

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE DOUALA



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace- Work- Fatherland

THE UNIVERSITY OF DOUALA

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
ET APPLIQUEES**

UNITE DE FORMATION DOCTORALE DE CHIMIE-BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

**Potentiel callogène et embryogène de trois
génotypes de *Theobroma cacao*. L**

**Mémoire présenté et soutenu en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies
(DEA) de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

Par:

BAHOYA Joseph Aimé Lauryn

Matricule : 07A0610

Maître ès Sciences

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Sous la Direction de:

Dr MINYAKA Emile

Chargé de Cours

Année académique 2011-2012

TABLE DES MATIERES

	Pages
TABLE DES MATIERES.....	i
DEDICACE.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
ABREVIATIONS.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
GLOSSAIRE.....	x
RESUME.....	.xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : Revue de la littérature.....	4
I. Généralités sur le cacaoyer.....	5
I.1. Origine et répartition géographique du cacao dans le monde.....	5
I.2. Biologie du cacaoyer.....	8
I.3. Groupes de cacaoyers.....	9
I.3.1. Le Criollo.....	9
I.3.2. Le Forastero.....	9
I.3.3. Le Trinitario.....	10
I.4. Importance économique du cacao.....	11
I.5. Importance de la cacaoculture au Cameroun.....	12
I.6. Culture du cacao au Cameroun.....	13
I.7. Contraintes liées à la culture du cacaoyer.....	13
I.7.1. Problèmes phytopathologiques.....	13
I.7.1.1. Balai de sorcière.....	14
I.7.1.2. Pourriture brune des cabosses.....	14
I.7.1.3. Swollen Shoot.....	14
I.8. Amélioration de la culture du cacaoyer.....	15
I.8.1. Amélioration par sélection.....	15
I.8.1.1. Sélection massale.....	15
I.8.1.2. Sélection clonale ou végétative.....	15
I.8.1.3. Sélection par hybridation.....	16

I.8.1.4. Sélection assistée par les marqueurs moléculaires.....	16
I.8.2. Amélioration par les méthodes biotechnologiques.....	16
I.8.2.1. Bouturage.....	17
I.8.2.2. Embryogenèse somatique.....	17
I.8.2.3. Embryogenèse somatique chez le cacaoyer.....	20
CHAPITRE II Matériel et méthodes.....	21
II.1. Culture <i>in vitro</i>	22
II.1.1. Matériel végétal.....	22
II.1.2. Aseptisation des boutons floraux.....	22
II.1.3. Ensemencement.....	22
II.1.4 Préparation des milieux de culture.	23
II.1.5 Suivi des cultures	24
II.2. Analyses biochimiques.....	25
II.2.1. Extraction et dosage des protéines solubles.....	25
II.2.2. Dosage de la cystéine libre	26
II.3. Analyse statistique.....	27
CHAPITRE III Résultats et discussion.....	28
III.1. Résultats.....	29
III.1.1. Culture <i>in vitro</i>	29
III.1.1.1. Callogenèse.....	29
III.1.1.2. Rhizogenèse.....	30
III.1.1.3. Embryogenèse.....	31
III.1.2. Analyses biochimiques.....	32
III.1.2.1. Teneur en protéines solubles.....	32
III.1.2.2. Teneur en cystéine libre.....	33
III.2. Discussion.....	34
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	37
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	39
ANNEXES.....	a

DEDICACE

A ma sœur jumelle Rachel

A mes parents

A papa Emmanuel et tonton Jacques

Que Dieu vous accorde longue vie.

REMERCIEMENTS

Par ces quelques lignes, je remercie toutes les personnes qui de près ou de loin, ont participé au bon déroulement de ce travail. Je leur suis infiniment redevable.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur **Emile MINYAKA** pour avoir dirigé ce travail malgré ses multiples occupations. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir emmené sur le chemin de la recherche.

Je remercie le Professeur **Anne Rosalie NGONO NGANE**, Chef de laboratoire et Chef de Département de Biochimie, pour avoir permis la réalisation de ce travail.

Merci au Professeur **Nicolas NIEMENAK** pour avoir accepté la réalisation des analyses biochimiques au Laboratoire de Biochimie et Physiologie Végétale de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé.

Mes remerciements vont également aux membres du Jury qui ont accepté la lourde tâche d'éplucher ce manuscrit de mémoire. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance pour le temps qu'ils lui auront accordé.

Un merci particulier au Professeur **Inocent GOUADO** (ex Chef de Département de Biochimie), pour son encadrement durant ces deux années de Master.

Je tiens à remercier tous les enseignants du Département de Biochimie pour leur participation à ma formation, en particulier le Docteur **Martin Luther KOANGA MOGTOMO** pour ses critiques mille fois renouvelées qui ont permis d'améliorer ma rédaction scientifique.

Merci à **Joseph** mon « frère » et à **Magali** ma « sœur » de mémoire. Votre esprit d'équipe m'a réconforté et m'a permis de corriger mes erreurs lors des séances pratiques au laboratoire. Sans vous, ce travail n'aurait un sens.

Je remercie sincèrement mes aînés et camarades de laboratoire notamment **Fabrice, Moïse, Désiré, Judith, Sandrine, Félicité, Joël, Vanessa, Odette Verra, Landry** pour vos multiples conseils et ces moments d'enthousiasme que nous avons passé ensemble.

Merci également à tous mes camarades de Master II, première promotion de la filière Biologie Moléculaire et Cellulaire pour le soutien sans faille que vous m'avez apporté durant ces années d'étude.

Merci à mon ami **Elisée Libert EMBOLO ENYEGUE** pour ton amitié qui m'est plus que précieuse et tes encouragements. Tu es pour moi un frère.

Enfin, je terminerai ces remerciements en témoignant ma reconnaissance à ma famille, plus précisément à mon oncle **Emmanuel HAGBE BAHOYA** pour l'aide qu'il m'a apportée toutes ces longues années d'étude, sans toutefois oublier **Jacques BOUGHA HAGBE** pour son financement à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIA	Acide β indole acétique
ASTS	Académie des Sciences et Techniques du Sénégal
CB	Cals blanchâtres
CE	Cals embryogènes
CN	Cals nécrosés
CR	Cals rhizogènes
CRD	Cals rhizogènes développés
CTA	Centre Technique de Coopération Agricole et Rural
CTB	Agence belge de développement
DKW	Driver and Kuniyuki Walnut medium
DTT	1,4-dithiotréitol
ES	Embryon somatique
ICCO	Organisation internationale pour le café et le cacao
ICGS	International Cocoa genome sequencing consortium
ICS	International College Selection
IRAD	Institut de Recherche Agricole pour le Développement
LEA	Late embryogenesis abundant proteins
MF	Matière fraîche

MINADER	Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural
MINCOMMERCE	Ministère du commerce
MINRESI	Ministère de la Recherche Scientifique et de l’Innovation
MS	Milieu minéral de Murashige et Skoog
ONCC	Office national du café et cacao
OriGIn	Organisation pour un réseau international des indications géographiques
Pb	Paire de base
PIB	Produit intérieur brut
PNUD	Programme des Nations unies pour le Développement
PNUE	Programme des nations unies pour l’environnement
QTL	Quantitative Trait Locus
RAPD	Amplification aléatoire de l’ADN polymorphe
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SAB	Sérum-albumine bovine
SERK	somatic embryogenesis receptor kinase
SNK	Sélection de la station de Nkoemvone, Cameroun
TDZ	Thidiazuron (1-phényl-3-(1, 2, 3 thiadiazol-5-yl))
UF	Sélection de la United Fruit, Costa Rica
UPA	Sélection Upper Amazon (Forastero haut amazonien)
WPM	Woody plant medim

Liste des tableaux

Tableau 1 : Production de fèves de cacao dans le monde en milliers de tonnes (année cacaoyère 2009/2010).....	11
Tableau 2 : Pourcentages moyens d'explants callogènes (staminodes et pétales) après 14 jours de culture pour cinq séries d'ensemencement.....	29
Tableau 3 : Pourcentages d'explants rhizogènes après 41 jours de culture pour cinq ensemencements.....	31
Tableau 4 : Pourcentages d'explants embryogènes (staminodes et pétales) chez <i>T. cacao</i> ...	32

Liste des figures

Figure 1 : Premiers pays producteurs de cacao en pourcentage du volume mondial total (2010).....	5
Figure 2 : Carte cacaoyère administrative et voies d'évacuation du Cameroun.....	7
Figure 3 : Répartition géographique des groupes de cacao dans le monde.....	10
Figure 4 : Fleurs matures et boutons floraux immatures de <i>Theobroma cacao</i> L.....	22
Figure 5 : Etapes de formation d'embryons somatiques à partir des pièces florales chez <i>T.cacao</i>	24
Figure 6 : Structure chimique du Bleu brillant de Coomassie G-250.....	25
Figure 7 : Réaction générale des acides aminés avec la ninhydrine.....	26
Figure 8 : Variation du volume des explants en culture sur milieu d'induction primaire de callogenèse.....	30
Figure 9: Rhizogenèse après 41 jours de culture.....	31
Figure 10 : Embryons somatiques.....	32
Figure 11 : Teneur en protéines totales ($\mu\text{g/g}$ de MF).....	33
Figure 12 : Teneur en cystéine ($\mu\text{g/g}$ de MF).....	34

Glossaire

Allogamie : Mode de reproduction caractérisé par l'union sexuée de deux gamètes produits par deux individus différents.

Callogenèse : Formation de cals en culture *in vitro*.

Cals : Amas de cellules indifférenciées résultant de la différenciation cellulaire des tissus végétaux.

Cyme : Inflorescence au mode de croissance définie de type sympodiale. On distingue les cymes multipares, bipares et unipares.

Dioïque : Une plante dioïque a ses fleurs mâles et femelles portées par des pieds différents.

Embryogenèse : Développement embryonnaire caractérisé par une différenciation cellulaire

Embryon : Structure morphogénétique dont le développement aboutit à la formation d'une plantule

Epigénétique : Ensemble de modifications réversibles et transmissibles de l'expression des gènes qui n'affectent pas la séquence de l'ADN mais l'organisation chromatinienne, et donc l'accessibilité aux facteurs de régulation génique.

Fécondation entomophile : Rencontre des gamètes mâles et femelles des fleurs effectuée par les insectes.

Génotype : Ensemble des allèles d'un gène que possède un individu

Hétérosis ou vigueur hybride : Augmentation des capacités et ou vigueur d'un hybride par rapport aux races, lignées, dont il est originaire.

Hétérozygote : Individu porteur pour un même gène, deux allèles différents situés au même locus. Cet individu est instable dans sa descendance, non de race pure, donnant lieu à des disjonctions des caractères génétiques.

Hybride: Plante issue d'un croisement entre deux individus différents par un ou plusieurs caractères fixes. Les hybrides d'un même croisement constituent une «famille hybride».

Inflorescence : Mode de groupement des fleurs d'une plante ou groupe de fleurs.

Méristème : Partie d'une plante formé de cellules aptes à se diviser. De ces divisions naissent les tissus définitifs (racine, tige, bourgeon, fleur...).

Méristème caulinaire : Méristème qui va générer la partie aérienne de la plante.

Orthotrope: Caractère de la croissance d'une pousse selon une orientation verticale.

Pétales : Pièces florales dont l'ensemble constitue la corole.

Phénologie : Etude du rôle joué par le climat dans les phénomènes biochimiques, physiologiques et moléculaires liés aux saisons.

Plagiotrope: Caractère de la croissance d'une pousse selon une orientation horizontale.

Staminode : Etamine stérile et parfois sans anthère ou vestige d'étamine, généralement de taille réduite, présente dans une fleur pistillée.

Résumé

Dans le programme d'amélioration par la technique de multiplication par embryogenèse somatique, le choix du génotype dépend principalement de son aptitude à la culture *in vitro*. Celle-ci réside dans sa capacité à produire les cals et les embryons somatiques. Dans ce travail, trois génotypes de cacaoyer (*Theobroma cacao*. L) d'une plantation paysanne étiquetés génotype 1, génotype 2 et génotype 3 ont été évalués pour leur potentiel callogène, rhizogène et embryogène. Les teneurs en protéines et en cystéine libre dans les différentes structures morphogénétiques obtenues après 91 jours de culture *in vitro* ont également été évaluées. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence un effet génotype et explant très marqués dans la production des cals et la différenciation des embryons somatiques. Des pourcentages très élevés d'explants callogènes ($89,93 \% \pm 5,50$ pour les staminodes et $82,87 \% \pm 4,50$ pour les pétales) ont été obtenus avec le génotype 2. Ce dernier a présenté des taux moyens d'explants embryogènes et rhizogènes appréciables par rapport aux autres génotypes qui n'ont pas différencié des embryons somatiques. Par ailleurs, les staminodes et les pétales ont présenté des réponses embryogènes significativement différentes pour ce même génotype ($P < 0,05$). Ces résultats dégagent l'influence du génotype et du type d'explant sur l'aptitude callogène et embryogène du cacaoyer. En outre, l'analyse quantitative des protéines et de la cystéine libre dans les structures morphogénétiques obtenues a été conduite. Une corrélation positive ($r=0,30$; $p < 0,05$) entre teneur en protéine et teneur en cystéine libre a été observée dans ces structures. Ces teneurs ont été très élevées dans les embryons somatiques ($1063,29 \pm 74,88$ et $8355,82 \pm 92,57$ $\mu\text{g/g}$ de MF respectivement) par rapport aux autres structures. Une très faible teneur en protéine et en cystéine s'est observée dans les cals embryogènes ($90,20 \pm 67,26$ et $1021,90 \pm 17,61$ $\mu\text{g/g}$ de MF respectivement). Ces faibles teneurs seraient à l'origine des modifications génétiques et épigénétiques qui s'effectueraient au cours de la différenciation des embryons somatiques.

Mots clés : *Theobroma cacao*, embryogenèse somatique, call, génotype.

Abstract

The improvement of the multiplication technique somatic embryogenesis, the choice of the genotype depends primarily on its ability to be cultured in vitro. It relies in its ability to produce callus and somatic embryos. In this work, three cocoa genotypes (*Theobroma cacao*. L.) of a peasant plantation labeled genotype 1, genotype 2 and genotype 3 were evaluated for their callogenic, rhizogenic and embryogenic potential. Protein and free cysteine contents in different morphogenetic structures obtained after 91 days of in vitro culture were also evaluated. These results highlight marked genotype and explant effect in the production of callus and the differentiation of somatic embryos. Very high percentages of explants callogenes ($89.93 \% \pm 5.50$ for staminodes and $82.87 \pm 4.50 \%$ for the petals) were obtained with genotype 2. The latter presented average rates of explants embryogenes as well as rhizogenes compared to other genotypes. However, staminodes and petals presented significantly different embryogenic responses for the same genotype ($p < 0.05$). These results reveal the influence of genotype and the type of explant on the callogenic and embryogenic potentials of cocoa. In addition, quantitative analysis of proteins and free cysteine in whitish callus, rhizogene callus, developed rhizogene callus, embryogenic callus, necrosis callus and somatic embryos was conducted. A positive correlation ($r = 0.30$; $p < 0.05$) between protein and free cysteine content was observed in different morphogenetic structures. These levels were very high in somatic embryos (1063.29 ± 74.88 et $8355.82 \pm 92.57 \mu\text{g/g}$ of FM respectively) compared to other structures. A very low protein and cysteine was observed in embryogenic callus (90.20 ± 67.26 and $1021.90 \pm 17.61 \mu\text{g/g}$ of FM respectively). These low levels are due to the genetic and epigenetic changes that occur during somatic embryo differentiation.

Keywords: *Theobroma cacao*, callus, somatic embryogenesis, genotype.

INTRODUCTION

Le cacaoyer, *Theobroma cacao* L., est une plante originaire d'Amérique Centrale et du Sud (**Janny et al., 2003**). Cette plante aux multiples vertus est principalement cultivée dans les pays en voie de développement (**CTB, 2011**). Les fèves de cacao présentent des intérêts nutritionnels, thérapeutiques et cosmétiques et constituent ainsi la principale matière première des industries chocolatières. Le beurre de cacao est largement utilisé en industrie cosmétique, dans la synthèse du savon et du détergent (**ONCC, CTA, OriGIn, 2010**). Près de 40 millions de personnes dans le monde dépendent de la culture du cacao pour vivre. Environ 3,5 millions de tonnes de cacao sont produites chaque année. L'Afrique représente environ 68,4 % de la production mondiale, la Côte d'Ivoire et le Cameroun étant respectivement le premier et le cinquième producteur mondial. Les industriels estiment que la production devrait dépasser 4,5 millions de tonnes d'ici 2020 afin de satisfaire la demande (**FairTrad/Max Havelaare, 2011**).

Le cacao constitue l'une des principales cultures de rente du Cameroun. La production nationale a atteint 218 000 tonnes en 2011 pour un verger de 400 000 ha. Près de 400 000 familles camerounaises tirent l'essentiel de leurs revenus du cacao. Ces revenus sont estimés à plus de 100 milliards de francs CFA (**ONCC, 2007**).

En ce début du 21^e siècle, la production mondiale du cacao (environ 4 millions de tonnes en 2012) suit avec peine sa demande. Ceci est dû au fait qu'en milieu paysan, la culture du cacao est affectée par les aléas parasites, le vieillissement des vergers, le coût élevé des intrants, l'indisponibilité et la sous-utilisation du matériel végétal amélioré. Ainsi, dans la projection de l'augmentation de la production nationale, il faut impérativement renouveler, rajeunir ou créer de nouvelles plantations en utilisant un matériel végétal élite (**Sonwa, 2002**).

Des schémas de distribution classique de matériel végétal tels que le bouturage et le greffage ont été proposés. Ces schémas ont demeuré inefficients (**Figueira et Janick, 1993**) à cause du mauvais système racinaire et aérien des plantes qui en sont issues auquel est associée la lenteur des procédés. La technique de sélection générative aboutissant à la production d'hybrides est pratiquée dans les stations de recherche pour la distribution du matériel végétal auprès des cacaoculteurs. Cette technique reste la plus courante dans les pays producteurs. Cependant les hybrides actuellement utilisés sont issus des parents généralement hétérogènes. Le cacaoyer étant allogame (**Michelli, 2009**), l'on assiste à une perte de caractères agronomiques recherchés d'où la nécessité d'une technique de multiplication végétative efficiente des géotypes élités. L'embryogenèse somatique du cacaoyer a été étudiée par différentes équipes de recherche. Cette méthode de multiplication *in vitro* offre l'avantage de

produire en masse tout en assurant la stabilité et l'intégrité génétique (**Maximova et al., 2002 ; Quainoo et Dwomo 2012**). Cependant, de nombreux génotypes restent récalcitrants face à la régénération par embryogenèse somatique. Trois facteurs principaux influencent la réponse embryogène chez le cacaoyer : le génotype, le type d'explant et la composition du milieu de culture (**Issali et al., 2010**). Pour le facteur génotype, la différenciation des embryons est la résultante des processus moléculaires desquels émanent les réponses biochimiques qui gouvernent l'embryogenèse végétale (**Galland, 2001**). Les travaux de **Minyaka et al (2007)** ont révélé que l'assimilation du soufre présent dans le milieu de culture serait impliquée dans le développement embryonnaire. Autrement dit, le soufre organique, jouerait un rôle certain dans la réponse embryogène chez de nombreux génotypes.

Le présent travail a comme objectif général la production en masse du matériel végétal amélioré pour la distribution auprès des cacaoculteurs. De manière spécifique, il s'agira :

- D'évaluer l'aptitude callogène et embryogène de trois génotypes de cacaoyer d'une plantation paysanne.
- De quantifier les protéines solubles et cystéine libre dans les différentes structures morphogénétiques obtenues en culture *in vitro*.

Chapitre I

Revue de la littérature

I. GENERALITES SUR LE CACAOYER

I.1. Origine et répartition géographique du cacao

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) a été découvert à l'an 600 de notre ère (**Mebenga, 2002**). Cette plante aux multiples vertus est domestiquée pour la première fois par les indiens Mayas, puis les Aztèques du continent américain (**Janny et al., 2003**). Ces derniers utilisaient les fèves de cacao dans la fabrication de boissons reconstituantes, fortifiantes et aphrodisiaques (**Hébert, 1999**). Les fèves de cacao étaient également utilisées comme monnaie d'échange avant la conquête du Mexique par les espagnols au XVI^e siècle. Le cacao domestiqué par les Mayas provenait des cacaoyers sauvages des forêts du bassin amazonien au pied des Andes, à la frontière de l'Equateur avec la Colombie (**Micheli, 2009**). Avec l'expansion rapide du marché européen au XVII^e siècle, la culture du cacao s'est étendue dans la plupart des îles des Caraïbes et par la suite au Venezuela et en Colombie (**Janny et al., 2003**). La consommation du cacao, sous forme de boisson débute en Europe dans les années 1523 grâce aux colons espagnols. Dès lors, les Anglais, les Français, les Hollandais et les Portugais introduisirent la cacaoculture dans leurs colonies. De nouvelles plantations naissent au XVIII^e siècle au Brésil, dans le Sud-est asiatique et en Afrique (**Hébert, 1999**). Ce n'est qu'en 1886 que la culture du cacao est introduite au Cameroun, à Victoria (Limbé actuel) grâce aux missionnaires allemands (**Assoumou, 1977**). En ce début du XXI^e siècle le cacao est cultivé dans quatre continents: l'Afrique, l'Amérique, l'Asie et l'Océanie (Tableau 1). En Afrique (principal producteur du cacao), les principaux pays producteurs sont la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Nigeria et le Cameroun (Fig. 1).

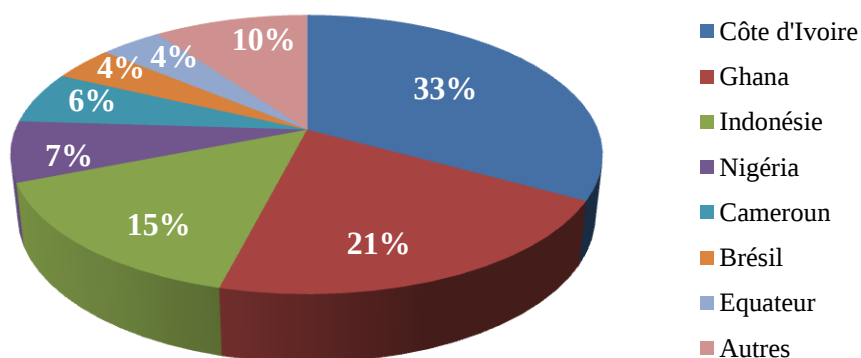


Fig.1. Premiers pays producteurs de cacao en pourcentage du volume mondial total, 2010 (**CTB, 2011**).

Dans notre pays, le cacao est cultivé dans sept des dix régions que compte le Cameroun (Centre, Sud, Est, Littoral, Ouest, Nord-Ouest et Sud-ouest). On distingue ainsi deux grands bassins de production qui se sont ensuite différenciés selon les systèmes de culture (**Assoumou 1977**). Il s'agit du bassin de la zone forestière littorale (dans la région du Sud-ouest) et du bassin de la zone forestière centrale (dans les régions du Centre et du Sud). Kumba dans la région du Sud-ouest est connu comme le plus grand centre commercial de cacao dans la région d'Afrique centrale (**ONCC, CTA, OriGIn, 2010**) (Fig. 2).

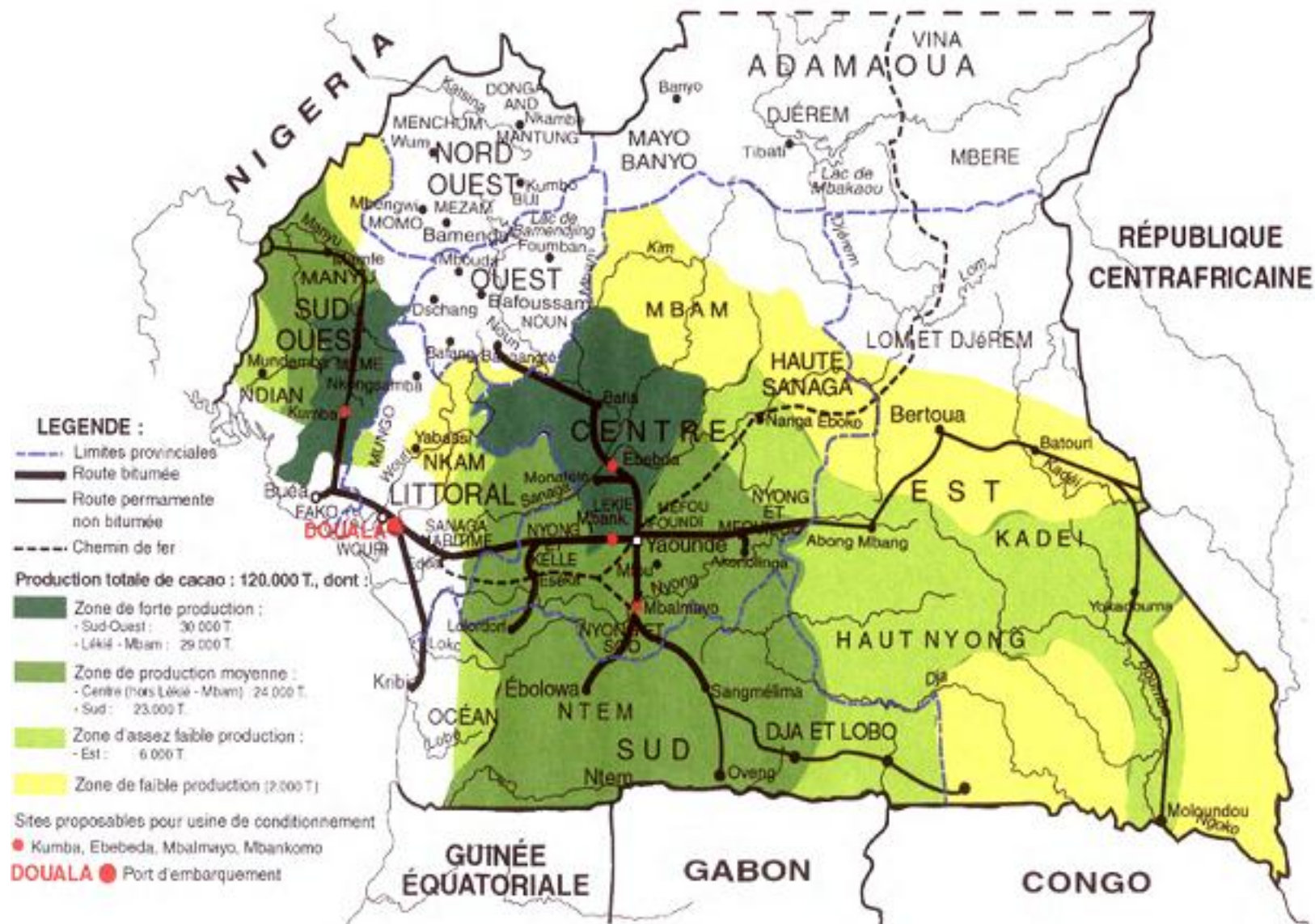


Fig. 2. Carte cacaoyère administrative et voies d'évacuation du Cameroun (ONCC, 2007).

I.2. Biologie du cacaoyer

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une plante pérenne. Selon la nomenclature du naturaliste suédois Carl von Linné, *Theobroma cacao* vient de deux mots grecs : *theos* qui signifie dieux et *broma* qui signifie aliment, soit “Nourriture des dieux”. Le cacaoyer appartient au règne des *Plantae*, de la superdivision des *Spermaphyta* (plante à graines), la division des *Magnoliophyta* (plantes à fleurs), classe des *Magnoliopsida* (dicotylédones), ordre des *Malvales*. Cette plante a d’abord été classée dans la famille des *Sterculiaceae* (Cuatrecasas, 1964). Les études phylogénétiques ont permis de revoir cette classification. Aujourd’hui *T. cacao* est classé dans la famille des *Malvaceae*, au genre *Theobroma* qui compte 22 espèces dont *Theobroma cacao* L. (Alverson et al., 1999 ; Whitlock, 2001).

T. cacao est diploïde ($2n = 20$ chromosomes) et possède un génome estimé à $0,415 \times 10^9$ pb (Figueira et al. 1992). L’espèce est allogame et donc, très hétérozygote. Le croisement entre génotypes conduit à la formation d’une descendance tout à fait hétérogène associé à une réduction globale des performances agronomiques (Coste, 1990).

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est un arbre à feuilles persistantes pouvant atteindre dix à douze mètres de hauteur. Dans la partie aérienne, on observe un tronc caractérisé par un port vertical (orthotropie), une différenciation de cinq bourgeons plagiotropes sous l’apex au moment de la dégénérescence du bourgeon terminal. Le cacaoyer porte en même temps, les fleurs et les fruits. Les boutons floraux poussent en bouquets sur le tronc et sur les branches principales, moins sur les jeunes rameaux. Ce phénomène d’apparition des fleurs sur le tronc et les branches appelé respectivement cauliflorie et ramiflorie donne au cacaoyer un aspect très particulier dans le règne végétal. La fleur de cacaoyer est très petite, 0,5 à 1 cm environ. Chaque inflorescence est une cyme bipare aux ramifications très courtes, 1 à 2 mm environ (Hébert, 1999). La fleur présente une organisation de type 5. Ainsi, elle est composée de cinq sépales blancs soudés à leur base formant le calice, de cinq pétales de forme très particulière (constituant la corolle) alternant avec les sépales, d’un androcée composé de cinq étamines (cachées par les pétales) alternant avec cinq staminodes (étamines stériles), érigés et de couleur violacée.

La floraison s’effectue par périodes successives et dépend des conditions d’environnement et de l’état physiologique de la plante (Coste, 1990). Un arbre produit environ 150 000 fleurs par an ; seulement 5 à 10 % des fleurs seront fécondées. La fécondation naturelle des fleurs est entomophile, assurée par des mouches, essentiellement *Forcypomia spp* ou les fourmis. Cette fécondation peut également être manuelle ou assurée par le vent.

La fécondation (naturelle ou manuelle) donne naissance à un fruit appelé chérelle à l'état jeune et cabosse à maturité **(CTB, 2011)**. Les cabosses produites poussent directement sur le tronc et les branches de l'arbre. Selon la variété, elles pèsent entre 200 et 800 g à sa maturité pour une vingtaine de cm de longueur. Elles comportent en moyenne 30 à 60 graines regroupées en épis et riches en amidon, en matières grasses et en alcaloïdes **(Hébert, 1999)**. Ces graines, entourées de pulpe mucilagineuse, blanchâtre et sucrées, après fermentation et séchage (appelées alors «fèves») constituent le cacao marchand, matière première du chocolat. **(Micheli, 2009)**.

I.3. Groupes de cacaoyer

La classification des cacaoyers cultivés fut longtemps très confuse. Elle reposait en effet sur les caractéristiques morphologiques des cabosses, des fleurs ou des fèves, qui présentent une très grande variabilité. Sur la base de ces critères, on distingue aujourd'hui trois grands groupes qui sont les Criollo, les Forastero et les Trinitario. Tous ces types de cacaoyers sont interfertiles et donnent, par croisement, des hybrides fertiles qui constituent aujourd'hui la majorité des cultivars utilisés en plantation.

I.3.1. Le Criollo

Cette variété qui donne du cacao fin, est originaire d'Amérique centrale et du Mexique. Elle ne correspond cependant qu'à 1 % de la production mondiale car est fragile et sensible aux maladies. Le groupe Criollo est caractérisé par des fèves blanches et dodues, les staminodes de couleur rose pâle, le péricarpe généralement très verruqueux et mince, les cotylédons de couleur blanche ou très légèrement pigmentés. Ils fournissent un cacao très recherché pour son arôme prononcé et sa faible amertume. Parmi les principaux types de Criollo, on peut citer le cacao Pentagona ou Lagarto aux cabosses à section pentagonale typique, le cacao Real et le cacao Porcelana.

I.3.2. Le Forastero

Les cacaoyers de type Forastero proviennent de l'Amazonie. C'est le cacao le plus produit dans le monde (près de 80 % de la production mondiale). Ce groupe produit des cabosses qui présentent une grande variabilité de forme, de nombre et de taille de fèves constituant ainsi, une grande diversité génétique et des meilleurs qualités agronomiques que le Criollo **(Micheli, 2009)**. Ils se caractérisent généralement par les staminodes pigmentés de violet, les cabosses de couleur verte avant maturité et de forme très variable, le péricarpe épais

et mésocarpe fortement lignifié, les fèves plus ou moins aplaties et violettes. Ce groupe se rencontre à l'état spontané ou sub-spontané en Haute Amazonie (Pérou, Equateur, Colombie), dans le bassin amazonien (Brésil), dans les Guyanes et le long du fleuve Orénoque au Venezuela (Fig. 2). On distingue plusieurs groupes de forastero. Les Forastero haut-amazoniens par opposition aux Forastero dits bas-amazoniens recueillis par plusieurs expéditions de prospection dans la partie supérieure du bassin amazonien. Les cacaoyers de type Forastero Amelonado (cabosses de forme ovale) sont ceux qui furent utilisés pour constituer les premières plantations de cacaoyers en Afrique de l'Ouest.

I.3.3. Le Trinitario

Ce groupe est un hybride entre les deux groupes précédents. Il a été identifié à Trinidad et représente environ 20 % de la production mondiale (**Hébert, 1999**). Les cacaoyers de type Trinitario sont très diversifiés et très hétérogènes. Leurs caractères botaniques sont intermédiaires entre Criollo et Forastero et produisent un cacao de qualité également intermédiaire. Les cultivars de Trinitario portent en général le nom des organismes ou des centres de recherche où ils ont été sélectionnés: ICS (sélection de l'Imperial College à Trinidad), UF (sélection de la United Fruit au Costa Rica), SNK (sélection de la station de Nkoemvone au Cameroun) (**Coste, 1990**).

Il convient de citer également le cacaoyer Nacional de l'Equateur très susceptible au balai de sorcière (**Desprésaux, 2004**). Cette variété produit un cacao fin réputé sur le marché sous le nom d'*Arriba* mais est malheureusement en voie de disparition.

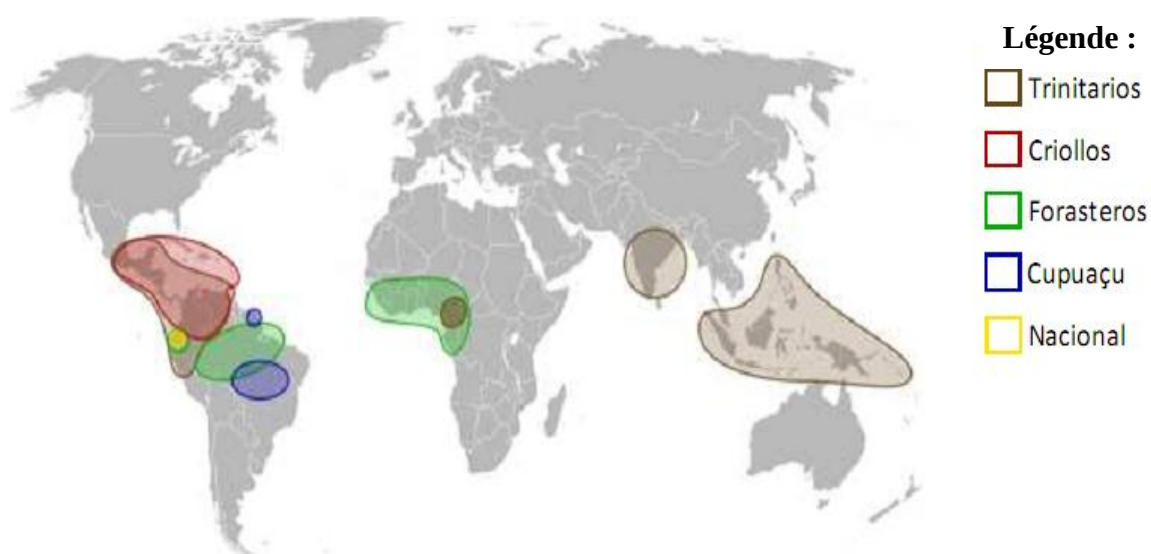


Fig. 3. Répartition géographique des groupes de cacao dans le monde.

I.4. Importance économique du cacao

L'économie cacaoyère mondiale représente environ 10 milliards de dollars américains. 3 596 000 tonnes de cacao marchand sont produites dans le monde (CTB, 2011) et réparties comme suit : 68,4 % pour l'Afrique, 14,05 % pour l'Amérique, 17,6 pour l'Asie et l'Océanie et un déficit de production d'environ 82.000 tonnes (Tableau 1). Le cacao occupe la troisième place après le sucre et le café dans le marché mondial des matières premières. Près de 40 millions de personnes dans le monde dépendent de la culture du cacao pour vivre. En moyenne, une tonne de cacao marchand est produite par paysan et par an sur 2,5 ha (FairTrad/Max Havelaare, 2011). Ces données expliquent bien l'intérêt accordé à la culture du cacao dans les pays en voie de développement.

Tableau 1. Production de fèves de cacao dans le monde (milliers de tonnes). Source: ICCO - Bulletin Trimestriel des Statistiques du Cacao ICCO, Vol. XXXVI, N°.3, année cacaoyère 2009/2010.

Années cacaoyères	2007-2008		2008-2009		2009-2010	
Afrique	2693	72,6 %	2520	69,9 %	2459	68,40 %
Cameroun	185		227		200	
Côte d'Ivoire	1382		1223		1190	
Ghana	729		662		650	
Nigéria	230		250		260	
Autres	166		158		159	
Amérique	450	12,1 %	487	13,5 %	505	14,00 %
Brésil	171		157		155	
Equateur	113		134		150	
Autres	167		196		200	
Asie et Océanie	591	15,8 %	598	16,6 %	632	17,60 %
Indonésie	485		490		535	
Papouasie nouvelle Guinée	52		59		50	
Autres			54		47	
Total Monde	3734	100 %	3604	100 %	3596	100 %

Au cours du siècle dernier, la demande de cacao a augmenté en moyenne de 3% par an. La production devrait quant à elle augmenter de 6% entre 2009 et 2013. Les industriels estiment cependant qu'en 2020, le secteur cacao aura besoin d'au moins 4,5 millions de tonnes de cacao par an pour satisfaire la hausse de la demande mondiale encouragée par l'augmentation du pouvoir d'achat des pays émergents (CTB, 2011).

Près de 65 % de la production mondiale est exportée, principalement en Europe, en Amérique du Nord et au Japon. Les acheteurs sont essentiellement l'industrie chocolatière de transformation et de confection des pays développés. Une poignée de multinationales contrôle la transformation et la confection du chocolat. Les produits dérivés de la fève (liqueur, pâte, beurre, tourteaux et poudre) sont la matière première de l'industrie chocolatière. La poudre de cacao est utilisée pour aromatiser les biscuits, les crèmes glacées, les produits laitiers et les boissons lactées. Le beurre de cacao est également prisé pour la fabrication de tabac, du savon et de produits cosmétiques. Le beurre de cacao est également utilisé pour soigner les brûlures, refroidissements, lèvres sèches, fièvres, malaria, rhumatismes, morsures de serpents et autres blessures (**FairTrad/Max Havelaare, 2011**).

Le cacao, tout comme le café, est coté à la bourse de Londres et de New York. Le prix du cacao marchand se détermine par la vente sur le marché à terme. Très volatile, le cours du cacao est influencé par divers facteurs. Ces facteurs sont d'ordre politique et économique. Il s'agit précisément des facteurs liés à l'offre et à la demande, le pouvoir des transnationales et l'émergence de nouveaux pays producteurs. A court terme, les prix du cacao sont influencés par les conditions climatiques, les aléas parasitaires affectant le cacaoyer, le mauvais entretien des cultures, l'indisponibilité ou l'insuffisance de pesticides et fertilisants, la rétention des stocks par les producteurs dans l'espoir d'en tirer de meilleurs prix et la spéculation sur les marchés.

I.5. Importance de la cacaoculture au Cameroun

L'économie camerounaise repose principalement sur l'agriculture ; le cacao occupe une place de choix parmi les produits agricoles d'importance. Le cacao représente avec le café 28 % environ des exportations non pétrolières et 40 % des exportations du secteur primaire. D'autre part, le secteur cacao représente environ 2 % du PIB national, 6 % du PIB primaire et à peu près 30 % du PIB du sous-secteur des produits agricoles destinés à l'exportation et à la transformation. Environ, 400.000 familles de producteurs tirent l'essentiel de leurs revenus du cacao. Ces revenus sont estimés à plus de 100 milliards de francs CFA (**ONCC, 2007**).

La production et la commercialisation du cacao sont soutenues par des initiatives de plusieurs ministères dont le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (MINADER), le ministère de commerce (MINCOMMERCE) et le Ministère de la Recherche Scientifique et de l'Innovation (MINRESI), à travers l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD).

I.6. Culture du cacao au Cameroun

Le cacaoyer est une plante délicate qui ne pousse que dans certaines conditions qui sont un climat humide, une température de 20 à 35°C et une altitude moyenne (Molas, 2009). Il a besoin d'une forte humidité (80%), d'un sol riche en phosphore et en potasse, en matières organiques et en oligo-éléments. La pluviométrie supérieure à 1700 mm doit être bien répartie, avec une saison sèche de quatre mois maximum. (CTB, 2011). La culture du cacaoyer est donc rentable dans les zones forestières du Cameroun.

Cependant, le matériel végétal utilisé dans les cacaoyères est très varié. Il comprend trois principales souches de cacaoyers sélectionnées à partir de 1959 : des clones SNK (de type *Trinitario* et *Forastero*) ; des clones ICS (de type *Trinitario* très évolué et voisin de *Criollo* pur) et des clones UPA (Upper Amazon). Les clones amazoniens trouvés à Tiko proviennent du Ghana. Les croisements entre ces souches, suivis de l'étude du potentiel productif et du comportement des hybrides obtenus, ont permis de définir les meilleures combinaisons qui ont été plantées en champs semenciers. Ils produisent le matériel hybride actuellement diffusé auprès des cacaoculteurs. Toutefois, le verger camerounais est constitué à 75 % de cacaoyers d'origine traditionnelle et à 25 % des variétés hybrides des champs semenciers (PNUE, 2009).

Le rendement moyen annuel de la cacaoculture camerounaise est de l'ordre de 354 kg/hectare. Ce rendement plutôt faible est surtout dû au vieillissement des plantations et des chefs d'exploitation, à la faible proportion des variétés améliorées, à la gestion souvent extensive des systèmes de production et à l'augmentation des pertes dues aux différents fléaux en raison de la chute des traitements phytosanitaires. Ce faible rendement serait aussi dû à l'abandon des cacaoyères par les paysans suite à la baisse des prix sur le marché international après la dévaluation du franc CFA (ONCC, 2007 ; Alary, 1996).

I.7. Contraintes liées à la culture du cacaoyer

I.7.1. Problèmes phytopathologiques

Le cacaoyer cultivé dans les pays en voie de développement est sujet de nombreuses maladies causées par la flore locale, car ne dispose d'aucun mécanisme de défense approprié. Lorsqu'il est dans son habitat naturel du prolongement de la forêt tropicale humide d'Amazonie, il est protégé jusqu'à un certain niveau contre l'infection par une gamme variée de plantes naturelles de même génération. De sérieuses menaces de maladies telles que le balai de sorcière et la moliniose en Amérique Centrale et du Sud sont des exceptions à cette règle. En Afrique, les cacaoculteurs font face à des problèmes phytopathologiques tels que la

pourriture brune des cabosses, le virus de l'œdème des pousses, les mirides, les foreurs de tige de cacaoyer, pour ne citer que ceux-là. Ces affections associées aux insectes parasites du cacaoyer, réduisent substantiellement la productivité des plantations (CTB, 2011).

I.7.1.1. Le balai de sorcière

En Amérique latine, le cacaoyer est affecté par un champignon qui abime cabosses, fleurs et bourgeons. L'agent responsable de cette affection est *Moniliophthora perniciosa*. L'arbre finit par être stérile et se couvre de rameaux. Il peut causer jusqu'à 100% de dommages selon les plantations (Micheli, 2009). *M. perniciosa* se rencontre dans tous les pays producteurs du cacao en Amérique du sud et constitue l'une des affections les plus redoutables (Rurdy et schmidt, 1996).

I.7.1.2. La pourriture brune des cabosses

La pourriture des cabosses, provoquée par différentes espèces appartenant à un champignon du genre *Phytophthora*, est la principale cause de pertes de récolte dans la production cacaoyère au niveau mondial (Janny et al., 2003). Sept champignons ont été identifiés comme causant la pourriture brune du cacao mais deux ont une grande incidence. Il s'agit de *Phytophthora palmivora* présent dans les zones tropicales et sub-tropicales et *Phytophthora megakarya* présent seulement en Afrique Centrale et de l'Ouest. On a pu observer entre 15 et 80% de pertes selon les espèces de *Phytophthora* ; *P. megakarya* étant la plus agressive (Legavre et al., 2006). La maladie commence avec l'apparition des petites tâches translucides près de deux jours après l'infection. La tâche devient brun chocolat puis noircit et se répand rapidement jusqu'à ce que la cabosse soit entièrement couverte. En dehors des cabosses, les agents pathogènes attaquent aussi la tige et les coussinets floraux.

I.7.1.3. Le Swollen Shoot

Il s'agit d'une pathologie d'origine virale. C'est un virus du genre *babnavirus*: virus non enveloppé, à morphologie bacilliforme avec un ADN double brin (Muller et Sackey, 2005). Il est transmis par des piqûres de pucerons et attaque directement les arbres, qui perdent leurs feuilles et meurent. Cette pathologie a été observée dans toutes les régions de production de cacao en Afrique de l'Ouest (Cote d'Ivoire, Ghana, Nigeria, Sierra Leone, Togo) et au Srilanka. En 1936, la maladie de Swollen shoot s'abat sur le principal foyer de production ghanéen. Le Ghana, premier producteur de fève de cacao jusqu'à cette date, voit son taux de production à la baisse.

En plus des problèmes liés à la santé de la plante, les planteurs doivent faire face à un marché mondial volatile, aux contraintes de travail, aux systèmes fonciers contraignants, aux coûts élevés des intrants agricoles et au manque de facilités de crédit (**Janny et al., 2003**).

I.8. Amélioration de la culture du cacaoyer

L'accroissement de la production et de la productivité est la résultante d'un ensemble de mesures techniques appropriées en l'occurrence la lutte contre les parasites en utilisant les produits chimiques et biologiques. Toutefois, bien qu'étant efficaces, ces techniques entraînent de nombreuses contraintes telles que le coût des produits, le coût de la main d'œuvre et des appareils de traitement, la pollution, la toxicité des pesticides, la résistance accrue de nombreux agents pathogènes aux doses couramment employées (**Janny et al., 2003**). Il convient à noter que l'amélioration de la culture du cacaoyer passe également par le réglage de l'ombrage dans l'entretien des plantations (lutte contre les mauvaises herbes), et l'utilisation des variétés améliorées.

I.8.1. Amélioration par sélection

I.8.1.1. Sélection massale

La sélection massale consiste à repérer les pieds de cacaoyer les plus productifs. Les fèves sont récupérées, puis mis en culture. L'opération est répétée de génération en génération jusqu'à l'amélioration des performances. Cette méthode est la plus ancienne et avantageuse du point de vue de la diversité génétique. Toutefois, elle présente certaines limites car les croisements sont non contrôlés, les caractères peu héréditaires et dure plusieurs décennies d'où la nécessité d'une méthode beaucoup plus performante.

I.8.1.2. Sélection clonale ou végétative.

La sélection clonale du cacaoyer débute au XX^e siècle. Elle a commencé au Cameroun dans les années 1949 avec la création de la Station de Nkoemvone située 200 km au Sud de Yaoundé (**Liabeuf, 1967**). Cette méthode consiste à choisir les arbres les plus précoces par multiplication végétative en insistant sur les critères tels que la productivité, la régularité à la production, l'époque de récolte, la résistance aux parasites ou la taille des fèves. Les individus vulnérables sont éliminés. Ceux sélectionnés vont constituer les têtes de clone et seront multipliés par bouturage ou par greffage.

I.8.1.3. Sélection par hybridation

La création et l'évaluation d'hybrides interclonaux constituent l'une des méthodes d'amélioration du cacaoyer. Il s'agit d'une sélection par voie générative. Le cacaoyer étant une plante hautement hétérozygote, la recherche de la meilleure association possible des caractères s'effectue par un grand nombre de croisements entre clones sélectionnés. Toutefois, les variétés hybrides (cas du Criollo) sont moins résistantes aux maladies et sont très hétérogènes, ce qui empêche l'élargissement de la gamme génétique par le sélectionneur d'où la nécessité d'une sélection assistée par les marqueurs moléculaires (**Coste, 1990**).

I.8.1.4. Sélection assistée par les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires de l'ADN rendent possible une sélection directe des gènes dans le génome de la plante. Ils permettent d'identifier et de localiser avec précision les QTL (portions de chromosomes) qui contiennent des gènes favorables à l'expression de caractéristiques agronomiques ou technologiques intéressantes. Le sélectionneur s'efforce alors d'accumuler dans une même plante tous les QTL qui paraissent porter des gènes favorables : c'est la sélection assistée par marqueurs (SAM). La sélection est faite à partir du génotype plutôt que du phénotype comme dans la sélection classique. Le génome du cacaoyer étant connu, l'on peut utiliser des marqueurs moléculaires pour préciser l'organisation génétique de l'espèce et surtout étudier les processus de domestication. Ainsi, les marqueurs nucléaires (RAPD, RFLP, microsatellites) ou cytoplasmiques ont été utilisés pour révéler la variation de séquences dont les vitesses d'évolution sont différentes (**Lanaud et al., 2003**). De nouvelles variétés productives et résistantes aux maladies sont ainsi créées en gardant les hautes qualités aromatiques du cacao. La technique semble prometteuse mais reste encore au stade de la recherche.

I.8.2. Amélioration par les méthodes biotechnologiques

Les biotechnologies désignent l'ensemble de techniques utilisant les organismes vivants ou des substances dérivées de ces organismes pour fabriquer ou modifier les produits, améliorer les espèces végétales ou animales ou développer des microorganismes pour des usages spécifiques (**ASTP, 2004**). Dans le processus de domestication d'espèces végétales, les gènes d'intérêt sont identifiés, puis transférés chez les organismes vivants par l'intermédiaire d'un vecteur. Ainsi, les biotechnologies trouvent leur application dans la culture *in vitro* en vue de multiplier les plantes à grande échelle.

I.8.2.1. Bouturage

Le bouturage de rameaux plagiotropes et des axes orthotropes est une technique utilisée essentiellement pour l'implantation des parcelles de collection et des parcelles clonales des stations de recherche. Il consiste en l'obtention directe d'une plante en laboratoire après avoir mis en culture soit un fragment de tige, soit un méristème isolé. Son intérêt ne reste cependant pas limité à la recherche. Une fois mise au point, cette méthode permet d'envisager une homogénéisation des plantations autour d'un type haut producteur et résistant à une maladie bien définie (**Franck, 1975**). Les techniques de bouturage restent utiles dans la propagation végétative d'individus sélectionnés, mais les plantes obtenues à partir des branches plagiotropes nécessitent une taille complète pour former une architecture végétale souhaitable, de plus les plantes issus de cette techniques ne présentent pas toujours un bon système racinaire résistant aux intempéries.

Au Cameroun, le besoin en plante a longtemps été une contrainte au développement de la cacaoculture. Des milliers de plants sélectionnés ont été distribués aux paysans pendant la période post coloniale sous forme de boutures. Mais le prix de revient relativement onéreux et la lenteur des procédés ont conduit à orienter les recherches vers les techniques beaucoup plus rapides (**Sonwa, 2002**). L'embryogenèse somatique s'est révélée comme pouvant permettre une multiplication rapide, un stockage et un transport facile des plants de cacaoyers.

I.8.2.2. Embryogenèse somatique

a - Définition et caractéristiques

L'embryogenèse somatique est une technique de micropropagation *in vitro* au cours de laquelle des cellules somatiques différenciées, recouvrent leur capacité embryogène. Cette reprogrammation cellulaire est connue sous le terme de transdifférenciation et est rendue possible par la totipotence des cellules végétales (**Reghavan, 1986 ; Thelen et al., 1989 ; Bresford., 1990**).

Le processus de formation *in vitro* d'embryons somatiques ressemble étroitement à celui de l'embryogenèse zygotique à la fois morphologiquement et physiologiquement (**Zimmerman, 1993**). Le développement des embryons somatiques s'effectue selon une séquence de stades définis dont les principaux sont: le stade globulaire, cordiforme, torpille, et cotylédonaire (**Margara, 1982**).

Cependant, l'obtention des cellules embryogènes à partir de cellules somatiques nécessite une étape de dédifférenciation préalable induite par des stimuli externes. Cette dédifférenciation aboutit à une réactivation cellulaire correspondant à une réinitiation des

divisions cellulaires. Seules certaines cellules semblent réceptives à ces stimuli et seront qualifiées de cellules compétentes à l'embryogenèse (De Jong et al., 1993).

Il existe plusieurs processus d'embryogenèse somatique. Celle-ci pourra être qualifiée d'embryogenèse somatique primaire ou secondaire, directe ou indirecte, pluricellulaire ou unicellulaire.

b - Facteurs influençant l'embryogenèse somatique

Bien que la capacité à former des embryons somatiques ait été depuis mise en évidence chez 300 espèces agronomiques et horticoles (Aiqing Ji et al., 2011), la technique n'est pas généralisée à tous les végétaux et varie en fonction de l'espèce, du génotype, du tissu ou des conditions de culture.

Outre le type d'explant mis en culture, interviennent les sucres, source d'énergie et de carbone dont la concentration doit contribuer à une pression osmotique favorable, la lumière, dont les besoins varient selon l'espèce, les facteurs de stress et les régulateurs de croissance. Ces deux derniers facteurs sont considérés comme les plus importants dans l'acquisition de la capacité embryogène. Le stress subi peut être d'origine variable ; il peut s'agir d'une blessure, d'une exposition aux métaux lourds ou à des mutagènes, d'un choc osmotique, qui vont déclencher l'acquisition de la capacité embryogène. L'application d'hormones, essentiellement les auxines, mais aussi les cytokinines, constitue une condition importante pour l'obtention de cultures embryogènes. L'ajout de l'auxine 2,4-D au milieu de culture est considéré comme une étape-clé de l'induction de l'embryogenèse somatique. Cette molécule agit à la fois comme une substance à activité auxinique et comme un facteur de stress.

Hormis les phytohormones, de nombreux autres facteurs peuvent être déterminants comme un choc de température, le calcium, un gradient électrique ou dans le modèle carotte le changement de pH qui est suffisant pour induire la réactivation cellulaire (Windels, 2005). Cinq milieux de culture sont principalement utilisés en embryogenèse somatique. Il s'agit des milieux MS, SH, DKW, WPM et B5. Chaque milieu étant adapté à une espèce bien précise. (Aiqing Ji et al., 2011).

Cependant, le statut physiologique et de développement des explants utilisés jouent un rôle prépondérant dans l'induction de l'embryogenèse somatique. D'une manière générale, le niveau le plus élevé du métabolisme ou le niveau le plus bas de la différenciation d'un tissu favoriserait l'induction de l'embryogenèse somatique (Aiqing Ji et al., 2011).

c - Etapes de l'embryogenèse somatique

La régénération d'embryons somatiques à partir de cellules somatiques se déroule selon trois phases principales: L'acquisition de la compétence, l'induction et la différenciation. Cette transition de la cellule somatique à l'état embryogène nécessite une dédifférenciation, une réactivation des divisions cellulaires et une reprogrammation du développement (**Féher et al., 2003**).

Tout d'abord, les cellules déjà différenciées suivent un processus conduisant à l'obtention de cellules compétentes. La compétence se définit comme l'aptitude à recevoir ou à répondre à un signal de développement. Elle est considérée comme un état physiologique, cellulaire et moléculaire nécessaire à la préparation de la morphogenèse (**Clabaut, 2009**).

Après l'acquisition de la compétence, intervient la phase d'induction nécessaire à l'activation des cellules compétentes. Nous rappelons que l'induction de l'embryogenèse somatique chez les plantes peut être naturelle (**Taylor, 1967**) ou dépendante de l'application de traitements constitués de facteurs biotiques ou abiotiques. En effet, lors de la phase d'induction, sous l'influence de stimuli externes, tels que les régulateurs de croissances ou de différents stress, les cellules compétentes deviennent déterminées à former un embryon. On parle alors de cellules embryogènes.

Après l'induction des cellules compétentes, il s'en suit une reprogrammation génétique. En effet, les cellules induites par différents facteurs passent par de nombreuses modifications cytologiques pour arriver à un état de réactivation cellulaire.

d - Marqueurs de l'embryogenèse somatique

L'induction de l'embryogenèse somatique implique une reprogrammation cellulaire, durant laquelle l'expression d'un grand nombre de gènes est régulée, dont des gènes impliqués dans la défense, probablement en réponse au stress appliqué (**Lebel, 2010**). Certains de ces gènes ont un profil d'expression spécifique durant l'embryogenèse somatique et peuvent servir de marqueurs pour identifier les cellules ou les tissus ayant une capacité embryogénique. Nous rappelons que la liste est exhaustive, les marqueurs varient en fonction des espèces.

- Les gènes *SERK*, pour *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* ont été définis comme marqueurs de l'embryogenèse somatique, entre autres chez la carotte, chez *Dactylis glomerata* ou encore chez *Arabidopsis thaliana*. Cependant, cette petite famille de gènes serait impliquée à la fois dans différents aspects du développement et dans la défense des plantes. Chez *Oryza sativa*, l'expression du gène *OsSERK1* est induite par différents stress biotiques ou abiotiques, suggérant également un rôle dans la défense (**Hu et al., 2005**).

- Les gènes *LEC*, pour *LEafy Cotyledon*, codent des facteurs de transcription contenant un domaine de fixation à l'ADN. Cette famille de gènes serait impliquée dans les phases précoce et tardive de l'embryogenèse somatique et contribuerait à la mise en place d'un environnement favorable à l'initiation du développement embryonnaire (**Lebel, 2010**).
- La famille de gènes codant pour les chitinases aurait un rôle prépondérant dans le développement embryonnaire chez la carotte. D'autre part, la polarisation et le développement des embryons seraient contrôlés par des molécules de la paroi cellulaire ayant des propriétés signalétiques comme les protéines arabinogalactanes (AGPs) et les pectines. Les AGPs seraient capables d'induire l'embryogenèse somatique chez différentes espèces végétales. Toutefois, les techniques de biologie moléculaire, plus précisément la technique de *differential display* RT-PCR (DD RT-PCR) peuvent être utilisées pour mettre en évidence des modifications dans l'expression des gènes au cours de l'embryogenèse somatique (**Galland, 2001**).

De nouvelles techniques permettant une meilleure approche ont été utilisées ces dernières années. 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 embryogenesis 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 (**Triqui, 2009**).

I.8.2.3. Embryogenèse somatique chez le cacaoyer

L'embryogenèse somatique s'est révélée comme une technique pouvant permettre une multiplication rapide du matériel végétale du cacaoyer. Cette technique offre l'avantage de produire les plants clonaux orthotropes. Elle empêche la recombinaison génétique et évite le recours à des cycles de sélection long et coûteux. Les premiers embryons somatiques chez *Theobroma cacao* L. ont été obtenus en 1977 par Esan en utilisant les embryons zygotiques immatures. De nombreux essais visant à propager cette plante *in vitro* ont été effectués en utilisant les explants tels que le nucelle, les feuilles et les cotylédons immatures. L'utilisation des pièces florales par **Lopez-Baez et al. (1993)** a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Par ailleurs, **Issali et al. (2008a)** ont mentionné que la réponse embryogène dépend principalement de la nature du génotype, du type d'explant et du milieu de culture. Les explants mis en culture sont soumis à de différents stress (stress osmotique, oxydatif, variations de pH du milieu, stress salin) car n'étant plus dans leur état physiologique habituel.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1. Culture *in vitro*

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de boutons floraux immatures (Fig. 4B) prélevé sur trois génotypes d'une cacaoyère paysanne de la chefferie de Bassa (Douala, Cameroun) étiquetés génotype 1, génotype 2 et génotype 3. Les boutons floraux des trois génotypes sont prélevés tôt le matin (6 h) dans les tubes Falcon (70 boutons floraux par tube) contenant de l'eau froide (4°C) et acheminés au laboratoire.

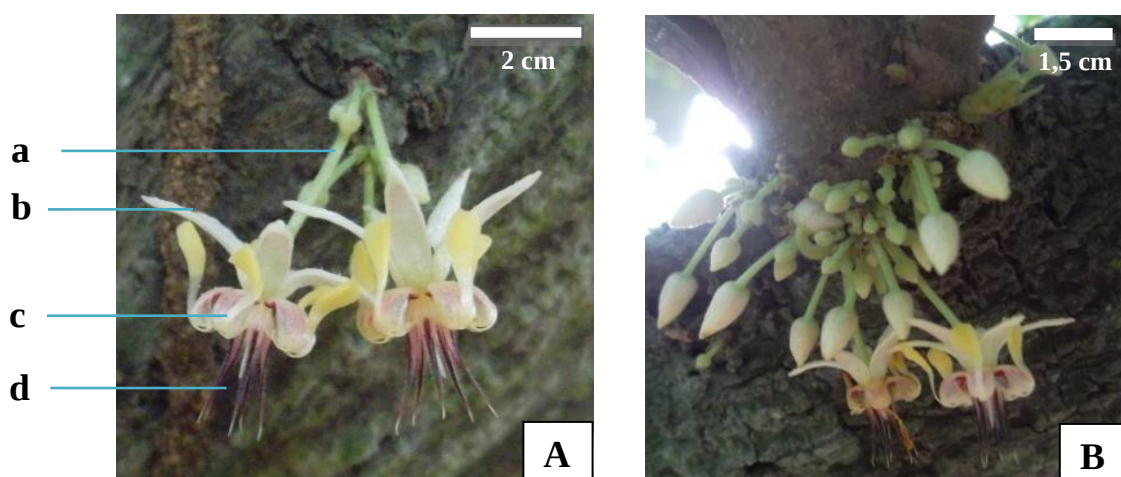


Fig. 4. Fleurs matures (A) et boutons floraux immatures de *Theobroma cacao* L. (B).

a : Pédoncule floral ; b : Sépale ; c : Pétale ; d : Staminode.

II.1.2. Aseptisation des boutons floraux

L'aseptisation des boutons floraux s'est faite sous la hotte à flux laminaire horizontal (Holten, LaminAir HV-2460). Pour ce faire, ceux-ci sont immergés pendant 10 mn dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1 % (p/v) suivi de trois rinçages à intervalle de 5 mn avec de l'eau distillée stérile. Après aseptisation, l'on a procédé à l'ensemencement.

II.1.3. Ensemencement

L'ensemencement des boutons floraux consiste à isoler soigneusement les pétales et les staminodes (explants) par excision à l'aide d'une pince et d'une lame de bistouri, au voisinage de la flamme d'un bec Bunsen, sur une boîte de Pétri servant de support dans les conditions stériles. Les explants isolés, sont mis en culture sur milieu solide d'induction primaire de cals (milieu PCG) dans des boîtes de Pétri compartimentées (90 mm de diamètre). Un premier compartiment contient les staminodes, un second les pétales et le troisième les staminodes et les pétales en lots distincts. Sept boutons floraux sont utilisés pour l'ensemencement d'une

boîte de Pétri; soit 35 pétales et 35 staminodes par boîtes de Pétri. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont scellées à l'aide du parfilm puis incubé à l'obscurité à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 14 jours.

II.1.4. Préparation des milieux de culture

Trois types de milieux de culture ont été utilisés dans le cadre de nos investigations.

- le milieu d'induction primaire de la callogenèse ou milieu PCG (Primary callus growth medium).
- le milieu d'induction secondaire de cals (milieu d'entretien) ou milieu SCG (Secondary callus growth medium).
- le milieu d'expression ou de différenciation d'embryons somatiques encore appelé milieu ED (Embryo development growth medium).

Ces milieux sont préparés à partir d'une solution minérale de DKW (Driver and Kuniyuki Walnut medium, 1984) composée de macroéléments et de microéléments (Annexe I). Le protocole utilisé est adapté à celui de **Minyaka et al. (2008)**. Le milieu d'induction primaire de cals (milieu PCG) est constitué, en plus de la solution minérale de DKW, de 250 mg.L^{-1} de glutamine, 100 mg.L^{-1} de myoinositol, 1 mL.L^{-1} de vitamines DKW (100 mg.mL^{-1} de myoinositol, 2 mg.mL^{-1} de thiamine-HCl, 1 mg.mL^{-1} d'acide nicotinique et 2 mg.mL^{-1} de glycine), 20 g.L^{-1} de glucose, $18\text{ }\mu\text{M}$ d'acide 2,4 – dichlorophénoxiacétique (2,4-D) et $45,4\text{ nM}$ de thidiazuron (TDZ). Le milieu d'entretien des cals ou milieu SCG est constitué des minéraux DKW ($0,5\text{ mL.L}^{-1}$ de vitamines DKW), 20 g.L^{-1} de glucose $9\text{ }\mu\text{M}$ et de 2,4-D, $250\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ de kinétine. Le milieu d'expression des embryons est constitué, en plus des sels basiques de DKW, 1 mL de vitamines DKW, 30 g.L^{-1} de saccharose, et 1 g.L^{-1} de glucose. Le gelrite 0,2% (w/v) a été utilisé comme agent gélifiant. Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,8 (milieux PCG et SCG) ou 5,7 (milieu ED) grâce à un pH-mètre à partir des solutions à 1 N de KOH ou de HCl avant ajout de l'agent gélifiant.

Les milieux de culture sont ensuite autoclavés à 115°C pendant 30 minutes à une pression de 1 bar. Les milieux autoclavés sont coulés en surfusion dans les boîtes de Pétri (15 ml par boîte) sous la hotte à flux laminaire horizontale (HOLTEN, LaminAir HV-2460). Après solidification des milieux à température ambiante, ceux-ci sont conservés à 4°C dans une enceinte stérile.

II.1.5. Suivi des cultures

Au terme des 14 jours de culture sur milieu d'induction primaire des cals, les explants sont transférés sur milieu d'entretien ou milieu d'induction secondaire des cals comme décrit par **Minyaka et al. (2008)** et les cultures incubées dans les mêmes conditions que précédemment (Fig.7). Après séjour sur milieu d'entretien des cals (milieu SCG), les explants sont à nouveau transférées (trois fois de suite à intervalle de 21 jours) sur milieu d'expression d'embryons somatiques (milieu ED) dans les conditions stériles, puis incubés dans les mêmes conditions citées plus haut. Au bout des 91 jours (qui représentent un cycle de culture), les études biochimiques sont menées sur différentes structures morphogénétiques obtenues à savoir les cals blanchâtres, les cals nécrosés, les cals rizhogènes, les cals embryogènes et les embryons somatiques.

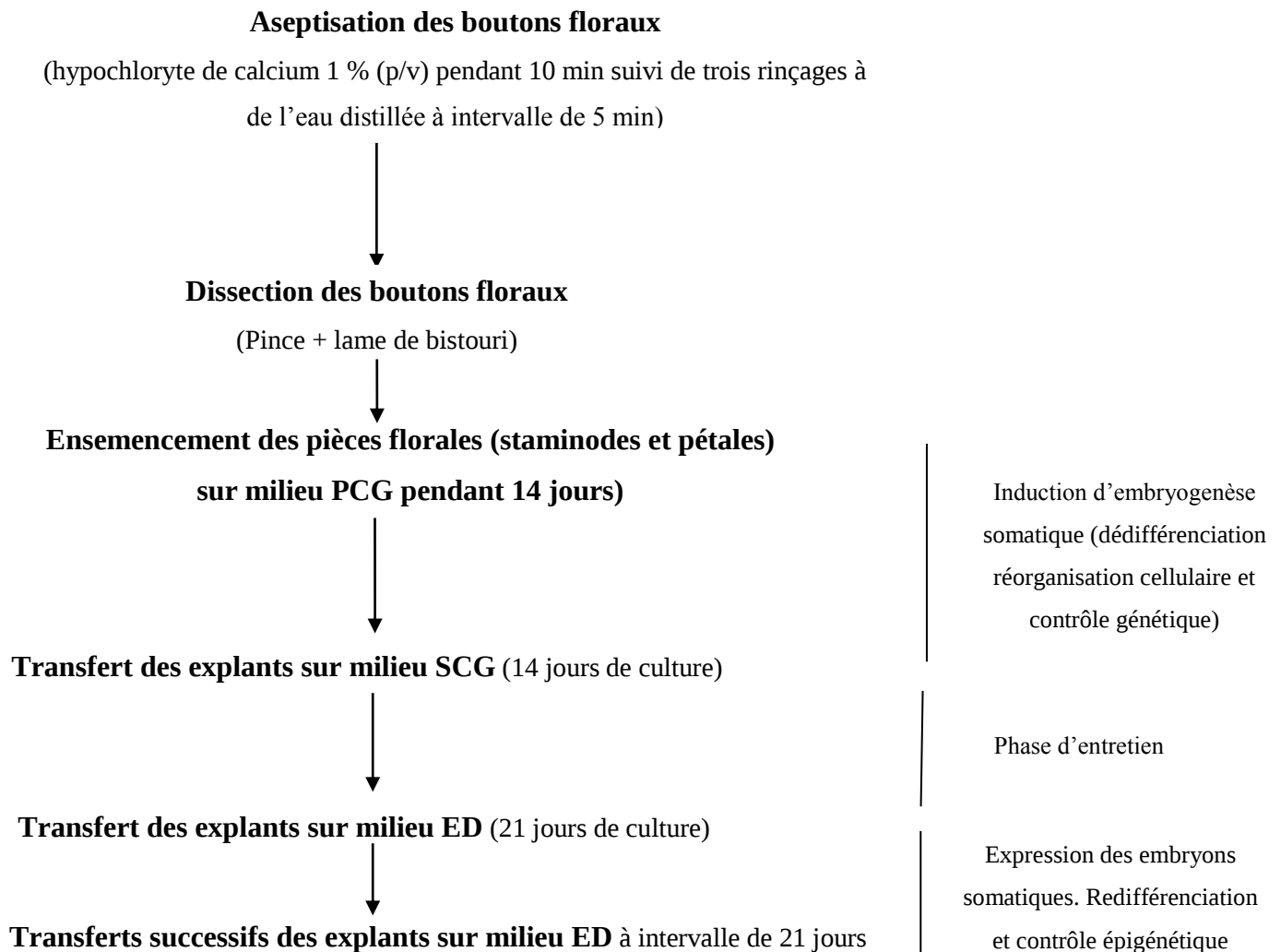


Fig. 5. Etapes de formation d'embryons somatiques à partir des pièces florales chez *T.cacao*
(Minyaka et al., 2008)

II.2. Analyse biochimiques

II.2.1. Extraction et dosage des protéines

Pour l'extraction des protéines, les différentes structures morphogénétiques obtenues à savoir les cals blanchâtres, les cals nécrosés, les cals rhizogènes, les cals embryogènes, les cals rhizogènes développés et les embryons somatiques sont pesées (0,29 g, 0,30 g, 0,40 g, 1,05 g, 0,37 g et 0,23 g respectivement) et broyées séparément dans un mortier à 4 °C dans 1 ml de tampon d'extraction pH 8,0 composé de Tris-HCl 20 mM, Triton X100 et DTT. Le broyat est centrifugé à 10 000g pendant 20 min puis le surnageant est récupéré et conservé à 4 °C.

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode colorimétrique de **Bradford (1976)**. La méthode est basée sur la liaison du bleu de Coomassie G-250 avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines pour donner un complexe coloré bleu dont le maximum d'absorption est à 595 nm.

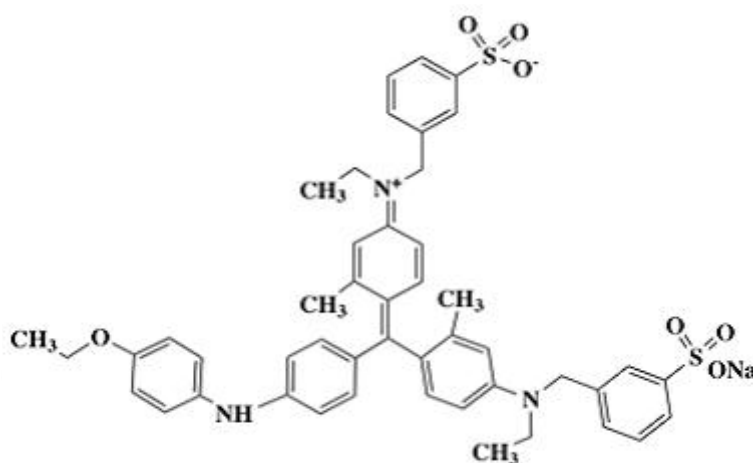


Fig. 6. Structure chimique du Bleu brillant de Coomassie G-250

Pour le dosage, 1,5 ml de réactif de Bradford est mélangé à 50 µl d'extrait protéique. Après homogénéisation et incubation à température ambiante, la DO est lue à 595 nm (spectrophotomètre UV – 6305, JENWAY) contre un blanc dans lequel l'extrait protéique est remplacé par le tampon d'extraction. Parallèlement, une équation de droite d'étalonnage est établie à partir d'une solution de SAB. Les teneurs en protéines dans les structures morphogénétiques sont déterminées à partir de l'équation de régression linéaire standard exprimant les densités optiques (DO) en fonction de la quantité de protéine de la gamme

($DO_{595nm} = f(\text{quantité de protéines})$). Soit l'équation $y = 0,018x$ avec y la densité optique et x la teneur en protéines en $\mu\text{g/g MF}$.

II. 2.2. Dosage de la cystéine libre

La teneur en cystéine dans les différentes structures morphogénétiques est évaluée selon la méthode décrite par **Gaitonde (1967)**. Le principe de la méthode repose sur la capacité de la cystéine à réagir avec la ninhydrine acide dans les conditions de pH compris entre 0,0 et 1,0 conduisant à la formation d'un produit de couleur rose qui présente un maximum d'absorbance à 560 nm (Fig. 8).

Ainsi, l'on introduit dans chaque tube à essai un volume de 100 μl de ninhydrine acide, 50 μl d'extrait protéique, 700 μl du tampon d'extraction. Les tubes sont ensuite placés dans un bain d'eau bouillante à 100 °C pendant 10 min puis, refroidit rapidement à l'eau froide pour arrêter toute réaction. Après refroidissement, 1 ml d'éthanol 95° est ajouté à chaque tube et l'absorbance du mélange est mesurée à 560 nm (spectrophotomètre UV – 6305, JENWAY) contre un blanc dans lequel l'extrait protéique est remplacé par de l'éthanol. Les teneurs en cystéine dans les différentes structures morphogénétiques sont déterminées à partir de l'équation de régression linéaire $y = 0,002x$ avec x la teneur en cystéine et y la densité optique.

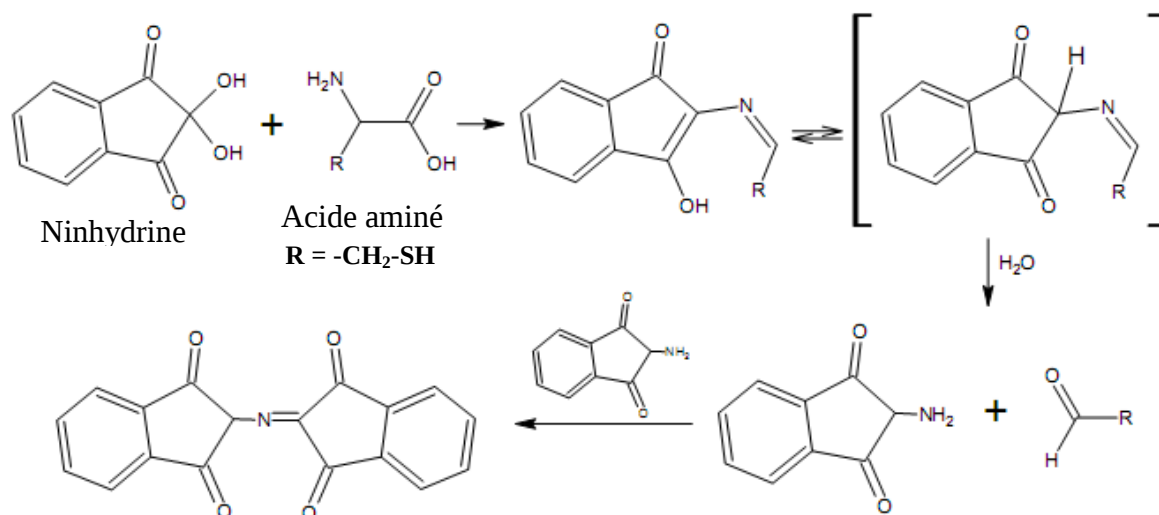


Fig. 7. Réaction générale des acides aminés avec la ninhydrine (**Belitz et Grosch, 1999**)

II.3. Analyse statistique

L'évaluation du taux d'explants callogènes, rhizogènes et embryogènes s'est faite respectivement au 14^{ème}, 41^{ème} et 56^{ème} jour de culture. Les pourcentages moyens sont calculés par boîte de Pétri, par génotype et par type d'explant. La comparaison des moyennes s'est faite grâce au logiciel SPSS version 17.0 par les tests de Newman-Pearson et Duncan.

Les histogrammes exprimant les teneurs moyennes en protéine et en cystéine libre dans les différentes structures morphogénétiques obtenues sont construits à partir du logiciel Microsoft Excel 2007. Une corrélation entre teneur en protéines et teneur en cystéine libre s'est faite par la méthode de Bravais-Pearson au seuil de 5 %.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Culture *in vitro*

III.1.1.1. Callogenèse

Le pourcentage d'explants callogénèses a été évalué au 14^{ème} jour de culture chez trois génotypes de cacaoyer. L'apparition des cals est survenue entre le 9^{ème} et le 12^{ème} jour. L'apparition des cals a été précoce chez le génotype 2 par rapport aux autres génotypes (10^{ème} jour en moyenne pour les cinq ensemencements). La taille des cals obtenue a varié avec l'âge, le génotype et le type d'explant.

Le suivi de la callogenèse au 14^{ème} jour de culture montre que lorsque les staminodes sont utilisés comme explants, un pourcentage élevé d'explants callogènes est obtenu avec le génotype 2 (89,93 % $\pm$ 5,50). En revanche, un pourcentage de 82,87 % $\pm$ 4,50 est obtenu lorsque les pétales sont utilisés comme explants chez le génotype 2 (Tableau 2). Le pourcentage d'explants callogènes chez le génotype 1 a été faible (73,78 % $\pm$ 7,90 pour les staminodes et 65,22 % $\pm$ 9,05 pour les pétales) par rapport aux deux autres génotypes. Une différence significative est cependant observée entre pourcentage de staminodes et pétales callogènes au seuil de 5 %.

Tableau 2. Pourcentages moyens d'explants callogènes (staminodes et pétales) après 14 jours de culture pour cinq séries d'ensemencement.

Types d'explants	Génotypes	Pourcentages d'explants callogènes
Staminodes	Génotype 1	73,78 $\pm$ 7,90 ^b
	Génotype 2	89,93 $\pm$ 5,50 ^a
	Génotype 3	77,20 $\pm$ 9,75 ^b
Pétales	Génotype 1	65,22 $\pm$ 9,05 ^c
	Génotype 2	82,87 $\pm$ 4,50 ^a
	Génotype 3	73,90 $\pm$ 10,18 ^b

Sur la même colonne, les valeurs sont exprimées en terme de moyenne plus ou moins l'écart-type. Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %.

Cependant, la comparaison des pourcentages moyens entre explants de même nature a montré qu'il existe une différence significative entre pourcentage moyen de pétales callogènes pour les trois génotypes étudiés. Par contre, il n'existait pas de différence significative entre pourcentage moyen de staminodes callogènes chez les génotypes 1 et 3. (Tableau 2).

Par ailleurs, les staminodes et les pétales du génotype 2 ont montré un bon développement des cals par rapport aux explants des génotypes 1 et 3. Le génotype 1 a développé moins de cals que tous les génotypes. Ainsi, les staminodes du génotype 2 ont présenté un pourcentage moyen de callogenèse supérieur à tous les génotypes ($89,93 \% \pm 5,50$), suivi des staminodes du génotype 3 ($77,20 \% \pm 9,75$).

Du point de vue morphologique, les explants initialement mis en culture augmentent progressivement de volume jusqu'à l'apparition des cals (10^{ème} jour en moyenne). Ce volume devient constant jusqu'au 14^{ème} jour. Lorsque les explants sont transférés au 14^{ème} jour sur milieu d'induction secondaire de cals, ceux-ci augmentent rapidement de volume (Fig. 9)

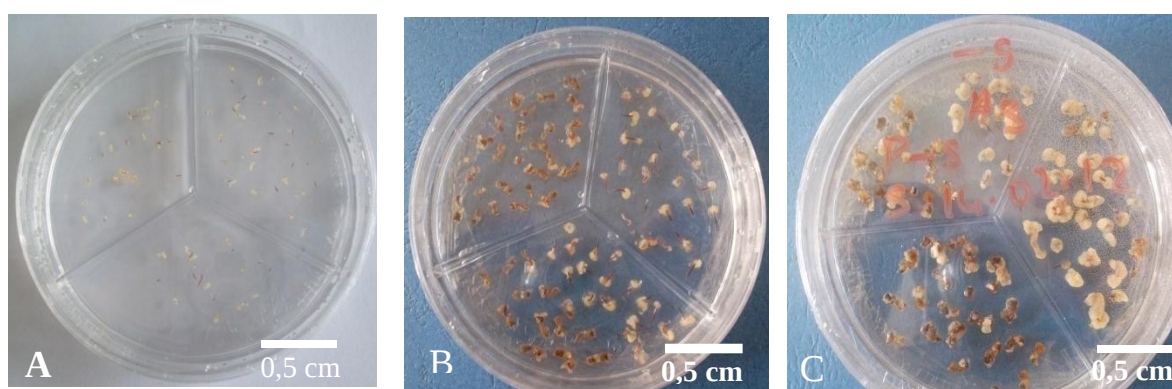


Fig. 8. Variation du volume des explants en culture sur milieu d'induction primaire de callogenèse. **A)** : Premier jour d'ensemencement, **B)** : 14^{ème} jour de culture, **C)** : 18^{ème} jour de culture

III.1.1.2. Rhizogenèse

Le pourcentage moyen d'explants rhizogènes est évalué au 41^{ème} jour de culture. Les premières racines ont apparu entre le 35^{ème} et le 37^{ème} jour (une semaine après transfert des explants sur milieu d'expression des embryons). Du point de vue morphologique, les cals rhizogènes peu développés (CR) et les cals rhizogènes développés (CRD) ont été distinctement observé (Fig. 10). Un faible pourcentage d'explants rhizogènes a été observé pour les trois génotypes. Les pourcentages moyens des cals rhizogènes chez les pétales n'ont pas été significativement différents pour les trois génotypes. Cependant une différence significative s'est observée entre pourcentages d'explants rhizogènes chez les staminodes. Les staminodes du génotype 3 ont présenté une bonne aptitude à la rhizogenèse avec un pourcentage moyen de $15,71 \% \pm 0,02$ (Tableau 3).

Tableau 3 : Pourcentages d'explants rhizogènes après 41 jours de culture pour cinq ensemencements.

Type d'explants	Génotypes	Pourcentages d'explants rhizogènes (%)
Staminodes	Génotype 1	$7,10 \pm 0,02^c$
	Génotype 2	$8,54 \pm 0,04^c$
	Génotype 3	$15,71 \pm 0,02^b$
Pétales	Génotype 1	$5,70 \pm 0,00^a$
	Génotype 2	$4,98 \pm 0,03^a$
	Génotype 3	$4,73 \pm 0,03^a$

Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 %

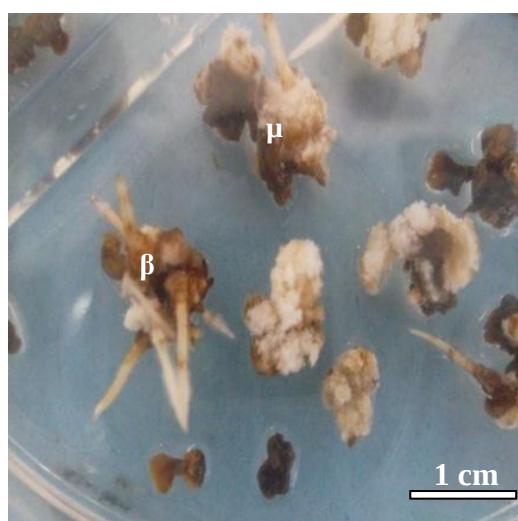


Fig. 9. Rhizogenèse après 41 jours de culture. μ : cal rhizogène; β : cal rhizogène développé.

III.1.1.3. Embryogenèse

Le pourcentage d'explants embryogènes a été évalué au 56^{ème} jour de culture. Les premiers embryons ont apparu au 51^{ème} jour de culture. Pour cinq séries d'ensemencement, les embryons somatiques n'ont pu être obtenus qu'au quatrième ensemencement. Seul le génotype 2 a développé les embryons. Le test de khi-2 a montré une différence significative entre pourcentages moyens des cals embryogènes pour les deux explants utilisés. En effet, le pourcentage moyen de cals embryogènes chez les staminodes ($37,62 \% \pm 17,65$) était supérieur à celui des cals embryogènes chez les pétales ($20,48 \% \pm 11,35$) (Tableau 4).

Les embryons somatiques obtenus ont dérivé de la différenciation des cals embryogènes. Ainsi, les embryons globulaires et cotylédonaire ont été observés sur cals nécrosés. Du point de vue morphologique, les embryons globulaires sont moins volumineux, de couleur jaune pâle, ayant un aspect liquidien. Les embryons cotylédonaire sont moins nombreux que les embryons globulaires, de couleur jaunâtre (Fig. 9).

Tableau 4 : Pourcentages d'explants embryogènes (staminodes et pétales) chez *T. cacao*.

Type d'explants	Pourcentage des cals
	embryogènes
Staminodes	37,62 ± 17,65
Pétales	20,48 ± 11,35

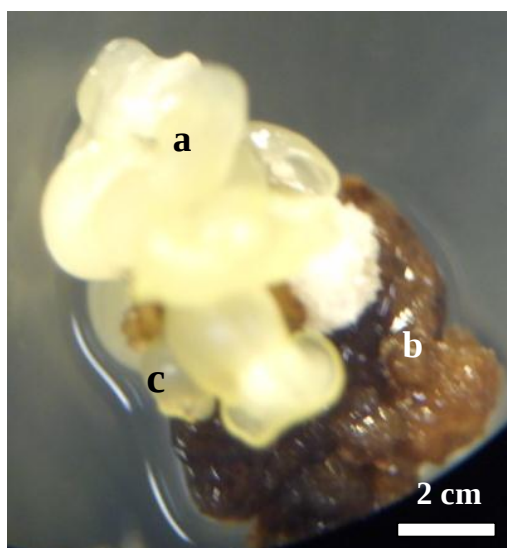


Fig. 10. Embryons somatiques. **a** : embryons cotylédonaire ; **b** : cal nécrosé embryogène; **c** : embryons globulaires.

III.1.2. Analyses biochimiques

III.1.2.1. Teneur en protéines solubles dans les structures morphogénétiques.

Les analyses biochimiques ont porté sur six structures morphogénétiques à savoir les cals rhizogènes, les cals blanchâtres, les cals nécrosés, les cals embryogènes, les embryons somatiques et les cals rhizogènes développés.

L'évaluation de la teneur en protéines solubles dans les différentes structures morphogénétiques montre que celle-ci est plus élevée dans les embryons somatiques ($1063,29 \pm 74,88 \mu\text{g/g}$ de MF) par rapport aux autres structures, suivi des cals nécrosés ($510,91 \pm 0,00$

µg/g de MF). Cependant, nous avons noté une très faible teneur en protéines dans les cals embryogènes ($90,20 \pm 67,26$ µg/g de MF). Les cals rhizogènes développés ont présenté néanmoins une teneur en protéines supérieure à celle des cals rhizogènes (Fig. 10).

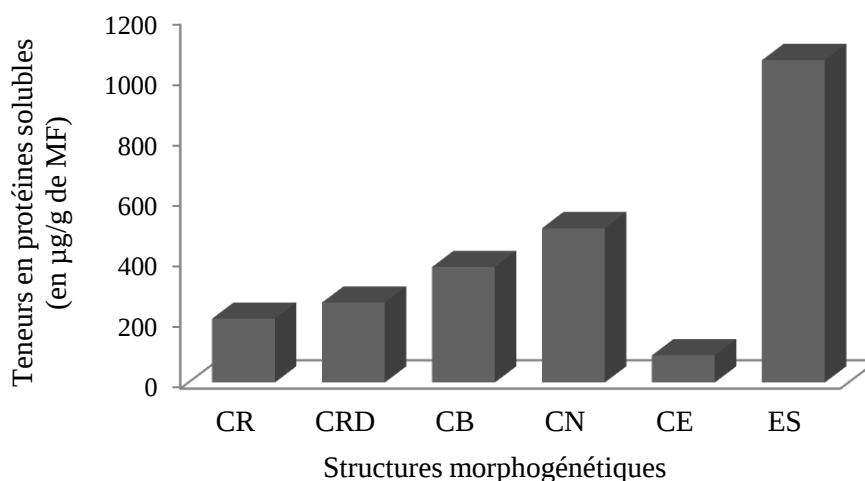


Fig. 11. Teneur en protéines solubles (µg/g de MF). **CR** : Cals rhizogènes ; **CRD** : cals rhizogènes développés ; **CB** : Cals blanchâtres ; **CN** : Cals nécrosés ; **CE** : Cals embryogènes ; **ES** : Embryons somatiques ;

III.1.2.2 Teneur en cystéine libre

La variation de la teneur en cystéine dans les différentes structures morphogénétiques montre que les cals nécrosés ont une teneur en cystéine libre élevée par rapport aux autres structures ($8355,82 \pm 92,57$ µg/g de MF), suivi des embryons somatiques ($2466,67 \pm 1204,73$ µg/g de MF). Les cals blanchâtres, les cals rhizogènes développés et les cals embryogènes ont présenté des teneurs en cystéine libre sensiblement égales ($1132,34 \pm 398,71$; $1124,99 \pm 24,99$ et $1021,90 \pm 17,61$ µg/g de MF respectivement). En revanche, cette teneur a été plus élevée dans les cals rhizogènes ($1503,13 \pm 23,13$ µg/g de MF) que dans les cals rhizogènes développés. Une diminution considérable de la teneur en cystéine libre a été observée entre cals rhizogènes et cals rhizogènes développés (Fig. 11).

Par ailleurs, le coefficient de corrélation entre teneur en protéines et teneur en cystéine dans les différentes structures morphogénétiques a été de 0.30. Ainsi, la teneur en protéines et la teneur en cystéine sont faiblement liées, donc varient dans le même sens dans les structures morphogénétiques. De plus, le test de significativité du coefficient de corrélation par Bravais Pearson au risque de 5% a révélé que la liaison entre les deux variables étudiées (teneur en protéines et teneur en cystéine libre) était effective.

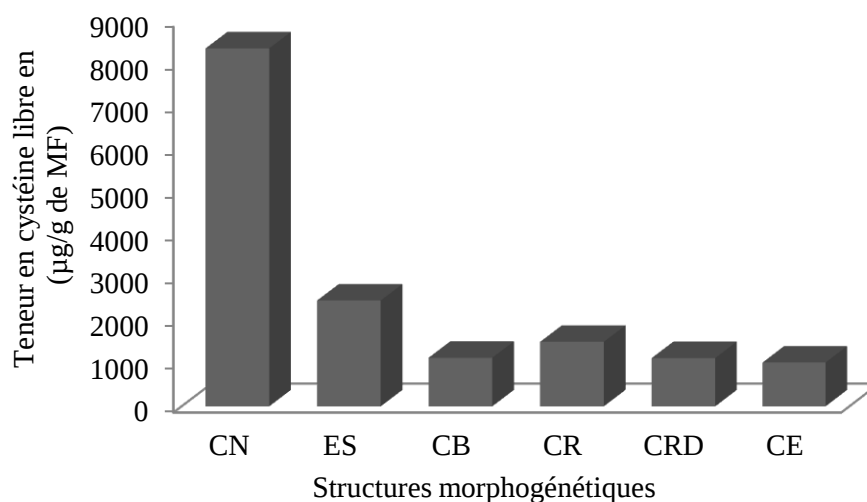


Fig. 12. Teneur en cystéine libre (µg/g de MF)

III.2. Discussion

Nos travaux ont été menés sur trois génotypes de cacaoyer d'une plantation paysanne. Ces travaux ont porté sur l'évaluation du potentiel callogène et embryogène de trois génotypes et la quantification des protéines solubles et cystéine libre dans les structures morphogénétiques obtenues en culture *in vitro*. Le suivi de la callogenèse a montré que le génotype 2 présente le meilleur pourcentage d'explants callogènes et ce, quelque soit le type d'explant comparé aux deux autres génotypes. Ce génotype a montré un bon développement de cals et une meilleure aptitude à l'embryogenèse somatique par rapport aux autres génotypes. Ces résultats montrent que la réponse callogène et embryogène chez *T. cacao* serait fortement liée à la nature du génotype comme mentionné par de nombreux auteurs (**Li et al., 1998** ; **T. É. R. da Silva et al., 2008** ; **Issali et al., 2010**). Par ailleurs, les types d'explants mis en culture (staminodes ou pétales) ont présenté des pourcentages de callogenèse significativement différents. Les staminodes ont présenté des pourcentages de callogenèse significativement différents pour les trois génotypes étudiés ; ceci suggère qu'il existe également un effet explant inter et intra génotypique. Les travaux de **Li et al. (1998)** ont rapporté que l'utilisation des staminodes comme explants était favorable au développement des cals chez *T. cacao*. **T.É.R. da Silva et al. (2008)** ont révélé que les pétales étaient mieux adaptés à la formation des cals et des embryons somatiques. Les staminodes et les pétales pourraient donc indistinctement du génotype fournir des pourcentages élevés d'explants callogènes avec un maximum pour les staminodes.

Dans le cadre de nos investigations, les prélèvements des boutons floraux et la mise en culture des pièces florales (staminodes et pétales) se sont fait à répétition, étalés sur neuf mois (février-octobre) correspondant à trois saisons (grande saison sèche, petite saison des pluies et grande saison des pluies). **Issali et al. (2008b)** ont montré que les niveaux de floraison du génotype au cours de l'année influencent significativement l'aptitude à la callogenèse et l'embryogenèse somatique chez *T. cacao*. Les différences de réponse à la callogenèse observées pourraient s'expliquer par des variations climatiques qui affectent les génotypes à des intervalles de temps bien distincts. Il existerait donc un stade de vie active et un stade de vie ralentie chez *T. cacao* au cours des différentes saisons, ce qui conduit les explants à développer des réactions différentes en culture *in-vitro*. Par ailleurs, **Kouadio et al. (2004)** ont signalé que le rythme de poussée des fleurs au cours de l'année et les conditions environnementales des cultures (température, lumière, atmosphère) peuvent influencer fortement la prolifération cellulaire au cours de la callogenèse et de l'embryogenèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.). Le génotype 2 qui a présenté un pourcentage d'explants callogènes élevé semblait le plus jeune. L'âge de la plante serait donc impliqué dans la callogenèse chez *T. cacao*.

Le pourcentage moyen d'explants embryogènes chez les staminodes était significativement différent de celui des pétales. Ce résultat montre que les staminode sont mieux adaptés à la propagation de cette plante par embryogenèse somatique. Par ailleurs, les embryons somatiques n'ont été obtenus qu'au quatrième ensemencement. Le génotype 2 est le seul qui a différencier les embryons. Les boutons floraux étant prélevés à des périodes différentes, les paramètres phénologiques influenceraient la réponse embryogène chez *T. cacao*. **Issali et al. (2012)** ont indiqué que la variation de l'état phénologique de la plante au cours de l'année semble influencer la variation de la production des embryons somatiques. Le cacaoyer étant sensible aux variations du climat, cette sensibilité entraînerait une réduction de la fréquence d'embryogenèse. La température maximale et le niveau de fleurissement ont été indiqués comme des paramètres phénologiques liés à l'embryogenèse somatique (**Issali et al., 2008b**). Les prélèvements effectués sur le génotype 2 se sont fait à une période favorable (mois de septembre) ce qui explique la différence avec les autres séries d'ensemencement.

Par ailleurs, le processus d'embryogenèse somatique indirect passe par une phase préalable de callogenèse qui s'accompagne d'une importante synthèse protéique. Les milieux de culture utilisés contiennent l'élément soufre sous forme d'ions sulfate. Les travaux de **Minyaka et al. (2007)** ont révélé que la teneur en protéines solubles est corrélée à la teneur en cystéine dans les embryons somatiques. Une forte teneur en protéines dans les embryons

somatiques et cals nécrosés pourrait s'expliquer par une forte activité des gènes responsables de l'assimilation du soufre au cours de la phase d'acquisition de la compétence et de la différenciation des embryons somatiques. En outre, les cellules végétales mises en culture ont besoin d'une alimentation soufrée pour assurer leur croissance et leur développement. Cette assimilation du soufre est conditionnée par la disponibilité des ions sulfates présents dans le milieu. La synthèse des protéines ou leur utilisation dans les milieux de culture au cours de l'embryogenèse somatique est dépendante du métabolisme du soufre et donc de l'incorporation de la cystéine.

La cystéine constitue le premier composé organique de la voie d'assimilation réductrice du sulfate cytosolique (assimilation plastidiale et mitochondriale) et la plaque tournante de la distribution du soufre organique dans la cellule. Cet acide aminé agit comme un précurseur pour la synthèse de tous les composés issus des métabolismes primaire et secondaire. Il est utilisé pour la synthèse des protéines ainsi qu'en tant que précurseur de composés non protéiques essentiels chez le végétal par l'intermédiaire des voies métaboliques. Les cellules eucaryotes utilisent principalement la cystéine et la méthionine comme source de soufre. Les travaux de **Taltec (2008)** ont révélé que le repliement et la stabilité des protéines sont favorisés par la formation de ponts disulfures entre les groupes soufrés (thiols) libres de la cystéine. Les explants mis en cultures ont donc besoin de protéines et par conséquent de cystéine pour leur croissance et leur différenciation.

Une très faible teneur en protéines s'est observée dans les cals embryogènes. Ceci pourrait s'expliquer par un contrôle épigénétique qui s'effectuerait à la phase d'acquisition de la compétence embryogène chez le génotype 2. En effet, les explants mis en culture sont soumis à des traitements par les régulateurs de croissance. La méthylation de l'ADN est l'un des acteurs majeurs de la régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel, notamment au cours des processus de dédifférenciation/redifférenciation et en réponse à diverses contraintes environnementales (**Phillips et al., 1994 ; Finnegan et al., 1998**). Il existerait donc une hyperméthylation de l'ADN et ou des histones qui réprimerait l'expression des gènes après formation des cals embryogènes chez le génotype 2.

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes proposé d'une part, d'évaluer l'aptitude callogène et embryogène de trois génotypes de cacaoyer afin de déterminer le génotype et le type d'explant favorable à la propagation par embryogenèse somatique. D'autre part, nous avons quantifié les protéines solubles et la cystéine libre dans les différentes structures morphogénétiques obtenues par culture *in vitro*.

A l'issu de cette investigation, il en ressort que les staminodes sont propices à la callogenèse et à la différenciation des embryons somatiques par rapport aux pétales pour les trois génotypes étudiés. Deux des trois génotypes étudiés se sont montrés récalcitrants à l'embryogenèse somatique. Chez le génotype testé embryogène, ce sont les staminodes qui apparaissent propices à la différenciation des embryons somatiques. La différence de réponse embryogène de ces génotypes serait due à la sensibilité du cacaoyer aux variations des conditions environnementales et à la physiologie de la plante. D'une manière générale, la capacité embryogénique dépendrait du génotype, du type d'explant et de l'état physiologique de la plante.

Les analyses biochimiques ont révélé qu'il y a variabilité de teneur en protéine et cystéine d'une structure morphogénétique à une autre. Ces teneurs ont été très élevées dans les embryons somatiques et faibles dans les cals blanchâtres. La variation de ces teneurs serait responsable de la différenciation cellulaire.

Dans le but d'améliorer ce travail, nous nous proposons :

- D'identifier le génotype 2 qui a présenté une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique par rapport aux autres génotypes étudiés
- De comprendre les événements moléculaires par analyse du protéome et des ARNs différentiels entre génotypes embryogènes et récalcitrants en condition de culture *in vitro*.
- D'élargir les expériences à d'autres génotypes

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiqing Ji., Xueqing Geng., Yan Zhang., Hongyan Yang., Guoliang Wu. 2011.** Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. *Am. J. Plant Sci.* **2**, 727-732.
- Alary V. (1996).** La libéralisation de la filière cacaoyère vue et vécue par les planteurs du Cameroun. *Revue Région & Développement* n° 4.
- Alverson W. S., Whitlock B., A., Nyffeler R., Bayer C., Baum D. A. 1999.** Phylogeny of the core Malvales: Evidence from NDHF sequence data. *Am. J. Bot.* **86**: 1474- 1486.
- Assoumou J. (1977).** L'économie du cacao. Ed. Universitaires. Paris (France). 380p.
- ASTS (2004).** Les biotechnologies ; potentiels, enjeux et perspectives: cas du Sénégal. Travaux de l'académie des sciences et technique du Sénégal.
- Belitz H.D., Grosch W. 1999.** Amino acids, peptides, proteins. In: Food chemistry. Ed. Springer, pag. 8-90.
- Bresford W.A. 1990.** Direct transdifferentiation: can cell change their phenotype without dividing? *Cell differ Dev.* **29**:81-93.
- Clabaut A. (2009).** Analyse génétique de l'embryogenèse somatique chez la chicorée (*Cichorium intybus* L.) cartographie des QTL et gènes candidats. Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1, France. 316p.
- Coste. R (1990).** Le cacaoyer, Maisonneuve et Larose.
- CTB, Trade for development centre (2011).** Le cacao, un levier pour le développement. 46p.
- Cuatrecasas J. 1964.** Cacao and it allies a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contributions from the United States National herbarium, Washington, **6**: 379 – 614
- De Jong A. J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vanderkerckove J., Van Kammen A., De Vries S.C.A. (1992)** Carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant Cell.* **4**: 425-433.
- Despréaux D. 2004.** *Phytophthora* diseases cacao tree resistance to *phytophthora* disease. Cilas C. and Despréaux D. (Eds). Montpellier. pp. 20-28.
- FairTrad/Max Havelaare (2011).** Cacao et commerce équitable. Etat des lieux de la filière et action du système FairTrad/Max Havelaare (France). 21p.
- Fehér A., Pasternak TP and Dudits D. (2003)** Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Org Cult* **74**:201–228.
- Figueira A., Janick J., Goldsbrough P. 1992.** Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. *J. Am. Soc. Hort Sci.* **117**: 673-67.
- Figueira A., Janick, J. 1993.** Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. *Acta Hort.* **336**: 231–238.

- Finnegan E. J., R. K. Genger, W. J. Peacock, and E. S. Dennis. 1998.** DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 223-247.
- Franck J. P. (1975).** Le bouturage du cacaoyer. O.R.S.T.O.M. N° 7814.
- Gaitonde, M.K. 1967.** A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Anal. Chem. J.* **104**: 627-633.
- Galland R. (2001).** Mise en évidence d'un gène de glutathion s-transférase exprimé au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1, France. 169p.
- Herbert A. (1999).** Les mondes du cacao. Salon international d'agriculture. CIRAD Nestlé France. 15p.
- Hu H., Xiong L., Yang Y. 2005.** Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cells and host defense response against fungal infection. *Planta*, **222**:107-117.
- Issali A. E., Traoré A., Kouablan Koffi E., Kohi N'goran., Sangaré A. 2008a.** Characterization of callogenic and embryogenic abilities of somme genotypes of cocoa (*Theobroma cocoa L.*) under selection in Côte d'Ivoire. *Biotech.* **7** (1): 51-58.
- Issali A. E., Abdoulaye Traoré., Kohi Ngoran. J. A., Kouablan Koffi1. E., Abdourahamane Sangaré 2008b.** Relationship between some phenological parameters and somatic embryogenesis in *Theobroma cacao L.* *J. Crop Sci. Biotech.* **11** (1): 23-30.
- Issali A. E., Traoré A., Konan J. L., Mpika J., Minyaka E., Kohi N. J. A. and Sangaré A. 2010.** Relationship between five climatic parameters and somatic embryogenesis from sporophytic floral explants of *Theobroma cacao L.* *Afri. J. Biotech.* **9** (40), 6614-6625.
- Issali A. E., Traore A., Minyaka E., Allou D., Sangare A., Diarrassouba N., Lékadou T. T., Toure M. 2011.** Resemblance between somatic embryo-derived plantlets and plantlets bearing cotyledons of *Theobroma cacao L.*, in relation to their growth in the greenhouse using the typology. *Am. J. Biotech., Mol. Sci.* 2011, **1**(1): 17-29.
- Issali A.E., Abdoulaye Traoré., Nafan Diarassouba., Kohi Ngoran J. A. and Abdourahamane Sangaré. 2012.** Impact of some climatic and phenological parameters on the callogenesis and somatic embryogenesis variations in cocoa. *Afri. C. Sci. J.* **20** (4), pp. 251 – 260.
- Janny G. M. Vos., Barbara J. Ritchie., Julie Flood (2003).** A la découverte du cacao, un guide pour la formation des facilitateurs. CABI Biosciences. 114p.
- Kouadio J. Y., Mongomaké Koné., Yao Djè., D'Almeida M. A., Zouzou M. (2004)** L'étiollement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la

callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* **8** (3), 155–162

Lanaud C., Motamayor J.C., Sounigo O. 2003. In : Hamon Perla (ed.), Seguin Marc (ed.), Perrier Xavier (ed.), Glaszmann Jean-Christophe (ed.). *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Montpellier : CIRAD, pp125-156.

Lebel. S. (2010). Caractérisation des gènes PR10 chez *Vitis vinifera* et étude de leur expression durant l'embryogenèse somatique. Thèse de Doctorat de l'Université de Haute-Alsace, France. 115p.

Legavre T., Gramacho K., Ducamp M., Sounigo O., Debert P., Fouet O., Sabau X., Argout X., Vincker P., da Silva C et C. Lanaud. 2006. Identification de gènes de *Theobroma cacao* différemment exprimés pendant une infection par *Phytophthora*. 15^{ème} Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère. Recueil des résumés.

Li Z., Traoré A., Maximova S. and Gultinan M. J. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* **34**: 293-299.

Liabeuf J. (1967). Etat des travaux effectués pour la sélection du cacaoyer au Cameroun et perspectives d'avenir, Institut de la recherche agronomique, O.R.S.T.O.M, N°18209. Cote B.

Lopez-Baez O., Bollon H., Eskes A.B. et Petiard N (1993). Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir des pièces florales. *C. R. Acad. Sci. Paris, série III.* **316**: 549-585

Maximova S. N., Alemano L., Young A., Ferriere N., Traore A. and Gultinan M. J. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **38**: 252–259.

Margara J. (1982). Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse, INRA éd. 263p.

Mebenga Tamba Luc (2002). Cacaoculture hybride à l'ère du retour des employés déflatés au village dans la zone cacaoyère du Cameroun, *The Afr. Anthro.* vol 9, N° 2. pp 138-156

Micheli F. (2009). Etude de l'interaction *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*. Habilitation à Diriger des Recherches, Université de Paris-Sud (XI) U.F.R scientifique d'Orsay, France. 85p.

Minyaka E., Niemenak N., N.M.S. Soupi., Sangare A. and Omokolo N.D. 2007. Implication of cysteine, glutathione and cysteine synthetase in *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis. *Biotech.* **6**(1): 129-135.

Minyaka E., Niemenak N., Issali Emmanuel A., Sangare A. and Omokolo D. N. 2010. Sulphur depletion altered somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. Biochemical difference

related to sulphur metabolism between embryogenic and non embryogenic calli. *Afri. J. Biotech.* **9**(35), 5665-5675.

Molas C. (2009). Intoxications des carnivores domestiques dues aux denrées alimentaires consommées par l'homme. Thèse de Doctorat de l'école nationale vétérinaire d'Alfort, France. 142p.

Muller E, Sackey S. 2005. Molecular variability analysis of five new complete cacao swollen shoot virus genomic sequences. *Arch Virol.* **150**: 53–66.

ONCC (2007). Table ronde sur l'économie cacaoyère durable. Rapport de International conférence center d'Accra (Ghana).

ONCC-NCCB, CTA, OriGLn. 2010. Indications géographiques : défis et opportunités pour le secteur café - cacao au Cameroun. Rapport de l'atelier tenu à Yaoundé, Cameroun. 43p.

Phillips R. L., S. M. Kaeppler, and P. Olhoft. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5222-5226.

PNUE (2009). Evaluation intégrée des politiques liées au commerce et les implications en termes de diversité biologique dans le secteur agricole en République du Cameroun : le secteur cacao. 106p.

Quainoo A. K., Dwomo B. I. 2012. The effect of TDZ and 2, 4-D concentrations on the induction of somatic embryo and embryogenesis in different cocoa genotype. *Jour. of Pl. Stu.* Vol. 1, No. 1.

Reghavan V. 1986. Embryogenesis in angiosperms. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Rurdy L.H. and Schmidt R.A. 1996. Status of cacao witches broom: Biology Epidemiology and Management. *Ann. Rev. phytopathol.* **34**: 573-594.

Sonwa D. J. (2002). Etude de cas d'aménagement forestier exemplaire en Afrique centrale: Les systèmes agroforestiers cacaoyers Cameroun, 49p.

Tallec. T. (2008). Effet d'un double gradient azote/soufre sur la structure des communautés végétales de prairie bas normandie : dynamique de l'acquisition des ressources minérales et des interactions compétitives. Thèse de Doctorat de l'université de Caen, France. 252p.

Taylor R. 1967. The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Can. J. Bot.* **45**:1553-1556.

T.É.R. da Silva., L.C. Cicade., F.C. Alvim., J.C. de Mattos Cascardo and M.G. Cardoso Costa (2008). Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite clones of *Theobroma cacao*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.43, n.10, p.1433-1436.

Thelen M.P. and Northcote D.H. (1989). Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L: a potential marker for xylogenesis. *Planta* **179**:181-195.

- Triqui Zine EL Abidine (2009).** Contribution a l'amélioration de la patate douce (*ipomoea batatas* L. (lam)) par l'application des biotechnologies : embryogenèse somatique et transformation génétique. Thèse de Doctorat de l'Université Mohammed V-Agdal. Maroc. 143p.
- Windels D. (2005).** Etude de l'amélioration des arabinogalactanes protéines (AGPs) au cours de l'embryogenèse somatique chez différents génotypes de chicorée. Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1. 151p.
- Whitlock B., Bayer C. and Baum D 2001.** Phylogenetic relationships and floral evolution of The *Byttnerioidae* (*Sterculiaceae* or *Malvaceae*). Based on sequences of the Chloroplast gene, *ndhF*. *Sys. Bot.*, **26** (2): 420-437.
- Yaye Kène G., Safiétou Touré-Fall., Mamady Konté., Ousman Kane., Amadou Tidiane Ba., Issa Mbaye., Becker C., Mamadou Lamine Show., Pape Meissa Dieng (2004).** Les biotechnologies ; potentiels, enjeux et perspectives: cas du Sénégal. Travaux de l'académie des sciences et technique du Sénégal (atelier). 82p.
- Zimmerman JL 1993.** Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. **5**: 1411-1423.

ANNEXES

Annexe I : Composition des milieux de culture pour 500 ml de solution (**Minyaka et al., 2008**)

Milieu d'induction primaire des cals (milieu PCG)		Milieu d'induction secondaire de cals (milieu SCG)		Milieu de développement des embryons (milieu ED)	
DKW macro A	50 ml	DKW macro A	50 ml	DKW macro A	50 ml
DKW macro B	50 ml	DKW macro B	50 ml	DKW macro B	50 ml
DKW micro	5 ml	DKW micro	5 ml	DKW micro	5 ml
Vitamines	0,5 ml	Vitamines	0,25 ml	Vitamines	0,5 ml
DKW		DKW		DKW	
Glucose	10 mg	Vitamine B5	0,25 ml	Sucrose	15 g
Glutamine	125 mg	Glucose	10 g	Glucose	500 mg
Myo-inositol	50 mg	2,4-D	0,5 ml	Gelrite	1,1 g
2.4-D	1 ml	Kinetine	125 µl	pH	5,7
TDZ	12,5 µl	Gelrite	1,1 g		
Gelrite	1,1 g	pH	5,7		
pH	5,8				

Annexe II : Teneur en protéines solubles et en cystéine libre dans diverses structures morphogénétiques obtenues au cours de l'embryogenèse somatique chez *Theobroma cacao* L. **CR :** Cals rhizogènes ; **CB :** Cals blanchâtres ; **CN :** Cals nécrosés ; **CE :** Cals embryogènes ; **ES :** Embryons somatiques ; **CRD :** cals rhizogènes développés.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Structures morphogénétiques	CR	CB	CN	CE	ES	CRD
Masse (g)	0,40g	0,29g	0,30g	1,05g	0,23g	0,37g
D.O Protéines solubles	0,079	0,070	0,089	0,096	0,132	0,062
	0,024	0,060	0,089	0,014	0,152	0,052
	0,0515	0,065	0,089	0,055	0,142	0,057
Teneur en protéines solubles (µg/gMF)	340,132	415,71	510,911	157,449	988,404	288,61
	103,354	356,314	510,911	22,94	1138,165	242,048
	221,712	386,012	510,911	90,21	1063,300	265,329
D.O dosage de la cystéine libre	0,032	0,024	0,137	0,057	0,043	0,022
	0,033	0,0115	0,134	0,059	0,014	0,023
	0,0325	0,01775	0,1355	0,058	0,035	0,0225
Teneur en cystéine libre (µg/g de MF)	1480	1531,06	8448,321	1004,291	3458,686	1100,01
	1526,25	733,636	8263,321	1039,515	1126,095	1149,997
	1503,125	1132,311	8355,821	1021,903	2815,219	1124,985
Teneur moyenne en protéines solubles (µg/g de MF)	211,733 ±	383,012 ±	510,911 ±	90,200 ±	1063,290 ±	265,329 ±
	103,750	29,698	0,000	67,255	74,880	23,281
Teneur moyenne en cystéine libre (µg/g de MF)	1503,125 ±	1132,336 ±	8355,821 ±	1021,903 ±	2466,667 ±	1124,997 ±
	23,125	398,712	92,5	17,612	1204,725	24,993

Annexe III. Nombre d'explants callogénènes par génotype et par boîte de Pétri après 14 jours de culture *in vitro* pour cinq séries de culture. **1geno1b1:**Série de culture 1, génotype 1, boîte de Pétri numéro 1.

Série de culture	Génotypes	Nombre d'explants mis en culture	Staminodes callogènes	Pétales Callogènes
1	1geno1b1	105	30	27
	1geno1b2		-	-
	1geno1b3		29	28
	1geno2b1	105	33	30
	1geno2b2		31	27
	1geno2b3		32	30
	1geno3b1	105	34	33
	1geno3b2		-	-
	1geno3b3		25	26
2	2geno1b1	105	26	23
	2geno1b2		-	-
	2geno1b3		-	-
	2geno2b1	105	30	27
	2geno2b2		34	29
	2geno2b3		32	28
	2geno3b1	105	27	25
	2geno3b2		30	26
	2geno3b3		24	23
3	3geno1b1	105	-	-
	3geno1b2		-	-
	3geno1b3		22	18
	3geno2b1	105	28	29
	3geno2b2		33	27
	3geno2b3		34	30
	3geno3b1	105	-	-
	3geno3b2		-	-
	3geno3b3		24	23
4	4geno1b1	105	27	24
	4geno1b2		26	22
	4geno1b3		22	20
	4geno2b1	105	31	29
	4geno2b2		28	29
	4geno2b3		33	33
	4geno3b1	105	-	-
	4geno3b2		29	28
	4geno3b3		-	-
5	5geno1b1	105	-	-
	5geno1b2		25	23
	5geno1b3		27	22
	5geno2b1	105	32	30
	5geno2b2		30	31
	5geno2b3		33	29
	5geno3b1	105	29	30
	5geno3b2		27	25
	5geno3b3		23	21

Annexe IV : Nombre d'explants rhizogènes et embryogènes respectivement au 41^{ème} et 51^{ème} jour de culture. **S** : staminodes ; **P** : pétales

Série de culture	Génotypes	Nombre d'explants mis en culture	Nombre d'explants embryogènes		Nombre d'explants rhizogènes	
			S	P	S	P
1	1geno1b1	105	-	-	3	2
	1geno1b2		-	-	-	-
	1geno1b3		-	-	-	-
	1geno2b1	105	-	-	2	1
	1geno2b2		-	-	6	-
	1geno2b3		-	-	3	-
	1geno3b1	105	-	-	6	-
	1geno3b2		-	-	-	1
	1geno3b3		-	-	-	-
2	2geno1b1	105	-	-	-	-
	2geno1b2		-	-	-	-
	2geno1b3		-	-	-	-
	2geno2b1	105	-	-	-	-
	2geno2b2		-	-	-	-
	2geno2b3		-	-	-	-
	2geno3b1	105	-	-	-	-
	2geno3b2		-	-	-	-
	2geno3b3		-	-	-	-
3	3geno1b1	105	-	-	-	-
	3geno1b2		-	-	-	-
	3geno1b3		-	-	-	-
	3geno2b1	105	-	-	-	-
	3geno2b2		-	-	-	-
	3geno2b3		-	-	-	-
	3geno3b1	105	-	-	-	-
	3geno3b2		-	-	-	-
	3geno3b3		-	-	-	-
4	4geno1b1	105	-	-	-	-
	4geno1b2		24	12	2	-
	4geno1b3		-	-	-	-
	4geno2b1	105	13	4	2	1
	4geno2b2		12	9	3	3
	4geno2b3		11	4	2	2
	4geno3b1	105	5	3	5	1
	4geno3b2		14	11	-	3
	4geno3b3		-	-	-	-
5	5geno1b1	105	-	-	-	-
	5geno1b2		-	-	-	-
	5geno1b3		-	-	-	-
	5geno2b1	105	-	-	-	-
	5geno2b2		-	-	-	-
	5geno2b3		-	-	-	-
	5geno3b1	105	-	-	-	-
	5geno3b2		-	-	-	-
	5geno3b3		-	-	-	-