance conduit à la différenciation des embryons à différents stades, mais très peu d'entre eux arrivent à maturité et encore moins à la conversion en plantes (Cavalcante Alves, 1996). Une étude de conversion d'embryons mûrs durant 20 jours a révélé que 80 à 90% des embryons ont formé des racines mais seuls 40 à 50% ont formé des pousses (Padmanabhan et al. 1998a). L'observation et le suivi de l'évolution de ces structures embryonnaires révèlent l'existence de 5 catégories dont deux sont aptes à germer alors que les autres présentent des anomalies de développement comme l'absence de pôles ou méristèmes apical ou racinaire, l'arrêt de développement aux stades globulaire et torpille, ou la prolifération anarchique des embryons (Padmanabhan et al. 1998b).

Ces difficultés de culture s'accroissent avec le temps de culture. En effet, une étude menée chez le cultivar White star par Padmanabhan et al. (2001) a révélé que la capacité de régénération diminue avec le temps de culture et cette diminution est expliquée par une plus faible sensibilité au 2,4-D.

En général, le 2,4-D qui est nécessaire à l'induction embryogénétique, devient inhibiteur pour la formation des embryons. En présence de 2,4-D, les cultures embryogènes synthétisent tous les produits de gènes nécessaires à l'accomplissement du stade globulaire et contiennent aussi d'autres ARNms dont la présence inhibe généralement le programme d'embryogenèse (Zimmermann, 1993). En plus, plusieurs travaux avaient révélé qu'un transport polarisé normal de l'auxine est nécessaire pour une morphogenèse normale (Schiavone et Cooke, 1985 ; Liu et al., 1993c).

Le repiquage de cals embryogènes sur un milieu contenant de l'acide 2,3,5-triiodobenzoïque, un inhibiteur du transport polarisé de l'auxine, a provoqué le même effet inhibiteur que le 2,4-D. Ce résultat suggère que l'inhibition du développement des embryons par le 2,4-D se fait par l'inhibition du transport polarisé de l'AIA au niveau de l'embryon naissant. (Chée et Cantliffe, 1989b).

Il faut donc réduire ou éliminer le 2,4-D dans le milieu de conversion qui contient en général une cytokinine à faible concentration (Cavalcante-Alves, 1996). En plus, chez certaines espèces, il est nécessaire de traiter les cultures embryogènes avec l'ABA souvent à des concentrations de 10 à 50 μ M (Von Arnold et al., 2002). C'est le cas pour la patate douce. En effet, d'après Zheng et al. (1996) l'addition d'ABA à 2,5 mg/L était critique pour une production élevée en embryons somatiques. De même, d'autres auteurs signalent l'utilisation

d'ABA dans le milieu de régénération chez la patate douce (Otani et Shimada, 1996 ; Dhir et al., 1998 ; Torres et al., 2001 ; Sim et Cardoso, 2005).

L'augmentation de l'osmolarité a aussi permis d'améliorer le taux de conversion (Al Mazrooi et al., 1996).

Une courte période dans l'obscurité sur un milieu contenant l'acide gibbérellique entre 0,05 et 0,1mg/L paraît efficace pour l'augmentation de la production de plantules complètes (Sim et Cardoso, 2005).

3.6. Automatisation de la production des embryons

L'automatisation pourrait augmenter l'efficacité de la production d'embryons. Elle peut réduire les coûts de la main d'œuvre et améliorer les procédés de l'évaluation des cultures, du suivi du développement des embryons, de la récolte et les procédés de post-récolte de préparation de la livraison (Ibaraki et Kurata, 2001).

Harrell et al. (1994) ont présenté un système de récolte automatique d'embryons somatiques à partir de suspensions cellulaires cultivées en bioréacteur. Un système optique intégrant les critères de sélection issus de l'expérimentation biologique, classe les embryons comme récoltables ou non récoltables à leur passage dans un tube en verre de 3 mm. Ce système a permis la récolte de 60% des embryons à la fréquence de 2,4 embryons par heure avec 1% des embryons récoltés par erreur. Ce rythme prometteur reste toutefois insuffisant pour une production industrielle.

4. Transformation par *Agrobacterium tumefaciens*

4.1. Généralités sur la transformation

4.1.1. Principe de la transformation

Le transfert de gènes consiste à introduire une information génétique dans le génome d'une cellule. On cherche dans la plupart des cas à obtenir une expression stable de cette information (Casse-Delbart, 1996).

4.2. Les techniques de transformation

Les techniques de transformation sont relativement variées. On peut les classer en deux catégories : les méthodes directes et les méthodes indirectes par le système *Agrobacterium*.

- Les techniques directes : Le gène d'intérêt est transféré sous forme de plasmide portant simplement une origine de répllication et un gène de résistance bactérien. Un gène reporter ou de sélection est parfois nécessaire.

- Les techniques indirectes : le transfert d'ADN nécessite dans ce cas l'utilisation d'une bactérie tellurique du genre *Agrobacterium*. Ces bactéries sont capables de transférer une partie de leur ADN aux plantes infectées. Le gène d'intérêt est transmis à la plante en utilisant les mécanismes moléculaires dont dispose la bactérie.

4.3. Transformation par les agrobactéries

4.3.1. Caractéristiques du genre *Agrobacterium*

Les agrobactéries de type *Agrobacterium* sont des bactéries telluriques c'est à dire vivant principalement dans la partie aérée du sol (Tourte, 2001). Ce sont des eubactéries aérobies gram-négatives qui se présentent sous forme de bâtonnets. Il existe différentes espèces d'*Agrobacterium* dont les plus connues et les plus fréquemment utilisées sont :

- *Agrobacterium tumefaciens* qui est responsable de la maladie appelée : galle du collet ou « crown gall ».
- *Agrobacterium rhizogenes* qui provoque, chez la plante, un développement intense de l'appareil racinaire encore appelé « chevelu racinaire ».

Ces bactéries renferment de gros plasmides qui s'appellent Ti dans le cas d'*Agrobacterium tumefaciens* et Ri dans le cas d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Des recherches en biologie moléculaire ont montré que les modifications observées au niveau de la plante sont dues à la transmission de la bactérie vers la plante d'une partie du plasmide Ti ou Ri. Cette partie transférée est appelée ADN-T (Tourte, 2001).

4.3.2. Structure du plasmide Ti

L'ADN-T contient 2 types de gènes: les oncogènes codant pour des enzymes impliqués dans la synthèse d'auxines et de cytokinines et responsables de la formation de la tumeur ou du chevelu racinaire et les gènes codant pour la synthèse des opines excrétés qui servent de source de carbone pour les bactéries. En dehors de l'ADN-T sont localisés les gènes du catabolisme des opines et, les gènes impliqués dans le processus du transfert de l'ADN-T et ceux responsables de conjugaison entre bactéries (De La Riva et al., 1998).

Il s'agit d'une modalité de transformation génétique naturelle de la cellule végétale. La connaissance des mécanismes de cette maladie sera essentielle pour la mise au point des modalités de transferts génétiques dirigés.

4.3.3. Processus de l'infection et de la transformation

Les mécanismes de l'infection et de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* sont détaillés dans plusieurs articles de revue comme De la Riva et al. (1998) et Windels et al., (2008). Le processus de transfert de gènes à partir d'*Agrobacterium* vers les cellules de la plante implique plusieurs étapes importantes : (1) colonisation bactérienne, (2) induction du système de virulence bactérien (3) formation du complexe de transfert de l'ADN-T, (4) transfert de l'ADN-T et (5) intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante.

a. Colonisation bactérienne

La colonisation bactérienne débute par la perception et le mouvement des bactéries vers les cellules végétales. Cette première étape est suivie par l'adhérence des bactéries aux cellules formant un biofilm de bactéries à la surface du tissu végétal (Windels et al., 2008).

b. Induction de la virulence bactérienne

Les plasmides Ti ou Ri portent, outre l'ADN-T, une région dite de virulence, comportant de nombreux gènes vir (Casse-Delbart, 1996) dont 6 essentiels (vir A, vir B, vir C, vir D, vir E, virG) et deux non essentiels (virF, virH) (De la riva et al., 1998). Ces gènes codent pour des protéines, dont la synthèse est induite par les cellules végétales blessées, et qui sont responsables des différentes étapes conduisant au transfert de l'ADN-T.

La perception de cellules végétales blessées induit un système régulateur à 2 composantes : le système de virulence virA-virG (Windels et al., 2008). VirA est une protéine transmembranaire dimérique sensible qui détecte des molécules signales libérées par les plantes blessées. Les signaux pour l'activation de virA comprennent le pH acide, les composés phénoliques comme l'acétosyringone et certaines classes de monosaccharides qui agissent en synergie avec les composés phénoliques (De La Riva et al., 1998). VirA activé a la capacité de transférer son phosphate à un résidu aspartate conservé de la protéine cytoplasmique virG récepteur de DNA (DNA binding) qui fonctionne comme un facteur de transcription régulant l'expression des gènes vir lorsqu'il est phosphorylé (De La Riva et al., 1998).

c. Formation du complexe de transfert de l'ADN-T

Vir G activé permet l'induction de l'opéron VirD comprenant les gènes virD1 et virD2 qui codent respectivement pour une endonucléase et une relaxase (Windels et al., 2008). Les bordures de l'ADN-T sont constituées de répétitions directes de 25 paires de bases, celle de droite étant accompagnée d'un signal particulier « overdrive ». Les protéines VirD1 et VirD2 reconnaissent ces frontières provoquant la coupure par endonucléase du brin inférieur de

chaque bordure. Les sites de restriction seront utilisés comme point d'initiation et de terminaison pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire représentant la copie du brin inférieur (5'-3') de l'ADN-T. C'est cette nouvelle molécule d'ADN simple brin qui sera transférée à la cellule végétale (De La Riva et al., 1998). Après le clivage, virD2 demeure lié de manière covalente à l'extrémité 5' au brin ss-T-. La protéine vir D2 est impliquée dans différentes fonctions durant le transfert du brin T : protection contre la dégradation par les exonucléases, localisation nucléaire par identification de signaux de localisation nucléaire (NLS) au niveau des extrémités N et C-terminales, intégration précise et ligation dans l'ADN de la plante avec intervention possible d'enzymes végétaux (Windels et al., 2008). VirD1 réagit avec la région d'origine du brin ss-T.

d. Les modèles de transfert du complexe ss-ADN-T

Le responsable du transfert de l'ADN-T au noyau de la plante est le complexe ssT-DNA – protéines (single stranded T-DNA-proteins). Tout ADN placé entre les bords de l'ADN-T sera transféré au noyau de la plante sous forme d'ADN simple brin (Windels et al., 2008).

L'ADN-T est enveloppé sur toute sa longueur par la protéine virE2 et les 2 protéines virD2 et virE2 dirigent l'ADN-T vers le noyau (Windels et al., 2008).

L'opéron virB de 9.5Kb joue un rôle important dans la formation d'une structure de surface cellulaire favorable au transfert du complexe ss-T-DNA de la bactérie vers la plante. La protéine virD4 est aussi exigée pour ce transport. Son rôle est la liaison ATP dépendante du complexe protéique nécessaire à la translocation (De La Riva et al., 1998)..

VirB sont des protéines qui présentent une hydrophilie similaire à d'autres protéines associés à la membrane. VirD4 est une protéine transmembranaire mais essentiellement située du côté cytoplasmique de la membrane plasmique. La majorité des protéines B sont assemblées en canaux intégrés à l'intérieur de la membrane. Seule virB11 a plusieurs domaines périplasmiques. VirB1 est la seule qui est trouvée en milieu extracellulaire. VirB4 et virB11 sont hydrophiles et nécessitent les ATPases pour un transfert actif de DNA (De La Riva et al., 1998)..

Deux opérons vir accessoires présents dans la zone octopine du plasmide Ti sont virF et virH. VirF qui code pour une protéine de 23 kDa fonctionne quand le complexe T-DNA se retrouve au sein de la cellule végétale et semble jouer un rôle dans l'export de virE2. VirF semble jouer un rôle dans le guidage du T-DNA vers le noyau de la cellule végétale (De La Riva et al., 1998)..

e. Intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante

A l'intérieur de la cellule végétale, le complexe ss-TDNA est dirigé vers le noyau en passant par la membrane nucléaire. Deux protéines vir se sont révélées importantes à ce stade: virD2 et virE2. VirF a probablement un rôle moins important (Windels et al., 2008).

Après la pénétration du complexe dans le noyau, il est traité en vue d'intégrer le génome de la plante notamment par protéolyse. Il est généralement accepté que le processus d'intégration se fait par recombinaison illégitime. Cependant différents modèles sont proposés pour les premières étapes de cette recombinaison. Les principales différences entre ces modèles concernent l'état mono ou bicaténaire de la molécule d'ADN au moment de l'intégration. Il n'est pas encore confirmé si le doublement de la molécule d'ADN se fait avant ou pendant l'intégration. Il existe des faits expérimentaux en faveur des deux hypothèses (Windels et al., 2008).

4.3.4. Principe de la méthode

La connaissance du mécanisme moléculaire de l'infection par *Agrobacterium* et sa capacité à transférer tout gène situé entre les 2 bordures de l'ADN-T a fait germer l'idée d'utiliser l'ADN-T comme vecteur pour transmettre aux plantes de gènes étrangers intéressants (Tourte, 2001).

Pour pouvoir utiliser ce système, il fallait retirer du génome de la bactérie les gènes oncogènes et insérer le gène d'intérêt dans l'ADN-T désarmé (Tourte, 2001). Le gène d'intérêt est intégré dans une cassette et inséré entre les frontières droite et gauche de l'ADN-T désarmé. Cette cassette contient en plus du gène d'intérêt un gène de sélection sous promoteur fort. Chez les Agrobactéries, le transfert de plasmide peut se réaliser selon 2 protocoles : cointégration et vecteur binaire (Tourte, 2001).

La cointégration correspond à la réunion du plasmide Ti désarmé et du plasmide dit intermédiaire qui est un plasmide d'E. coli, très souvent le plasmide pBR322, dans lequel a été intégré le gène de sélection chez les plantes. Ce gène de sélection est bien souvent le gène dit « NPTII » ou gène de la Néomycine phospho-transférase de type II qui va conférer à la cellule végétale une résistance spécifique à la kanamycine. Ce plasmide possède un site de clonage dans lequel on va insérer le gène d'intérêt à transférer et un fragment d'ADN-T qui aura pour rôle de faciliter la recombinaison avec le plasmide Ti de l'agrobactérie. Ce vecteur est amplifié et transféré par conjugaison chez un *Agrobacterium* à plasmide Ti désarmé. Les homologies entre les 2 régions d'ADN-T portées, d'une part, par le vecteur de transfert et,

d'autre part, par le plasmide Ti, permettent l'intégration du plasmide intermédiaire entre les 2 bordures du plasmide Ti, c'est à dire dans une position favorable à un transfert ultérieur dans la cellule végétale. Le vecteur recombiné est finalement plus grand que le plasmide Ti d'origine, ce qui constitue, en fait, un inconvénient pour le bon succès de son transfert dans la plante. Par ailleurs, l'origine de réplication est transférée et peut donc facilement s'autodupliquer. C'est la raison pour laquelle cette technique est actuellement presque abandonnée au profit de la méthode du vecteur binaire.

La méthode dite du vecteur binaire repose sur la présence, chez l'agrobactérie, de deux vecteurs séparés dont seul l'un, de taille raisonnable, est transféré dans la cellule végétale. Au départ, la construction du vecteur dit intermédiaire est caractérisée par l'insertion des bordures, droite (RB) et gauche (LB), de l'ADN-T entre lesquelles se trouvent placés, en tandem, le gène d'intérêt et le gène sélection. Ce plasmide vecteur est amplifié par introduction dans une population d'E. coli puis transféré dans une agrobactérie par conjugaison. L'absence de séquences homologues entre le plasmide intermédiaire et le plasmide Ti ne permet pas de recombinaison. . Il n'y aura ainsi pas d'origine de réplication bactérienne au sein du végétal transformé (Tourte, 2001).

Les vecteurs binaires possèdent (Tourte, 2001):

- Une origine de réplication.
- Deux bordures droite et gauche de l'ADN-T entre lesquelles a été placé le gène de résistance à la kanamycine sous le promoteur fort CaMV 35S et terminateur de la nopaline synthase.
- Un site multiple de clonage qui permet d'introduire le gène d'intérêt en position de transfert.
- Un second gène de sélection à un antibiotique bactérien (ampicilline, aminoglycoside transférase de type III, érythromycine...) extérieur à l'ADN-T permettant une sélection des bactéries porteuses du plasmide.

Pour que le gène d'intérêt soit nettement exprimé, on place en amont de la séquence codante un promoteur fort. Ce dernier a la particularité de s'exprimer en dehors de tout contrôle de la cellule réceptrice et a pour conséquence une expression permanente dans tous les tissus et cellules de la plante et quel que soit son stade de développement. Il en est ainsi du promoteur d'un gène qui code pour la synthèse d'une protéine de la capsid du virus provoquant la mosaïque du chou-fleur (Cauliflower mosaic virus CaMV). On parle du promoteur du CaMV 35S, capable d'assurer la transcription à un haut niveau du gène placé en

aval si toutefois cette dernière séquence est placée « en phase » avec le promoteur et qu'aucun codon stop ne vient tronquer la transcription (Tourte, 2001)

La transformation génétique peut aussi viser l'inhibition de l'expression d'un gène préexistant dans la plante. La stratégie classique dans ce domaine est la « stratégie antisens » dans laquelle la partie codante ou même simplement un de ses fragments est placée en position inversée sous le contrôle du promoteur fort ce qui conduit à la formation de messagers complémentaires des messages transcrits par le gène correctement positionné. Ces deux ARN messagers peuvent par exemple s'apparier en formant des doubles brins inexploitable par les enzymes de traduction (Banta et Montenegro, 2006).

L'inhibition des gènes peut être aussi réalisée par un mécanisme post-transcriptionnel appelé cosuppression dans lequel la formation d'ARN double brins (dsRNA) aboutit à une dégradation des ARNs homologues par des mécanismes spécifiques de la séquence (Banta et Montenegro, 2006).

4.3.1. Identification des plantes transgéniques

L'amplification par PCR du gène marqueur ou transgène est souvent prise comme indication du statut de transgénique des régénérants. Cependant, l'analyse par Southern est nécessaire pour prouver l'intégration du gène étranger dans le génome de l'hôte (Bhat et Srinivasan, 2002). Les techniques d'hybridation par RT-PCR, Northern et Western sont employées pour s'assurer de l'expression des gènes introduits (Bhat et Srinivasan, 2002).

4.3.2. Variabilité des plantes transgéniques et perspectives

Les vastes différences observées parmi les plantes transgéniques peuvent être attribuées à 2 causes principales : celles dues aux méthodes utilisées pour la régénération des transgéniques et celles dues aux méthodes d'amélioration (Bhat et Srinivasan, 2002).

Le processus de transformation peut être accompagné avec la variation somaclonale qui peut contribuer aux différences parmi les transgéniques (Bhat et Srinivasan, 2002). Elle peut influencer l'expression du transgène. Inversement, le niveau d'expression du gène étranger peut avoir une grande influence sur le phénotype de la plante.

Les méthodes de transformation en vogue n'assurent pas un mécanisme d'introduction du gène étranger à un locus défini. Le gène étranger se trouve inséré dans des localisations aléatoires dans les chromosomes de l'hôte. Par conséquent, des transgéniques indépendants portant la même cassette de séquences de gènes étrangers vont se comporter différemment selon le contexte génomique dans le génome de l'hôte transgéniques (Bhat

et Srinivasan, 2002). Une insertion ciblée a été réussie dans certains cas en visant une région chromosomique présentant une homologie avec le gène introduit ou en introduisant auparavant des séquences « lox » dans la région visée (revue : Banta et Montenegro, 2006).

Une autre complication vient de différences dans le nombre de copies du transgène présents dans des plantes transgéniques indépendantes (Bhat et Srinivasan, 2002).

La transformation par *Agrobacterium* aboutit souvent à l'introduction de séquences du vecteur qui sont indésirables pour la commercialisation de la plante transgénique. Banta et Montenegro (2006) ont cité plusieurs travaux récents qui montrent la possibilité d'éliminer ces séquences sans diminuer l'efficacité de la transformation en adoptant certaines stratégies comme l'introduction d'un gène létal dans la zone Non ADN-T, le remplacement de séquences bactériennes ou synthétiques par des séquences similaires d'origine végétale.

4.4. Transformation chez la patate douce

Le tableau 3 présente les principaux travaux de transformation réalisés chez la patate douce.

4.4.1. Principaux objectifs de la transformation

La transformation est une méthode d'amélioration à la fois ciblée et rapide des plantes pour différentes utilisations. Les objectifs de la transformation ont évolué avec les temps. Ainsi, pour Yonekura-Sakakibara et Saito (2006), il y a 3 générations de plantes transgéniques :

- La première génération développée s'est intéressée essentiellement à l'introduction de caractères agronomiques comme la tolérance aux herbicides, des gènes insecticides, la résistance aux virus et le retardement de la maturation.
- La seconde génération s'est intéressée à des caractères bénéfiques aux consommateurs comme l'amélioration de la valeur nutritive, la précocité et la faible allergénicité.
- La troisième et dernière génération en progrès ces dernières années permet la synthèse de vaccins et des principes thérapeutiques.

On retrouve ces 3 générations chez la patate douce (Tableau 3). Ainsi, les premiers travaux comme ceux de Newell et al. (1995); Moran et al. (1998) et Okada et al. (2001) ont concerné la résistance à des stress biotiques. Des travaux se sont intéressés ensuite à la qualité nutritive et industrielle de la patate douce à travers l'amélioration de la qualité de l'amidon (Kimura et al., 2001; Otani et al. 2003a et Shimada et al., 2006). Enfin, des tentatives

d'insertion de principes thérapeutiques ont été publiées à partir de 2005 (Berberich et al., 2005 ; Min et al., 2006).

Tableau 3: principaux travaux réalisés dans le domaine de la transformation génétique chez la patate douce (D'après Shimada et Otani, 2007 avec modifications).

<i>Cultivar</i>	<i>Tissu cible</i>	<i>Vecteur/méthode utilise</i>	<i>Gènes</i>	<i>référence</i>
Non précisé	Vitroplant entier	<i>A. rhizogenes</i>	Séquence synthétique	Dodds et al. (1991)
Jewel TIS-70357	Feuilles et pétioles	Bombardement de particules	<i>gusA nptII</i>	Prakash et Varadarajan (1992)
Cinq cultivars	Feuilles	<i>A. rhizogenes</i> 15834	<i>gusA nptII</i>	Otani et al. (1993)
Jewel	Racines tubérisées	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404	<i>gusA nptII</i> , "cowpea trypsin inhibitor", "snowdrop lecithin"	Newell et al. (1995)
White star	Cal embryogène	<i>A. tumefaciens</i> EHA101	<i>gusA nptII</i>	Gama et al. (1996)
Chikei 682-11	Protoplastes du mesophylle	Electroporation	Hpt, gene <i>dla</i> protein capsid	Murata et al. (1997)
Nanging	Cal embryogène	Biolistique	du virus SPFMV-S	
Kokei 14	Cal embryogène	<i>A. tumefaciens</i> EHA101	<i>gusA</i> , <i>hpt</i>	Otani et al. (1998)
Jewel	Feuilles	<i>A. tumefaciens</i> C58C1	<i>cryIIIA</i> , <i>nptII</i>	Moran et al. (1998)
Kokei 14, Beniazumama	Cal embryogène	<i>A. tumefaciens</i> EHA101	<i>NtFAD3</i> , <i>hpt</i>	Wakita et al. (2001)
Kokei 14	Cal embryogène	<i>A. tumefaciens</i> EHA101	GBSS, <i>hpt</i>	Kimura et al. (2001)
Kokei 14	Cal embryogène	<i>A. tumefaciens</i> EHA101 pCAM35S ou pCAM35S E12Ω	PAT (résistance au bialaphos)	Otani et al. (2003b)
Jewel, PI-318846-3, Jonathan, and Maria angola	Feuilles complètes ou fragments de feuilles	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 Plasmide pKTI-4	pKTI-4 , GUS et NPTII	Cipriani et al. (1998)
jewel	Fragments de feuilles et tiges	<i>A. tumefaciens</i> C58C1-pGV2260 (Str ; Spcr ; Rifr ; Ampr)	Plasmide binaire pDEBTT : <i>nptII</i> et delta- endotoxine de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	Garcia et al. (1999)
Kokei 14	Cal embryogène	<i>A. tumefaciens</i> plasmide pIG121Hm-AN	adiponectine	Berberich et al. (2005)
cv. Lizixiang	Suspensions cellulaires embryogènes	<i>A. tumefaciens</i> strain EHA105 binary vector pCAMBIA1301	Les gènes <i>gusA</i> et l'hygromycine phosphotransferase II (<i>hpt</i> II)	Yu et al. (2007)
cultivar Beniazuma.	Fragments de tige, de petioles et disques de limbes petioles	EHA105	Vecteur binaire pIG121Hm <i>npt</i> II, Hyg, <i>gusA</i> (p35S)	Song et al. (2004)
Kokei 14	Cal embryogène	EHA101	<i>NtFAD3</i>	Wakita et al. (2001)

cv. Kokei 14	Cal embryogène	<i>EHA101/pBIGBSSI-Hm</i>	GBSSI, hpt	Kimura et al. (2001)
Chikei 682-11	Protoplastes du mesophylle	Electroporation pMMHA-4.	CP SPFMV, hpt	Okada et al. (2001)
Non précisé	cell suspension cultures	hLF cDNA	binary vector pLSM1 containing a hLF cDNA	Min et al. (2006)
Non précisé	Protoplastes	électroporation	GFP	Winfield et al., 2001
	Cal embryogène	Biolistique		
Non précisé	Protoplastes	électroporation	CuZn superoxide dismutase (CuZnSOD) et ascorbate peroxidase (APX)	Lim et al. (2007)
	Cal embryogène	Biolistique		
'Yulmi'	Cals embryogènes	<i>Agrobacterium tumefaciens EHA105</i>	phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) , gusA	Choi et al. (2007)
"Jewel"	Cals embryogènes	électroporation	pBII21, <i>GUS</i>	Mitchell et al.(1998)
cv. <i>Beauregard</i>	Protoplastes	électroporation	GFP	Lawton et al. (2000)
	Cal embryogène	Biolistique		
Kokei 14,	Cal embryogène		RNAi de hpt, 1 partie d'exon GBSSI en sens et antisens et le 1 ^{er} intron	Otani et al.(2007)
Yulmi	Cal embryogène	Biolistique	gusA, résistance au PPT (herbicide)	Yi et al. (2007)
cv. Kokei 14)	Cal embryogène	EHA101	spermidine synthase (<i>FSPD1</i>).	Kasukabe et al. (2006)
cv. Kokei 14),	Cal embryogène	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA101	Interférence d'ARN <i>IbSBEII en sens et antisens et premier intron</i> , <i>GUS</i>	Shimada et al.(2006)

a. Stress biotiques

Des plantes transgéniques ont été développées afin de surmonter des stress biotiques causés les insectes (Newell et al. 1995; Moran et al. 1998), les virus (Okada et al. 2001) et les mauvaises herbes (Otani et al. 2003b).

Deux rapports publiés font état de plantes transformées présentant des gènes de résistance aux insectes surtout le charançon qui est le ravageur le plus destructeur dans le monde. Newell et al. (1995) ont introduit les gènes « cowpea trypsin inhibitor » et « snowdrop lectin » dans le génome de la patate douce mais ils n'ont pas confirmé la résistance aux insectes. Par contre, Moran et al. (1998) ont régénéré des plantes transgéniques exprimant le gène cryIIIA et ont observé que ces plantes sont moins affectées par le charançon que les plantes témoins dans les tests au champ.

Okada et al. (2001) ont produit des plantes transgéniques cv. Chikei 682-11 exprimant le gène de la protéine capsid du virus SPFMV et ces plantes se sont avérées hautement résistantes au virus. Récemment au Kenya, des lignées transgéniques de la variété CPT560 transformées avec le gène de la protéine capsid du virus SPFMV ont été testées au champ sous des conditions non contrôlées pour évaluer leur résistance, le rendement en racines tubérisées et d'autres caractères (Gichuki et al. 2003b).

Des plantes transgéniques de patate douce comprenant le gène de la phosphinothricine acetyl transferase qui donne la résistance à un herbicide appelé bialaphos ont été régénérées par Otani et al. (2003b). Cette forme de résistance aux herbicides rend la lutte contre les mauvaises herbes plus commode et économique.

Plus récemment, Choi et al. (2007) ont réussi à régénérer des plantes transgéniques résistantes aux herbicides par l'insertion d'un gène codant pour la phosphinothricine N-acetyltransferase (PAT) qui fixe un groupement acétyle sur la fonction NH₂ libre du Phosphinothricine (PPT) évitant ainsi l'autotoxicité et conférant une résistance à l'herbicide.

b. Stress abiotiques

Les stress abiotiques comme les faibles températures, la sécheresse, et le gel précoce posent de sérieux problèmes à la production de patate douce. Wakita et al. (2001) ont introduit chez la patate douce le gène de la désaturase des acides gras afin d'augmenter la teneur en acides gras insaturés et améliorer ainsi la tolérance aux faibles températures. Lim et al. (2007) se sont intéressés au métabolisme oxydatif des chloroplastes qui provoque les dommages les plus importants résultant de l'exposition des plantes aux stress

environnementaux. Ils ont produit des plantes transgéniques SSA surexprimant le CuZn superoxyde dismutase (SOD) et ascorbate peroxidase (APX) qui sont des enzymes protectrices des formes réactives de l'oxygène (ROS) sous le contrôle d'un promoteur inductible par le stress. Les plantes entières et en particulier les feuilles sont plus résistantes au stress oxydatif médié par le paraquat (methyl viologen) par rapport aux plantes non transgéniques.

Kasukabe et al. (2006) ont obtenu des plantes transgéniques exprimant le gène de la spermidine synthase et les plantes obtenues comportent deux fois plus de spermidine par rapport aux plantes témoins. Le nombre de racines tubérisées est plus élevé aussi bien en conditions normales qu'en conditions de stress. Elles sont moins affectées par la sécheresse et la salinité. Elles se montrent plus tolérantes au gel et aux hautes températures dans leurs effets sur la photosynthèse. Le gène introduit (FSPD1) semble avoir un effet anti-oxydatif au moins en partie puisque les plantes transformées sont tolérantes au paraquat.

c. Qualité de l'amidon

Des expériences de transformation de la patate douce ont été réalisées afin de créer de nouvelles variétés présentant de nouvelles caractéristiques au niveau de la structure de l'amidon pour de nouvelles applications industrielles. Kimura et al. (2001) ont introduit la séquence complète de l'ADNc de l'enzyme GBSSI (granule-bound starch synthase I) qui est une enzyme clé pour la formation de l'amylose un polymère linéaire $\alpha(1,4)$ d-glucane à partir de l'ADP-glucose pour la modification de la structure de l'amidon. Une plante transgénique parmi 26 régénérées est dépourvue d'amylose au niveau de ses racines tubérisées. D'autres plantes transformées ont été obtenues par inhibition de l'expression du gène codant pour GBSSI à travers l'interférence de l'ARN (Otani et al. 2003a). Shimada et al. (2006) ont réussi à augmenter la teneur en amylose au niveau des tubercules de patate douce en introduisant des ARN double brin interférentes (dsRNA) pour l'inhibition du gène codant pour l'enzyme *IbSBEII* (starch branching enzyme II gene, *IbSBEII*) responsable de la ramification de l'amidon. Les plantes transgéniques ainsi obtenues n'expriment pas le gène et la teneur en amylose passe à 25% contre 10 chez le témoin.

d. Objectifs thérapeutiques

La patate douce a été utilisée récemment pour produire des principes thérapeutiques. Berberich et al. (2005) ont régénéré des plantes transgéniques produisant l'adiponectine de souris qui est une protéine antidiabétique alors que Min et al. (2006) ont réussi à faire

produire dans la patate douce la lactoferrine humaine (hlf) qui est une protéine fixatrice de fer découverte dans le lait et qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire, en empêchant la croissance de pathogènes avec des propriétés antibactériennes et antivirales et des facilités dans le transport du fer.

4.4.2. Facteurs affectant l'efficacité de la transformation par *Agrobacterium*

La transformation par *Agrobacterium* constitue la méthode dominante pour la transformation de la patate douce. En effet, parmi les travaux présentés dans le tableau 3, 19 sur 29 ont été régénérées par agroinfection. Les cals et les suspensions embryogènes constituent un matériel privilégié pour cette agroinfection.

Plusieurs facteurs se sont avérés déterminants pour la réussite de la transformation.

a. Explant initial

La plupart des plantes transgéniques signalées dans la bibliographie ont été régénérées suite à une coculture avec *Agrobacterium tumefaciens* avec différents types d'explants comme les racines tubérisées (Newell et al. 1995), les disques foliaires (Moran et al. 1998), des fragments de tige (Song et al. 2004) et des cals embryogènes (Gama et al. 1996, Otani et al. 1998).

La majorité des travaux ont utilisé des cultures embryogènes sous forme de cals ou de suspensions cellulaires (tableau 3). Ces cultures s'imposent grâce à leur taux de multiplication et de régénération élevés et la facilité de leur entretien.

L'âge du cal embryogène a aussi un effet déterminant : les cals âgés de 14 jours depuis le dernier repiquage ont donné le meilleur nombre de spots (Otani et Shimada, 2002).

b. Type de plasmide

L'expression du transgène GUS variait avec le plasmide bactérien. *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/p1G121-Hm a donné les spots les plus élevés alors que les autres soit n'ont rien donné (LBA4404/pTOK233) ou ont généré peu de spots en moyenne six spots par gramme de poids frais pour R1000/pB1121) (Otani et Shimada, 2002). Gama et al. (1996) ont aussi réussi à transformer des plants de patate douce en utilisant le même plasmide bactérien EHA101. Ces résultats suggèrent que ce très virulent plasmide est recommandé pour la transformation chez la patate douce (Otani et Shimada, 2002).

c. L'acetosyringone

L'acétosyringone est ajouté systématiquement au milieu de coculture dans beaucoup de travaux. Otani et Shimada (2002) ont testé son effet sur la réussite de la transformation en utilisant des cals embryogènes âgés de 14 jours du cultivar 'Kokei 14' et *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101/pI-G121-Hm. L'addition de l'acétosyringone a significativement amélioré l'expression du transgène GUS

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Dans le cadre de ce travail, nous avons appliqué différentes techniques de biotechnologie pour l'amélioration génétique de la patate douce. Dans ce contexte, nous avons d'abord essayé de déterminer les conditions optimales pour l'induction de l'embryogenèse somatique. L'investigation a été étendue à l'examen du génotype, de l'agent gélifiant et l'auxine et leur interaction sur l'induction de l'embryogenèse somatique chez la patate douce. Nous avons comparé les effets de deux agents gélifiants, agar et gelrite, combinés avec les effets de trois auxines 2,4,5-T, 2,4-D et Piclorame utilisés à différentes concentrations sur l'embryogenèse somatique chez 6 cultivars de patate douce chinoises et un clone marocain. De même, la stabilité génétique des plants dérivant de l'embryogenèse a été aussi examinée à travers la détermination de la ploïdie par la technique de cytométrie en flux.

Nous avons aussi tenté d'entretenir les cultures embryogènes en milieu solide et en milieu liquide agité sous forme de suspensions cellulaires.

Ces cultures embryogènes ont été mises en culture sur différentes séquences de milieux de régénération afin d'induire le développement d'embryons somatiques et leur conversion en plantes entières. Nous avons essayé, entre autres, de déterminer l'effet de l'acide abscissique.

Parallèlement, nous avons tenté d'obtenir des plantes transgéniques par l'utilisation de souches d'*Agrobacterium tumefaciens* portant des gènes marqueurs : GUS et nptII puis une souche portant un gène de résistance aux potyvirus. En absence d'un système de régénération par embryogenèse bien maîtrisé au début de notre travail, nous avons comparé la réponse de plusieurs explants (entrenoeuds, pétioles, nœuds ébourgeonnés). L'explant sélectionné, constitué de nœuds ébourgeonnés a été utilisé pour la transformation avec des souches d'*Agrobacterium* portant des gènes marqueurs puis une souche portant un gène de résistance aux potyvirus.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel végétal

Ce travail a été mené avec huit cultivars. Cinq clones des cultivars Quangshu, Zho, 953, 865 et 90 ont été obtenus de Xuzhou Sweet Potato Research Center, China, et le clone cv Duclos 11 de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) des Antilles françaises. Ces clones ont été utilisés pour les manipulations de l'embryogenèse somatique.

Un clone de Zhounang 13, qui est le principal cultivar concerné par le projet européen, a été utilisé essentiellement dans des expériences sur la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens*.

Un clone marocain (M) a été constitué à partir de tubercules commercialisés et utilisé pour la formation de cals embryogènes.

Le matériel végétal est entretenu par culture de nœuds, à 6 semaines d'intervalle dans des tubes (25 x 300 mm) contenant le milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962), additionné avec les vitamines de Morel (Morel et Wetmore, 1951, cf. annexe 1), 20 g/L de saccharose, 0,5 mg/L d'AIA et solidifié avec 7 g/L d'agar (Sihachakr et Ducreux, 1987a). Les tubes sont incubés en salle de culture à $27\pm 2^\circ\text{C}$ sous 16h de lumière à l'intensité de $62\ \mu\text{M m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ et 60% d'humidité.

2. Induction des cals embryogènes

Pour l'induction de l'embryogenèse somatique, des bourgeons axillaires sont isolés à partir de vitroplants âgés de 7 à 8 semaines avec une aiguille hypodermique sous une loupe binoculaire. Un minimum de 10 bourgeons sont placés à la surface de milieu solide dans des boîtes de pétri 10 x 60 mm. Le milieu d'induction est composé du milieu minéral MS (cf. annexe 1), les vitamines de Morel, 30 g l⁻¹ de saccharose. Le milieu est additionné de l'une des 3 auxines : 2,4-D, 2,4,5-T (5 et 10 μM) et Piclorame à 5 μM . La solidification du milieu est réalisée avec l'addition de l'agar (Bacto Agar – DIFCO) à 7 g l⁻¹ ou du phytigel à 3 g l⁻¹. Le pH est ajusté à 5,8 avant autoclavage des milieux pendant 20mn sous une pression de 1 kb. L'incubation des boîtes se fait à l'obscurité à $27\pm 2^\circ\text{C}$.

3. Entretien des cals embryogènes

Les cals embryogènes sont divisés en fragments de 2 à 3 mm de diamètre et repiqués dans des boîtes de pétri contenant le milieu d'entretien à raison de 10 fragments par boîte.

Les milieux d'entretien des cals comprennent le milieu MS avec les vitamines de Morel, 30 g/L de saccharose. Ce milieu est additionné de régulateurs croissance comprenant soit le 2.4-D à 10 μ M combiné ou non avec BAP à 1 μ M, soit le 2.4.5-T à 5 μ M. Le milieu est solidifié avec du gelrite à 3 g/L.

Les cals embryogènes sont incubés à la lumière avec une photopériode de 16/8. La température d'incubation est de 27°C.

4. Traitement des résultats

Chaque expérience d'induction de l'embryogenèse somatique impliquant une combinaison de facteurs a été répétée six fois au minimum utilisant environ 4000 explants. Le nombre de réponses embryogènes a été collecté après 10 semaines de culture. Les données en fréquence (x) ont été transformées en $\arcsin\sqrt{x}$ (transformation angulaire) et la fréquence 0 en $1/4n$ (Steel et Torrie, 1960), n étant le nombre d'explants. Les variables transformées ont été soumises à une analyse statistique selon le modèle d'analyse de la variance à 1 ou 2 critères de classification. Les différences significatives ont été soumises au test de Duncan (Duncan, 1955).

5. Etablissement de suspensions cellulaires

5.1. Initiation des suspensions cellulaires

Les cals embryogènes des génotypes Zho et 865 ont été utilisés pour l'initiation des suspensions cellulaires. Des fragments de cals de 2 à 3 mm de diamètre fraîchement repiqués sur le milieu de maintenance depuis 1 à 2 semaines sont transférés en milieu liquide Ma₂ (Ma, 1991) utilisé généralement pour les suspensions cellulaires embryogènes chez le bananier (Ma, 1991; Assani et al., 2002 et Guédira, 2006) (tableau 4). Ce milieu contient 5 μ M de 2,4 D. Les cultures ont été initiées durant le premier mois de culture dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant chacun 5 mL du milieu Ma₂.

Les suspensions initiées à partir de cals, sont transférées après 2 mois de culture dans des erlenmeyers de 250 mL. Ces récipients contenant 50 mL du milieu Ma₂ sont obturés par du coton et recouverts par un papier d'aluminium,

Les cultures sont ensuite placées à la lumière sur un agitateur rotatif à 125 tours/mn.

Tableau 4: Composition du milieu Ma₂ (Ma, 1991)

Macro-éléments	MS
Micro-éléments	MS
Fe-EDTA	MS
Vitamines	Morel
Myo-inositol	100 mg/L
Glutamine	100 mg/L
Extrait de Malt	100 mg/L
2,4-D	5 µM
Saccharose	45 g/L
pH = 5,7	

5.2. Dynamique de croissance

Dans le but de déterminer la dynamique de croissance des suspensions, le volume cellulaire est mesuré toutes les 4 semaines. Pour ce faire, le contenu de l'ermeneyer est déversé dans une éprouvette graduée stérile. Le volume cellulaire est déterminé après décantation.

5.3. Etude histologique

Des échantillons d'agrégats cellulaires sont fixés au minimum pendant 24 h au formol à 10 %. Ils sont ensuite déshydratés dans un bain d'alcool 95° puis dans l'alcool absolu avant d'être plongés successivement dans le toluène et la paraffine.

Les fragments ainsi préparés sont inclus dans des blocs de paraffine et des coupes de 4µm d'épaisseur sont réalisées au microtome. Le déparaffinage est réalisé à l'étuve à 80°C pendant 30 mn puis dans des bains de toluène 2 x 5mn.

Pour l'hydratation, les lames sont plongées successivement dans l'alcool absolu, 95°, 70° et enfin dans l'eau.

La coloration débute par un traitement des lames à l'hématoxyline pendant 2 mn, lavées à l'eau, à l'eau acidifiée au Hcl 1% puis à l'eau ammoniacale 10 % pour bleuir les noyaux avant de laver à l'eau. La deuxième coloration se fait par traitement à la phloxine à 3% suivi par un lavage à l'eau. Les lames sont ensuite déshydratées à l'alcool 70° puis à l'alcool absolu

absolu. La dernière étape de la coloration comprend un traitement au safran suivi par 2 bains d'alcool absolu et un bain de toluène.

Le montage se fait par un kit de baume de montage pour coupes histologiques (Eukit, labonord).

6. Régénération d'embryons somatiques

6.1. Régénération à partir de cals

6.1.1. Expériences préliminaires

La régénération des cals embryogènes et la maturation des embryons sont réalisées sur un ensemble de séquences de milieux comprenant différentes compositions de régulateurs de croissance. Ces séquences impliquent soit la réduction de la concentration en auxines, l'introduction de cytokinines ou l'utilisation de l'acide abscissique et l'acide gibbérellique à différentes concentrations. Le milieu de base comprend toujours le milieu minéral de MS avec les vitamines de Morel et 30 g/L de saccharose.

Dans des expériences préliminaires, Le milieu DK (2,4-D et kin à 1 μ M chacun) utilisé par Cavalcante-Alves (1996) est comparé avec le même milieu de base additionné d'ABA à 9,5 μ M. Deux agents gélifiants sont comparés : l'agar (Kalys agar HP996) à 0,7% et le gelrite (phytagel p-8169) à 0,35%. Les embryons développés sont transférés sur le milieu de base sans régulateurs de croissance.

Nous avons ensuite testé différentes séquences de milieux inspirées de la bibliographie. Ces séquences sont détaillées dans les paragraphes ci-après.

6.1.2. Effet des séquences de milieux

a. Milieu de prématuration

Après deux semaines de culture sur le milieu d'entretien (Tableau 5), les fragments de cals embryogènes qui présentent un bon aspect sont repiqués dans des boîtes de Pétri (9x1cm) contenant le milieu T (tableau 5) dépourvu de régulateurs de croissance afin de favoriser le développement des embryons somatiques (Von Arnold et al., 2002).

Les cultures sont incubées à 27°C sous un éclairage d'environ 2000 lux durant 16 h par jour.

b. Milieux de maturation

Dans le but d'optimiser la régénération, les cals embryogènes et les agrégats cellulaires issus des suspensions qui développent des embryons somatiques sur milieu VM30 et qui ne présentent pas de nécroses sont sélectionnés pour notre expérimentation.

Sept milieux de maturation sont testés (Tableau 5). Pour chaque culture, un minimum de 5 cals ou agrégats cellulaires sont mis en culture dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre. Chaque combinaison est répétée moins trois fois.

Les cultures sont incubées pendant 5 semaines à 27°C sous un éclairage d'environ 2000 lux durant 16 h par jour.

c. Milieux de germination

Les cultures embryogènes qui possèdent des embryons verts ayant atteint le stade torpille avancé ou cotylédonaire, sont isolées et transférées dans des tubes à essais (25x300 mm).

Trois milieux différents (MS, K1, G1) sont utilisés pour tester le développement de la partie aérienne et racinaire des plantules (tableau 6).

Les cultures sont incubées à 27°C sous un éclairage d'environ 2000 lux durant 16 h par jour.

Tableau 5 : Composition des milieux de maturation

	Milieu de prolifération	T	DK	A _{0,4} B _{0,5}	ABA 1.5	ABA 2.5	ABA4	ABA4-G1
Milieu minéral	MS							
Vitamines	Vitamines de Morel							
Saccharose	30 g/L							
ABA (µM)	-				5,6	9,5	15	15
BAP (µM)	1		1	2,2				
KIN (µM)			1					
2,4D (µM)	10							
AIA (µM)				2,2				
GA3 (µM)								1
Gelrite (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
pH	5,7 – 5,8							

Tableau 6 : Composition des milieux de germination.

	MS	K1	G1
KIN (μM)		1	
GA3 (μM)			2,85
Gelrite (g)	2	2	2

6.2. Régénération à partir de suspensions cellulaires

Dans le but de tester la capacité embryogène des suspensions cellulaires obtenues, Nous avons réalisé deux séries d'expériences.

Dans la première série, des parties aliquotes (0,3 à 0,4 mL) ont été étalées sur trois types de milieux solides. Les trois milieux de régénération primaires solides utilisés sont $A_{0,4}B_{0,5}$, et VM30 inspirés des travaux de Assani et al. (2002) et Guédira (2006) sur le bananier ainsi que sur un milieu comprenant l'ABA à 1,5 mg/L (tableau 7).

Tableau 7 : Composition des milieux $A_{0,4}B_{0,5}$, et VM30 et ABA 1,5

	$A_{0,4}B_{0,5}$	ABA 1,5	VM30
Macro-éléments	1/2MS	1/2MS	MS
Micro-éléments	1/2MS	1/2MS	MS
Fe-EDTA	1/2MS	1/2MS	MS
Vitamines	Morel et Wetmore	Morel et Wetmore	Morel et Wetmore
BAP (μM)	2,2		
AIA (μM)	2,2		
ABA (μM)		5,6	
Saccharose	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Gelrite	3 g/L	3 g/L	3 g/L
pH	5,7		

Par la suite, les agrégats vivants et évolutifs ont été repiqués successivement sur différents milieux de maturation dans le but de déterminer la séquence de milieux optimaux pour la conversion des embryons somatiques en plantes entières.

La deuxième série d'expériences, a été réalisée uniquement avec cv865. Des parties aliquotes de 0,5 mL de volume cellulaire sont étalées sur un milieu de prématuration sans régulateurs de croissance avant d'être repiqués sur des milieux de maturation conformément à ce qui a été réalisé avec les cals (tableau 5).

6.3. Observations et traitement des résultats

La maturation est estimée par comptage des embryons somatiques à différents stades de maturation pendant 4 semaines à raison d'une observation par semaine. Les nombres d'embryons observés à la troisième semaine sont traités par analyse de la variance à 5 % et les différences significatives sont classées par le test de Duncan (Duncan, 1955).

Le pourcentage de conversion des embryons somatiques sur milieu de germination est calculé comme suit :

$$P = \frac{\text{Nombre de plantules obtenues par cal ou agrégat}}{\text{Nombre total d'embryons avant repiquage}} \times 100$$

La moyenne et l'erreur sont calculées pour ce paramètre.

6.4. Détermination du niveau de ploïdie par cytométrie en flux

Parmi des centaines de plants issus d'embryons somatiques du cultivar Zho un échantillon de 50 clones ont été sélectionnés au hasard et multipliés pour l'étude de la stabilité génétique. La cytométrie en flux a été utilisée pour quantifier l'ADN pour la détermination du niveau de ploïdie comme décrit par Fock et al. (2001). Brièvement, 1 cm² de feuille à partir de vitroplants est finement coupé dans 1 mL de tampon contenant les minéraux CPW (Frearson et al. 1973), le mannitol à 0,5M, 0,25 % (w/v) de PEG, 0,5% (w/v) triton X-100 et 0,25% (v/v) de mercaptoéthanol à pH6,5-7. Les échantillons bruts sont passés à travers un filtre de nylon (40µM de diamètre) et colorés par le 4,6diamidino-2-phenylidole (DAPI, 5µg mL⁻¹). L'analyse de l'ADN est réalisée sur cytométrie en flux PARTEC CA II (Chemunex, Maison Alford, France) équipé d'une lampe de mercure 100 W (type HBO). La fluorescence bleue à 455 nm a été enregistrée en fonction du contenu en ADN. Les plants parentaux (6X) de patate douce (2n=6x=92 chromosomes) (Srisuwan et al., 2006) ont été utilisés comme références externes pour étalonner l'échelle de fluorescence. La distribution de l'ADN a été

analysée en utilisant DPAC software sur des histogrammes générés à partir au moins 10000 noyaux.

7. Transformation

7.1. Souches bactériennes

Trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été successivement utilisées :

- La première appelée GUSMVE comprend le plasmide C58C1 (GV2260). Le vecteur binaire pBinGUSint porté par cette souche comprend deux gènes marqueurs : Gus qui code pour la β -glucuronidase qui a la caractéristique d'hydrolyser le substrat incolore X-gluc en un produit coloré en bleu et le gène nptII conférant la résistance à la kanamycine.
- La deuxième souche appelée GV 3101-pTHW136 a été par la suite utilisée. Elle comprend un plasmide binaire qui porte les mêmes gènes que précédemment. Le plasmide Ti désarmé utilisé est représenté ci-après :

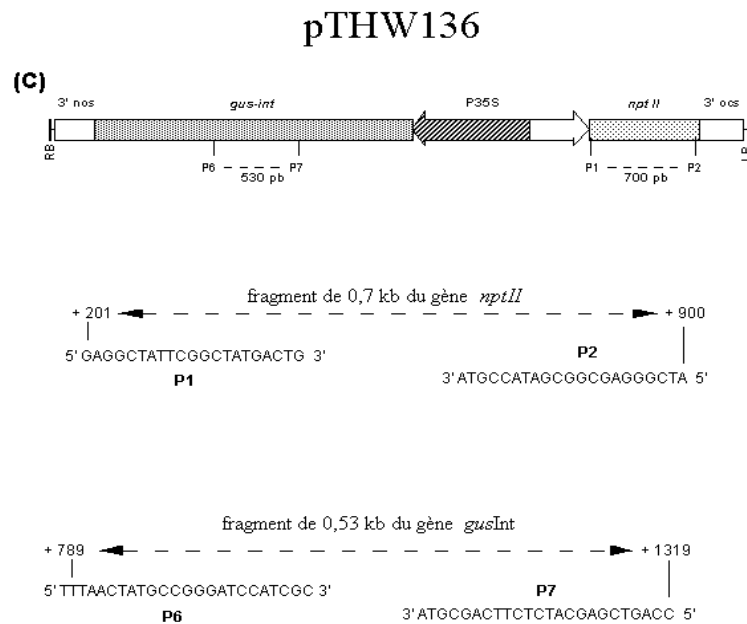


Figure 3 : structure de l'ADN-T de la souche GV 3101-pTHW136

- La souche C58C1RifR (pGV2260) d' construite au laboratoire de Gembloux portant le vecteur de transformation pBECKS19 dérivant de pBin19, une souche bactérienne construite au laboratoire de Gembloux. La cassette de transformation contient le gène nptII qui confère la résistance à la kanamycine chez les plantes transformées ainsi qu'un site multiple de clonage Ω pour l'insertion d'un gène placé sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV35.

Dans le cas de notre souche, la construction s'appelle pB19YAXTR12.6 et porte le gène codant pour une protéine PVY portant des mutations au domaine AX (384-390). Le gène a subi une mutagenèse dirigée donnant la double mutation pzpplpvymutax. Les mutations ont donné les effets suivants :

Mutation K389 : 1176 AAG → AAC

Mutations R385, R387, R388 1164 AGAACAAGAAGG → AACACAAACAAC

7.1.1. Préparation des souches bactériennes

Les souches, conservées à l'état congelé, sont étalées sur milieu solide. Des colonies sont remises en suspension dans 40 ml de milieu liquide et laissées à incuber en agitation à 27°C 24 h avant la manipulation (annexe 2).

7.1.2. Infection et coculture

La suspension bactérienne est soumise à un dosage au spectrophotomètre ($\lambda=600\text{nm}$) suivi d'une dilution en milieu liquide de manière à obtenir une absorbance comprise entre 0.4 et 0.6. Cependant, dans les premières expériences, la suspension bactérienne était diluée au un quart sans dosage.

Les plantules de patate douce âgées d'environ 8 semaines, sont sorties des tubes (Figure A) et disséquées dans des conditions aseptiques (Figure B et C). Trois types d'explants sont isolés: des fragments d'entre-nœuds, des morceaux de pétiole et des nœuds qui sont entaillés légèrement au niveau du bourgeon (Figure D et E). Les nœuds ébourgeonnés ont été utilisés pour la majorité des expériences.

Les explants sont ensuite plongés dans la solution bactérienne diluée (Figure F) qui est agitée légèrement au vortex pendant 10 secondes (Figure G). Après une durée de 10 à 30 mn suivant les expériences, les explants sont prélevés, éponnés dans une boîte de pétri stérile comprenant un papier filtre stérile (Figure H) etensemencés dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre contenant le milieu 440 dépourvu d'antibiotiques (annexe 2).

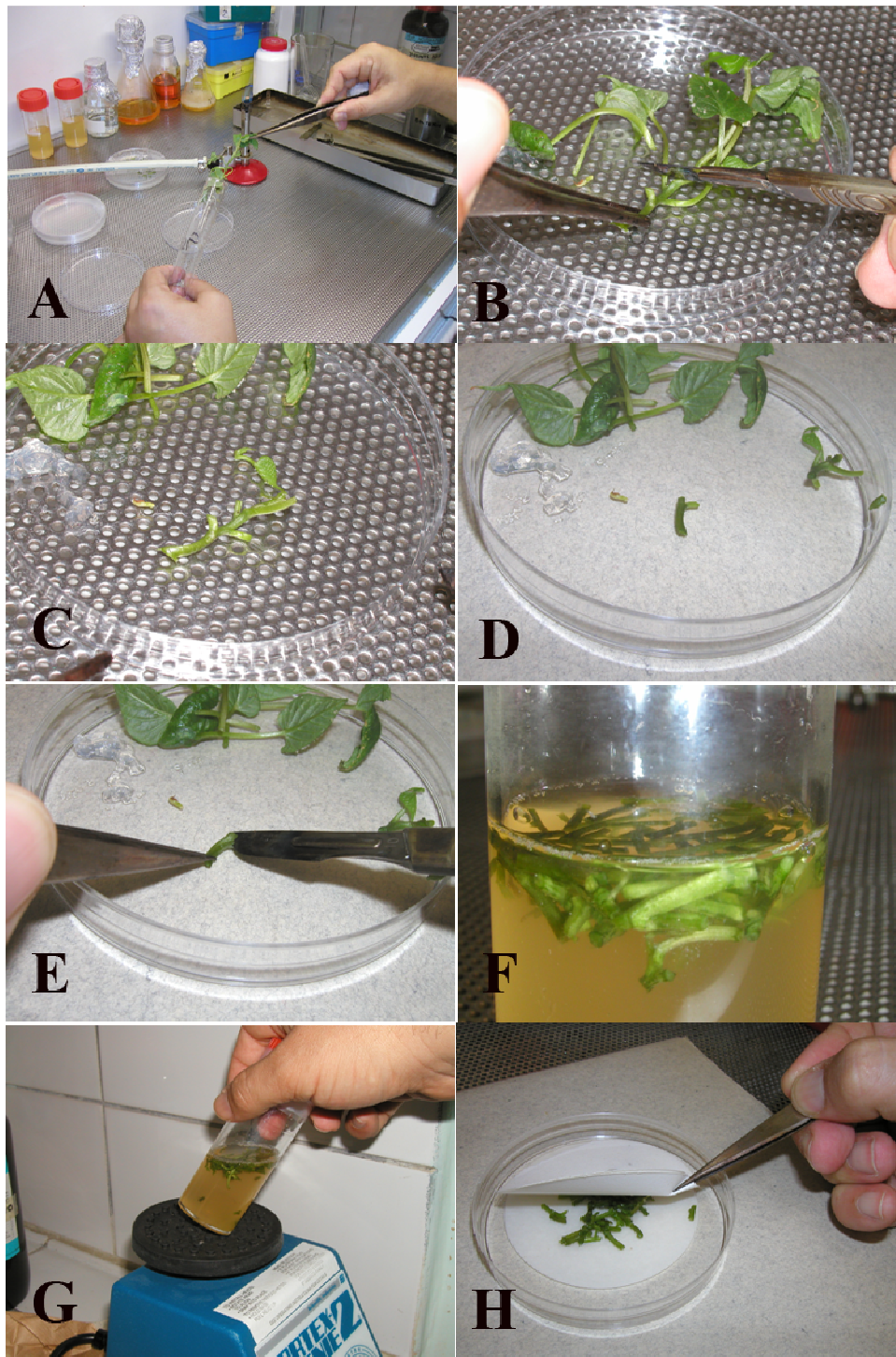


Figure 4 : les différentes étapes de la transformation génétique de la patate douce. A : plantules âgées d'environ 8 semaines. B, C et D : dissection dans des conditions aseptiques. E : incision au niveau du bourgeon axillaire. F : immersion dans la solution bactérienne. G : agitation au vortex pendant 10 secondes. H : séchage entre deux feuilles de papier filtre.

7.1.3. Culture et repiquages

Après 48 h, les explants sont repiqués sur le milieu 441 qui est additionné de 500 mg/l de céfotaxime ou de timentine (ticarcilline/acide clavulanique). Ces antibiotiques servent à bloquer la croissance bactérienne.

Les observations sont réalisées chaque semaine pour suivre la régénération des bourgeons et noter leur coloration. Au bout de trois à quatre semaines environ, les pousses vertes régénérées sont découpées en explants uninodaux et repiqués sur le milieu de multiplication comprenant les antibiotiques mais sans régulateurs de croissance.

7.1.4. Régénération

Après 48 h, les nœuds ébourgeonnés sont repiqués sur le milieu de régénération 442 (cf. annexe 2) qui comprend la timentine (ticarcilline/acide clavulanique) à 500 mg/l. Cet antibiotique a montré une meilleure efficacité par rapport à la cefotaxime utilisé auparavant.

7.2. Observations

Pour chaque boîte, on note le nombre d'explants ayant régénéré par rapport à l'ensemble des explants ensemencés. Les plantules régénérées doivent être multipliées sur milieu 442 afin de constituer des clones qui serviront aux tests Kanamycine et aux études moléculaires.

7.3. Test à la kanamycine

Des nœuds représentant les clones régénérés sont repiqués sur le milieu 443 (annexe 2) afin de tester leur résistance à la kanamycine. La concentration de kanamycine dans le milieu doit tenir compte de la sensibilité de chaque cultivar. D'après les manipulations précédentes, cette concentration est de 75 mg/l pour Zhounang 13 et 100 mg/l pour 953. Les nœuds des clones résistants se développent normalement alors que les non résistants donnent des bourgeons blancs qui n'évoluent pas.

7.4. Test Gus

Les fragments de feuilles sont placés en tubes eppendorfs et recouverts par 50 à 75 µl de la solution pour la détection du gène GUS comprenant : le ferricyanure de potassium et le ferrocyanure de potassium 1%, le X-Gluc à 5 % et le tampon phosphate à 93 % (annexe 2).

Les tubes eppendorf sont placés au bain marie à 37 °c pendant 2 à 8 heures selon l'intensité de la coloration. Les échantillons sont rincés 3 fois avec du tampon phosphate et gardés au froid (4 °c) pendant 2 mois au maximum.

7.5. Analyse moléculaire

Ce test consiste à détecter les séquences transgéniques au sein de l'ADN de la plante.

7.5.1. Extraction de l'ADN total

L'ADN total est extrait des feuilles de vitroplants âgés de 8 semaines grâce à un kit d'extraction (Dneasy Plant mini kit, Qiagen). L'isolement et la purification de l'ADN total sont réalisés sur des colonnes de résine anioniques. Cette méthode ne requiert qu'une faible quantité de matériel végétal: 100 mg de feuilles.

Le broyage des feuilles se fait au Danguomeau, à froid, à l'aide d'une bille d'acier. Le protocole suivi est celui proposé par Qiagen (Annexe 3).

L'ADN bactérien servira comme témoin positif et celui de plantes non infectées (Z13 et 953) comme témoin négatif.

Les solutions d'ADN total sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

La qualité et la quantité de l'ADN extrait sont évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose par comparaison avec un ADN témoin dont la quantité est connue. Une quantité aliquote des échantillons d'ADN (5 µL) est mélangée à 15 µL de tampon TBE 0,5x (Tris Borate EDTA) et 3 µL de tampon de charge (Annexe 3) contenant du bleu de bromophenol avant d'être déposée sur un gel d'agarose à 0,7 % préparé à partir de TBE 0,5x et contenant 0,1 µg/mL de bromure d'éthidium (BET). Un témoin de masse moléculaire (le marqueur de taille de 1kb; ladder Biolabs) sert de référence quantitative.

La migration dure environ 2 heures 30 minutes sous une tension de 80 V. L'évaluation de la concentration en ADN des différents échantillons est réalisée après photographie sur une table à ultraviolet, par comparaison de l'intensité de la fluorescence des bandes d'ADN des échantillons avec les bandes du marqueur moléculaire.

Des échantillons de ces ADN sont prélevés et amplifiés par PCR en présence d'amorces spécifiques.

7.5.2. Composition du milieu réactionnel

Les réactions PCR permettant d'amplifier les séquences ciblées dans un milieu réactionnel comportant : 30 ng d'ADN, le tampon d'amplification (concentré 10 fois) contenant 1,5 mM de MgCl₂, 25 µM de chaque dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,2 µM de chacune des deux amorces (GUS et NPTII) et 1 U de Taq DNA polymérase (Appligene) et un volume d'eau stérile nécessaire pour compléter le volume réactionnel à 25 µL (Annexe 3). Le tampon, les NTP et la taq polymérase proviennent du « PCR amplification kit » de Qiagen.

7.5.3. Amplification de l'ADN

Le programme d'amplification est réalisé dans un thermocycleur Touchgene (Techne) et compte une dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 10 mn. L'amplification se produit au cours de 35 cycles comprenant une étape de dénaturation de l'ADN de 1 mn à 94°C; 1mn à T_m (50°C) et 1 mn à 72°C. Une élongation supplémentaire de 5 mn à 72°C termine l'amplification à la fin des 35 cycles.

A la fin de la réaction PCR, le tampon de charge contenant le bleu de bromophénol (annexe 3) est ajouté aux produits d'amplification au 1/10 du volume.

7.5.4. Analyse des produits d'amplification :

La séparation préalable des produits d'amplification est réalisée sur gel d'agarose à 1.4% pendant 3 à 5 h à 100 V. Les fragments amplifiés sont mis en évidence sur une table à ultraviolets après coloration par le Bet (0,1 µL). Les gels sont ensuite photographiés (film polaroid).

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Induction de cals embryogènes

1.1. Evolution des explants en culture

Les bourgeons (figure 5A) mis en culture commencent par se gonfler légèrement durant les deux premières semaines de culture. Ils perdent leur consistance compacte et deviennent vitreux et liquéfiés. Des structures embryonnaires, formées de masses compactes nodulaires à petites cellules, émergent de cette masse mucilagineuse (figure 5B).

Ces structures présentent souvent une coloration rouge due à la présence d'anthocyanes (figure 5C). Ces structures embryonnaires grossissent pour former une masse embryogène compacte (figure 5D). Le repiquage de ces structures sur un milieu neuf permet leur développement en cal embryogène rouge (figure 5D) ou jaune suivant les génotypes.

Le cal comprend une partie compacte noduleuse riche en embryons et une partie molle mucilagineuse blanchâtre (figure 5D). Au cours des repiquages successifs, cette partie molle se régénère constamment et donne de nouvelles structures embryonnaires.

Certains explants forment de petits cals qui dégénèrent rapidement ou des cals non embryogènes blancs ou bruns friables à croissance rapide formées de cellules allongées très vacuolisées.

La capacité de formation des cals embryogènes varie à la fois en fonction de la composition du milieu de culture et du génotype.

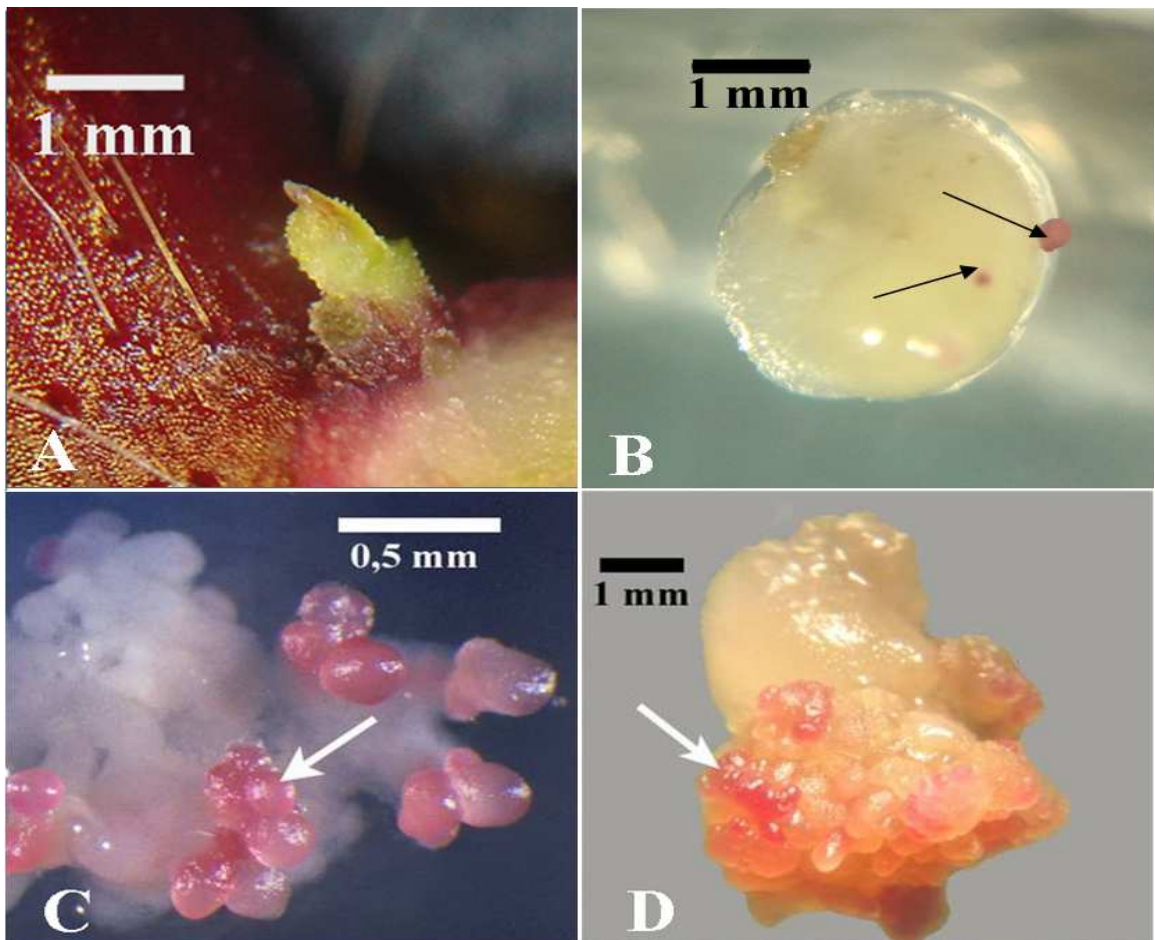


Figure 5: Explant initial au moment de la culture(A) début de formation du cal embryogène rougeâtre au sein d'une masse mucilagineuse laiteuse cv Zho (B) structures embryogènes rouges émergeant à partir de la masse laiteuse cvZho (C) cal embryogène nodulaire rouge du cv Zho. Les flèches indiquent les parties compactes embryogènes.

1.2. Effet de l'agent gélifiant

L'effet de deux types d'agents gélifiants, agar et gelrite, a été testé pour l'induction de la réponse embryogène chez six cultivars de patate douce (Tableau 8). L'analyse de la variance appliquée au pourcentage de réponse embryogène a montré des effets hautement significatifs de l'agent gélifiant et du génotype. Indépendamment du génotype, le milieu solidifié avec l'agar a donné la meilleure réponse embryogène estimée à 3,53 % alors que très peu de bourgeons axillaires ont formé des cals embryogènes sur gelrite avec seulement 0,45 %. Parmi les six génotypes testés, seuls trois qui sont Zho, 865 et 90 ont produit une réponse embryogène (Tableau 8).

La meilleure réponse embryogène a été obtenue chez les cultivars Zho et 865 sur le milieu solidifié avec l'agar et contenant 5 μM de 2.4.5T. Les pourcentages obtenus sont respectivement de 10,7 pour Zho et 14,68 % pour 865. Malgré l'absence d'interaction significative entre le génotype et l'agent gélifiant, seuls 1,46 % des bourgeons axillaires de la variété 90 ont donné des cals embryogènes dans un milieu solidifié avec la gelrite et contenant 10 μM de 2,4,5-T. Ce pourcentage de réponse embryogène n'était pas significativement différent de zéro (Tableau 8).

Tableau 8: pourcentage de réponse embryogène de 6 cultivars de patate douce après 10 semaines de culture dans le milieu d'induction comprenant deux concentrations (5 et 10 μM) de 2.4.5T et solidifiés soit avec l'agar ou la gelrite. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au risque de 5 %.

Genotype	Agar		Gelrite		Moyenne
	5 μM 2,4,5-T	10 μM 2,4,5-T	5 μM 2,4,5-T	10 μM 2,4,5-T	
Zho	10.70ab	10.07ab	0.00d	1.78cd	5.64
Quangshu	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00
953	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00
865	14.68a	6.92bc	0.00d	2.14d	5.94
90	0.00d	0.00d	0.00d	1.46d	0.37
Duclos 11	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00
Moyenne	4.23	2.83	0.00	0.90	1.99

1.3. Effet de l'auxine et du géotype

Nous avons comparé l'effet de trois auxines, le 2,4D, le 2,4,5T (5 ou 10 μ M) et le piclorame (10 μ M) sur la réponse embryogène chez 6 cultivars de patate douce cultivés sur des milieux solidifiés avec de l'agar (Tableau 9).

L'analyse de la variance appliquée sur la fréquence de la réponse embryogène a montré un effet hautement significatif à la fois du type d'auxine, du géotype et de leur interaction (Tableau 9). L'effet du type d'auxine sur la réponse embryogène dépend donc du géotype. Il est surprenant que seuls deux cultivars, Zho et 856 ont été induits à former quelques cals embryogènes sur le milieu comprenant une faible teneur en 2,4-D (5 μ M), alors qu'une teneur plus élevée en 2,4-D (10 μ M) n'est pas efficace pour induire une réponse embryogène chez tous les cultivars (Tableau 9). Au contraire, les meilleurs résultats ont été obtenus avec cv Zho en présence de 2,4,5-T ou de Piclorame, produisant en moyenne 10.33% de réponse embryogène quelle que soit la concentration utilisée. Le géotype 865 a donné 14.7 % de réponse embryogène à 5 μ M de 2,4,5-T et seulement 6.59 % à 10 μ M de Piclorame (Tableau 9).

Tableau 9: effet des auxines (2,4-D, 2,4,5-T et Piclorame) sur l'induction de l'embryogenèse somatique chez 6 cultivars de patate douce. La réponse embryogène (%) a été observée après 10 semaines de culture dans le milieu d'induction solidifié par 7g/L d'agar. Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au risque de 5 %.

Géotype	Piclorame		2,4,5-T		2,4-D	Moyenne
	10 μ M	5 μ M	10 μ M	5 μ M	10 μ M	
Zho	10.60ab	10.70ab	10.07ab	0.69cdef	0.00cdef	6.41
Guangshu	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00
953	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00
865	6.59abc	14.70a	6.92abcd	6.37bcde	0.00cdef	6.92
90	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00
Duclos 11	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00cdef	0.00
Moyenne	2.87	4.23	2.83	1.18	0.00	2.22

1.4. Induction de cals embryogènes chez le clone marocain

La patate douce est couramment commercialisée et consommée au Maroc mais à échelle réduite. Cependant, il n'y a pas de variétés inscrites dans le catalogue national. Les résultats obtenus avec les variétés chinoises nous ont encouragés à travailler en parallèle avec la patate douce cultivée et commercialisée au Maroc. Nous avons donc constitué un clone à partir de la patate vendue dans le commerce et nous avons appliqué le même protocole d'induction de cals embryogènes utilisé précédemment. Nous avons testé trois auxines synthétiques : le 2,4,5T, le piclorame et le dicamba. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : effet de différentes concentrations d'auxine sur la réponse embryogène chez le clone marocain.

Génotype	Témoin	2,4,5-T	Piclorame			Dicamba		
		5 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M	5 μ M	10 μ M	15 μ M
M	0	15,5 \pm 5	4,1 \pm 4,1	10 \pm 3,9	10 \pm 1,5	3,8 \pm 2,2	4 \pm 2,3	0

Les réponses embryogènes optimales chez la patate douce locale sont obtenues en présence du 2,4,5T à 5 μ M (15,5 \pm 5 %) et le piclorame à 10 et 15 μ M avec respectivement 10 \pm 3,9 % et 10 \pm 1,5 %. L'erreur standard montre que la différence n'est pas significative entre ces 3 traitements.

1.5. Entretien des cals embryogènes

Le cal compact embryogène est multiplié par subcultures (repiquage) régulières sur un milieu frais identique à celui utilisé pour l'induction dans un intervalle de 2 mois (Figure 6A et 6B). Les cals présentent une pigmentation qui diffère suivant les clones. Les cals de Zho sont rouges (Figure 6A et C), ceux de 90 et du clone Marocain jaunes verdâtres (Figure 6A et C) alors que ceux de 865 sont rouges au départ mais deviennent jaunes pendant les repiquages (Figure 6D). Les cultures sont maintenues à l'obscurité. Au cours des repiquages successifs, les cals embryogènes développent de nouvelles parties embryogènes. Au sein de ces cals se développent aussi de nouvelles masses laiteuses mucilagineuses à partir desquelles se forment de nouveaux fragments de cals compacts embryogènes. Cependant, on constate que les cals

embryogènes développent aussi des parties non embryogènes blanches ou jaunâtres friables (Figure 6D) à croissance rapide avec des cellules allongées vacuolisées. Certains secteurs du cal deviennent nécrosés bruns (Figure 6E). Les parties nécrosées et les cals friables non embryogènes doivent être minutieusement éliminées. En effet, les nécroses peuvent provoquer une nécrose générale alors que le cal non embryogène qui se développe beaucoup plus rapidement que le cal embryogène envahit complètement les cultures et provoque une perte irréversible de la capacité embryogène. Une meilleure prolifération du cal embryogène est sélectivement stimulée sur un milieu contenant soit 5 μM de 2,4,5-T ou une combinaison de 10 μM de 2,4-D et 1 μM de BAP ou de kinetine. En plus, nous avons remarqué que le milieu solidifié avec du gelrite à 2,5 ou 3 g/L présente une meilleure croissance du cal par rapport à celui qui est solidifié avec de l'agar à 7 g/L. En appliquant cette procédure, certains cals embryogènes ont été maintenus deux à trois années tout en gardant leur capacité à régénérer des plantes.

Les embryons somatiques restent au stade globulaire ou cordiforme en présence de l'auxine. Certains embryons évoluent vers les stades avancés et deviennent verts (figure 6F) surtout en présence de piclorame. Ils se développent en plantules après leur repiquage sur milieu MS sans régulateurs de croissance.

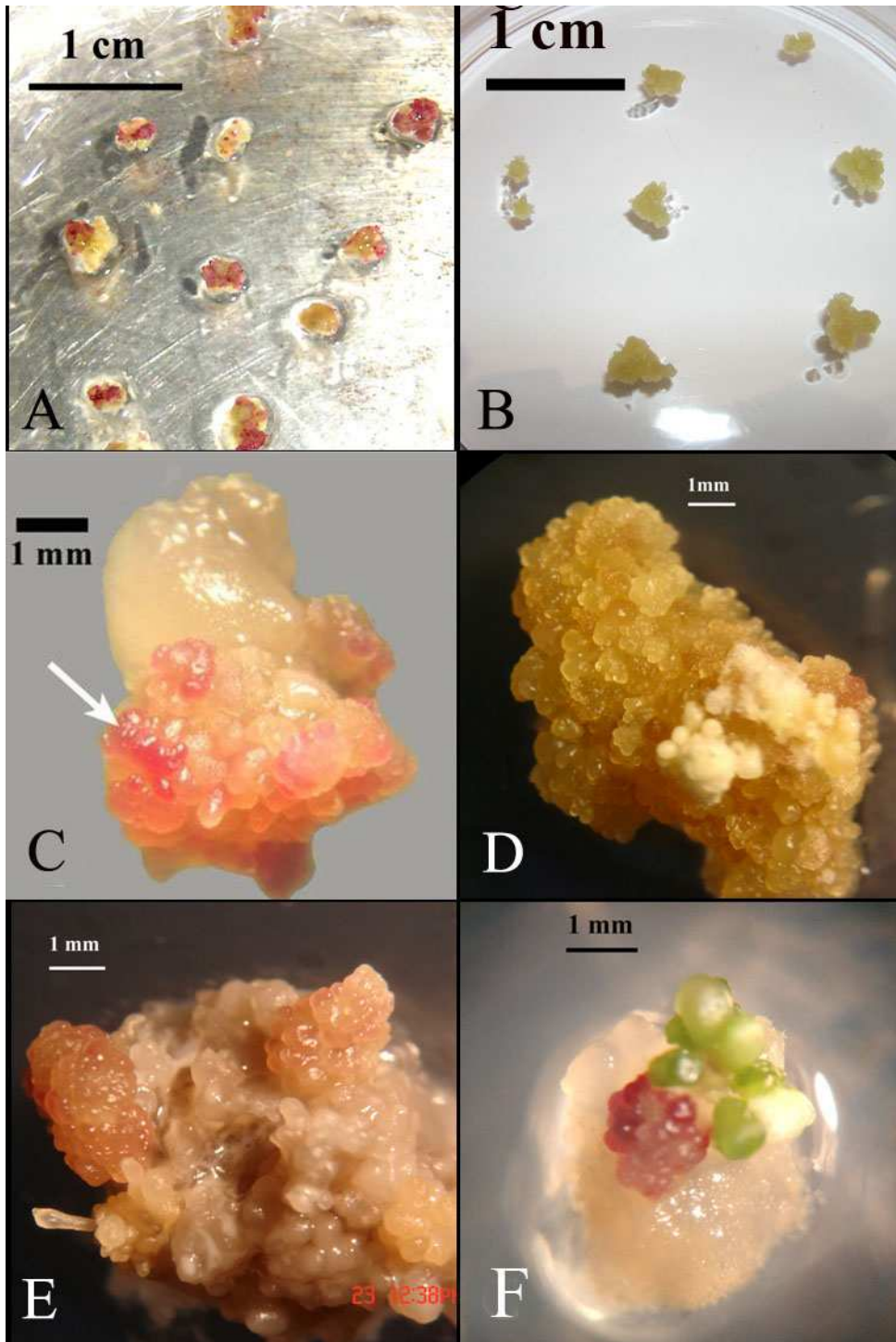


Figure 6 : les cals embryogènes chez cv Zho (A et C), 90 (B), cals de cv 865 avec début d'apparition de cals non embryogènes (D), cals avec nécroses (E) et cals avec un début de développement d'embryons somatiques (F).

1.6. Discussion

Dans cette étude, l'embryogenèse somatique a été régulièrement induite chez trois cultivars cv *Zho*, 90 et 865. Des cals embryogènes très compacts se développent à partir de masses laiteuses mucilagineuses. Ces cals embryogènes avec leur potentiel de conversion en plantes ont régulièrement été entretenus pendant plus de deux ans par repiquage sur un milieu contenant 5 μM 2,4,5-T ou une combinaison de 10 μM de 2,4-D avec 1 μM de BAP ou kinétine. L'agent gélifiant et la teneur en régulateurs de croissance ont montré un effet significatif sur l'induction de l'embryogenèse somatique chez la patate douce. L'agent gélifiant est généralement considéré uniquement comme un support solide protégeant l'explant contre l'immersion et l'asphyxie. Cependant, l'utilisation de milieux solides réduit les phénomènes de diffusion limitant ainsi le mouvement de certains éléments nutritifs (Laroche, 1997). En plus, la croissance des explants cultivés peut être affectée par des substances inhibitrices libérées par des tissus végétaux nécrosés et qui se concentrent autour des explants (Johansson, 1986). Ces effets dépendent du type et de la concentration de l'agent gélifiant utilisé. Le gelrite assure généralement une meilleure disponibilité en eau (Buah and al., 1999; Scherer and al., 1988). De même, des molécules inhibitrices produites par l'explant comme les phénols diffusent plus aisément au sein du milieu solidifié par le gelrite (Huang and Chi, 1988). En plus, cet agent gélifiant contient une teneur plus élevée en ions Ca, K, Mg et Fe par rapport au milieu solidifié avec de l'agar qui contient 3 fois plus de d'ions Na (Barbas and al., 1993; Cornu and Jay-allemend, 1989; Naim and al., 1995).

Dans cette étude, une meilleure induction de l'embryogenèse somatique chez la patate douce a été obtenue lorsque l'agar est utilisé comme agent gélifiant. En milieu liquide, l'induction était complètement inhibée (données non publiées). Ceci peut expliquer un pourcentage plus faible d'induction sur gelrite où l'eau est plus disponible. L'interaction entre le génotype et la combinaison de régulateurs de croissance s'est avérée significative dans notre travail. L'induction de l'embryogenèse somatique a été réussie en présence d'une faible teneur en 2,4D pour deux cultivars *Zho* et 865. Mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec le 2,4,5-T et le Piclorame comme déjà observé dans d'autres travaux (Al Mazrooei and al., 1997; Otani et Shimada, 1996). Dans notre travail, les cultivars *Duclos11*, *Quangshu* et 953 n'ont donné aucune réponse embryogène quel que soit le traitement utilisé alors que des cals embryogènes ont déjà été obtenus à partir de ces mêmes cultivars (Cavalcante-alves et al., 1994). Ce résultat est à priori surprenant même si la capacité à développer des embryons somatiques est en général sous contrôle génétique (Debuyser et al., 1992), et particulièrement chez la patate douce (Cavalcante-Alves et al., 1994; Al-Mazrooei et al., 1997; Sim et Cardoso,

2005). L'absence de réponse embryogène chez ces génotypes pourrait être due à la variation dans le stade développemental et physiologique des vitroplants utilisés, affectant ainsi le comportement des bourgeons axillaires en culture. En effet, il a été montré dans d'autres travaux que la réponse embryogène des bourgeons axillaires dépendait beaucoup de la taille des bourgeons ensemencés. Seuls les bourgeons dont la taille est comprise entre 0.5-1 mm sont favorables pour une réponse embryogène (Al-Mazrooei et al., 1997). Des facteurs endogènes comme le niveau des régulateurs de croissance endogènes au sein des explants ainsi que l'interaction entre les régulateurs endogènes et exogènes peuvent influencer la réponse embryogène (Jimenez, 2005). Dans cette étude, nous confirmons les résultats obtenus par Cavalcante-Alves et al. (1994) pour l'absence de réponse embryogène chez le cv Duclos 11. De même, cv Jewel, qui est utilisé dans beaucoup de programmes d'amélioration génétique, a aussi été trouvé inapte à donner une réponse embryogène (Desamero et al., 1994; Pido et al., 1995).

2. Les suspensions cellulaires embryogènes

2.1. Mise en place et évolution des suspensions cellulaires

Nous avons utilisé pour la mise en place des suspensions cellulaires des cals embryogènes des cultivars 865 et Zho relativement jeunes c'est-à-dire initiés depuis moins de trois mois et fraîchement repiqués dans le milieu d'entretien contenant 5 μ M de 2,4,5T deux semaines avant.

Un fragment de 2 à 3 mm de diamètre est placé dans une erlenmeyer de 100 mL contenant 10 mL de milieu Ma₂ avec 5 μ M de 2,4 D (tableau 4). Les erlenmeyers sont placés dans l'agitateur et exposés à la lumière. Après environ 8 semaines, les suspensions cellulaires embryogènes sont repiquées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu.

Chez les deux cultivars Zho et 865, les fragments de cals mis en culture grossissent légèrement formant des petites masses blanches avec des taches rouges (Figure 7A et 7B). Ces masses ont tendance à se fragmenter facilement sous l'effet de l'agitation ou en contact avec la pointe de la pipette lors des repiquages. Ainsi, le milieu liquide en agitation est envahi progressivement d'agrégats de plus en plus nombreux et fins ce qui aboutit à la mise en place de la suspension cellulaire embryogène limpide constituée d'agrégats cellulaires embryogènes (Figure 7D) rouges chez cvZho et cv865 mais peuvent devenir jaunes chez cv865 (Figure 7C).

Ces agrégats rouges ou jaunes suivant les cultivars présentent en fait une partie blanche qui rappelle la partie mucilagineuse des cals embryogènes parsemée de points rouges

(Figure 7D) ou jaunes suivant les cultivars. Nos estimations indiquent que leur taille varie de 0,3 à 3 mm. Le milieu est limpide à cause de l'absence de cellules isolées ou d'agrégats très fins.

Les suspensions cellulaires embryogènes peuvent être brusquement envahies par des cellules non embryogènes à croissance rapide. De telles suspensions deviennent très troubles jaunes à brunes (Figure 8A). Les agrégats embryogènes ont tendance à être noyés dans les cellules et des agrégats fins non embryogènes à croissance beaucoup rapide (Figure 8B). Les cellules non embryogènes sont vacuolisées, très allongées parfois recourbées en forme de banane (Figure 8C). Les suspensions perdent alors irréversiblement leur compétence embryogène.

Le risque de perte de la compétence embryogène semble se réduire lorsque les suspensions sont entretenues régulièrement par repiquage sur un milieu frais. Ainsi, parmi les 12 erlenmeyers initiées, une seule a été envahie par les cellules non embryogènes.

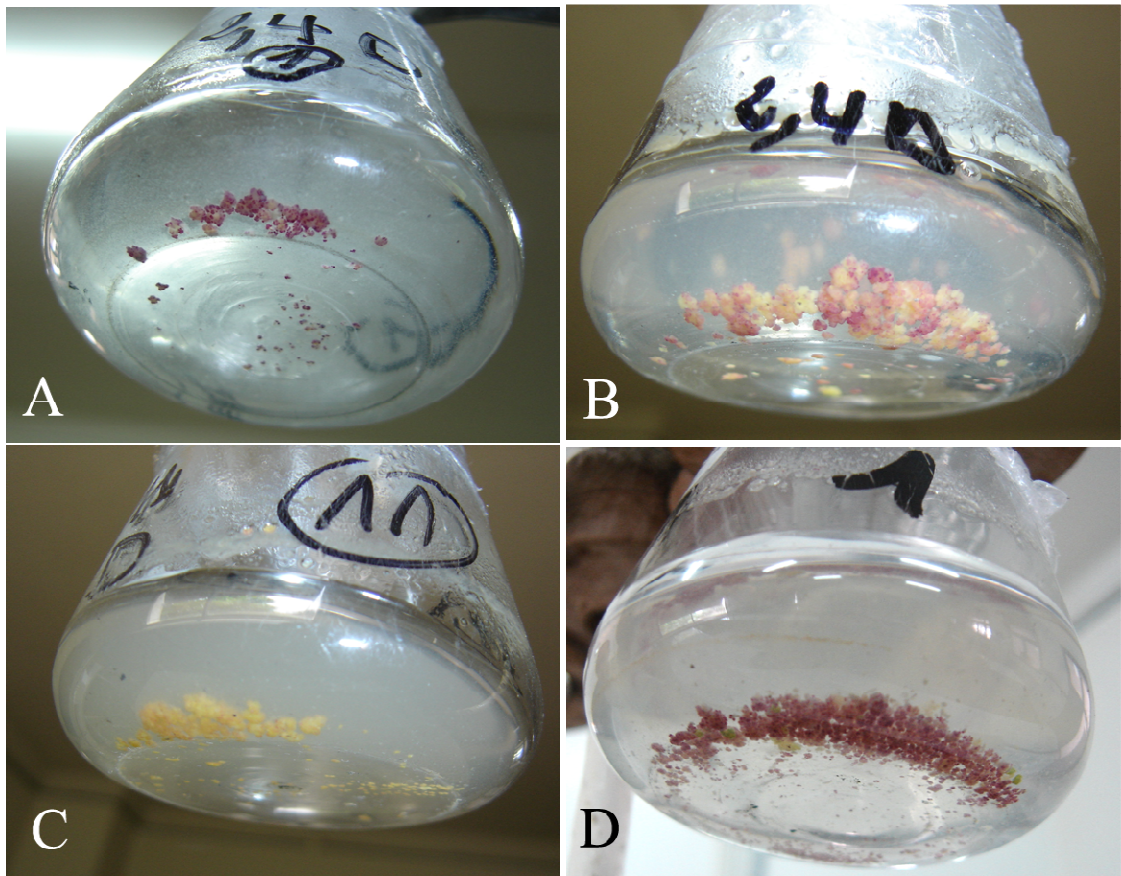


Figure 7 : Mise en place des suspensions cellulaires embryogènes. A ; petits cals blancs avec des points rouges pendant l'installation de la suspension de cv Zho. B : suspension de cvZho avec de gros agrégats rouges. C : suspension de cv865 avec des agrégats jaunes. D : Suspension cellulaire de cv Zho avec des agrégats rouges.

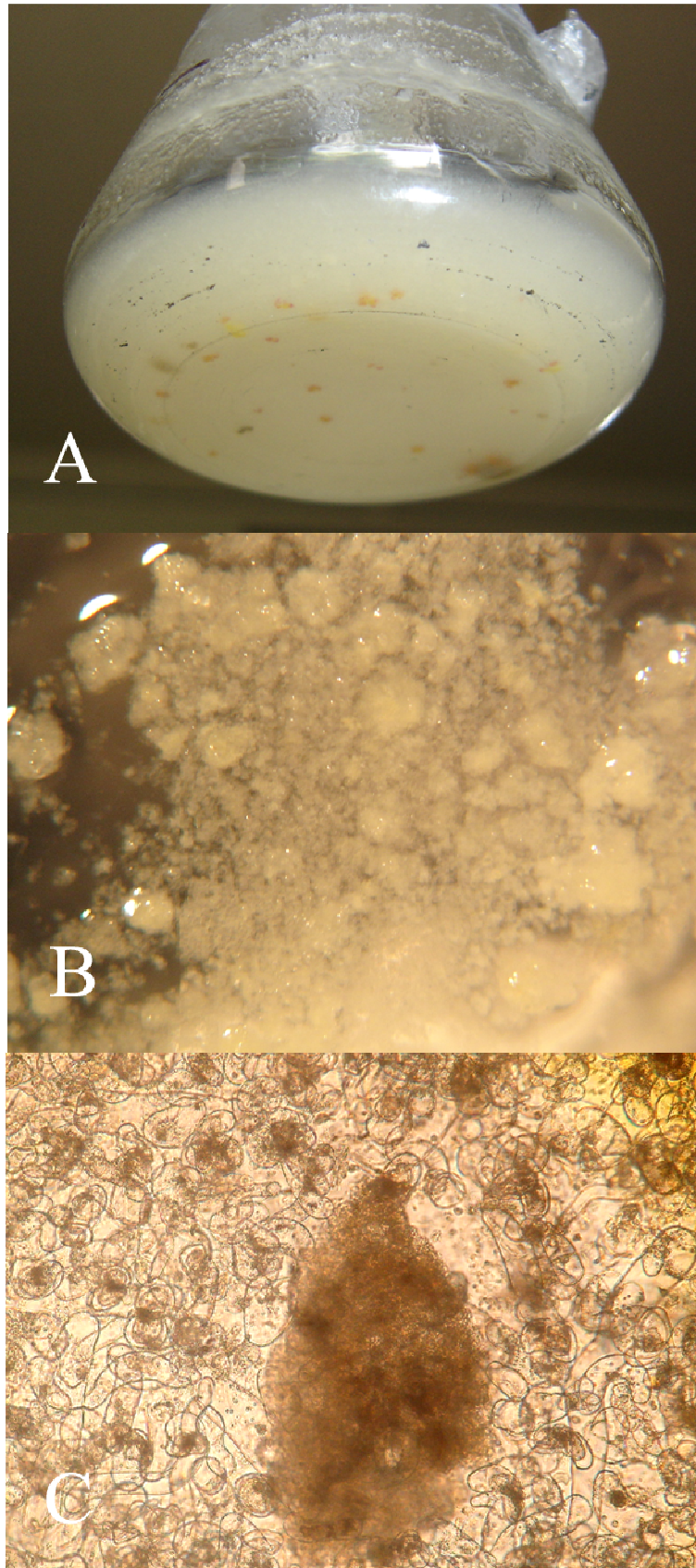


Figure 8 : structure des suspensions non embryogènes chez cv865 ; A : aspect général dense et trouble. B : agrégats cellulaires fins et cellules isolées. C ; aspect général des cellules sous microscope x200.

2.2. Structure cellulaire des suspensions embryogènes

Les suspensions cellulaires embryogènes sont constituées d'agrégats cellulaires formés de deux parties : une partie blanche lisse centrale et des bosses périphériques rouges chez cv Zho et chez cv 865 mais les bosses rouges peuvent devenir jaunes chez ce dernier.

Dans le but d'observer la structure de ces agrégats nous avons réalisé des coupes histologiques (Figure 9). Au faible grossissement, on observe deux parties au niveau des coupes histologiques. Une partie centrale correspondant probablement à la partie blanche qui paraît claire alors que des plages périphériques arrondies paraissent plus denses (Figure 9A). Les cellules des deux parties sont isodiamétriques et entourées d'une paroi fine (Figure 9B). La partie centrale claire présente des cellules vacuolisées avec un petit noyau allongé et situé à la périphérie (Figure 9C) alors que les parties arrondies sont formées de cellules à cytoplasme très dense et fortement coloré et un gros noyau en position centrale (Figure 9D)..

Toutes ces caractéristiques montrent que les cellules centrales sont faiblement différenciées. Par contre, les cellules périphériques présentent toutes les caractéristiques des cellules non différenciées de type embryonnaire.

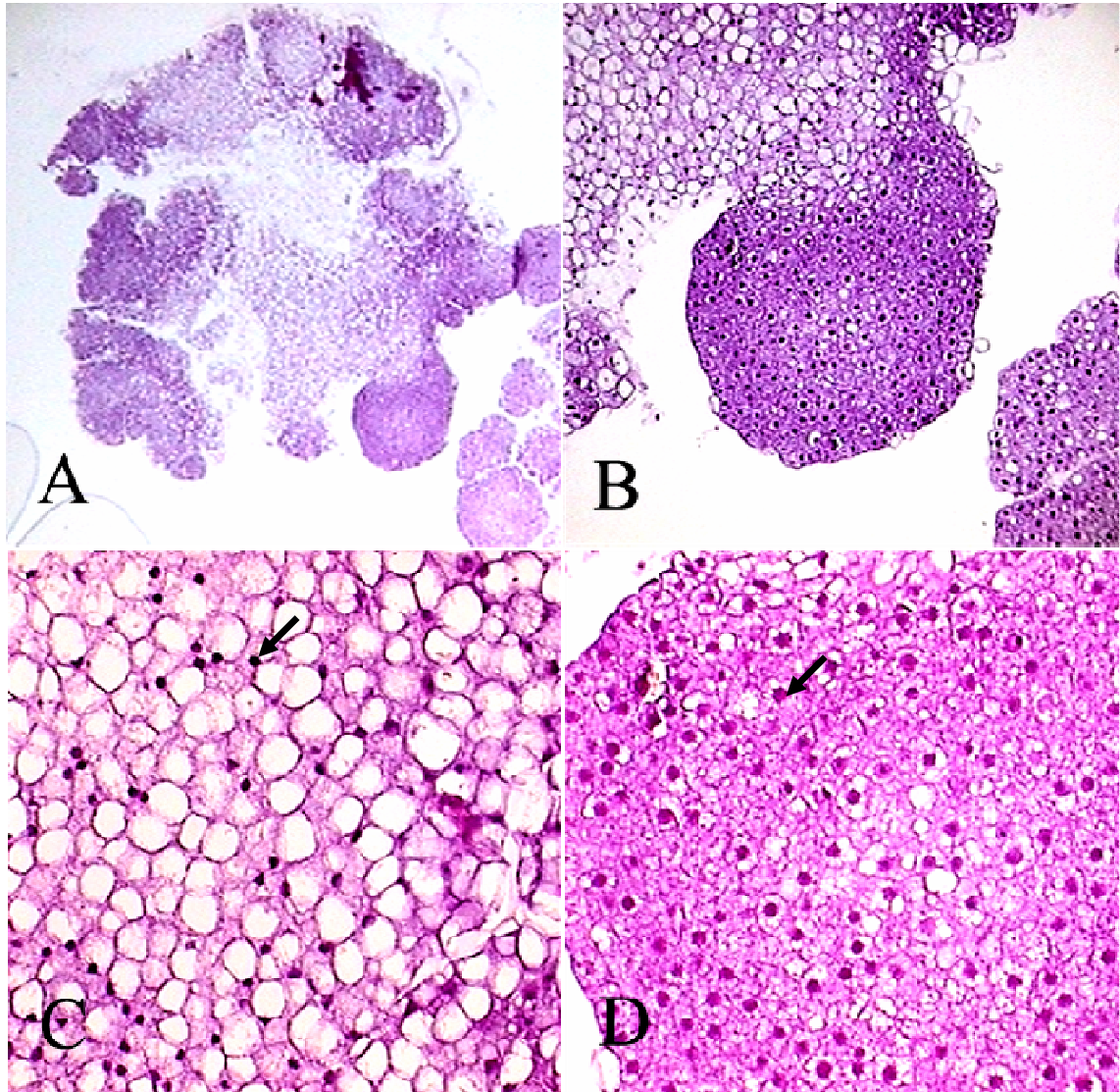


Figure 9 : Structure histologique des agrégats cellulaires embryogènes : vue d'ensemble de la coupe x 10 (A), les parties centrales claires et les parties périphériques plus sombres x 40 (B), cellules vacuolisées avec noyau périphérique (flèche) au niveau de la partie centrale x 100 (C) et cellules très jeunes avec cytoplasme granuleux dense et un gros noyau central (flèche) x 100 (D).

2.2.1. Cinétique de croissance

Malgré des difficultés techniques, rencontrées, nous avons réussi à suivre la cinétique de croissance d'une suspension cellulaire du cv 865 (Figure 10). La courbe de croissance présente une forme sinusoïdale classique avec trois phases de croissance : la première est une phase de latence observée entre 0 et 2 semaines et caractérisée par une croissance faible. La deuxième est la phase exponentielle avec une croissance rapide et linéaire. La dernière phase est la phase stationnaire où la croissance atteint un palier.

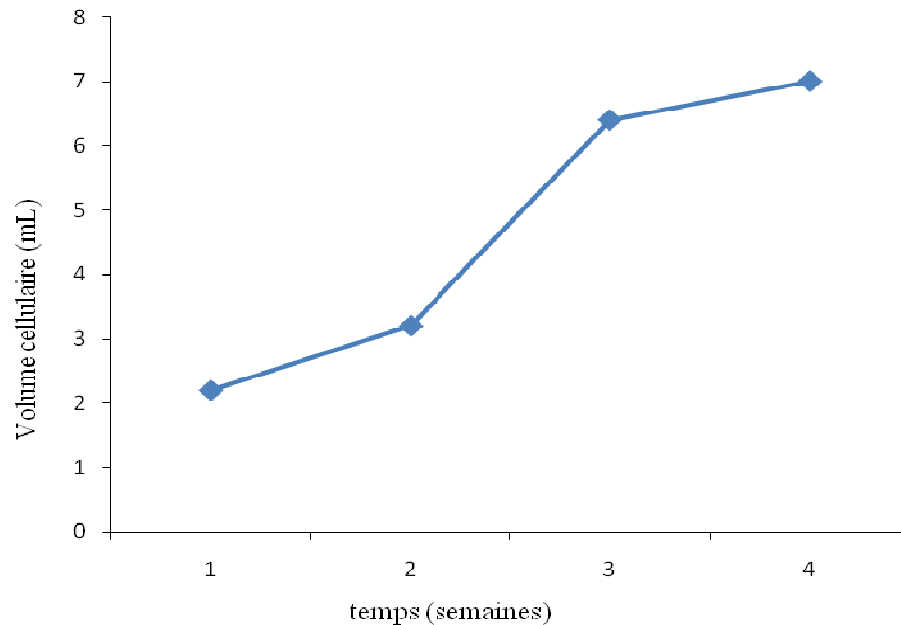


Figure 10: cinétique de croissance de la suspension cellulaire embryogène du cv 865 (mL)

Nous avons aussi essayé de réaliser des cinétiques sur d'autres suspensions cellulaires notamment pour cv Zho, mais des problèmes d'infection et de stabilité de la température dans la salle de culture n'ont pas permis de finir cette étude.

2.3. Discussion

Les suspensions cellulaires embryogènes présentent beaucoup d'avantages par rapport au milieu solide. Les cultures présentent un meilleur contact avec le milieu et donc de meilleures conditions de croissance. Ces suspensions sont aussi plus faciles à isoler et à manipuler.

Nous avons réussi dans ce travail à installer des suspensions cellulaires chez deux cultivars Zho et 865. L'aspect de ces suspensions est similaire à ceux décrits dans d'autres

travaux comme ceux de Chée et Cantliffe (1988) chez cv white star et Liu et al. (2001) chez 15 cultivars chinois. La cinétique de croissance de cette suspension présente une forme sigmoïde classique conformément à ce qui a été décrit par Chée et Cantliffe (1989a)

La mise en place et la croissance des suspensions cellulaires ont été réalisées en présence de 5 μM de 2,4-D. La même concentration a été utilisée par Chée et Cantliffe (1989). Il est surprenant que la même concentration soit utilisée pour les suspensions cellulaires de bananier (Guédira, 2006) malgré l'éloignement des deux plantes sur le plan systématique. Liu et al. (2001) ont utilisé une concentration de 9 μM . Le 2,4-D serait nécessaire pour stimuler sélectivement la prolifération des cellules embryogènes (Chée et Cantliffe, 1989a).

Comme décrit par d'autres auteurs, les suspensions cellulaires chez la patate douce sont un mélange de cals, d'agrégats cellulaires embryogènes et non embryogènes. Les suspensions embryogènes sont formées d'agrégats cellulaires hétérogènes comme pour Chée et Cantliffe (1989). Notre étude histologique a prouvé que ces agrégats sont formés de cellules à caractère embryonnaire en périphérie et faiblement vacuolisées au centre. Le mode de transition entre ces agrégats et les embryons nécessite des études supplémentaires à la fois histologiques et moléculaires.

Nos suspensions embryogènes sont formées d'agrégats relativement grands qui flottent dans un milieu limpide alors que les suspensions non embryogènes sont essentiellement formées de cellules isolées ou des agrégats de petite qui rendent le milieu très trouble. Une description similaire est présentée par Chée et Cantliffe (1989a) et Chée et al. (1990). Ces auteurs ont montré que 98 % de la fraction embryogène est composée d'agrégats de taille supérieure ou égale à 355 μm .

Nous aussi avons remarqué que les agrégats augmentent de taille pendant la croissance avant d'éclater sous l'effet de l'agitation ou pendant les repiquages. Les nouveaux agrégats se forment et se détachent à partir des agrégats préexistants comme décrit par Chée et Cantliffe (1989a) chez White star alors que chez la carotte, les agrégats se forment à partir de cellules isolées.

3. Régénération à partir de cals embryogènes et de suspensions cellulaires

3.1. Régénération à partir de cals embryogènes

Dans cette partie, nous avons essayé de déterminer les conditions optimales de la régénération d'embryons somatiques à partir de cals embryogènes cultivés sur le milieu solide et aussi celles de leur conversion en plantes.

Des études préliminaires réalisées avec des cals embryogènes des cv *Zho*, 865 et 90 ainsi que des cals anciens du cv *Qu* nous ont permis d'avoir une première idée sur les conditions nécessaires pour la régénération des cals. Ainsi, contrairement à la phase d'induction, la présence de gelrite en tant qu'agent gélifiant semble favorable au maintien des cals embryogènes et à la régénération de plantes. Les auxines synthétiques fortes utilisées pour l'induction se sont révélées inhibitrices pour la régénération. Néanmoins, un petit nombre d'embryons évolue vers les stades avancés lorsque les cals restent longtemps sur le milieu d'entretien, probablement à cause de l'épuisement de l'auxine.

L'utilisation d'un milieu de régénération sans régulateurs de croissance favorise la régénération mais le nombre d'embryons obtenus est faible et les cals ont tendance à se nécroser rapidement ou à devenir friables et non embryogènes.

Cependant, l'utilisation de milieux avec une réduction de l'auxine synthétique voire son absence, combinée avec l'addition d'autres régulateurs de croissance semble très favorable à la régénération. C'est le cas du milieu DK (2,4D et kin à 1µM) utilisé auparavant par Cavalcante-Alves (1996) et aussi les milieux comprenant l'acide abscissique à des concentrations comprises entre 1 à 5 mg/L, qui ont été largement utilisés par d'autres auteurs (Zheng et al., 1996 ; Sim et Cardosa, 2005). Les cals embryogènes du cv *Zhounang 13* ont montré une régénération optimale pour 1,5 mg/L d'ABA (Sihachakr, communication personnelle). Ces études préliminaires nous montrent la complexité du phénomène de régénération. Des expériences plus étoffées ont été réalisées pour optimiser ce processus de régénération à partir de cals embryogènes de patate douce.

3.1.1. Effet de différentes séquences de milieux

Des fragments de cals embryogènes des cv *Zho* et 865 (Figure 11A) ont été repiqués sur le milieu d'entretien contenant 10 µM de 2,4-D et 1 µM de BAP pour stimuler leur croissance. Ils ont ensuite été mis sur le milieu de prématuration sans régulateurs de croissance avant d'être transférés sur différents milieux de maturation afin de favoriser le développement des embryons somatiques (Figure 11B), leur germination (Figure 11C) et leur

conversion en plantes (Figure 11D). Pour suivre le processus de maturation, nous avons distingué trois grands stades de développement des embryons somatiques (Figure 11B) :

- Des embryons rouges de petite taille au stade globulaire ou en début du stade cordiforme.
- Des embryons verts de petite taille avec une petite dépression bien visible au niveau du pôle apical. Il s'agit de la fin du stade globulaire ou du début du stade torpille.
- Des embryons verts de grande taille et creux correspondant à la fin du stade torille ou au stade cotylédonaire.

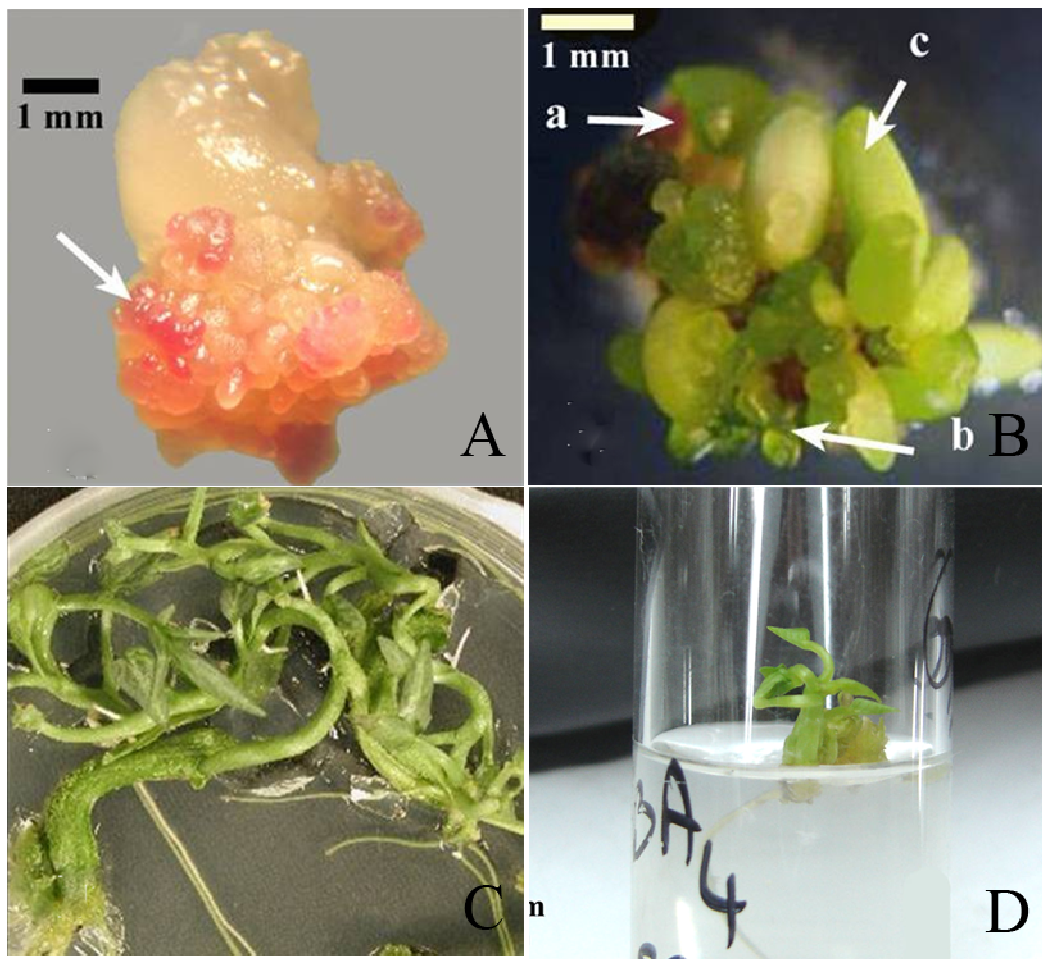


Figure 11: différentes étapes de la régénération à partir de calcs embryogènes. Aspect des calcs (flèche) (A) Embryons de différentes tailles (B) embryons très avancés (C) et plantes développées (D). Embryons petits rouges (a) ; petits verts (b) et grands verts (c).

Dans un premier temps, nous avons suivi la variation du nombre de différents types d'embryons pendant les quatre semaines qui ont suivi le transfert des cals du milieu de prématuration vers les différents milieux de maturation.

Chez le cv 865, on observe une réduction rapide du nombre d'embryons rouges sur le milieu $A_{0,4}B_{0,5}$ où le nombre moyen passe de 25,66 à 6,5 par cal (Figure 12A). Dans les autres milieux, la réduction est moins importante avec, par exemple, de 25 à 20 sur le milieu ABA4. Les milieux DK et ABA1,5 constituent une exception dans la mesure où le nombre d'embryons développés augmente.

Le nombre d'embryons verts de petite taille diminue entre la première et la deuxième semaine pour tous les milieux testés (Figure 12C). Cette diminution est suivie par une augmentation qui culmine à 9,21 ; 7,14 et 6,93 embryons/cal, respectivement pour ABA2,5 ; ABA1,5 et ABA4 à la troisième semaine, alors que pour les autres milieux le nombre d'embryons formés se stabilise ou diminue légèrement.

Le nombre des embryons verts de grande taille augmente à partir de la première semaine jusqu'à la 3^{ème} semaine pour tous les milieux testés (Figure 12E). Le milieu DK présente la plus grande augmentation avec 5,87 embryons/cal, suivi par les milieux ABA4 et T avec respectivement 3 et 2,50 embryons par cal.

Chez le cv Zho, le nombre d'embryons globulaires rouges développés par cal diminue rapidement entre la première et la deuxième semaine pour tous les milieux testés (Figure 12B). Par exemple, pour le milieu ABA4, le nombre d'embryons passe de 38,74 à 18,94 embryons/cal. La chute se ralentit par la suite et le minimum est atteint à la troisième semaine à l'exception des milieux T et DK où la réduction se stabilise à la 4^{ème} semaine.

Concernant les petits embryons verts, leur nombre augmente pour le cv Zho pour atteindre un maximum à la troisième semaine après le repiquage (Figure 12D). L'augmentation la plus nette est observée avec le milieu $A_{0,4}B_{0,5}$, où le nombre passe de 23 à 38,57 embryons/cal, suivie par le milieu ABA4 où le nombre atteint 30 embryons/cal à la 4^{ème} semaine. Les plus faibles augmentations sont observées sur les milieux ABA2.5 et ABA-G1.

Des embryons verts de grande taille correspondant à la fin du stade torpède ou cotylédonaire apparaissent sur le milieu de maturation (Figure 12F). Chez le cv Zho, le nombre de ces embryons augmente régulièrement pour atteindre un maximum à la troisième semaine. Les milieux $A_{0,4}B_{0,5}$, ABA1.5 et ABA2.5 montrent la plus forte augmentation. Chez $A_{0,4}B_{0,5}$ le nombre passe de 1,85 à 9,22 embryons/cal.

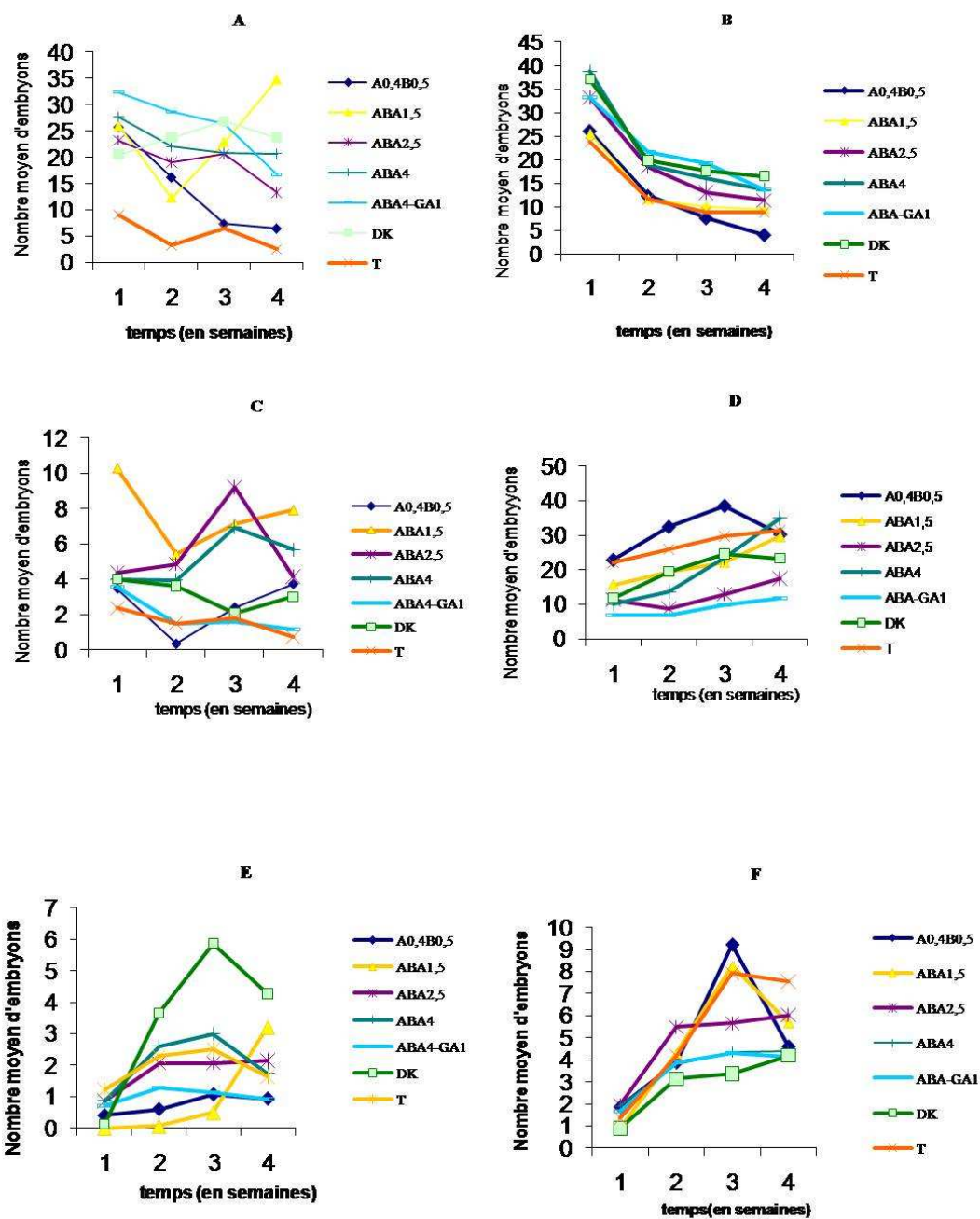


Figure 12 : Evolution du nombre moyen d'embryons somatiques par fragment de cal en fonction du temps. A : embryons rouges de petite taille, cv 865 ; B : embryons rouges cv Zho ; C : embryons verts de petite taille, cv 865 ; D : embryons verts de petite taille, cv Zho ; E : embryons verts de grande taille, cv 865 et F : embryons verts de grande taille, cv Zho.

L'étude de l'évolution du nombre d'embryons en fonction du temps a montré que la plupart des milieux présentent un optimum à la 3^{ème} semaine. Ces résultats nous ont amenés à considérer le nombre d'embryons obtenus à la 3^{ème} semaine pour comparer l'efficacité des milieux. Nous avons déterminé l'effet du milieu et génotype par l'utilisation de l'analyse de la variance.

Chez cv 865, les milieux A_{0,4}B_{0,5} et T donnent le plus petit nombre d'embryons rouges (Tableau 11). Le nombre de petits embryons verts est significativement supérieur dans le milieu ABA2.5 par rapport à celui obtenu dans les milieux dépourvus d'ABA. Les milieux ABA4 et ABA1.5 sont intermédiaires. Il n'y a pas de différence significative pour le nombre d'embryons verts de grande taille.

Chez le cv *Zho*, il n'y a pas de différence significative entre les milieux pour le nombre d'embryons rouges et verts de grande taille (Tableau 12). Pour les petits embryons verts, le milieu A_{0,4}B_{0,5} présente des résultats significativement supérieurs par rapport aux autres milieux à l'exception du milieu T (sans régulateurs) qui reste intermédiaire.

Tableau 11 : Effet de la composition du milieu de maturation sur le nombre d'embryons somatiques produits par les cals embryogènes chez le cv 865 après 3 semaines de culture.

<i>milieux</i>	<i>Embryons rouges</i>	<i>Petits embryons verts</i>	<i>Grands embryons verts</i>
<i>T</i>	6,57 e	1,79 b	2,50 a
<i>A_{0,4}B_{0,5}</i>	7,40 de	2,40 b	1,07 a
<i>DK</i>	26,87 a	2,07 b	5,87 a
<i>ABA1.5</i>	22,86 ab	7,14 ab	0,50 a
<i>ABA2.5</i>	20,57 abc	9,21 a	2,47 a
<i>ABA4</i>	20,87 abc	6,93 ab	3,00 a
<i>ABAGAI</i>	26,29 a	1,57 b	1,14 a

Tableau 12 : Effet de la composition du milieu de maturation sur le nombre d'embryons somatiques produits par les cals embryogènes chez la variété *Zho* après 3 semaines de culture.

<i>milieux</i>	<i>Embryons rouges</i>	<i>Petits embryons verts</i>	<i>Grands embryons verts</i>
<i>T</i>	9,23 cde	29,78 ab	7,92 ab
<i>A_{0,4}B_{0,5}</i>	7,74 de	38,57 a	9,23 a
<i>DK</i>	17,72 abcde	24,58 bc	3,36 abc
<i>ABA1.5</i>	10,17 cde	22,17 bcde	8,26 ab
<i>ABA2.5</i>	13,18 bcde	12,32 cdef	5,82 abc
<i>ABA4</i>	15,86 abcde	23,83 bcd	4,22 abc
<i>ABA4 GAI</i>	19,23 abcd	9,94 def	4,31 abc

3.1.2. Effet du milieu de germination des embryons

Après 5 semaines de culture sur le milieu de maturation, des fragments qui portent des embryons développés et qui ne présentent pas de nécrose sont repiqués dans des tubes.

Dans le but d'étudier l'effet du milieu sur la conversion des embryons en plantules enracinées, nous avons testé 3 types de milieux.

Nous avons calculé le pourcentage d'embryons présentant un développement à la fois de la partie racinaire du bourgeon apical et le pourcentage d'embryons donnant des plantules enracinées par rapport à l'ensemble des embryons préexistants sur le fragment.

Chez *Zho* (Figure 13A), c'est le milieu K1 qui a donné le meilleur pourcentage de conversion en plantules (3,9 %) par rapport aux milieux G1 (1,9 %) et MS (1,4 %). Par contre, les pourcentages de conversion chez la variété 865 (Figure 13B) varient entre 14,4 et 18,25 % et la comparaison des erreurs standards montre qu'ils ne sont pas significativement différents.

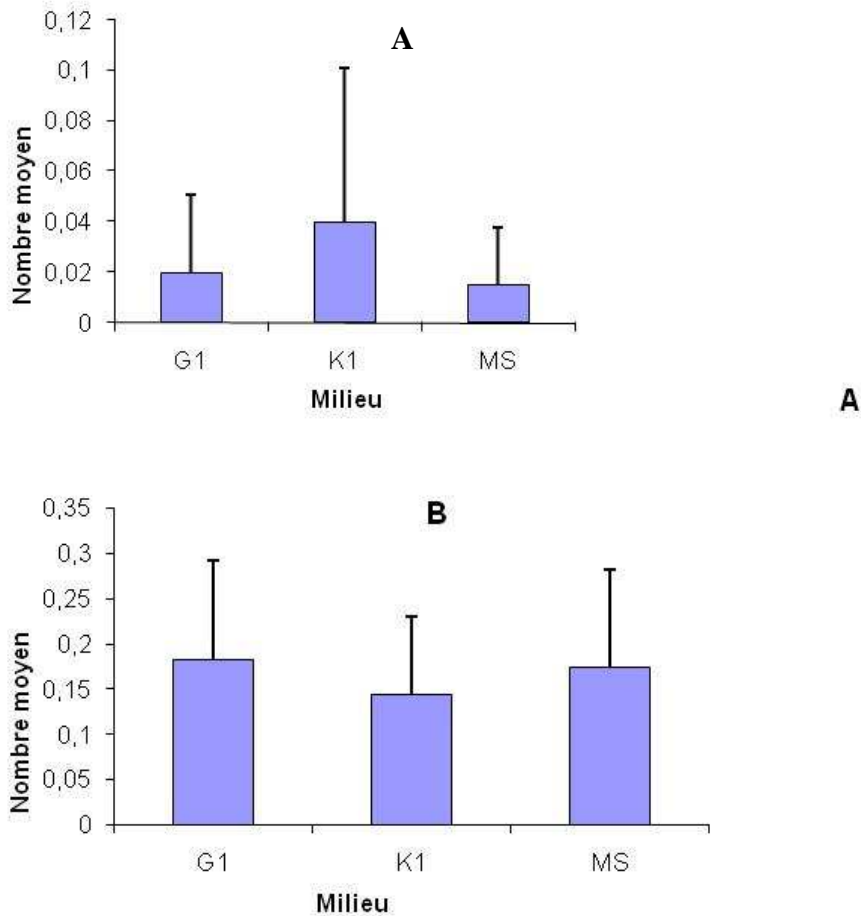


Figure 13 : Effet du milieu de germination sur la conversion des embryons en plantules enracinées 15 jours après le repiquage. A : cv Zho. B : cv 865.

3.2. Régénération à partir de suspensions cellulaires

La régénération à partir de suspensions cellulaires est un processus très complexe qui a nécessité, comme pour les cals, au moins trois types de milieux : un milieu de prématuration, un milieu de maturation et un milieu de germination de conversion en plantules.

La suspension cellulaire qui est étalée sur un milieu solide favorable est constituée, comme ce qui a été décrit précédemment, par un ensemble d'agrégats cellulaires embryogènes présentant une partie blanche molle ou mucilagineuse et une partie rouge chez cv Zho (Figure 14A). Chez cv 865, la couleur rouge peut parfois virer au jaune. Un mois après l'étalement, ces agrégats augmentent de taille et se couvrent d'embryons du stade globulaire au stade cordiforme, formant ainsi des paquets d'embryons rouges et verts (Figure 14B). Les embryons continuent à se développer et deviennent de plus en plus verts (Figure 14C). Certains évoluent vers les stades avancés et leur taille devient plus importante. Ils présentent alors une forme très allongée et tubulaire (figure 14D).

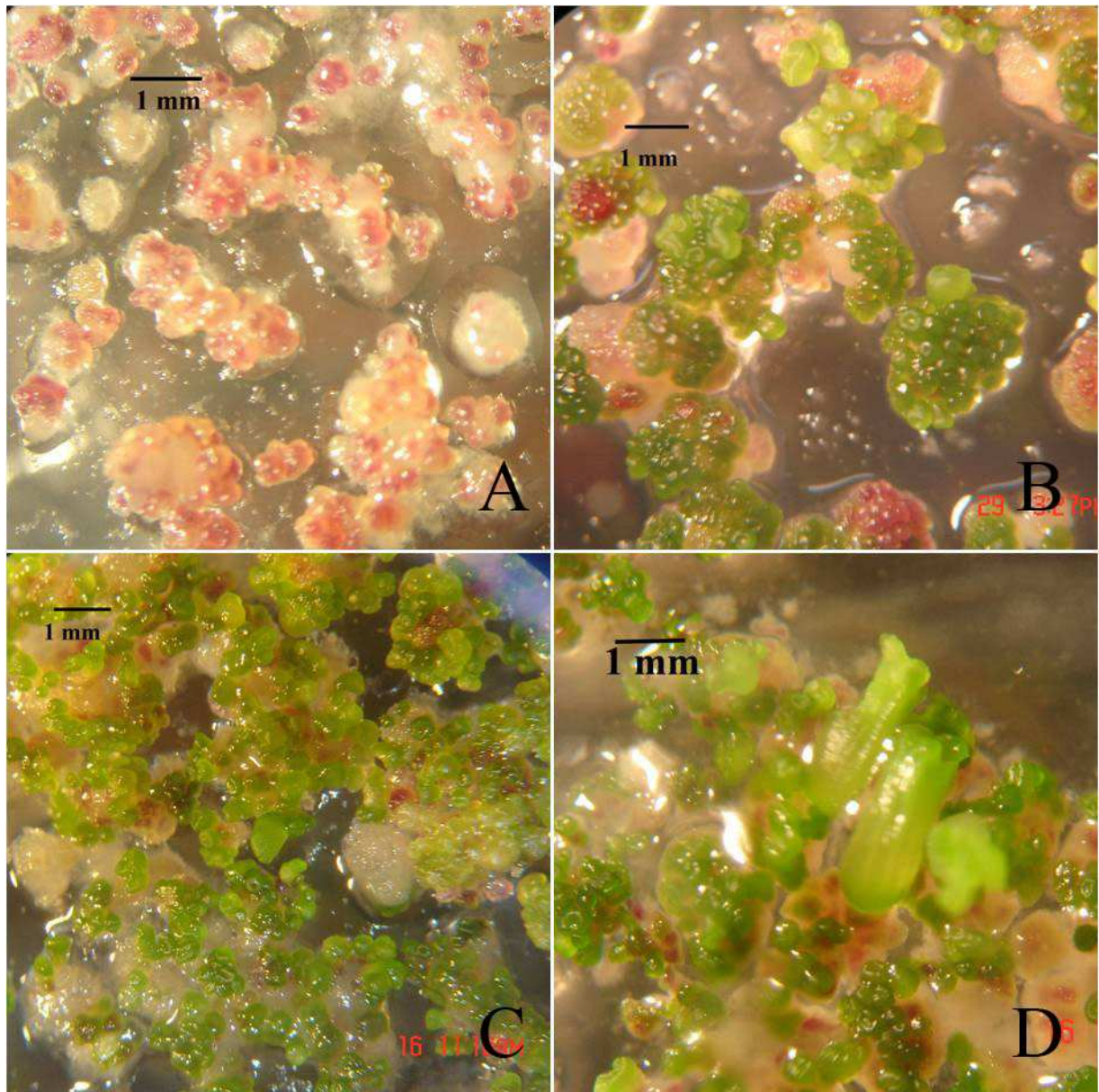


Figure 14 : Evolution des agrégats cellulaires embryogènes après étalement de la suspension cellulaire sur des séquences de milieux solides de régénération solides. A : juste après l'étalement de la suspension cellulaire du cv Zho sur milieu $A_{0,4}B_{0,5}$. B: après trois semaines de culture. C: après 6 semaines. D: embryons développés.

Les premières expériences visant la régénération à partir de suspensions cellulaires ont été réalisées avec trois milieux : le milieu $A_{0,4}B_{0,5}$, déjà utilisé chez le bananier, le milieu ABA1,5 comprenant 1,5 mg/L d'ABA et le milieu VM30 dépourvu de régulateurs de croissance. Les agrégats étalés sur les 3 milieux évoluent et forment des embryons globulaires

rouges puis verts. Nos premières observations montrent que les milieux $A_{0,4}B_{0,5}$ et ABA1,5 présentent les paquets d'embryons les plus développées avec un grand nombre d'embryons verts. Le milieu VM30 présente des paquets moins développées. En plus, des nécroses et des tissus non embryogènes ont tendance à envahir les boîtes contenant le milieu sans régulateurs de croissance.

Les milieux ABA1,5 et $A_{0,4}B_{0,5}$ favorisent donc davantage la régénération par rapport au milieu VM30. Cependant, les embryons ne se sont pas développés en plantules dans ces milieux. Les boîtes non repiquées montrent des nécroses accompagnées d'oxydations aboutissant à la mort des paquets d'embryons.

Dans le but de maîtriser la conversion des embryons en plantes, nous avons repiqué les touffes embryonnaires développées sur les milieux $A_{0,4}B_{0,5}$ (bananier) et ABA1,5 (ABA à 1,5 mg/L), sur un ensemble de milieux de maturation avant de les transférer dans un milieu final de germination en tubes. Nous avons remarqué un développement spectaculaire des embryons lorsque les touffes provenant du milieu $A_{0,4}B_{0,5}$ sont repiquées sur un milieu comprenant de l'acide abscissique (Figure 15).

Le tableau 13 présente un ensemble de séquences de milieux qui ont permis un développement important des embryons et leur évolution en plantes. La meilleure conversion en plantes chez le cv Zho est obtenue sur les milieux ABA2 et ABA4 pour les touffes embryonnaires provenant du milieu $A_{0,4}B_{0,5}$ avec respectivement 3,23 et 1,47 plantes par touffe. Le milieu ABA4 donne aussi la meilleure conversion chez cv 865 avec 1,2 plantes par touffe. Les touffes repiquées du milieu ABA1,5 vers le milieu $A_{0,4}B_{0,5}$ donnent des nombres de plantes de 0,6 et 0,22 respectivement pour 865 et Zho. Les autres séquences dépourvues d'ABA ont donné un taux de conversion plus faible. Les touffes présentant des embryons développés grossissent davantage lorsqu'ils sont transférés sur un milieu sans régulateurs de croissance ou sur un milieu contenant une faible concentration en kinétine (Figure 16 A), et les embryons se développent en plantes entières (Figure 16 B).

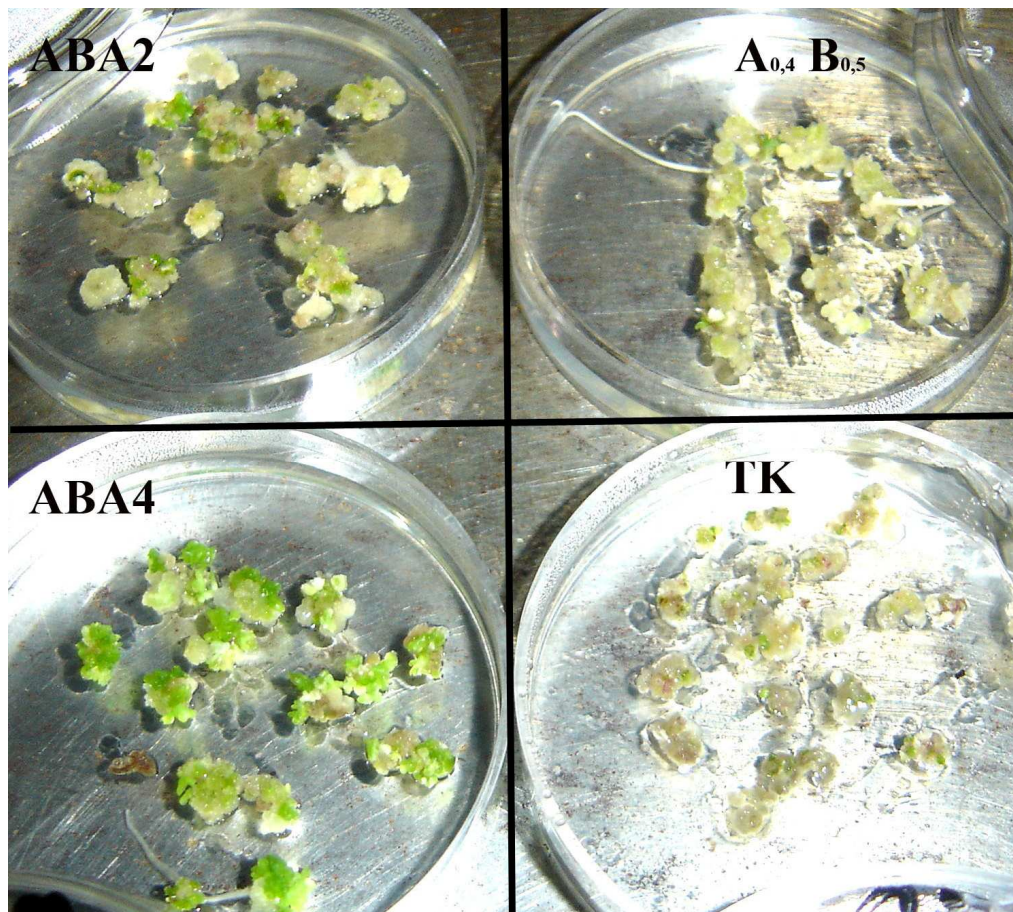


Figure 15: Comparaison de l'aspect des suspensions étalées de Zho sur quatre milieux de maturation après prématuration sur le milieu A_{0,4}B_{0,5}

Tableau 13 : Effet des milieux d'étalement et de maturation sur le nombre moyen de plantes obtenues par agrégat cellulaire embryogène

VARIÉTÉ	Milieu d'étalement	milieu de maturation	Moyenne
865	A _{0,4} B _{0,5}	A _{0,4} B _{0,5}	0,6 ± 0,4
		ABA4	1,2 ± 0,8
	ABA 1,5	A _{0,4} B _{0,5}	0,9 ± 0,3
Zho	A _{0,4} B _{0,5}	A _{0,4} B _{0,5}	0,36 ± 0,15
		ABA2	3,23 ± 1,1
		ABA4	1,47 ± 0,48
	ABA1,5	A _{0,4} B _{0,5}	0,22 ± 0,17

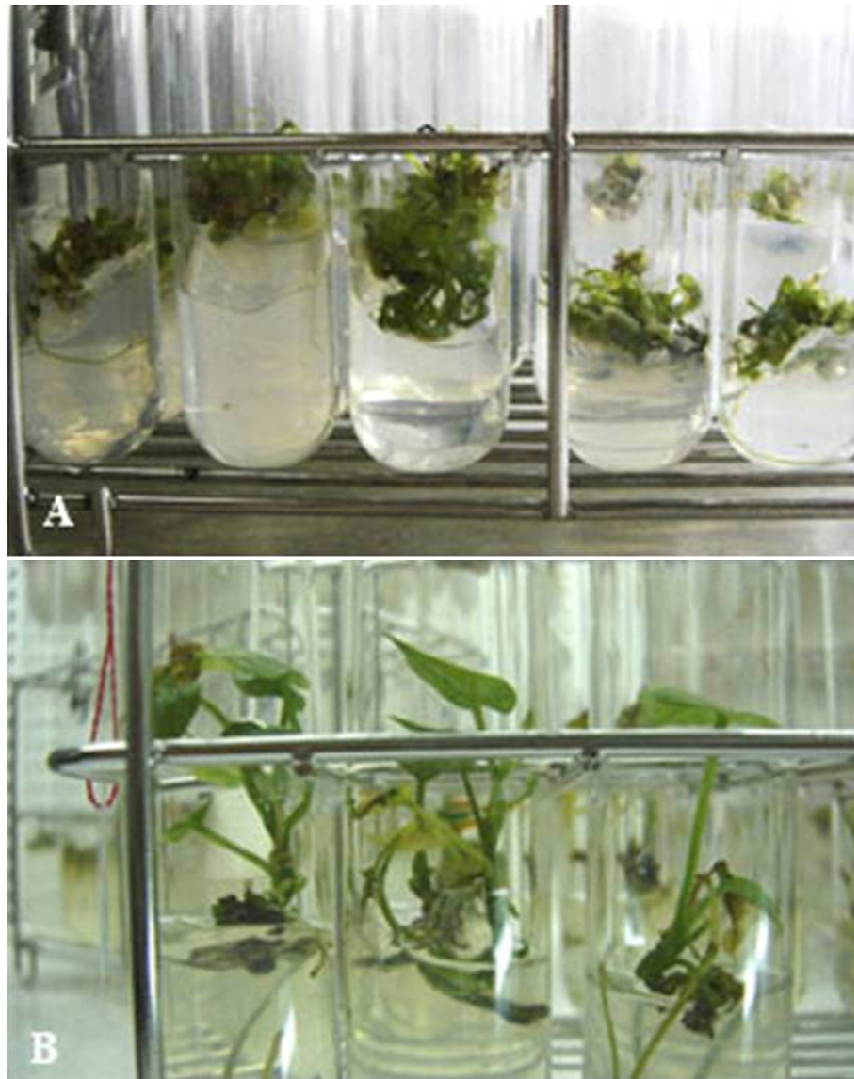


Figure 16: paquets d'embryons très développés après repiquage en tubes (A) et développement en plantes entières (B).

3.2.1. Autres séquences de milieux de régénération

Dans le but de mieux maîtriser la régénération à partir de suspensions cellulaires, nous avons testé d'autres séquences de milieux. Cette étude a été réalisée uniquement avec le cv 865 en raison de la disponibilité du matériel végétal. Nous avons testé les mêmes milieux déjà utilisés pour les cals.

Le nombre d'embryons globulaires rouges diminue entre la première et la quatrième semaine pour la plupart des milieux testés (Figure 17A). Par exemple, ce nombre passe de 22,28 à 12,53 pour le milieu ABA2.5 et de 16,38 à 7,23 pour ABA4. Deux milieux font l'exception : le milieu DK où le nombre augmente de 21,44 à 40 embryons entre la première et la deuxième semaine pour se stabiliser par la suite et le milieu ABA-G1 qui permet une légère augmentation (10,36 à 14,72 embryons).

Le nombre de petits embryons verts (Figure 17B) augmente et atteint un optimum à la troisième semaine avant de chuter à la quatrième semaine. Les plus fortes augmentations sont enregistrées avec les milieux contenant l'acide abscissique seul. Ainsi, le nombre d'embryons passe de 0,25 à 9,71 et de 1,23 à 8,46 respectivement pour les milieux ABA2.5 et ABA1.5.

Le nombre d'embryons développés (Figure 17C) augmente à partir de la première semaine pour tous les milieux testés et le maximum est atteint à la quatrième semaine pour tous les milieux à l'exception du milieu ABA4. Les plus fortes augmentations sont enregistrées pour ABA1,5 (0 à 4,5), ABA2,5 (0 à 3,10) et ABA4 (0 à 2,65).

L'analyse de la variance appliquée au nombre de différents types d'embryons somatiques après 3 semaines de culture montre que le DK présente un nombre d'embryons rouges (36,04) significativement plus élevé par rapport aux autres milieux (Tableau 14). Le milieu ABA2,5 donne un nombre de petits embryons verts de 9,71 significativement supérieur par rapport à tous les milieux dépourvus d'ABA. Il n'y a pas de différence significative avec entre ABA1,5 et 2,5. De même, le milieu ABA4 donne un nombre de grands embryons verts avec une moyenne de 3,42, significativement supérieur par rapport aux milieux dépourvus d'ABA, où le nombre d'embryons développés ne dépasse pas 1. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre le nombre d'embryons somatiques par touffe pour les différentes concentrations d'ABA.

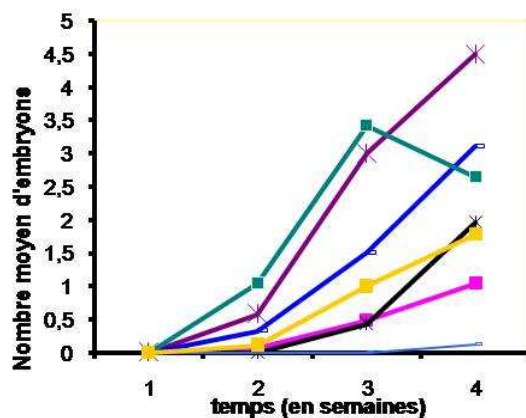
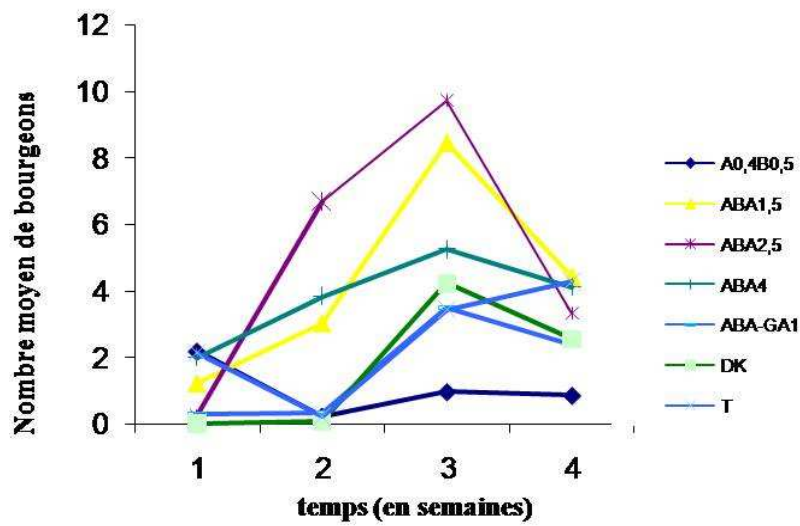
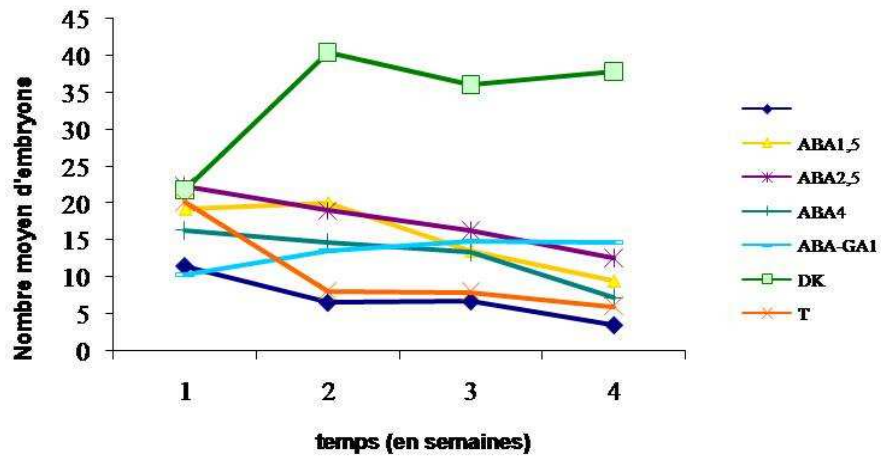


Figure 17 : Evolution du nombre d'embryons somatiques rouges (A), petits verts (B) et grands verts (C) par agrégat cellulaire issu de suspension cellulaire embryogène du cv 865.

Tableau 14 : Effet de la composition du milieu de maturation sur le nombre d'embryons somatiques produits par les agrégats cellulaires issus de suspensions cellulaires après 3 semaines de culture.

Milieux	Embryons rouges	Embryons verts petits	Embryons verts grands
T	8,04 b	3,44 c	1,00 cb
A _{0,4} B _{0,5}	6,70 b	0,96 c	0,48 c
DK	36,04 a	4,24 cb	0,00 c
ABA1.5	13,62 b	8,46 ba	3,00 ba
ABA2.5	16,29 b	9,71 a	1,50 cba
ABA4	13,42 b	5,27 cba	3,42 a
ABA GA1	14,88 b	3,48 c	0,44 c

3.3. Détermination du niveau de ploïdie

Le niveau de ploïdie de plantes régénérées a été déterminé par la comparaison de la position des pics dominants correspondant aux noyaux aux phases G0-G1 du cycle cellulaire pour les plantes dérivant d'embryons somatiques et les lignées parentales. L'analyse a montré que le pic dominant de la lignée parentale cv *Zho* était localisé au canal 83, et l'échantillon de 50 clones dérivant d'embryons somatiques qui a été examiné avait des pics variant entre 80 et 85 donnant une valeur moyenne de 82.5 ± 0.6 (Tableau 15). Cette valeur moyenne était pratiquement identique à celle de la plante témoin en tenant compte de la valeur élevée du coefficient de variation oscillant entre 4,3 et 6,5%. Par conséquent, le niveau de ploïdie des plants dérivant d'embryons somatiques pouvait être considéré comme identique au niveau hexaploïde (6x) de la plante témoin de patate douce.

Tableau 15: estimation du niveau de ploïdie pour un échantillon de 10 clones de patate douce cv Zho dérivant de l'embryogenèse somatique. La valeur moyenne du pic dominant d'un échantillon de 50 clones analysés a été estimée à $82,5 \pm 0,6$, la valeur de la plante témoin cv Zho étant au canal $83 \pm 0,56$.

Clones dérivant d'embryons	Ligne témoin cv Zho	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
Pics Dominants de noyaux (Go/G1)											
N° canal	83	85	82	81	80	82	84	80	85	80	81
Coefficient de variation (%)	5.6	6.2	4.3	5.5	6.3	4.5	6.5	5.5	5.3	6.1	5.3
Niveau de ploïdie (X)											
	6X	6X	6X	6X	6X	6X	6X	6X	6X	6X	6X

3.4. Discussion

Dans ce travail, nous avons déterminé la séquence de milieux de culture favorisant la maturation des embryons somatiques au niveau des cals et des agrégats cellulaires embryogènes pour améliorer leur conversion en plantes. En effet, la germination des embryons somatiques est fonction de leur état de maturité (Cavalcante-Alves, 1996). Nous avons testé plusieurs milieux de culture qui diffèrent par leur composition en régulateurs de croissance. Nos résultats confirment les difficultés rencontrées dans le développement des embryons somatiques et leur évolution vers les stades avancés. En effet, pour plusieurs auteurs, le taux de conversion en plantes est faible (Cavalcante Alves, 1996 ; Sim et Cardoso, 2005). Cette difficulté est à l'origine de la grande diversité des milieux de maturation signalés dans la bibliographie. Les embryons somatiques obtenus dans certains travaux ont montré des anomalies structurales qui ont empêché leur conversion en plantes (Padmanabhan et al., 1998a et 1998b).

Le repiquage des cultures (cals ou suspensions) placées sur les milieux de maturation aboutit à une diminution du nombre d'embryons globulaires rouges qui évoluent en embryons verts. Le nombre de ces derniers augmente pour atteindre un optimum à la troisième semaine. Par la suite, il y a une chute due à la prolifération anarchique et une nécrose des embryons, et

aussi à la formation de cals non embryogènes dans certaines cultures. Des augmentations du nombre d'embryons globulaires observés sur certains milieux montrent que ces milieux favorisent la prolifération du cal et la formation de nouveaux embryons globulaires.

Nous avons réussi à régénérer des plantes entières à partir des cals embryogènes de tous les clones aptes à l'embryogenèse somatique.

La diminution ou l'élimination des auxines synthétiques était nécessaire à la régénération mais cette condition n'était pas suffisante pour obtenir un taux de régénération plus important. D'autres régulateurs de croissance sont nécessaires pour stimuler la maturation. Le développement et la maturation des embryons somatiques nécessitent, chez plusieurs espèces, une stimulation par différents régulateurs de croissance (Zimmerman, 1993). Le milieu DK (Cavalcante-Alves, 1996) a eu un effet favorable pour cv 865 et le milieu A_{0,4}B_{0,5} pour cv Zho. Les milieux contenant de l'acide abscissique ont aussi donné les résultats intéressants, ce qui confirme l'effet bénéfique de ce régulateur de croissance signalé dans plusieurs travaux (Zheng et al., 1996; Dhir et al., 1998 ; Sim et Cardosa, 2005).

Cependant, La régénération à partir de cals embryogènes présente beaucoup de difficultés. En effet, en plus de leur croissance lente et leur entretien difficile, les fragments de cals présentent beaucoup d'irrégularité et de variation dans leur réponse aux milieux de régénération ce qui explique les différences non significatives observées dans ces expériences. Cette diversité serait due à la présence de zones hétérogènes au sein du cal qui répondent différemment lorsqu'elles sont réparties dans les milieux de régénération.

Concernant les suspensions cellulaires, la régénération a été réussie à la fois chez 865 et Zho avec des moyennes qui dépassent 3 embryons par agrégat cellulaire.

Le milieu A_{0,4}B_{0,5} (AIA 0,4 et BAP 0,5 mg/L) a eu un effet favorable sur la régénération dans la première phase et a stimulé le développement et le verdissement des embryons. Ce milieu a été montré efficace pour la régénération chez le bananier (Guédira, 2006). Ce résultat semble indiquer que, malgré l'éloignement sur le plan systématique, il y a des mécanismes sous jacents communs au niveau de l'embryogenèse somatique des plantes.

Comme pour les cals, l'acide abscissique a eu un effet bénéfique sur la maturation des embryons issus de suspensions cellulaires. Son effet chez les suspensions est plus évident et plus tranché par rapport à la régénération à partir de cals. Cette stimulation de la maturation par l'ABA a été signalée par plusieurs auteurs (Sim et Cardosa, 2005 ; Otani et Shimada, 1996 ; Dhir et al., 1998 ; Torres et al., 2001). L'efficacité de l'ABA semble conditionnée à la fois par la dose et le moment d'application. Un milieu de maturation avec ABA est plus efficace après une phase de prématuration. D'après Torres et al. (2001), la stimulation de la

maturation par l'acide abscissique est meilleure lorsqu'il est appliqué 7 jours après un milieu dépourvu de régulateurs de croissance. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer à la fois la concentration et le moment d'application optimaux.

Les suspensions cellulaires ont montré beaucoup d'avantages par rapport aux cals multipliés en milieu solide. Leur taux de prolifération est plus important par rapport aux cals multipliés en milieu solide. L'abondance des agrégats cellulaires dans le milieu liquide, leur taille fine, leur homogénéité et leur contact étroit avec les composants du milieu permettent une réponse à la fois plus rapide et plus homogène, et le rendement en plantules obtenues est beaucoup plus élevé par rapport aux résultats obtenus à partir des cals. Ce rendement peut être amélioré en travaillant encore davantage sur les séquences de milieu de régénération.

En considérant que la boîte de pétri contient en moyenne 40 agrégats, la moyenne par boîte est donc de 120 embryons, provenant de 0,5 mL de volume cellulaire qui a été initialement étalé sur le milieu solide. Par conséquent, à partir d'un millilitre mL de volume cellulaire, on espère potentiellement obtenir 240 plantules. Il s'avère donc que le milieu liquide est plus avantageux.

Les plants dérivant d'embryons somatiques semblent génétiquement stables et similaires aux plants parentaux hexaploïdes en se basant sur leur apparence morphologique et leur niveau de ploïdie déterminé par cytométrie en flux (Sgorbati et al., 1986; Sihachakr et Ducreux, 1993; Srisuwan et al., 2006). Cette stabilité génétique peut être expliquée par l'organisation méristématique de l'explant initial et la durée limitée de la phase cal.

Une évaluation et des analyses supplémentaires, particulièrement dans les conditions de champ, sont nécessaires pour confirmer la conformité et la stabilité génétique pour les plants régénérés par embryogenèse somatique chez la patate douce. Bien entendu, il faudra aussi étendre les analyses à des plants issus de suspensions cellulaires.

Malgré le fait que la réponse embryogène a été obtenue en appliquant le protocole développé dans ce travail, des études supplémentaires sont nécessaires pour optimiser les conditions de nutrition et de culture dans le but d'obtenir un rendement maximum de conversion en plantes et aussi d'étendre ce protocole expérimental à d'autres génotypes de patate douce.

4. Transformation par *Agrobacterium*

4.1. Transformation par *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (GV2260).

L'objectif de ce travail est la détermination des conditions optimales pour la coculture et l'infection. Pour cela, trois types d'explants ont été testés ; des morceaux de pétiole, des morceaux d'entre-nœuds et des nœuds ébourgeonnés. Des expériences préliminaires ont prouvé que seuls les nœuds ébourgeonnés sont capables de régénérer rapidement sans phase callogène. Ces explants ont été infectés par la souche C58C1 (GV2260).

Tableau 16 : Pourcentage d'explants ayant régénéré des bourgeons pour 3 types d'explants en présence et en absence de kanamycine suite à l'infection par C58C1 (GV2260).

Cultivar		953		90		Duclos 11		Zho	
Explant		Kan	Sans	Kan	Sans	Kan	Sans	Kan	Sans
Nœuds ébourgeonnés	Bourgeons verts	44,33 ± 15,2	89 ± 4,62	50	70	34 ± 19	94 ± 1,5	0	73
	Bourgeons jaunes	49 ± 13,2	0	17	0	53,5 ± 11,5	0	0	0
Entre-nœuds	Bourgeons verts	1,33 ± 1,33	1,33 ± 1,33	0	0	4 ± 4	0	0	0
Pétiole	Bourgeons verts	0	0	0	0	0	0	0	0

Chez tous les génotypes étudiés, Les morceaux de pétiole ont donné un taux de régénération de 0 % aussi bien en présence qu'en absence de kanamycine (tableau 16). La régénération des entre- nœuds est nulle pour cv 90 et cv Zho et reste très faible pour cv 953 avec 1,33% avec ou sans kanamycine. Tous les bourgeons régénérés sont apparemment normaux et de couleur verte. Pour le cv Duclos 11, le taux est nul en présence de kanamycine et de 4% en son absence. Par contre, pour les nœuds ébourgeonnés (Figure 18A), le taux moyen de régénération est de 56,2% pour tous milieux confondus, avec en moyenne 31% et 81,5% respectivement en présence et en absence de kanamycine. Les bourgeons obtenus ont une apparence morphologique normale mais sont de couleur jaune ou verte. Tous les bourgeons jaunes ont été régénérés en présence de kanamycine (Figure 18C), alors que la majorité (78,8%) des bourgeons verts (Figure 18D) obtenus proviennent du milieu dépourvu de kanamycine. En présence de kanamycine, les bourgeons verts représentent 28,2% des

bourgeons régénérés à partir de la culture de nœuds ébourgeonnés. Seul le cv Zho n'a pas régénéré de bourgeons en présence de kanamycine (tableau 16).

Etant donné leur capacité de régénération élevée, seuls les nœuds ébourgeonnés ont été utilisés dans les expériences ultérieures.

Les plantes vertes régénérées ont été testées pour détecter d'éventuelles plantes transgéniques. Cependant, les résultats obtenus étaient ambigus et contradictoires. Par conséquent, nous avons abandonné cette souche de bactérie et nous l'avons remplacée par une autre souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101—pTHW136.

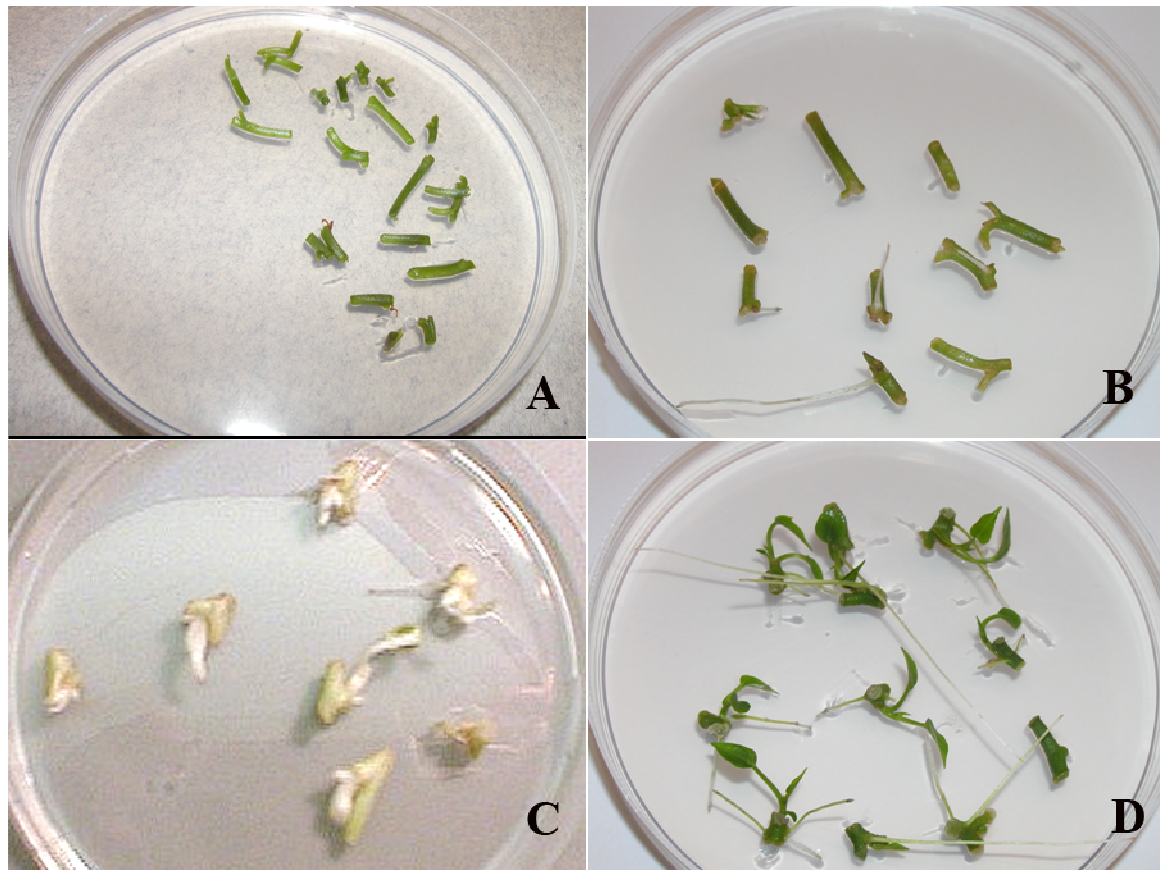


Figure 18 : développement des nœuds ébourgeonnés pendant la transformation par *Agrobacterium*. A : nœuds ébourgeonnés mis en culture. B : début d'évolution des l'explant avec émission de racines. C : bourgeons blancs sensibles développés en présence de kanamycine. D : bourgeons verts développés en absence de kanamycine.

4.1.1. transformation avec la souche GV3101—pTHW136

Le principal problème qui s'est posé avec cette nouvelle souche est sa résistance à l'antibiotique, céfotaxime, que nous avons utilisé pour éliminer la bactérie après la coculture. Malgré l'augmentation de la concentration de céfotaxime jusqu'à 500mg/L, l'éradication de la bactérie reste problématique et inefficace. Ainsi, nous avons par la suite utilisé le timentin à 500mg/L qui s'est montré plus efficace mais qui nécessite de nombreux repiquages pour diminuer la concentration des bactéries et faciliter leur éradication.

Pour cette expérience, nous avons travaillé uniquement avec le milieu dépourvu de kanamycine et nous avons modifié légèrement le protocole expérimental. La concentration de la suspension bactérienne est diluée de manière à obtenir une Do entre 0,4 et 0,6. Les explants sont placés plus longtemps dans la suspension bactérienne pendant 30 mn.

Tableau 17: résultats de la régénération de bourgeons à partir de nœuds ébourgeonnés témoins ou infectés du cultivar Zhounang13.

	Nombre d'explants	Nombre de bourgeons régénérés	Pourcentage de régénération
Témoin	62	40	64,33 ± 9,56
inoculés	437	108	25,44 ± 8,54

Le taux de régénération est de 25,44 % pour les explants inoculés contre 64,33 % pour les témoins (Tableau 17). Le contact avec la solution bactérienne pendant une durée relativement longue semble avoir un effet défavorable sur la régénération.

Un échantillon de 44 clones régénérés a été soumis au test Gus et à l'étude par PCR afin de détecter la présence des transgènes. Parmi ces plantes testées, deux se sont avérées à la fois positives pour GUS et la biologie moléculaire (Figure 19).

Le test à la kanamycine n'a pas pu être réalisé à terme à cause des infections généralisées qui sévissaient au laboratoire et qui malheureusement occasionnaient des pertes considérables en matériels expérimentaux obtenus.

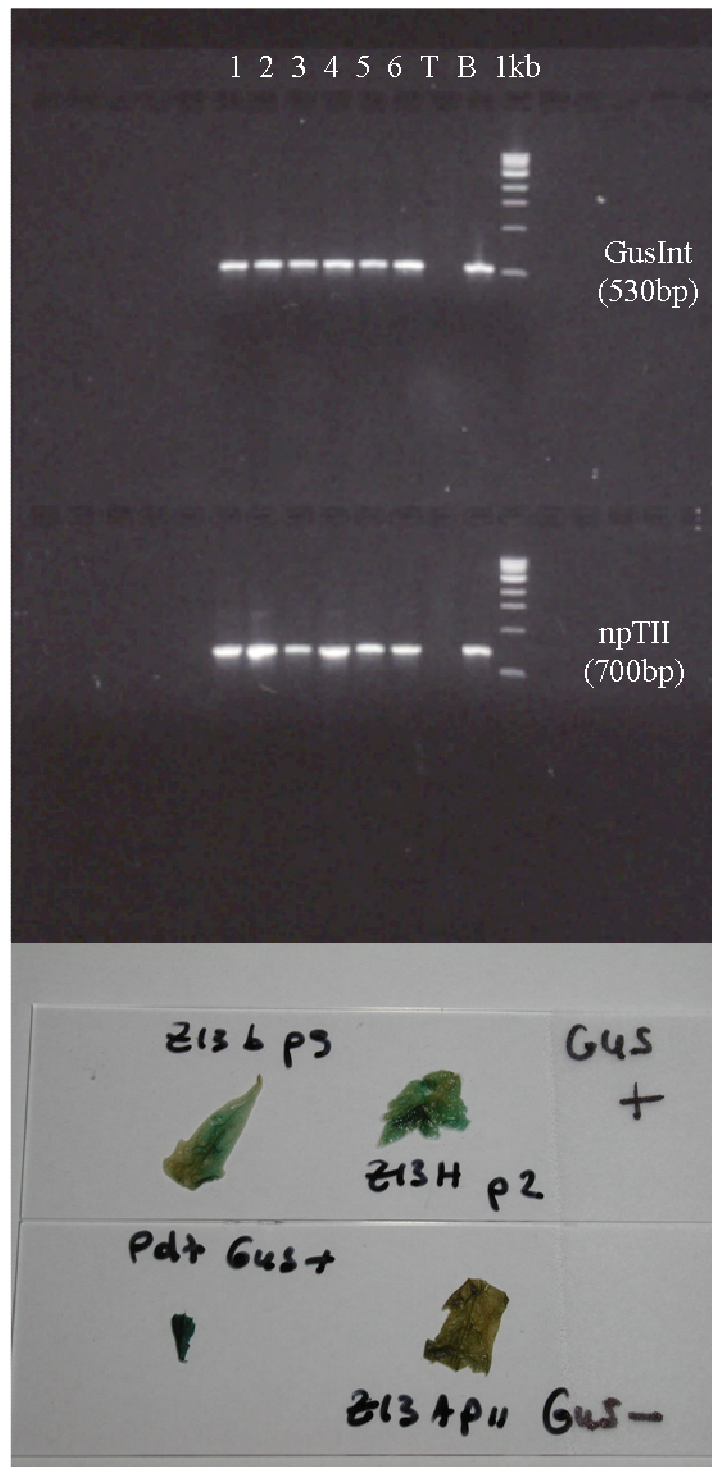


Figure 19 : Révélation sur gel d'agarose des séquences GusInt et NPTII amplifiées par PCR chez les clones transformés (1 à 6), témoin négatif (T) et témoin positif. (B).

4.1.2. transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1Rif^R (pGV2260)

La souche bactérienne utilisée pour ce travail a été construite au laboratoire de Gembloux. Il s'agit de la souche C58C1Rif^R (pGV2260) d'*Agrobacterium tumefaciens*. Elle porte le vecteur de transformation pBECKS19 dérivant de pBin19. La cassette de transformation contient le gène nptII qui confère la résistance à la kanamycine chez les plantes transformées ainsi qu'un site multiple de clonage Ω pour l'insertion d'un gène placé sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV35 (figure 1). Dans le cas de notre souche, la construction s'appelle pB19YAXTR12.6 et porte le gène codant pour une protéine PVY portant des mutations au domaine AX (384-390). Le gène a subi une mutagenèse dirigée donnant la double mutation pzp0lpvymutax. Les mutations ont donné les effets suivants :

Mutation K389 : 1176 AAG → AAC

Mutations R385, R387, R388 1164 AGAACAAGAAGG → AACACAAACAAC

La transformation génétique a aussi été tentée avec la bactérie C58C1Rif (pGV2260) portant le plasmide pBECKS19.6 développé à Gembloux. Ce plasmide porte le gène nptII et un gène muté de PVY polymérase. Un total de 240 plantes a été régénéré à partir de nœuds ébourgeonnés infectés. Cependant, aucune de ces plantes ne s'est avérée résistante à la kanamycine. En conséquence, il nous a été inutile de mener des analyses moléculaires de ces plantes

4.2. Discussion

Cette manipulation avait pour but l'insertion de gènes de résistance au complexe de potyvirus au sein du génome de la patate douce cv Zhounang13. Nous avons travaillé dans un premier temps avec des bactéries comprenant uniquement des gènes marqueurs afin de maîtriser la technique. Nous avons tenté quelques manipulations avec des cals embryogènes mais nous avons été confrontés à deux problèmes principaux : des difficultés au niveau de l'élimination des bactéries après la coculture et un taux particulièrement faible de régénération en particulier au cours de la phase de commencement de nos travaux.

La technique utilisant les nœuds ébourgeonnés s'est avérée initialement rapide, pratique et efficace. En effet, ces explants sont très faciles à manipuler et la régénération a été très rapide. Cette technique nous a permis de régénérer deux plantes dont le caractère transgénique a été confirmé par le test Gus et par la biologie moléculaire. C'est donc une technique très prometteuse qui présente encore beaucoup de possibilités d'amélioration comme par exemple

l'utilisation de l'acétosyringone, dont l'effet favorable à la transgénèse a été montré dans plusieurs travaux (Otani et Shimada, 2002).

Parallèlement, nous avons développé un protocole fiable et efficace de suspensions cellulaires et maîtrisé la régénération de plantes. Ces suspensions cellulaires présentent un matériel végétal intéressant avec un potentiel important pour la réalisation de la transformation génétique via *Agrobacterium*.

En effet, les suspensions cellulaires ont une croissance rapide, une capacité de régénération importante. De plus, les éléments qui les constituent sont de petite taille offrant ainsi une surface de contact plus importante pour l'agroinfection. Ces suspensions cellulaires ont été utilisées avec succès par Min et al. (2006) et Yu et al. (2007) pour la régénération de plantes transgéniques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'amélioration génétique classique de la patate douce présente beaucoup de difficultés liées, entre autres, à son état hexaploïde et à ses problèmes d'incompatibilité et de stérilité. La résolution des problèmes épineux que rencontre cette culture comme le complexe des potyvirus nécessite le recours aux méthodes modernes de biotechnologie qui peuvent accélérer et rendre l'amélioration plus efficace.

Notre premier objectif, dans ce travail, était de maîtriser les différentes étapes de l'embryogenèse somatique pour plusieurs variétés de patate douce.

Nous avons opté dès le départ pour les bourgeons comme explant initial. Ce choix était dicté par les nombreuses réussites réalisées avec cet explant. Des milliers d'explants appartenant à six variétés ont ainsi été ensemencés sur différents milieux de culture afin de déterminer les conditions de culture optimales pour l'obtention de cals embryogènes.

Parmi les six variétés testées, deux ont donné des cals embryogènes de manière répétitive avec des pourcentages de réussite avoisinant les 14%. Il s'agit des variétés *Zho* et *865*. La variété *90* a donné un nombre très réduit de cals alors que les trois restantes se sont montrées récalcitrantes malgré l'utilisation de plusieurs milieux. Donc, comme pour d'autres travaux, le facteur génotype reste déterminant et constitue une limite en vue de l'utilisation de ces techniques pour l'amélioration. Cependant, cette barrière n'est pas infranchissable puisque l'expérience a prouvé que l'effet du génotype peut être surmonté par la modification des conditions de culture ou par des traitements particuliers du matériel végétal source d'explants.

A part le génotype, deux autres facteurs se sont montrés déterminants. Il s'agit tout d'abord du type d'auxine : le 2,4,5T à 5 μM et le piclorame à 10 μM se sont montrés les plus efficaces et ont davantage favorisé l'induction des cals embryogènes que le 2,4D qui est l'auxine la plus utilisée dans ce domaine. L'autre facteur qui a eu un effet significatif est l'agent gélifiant. En effet, l'agar à 7 g/L a donné des pourcentages significativement supérieurs par rapport au gelrite à 3 g/L. Ce résultat, qui a été obtenu avec les concentrations les plus utilisées dans les travaux similaires, reste à approfondir par la comparaison d'autres concentrations d'agents gélifiants.

Le résultat optimal au niveau de l'induction de cals embryogènes a donc été obtenu pour les variétés *Zho* et *865* sur un milieu solidifié avec l'agar à 7 g/L et comprenant 5 μM de 2,4,5T.

L'explant placé sur un tel milieu a tendance à se gonfler et à devenir mucilagineux. Au sein de cette masse mucilagineuse se forment des masses compactes nodulaires dont la couleur varie suivant les génotypes. Ces masses sont hautement embryogènes.

L'entretien de ces cals embryogènes nécessite des repiquages fréquents sur des milieux d'entretien qui comprennent des concentrations en auxines synthétiques similaires à celles des milieux d'induction. Ils donnent alors de grandes masses de cals embryogènes comprenant deux parties : une mucilagineuse et l'autre compacte nodulaire.

Nos moyens techniques n'ont pas permis de faire des mesures précises du rythme de croissance, mais nous avons constaté que cette croissance est très lente. En plus, les cals sont constamment menacés par les nécroses et des zones de cals friables non embryogènes à croissance très rapide qui risquent de se propager et envahir complètement les cals embryogènes. Ces zones doivent être éliminées à chaque repiquage pour éviter la perte des cals embryogènes.

Malgré ces difficultés, nous avons pu entretenir des cals embryogènes pendant plusieurs mois voire plusieurs années dont certains sans perte de leur capacité embryogène.

Notre deuxième objectif était la mise en place de suspensions cellulaires embryogènes en milieu liquide agité.

L'ensemencement de fragments de cals embryogènes en milieu liquide agité comprenant 5 μM de 2,4D a permis une mise en place rapide de suspensions cellulaires embryogènes. Ces suspensions sont caractérisées par un milieu à aspect limpide dans lequel baignent des petits agrégats cellulaires. L'étude histologique de ces agrégats montre des cellules petites et isodiamétriques réparties en deux catégories : des cellules vacuolisées au centre (partie blanche) et des cellules à cytoplasme abondant et granuleux avec un gros noyau central (partie périphérique rouge ou jaune). Ces dernières présentent donc les caractéristiques des cellules embryonnaires.

L'entretien des suspensions embryogènes demande beaucoup de précautions, mais leur croissance est beaucoup plus rapide que celle des cals et les agrégats paraissent très homogènes à part des différences de taille qui ont tendance à s'estomper avec les repiquages. Le contact plus étroit des composants du milieu serait responsable à la fois de la rapidité de croissance et l'homogénéité.

Nous avons réalisé une étude à petite échelle de la cinétique de croissance d'une suspension cellulaire de 865. La courbe obtenue présente une forme sigmoïde classique avec une phase exponentielle qui dure environ 4 à 5 semaines.

Le risque le plus important pour les suspensions embryogènes est l'invasion par des cellules non embryogènes à croissance rapide. Il en résulte des suspensions troubles jaunes à brunes très denses ayant perdu définitivement leur pouvoir embryogène. Le repiquage régulier et la filtration permet d'éviter ce phénomène. Ainsi, la majorité de nos souches ont été entretenues et préservées pendant plusieurs mois.

Les cals et les suspensions embryogènes obtenus chez les cv *Zho* et *865* ont été utilisés pour la régénération qui est le 3^{ème} objectif.

La régénération des plantules est un processus difficile qui requiert plusieurs étapes et un ensemble de traitements hormonaux. Nous avons réussi la régénération, dans notre travail, à la fois à partir de cals et à partir de suspensions cellulaires embryogènes. Dans les deux cas, la régénération exige au minimum trois étapes. Dans la première étape dite de prématuration, il est nécessaire de diminuer ou éliminer l'auxine synthétique. Certains milieux comme *A_{0,4}B_{0,5}* favorisent la formation et le développement des embryons somatiques durant cette phase. La 2^{ème} étape de maturation favorise l'évolution des embryons vers les stades avancés. L'acide abscissique joue un rôle important durant cette phase. Son effet favorable est significatif surtout pour les suspensions cellulaires qui réagissent de manière plus homogène. Les embryons développés sont convertis en plantes lorsqu'ils sont sur un 3^{ème} milieu en tubes.

Nous avons essayé de réaliser la transformation génétique et la régénération de plantes transgéniques résistantes aux potyvirus. Notre protocole d'origine prévoyait l'utilisation de cals embryogènes pour cette manipulation. Cependant, le manque de matériel végétal et les difficultés de régénération au début de notre travail nous a obligé à reconsidérer cette décision.

Nous avons utilisé dans un premier temps des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* dont le plasmide porte deux gènes marqueurs : *Gus* et *nptII*. Nous avons tenté la transgénèse par coculture avec trois types d'explants : des pétioles, des entrenœuds et des nœuds ébourgeonnés. Ce dernier explant a donné le meilleur taux de régénération et a été sélectionné pour la majorité des expériences.

Malgré de nombreuses difficultés, nous avons pu régénérer deux plantes présentant une réponse positive à la fois au test *Gus* et à l'analyse moléculaire par PCR. Ce résultat est très prometteur et ouvre la voie à la régénération abondante de plantes transgéniques.

Nous avons réalisé quelques manipulations avec une autre souche d'*Agrobacterium tumefaciens* véhiculant un gène de résistance aux potyvirus mais le nombre limité de ces travaux n'a pas permis la sélection de plantes transformées.

En perspective, des travaux supplémentaires peuvent permettre l'amélioration des résultats obtenus dans ce travail. Il s'agit en premier lieu d'augmenter les rendements au cours de la phase d'induction et surmonter le problème de l'effet du génotype. La modification de la composition du milieu ne semble pas à elle seule capable de résoudre le problème des variétés récalcitrantes. Il faut aussi agir sur l'état physiologique du matériel végétal source d'explants. Dans notre laboratoire, des travaux sont actuellement en cours dans le but d'essayer d'obtenir des cals embryogènes en utilisant des explants issus de plantes sevrées et placées en serre. Cette méthode donne déjà des résultats prometteurs puisqu'elle a permis d'obtenir des cals embryogènes chez 90, Qu et 953 qui sont des variétés récalcitrantes.

Les suspensions cellulaires montrent déjà des résultats satisfaisants chez 865 et Zho mais il faudra étudier de manière plus précise la cinétique de croissance et estimer le rythme de repiquage permettant de les maintenir en phase exponentielle.

La régénération à partir de suspensions cellulaires peut être améliorée en essayant d'autres séquences de milieux et en raccourcissant les délais entre les repiquages.

L'utilisation de nœuds ébourgeonnés a permis d'obtenir des plantes transgéniques confirmées mais en nombre limité. Le rendement de cette technique peut être amélioré par certaines modifications au niveau du protocole de transformation comme l'addition d'acétosyringone dont l'effet favorable a été prouvé dans beaucoup de travaux. En revanche, les résultats réalisés au niveau de l'embryogenèse somatique surtout les suspensions offre aussi un matériel végétal intéressant pour la transgénèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Mazrooei S, Bhatti MH, Henshaw GG, Taylor NJ et Blakesley D (1997)** Optimisation of somatic embryogenesis in fourteen cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas L. Lam.*). Plant Cell Rep 16:710-714.
- Ammirato PV (1983)** Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter, International for plant tissue culture. 57: 15-23.
- Arrendell S et Collins WW (1986)** Reaction of sweet potato seedlings to the russet crack strain of feathery mottle virus. HortScience, 21: 1191-1193.
- Assani A, Haicour R, Wenzel G, Foroughi-Wehr B, Bakry F, Côte FX, Ducreux G, Ambroise A et Grapin A (2002)**. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa spp.*). Plant Science, 162: 355-362.
- Austin DF (1988)** The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In: Exploration, maintenance and utilization of sweetpotato genetic resources. Report of the First Sweet Potato Planning Conference 1987. International Potato Center, Lima, Peru: 27-59.
- Banta LM et Montenegro M (2008)** Chapter 3: Agrobacterium and plant biotechnology. In: Agrobacterium: From Biology to Biotechnology by Tzvi Tzfira and Vitaly Citovsky: 73-149.
- Barbas E, Jay-Allemand C, Doumas P, Chaillou S et Cornu D (1993)** Effects of gelling agents on growth, mineral composition and naphthoquinone content of in vitro explants of hybrid walnut tree (*Juglans regia x Juglans nigra*). Ann Sci For (Paris). 50:177-186.
- Belarmino MM, Abe T et Sasahara T (1994)** Plant regeneration from stem and petiole protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its wild relative, *I. lacunosa* (1994)Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 145-150.
- Belarmino MM, Abe T et Sasahara T (1996)** Asymmetric protoplast fusion between sweet potato and its relatives, and plant regeneration. Plant Cell Tissue Org Cult 46:195-202.

- Benbadis A (1973)** Analyse des aptitudes embryogènes de divers types de cellules isolées de *Daucus carota* L. Soc. Bot. Fr, Mém., Coll. Morpho. : 223-234.
- Berberich T, Takagi T, Miyazaki A, Otani M, Shimada T et Kusano T (2005)** Production of mouse adiponectin, an anti-diabetic protein, in transgenic sweet potato plants. Journal of Plant Physiology 162 (2005) 1169-1176.
- Bhat SR et Srinivasan S (2002)** Molecular and genetic analyses of transgenic plants: - Considerations and approaches. Plant Science 163 (4): 673-681.
- Bidney DL et Shepard JF (1980)** colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. Plant Science Letters 18: 335-342.
- Bohac JR, Jones A et Austin DF (1992)** Unreduced pollen: proposed mechanism of polyploidization of sweetpotato (*Ipomoea batatas*). HortScience 27: 611.
- Bouhassan A (1984)** Analyse du polymorphisme des néoformations obtenues in vitro à partir de divers tissus de Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées). Thèse 3ème Cycle, Univ. Paris Sud, Orsay, 167 pp.
- Brown AHD (1989)** Core collections: a practical approach to genetic resources management. Genome 31: 818-824.
- Buah JN, Kawamitsu Y, Sato S et Murayama S (1999)** Effects of different types and concentrations of gelling agents on the physical and chemical properties of media and the growth of banana (*Musa* spp.). in vitro. Plant Prod Sci (JPN). 2:138-145.
- Caetano-Anolle's G, Bassam BJ et Gresshoff PM (1991)** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 9: 553-557.
- Cantliffe DJ (1993)** Advanced propagation systems for biomass species: model system based on sweet potato. Biomass Bioenerg 5:63-69.
- Casse-Delbart F (1998)** La transgénèse végétale: les plantes transgéniques en agriculture. Dix ans d'expérience de la Commission du génie biomoléculaire sous la direction d'Axel Kahn. John Libbey Eurotext : 59-88.
- Cavalcante Alves JM, Sihachakr D, Allot M, Tizroutine S, Mussio I, Servaes A et Ducreux G (1994)** Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). Plant Cell Rep. 13:437-441.
- Cavalcante Alves JM (1996)** l'embryogenèse somatique chez la patate douce (*ipomoea batatas* (L.) lam., convolvulacées): induction et maintien des structures embryogènes, caractérisation de protéines associées. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur es-sciences de l'université Paris XI Orsay. 183p.

- Chée RP, Daniel J et Cantliffe DJ (1988)** Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir. Embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. *Plant Cell Tissue Org Cult*: 15:149-159.
- Chée RP et Cantliffe DJ (1989a)** Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized embryos. *Plant Cell Tissue Org Cult*. 17: 39-52.
- Chée RP et Cantliffe DJ (1989b)** Inhibition of somatic embryogenesis in response to 2,3,5-triiodobenzoic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cultured in vitro. *J. Plant Physiol.*, 135: 398-403.
- Chée RP, Schultheis JR et Cantliffe DJ (1992)** Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *High-Tech and Micropropagation III*. Ed. Y. P. S. Bajaj- Birkhäuser, 1992: 107-117.
- Cheikh R (1984)**. Etude d'un virus de la patate douce (*Ipomoea batatas* (L)) et essai de son élimination par la méthode de culture d'apex in vitro. Mémoire de fin d'étude présenté en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur horticole, institut agronomique et vétérinaire Hassan II. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II. 30p.
- Choi HJ, Chandrasekhar T, Lee HY et Kim KM (2007)** Production of herbicide-resistant transgenic sweet potato plants through method. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2007) 91:235–242.
- Cipriani G, Michaud D, Brunelle F, Gmirzaie A et Zhang DP (1998)** Expression of Soybean proteinase inhibitor in Sweet potato. CIP program report 1997-98: 271-277.
- Clark CA (1986)** Reactions of sweet potato selections to *Fusarium* root and stem canker caused by *Fusarium solani*. *Plant Dis.*, 70: 869-871.
- Cornu D et Jay-Allemand C (1989)** Micropropagation of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* x *Juglans regia*) through culture and multiplication of embryos. *Ann Sci For (Paris)* 46 (Suppl.):113s–116s.
- Daifu M, Hongmin L, Zhang D et Wang Y (2001)** sweetpotato varieties decline in china and the prevent practices. International Workshop on Sweetpotato Cultivar Decline Study. September 8-9, 2000. Miyakonojo, Japan. Edited by Y. Nakazawa and K. Ishiguro: 20-26.
- De la Riva G A, González-Cabrera J, Vázquez-Padrón R et Ayra-Pardo C (1998)** Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation Vol.1 No.3, Issue of December 15, 1998. <http://ejb.ucv.cl/content/vol1/issue3/full/1/> [visité le 17/06/09].

- Debuyser J, Marcotte JL et Henry Y (1992)** Genetic analysis of in vitro wheat somatic embryogenesis. *Euphytica* 63:265-270
- Desamero N.V., Rhodes B.B., Decoteau D.R. et Bridges W.C. (1994)** Picolic acid induced direct somatic embryogenesis in sweet potato. *Plant Cell Tissue Org Cult* 37:103-111.
- Dhakhwa S (2008)** Insect and related pests of vegetables Sweetpotato Weevil *Cylas formicarius elegantulus* (Summers), Curculionidae, Coleoptera. <http://ipm.ncsu.edu/AG295/html/index.htm> [visité le 17/02/08].
- Dhir SK, Oglesby J et Bhagsari AS(1998)** Plant regeneration via somatic embryogenesis, and transient gene expression in sweet potato protoplasts. *Plant Cell Rep.* 17: 665–669.
- Dodds JH, Merzdorf C, Zambrano V, Siqueenas et Jaynes J (1991)** Potential use of Agrobacterium mediated gene transfer to confer insect resistance in sweet potato. In: Jansson RK, Raman KV (eds) Sweet potato pest management: a global perspective. Westview, Boulder: 203–219.
- Dubois T, Dubois J, Guedira M, Diop A et Vasseur J (1992)** SEM characterization of an extracellular matrix around somatic proembryos in roots of *Cichorium*. *Ann Bot* 70:119–124.
- Duncan DB (1955)** Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- Elameen A., Fjellheim S., Larsen A., Rognli O. A., Sundheim L., Msolla S., Esther Masumba E., Mtunda K. et Klemsdal S.S. (2008)** Analysis of genetic diversity in a sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) germplasm collection from Tanzania as revealed by AFLP *Genet Resour Crop Evol.* (2008) 55:397–408.
- Fajardo DS, La Bonte DR et Jarret RL (2002)** Identifying and selecting for genetic diversity in Papua New Guine sweetpotato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. germplasm collected as botanical. *Seed Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 463–470.
- FAO (1996)** Rapport sur l'état des ressources phylogénétiques dans le monde préparé pour la Conférence technique internationale sur les ressources phylogénétiques, Leipzig, Allemagne du 17 au 23 Juin 1996. http://www.fao.org/ag/agP/AGPS/PGRFA/pdf/swrshr_f.pdf. [visité le 17/06/08]
- FAOSTAT (2008)** <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> [visité le 17/06/08].
- Fehér A, Pasternak TP et Dudits D (2003)** Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Org Cult* 74:201–228.
- Fehér A (2006)** why somatic plant cells start to form embryos? *Plant Cell Monographs*. Springer Berlin / Heidelberg. 2/2006 :85-101.

- Feng G., Gong Y. et Zhang P. (2000)** Production and deployment of virus-free sweet potato in China. *Crop Protection* 19: 105-111.
- Fock I, Collonnier C, Luisetti J, Purwito A, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducrexu G et Sihachakr D (2001)** Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant Physiol Biochem* 39:899-908.
- Frearson EM, Power JB et Cocking EC (1973)** The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol* 33:130-137.
- Freyre R., Iwanaga M. et Orjeda G. (1991)** Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don germplasm for sweetpotato improvement. 2.Fertility of synthetic hexaploids and triploids with 2n gametes of *I. trifida*, and their interspecific crossability with sweet potato. *Genome* 34:209-214.
- Gama MICS, LeiteRP Jr, CordeiroAR et CantliffeDJ (1996)** Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 46:237–244.
- Garcia R, Moran R, Somontes D, Mena J, Pimentel E, Zaldua Z, Lopez A et Garcia M. (1999)** Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) biotechnology: progress and perspectives. *Plant biotechnology and in vitro Biology in the 21st century.* ©1999 Kluwer Academic Publishers. p: 143-146.
- Gibson RW, Aritua V, Byamukama E, Mpembe I et Kayongo J (2004)** Control strategies for sweet potato virus disease in Africa. *Virus Research* 100 (2004) 115–122.
- Gichuki ST, Berenyi M, Zhang D, Hermann M, Schmidt J, Glössl J et Burg K (2003a)** Genetic diversity in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 429–437.
- Gichuki ST, Nangayo F, Machuka J, Njagi I, Macharia C, OdhiamboB et Irungu J (2003b)** Development of virus resistance sweet potato using biotechnological approaches in Kenya. *Proc Symp Int Soc Trop Root Crops* 13:131.
- Gosukonda RM, Porobodessai A, Blay E, Prakash CS et Peterson CM (1995a)** Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *In Vitro Cell Dev Biol* 31:65–71.
- Gosukonda RM, Prakash CS et Dessai AP (1995b)** Shoot regeneration in vitro from divers genotypes of sweet potato and multiple shoot production per explant. *HortSci* 30:1074–1077.

- Guédira A (2006)** Mise en œuvre des biotechnologies : suspensions cellulaires, protoplastes, en vue de l'amélioration des bananiers à la résistance aux nématodes au Maroc. Thèse d'état, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat, 203 p.
- Gura S (1991).** Sweet potato-No longer to be neglected. *Entwicklung und landlicker raun.*1:20-23.
- Hadeler B, Scholtz S et Reski R (1995)** Gelrite and agar differently influence cytokinin-sensitivity of a moss. *J Plant Physiol* 146:369-371.
- Hamama L. (2002)** éléments du déterminisme de l'orientation des cellules du sporophyte vers la voie de l'embryogenèse somatique chez le jojoba (*Simondsia chinensis(L.)*). Physiologie et contrôle moléculaire de la régénération. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur d'état. Université Cadi Ayyad. Faculté des Sciences- Semlalia-Marrakech. 262p.
- Harrell RC, Bieniek M, Hood CF, Munilla R et Cantliffe DJ (1994)** Automated, in vitro harvest of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39 (2): 171-183.
- Haug JC et Sun M (2000)** Genetic diversity and relationship of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA, *Theor. Appl. Genet.* 100: 1050–1060.
- Houndonougbo (1989)** Influence de différentes concentrations d'acide indole-3-acétique, d'acide naphthalène-acétique, d'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique et de kinétine sur la callogenèse et l'organogenèse in vitro de fragments d'entre-noeuds de deux variétés de patate douce (*Ipomoea batatas L. Lam.*). *Agronomie* 9: 653-660.
- Huamán Z, Aguilar C et Ortiz R (1999)** Selecting a Peruvian sweetpotato core collection on the basis of morphological, eco-geographical, and disease and pest reaction data.*Theoretical and Applied Genetics* 98:840-845.
- Huang C P (1982)** Nutritive value of sweet potato, AVROC.
- Huang L et Chi D (1988)** Pivotal roles of picloram and gelrite in banana callus culture. *Environmental and Experimental Botany* 28: 249-258.
- Huang J, Corke H et Mei M (2002)** Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*) and its wild relatives *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 541–550.

- Hwang Shih Y, Tsang yu T et Hsiao FLo (2002)** Application of simple sequence repeats in determining the genetic relationships of cultivars used in sweet potato polycross breeding in Taiwan. *Scientia Horticulturae* 93. pp: 215-224.
- Ibaraki Y et Kurata K (2001)** Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65 (21): 179–199, 2001.
- Ikeda M et Kamada H (2006)** Comparison of Molecular Mechanisms of Somatic and Zygotic Embryogenesis *Plant Cell Monographs* . Springer Berlin / Heidelberg. 2/2006: 51-68.
- Iwanaga M, Freyre R et Orjeda G (1991)** Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don. germ plasm for sweet potato improvement. 1. Development of synthetic hexaploids of *I. trifida* by ploidy-level manipulations. *Genome*, 34: 201-208.
- Jarret RL, Salazar F et Fernandez ZR (1984)** Somatic embryogenesis in sweet potato. *HortSci* 19:397-398.
- Jarret R. L. et Austin D.F. (1994)** Genetic diversity and systematic relationships in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis *Genetic Resources and Crop Evolution* 41: 165-173, .
- Jarret R.L., Gawel N. et Whittemore A. (1992)** Phylogenetic relationships of the Sweetpotato [*Ipomea batatas* (L. Lam.)].*J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 117: 633–637.
- Jarret RL et Austin DF (1994)** Genetic diversity and systematic relationships in sweetpotatoes [(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)] and related species as revealed by RAPD analyses. *Genet. Res. Crop Evol.* 41:165-173.
- Jimenez V M (2005)** Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant growth regulations* 47:91-110.
- Johansson LB (1986)** Effects of activated charcoal cold treatment and elevated CO₂ concentration on embryogenesis in anther cultures. In: Walter de Gruyter (ed), *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. New York, USA pp257-264.
- Jones A (1965)** Cytological observations and fertility measurements of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM). *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 86 :527-537.
- Jones A et Cuthbert FP Jr (1973)** Associated effects of mass selection for soil-insect resistances in sweet potato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 98: 480-482.
- Jones A et Deonier MT (1965)** Interspecific crosses among *Ipomoea lacunosa*, *I. ramosa*, *I. trichocarpa* and *I. triloba*. *Bot. Gaz.* 126: 226-232.
- Jones A et Dukes PD (1980)** Heritabilities of sweet potato resistance to rootknot caused by *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105: 154-156.

- Jones A et Deonier MT (1965)** Interspecific Crosses Among *Ipomoea lacunosa*, *I. ramosa*, *I. trichocarpa*, and *I. Triloba* (1965) Botanical Gazette, Vol. 126, No. 3 (Sep., 1965), pp. 226-232.
- Kasukabe Y, He L, Watakabe Y., Otani M., Shimada T. et Tachibana S. (2006)** Improvement of environmental stress tolerance of sweet potato by introduction of genes for spermidine synthase. Plant Biotechnology. 23: 75–83.
- Kimura T, Otani M, Noda T, Ideta O, Shimada T et Saito A (2001)** Absence of amylose in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] following the introduction of granule-bound starch synthase I cDNA. Plant Cell Rep. 20: 663–666.
- Kwon EJ, Kwon SY, Kim MZ, Lee JS, Ahn YS, Jeong BC, Kwak SS et Lee HS (2002)** Plant regeneration of major cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas*) in Korea via somatic embryogenesis (in Korean). Korean J Plant Biotechnol 29:189–192.
- Lainé E., Lamblin F., Lacoux J., Dupre P., Roger D., Sihachakr D. et David A. (2000)** Gelling agent influences the detrimental effect of kanamycin on adventitious budding in flax. Plant Cell Tissue Org Cult 63:77-80.
- Laroche L. (1997)** influence de la concentration des composantes du milieu au début de la phase d'induction en culture in vitro d'anthères d'orge. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M-Sc.). 106p.
- Lawton R., Winfield S., Daniell H., Bhagsari A.S. et Dhir S.K. (2000)** Expression of Green-Fluorescent Protein Gene in Sweet Potato Tissues Plant Molecular Biology Reporter 18: 139, 2000.
- Lee KS, Zapata-Arias FJ, Brunner H et Afza R (1997)** Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 51: 1-8.
- Lim S, Kim YH, Kim SY, Kwon SY, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Paek KY et Kwak SS (2007)** Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants that express both CuZnSOD and APX in chloroplasts to methyl viologen-mediated oxidative stress and chilling. Mol Breeding. 19: 227–239.
- Linsmaier EM et Skoog F (1965)** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. - Physiol. Plant., 1965, 18(1), 100-127.
- Liu JR et Cantliffe DJ (1984)** Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). Plant Cell Rep 3:112–115

- Liu QC, Kokubu T et Sato M (1993a)** Plant regeneration from protoplast fusions of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and *I. triloba* L. *Mem Fac Agric Kagoshima Univ* 29:43–47.
- Liu QC, Kokubu T et Sato M (1993b)** Varietal differences of somatic embryogenesis in shoot tip culture of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Mem Fac Agric Kagoshima Univ* 29:39–42.
- Liu CM, Xu ZH et Chua NH (1993c)** Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant cell*. 5: 621-630.
- Liu QC, Zhai H, Wang Y et Zhang DP (2001)** efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweetpotato. *In vitro cell. dev. biol.plant* 37:564-567.
- Margara J. (1982)** Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse, INRA éd. 263p
- Martin F W et E Cabanillas (1966)** Post-pollen-germination barriers to seed set in sweet-potato. *Euphytica* 15: 404-411.
- Martin FW (1970a)** Self- and interspecific incompatibility in the Convolvulaceae. *Bot Gaz* 131:139-144.
- Martin FW (1970b)** Sterility in some species related to the sweet potato. *Euphytica* 19: 459-464
- Martin F.W. et Jones A (1971)** Flowering and fertility changes in six generations of open-pollinated sweet potato. *Amer J Hort Sci*. 96:493-495.
- Martin FW et Jones A (1972)** The species of *Ipomoea* closely related to the sweet potato. *Econ. Bot.* 20: 201-215.
- Martin FW (1982)** L'analyse de l'incompatibilité et de la stérilité chez la patate douce. In: Villareal RL, Griggs TD (eds) Sweet potato. (AVRDC Pub 82–172) *Proc Int Symp AVRDC* 1:293–300.
- McDonald JA et Mabry TJ (1992)** Phylogenetic systematics of *Ipomoea* (Convolvulaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Plant Systematics and Evolution*. 180: 243–259.
- Min SR, Woo JW, Jeong W J, Han S K, Lee YB et Liu J R (2006)** Production of human lactoferrin in transgenic cell suspension cultures of sweet potato. *Biologia plantarum* 50: 131-134.
- Mitchell TD, Bhagsari AS, Ozias-Akins P et Dhir SK (1998)** Electroporation-mediated transient gene expression in intact cells of sweetpotato. *In vitro cellular & developmental biology*. 34: 319-324.

- Moran R, Garcia R, Lopez A, Zaldua Z, Menta J, Garcia M, Armas R, Somonte D, Rodriguez J, Gomez M et Pimentel E (1998)** Transgenic sweet potato plants carrying the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis. *Plant Sci* 139:175–184.
- Morel G et Wetmore RM (1951)** Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38: 141-143
- Moyer W J (1982a).** Le traitement des maladies Post-Récolte des patates douces. La patate douce: actes du premier symposium international : 189-197.
- Moyer WJ (1982b)** L'analyse de l'incompatibilité et de la stérilité chez la patate douce. La patate douce: actes premier symposium international. P: 293-300.
- Murashige T et Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Murata T, Okada Y, Fukuoka H, Saito A, Kimura T, Mori M, Nishiguchi M, Hanada K et Sakai J (1997)** Transformation by direct gene transfer in sweet potato [*Ipomoea batatas* L.(Lam)]. In: La Bonte R, Yamashita M, Mochida H (eds) Proc Int Workshop Sweet potato Production System 21st Century. Kyusyu National Agricultural Experimental Station, Miyakonojo, Japan: 159–180.
- Naim BJ, Furneaux R.H et Stevenson TT (1995)** Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 43:1-11.
- Newell CA, Lowe JM, Merryweather A, Rooke LM et Hamilton WDO (1995)** Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Sci* 107:215–227.
- Nishimaki T et Nozue M (1985)** Isolation and culture of protoplasts from high anthocyanin-producing callus of sweet potato. *Plant Cell Reports.* 4: 248- 251.
- Nishiyama I (1971)** Evaluation and domestication of sweet potato. *Bot. Mag. Tokyo.* 84 377–387.
- Nishiyama I, Miyazaki T et Sakamoto S (1975)** Evolutionary autopoloidy in the sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its progenitors. *Euphytica* 24:197-208.
- Okada Y, Saito A, Nishiguchi M, Kimura T, Mori M, Hanada K, Sakai J, Miyazaki C, Matsuda Y et Murata T (2001)** Virus resistance in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) expressing the coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus. *Theor Appl Genet.* 103:743–751.

- Okada Y, Nishiguchi M, Saito A, Kimura T, Mori M, Hanada K, Sakai J, Matsuda Y et Murata T (2002)** Inheritance and stability of the virus-resistant gene in the progeny of transgenic sweet potato. *Plant Breed* 121:249–253.
- Orjeda J, Freyre R et Iwanaga M (1990)** production of 2n pollen in diploid *Ipomoea trifida*, a putative wild ancestor of sweet potato. *J. Hered.* 462–467.
- Otani M, Shimada T et Niizeki H (1987)** Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea Batatas* L.). *Plant Science*, 53/ 157-160.
- Otani M, Mii M, Handa T, Kamada H et Shimada T (1993)** Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci* 94:151–159.
- Otani M et Shimada T (1996)** Efficient embryogenic callus formation in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *Breed. Sci.* 46: 257-260.
- Otani M, Mii M et Shimada T (1996)** High frequency plant regeneration from leaf calli in sweet potato cv. Chugoku 25. *Plant Tiss Cult Lett.* 13:23–27.
- Otani M, Shimada T, Kimura T et Saito A (1998)** Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol* 15:11–16.
- Otani M et Shimada T (2002).** Transgenic sweet potato with agronomically important genes. In: transgenic plants and crops. Edited by George Khachatourians. Marcel Dekker Inc. New York Basel: 699-715.
- Otani M, Hamada T et Shimada T (2003a)** Production of amylose-free sweet potato plants by RNAi. *Proc Symp Int Soc Trop Root Crops* 13:182–183.
- Otani M, Wakita Y et Shimada T (2003b)** Production of herbicide-resistant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Breed. Sci.* 53 (2):145–148.
- Otani M, Hamada T, Katayama K, Kitahara K, Kim SH, Takahata Y, Suganuma T et Shimada T (2007)** Inhibition of the gene expression for granule-bound starch synthase I by RNA interference in sweet potato plants *Plant Cell Rep.* 26:1801–1807.
- Padmanabhan KD, Cantliffe DJ, Harrell RC et Harrison J (1998a)** Computer vision analysis of somatic embryos of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] for assessing their ability to convert to plants *Plant Cell Reports* 17 (9): 681–684.
- Padmanabhan K, Cantliffe DJ, Harrell RC et McConnell DB (1998b)** A comparison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato [*Ipomoea batatas*

(L.) Lam.] using computer vision and histological analyses V. Plant Cell Reports. 17: 685-692.

Padmanabhan K, Cantliffe DJ et Koch KE (2001) Auxin-regulated gene expression and embryogenic competence in callus cultures of sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Plant Cell Reports 20:187–192.

Perera SC et Ozias-Akins P (1991) Regeneration from sweetpotato protoplasts and assessment of growth conditions for flow-sorting of fusion mixtures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 917-922

Pido N, Kowyama Y, Shimonish K et Karube M (1995) Plant regeneration from adventitious root segments derived from leaf disc of sweet potato cultivar Jewel. Plant Cell Tissue Org Cult. 2 (1995): 81–84.

Pierick RLM (1984) In vitro culture of higher plants. Department of horticulture, Agricultural University (Eds). 120p.

Porobo Dessai A, Gosukonda RM, Blay E, Dumenyo CK, Medina-Bolivar F and Prakash CS (1995) Plant regeneration of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) from leaf explants in vitro using a two-stage protocol . Scientia Horticulturae. 62: 217-224

Prakash CS et Varadarajian U (1992) Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. Plant Cell Rep 11:53–57

Salazar LF et Fuentes S (2001) Current knowledge on major virus diseases of sweetpotatoes. In: Proc. Int. Workshop Sweet potato Cultivar Decline Study. Y. Nakazawa and K. Ishiguro, eds. Kyushu Nat. Agric. Exp. Stn. Miyakonojo, Japan: 14-19

Šamaj J, Bobák M, Blehová A, Krištín J et Auxtová-Šamajová O (1995) Developmental SEM observations of an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays*. Protoplasma 186:45–49.

Šamaj J, Bobák M, Blehová A et Pretová A (2006) Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis Plant Cell Monographs . Springer Berlin / Heidelberg. 2/2006: 35-50.

Sawada H, Matsumoto M et Nishimura S (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration in ‘Tosabeni’ sweet potato. (Japanese) Bull Kochi Hortic Exp Stn 5:7–14

Scherer PA, Muller E, Lippert H et Wolff G (1988) Multielement analysis of agar and Gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellan gum-Gelrite. Acta Hortic 226: 655-658.

- Schiavone F.M. et Cooke T.J. (1985)** a geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell culture. *Can. J.Bot.* 63: 1573-1578.
- Schmidt EDL, Guzzo F, Marcel A, Toonen J et De Vries SC (1997)** A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124, 2049-2062.
- Sgorbati S, Levi M, Sparvoli F, Trezzi G et Luchini (1986)** Cytometry and flow cytometry of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained suspensions of nuclei released from fresh and fixed tissue of plants. *Physiol Plant* 68:471-476.
- Sharp WR, Söndhal MR, Caldas LS et Maraffa WR (1980)** The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural reviews*. Ed. Jules Janick. Purdue University. Avi publishing company. INC Westport, Connecticut: 268-310.
- Shimada T, Otani M, Hamada T et Kim SH (2006)** Increase of amylose content of sweetpotato starch by RNA interference of the starch branching enzyme II gene (IbSBEII). *Plant Biotechnology* 23: 85–90.
- Shimada T et Otani M. (2007)** IV.3 Sweet Potato. *Biotechnology in Agriculture and Forestry: 59 Transgenic Crops IV* (ed. by E.C. Pua and M.R. Davey) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007: 337-353.
- Shimonishi K et Karube M (1996)** Effect of auxins to somatic embryogenesis efficiency in sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.) (in Japanese). *Bull Kogoshima Nogyoshikenjo Kenkyu Hokoku.* 25:89–96.
- Shiotani I (1988)** Genomic structure and the gene flow in sweet potato and related species. In: *Exploration, maintenance and utilization of sweet potato genetic resources. Report of the First Sweet Potato Planning Conference 1987.* International Potato Center, Lima, Peru.:. 61-73.
- Sihachakr D (1982)** Premiers résultats concernant la multiplication végétative *in vitro* de la Patate douce (*Ipomoea batatas* Lam., Convolvulacées). *Agronomie Tropicale* 37:142-151
- Sihachakr D, Cavalcante-Alves J M, Tizroutine S, Allot M, Mussio I , Servaes A, Nzoghe D et Ducreux G (1994)** Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoea batatas*(L).Lam) : Caractérisation et régénération des plantes. Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris D: 251-261.
- Sihachakr D et Ducreux G (1987a).** Isolement et culture de protoplastes de deux variétés de patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.). *Can J Bot* 65 :192-197.

- Sihachakr D et Ducreux G (1987b)** Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Cell Rep* 6:326-328.
- Sihachakr D and Ducreux G (1993)** Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam). In: YPS Bajaj (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol 23, *Plant protoplasts and genetic engineering IV*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp43-59.
- Sihachakr D, Haïcour R, Cavalcante Alves JM, Umboh I, Nzoghé D, Servaes A et Ducreux G (1997)** Plant regeneration in sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Convolvulaceae). *Euphytica* 96: 143-152.
- Silva E, Marques AR, Arsénio Mendes Fialho AM, GranjaAT et Sá-Correia I (2005)** Proteins Encoded by *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 *rmlA* and *ugpG* Genes, Involved in Gellan Gum Biosynthesis, Exhibit both dTDP- and UDP-Glucose Pyrophosphorylase Activities. *Appl Environ Microbiol.* 2005 August; 71(8): 4703–4712.
- Sim SL et MJ Cardoso (2005)** Genotype specific somatic embryogenesis in sweet potato. *Proc. II Inter Symp Biotechnology of Tropical and Subtropical species. Acta Horticulturae.* 692:119-124.
- Skiredj A, Elattir H et ElFadl A (2007)** L'art de produire les legumes et les fruits au Maroc <http://www.legume-fruit-maroc.com/patate-douce.php>© www.legume-fruit-maroc.com, 2007.
- Song GQ, Honda H et Yamaguchi KI (2004)** efficient mediated transformation of Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from stem explants using a Two-step kanamycin–hygromycin selection method. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 40:359–365.
- Srisuwan S, Sihachakr D et Siljak-Yakovlev S (2006)** The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Sci* 171: 424-433.
- Steel GD et Torrie JH (1960)** Principles and procedures of statistics, with special reference to the biological sciences. McGraw-Hill Book Co, NY: 156-159.
- Suprasanna P et Bapat VA (2006)** differential gene expression during somatic embryogenesis. *Plant Cell Monographs.* Springer Berlin / Heidelberg. 2/2006 :305-320
- Talekar NS (1982)** la recherche de sources de résistance au charançon de la patate douce. In: Villareal RL, Griggs TD (eds) *Sweet potato.* (AVRDC Pub 82–172) *Proc Int Symp AVRDC* 1:157-166.
- Tan F, Li KP, Lan LQ et Zhang QT (1993)** Somatic embryogenesis and plant regeneration in sweet potato (in Chinese). *Acta Agric Sin* 19:372–376.

- Tchorbadjieva MI (2006)** Protein Markers for Somatic Embryogenesis Plant Cell Monographs. Springer Berlin / Heidelberg. 2/2006 : 215-233.
- Terry ER (1981)** Les maladies virales de la patate douce et leur élimination. In: Agence de Coopération Culturelle et Technique (ed) La Patate douce. Proc.1st Intern. Symp. Sweet potato, 23-27 mars, Taiwan: 171-177.
- Thomas C et Jiménez VM (2006)** Mode of Action of Plant Hormones and Plant Growth Regulators During Induction of Somatic Embryogenesis: Molecular Aspects. Plant Cell Monographs . Springer Berlin / Heidelberg. 2/2006 : 157-175.
- Ting YC, Kehr AE et Miller JC (1957)** A cytological study of the sweet potato plant, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and its related species. Amer. Naturalist 91:197-203
- Torres AC, Ze NM et Cantliffe DJ (2001)** Abscisic acid and osmotic induction of synchronous somatic embryo development of sweet potato. In vitro cell. Dev. Biol.plant 37:262-267.
- Tourte Y (2001)** Les Ogm - La Transgénèse Chez Les Plantes. Dunod - 05/10/2001. 144p.
- Triqui Z (1991)**. Etude de la callogenèse et de la régénération in vitro à partir de fragments de vitrosemis d'*eucalyptus camaldulensis*. Thèse d'étude supérieure de 3^{ème} cycle. 128p.
- Triqui Z, Guédira A, Chlyah A, Chlyah H, Souvannavong V, Haïcour R et Sihachakr D (2008)** Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). C. R. Biologies 331 (2008) 198–205.
- Tsai HS et Tseng MT (1979)** Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. Bot. Bull. Acad. Sinica, 20: 117-122
- Van Rheenen H. A. (1965)** flowering stimulation in sweet potato. Euphytica 14: 271-275.
- Van Rheenen H. A. (1964)** Breeding research in sweet potato, *Ipomoea batatas* Poir. Euphytica 13 (1964): 94-99.
- Verdeil J.L., Dussert S., Grosdemange F., Huet C. et Buffard-Morel J. (1994)** Multiplication végétative du cocotier par embryogénèse somatique. In: La culture in vitro de plantes tropicales. Teisson C., CIRAD, pp. 65-67.
- Von Arnold S, Izabela Sabala, Bazhkov P, Dyochok J et Filonova L (2002)** Developmental pathways of somatic embryogenesis .Plant cell tissue and organ culture 69 (3): 233-249.
- Von Arnold S (2008)** Chapter 9: Somatic Embryogenesis E. F. George et al. (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: 335–354.

- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M et Frijters A (1995)** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.
- Wakita T, Otani M, Hamada T, Mori M, Iba K et Shimada T (2001)** A tobacco microsomal ω -3 fatty acid desaturase gene increases the linolenic acid content in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Cell Reports* (2001) 20: 244–249.
- Wang JS, Sakai T, Sato M, Taura S, Sato M et Kokubu T (1997)** Production of somatic hybrid between cultivars of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. in the same cross-incompatible group. *Breed Sci* 47:135–139.
- Wang JS, Sato M, Taura S et Kokubu T (1998a)** Efficient plant regeneration from protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Mem Fac Agric Kagashima Univ* 34: 65–70.
- Wang JS, Sakai T, Sato M, Taura S et Kokubu T (1998b)** Characteristics of regenerated plant from protoplast fusions between sweet potato and its related species. *Mem Fac Agric Kagashima Univ* 34:71–76.
- Wang JS, Sato M et Taura S (1999)** High frequency plant regeneration in leaf and petiole explants cultures of sweet potato. *Mem Fac Agric Kagashima Univ* 35: 1–5.
- Wann S.R. (1988)** Somatic embryogenesis in woody species. *Horticultural reviews*. 10: 153-181.
- Water WM Jr, Collins WW et Purcell AE (1984)** Sweet potato protein. *J. Agr. Food Chem.*, 32. P : 695-699.
- Wedderburn MM (1967)** A study of hybridisation involving the sweet potato and related species *Euphytica* 16 (1967): 69-75.
- Williams JGK., Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA et Tingey SV (1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- Windels P, De Buck S et Depicker A (2008)** Chapter 12: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: patterns of T-DNA integration into the host genome. In: *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology* by Tzvi Tzfira and Vitaly Citovsky : 441-482.
- Winfield S, Lawton R, Daniell H et Dhir SK (2001)** transformation of sweet potato tissues with green-fluorescent protein gene in vitro cell. *Dev. Biol. Plant* 37:648-653.
- Yen DE (1982)** Sweet potato in historical perspective. In: Villareal RL, Griggs TD (eds) *Sweet potato*. (AVRDC Pub 82–172) *Proc Int Symp AVRDC* 1:18–27.

- Yi G, Shin YM, Choe G, Shin B, Kim YS et Kim KM (2007)** Production of herbicide-resistant sweet potato plants transformed with the bar gene. *Biotechnol Lett* (2007). 29: 669–675.
- Yonekura-Sakakibara K. et Kazuki Saito** Review: genetically modified plants for the promotion of human health. *Biotechnol Lett* (2006) 28:1983–1991.
- Yu B, Zhai H, Wang Y, Zang N, He S et Liu Q (2007)** Efficient -mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2007) 90: 265–273.
- Zhang DP, Cervantes JC, Huamàn Z, Carey EE et Ghislain M (2000)** Assessing genetic diversity of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L) Lam.] cultivars from Tropical America using AFLP. *Gene. Resour. Crop. Evol.* 47: 659–665.
- Zhang D, Rossell G, Kriegner A et Hijmans R (2004)** AFLP assessment of diversity in sweetpotato from Latin America and the Pacific region: Its implications on the dispersal of the crop. *Genetic Resources and Crop Evolution* 5: 115–120.
- Zheng Q, Dessai AP et Prakash CS (1996)** Rapid and repetitive plant regeneration in sweet potato via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 15:381-385
- Zimmerman JL (1993)** somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant cell.* 5: 1411-1423.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition du milieu de base

	Eléments	concentration (mg/l)
Macroéléments	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Microéléments	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.6
	KI	0.83
	Na ₂ MOO ₄ .2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA	37.3
Vitamines de Morel	Panthoténate de Ca	1.0
	Myo-inositol	100.0
	Acide nicotinique	1.0
	Chlorhydrate de pyridoxyne	1.0
	Thiamine (B1)	1.0
	pH	5,8
	Saccharose	30000

ANNEXE 2: composition des milieux de transformation

Milieux de culture bactériens

	Milieu 2YT		Milieu PIL	
	Milieu solide	Milieu liquide	Milieu solide	Milieu liquide
Tryptone	1,6 g	1,6 g		
Beef extract			0,5 g	0,5 g
Yeast extract	1 g	1 g	0,1 g	0,1 g
Peptone			0,5 g	0,5 g
NaCl	500 mg	500 mg		
Saccharose			0,2 g	0,2 g
Agar	1,5 g		1,5 g	
Eau	95 ml	95 ml	95 ml	95 ml
Streptomycine (mg/L)	200	200		
Rifampicine (mg/L)			50	50
Kanamycine (mg/L)	50	50	50	50
pH	7	7	5,6	5,6

Milieux de coculture et de régénération

Pour 500 ml	440	441	442	443	MS liquide (100 ml)
Macro MS	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	5 ml
Micro MS	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	1 ml
FerEDTA	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	1ml
Vit de Morel	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	0,2
Saccharose	10 g	10 g	10 g	10 g	2 g
Agar	3,5 g	3,5 g	3,5 g	3,5 g	
Kanamycine (50.10 ⁻³)		500 µl		500µl	
cefotaxime (100.10 ⁻³)		1000 µl	1000 µl	1000 µl	
2,4D (10 ⁻⁴)	10 µl	10 µl	10 µl		
Kinétine (10 ⁻⁴)	10 µl	10 µl	10 µl		

ANNEXE 3 : analyse moléculaire

Extraction d'ADN total (Kit Dneasy, Qiagen)

- 1- Prélever les feuilles (100 mg) et les conserver dans la glace.
- 2- Placer le tampon AE et les tampons présentant des précipités dans un bain-marie à 65°C.
- 3- Placer les feuilles dans les tubes Eppendorffs Safe-lock de 2 mL + 1 bille d'acier, refroidir 2 à 3 mn avec l'azote liquide, broyage au Danguomeau, 1 mn.
- 4- Ajouter 400 µL de tampon AP1 et broyer au Danguomeau, 1mn.
- 5- Centrifuger 1 mn à 5000 rpm, (centrifugeuse sigma), pour éliminer les bulles.
- 6- Ajouter 4 µl de RNase A (100 mg/L), agiter au vortex.
- 7- Mettre les Eppendorffs 10 mn au bain-marie à 65°C. Réhomogénéiser 2 ou 3 fois les tubes en les retournant.
- 8- Ajouter 130 µL de tampon AP2. mélanger et laisser 5 mn dans la glace.
- 9- Centrifuger 5 mn à vitesse maximale (15000 rpm).
- 10- Numéroter les colonnes violettes et y mettre les 530 µL d'échantillon. Centrifuger pendant 2 mn à vitesse maximale (15000 rpm).
- 11- Dans de nouveaux tubes Eppendorffs numérotés, transférer les filtrats obtenus (sans les culots présents dans les tubes 'collection').
- 12- Ajouter 0,5 volume (225 µL) de tampon AP3 et 1 volume d'éthanol absolu (450 µL). Mélanger (en pipétant en aller et retour) la solution.
- 13- Mettre 650 µL du mélange obtenu sur les colonnes DNeasy (blanches) numérotées.
- 14- Centrifuger 1 mn à 8000 rpm. Jeter le filtrat.
- 15- Répéter l'étape précédente avec ce qui reste du mélange.
- 16- Placer les colonnes DNeasy sur de nouveaux tubes collection numérotées.
- 17- Ajouter 500 µL de tampon AW et Centrifuger 1 mn à 8000 rpm. Jeter le filtrat et garder le tube 'collection'.
- 18- Ajouter à nouveau 500 µL de tampon AW sur la colonne DNeasy. Centrifuger 2 mn à vitesse maximale (15000 rpm). Jeter le filtrat et le tube 'collection'.
- 19- Placer les colonnes DNeasy sur de nouveaux tubes Eppendorffs (tubes définitifs).
- 20- Pipeter 100 µL de tampon AE et les passer directement sur la colonne. Incuber 5 mn à température ambiante. Puis centrifuger 1 mn à 8000 rpm.
- 21- Placer les colonnes sur de nouveaux Eppendorffs numérotés pour la deuxième élution : répéter l'étape précédente avec 100 µL de tampon AE et Centrifuger 1 mn à 8000 rpm.

Tampon TBE (10 x)

Tris 0.9 M	108 g
Acide borique	55 g
EDTA 0,5 M pH 8 (solution mère)	40 mL
Eau distillée	qsp 1000 mL

Tampon de charge

EDTA 1 M pH 8 (solution mère)	1 mL
Ficoll 15 % (m/v)	1.5 g
Bleu de bromophénol 0,2 % (m/v)	20 mg
Tampon TBE	qsp 10 mL

Nom et Prénom de l'auteur : Zine el abidine TRJQUJ

*Etablissement : Université Mohammed V – Agdal/ Faculté des Sciences
Rabat*

Résumé

Cette étude vise à développer l'embryogenèse somatique et un protocole de transformation génétique chez la patate douce. L'induction embryogène dépend du génotype, de l'agent gélifiant, de l'auxine et de leur interaction. Les cv. Zho et 865 ont donné la meilleure réponse dans l'agar, avec respectivement 10,7 et 14,7 % de cals embryogènes en présence de 2,4,5T et Piclorame. Des cals embryogènes émergent d'une masse mucilagineuse formée à partir de culture de bourgeons axillaires. La capacité embryogène des cals de Zho et 865 est maintenue par des repiquages dans 2,4,5-T(5 μ M) ou 2,4-D (10 μ M) + BAP (1 μ M). Les suspensions cellulaires embryogènes ont été initiées à partir de cals embryogènes en milieu liquide (5 μ M de 2,4-D). Des séquences de milieux (prématuration, maturation et germination + l'acide abscissique) ont été efficaces pour la régénération. Les plantes régénérées sont hexaploïdes (6x), identiques aux témoins. Des plantes transgéniques obtenues expriment les gènes GUS et nptII.

Mots clés : *Ipomoea batatas* L.(Lam) - embryogenèse somatique- suspensions cellulaires – régénération – niveau de ploïdie – transformation génétique