

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. CONTEXTE ET OBJECTIFS	1
2. ETAT DES CONNAISSANCES	5
2.1. L'embryogenèse somatique	5
2.1.1. Définition	5
2.1.2. Facteurs clés de l'embryogenèse somatique	5
2.1.3. Multiplication végétative par embryogenèse somatique en masse. Principe et état de la technique	8
2.1.4. Semences artificielles	11
2.2. Le caféier	12
2.2.1. Stratégies d'amélioration génétique des caféiers	12
2.2.2. La multiplication végétative des caféiers	17
MATERIEL ET METHODES	22
1. MATERIEL VEGETAL	22
1.1. Description des génotypes étudiés	22
1.2. Les souches cellulaires embryogènes	23
2. METHODES DE CULTURE	24
2.1. Milieux de culture	24
2.2. Conditions expérimentales de culture	25
2.3. Culture en bioréacteur	25
2.4. Culture de microboutures	26
3. OBTENTION DES DIFFERENTES CULTURES	26
3.1. Initiation de souches cellulaires embryogènes	26
3.2. Multiplication des souches cellulaires embryogènes	28
3.3. Expression de l'embryogenèse	28
3.4. Développement des embryons	29
3.5. Transfert en conditions <i>ex-vitro</i>	30

4. METHODES D'ANALYSE	30
4.1. Variables mesurées	30
4.2. Variables mesurées en bioréacteur.....	32
4.3. Dosage des sucres dans les milieux de culture.....	33
5. EXAMENS HISTOLOGIQUES	33
6. ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES	33
6.1. Détermination de la teneur en caféine	33
6.1.1. Techniques d'extraction	34
6.1.2. Dosage de la caféine.....	34
6.2. Analyse chromatographique de divers milieux.....	34
7. CYTOMETRIE DE FLUX	35
7.1. Matériel.....	35
7.2. Méthode	35
8. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	36
RESULTATS ET DISCUSSION	37
1. APTITUDE A L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE DIFFERENTS GENOTYPES DE CAFEIER	37
1.1. Introduction	37
1.2. Résultats	37
1.2.1. Phase de callogenèse	37
1.2.2. Phase d'embryogenèse	40
1.3. Discussion.....	45
2. PHASE DE MULTIPLICATION DES SOUCHES EMBRYOGENES	47
2.1. Cinétique de croissance de la souche <i>C. canephora</i> R2 au cours de la phase de multiplication	47
2.2. Description des souches embryogènes <i>C. canephora</i> R2 et Arabusta 1312-2 en phase de multiplication.....	49
2.2.1. Caractéristiques morphologiques	49

2.2.2. Caractéristiques histologiques.....	49
2.3. Discussion.....	52
2.4. Evolution du potentiel embryogène des souches <i>C. canephora</i> et Arabusta	53
3. ETUDE DES CONDITIONS D'EXPRESSION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE.....	57
3.1. Effet de la densité d'inoculation cellulaire sur l'embryogenèse somatique.....	57
3.1.1. Souche <i>C. canephora</i>	57
3.1.2. Souche Arabusta	59
3.2. Effet du renouvellement du milieu de culture sur la production d'embryons inoculée à différentes densités.....	66
3.2.1 Souche <i>C. canephora</i>	66
3.2.2. Souche Arabusta	68
3.3. Influence de la composition du milieu de culture sur l'embryogenèse somatique.....	72
3.3.1. Influence de 4 milieux sur l'expression embryogène de la souche Arabusta	72
3.3.2. Effet de la concentration du BAP sur la production d'embryons somatiques de caféier Arabusta.....	74
3.3.3. Effet de l'adénine sur la production d'embryons somatiques de caféier Arabusta.....	78
3.3.4. Recherche d'une concentration optimale d'adénine pour la production d'embryons somatiques de caféier Arabusta.....	79
3.4. Discussion.....	81
3.5. Etude histologique de l'embryogenèse somatique du caféier.....	84
3.5.1. Etude des événements conduisant à l'embryogenèse.....	84
3.5.2. Etude de l'inhibition de l'expression embryogène.....	85
3.5.3. Discussion.....	85
4. PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES DE CAFEIER EN BIOREACTEUR.....	88
4.1. Introduction	88
4.2. Essai préliminaire d'embryogenèse somatique de <i>C. canephora</i> en bioréacteur.....	88
4.3. Effet de l'aération sur l'embryogenèse somatique du caféier en bioréacteur.....	90
4.4. Cinétique d'embryogenèse de <i>C. canephora</i> en bioréacteur.....	92
4.5. Cinétique d'embryogenèse du caféier Arabusta en bioréacteur	94

4.6. Discussion	97
5. ETUDE DU DETERMINISME DE L'INHIBITION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE	99
5.1. Introduction	99
5.2. Mise en évidence de substances inhibitrices dans le milieu de culture.	99
5.2.1. Obtention du milieu conditionné inhibiteur (MCI)	99
5.2.2. Test du pouvoir inhibiteur d'un milieu conditionné	99
Résultats.....	100
5.2.3. Suppression du pouvoir inhibiteur du MCI par traitement au charbon actif	102
Résultats.....	102
5.3. Essais de purification des composés inhibiteurs du MCI	104
5.3.1. Essais de fractionnement d'un milieu conditionné par dialyse.....	104
5.4. Essais de purification des composés inhibiteurs par absorption sur une colonne C-18	112
5.4.1. Mode opératoire.....	112
5.4.2. Effet du procédé de fractionnement	113
5.4.3. Purification des molécules inhibitrices du MCI de la souche <i>C. canephora</i> sur colonne C-18	114
5.4.4. Purification des molécules inhibitrices du MCI de la souche Arabusta sur colonne C-18.....	116
5.4.5. Purification à 4°C des molécules inhibitrices de MCI sur colonne C-18 (souches <i>C. canephora</i> R2 et Arabusta)	118
Résultats	118
5.4.6. Analyse chromatographique des MCI des souches de <i>C. canephora</i> et Arabusta	120
5.5. Essais préliminaires d'identification des molécules impliquées dans l'inhibition de l'embryogenèse	123
5.5.1. Effet des quelques acides phénols et organiques sur l'embryogenèse.....	123
Résultats	123
5.6. Discussion	123
6. DEVELOPPEMENT DES EMBRYONS SOMATIQUES ET SEVRAGE DES PLANTULES OBTENUES	128
6.1. Etude de diverses conditions de culture sur le rendement de conversion des embryons somatiques	128
6.1.1. Introduction	128
6.1.2. Influence des régulateurs de croissance et des substrats sur le développement d'embryons somatiques.....	129

Résultats	129
6.1.3. Effet de la concentration en BAP sur le développement des embryons somatiques	131
6.1.4. Effet de la durée d'application de la BAP sur le développement des embryons somatiques	131
6.1.5. Influence de la nature et de la concentration du substrat gélifiant sur le développement des embryons somatiques.....	133
Résultats	135
6.1.6. Influence de l'isolement des embryons lors de leur transfert sur milieu semi-solide	137
6.1.7. Etude préliminaire du rendement de conversion des embryons somatiques d'Arabusta.....	139
6.1.8. Description du développement des embryons somatiques de <i>C. canephora</i>	139
6.2. Acclimatation des plantules aux conditions <i>ex-vitro</i>	140
Comparaison de deux méthodes de sevrage.....	142
6.3. Discussion.....	144
 7. ETUDE PRELIMINAIRE SUR LA CONFORMITE DE PLANTES REGENEREES PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE.....	147
7.1. Introduction	147
7.2. Analyse du niveau de ploïdie par cytométrie de flux.....	148
7.3. Teneur en caféine des plantes régénérées par embryogenèse somatique.....	150
7.4. Discussion.....	153
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	155
CONCLUSIONS	155
PERSPECTIVES	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162
LISTE DES PUBLICATIONS	177
ANNEXES.....	178
LISTE DES ILLUSTRATIONS	186
LISTE DES TABLEAUX	186
LISTE DES FIGURES.....	188

RESUME

Etude et développement de l'embryogenèse somatique en milieu liquide du caféier
(*Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. et l'hybride Arabusta)

L'étude et le développement d'une méthode de multiplication végétative du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide sont décrits. Ce procédé est basé sur l'obtention d'agrégats cellulaires à potentiel embryogène et leur orientation soit vers l'embryogenèse somatique soit vers la multiplication cellulaire de type indifférencié pour le maintien des cultures. L'aptitude à l'embryogenèse somatique de divers génotypes de *C. arabica*, de *C. canephora* et d'Arabusta est déterminée. Une forte interaction génotype / milieu de culture a été mise en évidence pour l'embryogenèse sur milieu semi-solide. L'expression de l'embryogenèse en milieu liquide est très dépendante de la densité d'inoculation utilisée. De faibles densités d'inoculation (0,5 g MF.l⁻¹) s'avèrent optimales pour la production et le développement d'embryons, alors que des densités d'inoculation élevées inhibent fortement l'embryogenèse. Il a été montré que ce phénomène est dû à un autoantagonisme cellulaire. L'étude de ce phénomène a révélé l'existence dans le milieu de composés extracellulaires à caractère partiellement hydrophobe de poids moléculaire inférieur à 1000 qui inhibent l'embryogenèse somatique du caféier.

L'optimisation de la production d'embryons est décrite. L'importance du renouvellement du milieu, de la benzylaminopurine et de l'adénine est montrée. L'évolution de l'embryogenèse somatique en milieu liquide est décrite grâce à une étude histologique. La faisabilité du "scaling-up" de la production d'embryons en bioréacteur est démontrée. L'optimisation des conditions de culture en bioréacteur a permis d'atteindre des productivités de l'ordre de 5700 et 11000 embryons par litre et par jour, respectivement, pour *C. canephora* et Arabusta. Le développement d'un protocole pour la conversion des embryons somatiques en plantules et leur transfert en conditions *ex-vitro* est décrit, conduisant à un taux de réussite final supérieur à 60 %.

Une étude préliminaire de la conformité des plantes régénérées a montré que le niveau de ploïdie, la teneur en caféine et la morphologie de jeunes plantes ne sont pas modifiés. La production massive d'embryons somatiques et de plantules de caféier peut maintenant être appliquée pour valoriser des génotypes hétérozygotes et accélérer la diffusion de variétés améliorées.

Mots-clés : caféier, *Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L., Arabusta, multiplication végétative, suspension cellulaire embryogène, production d'embryons somatiques, autoinhibition