



**Titre:** Contrôle de la germination lors de la production d'embryons  
Title: somatiques de carotte en bioréacteur

**Auteur:** Laurence Lamboursain  
Author:

**Date:** 1997

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Lamboursain, L. (1997). Contrôle de la germination lors de la production  
Citation: d'embryons somatiques de carotte en bioréacteur [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8568/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8568/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Claude Chavarie, & Jean Archambault  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

## **INFORMATION TO USERS**

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA

**UMI**<sup>®</sup>  
800-521-0600



**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**CONTRÔLE DE LA GERMINATION  
LORS DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES  
DE CAROTTE EN BIORÉACTEUR.**

**LAURENCE LAMBOURSAIN  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)**

**DÉCEMBRE 1997**





**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-42912-1**

**Canada**

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**Ce mémoire intitulé:**

**CONTRÔLE DE LA GERMINATION  
LORS DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES  
DE CAROTTE EN BIORÉACTEUR.**

**présenté par: LAMBOURSAIN Laurence**

**en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées**

**a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:**

**M. LAFLEUR Pierre, Ph.D., président**

**M. CHAVARIE Claude, Ph.D., membre et directeur de recherche**

**M. ARCHAMBAULT Jean, Ph.D., membre et codirecteur de recherche**

**M. RAMSAY Bruce, Ph.D., membre**

## REMERCIEMENTS

A huit ans, lorsqu'on me demandait ce que je voulais faire plus tard, je répondais sans hésiter: "moi, je ferais pousser des roses dans des tubes !". Vingt ans plus tard, me voilà en train de faire pousser des carottes dans des réacteurs, comme quoi, on ne peut rien contre sa destinée, même si la réalité est parfois moins poétique que les rêves!

Un grand merci à tous ceux qui ont rendu ce rêve possible, et plus particulièrement:

Merci au Dr. Jean Archambault, pour ses bons conseils, ses encouragements et pour avoir partagé sa grande expérience des bioréacteurs.

Merci au Dr. Claude Chavarie, pour sa grande patience, son dynamisme et son soutien financier.

Merci au Dr. Michel Perrier, pour son temps et sa disponibilité.

Merci à Mario Jolicoeur, pour sa très précieuse aide technique et sa soif contagieuse de tout connaître.

Merci à toute l'équipe des "planteux": Dany, François, Joël, Luc, Martin, Christophe (en tant que résident temporaire) et Rob. Votre aide et votre bonne humeur ont été spécialement précieuses.

Merci à Sylvain, pour son soutien de tous les instants, sa voiture-taxi et les dépannages informatiques de dernière minute.

Merci à Liane, Margot et Thomas: vous êtes les plus beaux embryons de la cuvée 1996.

Merci enfin à toutes les carottes québécoises, pour leur contribution active aux progrès de la science: promis, j'arrête de vous torturer!

## RÉSUMÉ

Dans la nature, les embryons végétaux des graines dites orthodoxes entrent dans une période de vie ralentie lorsqu'ils ont atteint la pleine maturité. Cette phase de latence leur permet de différer la germination jusqu'à ce que la température, l'humidité et la luminosité du milieu extérieur soient favorables au développement de la jeune plante.

Au contraire, les embryons cultivés *in vitro* germent au sein du milieu de culture sans passer par cette période de repos observée au sein de la graine. Ce phénomène de germination en culture rend la manipulation et la conservation des embryons produits *in vitro* particulièrement délicates. La germination précoce des embryons matures provoque également l'arrêt du développement des jeunes embryons qui sont présents en même temps qu'eux dans le milieu de culture. De ce fait, le pourcentage d'embryons capables de germer et de devenir une plante adulte dépasse rarement 10 % du total des embryons produits.

L'objectif principal de ce projet de recherche visait donc à limiter la germination en culture d'embryons somatiques de carotte produits en bioréacteur. Dans un premier temps, nous avons cherché à synchroniser le développement des embryons lors de la production afin d'éviter les blocages développementaux et d'augmenter la qualité des embryons produits (réduction du pourcentage d'anormalités et augmentation du pourcentage de conversion en plantes). Dans un deuxième temps, les populations synchrones d'embryons obtenues ont été soumises à divers traitements visant à limiter, voire à éliminer, le phénomène de germination en culture.

Un nouveau procédé de production "par paliers de densité" a été mis au point afin de synchroniser le développement des embryons *in vitro*. Ce procédé utilise le

phénomène d'auto-inhibition pour bloquer réversiblement la croissance des embryons à deux stades précis de leur développement, soit le stade des masses pro-embryonnaires et le stade globulaire (stades immatures).

Le procédé comporte quatre étapes distinctes qui sont : la culture des cellules embryogènes, la production des masses proembryonnaires (MPE), la formation des embryons globulaires (EG) et enfin la maturation des embryons globulaires en embryons torpilles (ET) prêts à être récoltés. Les trois premières étapes sont effectuées en flacons agités alors que la phase de maturation des EG en ET est opérée en bioréacteur à doubles rubans hélicoïdaux.

L'utilisation conjointe de la nouvelle méthode de production par paliers de densité (MPD) et d'une nouvelle lignée cellulaire embryogène a permis de multiplier la productivité par 25 par rapport à la méthode de production classique ( $2 \times 10^3$  et  $51 \times 10^3$  emb.l<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> respectivement). Simultanément, le pourcentage final de germination en culture a diminué de 85 % à 28 %. La qualité des embryons produits a également été améliorée, ce qui se traduit par une diminution du pourcentage d'anormalités (de 50 % à moins de 10 %) et par une augmentation du pourcentage de germination en sol stérile qui passe de 13 % à 96 % (embryons encapsulés dans des billes d'alginate).

Il existe un lien direct entre la densité d'inoculation en embryons globulaires lors de la dernière étape du procédé MPD et la durée d'opération nécessaire pour obtenir la concentration maximale en embryons torpilles. Par exemple, on obtient le maximum de production (824 ET.ml<sup>-1</sup> produits) au bout de 4 jours si on inocule à 5 g EG.l<sup>-1</sup> (en matière humide) et au bout de 13 jours en inoculant à 10 g EG.l<sup>-1</sup> (1032 ET.ml<sup>-1</sup> produits). On peut donc, simplement en faisant varier la densité d'inoculation, choisir de privilégier soit une faible durée d'opération du bioréacteur soit la qualité et la quantité des embryons produits. En MPD, les populations synchrones d'embryons torpilles ou globulaires peuvent être conservées au moins trois semaines à haute

concentration embryonnaire, ce qui permet de différer le semis. Cette flexibilité de la technique par paliers de densité en fait un outil de production unique en embryogenèse végétale.

Les résultats obtenus par paliers de densité ont démontré que plus il y a d'embryons torpilles dans le milieu de culture, moins le pourcentage de germination en culture est élevé (45 % de germination à 200 ET.ml<sup>-1</sup> contre 1 % de germination à 2000 ET.ml<sup>-1</sup>). De ce fait, la densité d'inoculation en embryons globulaires lors de la dernière étape de production influence directement le pourcentage de germination en culture. En flacons agités par exemple, il est possible de maintenir le pourcentage de germination en culture en deçà de 5 % en utilisant des densités d'inoculation de 10 g.l<sup>-1</sup> (en matière humide) et plus.

Afin de limiter la germination lors des cultures inoculées à basse densité d'inoculation (10 g.l<sup>-1</sup> et moins en bioréacteur), les embryons ont été soumis à divers traitements pendant la phase de maturation des EG en ET. Il n'a pas été possible de démontrer l'influence de l'acide abscissique (ABA) sur la germination en culture en MPD. Par contre, les résultats prouvent que l'ABA inhibe le développement des embryons globulaires, ce qui diminue significativement le nombre d'embryons torpilles produits. De plus, les embryons torpilles produits dans un milieu contenant de l'ABA ont un pourcentage de germination post-récolte inférieur à celui des témoins (cultivés sans ABA).

L'utilisation d'un milieu de production sans Fe-EDTA lors de la maturation des embryons globulaires en embryons torpilles provoque une diminution du pourcentage de germination en culture de 28 à 3 % (milieu avec et sans Fe-EDTA respectivement). Parallèlement, la production en embryons passe de 1000 à 3000 embryons torpilles par ml (bioréacteurs inoculés à 10 g.l<sup>-1</sup>).

Enfin, l'augmentation de la concentration en sucrose du milieu de 30 g.l<sup>-1</sup> à 90 g.l<sup>-1</sup> lors de la maturation des embryons globulaires en embryons torpilles a totalement supprimé la germination en culture, tout en multipliant par 5 la production d'embryons torpilles (300 et 1400 emb.ml<sup>-1</sup> à 30 g.l<sup>-1</sup> et 90 g.l<sup>-1</sup> de sucrose respectivement, pour des bioréacteurs inoculés à 5 g.l<sup>-1</sup>). Ce traitement à haut potentiel osmotique a donc été le plus efficace afin de contrôler la germination au sein des cultures opérées à basse densité d'inoculation. Notons que ni le retrait du Fe-EDTA du milieu de culture, ni l'augmentation de la concentration en sucrose n'ont eu d'influence sur le pourcentage de germination post-récolte des embryons traités.

La synchronisation du développement des embryons cultivés *in vitro* constitue une avancée importante en matière d'embryogenèse somatique. La mise au point de la technique de production par paliers de densité a permis à la fois d'améliorer la productivité du bioprocédé, de contrôler la germination en culture et d'augmenter significativement la qualité des embryons produits. Pour la première fois, on dispose d'une méthode simple de contrôle de la germination en culture, qui permet de retarder le semis des embryons produits sans altérer leur germinabilité post-récolte. Ce nouveau procédé de production d'embryons somatiques possède de plus une flexibilité qui en fait un outil de choix en vue d'une future application industrielle.

## ABSTRACT

In so called "orthodox" seeds, the growth of zygotic embryos stops as soon as they reach full maturity, at the torpedo stage. This resting period is the key of the embryos survival during winter. However, somatic embryos produced *in vitro* never show this quiescent state and germinate in the culture medium immediately after they reach the torpedo stage. This precocious germination, which occurs before embryo harvest, makes their handling and conservation difficult. Moreover, the germination of somatic torpedo stage embryos during production is responsible for developmental abnormalities among the immature embryos. Therefore, no more than 10 % of total embryos produced actually reach the torpedo stage.

The main objective of this work was to suppress the precocious germination of carrot somatic embryos produced in bioreactor. Since asynchrony is believed to be responsible for abnormal development of cultivated embryos, we first attempted to improve their quality by synchronizing their growth during production. Subsequently, we tested various treatments to prevent somatic embryo germination in the culture medium.

A new production process was developed which allowed a better synchronization of embryo development and enhancement of their morphological normalcy. This process uses the auto-antagonism phenomenon to reversibly stop embryo development during production. This process is subdivided into four stages: the culture of embryogenic cells, the proembryo masses (PME) production, the globular stage embryos (GE) formation and finally the globular embryos maturation into torpedo stage embryos (TE) ready to be harvested. The first three stages were carried out in



agitated flasks while the maturation of synchronized GE's into torpedo stage embryos was performed in a helical ribbon impeller bioreactor.

Using this new "multi stage production process" (MSPP) and a new *Daucus carota* embryogenic cell line, productivity was increased 25 fold as compared to the conventional production process (CPP) ( $2 \times 10^3$  versus  $51 \times 10^3$  for MSPP and CPP, respectively). In addition, the final germination rate during production decreased from 85 % to 28% using MSPP as compared to CPP. Furthermore, embryo quality was improved as indicated by fewer abnormalities (10% versus 50%) and increased conversion rate into plants (from 13% to 96% in a sterile soil) of embryos encapsulated in alginate beads.

A direct relationship was established between the globular embryo inoculation rate of bioreactor cultures and the time required to reach the maximum TE's concentration using this novel MSPP process. For example, maximum production was reached after 4 days when the medium was inoculated with 5 g wet weight GE.l<sup>-1</sup> (824 TE.ml<sup>-1</sup> produced) whereas 13 days were required with 10 g GE.l<sup>-1</sup> (1032 TE.ml<sup>-1</sup> produced). Thus, we can either favour a shorter bioreactor operation time or maximize the quality and quantity of the embryos produced by simply varying the last stage inoculation concentration. Furthermore, the synchronized torpedo and globular somatic embryos can be kept at a high embryo concentration for at least three weeks, which permits to postpone seedling.

Results showed that, using the MSPP method, germination during production decreased as the torpedo embryo (TE) concentration increased (45 % germination rate as 200 TE.ml<sup>-1</sup> versus 1 % at 2000 TE.ml<sup>-1</sup>). Therefore, GE's inoculation density of the last production stage is directly proportional to the precocious

germination rate. Therefore, it is possible to maintain this germination rate below 5 % by using inoculation rates of 10 g GE.l<sup>-1</sup> (wet weight) or more in agitated flasks.

In order to limit precocious germination during cultures inoculated with low GE density (i.e. bioreactors inoculated with 10 g GE.l<sup>-1</sup> or less) the embryos were submitted to various treatments during the last production stage. It was not possible to demonstrate abscissic acid (ABA) effects on precocious germination during MSPP production. However, supplementing the culture medium with ABA significantly decreased productivity using both CPP and MSPP production methods. On the other hand, precocious germination was reduced from 28 % to 3 % using a Fe-EDTA free medium, while production increased from 1000 TE.ml<sup>-1</sup> to 3000 TE.ml<sup>-1</sup> (10 g GE.l<sup>-1</sup> inoculation concentration). Finally, increasing the sucrose concentration from 30 to 90 g.l<sup>-1</sup> totally inhibited embryo precocious germination and increased production fivefold (from 300 to 1400 TE.ml<sup>-1</sup>, 5 g GE.l<sup>-1</sup> inoculation rate). Neither Fe-EDTA removal from the culture medium nor high sucrose concentration affected post-harvest germination rates.

The synchronization of *in vitro* embryo developement is a major advance for somatic embryo production. The multi stage production process developed during this work allows, at the same time, an increase of process productivity, better control of precocious germination and higher quality of the embryos produced. It is now possible to control germination during production and postpone seedling without decreasing embryo post-harvest germinability. Moreover, MSPP's unique flexibility makes it an indispensable production tool for the industrial use of somatic embryogenesis.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XX</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>XXII</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. POURQUOI PRODUIRE DES EMBRYONS SOMATIQUES ET COMMENT ?.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. <i>La magie de l'embryogenèse somatique .....</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Intérêts de la culture d'embryons .....</i>	<i>4</i>
2.1.3. <i>Embryon zygotique ou somatique: quelle différence ? .....</i>	<i>6</i>
2.1.4. <i>La carotte: un modèle.....</i>	<i>8</i>
2.1.5. <i>Les limitations de l'embryogenèse in vitro.....</i>	<i>9</i>
<b>2.2. EMBRYOGENÈSE DE LA CAROTTE IN VIVO .....</b>	<b>13</b>
2.2.1. <i>Événements morphologiques .....</i>	<i>13</i>
2.2.2. <i>Régulation de l'embryogenèse.....</i>	<i>14</i>

2.2.3. Nutrition et environnement de l'embryon.....	17
<b>2.3. EMBRYOGENÈSE DE LA CAROTTE IN VITRO.....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Production d'embryons in vitro .....	19
2.3.2. Induction de l'embryogenèse in vitro.....	21
2.3.3. Régulation de l'embryogenèse in vitro.....	23
2.3.4. Environnement de l'embryon in vivo et in vitro: toute une différence. ....	34
<b>2.4. LE PROBLÈME DE LA SYNCHRONISATION DES EMBRYONS IN VITRO .....</b>	<b>36</b>
2.4.1. Pourquoi synchroniser les cultures d'embryons ? .....	36
2.4.2. Les procédés de synchronisation et leur efficacité.....	37
<b>2.5. LA GERMINATION ET SA PROBLÉMATIQUE .....</b>	<b>42</b>
2.5.1. Dormance et quiescence.....	42
2.5.2. Événements de la germination .....	44
2.5.3. Régulation de la germination.....	45
<b>2.6. ENCAPSULATION DES EMBRYONS SOMATIQUES.....</b>	<b>50</b>
2.6.1. Qu'est-ce qu'une semence artificielle ? .....	50
2.6.2. Méthodes d'encapsulation .....	51
2.6.3. Les limites de l'encapsulation.....	51
<b>2.7. RÉSUMÉ DU CONTEXTE DE LA RECHERCHE .....</b>	<b>52</b>
<b>3. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF GÉNÉRAL.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2. HYPOTHÈSES ET STRATÉGIE DE RECHERCHE.....</b>	<b>55</b>
3.2.1. Que se passe-t-il lorsque les embryons matures germent?.....	55
3.2.2. Comment faire pour l'éviter?.....	56

<b>4. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. MILIEUX DE CULTURE.....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Milieu d'induction .....	59
4.1.2. Milieu de production .....	59
4.1.3. Stérilisation des milieux.....	59
<b>4.2. MATÉRIEL VÉGÉTAL.....</b>	<b>60</b>
4.2.1. Préparation des suspensions cellulaires .....	60
4.2.2. Préparation des suspensions embryonnaires .....	51
<b>4.3. DESCRIPTION DU BIORÉACTEUR.....</b>	<b>61</b>
4.3.1. Bioréacteur à double ruban hélicoïdal .....	61
4.3.2. Conditions d'opération.....	62
4.3.3. Suivi analytique et étalonnages.....	64
<b>4.4. PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES.....</b>	<b>65</b>
4.4.1. Préparation des inocula.....	65
4.4.2. Production d'embryons somatiques en bioréacteur .....	66
4.4.3. Production d'embryons somatiques en flacons .....	66
<b>4.5. ANALYTIQUE.....</b>	<b>67</b>
4.5.1. Comptage des embryons.....	67
4.5.2. Comptage des cellules .....	68
4.5.3. Mesure du poids sec, du pH et de la conductivité .....	69
4.5.4. Mesure des concentrations en sucres.....	69
4.5.5. Mesure des concentrations en ions .....	70
<b>4.6. MESURES RESPIROMÉTRIQUES.....</b>	<b>70</b>
4.6.1. Estimation du taux de consommation en oxygène .....	70

4.6.2. Estimation du taux de production de CO <sub>2</sub> .....	72
<b>4.7. ENCAPSULATION DES EMBRYONS SOMATIQUES.....</b>	<b>72</b>
<b>4.8. ESSAIS DE GERMINATION.....</b>	<b>73</b>
4.8.1. Sur gélose.....	73
4.8.2. En sol reconstitué .....	73
<b>5. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1. SYNCHRONISATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS.....</b>	<b>75</b>
5.1.1. Méthode de production classique.....	75
5.1.1.1. Description du procédé de production classique.....	75
5.1.1.2. Résultats généraux.....	76
5.1.1.3. Résultats typiques: cuvée B8 .....	80
5.1.1.4. Conclusion .....	99
5.1.2. Développement de la technique de production par paliers de densité.....	100
5.1.2.1. Comportement de la lignée cellulaire FP95: cuvée B16 .....	100
5.1.2.2. Développement de la méthode par paliers de densité .....	103
5.1.2.3. Description du mode de production par paliers de densité.....	105
5.1.2.4. Avantages du mode de production par paliers de densité.....	107
5.1.3. Production d'embryons par la technique des paliers de densité .....	108
5.1.3.1. Résultats généraux.....	108
5.1.3.2. Résultats d'une cuvée typique: cuvée B9 .....	113
5.1.4. Conclusion.....	130
<b>5.2. CONTROLE DE LA GERMINATION EN CULTURE.....</b>	<b>131</b>
5.2.1. Influence de la densité d'inoculation en embryons globulaires.....	132
5.2.1.1. Expériences en flacons agités.....	132
5.2.1.2. Expérience en bioréacteur: cuvée B13 .....	133

5.2.2. Influence de l'acide abscissique .....	141
5.2.3. Influence du Fe-EDTA .....	146
5.2.3.1. Expériences en flacons agités .....	146
5.2.3.2. Expérience en bioréacteur .....	148
5.2.4. Influence de la pression osmotique du milieu .....	155
5.2.4.1. Expériences en flacons agités .....	155
5.2.4.2. Expérience en bioréacteur: cuvée B15 .....	157
5.2.5. Conclusion sur la germination en culture .....	166
5.2.6. Suggestions pour les travaux futurs .....	167
 <b>5.3. ENCAPSULATION DES EMBRYONS ET GERMINATION</b>	
<b>POST-RÉCOLTE</b> .....	<b>170</b>
5.3.1. Choix de la matrice d'encapsulation .....	170
5.3.2. Pourcentage de germination et de conversion post-récolte .....	170
5.3.2.1. Germination sur gélose .....	171
5.3.2.2. Germination en sol reconstitué stérile .....	171
5.3.3. Conclusion .....	172
 <b>6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>174</b>
 <b>LISTE DE RÉFÉRENCES</b> .....	<b>176</b>
 <b>ANNEXES</b> .....	<b>194</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 5.1: Résultats obtenus par la méthode de production classique.</i>	77
<i>Tableau 5.2: Poids sec moyen et nombre de cellules moyen des principaux stades embryonnaires (lignée FP29, méthode de production classique).</i>	89
<i>Tableau 5.3: Concentrations cellulaires lors des cuvées B8 et F8-r</i>	96
<i>Tableau 5.4: Influence du pourcentage d'inoculation en cellules sur la production d'embryons torpilles en flacons agités.</i>	106
<i>Tableau 5.5: Résultats moyens obtenus en mode de production par paliers de densité.</i>	111
<i>Tableau 5.6: Poids sec moyen et nombre de cellules moyen des principaux stades embryonnaires (lignée SP95, méthode par paliers de densité).</i>	113
<i>Tableau 5.7: Concentrations en CE et CNE lors des cuvées B9 et F9-r.</i>	130
<i>Tableau 5.8: Influence de la densité d'inoculation en embryons globulaires sur le pourcentage de germination en culture.</i>	134
<i>Tableau 5.9: Effet du Fe-EDTA dans le milieu de culture sur le nombre d'embryons produits et sur le pourcentage de germination en culture en flacons agités.</i>	148
<i>Tableau 5.10: Effet du Fe-EDTA dans le milieu de culture sur le nombre d'embryons produits et sur le pourcentage de germination en culture en bioréacteur.</i>	150
<i>Tableau 5.11: Effet de deux concentrations en sucrose du milieu de culture sur la production d'embryons torpilles en flacons agités.</i>	158
<i>Tableau 5.12: Effet de deux concentrations en sucrose du milieu de culture sur la production d'embryons torpilles en bioréacteur.</i>	160
<i>Tableau 5.13: Suggestion de conditions d'opérations lors des différentes phases de production en MPD.</i>	170



## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 2.1: Représentation schématique des différents stades du développement des embryons zygotiques chez la carotte .....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 2.2: Photographies des principales étapes du développement d'un embryon somatique de carotte. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 4.1: Bioréacteur de 2 litres à doubles rubans hélicoïdaux. ....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 5.1: Représentation du procédé de production classique. ....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 5.2: Exemples d'anormalités observées chez les embryons produits in vitro. ....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 5.3: Inocula cellulaires. ....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 5.4: Résultats de production de la cuvée B8. ....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 5.5: Graphique récapitulatif de la cuvée B8. ....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 5.6: Résultats de production de la cuvée F8-r. ....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 5.7: Graphique récapitulatif de la cuvée F8-r. ....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 5.8: Résultats de production de la cuvée B16. ....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 5.9: Description schématique du mode de production par paliers de densité. ....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 5.10: Résultats de production de la cuvée B9. ....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 5.11: Graphique récapitulatif de la cuvée B9. ....</i>	<i>118</i>
<i>Figure 5.12: Résultats de production de la cuvée F9-r. ....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 5.13: Graphique récapitulatif de la cuvée F9-r. ....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 5.14: Résultats de production de la cuvée B13. ....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 5.15: Graphique récapitulatif de la cuvée B13. ....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 5.16: Pourcentage maximal de germination en culture en fonction du nombre d'embryons torpilles produits. ....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 5.17: Influence du temps d'ajout et de la concentration en ABA sur la germination en culture et sur la production d'embryons. ....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 5.18: Résultats de production de la cuvée B10. ....</i>	<i>153</i>

<i>Figure 5.19: Graphique récapitulatif de la cuvée B10.....</i>	<i>155</i>
<i>Figure 5.20: Résultats de production de la cuvée B15.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 5.21: Graphique récapitulatif de la cuvée B15.....</i>	<i>164</i>

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2,4-D	: Acide 2,4-dichlorophenoxy acétique
$\mu^{\text{cell}}$	: Taux de croissance spécifique en cellules
$\mu^{\text{PS}}$	: Taux de croissance spécifique en poids sec
ABA	: Acide abscissique
ADN, ARN	: Acide désoxyribonucléique, Acide ribonucléique
APG	: Protéines arabinogalactanes
ATP	: Adénosine triphosphate
B5	: Milieu Gamborg, Miller et Ojima (1968)
CE, CNE	: Cellules embryogènes, cellules non embryogènes
Cell	: Cellule(s)
CPR	: Taux de production en $\text{CO}_2$ ( $\text{mM.h}^{-1}$ )
DO	: Concentration en oxygène dissous (%)
EG, EC, ET	: Embryon globulaire, embryon coeur, embryon torpille
ES, EZ	: Embryon somatique, embryon zygotique
Fe-EDTA	: Fer chélaté à de l'acide éthylènediaminetétraacétate
HRE	: Humidité relative à l'équilibre
I	: Temps d'inoculation
IAA	: Acide indole acétique
MC	: Méthode de production classique
MI, MP	: Milieu d'induction, milieu de production
MPD	: Méthode de production par paliers de densité
MPE	: Masses proembryonnaires
MS	: Milieu de Murashige et Skoog (1962)

**LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS (SUITE)**

OTR	: Taux de transfert en oxygène ( $\text{mM.h}^{-1}$ )
OUR	: Taux de consommation en oxygène ( $\text{mM.h}^{-1}$ )
P	: Plantule
PE	: Protéine extracellulaire
PEG	: Polyéthylène glycol
PS, PH	: Poids sec, poids humide
$q_s^c$	: Taux de consommation d'un substrat (S) des cellules ( $\mu\text{mole.j}^{-1}.(10^6\text{cell})^{-1}$ )
rpm	: Tours par minute
RQ	: Coefficient respiratoire
VPP	: Voie des pentoses phosphates
$Y_s^c$	: Rendement de consommation des cellules vis à vis d'un substrat (S) ( $\text{nb cell.mmmole}^{-1}$ )

## LISTE DES ANNEXES

<i>ANNEXE 1: GÉNÉRALITÉS SUR LES PHYTOHORMONES .....</i>	<i>196</i>
<i>ANNEXE 2: COMPOSITION DÉTAILLÉE DES MILIEUX DE CULTURE .....</i>	<i>198</i>
<i>ANNEXE 3: RÉSULTATS OBTENUS EN MODE DE PRODUCTION</i>	
<i>CLASSIQUE.....</i>	<i>201</i>
<i>ANNEXE 4: RÉSULTATS OBTENUS PAR PALIERS DE DENSITE .....</i>	<i>203</i>
<i>ANNEXE 5: ESTIMATION DU NOMBRE D'EMBRYONS AU STADE</i>	
<i>GLOBULAIRE ET COEUR, EXEMPLE DE LA CUVÉE B8 .....</i>	<i>205</i>
<i>ANNEXE 6: ESTIMATION DU NOMBRE D'EMBRYONS AU STADE</i>	
<i>GLOBULAIRE ET COEUR, EXEMPLE DE LA CUVÉE B9. ....</i>	<i>208</i>
<i>ANNEXE 7: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B8.....</i>	<i>210</i>
<i>ANNEXE 8: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE F8-R.....</i>	<i>211</i>
<i>ANNEXE 9: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B16.....</i>	<i>212</i>
<i>ANNEXE 10: GRAPHIQUE RÉCAPITULATIF DE LA CUVÉE B16 .....</i>	<i>213</i>
<i>ANNEXE 11: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B9.....</i>	<i>214</i>
<i>ANNEXE 12: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE F9-R.....</i>	<i>215</i>
<i>ANNEXE 13: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B13.....</i>	<i>216</i>
<i>ANNEXE 14: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B10.....</i>	<i>217</i>
<i>ANNEXE 15: RÉSULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B15.....</i>	<i>218</i>

## 1. INTRODUCTION

L'émergence au début des années 70 du génie génétique et de la biologie moléculaire a donné naissance à une nouvelle génération de super-plantes: les plantes transgéniques. Ces plantes élités issues d'hybridations inter-espèces ou de manipulations génétiques possèdent d'étonnantes capacités comme la résistance au gel, à la sécheresse, aux herbicides et à de nombreuses autres agressions environnementales. Cependant, ces plantes modifiées sont incapables de transmettre leur patrimoine génétique par voie sexuée. Leur multiplication est donc tributaire des techniques de propagation clonale *in vitro* comme l'organogenèse et la culture de méristème (Raven et col. 1992b, Zryd 1988).

Jusqu'à présent, la commercialisation à grande échelle de la majorité de ces nouvelles plantes a été vouée à l'échec en raison de la faible productivité des techniques de micro-propagation classiques (Nouaille et Petiard 1988). L'embryogenèse somatique, une technique de propagation clonale à haute productivité découverte à la fin des années 50, a donc suscité un regain d'intérêt de la part de l'industrie agronomique dans les années 80.

L'embryogenèse somatique permet en effet d'obtenir en quelques mois plusieurs millions d'embryons parfaitement identiques à la plante mère. Ces embryons somatiques, issus de cellules prélevées sur le corps de la plante mère, possèdent les mêmes caractéristiques que les embryons zygotiques issus de la reproduction sexuée. Il est donc désormais possible de produire un grand nombre de clones identiques en un minimum de temps, ce qui constitue un des atouts majeurs de l'embryogenèse somatique par rapport aux autres techniques de propagation clonale.

Les nombreuses équipes qui ont travaillé sur cette technique prometteuse depuis sa découverte se sont cependant heurtées à de nombreux problèmes. Bien que des embryons somatiques aient été obtenus chez près de 100 espèces réparties dans une trentaine de familles de plantes, certaines espèces végétales comme la tomate restent

aujourd'hui encore récalcitrantes à toute tentative. De plus, la qualité des embryons produits *in vitro* est médiocre et les pourcentage de germination en sol sont encore bien décevants en comparaison de ceux des graines (moins de 50 % contre 95 % pour les graines classiques).

Ce manque de qualité a été attribuée à des variations génétiques incontrôlées qui se produisent lorsque des cellules végétales sont maintenues en culture sur de longues périodes (Caligari et Shohet 1993, Lee et Philipps 1988, Reisch 1983). Le manque de synchronisme du développement des embryons cultivés pourrait également être responsable pour une grande part des anormalités et des arrêts développementaux qui sont observés *in vitro*.

Les procédés de production actuels possèdent une autre lacune importante : l'impossibilité de conserver les embryons somatiques produits sans altérer leur germinabilité post-récolte. Alors que dans la graine, le développement de l'embryon zygotique cesse lorsqu'il atteint sa pleine maturité, les embryons cultivés *in vitro* poursuivent leur croissance et germent en culture dès que le développement embryonnaire est achevé.

Cette germination en culture provoque l'arrêt du développement des embryons immatures présents dans le milieu de culture, ce qui diminue significativement la productivité du procédé. Mais surtout, elle rend la manipulation des plantules particulièrement difficile et implique leur repiquage immédiat après leur récolte. En pratique, il est cependant impossible de produire les embryons directement sur leur lieu de plantation. Une méthode de conservation des embryons avant leur germination est donc nécessaire afin de pouvoir en différer le semis.

Jusqu'à présent, deux voies ont été principalement explorées afin de conserver les embryons somatiques à l'état non germé. La première implique l'ajout

d'acide abscissique, une phytohormone qui inhibe la division et l'élongation cellulaire, dans le milieu de culture (Attree 1991, Iida et col. 1992, Von Arnold et col. 1988, Walton 1977). D'autres auteurs se sont plutôt intéressés à une méthode de conservation par séchage des embryons avec ou sans traitement à l'ABA (Attree 1991, Iida et col. 1992, Seneratna et col. 1990). Cependant, ces traitements provoquent une diminution significative du pourcentage de germination post-récolte des embryons traités, qui sont 2 à 20 fois inférieurs à ceux des embryons non-traités (Carman 1989). De plus, le moment où ils sont appliqués est crucial pour assurer leur efficacité aussi bien que la survie de l'embryon.

Avant d'essayer de contrôler la germination en culture, il semble donc primordial de synchroniser au préalable la production des embryons. Cette synchronisation reste cependant délicate puisqu'aucune des différentes techniques utilisées jusqu'ici (tri des inocula, traitements chimiques, chocs anoxiques ou osmotiques) n'a jusqu'à présent été couronnée de succès.

Dans ce contexte, ce projet de recherche vise à contrôler la germination avant récolte des embryons produits *in vitro*, qui constitue un obstacle majeur à l'utilisation industrielle éventuelle des embryons somatiques. Pour atteindre cet objectif, le travail expérimental a été orienté dans deux voies distinctes mais complémentaires. Dans un premier temps, nous avons cherché à synchroniser le développement des embryons lors de la production par l'intermédiaire de techniques simples et faciles à mettre en oeuvre. Une fois cette étape franchie, nous avons étudié l'effet de divers traitements sur la germination en culture de la population d'embryons synchrones obtenue.



## **2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **2.1. POURQUOI PRODUIRE DES EMBRYONS SOMATIQUES ET COMMENT ?**

#### **2.1.1. LA MAGIE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE**

Les plantes supérieures possèdent une des propriétés les plus énigmatique et fascinante du monde vivant : la capacité de recréer un individu entier à partir d'une seule cellule, sans avoir recours à la reproduction sexuée. Cette propriété des cellules de plantes, la totipotence, est à l'origine d'embryons provenant du corps même de la plante, que l'on appelle des embryons somatiques (du grec *soma*, signifiant corps) en opposition aux embryons zygotiques (du grec *zygo*, oeuf) qui sont issus de la reproduction sexuée.

Bien que la présence dans la nature d'embryons somatiques (ES) ait été rapportée depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle chez les agrumes et le pissenlit, il fallut attendre les années cinquante, et les progrès constants effectués dans le domaine de la culture de cellules de plante depuis le début du siècle, pour qu'enfin Stewart et coll. en 1958 et Reinert en 1959 obtiennent les premiers embryons somatiques de carotte *in vitro*.

#### **2.1.2. INTÉRÊTS DE LA CULTURE D'EMBRYONS**

Les progrès effectués dans le domaine du génie génétique lors des dernières décennies permettent aujourd'hui la création de nouvelles plantes élites capables de résister aux insectes ravageurs, à la sécheresse, au gel et à nombre d'agressions environnementales (Demarly et Sibi 1989, Le Deunff 1993).

Cependant, ces super-plantes obtenues par le biais d'hybridations inter-espèces (fusion de protoplaste) ou par transfert de gènes (génie génétique) sont

incapables de transmettre leurs nouvelles aptitudes par voie sexuée. Afin de propager ces plantes transformées, il faut par conséquent avoir recours à des techniques de multiplication clonale comme le bouturage ou l'organogenèse *in vitro*.

L'exploitation de certaines plantes transgéniques, comme le blé transformé et plus généralement toutes les espèces cultivées en plein champs, se heurte donc aujourd'hui aux faibles rendements des techniques de micro-propagation classiques qui augmentent les coûts de production bien au delà du seuil de rentabilité. Il en est de même pour toutes les espèces dont la reproduction sexuée est difficile et pour lesquelles la micro-propagation est trop coûteuse, comme les arbres ligneux forestiers (i.e. l'épinette) et certains arbres fruitiers (i.e. le bananier) (Bazinet 1994, Nouaille et Petiard 1988).

L'embryogenèse somatique constitue donc, entre autre, le passage obligé vers l'exploitation future des nombreuses ressources du génie génétique végétal. Cette technique de micro-propagation clonale permet d'obtenir des embryons génétiquement identiques à la plante mère (des clones) qui possèdent toutes les qualités et capacités des embryons zygotiques, c'est-à-dire une structure bipolaire avec un méristème à chaque extrémité qui deviendra respectivement la tige et la racine de la future plante.

Contrairement aux diverses autres techniques de propagation végétative (bouturage, drageonnage, marcottage, organogenèse *in vitro*, etc.), les rendements de l'embryogenèse somatique sont élevés. Cette technique permet en effet l'obtention rapide de plusieurs millions de jeunes plants identiques, ce qui en fait la plus productive de toutes les techniques de micro-propagation connues à ce jour (Ammirato 1986, Ammirato et Styer 1985, Levin et col. 1988).

De nombreux travaux s'orientent également vers la production de graines artificielles (les "synseeds" de l'anglais SYNthetic SEEDS) à partir d'embryons

somatiques. Les embryons produits *in vitro* sont alors encapsulés et pelliculés de façon à recréer les tissus accessoires (enveloppe et réserves alimentaires) présents dans la graine et qui permettent aux embryons zygotiques de se développer de façon autonome.

Les embryons somatiques encapsulés pourraient ainsi être traités de manière à présenter les mêmes caractéristiques de conservation et de conversion en plantes que les vraies graines, ce qui permettrait de propager en masse des plantes modifiées dont la propagation végétative était jusqu'ici impossible parce que trop chère. Le coût de revient d'une semence artificielles obtenue à partir d'un embryon somatique pourrait être équivalent à celui d'une graine de tomate hybride (Nouaille et Petiard, 1988). Ce coût devra cependant être encore abaissé afin de pouvoir commercialiser des semences de céréales et d'autres plantes de plein champs.

La possibilité de produire une grande quantité d'embryons au même stade de développement ouvre également des portes du point de vue de la recherche fondamentale et appliquée. Jusqu'à présent, les aspects métaboliques et biochimiques de l'embryogenèse végétale *in vivo* demeurent très mal connus car il est pratiquement impossible de recueillir des données *in situ* sans modifier l'environnement de l'embryon (Zryd, 1988). L'embryogenèse *in vitro* constitue donc un outil de recherche exceptionnel afin d'appréhender le comportement morpho-génétique et biochimique des embryons végétaux (Gray et Purohit 1991). Elle permet, entre autres, d'accumuler des données sur les événements biochimiques et moléculaires qui ont lieu lors de l'embryogenèse, la maturation des embryons et la germination.

### 2.1.3. EMBRYON ZYGOTIQUE OU SOMATIQUE: QUELLE DIFFÉRENCE ?

La principale différence qui existe entre les embryons zygotiques et somatiques est leur provenance respective. Les embryons zygotiques sont le résultat de la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde pour donner un troisième individu

différent et unique, issu de la reproduction sexuée. L'embryon somatique lui, est le sosie rigoureusement identique de sa mère: un clone issu de la reproduction végétative.

Mais d'un point de vue physiologique et morphologique, qu'est-ce qui différencie ces deux types d'embryons? De nombreux auteurs ont constaté que les embryons somatiques (ES) produits *in vitro* se développent différemment des embryons zygotiques (EZ) rencontrés *in vivo*. Les embryons obtenus *in vitro* peuvent ainsi présenter un certain nombre d'anormalités qui sont inexistantes dans la nature, comme un nombre aberrant de cotylédons, la formation de plusieurs embryons liés en amas, une morphologie anormale ou un arrêt du développement de l'embryon à un stade immature (Huang et col. 1992).

D'autres auteurs, comme Halperin et Wetherell en 1964, ont surtout mis l'accent sur les similitudes qui existent entre les différents stades morphologiques de l'embryogenèse zygotique et somatique *in vitro*. Ils ont constaté que, sortis de la poche protectrice de l'ovule, les embryons zygotiques cultivés *in vitro* rencontrent les mêmes blocages et anormalités rapportés à tort comme étant spécifiques aux embryons somatiques (Gray et Purohit 1991).

Ainsi, bien plus que des différences entre la nature somatique ou zygotique des embryons, ce sont plutôt les différences entre les environnements rencontrés *in vivo* et *in vitro* qui sont responsables des anomalies de développement observées chez les embryons cultivés. Dans la graine, le milieu et les conditions environnementales s'adaptent en continu aux besoins changeants de l'embryon au cours de son développement. Comparé à la grande variabilité des régimes nutritionnels et hormonaux des embryons zygotiques dans le temps et selon les espèces, les trois ou quatre milieux de culture synthétiques utilisés *in vitro* semblent bien insuffisants (Gray et Purohit 1991). En fait, les conditions de cultures employées en embryogenèse somatique sont encore très largement empiriques et demandent encore un gros travail d'optimisation (Carman 1989).

C'est au prix de cette optimisation que disparaîtront les nombreux blocages développementaux, les anormalités, les faibles pourcentages de germination et de conversion en plantes constatés aujourd'hui au sein des populations d'embryons somatiques produits *in vitro*. C'est enfin grâce à une meilleure compréhension des processus impliqués lors de l'embryogenèse, de la maturation et de la germination que l'on réussira à produire des semences artificielles présentant cette phase de vie ralentie (la quiescence) qui fait actuellement défaut aux embryons cultivés et qui permet pourtant la conservation des embryons dans la graine.

#### 2.1.4. LA CAROTTE: UN MODÈLE

Depuis les premiers travaux de Stewart et coll. (1958) et Reinert (1959), la carotte (*Daucus carota* L.) a servi de modèle pour la compréhension des mécanismes complexes liés à l'embryogenèse des plantes dicotylédones. Un nombre impressionnant de travaux ont ainsi été menés sur cette ombellifère depuis quelques décennies, ce qui en fait un des végétaux les plus étudiés au monde.

L'embryogenèse somatique a été décrite chez une centaine d'espèces végétales parmi lesquelles des céréales (le blé (Carman 1989), l'orge (Vasil et col. 1990, Norstog et Klein 1972)), des espèces forestières (l'épinette, l'épicéa, le pin), des plantes tropicales récalcitrantes (le bananier, le manguier (Litz et col. 1993)) des légumineuses (le pois, le haricot (Kysely et Jacobsen 1990)) et d'autres ombellifères (le persil, le céleri (Nadel et col. 1989)).

De ces nombreux travaux, il ressort qu'en matière de culture de cellules et d'embryogenèse végétale, toute généralisation d'une espèce à l'autre, d'une variété à l'autre et même d'une lignée cellulaire à l'autre reste délicate (Ammirato 1983). Néanmoins, la carotte constitue un modèle de choix pour étudier le développement des embryons végétaux, parce qu'elle se prête exceptionnellement bien à l'embryogenèse *in*

*vitro* et qu'elle reste une espèce végétale largement étudiée dans des domaines aussi variés que la culture de cellules, le génie génétique et la biologie moléculaire.

## **2.1.5. LES LIMITATIONS DE L'EMBRYOGENÈSE IN VITRO**

### **2.1.5.1. Les espèces récalcitrantes**

Bien que des embryons somatiques aient été obtenus parmi une trentaine de familles différentes de plantes, il demeure des espèces récalcitrantes qui se prêtent difficilement aux techniques d'embryogenèse somatique. La tomate est par exemple de celles-là, ainsi que nombres d'espèces de légumineuses, de graminées et plus généralement la majorité des plantes monocotylédones (Ammirato 1983, Nouaille et Petiard 1988).

De fait, l'embryogenèse somatique ne semble pas constituer un phénomène commun à toutes les espèces végétales. Aujourd'hui encore, on ne sait pas si ces difficultés sont liées à des conditions de culture mal adaptées ou à une incapacité intrinsèque de certaines espèces ou variétés végétales à produire des embryons somatiques. Quoi qu'il en soit, l'utilisation de l'embryogenèse somatique reste limitée à un nombre relativement restreint d'espèces.

### **2.1.5.2. La mauvaise qualité des embryons produits**

La production d'embryons *in vitro* est aujourd'hui encore largement tributaire de méthodes empiriques. Les méthodes classiques de production et les milieux employés sont en général mal adaptés aux besoins spécifiques des embryons qui, en conséquence, sont loin d'être aussi robustes et vigoureux que les embryons issus de graines (Gray et Purohit 1991).

On constate en effet au sein des populations d'embryons produits *in vitro* de très nombreuses anomalies, des blocages développementaux (Huang et col.

1992), de la germination précoce (germination en culture des embryons immatures) et des pourcentage de germination après récolte plutôt médiocres (le plus souvent moins de 50 % contre près de 95 % pour les graines conventionnelles (Molle et col. 1993)).

De plus, certains auteurs comme Caligari et Shohet (1993) ont détecté des anomalies chromosomiques au sein de populations d'embryons pourtant obtenues à partir du même explant, donc de la même plante mère. Ces faux clones seraient le résultat de variations génétiques incontrôlées qui surviendraient pendant la phase d'induction du procédé de production. Chez le céleri et la carotte, on estime que près de 80 % des cellules cultivées *in vitro* présentent un contenu chromosomique anormal après six mois de culture (Smith et Street 1974).

Ces variations génétiques (appelées variations somaclonales) seraient dues à la présence d'agents mutagènes dans le milieu, comme le 2,4-D, une phytohormone synthétique utilisée pour stimuler la prolifération des cellules végétales *in vitro* (Peschke et Philipps 1992). Elles ont aussi été attribuées à la mauvaise formulation des milieux de cultures utilisés et aux méthodes de repiquage des cellules qui favoriseraient la sélection des cellules anormales (Caligari et Shohet 1993, Peschke et Philipps 1992).

Ce manque d'uniformité des cultures d'embryons ajoute encore à la mauvaise qualité générale des embryons produits. Or l'obtention d'embryons de qualité est le premier critère à satisfaire pour parvenir un jour à la production en masse de graines artificielles uniformes (Nouaille et Petiard 1988, Onishi et col. 1994). Afin de rencontrer cet objectif, il est donc impératif de mieux cerner les besoins nutritionnels et environnementaux des embryons à chacun des différents stades de leur développement.

#### 2.1.5.3. La fragilité des embryons somatiques

Contrairement à ce qui se passe *in vivo* où les embryons zygotiques sont protégés par l'enveloppe de la graine et alimentés par les tissus nourriciers jusqu'à ce qu'ils soient devenus une jeune plante autonome, les embryons cultivés sont particulièrement fragiles et démunis à la sortie du procédé de culture.

Dans la nature, il existe trois principaux types de graines. Les graines dites exalbuminées, comme le pois et le haricot, sont composées majoritairement de l'embryon entouré de son enveloppe. Chez ces espèces, l'embryon possède dans ses cotylédons toutes les réserves nécessaires à sa germination et il peut donc se développer de façon autonome. Ce type d'embryon est le candidat parfait pour devenir une graine artificielle dans la mesure où il est capable de subvenir seul à ses besoins nutritionnels.

Par contre, chez les graines à périsperme (comme le blé, le maïs et la betterave) et les graines albuminées (comme la carotte et le céleri), l'embryon ne représente qu'une infime partie de la graine. Pour ces espèces, la majorité des réserves nécessaires à la germination de l'embryon sont contenues dans les tissus nourriciers qui l'entourent (Lafon et col. 1985).

L'embryon nu (sans les tissus accessoires) tel qu'il est produit *in vitro* ne peut donc pas germer et se développer en plante par lui-même. Il faut recréer pour lui des tissus accessoires artificiels capables de le nourrir et de le protéger. La phase de production des embryons n'est donc que la première étape conduisant à l'obtention d'une semence artificielle à part entière.

#### 2.1.5.4. La conservation des embryons

Le développement des embryons produits *in vitro* ne cesse pas à la fin de la période de maturation, comme c'est le cas dans la graine. Au contraire, les embryons cultivés poursuivent leur croissance et germent en culture sans observer de période de repos. Pour poursuivre leur développement et devenir une plante adulte, ils



doivent donc être immédiatement repiqués dans des conditions adéquates. Cependant, il est parfois nécessaire de différer les semis, ce qui suppose la mise au point de méthodes pour limiter la germination en culture et pour conserver les embryons récoltés (Nouailles et Pétiard 1988). Bien que plusieurs méthodes aient été envisagées pour stopper le développement des embryons (cryopréservation, modification de l'environnement gazeux, traitement à l'ABA, déshydratation, etc), elles provoquent toutes une diminution significative de leurs capacités germinatives à court ou moyen terme (Nouaille et Pétiard 1988, Molle et col. 1993).

#### 2.1.5.5. Le maintien de la biodiversité

L'embryogenèse somatique produit des clones rigoureusement identiques à la plante mère. Elle permet donc la multiplication à grande échelle de plants élités, au détriment d'autres, moins performants. Ainsi, si dans le futur cette technique de micropropagation se généralise, elle peut en peu de temps appauvrir considérablement le patrimoine génétique des espèces végétales cultivées. Afin de préserver la biodiversité de ces espèces, il est donc important de conserver les cultivars de moindre intérêt agronomique qui peuvent néanmoins présenter des avantages génétiques cachés (Gray et Compton 1993).

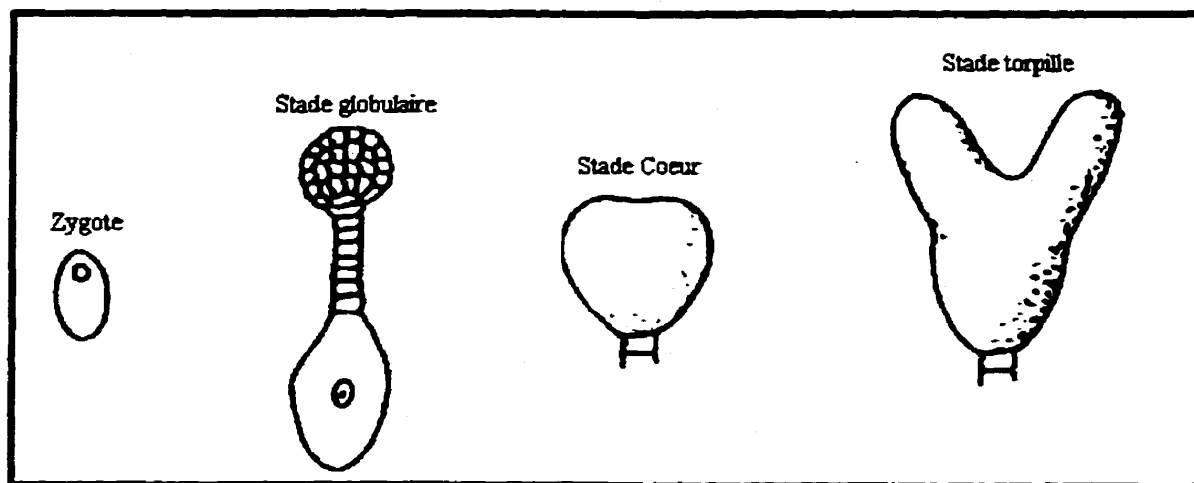
Plus que jamais, il est de la responsabilité des biotechnologues et des agronomes de constituer de vastes banques de gènes afin de conserver la biodiversité des espèces domestiques et sauvages. L'embryogenèse somatique peut alors permettre de multiplier presque à l'infini les copies du génome des espèces à préserver, et ce bien plus fidèlement et rapidement que par la reproduction sexuée. Les coûts de constitution et de maintenance des banques de gènes s'en trouveraient ainsi considérablement réduits, permettant la sauvegarde de plus d'espèces.

## **2.2. EMBRYOGENÈSE DE LA CAROTTE IN VIVO**

### **2.2.1. ÉVÉNEMENTS MORPHOLOGIQUES**

Dès que la pollinisation a eu lieu, une cascade d'étapes morphogénétiques prend place au sein de l'ovule. Les deux zygotes issus de la double pollinisation ont des destinées différentes, le zygote principal donnant l'embryon et le suspenseur (tissu qui relie l'embryon au reste de la plante pendant les premières phases du développement) alors que le zygote accessoire donne naissance à l'albumen ou à l'endosperme de la graine (tissus accessoires). L'ovule, quant à lui, deviendra l'enveloppe de la graine.

Les différentes étapes de l'embryogenèse zygotique chez les plantes dicotylécones ont été classées selon des stades morphologiques distinctifs (voir figure 2.1). Les cellules embryonnaires entrent tout d'abord dans une phase de division active (étape de prolifération) pour donner naissance à un embryon globuleux composé de cellules indifférenciées (stade globulaire). Puis, le rythme des divisions cellulaires diminue. L'embryon commence à se différencier (étape de morphogenèse) et les différents tissus de la plante se mettent en place. L'embryon s'allonge selon un axe à chaque extrémité duquel apparaissent les futurs méristèmes apical et racinaire. Les cotylédons prennent forme et l'embryon adopte alors la forme d'un coeur (stade cordiforme).



**Figure 2.1: Représentation schématique des différents stades du développement des embryons zygotiques chez la carotte**

L'embryon amorce alors une troisième phase (étape de maturation) pendant laquelle les cellules s'allongent et les tissus et organes ébauchés au stade coeur finissent de se développer (stade Torpille). A la fin de cette étape, la graine accumule dans les cotylédons ou dans les tissus accessoires les réserves qui lui seront nécessaires lors de la germination. L'embryon, qui a acquis sa forme et son poids définitifs, se dessèche progressivement et son développement cesse (période de quiescence) jusqu'à la germination (Raven et col 1992<sup>d</sup>).

## 2.2.2. RÉGULATION DE L'EMBRYOGENÈSE

### 2.2.2.1. Généralités sur les phytohormones

Contrairement à, ce qui se passe chez les animaux, les tissus et les organes des plantes (feuilles, tiges, racines et organes reproducteurs) se développent après la germination et non pas durant l'embryogenèse. La régulation de ces processus nous est encore largement inconnue, mais il apparaît clairement que le développement

normal des plantes dépend de nombreux facteurs externes (la lumière, la température, la longueur du jour, etc.) et internes.

Les principaux facteurs internes mis en jeu lors de la régulation de la croissance et du développement des plantes sont de nature chimique. Ces composés organiques hydrosolubles appelés phytohormones (ou régulateurs de croissance) sont actifs en très faibles concentrations (de l'ordre de quelques  $\mu\text{g}$  par kg de matériel végétal) et agissent le plus souvent en combinaison (Darnell et col. 1988, Raven et col. 1992<sup>b</sup>). Leur action dépend non seulement de leur concentration mais aussi de la façon dont ils sont interprétés par la cellule, puisqu'une même concentration de phytohormone peut provoquer une réponse différente selon la nature et l'âge du tissu cible.

Cinq groupes principaux de phytohormones ont été identifiés jusqu'à présent : les auxines, les cytokinines, l'éthylène, l'acide abscissique et les gibbérellines. Dans la plante, ces molécules agissent ensembles, créant des équilibres et des déséquilibres hormonaux qui régulent la croissance et le développement. Les principales propriétés des phytohormones dont il sera souvent question dans le reste du texte sont présentées en annexe 1.

#### 2.2.2.2. Différenciation et morphogenèse

Le passage du stade globulaire (embryon indifférencié) au stade coeur (embryon différencié) est une étape cruciale du développement embryonnaire des plantes à graines. Lors de ce processus, certains groupes de cellules continuent à se diviser activement à certains sites spécifiques de l'embryon alors que d'autres ne se divisent plus, ce qui donne naissance à la forme en coeur. En même temps, les cellules centrales de l'embryon se différencient pour former un tissu vascularisé tout le long de l'axe embryonnaire.

Bien que les processus impliqués lors de la régulation de la différenciation soient encore mal connus chez les plantes, de nombreux travaux ont démontré le rôle déterminant des phytohormones dans ce phénomène. Entre autre, il a été démontré que des gradients de concentration en auxine et en sucrose contrôlent le degré de différenciation des cellules chez le lys (Raven et col. 1992<sup>b</sup>).

Ces mêmes auxines sont capables d'initier la formation de racines adventives à faible concentration et de l'inhiber à forte concentration. Différentes concentrations en auxine, cytokinine et gibberelline sont capables d'induire soit la formation de feuilles, soit la formation de racines ou encore la prolifération indifférenciée chez des explants de feuille de tomate (Kantha 1976). Comme chez l'animal, la différenciation et la division cellulaire chez les plantes semblent donc contrôlées par les différentes concentrations en hormones et en substrats reçues par chacune des cellules.

En 1992, dans leur tentative de formuler un modèle morphogénétique du développement embryonnaire, Vits et ses collaborateurs ont réussi à simuler la formation d'un embryon cordiforme à partir d'une structure globulaire. Pour ce faire, ils ont émis l'hypothèse selon laquelle la diffusion des substrats de l'extérieur vers l'intérieur de l'embryon globulaire devient limitante lorsque ce dernier atteint un certain diamètre. Cette limitation en substrats provoquerait l'arrêt de la division des cellules du centre de l'embryon et l'émission par celles-ci d'une phytohormone (probablement une auxine) qui diffuserait dans le reste de l'embryon.

Les gradients de concentration en phytohormones ainsi créés seraient surimposés avec les gradients de substrats déjà existants et provoqueraient l'arrêt de la division de certaines cellules (près du méristème apical), la division active d'autres cellules plus éloignées (cellules des cotylédons et de l'extrémité racinaire) et enfin la différenciation des cellules centrales de l'embryon (apparition du tissu vascularisé le long de l'axe embryonnaire). Cette bande de tissus vascularisés permettrait alors à

l'embryon d'alimenter en substrats ses cellules centrales et de poursuivre son développement.

Ces hypothèses, par ailleurs étayées par nombre de preuves expérimentales, proposent un mécanisme basé sur le fait que la forme en coeur est due aux taux de croissance cellulaires différents de chacun des tissus de l'embryon. Il reste cependant de larges zones d'ombre. Comment par exemple l'axe embryonnaire tige-racine prend-t-il naissance au sein de l'embryon globulaire, qui possède une symétrie radiale? Si l'influence du suspenseur et des champs électriques entourants l'embryon a été évoquée, beaucoup reste encore à faire pour valider une quelconque hypothèse.

### 2.2.3. NUTRITION ET ENVIRONNEMENT DE L'EMBRYON

On connaît peu de choses sur l'environnement hormonal et nutritionnel de l'embryon *in vivo*. Dans la graine, l'embryon baigne dans un liquide dont la composition change constamment pour s'adapter à ses besoins (Gray et Purohit 1991). Les tissus accessoires jouent en quelque sorte le rôle de réservoir tampon entre la plante nourricière et l'embryon, de façon à ce que les conditions extérieures influent le moins possible sur le développement embryonnaire.

#### 2.2.3.1. L'environnement in ovulo

Lorsqu'un embryon se développe dans l'ovule, il est très étroitement dépendant pour sa nutrition des tissus maternels, mais il devient progressivement autonome au cours de la formation de la graine. Quelques caractéristiques physico-chimiques du milieu dans lequel baigne l'embryon *in vivo* sont connues pour des plantes à gros ovules. Ces données révèlent que l'osmolarité varie tout au long du développement de l'embryon. Il est maximal dans l'ovule non fécondé (0,4 à 0,5 osmole, ce qui correspond à 130 g.l<sup>-1</sup> de sucrose) et diminue peu à peu jusqu'à un

potentiel osmotique presque nul ou même positif pour l'embryon mature prêt à germer (Zryd 1988, Ryczkowsky 1969, Wang et col. 1987 et Yeung et Brown 1982).

#### 2.2.3.2. Les échanges gazeux

Dans les graines matures, les tissus accessoires et l'enveloppe constituent une barrière à la diffusion des gaz (Black 1972, Gray et Purohit 1991, Khan 1977). Les concentrations en oxygène disponibles *in ovulo* ont été estimées à l'aide de modèles mathématiques (Collis-George et Melville 1974). Ces modèles prédisent que les concentrations en oxygène dissous (DO) dans les graines sont susceptibles de limiter la respiration aérobie (phosphorylation oxydative). L'équilibre qui s'établit dans la graine entre les phénomènes de diffusion et de respiration dépend, entre autres, de la composition du liquide ovulaire qui affecte la solubilité de l'oxygène, de l'âge de l'embryon qui affecte sa demande en oxygène et de la température.

Le liquide ovulaire étant particulièrement riche en composés osmotiquement actifs au moment de la fécondation et le jeune embryon possédant encore relativement peu de cellules dans les premiers jours de son développement, on considère que l'initiation et la différenciation des embryons zygotiques a lieu à de faibles concentrations en oxygène (Collis-George et Melville 1974).

#### 2.2.3.3. Les phytohormones

La fécondation provoque une série de modifications très rapides du milieu ovulaire. Chez le blé, la concentration en cytokinine passe en quatre jours de presque 0 à 180  $\mu\text{mole.l}^{-1}$  en équivalent zéatine, ce qui stimule la formation de l'endosperme nécessaire au développement de l'embryon. Par la suite, la concentration *in ovulo* de cytokinines décroît en même temps que l'embryon se différencie et que les réserves sont consommées. Cette étape achevée, les concentrations en auxine et acide

abscissique augmentent et la graine commence à stocker des protéines de réserve (Carman 1989).

Chez la carotte, la concentration en ABA augmente dans la graine à partir du stade coeur (Kamada et Harada 1981). Cette synthèse d'ABA est corrélée avec le début de la période de stockage des réserves et la diminution de la teneur en eau de l'embryon (début de la dessiccation).

### **2.3. EMBRYOGENÈSE DE LA CAROTTE IN VITRO**

#### **2.3.1. PRODUCTION D'EMBRYONS IN VITRO**

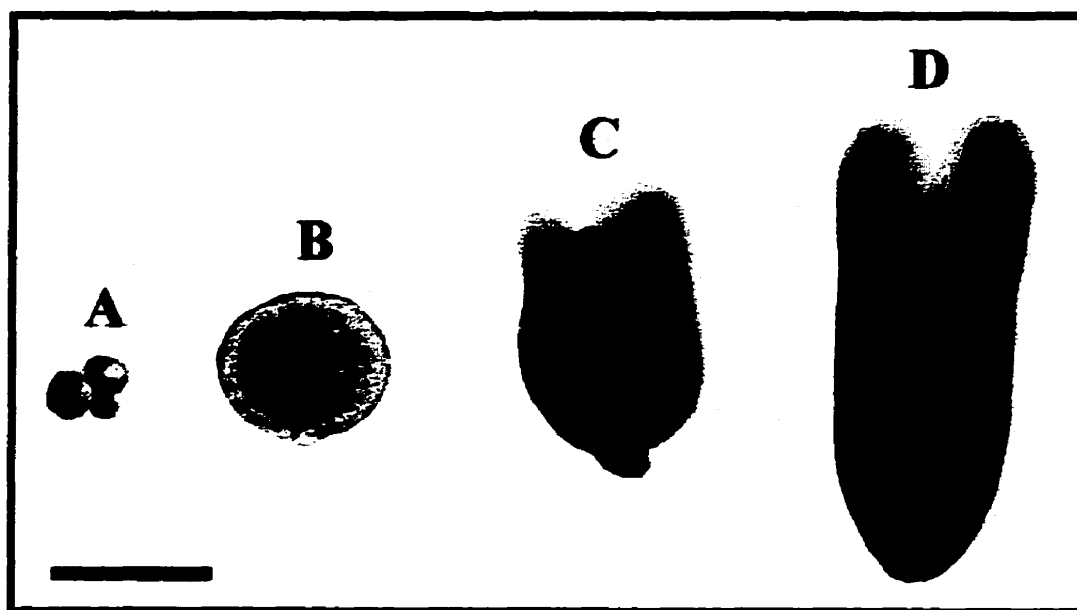
En culture en milieu liquide, les embryons somatiques se développent à partir d'amas cellulaires denses: les masses proembryonnaires (MPE). Ces amas sont composés de petites cellules rondes ayant les mêmes caractéristiques que des cellules méristématiques (cellules indifférenciées en division qui sont à l'origine des tiges et des racines). Elles possèdent un gros cytoplasme, un gros noyau et peu ou pas de vacuoles (Bazinet 1994, Lafon et col. 1985).

En présence d'auxines, ces cellules se développent en amas indifférenciés d'une vingtaine de cellules. Le milieu de culture est alors composé d'un mélange de MPE et de cellules très vacuolées isolées ou en amas de quelques cellules, qui ont des caractéristiques de cellules différenciées (forme allongée ou géométrique, petit noyau, peu de cytoplasme, une ou deux grosses vacuoles et de nombreux amyloplastes).

Le processus d'embryogenèse peut être induit de diverses façons (voir section suivante), et notamment en transférant les cellules dans un milieu dépourvu de 2,4-D. Environ trois jours après le début de l'induction, les cellules des MPE entrent en phase de division active et donnent naissance à un embryon globulaire semblable à ceux



obtenus *in vivo*, qui possède même parfois un pseudo-suspenseur (Halperin et Wetherell 1964). Les embryons cultivés passent alors par les mêmes stades morphologiques déjà décrits pour les embryons zygotiques (stade cordiforme, stade torpille, voir fig. 1.2).



**Figure 2.2: Photographies des principales étapes du développement d'un embryon somatique de carotte.**

A: Amas proembryonnaire (MPE); B: Embryon globulaire; C: Embryon coeur; D: Embryon torpille. (la barre représente 50  $\mu$ m).

Il existe cependant des différences majeures entre le développement des embryons *in vivo* et *in vitro*. Généralement, les embryons cultivés *in vitro* sont plus gros et présentent des anomalies morphologiques par rapport aux embryons *in vivo* (Ammirato 1987, Zrýd 1988). Dans bien des cas, seule une faible proportion des embryons cultivés parviennent à compléter leur cycle de développement jusqu'au stade torpille, et un plus petit nombre encore parvient à devenir une plante autotrophe (Molle et col. 1993).

En fait, chez la carotte qui est pourtant une espèce se prêtant bien à l'embryogenèse somatique, seules 20 % des MPE parviennent à produire des embryons matures normaux (Ducos et col. 1993) et moins de 50 % de ces derniers produisent ensuite une plante normale (Molle et col. 1993). Les autres MPE voient leur développement bloqués à un stade de développement immature ou souffrent d'anormalités les rendant incapables de poursuivre leur développement (Chee et Cantliffe 1989, Michaux-Ferrière et Schwendiman 1992).

Au sein de la graine, les embryons arrivés au terme de leur maturation se déshydratent progressivement et entrent en phase de quiescence. Leur métabolisme est alors considérablement ralenti, ce qui leur permet d'économiser leurs réserves et d'attendre des conditions favorables à la germination. Les embryons cultivés *in vitro*, quant à eux, ne passent pas par cette phase de déshydratation et de vie ralentie. Ceux qui parviennent au stade torpille germent le plus souvent en culture, ce qui rend leur manipulation des plus malaisée et leur conservation quasiment impossible.

### 2.3.2. INDUCTION DE L'EMBRYOGENÈSE *IN VITRO*

Il existe plusieurs moyens d'induire le processus d'embryogenèse au sein d'une culture cellulaire. Toutes les méthodes employées ont cependant un point commun, elle visent toujours à provoquer un stress auquel les cellules semblent réagir en initiant l'embryogenèse. Il est d'ailleurs bien connu en agronomie que les plantes stressées tendent à produire des graines plutôt que des feuilles ou des tiges. Lors de ces situations de stress, les cellules produisent de l'ABA endogène qui jouerait un rôle majeur, bien que mal connu, dans l'induction de l'embryogenèse.

### 2.3.2.1. Induction par un stress physique

Certains auteurs ont eu recours avec succès à un choc osmotique pour induire le processus d'embryogenèse au sein d'une culture cellulaire. Chez le céleri, il suffit de placer les cellules dans un milieu contenant 3 % de mannitol ou 12 % de sucrose pendant 72 heures pour initier l'embryogenèse (Nadel et col. 1989). Chez la carotte, un traitement plasmolysant en présence de 0,5 à 1,0 M de sucrose (180 à 360 g.l<sup>-1</sup>) permet d'arriver au même résultat (Wetherell et col. 1984, Zrýd 1988). Le choc osmotique peut également être réalisé en présence de molécules osmotiquement actives mais non assimilables comme le polyéthylène glycol (PEG) ou les sucres aromatiques (sorbitol, etc.). Les meilleurs résultats ont néanmoins été obtenus avec le sucrose (Kamada et col. 1993), qui est l'osmoticum le plus employé par les plantes.

Outre les chocs osmotiques, certains auteurs ont également induit l'embryogenèse en soumettant les cellules à un choc thermique ou mécanique, mais ces méthodes sont peu utilisées en manipulation de routine.

### 2.3.2.2. Induction par un stress chimique

L'embryogenèse peut également être induite en soumettant les cellules à un choc toxique. L'ajout de métaux lourds (comme AgNO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, etc.) ou de 2,4-D (à l'origine un herbicide) dans le milieu stimule l'induction de l'embryogenèse somatique chez la carotte (Roustan et col. 1989) et l'épicéa (Kong et Yeung 1995). Chez la carotte, les embryons sont le plus souvent produits simplement en transférant les cellules embryogènes d'un milieu contenant du 2,4-D à un milieu qui en est dépourvu.

### 2.3.2.3. Mécanismes d'induction

Deux théories s'affrontent quant aux mécanismes impliqués lors de l'induction de l'embryogenèse *in vitro* : le redéterminisme et le prédéterminisme. La

théorie du redéterminisme affirme que dans certaines conditions (par exemple en présence de 2,4-D), les cellules différenciées de l'explant entameraient un processus de dédifférenciation et redeviendraient des cellules méristématiques (non différenciées et embryogènes). Les cellules végétales seraient donc capables de rembobiner la cassette de leur programmation génétique pour revenir à leur forme juvénile indifférenciée. Placées dans le milieu de production, les cellules redémarreraient leur programme génétique remis à zéro pour donner naissance à un embryon somatique (Carman et Campbell 1990, Zryd 1988°).

D'autres auteurs proposent plutôt un autre scénario selon lequel certaines cellules de l'explant conserveraient leur nature méristématique et seraient capables de redonner des organes ou des individus entiers lorsque les conditions sont favorables. L'ajout et le retrait des auxines dans le milieu permettrait donc à certaines cellules prédéterminées de l'explant d'exprimer leur potentiel intrinsèque à produire des embryons somatiques (Thorpe 1988, Nadel et col. 1989). Cette deuxième théorie permettrait d'expliquer la présence conjointe de cellules embryogènes et non embryogènes dans des cultures provenant pourtant d'un même explant.

### 2.3.3. RÉGULATION DE L'EMBRYOGENÈSE IN VITRO

#### 2.3.3.1. Les phytohormones

De plus en plus de travaux démontrent l'importance du rôle des phytohormones dans le contrôle de l'embryogenèse, de la maturation et de la germination des plantes. *In vitro* cependant, l'ajout de phytohormones dans le milieu d'induction ou de production des embryons est souvent de peu d'intérêt dans le cas de cultures asynchrones, c'est-à-dire lorsque tous les stades embryonnaires sont présents en même temps dans le milieu de culture (Carman 1989).

Par exemple, la simulation *in vitro* des niveaux de cytokinines observés *in vivo* n'améliore pas sensiblement la production d'embryons (Carman et col. 1988<sup>a</sup>, Carman et col. 1988<sup>b</sup>, Papenfuss et Carman 1989). Diverses phytohormones, parmi lesquelles des auxines, des cytokinines, des gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscissique, inhibent l'initiation et / ou du développement des embryons lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de production (Fujimura et Komamine 1975, Kamada et Harada 1981, Tissera et Murashige 1977).

Le 2,4-D, par exemple, bloque le développement des embryons au stade des MPE et favorise la prolifération cellulaire (Halperin et Wetherell 1964). De même, l'éthylène inhibe fortement l'embryogenèse somatique des cals de carotte (Tissera et Murashige 1977, Biddington 1992) et la germination. A l'inverse, l'inhibition de la synthèse d'éthylène (en présence d'acide salicylique, d'acide acétylsalicylique ou de cations de métaux lourds) stimule la production d'embryons (Roustan et col. 1990).

Dans leurs travaux publiés en 1981, Kamada et Harada se sont intéressés aux concentrations en ABA endogène (ABA<sub>endo</sub>) présentes dans des embryons somatiques de carotte produits *in vitro*. Ils ont constaté que les concentrations en ABA<sub>endo</sub> sont très faibles dans les MPE et les jeunes embryons jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade coeur. Lorsque la phase de différenciation est achevée, la concentration augmente alors rapidement et atteint un maximum de 40 ng.g<sup>-1</sup> (matière humide) au stade torpille pour ensuite diminuer.

Pourtant, l'ajout d'ABA exogène (ABA<sub>exo</sub>) dans le milieu de production diminue le nombre total d'embryons et le nombre d'embryons torpilles formés, et ce d'autant plus que l'ajout est effectué tardivement (diminution du nombre d'embryons torpilles de 16 % pour un ajout continu, 4 % pour un ajout pendant les 7 premiers jours et 24 % pour un ajout effectué pendant les 7 derniers jours (Kamada et Harada 1981)). En 1988, Carman a démontré qu'en simulant les concentrations d'ABA *in ovulo* chez le

blé pendant l'induction, le pourcentage d'anormalités et de germination précoce diminuait mais le nombre total d'embryons formés également (Carman et col. 1988<sup>b</sup>).

#### 2.3.3.2. L'oxygène et le dioxyde de carbone

A la lecture des nombreux travaux effectués jusqu'à ce jour en embryogenèse somatique, on constate que la quantité d'oxygène requise pour induire la production d'embryons varie énormément d'une espèce à l'autre et même, d'une lignée cellulaire à l'autre.

Pour le poinsettia et l'alfalfa, la majorité des auteurs ont utilisé des concentrations en oxygène dissous (DO) de l'ordre de 60 à 70 % (Preil et col. 1988; Stuart et col., 1987). Pour d'autres espèces comme chez *Eschscholtzia californica* par exemple, le nombre et la qualité des embryons produits sont meilleurs à 20 % de DO qu'à 60 % (Archambault et col. 1994).

Dans le cas de la carotte, Kessel et Carr (1972) ont rapporté que des DO inférieures à 16 % stimulent la production d'embryons somatiques de carotte en présence de lait de coco (qui contient des concentrations importantes en cytokinines), alors que des DO supérieures à 16 % stimulent l'apparition de racines et inhibent l'embryogenèse. Cependant au cours de ces expériences, seulement 10 embryons par ml de culture ont été obtenus en bioréacteur à 16 % de DO au bout de 50 jours de culture.

Lavoie (1997) a également démontré que la production en embryons somatiques est supérieure lorsque la DO du milieu de culture est maintenue à 20 % (en bioréacteurs, milieu dépourvu d'hormones), en comparaison avec des cultures en flacons agités où la DO est variable et toujours supérieure à 20 %. La production en bioréacteur atteignait 300 embryons torpilles par ml.

Certains auteurs présentent cependant des résultats contradictoires. En 1992, Jay et ses collaborateurs ont démontré que des DO voisines de 100 % stimulent la

production d'embryons de carotte dans un milieu dépourvu d'hormones. Plus récemment, les travaux de Terashima et Nishimura (1991) ont démontré que chez la carotte, l'embryogenèse est stimulée par des concentrations élevées en oxygène dissous. Ainsi, 384 emb.ml<sup>-1</sup> ont été produits à 88 % de DO contre seulement 19 emb.ml<sup>-1</sup> à 18 % de DO. Des résultats similaires ont été obtenus chez le blé (Carman et Campbell 1990) et l'alfalfa (Stuart et col. 1987).

#### 2.3.3.3. Le milieu de culture

La composition du milieu de culture influence directement le développement des embryons cultivés *in vitro*. De nombreux auteurs ont constaté une augmentation de la qualité des embryons et / ou de leur nombre en modifiant la composition des milieux de culture (augmentation des concentrations en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Carman 1989), augmentation de la concentration en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Lavoie 1997), modification des concentrations en sucrose (Verma et Dougall 1977, Smith et Krikorian 1988), suppression du PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et Ca<sup>2+</sup> (Tazawa et Reinert 1991, etc)).

En règle générale, le retard dans la différenciation embryonnaire est d'autant plus faible que le milieu est plus adapté aux besoins nutritionnels de l'embryon. Le patrimoine génétique des cellules ne peut s'exprimer que si les nutriments qui leur sont fournis tout au long de leur développement le permettent (Zrýd 1988).

Plus l'embryon est jeune et moins ses tissus sont différenciés. Les outils qu'il possède pour transformer son environnement et s'y adapter sont alors très limités (Raven et col. 1992<sup>d</sup>, Zrýd 1988). En conséquence, plus l'embryon est jeune et plus il est tributaire du milieu dans lequel il baigne. Par exemple, les concentrations en fer, en calcium, en sucrose et en sels des milieux de culture ont un lien direct avec le taux de survie des très jeunes embryons excisés (extraits de graines) (Zrýd 1988).

### **Influence du Fe-EDTA et des ions Calcium**

Le Fe-EDTA (même à la faible concentration de 0,1 mM présente dans les milieux MS et B5) et les fortes concentrations en sels sont toxiques pour les embryons globulaires excisés (i.e. augmentation du taux de survie de 15 à 75 % lorsqu'on passe de 0,2 à 0,025 mM de Fe-EDTA (Zrýd 1988)). Par ailleurs, l'ajout de calcium, auquel on attribue souvent un rôle antitoxique, augmente les chances de survie des jeunes embryons (survie multipliée par deux lorsqu'on passe de 1 à 6 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Zrýd 1988). Chez la carotte, lorsque la concentration en calcium passe de 1 mM dans le milieu d'induction (avec 2,4-D) à 10 mM dans le milieu de production (sans 2,4-D), le nombre d'embryons est multiplié par 2 par rapport au témoin (les deux milieux à 1 mM) (Jansen et col. 1990). Au contraire, l'augmentation de la concentration en fer du milieu assure une meilleure croissance des embryons plus âgés (dès le stade cordiforme).

### **Concentrations en sels et en sucres**

Les jeunes embryons ont besoin d'une forte concentration en sucrose (de l'ordre de 100 g.l<sup>-1</sup> et plus) et d'une faible concentration en sels minéraux (milieu Murashige et Skoog (MS) dilué 4 fois) pour survivre alors que les conditions contraires (concentration en sucrose inférieure à 50 g.l<sup>-1</sup> et concentration en sels minéraux du milieu MS non dilué) favorisent le développement des embryons âgés (Zrýd 1988<sup>a</sup>).

### **Influence des différentes sources d'azote**

Les milieux utilisés en culture d'embryons contiennent diverses sources d'azote sous forme ionique ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^{2-}$ ) ou sous forme d'acides aminés. La présence d'ions ammonium semble essentielle aussi bien lors de l'initiation que lors de la maturation (Halperrin et Wetherell 1965, Kamada et Harada 1978, Zrýd 1988) mais



n'est pas suffisante pour assurer seule le bon développement des embryons lorsque le pH de la culture n'est pas régulé (Dougall et Verma 1978, Kamada et Harada 1978).

Chez la carotte, la différenciation (i.e. formation de racines) est stimulée lorsqu'on place des fragments de tige dans un milieu contenant du  $\text{NO}_3^{2-}$  comme seule source d'azote. Au contraire, on observe la formation d'embryons somatiques lorsque les segments sont placés dans un milieu contenant à la fois du  $\text{NH}_4^+$  et du  $\text{NO}_3^{2-}$  (nombre d'embryons maximal avec le milieu MS, soit 21 mM de  $\text{NH}_4^+$  et 39 mM de  $\text{NO}_3^{2-}$ , Kamada et Harada 1978). Lavoie (1997) a également prouvé que la production d'embryons chez la carotte est multipliée par 3 lorsqu'on ajoute 15 mM de  $\text{NH}_4^+$  au milieu B5 qui contient déjà 25 mM de  $\text{NO}_3^{2-}$  (composition des milieux à l'annexe 2). Des résultats similaires ont été obtenus chez le blé (Carman 1989) et le bouleau (Nuutila et col. 1991).

Les besoins en azote des embryons changent au cours de leur développement. Ainsi, chez la carotte sauvage, les MPE, les embryons globulaires et les plantules ont des besoins en  $\text{NH}_4^+$  supérieurs à ceux des embryons différenciés (Halperin et Wetherell 1965). Les acides aminés stimulent la formation des embryons chez la carotte cultivée, mais n'ont pas d'effet sur les taux de conversion du stade globulaire au stade torpille (Kamada et Harada 1978).

### **Influence du pH**

Le pH semble également jouer un rôle important lors du processus d'embryogenèse. Ainsi, chez la carotte, le nombre d'embryons produits est maximal à pH 4,3 mais leur développement est bloqué au stade globulaire. A pH 5,3 par contre, le nombre d'embryons globulaires formés est divisé par 3 (par rapport à la culture à pH 4,3) mais le blocage développemental semble levé et une partie de ces embryons parviennent jusqu'au stade torpille (Jay et col. 1994, Dougall et col. 1983). Les résultats d'une étude de Smith et Krikorian (1990) ont également démontré que les MPE de

carotte sont capables de se développer à pH 4,0 mais que leur développement est stoppé avant d'atteindre le stade globulaire.

Certains auteurs (Jay et col. 1994, Martin et Rose 1976, Wetherell et Dougal 1976) ont constaté que le pH du milieu de culture affecte l'absorption des sucres et des ions, notamment du  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ , ce qui influence la différenciation et le développement des cellules.

Ces exemples montrent à quel point les conditions de culture influencent le développement embryonnaire *in vitro*. En plus des paramètres de culture que nous avons évoqués dans cette section, de nombreux autres tels que les concentrations en  $\text{PO}_4^{2-}$  et en micronutriments peuvent également jouer un rôle lors du processus d'embryogenèse. Les données accumulées jusqu'à présent ne sont cependant pas encore assez significatives pour pouvoir dégager des tendances claires à leur sujet.

Il apparaît cependant qu'un seul milieu de culture ne peut pas satisfaire les besoins de tous les stades embryonnaires. Seul un milieu dynamique et évolutif, à l'image du milieu ovulaire, allié à une technique de synchronisation, permettra la production d'embryons de qualité.

#### 2.3.3.4. Le matériel végétal

En matière d'embryogenèse végétale, la nature de l'explant conditionne en grande partie le succès des opérations. Une suspension cellulaire est composée d'un mélange de MPE embryogènes et de cellules très vacuolées non embryogènes. La capacité d'une suspension à produire des embryons (son potentiel embryogène) est liée à la proportion de MPE qu'elle contient. Bien que de nombreux types d'explant se soient révélés capables de produire des embryons somatiques, il apparaît néanmoins que le potentiel embryogène des jeunes tissus (tiges de jeunes plants venant de germer,

bourgeons foliaires, ovules, etc.) est nettement supérieur à celui des tissus différenciés (feuilles matures et racines par exemple).

De plus, le potentiel embryogène d'une lignée cellulaire diminue dans le temps au fil des repiquages successifs (Murashige et Nakano 1965, Reinert 1959, Halperin et Wetherell 1965, Thomas et Street 1970). Ce phénomène est dû à un appauvrissement de la suspension en cellules embryogènes (diminution du nombre de MPE) au profit des cellules non embryogènes. Plusieurs théories s'affrontent quant aux raisons de cette diminution du potentiel embryogène en fonction du temps.

Certains auteurs (Sussex et Frei 1968, Reinert et Black 1968) affirment que les cellules végétales sont capables de s'adapter progressivement aux conditions de culture *in vitro* et qu'elles se différencient alors malgré la présence de 2,4-D dans le milieu. Ces cellules, dites habituées, perdraient leur embryogénicité en même temps qu'elles se différencient.

D'autres auteurs (Torrey 1958, Murashige et Nakano 1965, Smith et Street 1974) avancent que la culture prolongée des cellules en présence de 2,4-D favoriserait l'apparition d'anomalies chromosomiques (appelées variations somaclonales) qui seraient à l'origine des cellules non embryogènes. Chez le céleri et la carotte, on estime qu'après seulement 6 mois de culture près de 20 % des cellules d'une suspension ont déjà un contenu chromosomique anormal (Smith et Street, 1974).

Quelque soit l'origine des cellules non embryogènes, les résultats de l'étude de Smith et Street (1974) confirment qu'elles possèdent un avantage sélectif vis-à-vis des cellules embryogènes. Cet avantage entraîne l'appauvrissement progressif des suspensions en cellules embryogènes et engendre donc une diminution du potentiel embryogène des suspensions cellulaires.

### 2.3.3.5. La densité cellulaire

Outre l'importance de la nature de l'explant utilisé et de l'âge de la suspension cellulaire, le nombre de cellules présentes dans le milieu de culture joue également un rôle primordial dans la régulation de l'embryogenèse. De nombreux travaux (Ammirato 1983, Ducos et col. 1993, Molle et col. 1993, Teng et col. 1994) ont démontré l'existence d'un lien direct entre la densité cellulaire initiale de la culture, le nombre d'embryons produits, le degré de maturation de la population d'embryons et le pourcentage d'embryons anormaux produits.

En général, plus la densité d'inoculation du milieu de production est élevée ( $10^6$  cellules par ml et plus) et plus le nombre total d'embryons est important, mais moins ils sont différenciés. Inversement, plus la densité d'inoculation du milieu de production est basse (moins de  $10^6$  cellules par ml) et plus le nombre d'embryons torpilles obtenus est élevé mais plus le pourcentage d'anormalités de ces embryons est important (Teng et col. 1994). Par ailleurs, lorsque la densité d'inoculation est trop faible ou trop importante, l'embryogenèse somatique est totalement inhibée (Ammirato 1983, Teng et col. 1994). Ces résultats viennent confirmer ceux déjà présentés par Ducos et col. 1993, Molle et col. 1993 et Zryd 1988.

L'initiation, la différenciation, la maturation, la germination et plus généralement tout les processus impliqués lors de l'embryogenèse *in vitro* sont directement liés au nombre de cellules présentes dans le milieu. Là encore, il semble que les différents stades embryonnaires aient des besoins différents en matière de densité cellulaire. Ainsi, la présence d'un grand nombre de cellules est absolument nécessaire à la formation des MPE (phase d'initiation de l'embryogenèse) mais la conversion de ces MPE en embryons torpilles ne peut se faire qu'à basse densité embryonnaire en culture asynchrone (Halperin 1967, Hari 1980).

Par exemple, chez la carotte, le nombre total d'embryons augmente de  $0,3 \times 10^6$  emb.l<sup>-1</sup> à  $3,0 \times 10^6$  emb.l<sup>-1</sup> lorsqu'on augmente la densité d'inoculation du milieu de production de 0,4 à 4,0 g.l<sup>-1</sup> (en poids humide, Molle et col. 1993). Mais, dans

le même temps, le pourcentage de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles passe de 25 à 3 % (Molle et col. 1993). Ce phénomène d'auto-inhibition semble lié à la présence dans le milieu de protéines extracellulaires dont nous parlerons au paragraphe suivant (De Vries et col. 1988). L'auto-inhibition est par ailleurs un phénomène réversible. Par exemple, une population d'embryons bloqués au stade coeur peuvent poursuivre un développement tout à fait normal pour peu qu'ils soient dilués suffisamment (Ducos et col. 1993, Molle et col. 1993).

#### 2.3.3.6. Les protéines extracellulaires

Beaucoup de travaux ont démontré que l'utilisation d'un milieu conditionné (ayant déjà contenu des embryons) lors de l'initiation et de la maturation permettait d'améliorer ou même de restaurer le potentiel embryogène de certaines cultures cellulaires (De Vries et col. 1988, Hari 1980, Von Arnold et col. 1995). Ces propriétés du milieu conditionné ont été attribuées à la présence de protéines glycosylées à hauts poids moléculaires qui sont habituellement liées ioniquement aux parois végétales mais qui, *in vitro*, se retrouvent à l'état libre dans le milieu de culture.

En fait, une grande diversité de protéines extracellulaires (PE) ont été identifiées dans divers milieux conditionnés, parmi lesquelles des peroxydases, des phosphatases, des protéases et, en général, une grande variété d'enzymes hydrolytiques. Ces PE permettraient, entre autre, aux cellules végétales de modifier leur environnement physico-chimique afin de favoriser l'absorption des nutriments (notamment au niveau des racines) et de modifier les propriétés de leurs parois pecto-cellulosiques pour permettre l'expansion cellulaire (Clarkson 1985).

D'autres PE présentes sur la paroi des cellules semblent jouer un rôle majeur comme modulateur de la communication cellule-cellule (Zrýd 1988). Elles pourraient, entre autre, jouer le rôle de signaux pour contrôler la différenciation, la dédifférenciation et la croissance cellulaire. Ces protéines à très hauts poids moléculaires (> 100 kDa) et glycosylées à plus de 90 % sont appelées protéines

arabinogalactanes (ou APG). Comme chez les cellules animales, ces protéines seraient la base de la reconnaissance et de la communication intercellulaire.

En 1976, Kartha a démontré que la différenciation cellulaire est étroitement régulée par la balance des différentes phytohormones présentes dans le milieu. D'autres auteurs ont depuis constaté que la différenciation cellulaire est corrélée avec la présence de PE glycosylées dont la synthèse est régulée par les différentes phytohormones du milieu (De Vries et col. 1988, Van Engelen et De Vries 1992, Von Harnold et col. 1995).

D'après les travaux de Hendricks et de Vries (1995), chaque tissu végétal posséderait à la surface de ses cellules des APG spécifiques. Il ont ainsi prouvé qu'il est possible de modifier le développement de cellules en culture en les mettant en présence d'APG spécifiques à une autre lignée cellulaire. Par exemple, en ajoutant des APG issus d'une culture de cellules embryogènes à une autre culture cellulaire non embryogène, il est possible d'obtenir des embryons et vice-versa.

Comme tout processus de différenciation, l'embryogenèse est donc régulée par l'intermédiaire de protéines extracellulaires spécifiques. Si on compare le profil de synthèse des protéines *in vitro* de cellules embryonnaires avec celui de cellules différenciées, on constate qu'il reste pratiquement inchangé en ce qui concerne les protéines intracellulaires alors que le profil de synthèse des PE est profondément modifié.

Jusqu'à maintenant, peu de liens ont été clairement établis entre les PE présentes dans le milieu de culture et les étapes morphologiques de l'embryogenèse. Parmi les trois PE qui ont été identifiées par Hendricks (1995) comme ayant un rôle spécifique lors de l'embryogenèse chez la carotte, deux ont un rôle direct avec la formation du protoderme de l'embryon globulaire. Leur absence dans le milieu provoque un blocage du développement embryonnaire au stade globulaire, comme si la

phase de différenciation avait échoué. Les autres études sur le sujet se contentent pour la plupart d'énumérer les différentes PE présentes dans le milieu et de noter les différences de sécrétion entre différents types cellulaires.

#### 2.3.4. ENVIRONNEMENT DE L'EMBRYON *IN VIVO* ET *IN VITRO*: TOUTE UNE DIFFÉRENCE.

Il existe de nombreuses différences entre le développement des embryons cultivés et celui des embryons *in vivo*. Ces différences ont été depuis longtemps attribuées au fait que l'environnement auquel est soumis un embryon cultivé en laboratoire est radicalement différent de l'environnement qu'il aurait connu s'il s'était développé dans la graine (Gray et Purohit 1991)

Dans sa revue sur l'environnement *in ovulo* parue en 1989, Carman compare la composition des milieux les plus utilisés en culture d'embryons ( les milieux MS et B5 notamment) avec la composition du liquide dans lequel baignent les embryons de blé de 20 jours et plus.

Il apparaît dans cette étude que tous les milieux de culture synthétiques sont carencés en azote (particulièrement en acides aminés) et en phosphore. Carman constate également que plus la composition du milieu de culture se rapproche de celle du liquide ovulaire, plus le nombre et la qualité des embryons sont élevés. De même, des embryons globulaires extraits de graines de carotte se développent anormalement (pas de formation de cotylédons, obtention d'embryons massifs et informes) lorsqu'on les place dans du liquide de KNOP (contenant seulement de l'azote, du phosphate, du potassium et du sucre) alors qu'ils passent au stade cordiforme lorsqu'ils sont transférés dans une solution minérale équilibrée (milieu synthétique complet contenant des minéraux, des vitamines et du sucre)(Zryd 1988).

Les concentrations en facteurs de croissance et en protéines extracellulaires du milieu dans lequel baigne l'embryon sont également très différentes *in vitro* et *in vivo*. Les phytohormones par exemple, sont hydrosolubles, et diffusent rapidement dans le liquide qui entoure l'embryon. Dans la graine, cette émission de phytohormones permet à l'embryon de communiquer avec les tissus accessoires, de contrôler l'activité des enzymes du liquide ovulaire et de modifier les propriétés de ses parois cellulaires. Le niveau en phytohormones du liquide ovulaire est régulé par leur taux de dégradation (dégradation par oxydation qui dépend de la concentration en oxygène dissous, Walton 1977) et par le taux de diffusion dans les tissus de l'embryon et de l'endosperme.

Mais, alors que dans la graine la quantité de liquide entourant l'embryon est limitée, ce dernier baigne *in vitro* dans une grande quantité de liquide agité dans lequel les phytohormones et les PE sont immédiatement diluées. En culture en milieu liquide, l'embryon est donc privé d'outils qui lui sont indispensables pour agir sur le milieu qui l'entoure et pour réguler son développement. Ce phénomène est encore amplifié par le fait que la culture d'embryons est pratiquée à faible densité cellulaire (densité d'inoculation souvent inférieure à  $1 \text{ g.l}^{-1}$  en poids humide contre 10 à  $100 \text{ g.l}^{-1}$  en culture de cellule classique).

De plus, alors que dans la graine l'embryon est seul, il se retrouve lors d'une production *in vitro* en présence de plusieurs milliers d'autres embryons qui ne sont pas tous au même stade développemental que lui. Chaque stade libère alors dans le milieu des signaux spécifiques, à des concentrations spécifiques. Or, la sensibilité des embryons à ces signaux change en fonction de leur âge. Les très jeunes embryons (stade globulaire et précédents) réagissent à des concentrations en phytohormones qui n'ont aucune incidence sur le développement des embryons plus âgés. C'est pourquoi l'étape de différenciation est si critique *in vitro*: une fois ce stade franchi, l'embryon peut poursuivre sa croissance sans trop souffrir des imperfections de son environnement.



Avant cela, son développement être perturbé par la présence de PE issues d'embryons plus âgés, ce qui provoque les anomalies et les blocages que l'on a décrit plus haut.

On pourrait ainsi énumérer un grand nombre de différences entre l'environnement des embryons cultivés et celui des embryons naturels, par exemple le manque de barrière mécanique à l'expansion de l'embryon (Gray et Purohit 1991), le métabolisme respiratoire, etc. En résumé, l'environnement *in ovulo* est restreint et dynamique pour rencontrer les besoins changeants de l'embryon, alors que le milieu *in vitro* est ouvert, mal adapté et non-régulé. Il est en plus surchargé de signaux parasites (provenant de l'ensemble des embryons) qui couvrent les signaux individuels de chaque embryon. Il n'est donc pas étonnant que la grande majorité des embryons restent bloqués au stade globulaire lorsque le développement de la population embryonnaire est asynchrone.

## **2.4. LE PROBLÈME DE LA SYNCHRONISATION DES EMBRYONS *IN VITRO***

### **2.4.1. POURQUOI SYNCHRONISER LES CULTURES D'EMBRYONS ?**

Les besoins nutritionnels, respiratoires, osmotiques et hormonaux des différents stades embryonnaires sont totalement différents. De plus, la présence dans une même culture d'embryons à des stades de développement différents provoque des blocages de croissance et des anomalies qui nuisent à la qualité des embryons produits. Enfin, la survie des embryons aux différents traitements utilisés pour limiter leur germination en culture (par exemple les traitements à l'ABA et la déshydratation) dépend de leur âge et de leur degré de maturation (voir section 2.5.).

Pour toutes ces raisons, la synchronisation du développement des embryons lors de la production est absolument nécessaire à la production d'embryons de qualité. Les conditions de culture pourraient alors être adaptées en continu aux besoins des embryons tout au long de leur développement. Il serait de plus possible d'appliquer très précisément divers traitements aux embryons et surtout d'éviter l'étape du triage en sortie de réacteur, qui implique une machinerie compliquée et coûteuse. Ces facteurs, parmi bien d'autres, ont poussé certains auteurs à rechercher des moyens de synchroniser la production des embryons somatiques

#### 2.4.2. LES PROCÉDÉS DE SYNCHRONISATION ET LEUR EFFICACITÉ

La désynchronisation du développement des embryons observée actuellement lors de la production *in vitro* proviendrait du manque d'uniformisation de l'inoculum, c'est-à-dire de la taille variable des MPE produites lors de l'induction de l'embryogenèse. Ainsi, après son transfert dans le milieu de production, un amas comptant 4 cellules mettrait 20 jours avant de parvenir au stade globulaire (formé d'environ 500 à 1000 cellules). Un amas comptant 20 cellules mettrait, quant à lui, seulement 5 jours pour parvenir au même résultat. Chaque embryon poursuivrait alors son développement en conservant les avances et les retards accumulés lors des premiers jours, donnant naissance à une culture asynchrone contenant simultanément tous les stades embryonnaires (Fujimara et Komamine 1979, Zrýd 1988).

Afin de synchroniser le développement des embryons, certains auteurs ont donc cherché à uniformiser la taille des MPE présentes dans le milieu d'induction. Pour ce faire, ils ont principalement eu recours à deux techniques, soit la filtration des inocula et les chocs anoxiques.

#### 2.4.2.1. Chocs anoxiques répétés

Une synchronisation partielle de la division des cellules d'une culture peut être obtenue en les privant périodiquement d'oxygène. Ainsi, lorsqu'on fait buller de l'azote dans le milieu de culture à raison de 90 minutes toutes les 30 heures, le cycle de division des cellules se synchronise peu à peu. Au bout de quelques jours, la majorité de la population cellulaire se divise en même temps toutes les 30 heures (Constabel et Kurz 1982).

En théorie donc, si l'on part d'une suspension embryogène composée de cellules isolées (par exemple des protoplastes) il devrait être possible d'obtenir, par une suite de chocs anoxiques, des MPE de taille uniforme, donc un développement synchrone des embryons. Cependant, la mortalité des cellules est très importante avec cette technique qui n'a pas, jusqu'à présent, permis d'obtenir des embryons de façon reproductible.

#### 2.4.2.2. Tri à l'aide de tamis et de gradients de densité

Le criblage des suspensions cellulaires à l'aide de tamis de différents maillages devrait en théorie permettre une uniformisation immédiate des inocula ainsi que l'élimination des cellules non embryogènes. Cette technique pourrait en effet permettre de trier les MPE d'après leur taille et d'inoculer les milieux de production avec des amas cellulaires standardisés qui poursuivraient leur développement de façon synchrone.

Dans la pratique, cette standardisation est loin d'être aussi simple qu'il y paraît. En fait, les cellules embryogènes ont tendance à sédimenter en couche dense sur les tamis, ce qui compromet l'efficacité du tri des inocula. De plus, les MPE sont de la même taille que certaines cellules non embryogènes et il est donc impossible de les séparer à l'aide de tamis. La densité des cellules embryogènes étant supérieure à celle de leur consœurs non embryogènes, il faut alors avoir recours à une technique de

séparation par gradients de densité pour obtenir une population de MPE pure de taille à peu près uniforme (Bazinet 1994, Fujimara et Komamine 1979). Toutes ces étapes doivent se faire dans des règles strictes d'asepsie. Dans ces conditions, la multiplication du nombre d'étapes augmente d'autant les risques de contamination. De plus, le degré de synchronisation obtenu reste bien médiocre en comparaison des efforts fournis. Les MPE semblent réagir différemment au stress induit par les opérations de tri et si certaines reprennent immédiatement leur développement, d'autres par contre observent une période de latence, ce qui désynchronise une nouvelle fois la culture.

D'autres auteurs se sont plutôt intéressés au tri des embryons à un stade plus tardif de leur développement (Guiliano et col. 1983, Rodriguez et col. 1990, Warren et Fowler 1977). Le tri est alors plus aisé en raison de la nette différence de taille entre les embryons et les cellules non embryogènes. De plus, un tri plus tardif assure un meilleur pourcentage de survie car les embryons sont moins sensibles au stress que les MPE.

Les résultats concernant la synchronisation du développement des embryons après le tri sont cependant contradictoires. Dans leurs travaux publiés en 1991, Gray et Purohit ont filtré une population asynchrone d'embryons à travers différents tamis dont le maillage allait de 864 à 234  $\mu\text{m}$ . Ils ont ensuite remis en culture les différentes classes d'embryons obtenues (embryons globulaires, coeurs et torpilles séparés par taille) pour constater qu'ils poursuivaient leur développement de façon synchrone.

Au contraire, Nadel et col. (1990) ont constaté que des embryons cordiformes de céleri de taille uniforme placés sur milieu solide ne se développent pas de façon synchrone. Il ressort de leurs travaux que seuls les embryons globulaires sont capables de maintenir un semblant de synchronisme sur milieu solide, et que leur croissance est considérablement ralentie par rapport au procédé de culture asynchrone.

En 1993, Molle et son équipe ont mis au point une technique compliquée de tri continu des embryons en cours de production. Pour ce faire, ils ont utilisé deux réacteurs en série reliés par des filtres servant à trier les embryons. Les embryons torpilles étaient ainsi séparés en continu du reste de la culture et placés dans le deuxième réacteur. Cette technique leur a permis d'obtenir une culture composée de 90 % d'embryons torpilles au bout de trois semaines (159 000 embryons produits) et d'augmenter significativement la qualité de ces embryons (pourcentage de conversion en plante de 77 %).

#### 2.4.2.3. Phytohormones

L'utilisation de phytohormones constitue une autre approche visant cette fois une synchronisation du développement des embryons en régulant leur état physiologique. Une synchronisation partielle du développement des embryons peut être obtenue à l'aide d'un traitement à l'ABA à basse concentration chez les conifères (Von Arnold et Hakman 1988), la carotte (Ammirato 1983) et le céleri (Nadel et col. 1990) mais pas chez le raisin (Gray et Compton 1993, Ammirato 1986, Nadel et col. 1990).

Par exemple, lorsqu'on place une population d'embryons globulaires de céleri dans un milieu contenant 0,5  $\mu\text{M}$  d'ABA pendant une semaine puis qu'on retire cet ABA, on obtient au bout de 2 semaines une culture composée de 80 % d'embryons torpilles (contre 40 % pour la culture témoin non traitée) (Nadel et col. 1990). Cependant, la présence d'ABA dans le milieu de culture au moment de la différenciation (passage du stade globulaire au stade coeur) peut diminuer significativement le pourcentage de germination post-récolte des embryons traités (Carman et Campbell 1990).

La synchronisation chez la carotte peut également être obtenue en ajoutant 0,1  $\mu\text{M}$  de zéatine dans le milieu de production. Environ 90 % des embryons globulaires se forment alors en même temps mais la présence de la zéatine inhibe le développement des embryons au delà du stade globulaire (Komamine et col. 1992).

#### 2.4.2.4. Choc osmotique

En plus de stimuler l'induction de l'embryogenèse chez de nombreuses espèces végétales (voir chap. 2.3.2.1), les traitements induisant un choc osmotique permettent également d'améliorer la synchronisation des cultures d'embryons. Chez la carotte par exemple, Wetherell (1984) a constaté que 80 % des embryons atteignent le stade coeur en même temps lorsqu'on ajoute 180  $\text{g.l}^{-1}$  de sucrose dans le milieu de production.

#### 2.4.2.5. Régulation du pH

On a vu au paragraphe 2.3.3.3 que le pH joue un rôle important lors du développement des embryons *in vitro*. Il est notamment possible de bloquer une population embryonnaire à un stade précis de son développement en régulant le pH du milieu de culture. A pH 4,0 par exemple, les embryons sont bloqués au stade globulaire (Smith et Krikorian 1990) alors qu'ils sont bloqué au stade coeur à pH 4,3 et qu'ils poursuivent leur développement jusqu'au stade torpille à pH 5,8 (Jay et col. 1994).

Une valeur de pH inférieure à 4,5 provoquerait en fait des modifications de la perméabilité des membranes plasmiques et une diminution de l'absorption des nutriments. La consommation en azote et en sucres des embryons est alors très faible (Jay et col. 1994) et ne permet peut-être pas la transition au stade torpille, ce qui provoque un blocage réversible. La modification du pH permettrait alors une reprise synchrone du développement des embryons.

## 2.5. LA GERMINATION ET SA PROBLÉMATIQUE

### 2.5.1. DORMANCE ET QUIESCENCE

#### 2.5.1.1. Définitions

Dans la nature, certaines graines peuvent rester à l'état sec pendant de longues périodes lorsque les conditions environnementales (température, humidité, luminosité, etc.) sont défavorables à leur germination. Dans ces graines dites quiescentes, les embryons vivent au ralenti, ce qui leur permet d'économiser leurs réserves en vue de la germination. Dès que les conditions deviennent favorables au développement des jeunes plantules, la quiescence est rompue et le processus de germination s'amorce.

Certaines graines pourtant refusent de germer, même lorsque toutes les conditions environnementales semblent favorables. Les graines de carotte par exemple, ne germent pas tant qu'elles n'ont pas subi les froids de l'hiver (ou un minimum de 40 à 60 jours en dessous de 10 °C (Molle et col. 1992)). Ces graines, que l'on qualifie de dormantes, sont le résultat d'une longue évolution des plantes des climats tempérés. La dormance permet au jeune plant de ne pas émerger lors d'un automne trop clément pour ensuite mourir à l'apparition des premiers gels. De plus, le degré de dormance étant légèrement différent d'une graine à l'autre, la germination est dispersée dans le temps, ce qui augmente les chances de survie des jeunes plantules.

Si la dormance assure dans la nature la survie des espèces végétales, elle constitue cependant un véritable casse tête pour l'agronome. L'entrée et la sortie en dormance des embryons végétaux est en effet sous l'influence complexe de paramètres génétiques, environnementaux et hormonaux dont l'importance varie en fonction des espèces végétales (Bewley et Black, 1982<sup>b</sup>).

### 2.5.1.2. Dormance, ABA et métabolisme respiratoire

L'ABA semble jouer un rôle clef, bien que contesté, dans l'ensemble des processus impliqués lors de la dormance. Chez certaines espèces comme le rosier, le degré de dormance est directement corrélé avec la quantité d'ABA extractible des graines. Les traitements utilisés empiriquement pour rompre la dormance (maintien au froid, trempage, grattage de l'enveloppe des graines, etc.) provoquent chez ces espèces une diminution de la concentration en ABA des graines (Black 1972). De plus, l'application d'ABA exogène inhibe la germination d'un grand nombre de graines non dormantes (Walton 1977).

Mais chez d'autres espèces (i.e. le pommier, le noisetier, le pois), on n'a pu établir aucune corrélation entre la concentration en ABA libre ou lié des graines et la régulation de la dormance. Par exemple, parmi des graines de pois contenant des quantités identiques d'ABA, certaines germent alors que d'autres sont dormantes. De même que l'abaissement de la concentration d'ABA n'est pas nécessaire pour casser la dormance de certaines graines (Walton 1977), une concentration nulle d'ABA ne suffit pas pour la briser (Bewley et Black 1982<sup>b</sup>).

Le métabolisme respiratoire des embryons semble également de toute importance lors de la dormance. Bien que l'intensité respiratoire (mmole de CO<sub>2</sub> rejeté par unité de temps) et le quotient respiratoire (RQ, rapport des quantités de CO<sub>2</sub> et de O<sub>2</sub> échangées pendant le même intervalle de temps) des graines dormantes et non dormantes ne soient pas significativement différents, plusieurs études ont établi un lien entre les voies métaboliques respiratoires et la dormance.

On a par exemple constaté que les agents qui brisent la dormance augmentent généralement la contribution de la voie des pentoses phosphates (voie secondaire du métabolisme du glucose qui produit des précurseurs utilisés pour biosynthèse des protéines, des acides gras, de l'ADN, etc.) au dépend de la glycolyse



(voie principale du métabolisme du glucose qui permet le stockage d'énergie sous forme d'ATP) (Bewley et Black 1982<sup>b</sup>). Ainsi, la majorité des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (inhibiteurs chimiques, haute concentration en CO<sub>2</sub> (supérieure à 0,03 %), basse concentration en O<sub>2</sub> (inférieure à 20 %), etc.) provoquent le bris de la dormance.

#### 2.5.1.3. Conservation des embryons cultivés: Dormance ou quiescence ?

*In vitro*, le développement des embryons est continu, c'est-à-dire que la croissance se poursuit sans période d'arrêt entre le stade torpille et le stade plantule. Etant continuellement alimentés en eau et en nutriments, les embryons germent dès qu'ils ont achevé leur maturation (stade torpille), ce qui rend leur manipulation et leur conservation très délicates. Or, l'induction d'une période d'arrêt de croissance des embryons produits *in vitro* est une étape primordiale pour la production et la conservation des semences artificielles.

Dans la nature, les plantes ont recours à deux procédés complémentaires pour assurer la conservation des embryons : la dormance et la quiescence. La dormance reste un processus mal connu et difficilement contrôlable. Il semble donc préférable d'induire la quiescence des embryons cultivés (arrêt immédiatement réversible de la croissance des embryons juste avant la germination) qui est mieux comprise, plus facile à mettre en place et mieux contrôlable.

#### 2.5.2. ÉVÉNEMENTS DE LA GERMINATION

A l'échelle macroscopique, on considère généralement qu'une graine a germé lorsque la radicule (la première racine de la plantule) perce l'enveloppe. Mais de nombreuses étapes sont nécessaires avant de parvenir à ce stade. Dès que la graine est imbibée d'eau, les enzymes qu'elle contient sont activées et l'hydrolyse des réserves insolubles contenues dans les tissus accessoires commence afin d'alimenter l'embryon.

La machinerie métabolique de l'embryon se met alors en marche et de nouveaux composants cellulaires sont synthétisés (ATP, ARN, protéines, etc.) Dans le même temps, les cellules de l'embryon se gorgent d'eau et s'allongent sous le contrôle de l'acide indole acétique (IAA), une auxine naturelle. L'augmentation de volume qui en découle exerce une pression sur l'enveloppe de la graine déjà ramollie par l'imbibition et facilite l'émergence de la radicule. Cette première étape a souvent lieu en anaérobiose et avant même que la première division cellulaire n'ait eu lieu.

Une fois que l'enveloppe de la graine est perforée, les conditions deviennent aérobiques et l'embryon entre en période de division active. La radicule s'allonge et s'ancre dans le sol pour permettre l'enracinement du jeune plant. Pendant cette période, l'embryon se comporte comme un organisme parasite vivant au dépend des tissus accessoires de la graine. L'amidon, les lipides et les protéines stockés dans l'endosperme pendant la maturation sont peu à peu hydrolysés par des enzymes synthétisées à la périphérie des tissus accessoires. L'embryon contrôle la production et l'activité de ces enzymes à l'aide d'une panoplie de phytohormones, dont l'acide gibbérellique et l'IAA (Black 1972). La croissance de l'embryon se poursuit donc au dépend des tissus accessoires, la radicule apportant quant à elle les sels minéraux et l'eau nécessaire à son bon développement. La tige émerge alors et les cotylédons se déploient pour permettre à la jeune plante de devenir autotrophe et indépendante.

### 2.5.3. RÉGULATION DE LA GERMINATION

#### 2.5.3.1. Influence de l'oxygène et du CO<sub>2</sub>

Chez la majorité des espèces végétales (sauf les espèces aquatiques), le nombre de graines qui germent diminue lorsque la concentration en oxygène de l'atmosphère est inférieure à 20 % ou lorsque la concentration en CO<sub>2</sub> est supérieure à 0,03 % (Bewley et Black 1982<sup>o</sup>). En fait, la présence d'oxygène est nécessaire à l'accomplissement du processus germinatif, même si une courte période d'anaérobiose

peut être tolérée dans les premières heures (notamment lorsque les graines sont submergées dans l'eau)

Ainsi, tout traitement ayant pour conséquence de limiter l'activité respiratoire de l'embryon permet d'inhiber sa germination, et induit donc sa quiescence. En 1992, Bhowmik et Pan ont ainsi réussi à conserver des graines de tomate pendant 8 semaines à 12°C et à haute humidité relative (de 85 à 98 % HRE) en les maintenant dans une atmosphère composée de 2,5 % d'oxygène, 5,0 % de CO<sub>2</sub> et 92,5 % de N<sub>2</sub>.

Des conditions aérobiques semblent également nécessaires à la germination des embryons produits *in vitro*. Chez le blé, les embryons formés à des concentrations en oxygène inférieures à 9 % ne germent pas en culture (Carman, 1988). En 1972, Norstog et Klein ont déterminé que des embryons excisés d'orge cultivés sur milieu solide ne germent pas lorsque la concentration en oxygène de l'atmosphère est inférieure à 5 %.

#### 2.5.3.2. Influence du potentiel osmotique du milieu et de la teneur en eau des embryons

Lorsqu'on place des graines dans une solution de PEG à 25 g.l<sup>-1</sup> (pression osmotique de 8,4 bar), leur germination est inhibée réversiblement (Khan 1977, Smith et Krikorian 1988). Cette méthode est utilisée depuis de nombreuses années en agronomie car elle permet de synchroniser la germination d'un lot de graines et de diminuer le temps de germination en sol.

Le principe de ce traitement empirique est simple. On a vu que l'allongement de la racine lors des premières heures de germination est due à l'élongation des cellules et non pas à leur division. Or chez les plantes, la croissance des cellules en longueur se fait grâce à la pression que la vacuole exerce sur la paroi pecto-cellulosique. Lorsqu'on soumet les cellules à une pression osmotique élevée, la vacuole

se vide de son eau, ce qui provoque une diminution de la pression de turgescence (Raven et col. 1992<sup>a</sup>). L'élongation des cellules de l'embryon est alors inhibée, ce qui empêche l'allongement de la racine, donc la germination.

Selon ce principe, Attree (1991) a démontré que la germination en culture d'embryons d'épicéa est inhibée lorsqu'ils sont soumis à des concentrations élevées de PEG (de 5,0 à 7,5 %). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'orge (Norstog et Klein 1972), le blé (Khan 1977) et la carotte (Raghavan et Srivastava 1982). Il est également possible d'inhiber la germination des embryons cultivés en les plaçant dans des milieux riches en sucrose (100 g.l<sup>-1</sup> et plus) (Ammirato 1983, Smith et Krikorian 1988, Zryd 1988). Cependant, chez certaines espèces comme le colza, la germination n'est inhibée que si l'embryon se trouve dans un état développemental bien précis, appelé stade de pré-dessiccation (Finkelstein et Crouch 1987).

Lorsqu'on place des cellules végétales dans un milieu plasmolysant, elles sont soumises à un stress hydrique important et leur teneur en eau diminue. Le même résultat peut être obtenu en déshydratant progressivement les embryons. Chez la carotte, la quiescence peut être induite *in vitro* en soumettant les embryons encapsulés dans du polyox (oxyde de polyéthylène) à une déshydratation progressive. Les chances de survie des embryons, bien qu'augmentées par un traitement préalable à haute concentration de sucrose (120 g.l<sup>-1</sup>) et en présence d'ABA (1  $\mu$ M) ou lorsqu'on augmente la densité cellulaire (6 g.l<sup>-1</sup> en poids humide contre moins de 1 g.l<sup>-1</sup>), sont encore extrêmement faibles (de l'ordre de 5 % au bout de 4 jours de conservation à température ambiante) (Kitto et Janick 1985). Le stade de développement de l'embryon au moment du traitement est, là encore, primordial pour sa survie ultérieure et une parfaite synchronisation de la population est donc nécessaire.

### 2.5.3.3. Le rôle de l'acide abscissique

Parmi la liste des substances inhibant la germination, on retrouve notamment l'éthylène, des acides organiques et l'acide abscissique (Bewley et Black 1982<sup>a</sup>). D'autres auteurs citent également les auxines et leur précurseur, le tryptophane (Khan 1977). Nous nous intéresserons principalement ici à l'ABA car il a été l'objet d'un grand nombre d'études et qu'il est l'inhibiteur de la germination le plus utilisé.

De nombreux travaux font état de l'utilisation de l'ABA pour inhiber la germination des embryons dans le milieu de culture. Kamada et Harada (1981) ont démontré par exemple que le nombre d'embryons de carotte ayant germé en culture est divisé par 3 en présence d'ABA dans le milieu de production. En fait, l'ABA est une phytohormone reconnue pour ses effets inhibiteurs de la division et de l'élongation cellulaire (Raven et col. 1992<sup>b</sup>). Son rôle dans le contrôle de la germination s'apparenterait donc à celui du PEG en empêchant l'allongement de la radicule (Walton 1977, Bewley et Black 1982<sup>b</sup>). L'ABA étant également un inhibiteur de la synthèse protéique, il serait responsable *in vivo* d'une diminution de la disponibilité des nutriments solubles en inhibant la synthèse des enzymes hydrolytiques (Ranjan et col. 1995).

Les pourcentage de germination post-culture des embryons traités à l'ABA sont en règle générale extrêmement bas (inférieur à 10 %). Pour la majorité des espèces, la sensibilité des différents stades embryonnaires à l'ABA diminue avec âge de l'embryon. La bonne réussite du traitement à l'ABA dépend énormément du stade de développement des embryons au moment du traitement (Iida et col. 1992, Seneratna et col. 1990). Le temps d'application d'un traitement à l'ABA est donc particulièrement crucial. Appliqué trop tôt, il provoque la dormance des embryons alors que trop tard, il échoue à inhiber la germination. L'utilisation de l'ABA nécessite donc une population

d'embryons parfaitement synchrones et une standardisation stricte des conditions de culture et de traitement. Il faut également être capable de déterminer à coup sur à quel moment les embryons ont atteint le stade précis dans lequel ils sont aptes à recevoir le traitement, ce qui constitue tout un défi en perspective.

#### 2.5.3.4. Le froid

La conservation par le froid, entre 5 et 10 °C, est très largement utilisée pour conserver les fruits et les légumes. A basse température, l'activité métabolique des cellules (et donc leur croissance) est considérablement ralentie. Dans le cas des suspensions cellulaires, la survie des cellules après un séjour à basse température dépend, entre autre, de leur état physiologique et de la durée du traitement (Benson et Withers 1988).

En 1987, Redenbaugh et ses collaborateurs ont conservé des embryons d'alfalfa à 4°C et ont démontré que le pourcentage de germination n'était pas affecté par ce passage au froid, même après de longues périodes de conservation (Redenbaugh et col. 1987). En 1989, Datta et Potrykus ont, quant à eux, obtenu des pourcentage de germination de 37 % chez des embryons de *Hordeum vulgare* conservés pendant 6 mois à 4°C (Datta et Potrykus 1989). Enfin, en 1993, Shigeta et son équipe ont obtenu 95 % de germination pour des embryons de carotte encapsulés dans de l'alginate et conservés 3 mois à 4°C dans du milieu Murashige et Skoog (contre 5 % pour des embryons nus ayant subi le même traitement).

Certains auteurs ont également eu recours aux très basses températures (-196°C) pour conserver des embryons zygotiques excisés (Creaser-Pence 1991), des embryons somatiques produits *in vitro* (Bajaj et Reinert 1977) et des cellules embryogènes (Kantha et col. 1988). La descente de température s'effectue par paliers

successifs dans des armoires à congélation programmables et en présence de cryoprotectants (glycérol, sucrose à haute concentration, mannitol, etc.).

Bien que le pourcentage de survie des cellules embryogènes et des jeunes embryons soient supérieurs à 85 % sur des périodes allant jusqu'à 2 ans, ce procédé est trop coûteux pour permettre une utilisation à large échelle. De plus, les embryons âgés et les plantules tolèrent beaucoup moins bien un séjour à très basse température puisque, même avec un prétraitement adapté, seulement 40 % des embryons congelés parviennent à germer (Tessereau et col. 1990).

## 2.6. ENCAPSULATION DES EMBRYONS SOMATIQUES

### 2.6.1. QU'EST-CE QU'UNE SEMENCE ARTIFICIELLE ?

Une semence artificielle est un embryon produit *in vitro* et traité de façon à se comporter exactement comme une graine naturelle. Une semence artificielle doit donc pouvoir être conservée, semée en milieu non stérile et l'embryon doit être capable de se développer de façon autonome jusqu'au stade adulte. Les embryons nus, tels qu'ils sortent du bioréacteur, ne peuvent donc pas être considérés comme des graines artificielles à part entière. Ils ne peuvent pas être conservés pendant de longues périodes ni être semés en sol car ils sont dépourvus d'enveloppe protectrice et de réserves nutritionnelles (sauf en ce qui concerne les embryons des espèces exalbuminées).

Le concept de semence artificielle implique donc toute une préparation des embryons, qui vise à induire leur quiescence et à leur fournir les réserves et la protection dont ils ont besoin. De nombreux travaux ont été publiés depuis la fin des années 80 sur l'encapsulation d'embryons produits *in vitro* dans diverses matrices artificielles. L'enrobage doit notamment protéger l'embryon des attaques mécaniques et biologiques et faciliter sa manipulation (Bazinet 1994, Redenbaugh et col. 1993). La

matrice doit également maintenir la quiescence de l'embryon pendant la période de stockage et l'alimenter durant la germination, tout en permettant les échanges gazeux. En résumé, la capsule doit permettre de reconstituer aussi fidèlement que possible l'environnement de l'embryon dans la graine (Molle et col. 1993).

### 2.6.2. MÉTHODES D'ENCAPSULATION

Le concept de semences artificielles (les synseeds, de Synthetic seeds) a été introduit pour la première fois par Murashige en 1977, mais ce n'est qu'en 1985 que Kitto et Janick ont produit les premières synseeds de carotte. L'enrobage des embryons dans de l'oxyde de polyéthylène avait alors permis d'obtenir pour la première fois la germination d'embryons déshydratés.

Ces auteurs sont cependant les seuls à travailler sur des semences artificielles déshydratées. La majorité des travaux publiés décrivent plutôt des méthodes où les embryons demeurent à l'état hydraté. A ce titre, l'encapsulation des embryons dans un hydrogel (gel d'agar, de carraghénanes, d'alginate, etc.) est de loin la technique la plus utilisée. En 1986, Redenbaugh et ses collaborateurs ont par exemple enrobé des embryons de luzerne et de céleri avec de l'alginate à 2 ou 3 %, et ont obtenus des pourcentage de germination de 100 % et d'environ 50 % en conditions non stériles. Les matrices d'alginate ont le double avantage d'être faciles à mettre en oeuvre et de ne pas être toxiques pour l'embryon.

### 2.6.3. LES LIMITES DE L'ENCAPSULATION

Les procédés de production étant encore largement asynchrones, les embryons produits doivent passer par une étape de triage qui permet d'éliminer les embryons anormaux ou immatures. Après cette étape de sélection, les pourcentage de germination des embryons encapsulés sont de l'ordre de 50 à 100 % selon les auteurs, c'est-à-dire à peu près équivalents aux pourcentage de germination des embryons nus



(Kamada et col. 1989, Li et Deng. 1990, Molle et col. 1993). Ces résultats ont néanmoins été obtenus en conditions stériles où les embryons baignent dans une solution nutritive qui diffuse à travers l'hydrogel. Les tentatives de certains auteurs d'inclure divers composés nourriciers au sein de la capsule ont été peu concluantes. Les nutriments solubles diffusent en effet trop rapidement dans le milieu environnant et ne sont alors plus disponibles pour l'embryon (Molle et col. 1993).

Afin de prévenir la diffusion des nutriments à l'extérieur de la bille d'hydrogel et de limiter la déshydratation des ES, les capsules d'alginate doivent donc à leur tour être recouvertes d'une couche imperméable à l'eau mais perméable aux gaz (étape de pelliculage (Friend 1993, Tay et col. 1993, Suhaila et Saleh 1982)). Cependant, aucune des pellicules testées à ce jour n'a encore pu remplir efficacement toutes ces fonctions. De plus, la présence de nutriments dans la capsule en fait une cible de choix pour les micro-organismes du sol et les divers antifongiques et antibiotiques qui ont été testés jusqu'à présent se sont tous révélés toxiques pour l'embryon aux concentrations efficaces (Molle et col. 1993).

On constate donc que l'enrobage des embryons produits *in vitro* est loin d'être au point. Le succès des semences artificielles passe avant tout par la production d'embryons somatiques de bonne qualité. La production des synseeds en est donc à ses balbutiements et beaucoup de travail doit encore être accompli avant d'envisager une éventuelle application industrielle.

## 2.7. RÉSUMÉ DU CONTEXTE DE LA RECHERCHE

L'embryogenèse somatique est une technique de propagation clonale très avantageuse en raison de son excellente productivité. Cependant, les embryons produits *in vitro* sont de qualité très médiocre, ce qui se traduit par un pourcentage d'anormalités élevé et un pourcentage de conversion en plantes inférieur à 50 %.

Surtout, il n'existe pas actuellement de technique satisfaisante permettant la conservation des embryons produits par embryogenèse somatique. Avec les techniques actuelles de production, les embryons germent dès qu'ils ont atteint leur maturité, ce qui augmente leur fragilité et rend leur manipulation délicate. De plus, les plantules doivent être repiquées immédiatement après leur récolte, ce qui compromet l'utilisation des techniques d'embryogenèse somatique à l'échelle industrielle.

Les deux techniques principalement décrites dans la littérature afin de limiter la germination précoce des embryons *in vitro* (ajout d'ABA dans le milieu de production et déshydratation des embryons) sont particulièrement délicates à mettre en oeuvre et diminuent significativement le pourcentage de survie et de germination post-récolte des embryons traités. Le peu de succès de ces traitements est largement attribuable au manque d'uniformité des populations d'embryons produites, qui sont composées de stades développementaux divers. Le contrôle de la germination en culture des embryons et l'amélioration de leur qualité passent donc principalement par la mise au point d'une technique efficace de synchronisation de la production.

C'est dans ce contexte que vient s'inscrire ce projet de recherche, dont les principaux objectifs sont présentés au chapitre suivant.

### **3. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE**

#### **3.1. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF GÉNÉRAL**

La germination des embryons en culture reste un des problèmes majeurs rencontrés lors de la production d'embryons *in vitro*. Les jeunes plantules (embryons germés) sont particulièrement fragiles et sont souvent endommagées par le module d'agitation ou lors de la récolte. Cette fragilité, qui les rend difficilement manipulables, compromet leur utilisation ultérieure. De plus, la germination des embryons matures provoque l'arrêt du développement des jeunes embryons (MPE, stade globulaire et coeur) et diminue significativement la productivité du procédé. En règle générale, seulement 5 à 10 % des embryons formés parviennent au stade torpille. Parmi ces embryons matures, plus de la moitié germent au sein même du milieu de culture, ce qui réduit dramatiquement le nombre des embryons qui peuvent effectivement être récoltés.

L'objectif global de ce travail consiste donc à :

LIMITER LA GERMINATION EN CULTURE D'EMBRYONS DE CAROTTE  
PRODUITS EN BIOREACTEUR.

En poursuivant cet objectif nous cherchons, d'une part, à faciliter la manipulation et la conservation des embryons et, d'autre part, nous espérons limiter les blocages développementaux et améliorer la qualité des embryons produits.

La démarche employée pour y parvenir passe par la réponse à deux questions principales : que se passe-t-il lorsque les embryons germent en culture et que faire pour l'éviter ?

### **3.2. HYPOTHÈSES ET STRATÉGIE DE RECHERCHE**

#### **3.2.1. QUE SE PASSE-T-IL LORSQUE LES EMBRYONS MATURES GERMENT?**

Les protéines excrétées (PE) dans le milieu de culture sont le reflet du stade développemental des cellules qui les ont sécrétées. Plus que de simples marqueurs spécifiques à chaque type cellulaire, ces PE jouent un rôle fondamental dans la régulation du développement des cellules et des tissus. Elles sont autant de messages qui dictent le comportement de la population cellulaire et régissent, par exemple, leur aptitude à se diviser ou à s'allonger. Ainsi, un ensemble hétérogène de cellules sécrète une grande quantité de PE différentes qui sont autant de signaux contradictoires susceptibles de perturber le développement de la communauté.

Dans le cas spécifique de l'embryogenèse, plusieurs études démontrent que les embryons sécrètent des PE différentes lors de chaque étape de leur développement et que leur sensibilité à ces signaux varie dans le temps. Chez l'épicéa par exemple, les embryons âgés produisent cinq fois plus de PE que les jeunes embryons (Von Arnold et col. 1995).

On sait également qu'il est possible de restaurer en partie le potentiel embryogène de cellules différenciées (non embryogènes) en les plaçant dans un milieu ayant contenu des cellules embryogènes. Les cellules embryogènes sont donc capables de libérer dans le milieu des signaux spécifiques signifiant "divisons-nous et ne nous allongeons plus" qui font entrer l'ensemble de la population cellulaire en période de division active pour donner naissance à des embryons somatiques. Inversement, si une partie des cellules de la population libèrent dans le milieu des signaux spécifiques signifiant "allongeons-nous et ne nous divisons plus", on peut supposer que l'ensemble des cellules cesse brusquement de se diviser et entre en période d'élongation.

On peut donc formuler l'hypothèse selon laquelle les cellules en élongation des embryons en train de germer excrètent dans le milieu des molécules

spécifiques (comme des protéines extracellulaires ou des phytohormones) qui inhibent la division cellulaire. Si de tels signaux sont libérés au moment où certains des embryons sont en phase de division active (par exemple au moment du passage des MPE au stade globulaire), ils peuvent sérieusement perturber voire même stopper leur développement. Ils peuvent également provoquer la germination précoce de tous les embryons matures en quelques heures.

Cette hypothèse est étayée par de nombreuses observations expérimentales qui montrent que la germination des premiers embryons dans le milieu de culture provoque la germination généralisée de presque tous les embryons torpillés et coïncide avec l'arrêt du développement des embryons immatures (résultats non publiés). Ces messages aberrants pourraient ainsi être responsables des pourcentages d'anomalies élevés, des blocages développementaux et de la germination précoce rencontrés en culture d'embryons asynchrones *in vitro*.

### 3.2.2. COMMENT FAIRE POUR L'ÉVITER?

La plupart des auteurs qui ont été confrontés au problème de la germination en culture ont tenté de le résoudre en ajoutant de l'ABA exogène dans le milieu de production. Comme nous l'avons vu plus tôt, les traitements à l'ABA sont cependant loin d'être la panacée. Si les embryons matures cessent en effet de germer en culture, on constate également que le nombre total d'embryons produits est toujours inférieur en présence d'ABA et que, de plus, les pourcentages de germination après récolte sont également diminués.

Certains auteurs ont essayé d'imiter les graines orthodoxes et ont pratiqué une déshydratation progressive des embryons à la fin de la période de maturation. Cependant, les résultats ont été là aussi bien décevants et les pourcentages de survie des embryons traités ne dépassent généralement pas 5 %.

Devant le peu de succès des méthodes conventionnelles, une nouvelle stratégie a été élaborée d'après l'hypothèse formulée plus haut. Si les blocages développementaux et les cas de germination précoce sont dus à la désynchronisation du développement des embryons cultivés, le premier objectif de ce travail doit donc être de

#### SYNCHRONISER LA CROISSANCE DES EMBRYONS,

pour éliminer toute perturbation de leur développement.

Le second objectif sera alors de

#### PROVOQUER LA QUIESCENCE DES EMBRYONS

avant qu'ils ne germent, ou bien de trouver un signal physiologique permettant de les récolter avant leur germination.

##### 3.2.2.1. Synchronisation des cultures

L'étude bibliographique a démontré que les méthodes conventionnelles de synchronisation étaient loin de donner les résultats escomptés. Cependant un certain nombre de paramètres de culture, comme la densité cellulaire et embryonnaire, le pH, la présence de phytohormones et la disponibilité de l'oxygène dans le milieu peuvent provoquer le blocage du développement des embryons lors de la production.

Dans la plupart des cas, on a jusqu'ici cherché à éviter ces blocages pour augmenter la productivité des cultures. Mais que se passerait-il si on adoptait plutôt la démarche contraire, c'est-à-dire si on cherchait à bloquer réversiblement le

développement des embryons? On obtiendrait alors une population d'embryons se trouvant tous au même stade développemental et dans le même état physiologique. La levée du blocage (en modifiant la densité cellulaire ou embryonnaire, le pH, etc.) devrait alors permettre aux embryons de poursuivre leur développement de façon synchrone.

#### 3.2.2.2. Bloquer le développement des embryons matures

Une fois que l'on aura obtenu une population d'embryons synchrones, il sera alors possible de leur appliquer avec le maximum d'efficacité les divers traitements cités à la sous-section 2.5.3. afin d'induire leur quiescence, soit la modification de la concentration en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, l'augmentation de l'osmolarité du milieu, l'ajout d'acide abscissique ou l'abaissement de la température.

On pourra, entre autre, adapter spécifiquement le traitement en fonction de la sensibilité et des besoins spécifiques des différents stades embryonnaires. On a également vu au paragraphe 2.3.3.5. que le stade de maturité atteint par les embryons est directement lié à la densité embryonnaire de la culture. Cette propriété pourrait être utilisée pour bloquer le développement des embryons au stade torpille.

## 4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 4.1. MILIEUX DE CULTURE

#### 4.1.1. MILIEU D'INDUCTION

Le milieu d'induction (MI) correspond au milieu B5 (Gamborg et col, 1968) dont la concentration en sucrose a été augmentée à 30 g.l<sup>-1</sup>. Les autres concentrations sont inchangées par rapport au milieu B5 classique, soit: 2 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 25 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 2 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 1 mM de PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et 25 mM de K<sup>+</sup>. Le pH a été ajusté à 5,5 avant autoclavage à l'aide d'une solution concentrée de KOH. Tous les milieux ont été préparés avec de l'eau déionisée.

Le milieu est supplémenté avec 0,2 mg.l<sup>-1</sup> d'acide dichlorophenoxy-acétique (2,4-D, 0,9 mM) et 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de kinétine. La composition détaillée de ce milieu est présentée à l'annexe 2.

#### 4.1.2. MILIEU DE PRODUCTION

Le milieu de production (MP0) correspond au milieu B5 (Gamborg et col, 1968) avec 30 g.l<sup>-1</sup> de sucrose et une concentration en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> augmentée de 2 mM à 15 mM, en accord avec les travaux de L. Lavoie (1997). Les autres composants du milieu ont également dû être modifiés pour obtenir des concentrations finales de 15 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 25 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 2 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 1 mM de PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et 12 mM de K<sup>+</sup>. Les autres concentrations sont inchangées. Le milieu de production ne contient pas de phytohormones. La composition détaillée de ce milieu est présentée à l'annexe 2. Le pH a été ajusté à 5,5 avant autoclavage à l'aide d'une solution concentrée de KOH.

#### 4.1.3. STÉRILISATION DES MILIEUX

Les milieux ont été soit stérilisés à l'autoclave à 121°C et 1×10<sup>5</sup> Pa pendant 15 minutes, soit stérilisés par filtration (capsule de microculture 0,2 µm, Gelman Sciences, modèle 12158) sous une hotte à flux laminaire.



## 4.2. MATÉRIEL VÉGÉTAL

### 4.2.1. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

#### 4.2.1.1. Mise en culture des callus

Des graines de carotte (*Daucus carota* L. variété Six Pack (code SP), ou variété Fancy Pack (code FP), société A. Bourcheix et R. Charbonneau Limitée, Laval, Canada) ont été placées pendant 2 minutes sous agitation dans une solution d'éthanol 70 %. Elles ont ensuite été stérilisées dans une solution de 20 % d'eau de Javel commerciale (contenant 5 % d'hypochlorite) sous agitation pendant 20 minutes, puis rincées à 3 reprises dans de l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été placées dans des boîtes de pétri, sur une double couche de papier filtre préréprouvé et humidifié. La germination a eu lieu à l'obscurité à 26°C en environ 10 jours.

Le méristème apical des jeunes plantules (zone située à la base des deux cotylédons) a été prélevé stérilement et placé sur du milieu d'induction gélifié avec 8 g.l<sup>-1</sup> d'agar (Sigma). A partir du deuxième mois, les callus à croissance rapide obtenus ont été repiqués sur le même milieu tous les mois.

#### 4.2.1.2. Obtention des suspensions cellulaires

Environ 1 gramme (en poids humide) de cellules a été prélevé à partir du callus et placé dans un flacon Erlenmeyer de 125 ml contenant 10 ml de milieu d'induction liquide. Le flacon a ensuite été placé sous agitation à 120 rpm, dans l'obscurité à 26°C (agitateur rotatif New Brunswick Scientific inc., série 25). Au bout de 2 semaines, 10 ml de milieu frais ont été rajoutés et la semaine suivante, la suspension cellulaire a été filtrée successivement sur deux filtres de 500 µm et 50 µm et rincée avec une solution de 20 g.l<sup>-1</sup> de sucre.

Les cellules retenues sur le filtre de 50  $\mu\text{m}$  ont été remises en suspension à raison de 10 g (poids humide) par 100 ml de milieu d'induction dans des flacons erlenmeyer de 250 ou 500 ml (ratio [volume total du flacon / volume de milieu] de 2,5) placés sous agitation à 120 rpm, dans l'obscurité à 26°C. Après 2 semaines, la suspension a été repiquée à raison de 20 ml par 100 ml de milieu d'induction frais. Les repiquages suivants ont eu lieu selon le même protocole à des intervalles d'environ 10 jours.

#### **4.2.2. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS EMBRYONNAIRES**

Les cellules embryogènes (voir chapitre 4.2.1.2) ont été filtrées sur un tamis de 50  $\mu\text{m}$  afin de retirer le milieu. Elle ont ensuite été rincées et remises en suspension dans du milieu de production à raison de 50 g de matière humide par litre. Au bout d'une semaine, la suspension cellulaire obtenue (alors composée de MPE de grosse taille (20 cellules et plus) et de CNE) a été filtrée successivement à travers une série de tamis en Nylon de 1000, 210 et 50  $\mu\text{m}$ , afin de retirer la majorité des cellules non embryogènes. Les MPE retenues sur le filtre de 50  $\mu\text{m}$  ont ensuite été rincées et remises en suspension à raison de 50 g de matière humide par litre de milieu de production (Phase de production et de synchronisation des embryons globulaires).

Au bout de 1 à 2 semaines, la suspension a été une nouvelle fois filtrée, à travers deux tamis de 500 et 210  $\mu\text{m}$ . Les embryons globulaires retenus sur le filtre de 210  $\mu\text{m}$  ont été rincés avec une solution de sucrose à 20 g.l<sup>-1</sup> et remis en suspension dans du milieu de production (voir chapitre 4.4.1.2).

### **4.3. DESCRIPTION DU BIORÉACTEUR**

#### **4.3.1. BIORÉACTEUR À DOUBLE RUBAN HÉLICOÏDAL**

Dans cette étude, des bioréacteurs à doubles rubans hélicoïdaux de 2 et 5 litres ont été utilisés (figure 4.1). Ces réacteurs ont été conçus par Jolicoeur et col.

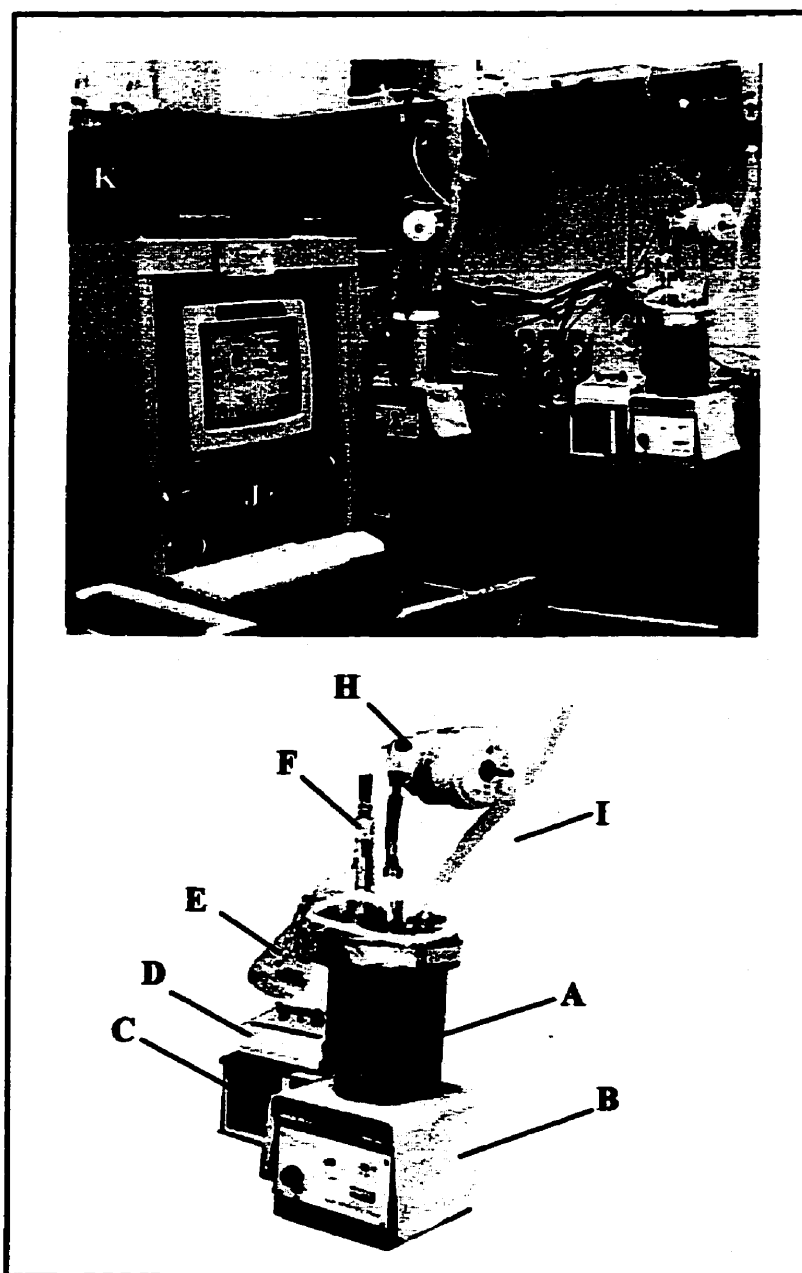
(1992) dans le but de cultiver des suspensions de cellules végétales à haute densité. Le module d'agitation à double hélice couplé à un système de chicanes de surface permet d'assurer un bon transfert de masse au sein de la culture tout en limitant les forces de cisaillement susceptibles d'endommager les cellules et les embryons végétaux.

Après avoir été assemblés et équipés d'un filtre à air stérile, d'un port de prélèvement, d'un condenseur, d'une sonde à pH (Phoenix) et d'une sonde à oxygène dissous polarographique (Ingold, France), les bioréacteurs ont été stérilisés à la vapeur (121°C,  $1 \times 10^5$  Pa, 60 min).

#### 4.3.2. CONDITIONS D'OPÉRATION

Les cultures en bioréacteurs ont été maintenues à 26°C, à l'obscurité et sous agitation constante (60 rpm, dans le sens anti-horaire) pendant toute la durée d'opération. Le gaz d'alimentation était fourni en aération de surface seulement aux débits de 0,45 l.min.<sup>-1</sup> et 0,15 l.min.<sup>-1</sup> pour les bioréacteurs de 5 et 2 litres respectivement. La concentration en oxygène dissous (DO) a été maintenue à 20 % pour toutes les cultures sauf B3 (pas de contrôle de la DO).

La stratégie de contrôle de la concentration en oxygène dissous utilisait comme variable manipulée la pression partielle en oxygène du gaz d'alimentation du bioréacteur. La phase gazeuse étant à saturation et à l'équilibre avec la phase liquide, la différence entre la concentrations en O<sub>2</sub> de la phase gazeuse (C\*) et de la phase liquide (C<sub>L</sub>) permet de faire varier le taux de transfert en O<sub>2</sub> du bioréacteur et de combler la demande en oxygène de la culture.



**Figure 4.1: Bioréacteur de 2 litres à doubles rubans hélicoïdaux.**

A: Bioréacteur; B: Module de chauffage; C: Contrôleur de température; D: Contrôleur de vitesse; E: Port d'échantillonnage; F: Sonde à oxygène dissous; H: Module d'agitation; I: Tuyau d'alimentation en gaz; J: Acquisition des données et contrôleur de DO; K: Analyseur de CO<sub>2</sub>.

Pour le bioréacteur de 5 litres, le contrôle de la composition du mélange gazeux utilisé (mélange d'air, d'azote et d'oxygène) se faisait à l'aide de débitmètres massiques actionnés par un contrôleur de type proportionnel-intégral (PI). Dans le cas des bioréacteurs de 2 litres, le contrôleur de type PI actionnait des vannes solénoïdes qui s'ouvraient et se fermaient un certain nombre de secondes par minute selon les besoins du contrôleur. Le débit gazeux total variant d'environ  $\pm 20\%$  lors de l'ouverture et de la fermeture des vannes solénoïdes, les actions du contrôleur ont été limitées en alimentant les bioréacteurs de 2 litres avec des mélanges (azote / air) et (oxygène / air) plutôt qu'avec des gaz purs. La composition des mélanges était ajustée manuellement tout au long de la culture. La composition globale du mélange gazeux à l'entrée du bioréacteur pouvait ainsi s'adapter à l'évolution de la demande en oxygène sans nécessiter d'actions brusques de la part du contrôleur.

#### 4.3.3. SUIVI ANALYTIQUE ET ÉTALONNAGES

Pour chaque bioréacteur, le pH, la concentration en oxygène dissous (DO) et en  $\text{CO}_2$  du gaz de sortie ont été mesurés en continu (pH et DO) ou ponctuellement ( $\text{CO}_2$ ). Toutes les sondes à pH (Cole Parmer, Phoenix electrode Co., modèle A773593) et à oxygène dissous (Sonde polarométrique Ingold) ont été calibrées avant autoclavage pour chaque culture. Les sondes à oxygène dissous ont été calibrées avec de l'azote (0 %) et de l'air (100 %). Cet étalonnage s'est révélé stable tout au long de la culture pour les 5 sondes testées (variation de moins de 3 % entre le début et la fin). Les débitmètres gazeux et l'analyseur de  $\text{CO}_2$  (Rosemount analytical, modèle 870) ont également été calibrés avant chaque culture.

#### 4.4. PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES

##### 4.4.1. PRÉPARATION DES INOCULA

###### 4.4.1.1. Inoculum constitué de cellules

La suspension cellulaire obtenue selon le protocole décrit au paragraphe 4.2.1.2 a été filtrée successivement sur trois tamis de 1000, 210 et 50  $\mu\text{m}$  et rincée avec une solution de sucrose à 20 g.l<sup>-1</sup>. Les cellules retenues sur le filtre de 50  $\mu\text{m}$  ont été remises en suspension dans du milieu de production stérilisé par autoclavage (121°C,  $1 \times 10^5$  Pa, 15 min).

Le procédé d'inoculation des bioréacteurs et des flacons a été conçu pour que l'inoculum représente 10 % du volume total de la culture après inoculation. En conséquence, la densité cellulaire de l'inoculum doit être dix fois supérieure à celle que l'on veut obtenir dans le bioréacteur (ou le flacon agité). Par exemple, pour obtenir une densité d'inoculation en cellules de 10 g.l<sup>-1</sup> (matière humide) dans un bioréacteur de 2 litres (volume utile de 1,8 litres), l'inoculum sera composé de 18 g de cellules remis en suspension dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml, pour obtenir un volume final de 180 ml (densité cellulaire de l'inoculum : 100 g.l<sup>-1</sup>).

###### 4.4.1.2. Inoculum constitué d'embryons globulaires

Les embryons globulaires obtenus selon le protocole décrit à la sous section 4.2.2 ont été remis en suspension, à la densité d'inoculation choisie multipliée par 10, dans du milieu de production stérilisé par autoclavage ( $1 \times 10^5$  Pa, 15 min). Par exemple, pour obtenir une densité d'inoculation finale en embryons de 10 g.l<sup>-1</sup> (matière humide) dans un bioréacteur de 2 litres (volume utile de 1,8 litres), 18 g d'embryons ont été prélevés sur le filtre de 50  $\mu\text{m}$  et remis en suspension dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml pour obtenir un volume final de 180 ml.

#### 4.4.2. PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES EN BIORÉACTEUR

Le protocole de préparation du milieu de production pour les cultures en bioréacteur est le suivant : une solution contenant les sels minéraux et les vitamines a été préparée en multipliant par deux toutes les concentrations. Son pH a été ajusté à 5,5 à l'aide d'une solution concentrée de KOH. Elle a ensuite été stérilisée par filtration (unité de filtration Millipak de 0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore Inc.). Une solution de sucre a été préparée en multipliant par deux la concentration puis elle a été stérilisée par autoclavage (121°C,  $1 \times 10^5$  Pa, 30 min.).

Pour les bioréacteurs de 2 litres, 800 ml de chacune de ces solutions de sucre et de sels ont été transvasés dans le bioréacteur par gravité. L'inoculum (180 ml) a ensuite été transvasé à son tour par gravité, pour obtenir un volume final d'environ 1,8 litre. Pour les bioréacteurs de 5 litres, 2250 ml de chacune des solutions de sucre et de sels ont été transvasés dans le bioréacteur par pompage. L'inoculum (500 ml) a ensuite été transvasé à son tour par gravité, pour obtenir un volume final d'environ 5,0 litres.

#### 4.4.3. PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES EN FLAcons

Simultanément à chaque culture en bioréacteur, 4 cultures en flacons Erlenmeyer de 500 ml (volume utile de 250 ml) ont été menées en utilisant le même inoculum. Les flacons identifiés "F-r" (mêmes conditions que le bioréacteur) contenaient 225 ml du même milieu utilisé pour la culture en bioréacteur stérilisé par filtration. Les flacons identifiés "F-t" (flacons témoins) contenaient 225 ml de milieu de production stérilisé à l'autoclave (121°C,  $1 \times 10^5$  Pa, 15 min).

Les quatre flacons ont été inoculés avec 25 ml du même inoculum utilisé pour le bioréacteur puis ils ont été placés dans l'obscurité à 26°C sur un agitateur rotatif à 120 rpm. Un des flacons de la série "F-r" a été équipé d'une sonde à oxygène dissous stérile (Ingold, France) afin de suivre l'évolution de ce paramètre au cours de la culture.

## 4.5. ANALYTIQUE

Des prélèvements ont été effectués sur les flacons et les bioréacteurs tous les 1 à 3 jours selon les cultures. La concentration en embryons, le pH, la conductivité, la concentration en biomasse sèche, ainsi que les concentrations résiduelles en ions et en sucres du milieu de culture ont été déterminés pour chaque échantillon.

### 4.5.1. COMPTAGE DES EMBRYONS

La concentration en embryon a été mesurée en plaçant 1 ml de la suspension prélevée (après dilution lorsque nécessaire) sur une boîte de pétri dans le fond de laquelle des lignes ont été tracées pour faciliter le comptage. Les embryons ont été comptabilisés par observation de la suspension embryonnaire au microscope (Olympus modèle CK2, objectif EF, 0,12 - grossissement final  $\times 10$ ). Trois comptages ont été effectués pour chaque prélèvement.

La concentration en embryons torpilles (embryons d'apparence normale ayant des cotylédons bien visibles et une forme allongée) ainsi que la concentration en embryons germés (apparition d'une racine avec de grosses cellules translucides) ont été mesurées lors de chaque prélèvement. La concentration en embryons globulaires a été déterminée lors du premier et du dernier échantillonnage (récolte des embryons). La concentration en embryons coeurs a été mesurée lors du dernier échantillonnage seulement.

Le pourcentage maximal de germination en bioréacteur (PG) et le pourcentage de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles (PC) ont été calculés selon les équations 3.1 et 3.2 :



$$PG = \frac{P}{P+T} \quad (3.1)$$

$$PC = \frac{T}{(G+C+T+P)_{final}} \quad (3.2)$$

où  $G$  représente la concentration en embryons globulaires,  $C$  la concentration en embryons cordiformes,  $T$  la concentration en embryons torpilles et  $P$  la concentration en plantules (embryons germés) de la suspension.

#### 4.5.2. COMPTAGE DES CELLULES

Un volume de 1 ml de l'échantillon a été prélevé et centrifugé pendant 2 minutes. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans une solution de rinçage (tampon citrate 0,1 M à pH 4,5 (solutions de citrate de sodium à 29 g.l<sup>-1</sup> et d'acide citrique à 21 g.l<sup>-1</sup> mélangées jusqu'à obtenir un pH de 4,5) contenant 10 g.l<sup>-1</sup> d'EDTA et 20 g.l<sup>-1</sup> de sucrose). Les cellules ont alors été centrifugées une nouvelle fois et le surnageant éliminé.

Les cellules ont été remises en suspension dans une solution enzymatique afin de dissoudre leur paroi pecto-cellulosique et de désagréger les amas cellulaires. La solution enzymatique était composée de la solution de rinçage contenant 5 mg.ml<sup>-1</sup> de cellulase (16 unités enzymatiques par mg, Sigma) et 16 µl.ml<sup>-1</sup> de pectinase (pectinase d'*Aspergillus niger*, 365 unités enzymatiques par ml, Sigma). Les cellules ont été remises en suspension dans cette solution jusqu'à obtenir un volume final de 5 ml.

Elles ont ensuite été transférées dans un flacon Erlenmeyer de 25 ml et placées sous agitation (100 rpm). Toutes les 20 minutes, la suspension a été aspirée à l'aide d'une pipette puis replacée dans le flacon à plusieurs reprises. Cette opération permet de détacher des cellules situées à la périphérie des amas et de mettre en contact

les cellules situées immédiatement en dessous avec la solution enzymatique. L'opération de digestion enzymatique a été poursuivie jusqu'à l'obtention d'amas cellulaires d'un maximum 5 cellules.

Ces cellules ont ensuite été centrifugées et la solution enzymatique éliminée. Elles ont enfin été remises en suspension dans la solution de rinçage jusqu'à un volume final précis pour atteindre une concentration en cellule confortable en vue du comptage (de l'ordre de  $5 \times 10^4$  cellules par ml). Les cellules ont été dénombrées à l'aide d'une cellule de comptage (Fushs-Rosenthal ultraplane, Hausser Scientific) et d'un microscope (Olympus modèle CK2 - grossissement final  $\times 100$ ). Trois comptages ont été effectués pour chaque prélèvement.

#### 4.5.3. MESURE DU POIDS SEC, DU PH ET DE LA CONDUCTIVITÉ

Après que le pH (pH mètre Accumet® modèle 805MP, Fisher) et la conductivité (sonde à conductivité ATC, Oaklon™) de l'échantillon aient été mesurés, un volume connu de la suspension a été filtré sous vide (Papier filtre Whatmann type 42 prépesé). Le filtrat a été congelé en vue de la mesure des concentrations résiduelles en ions et en sucres. Le matériel végétal retenu sur le filtre a été rincé à l'eau distillée et placé à l'étuve pour déterminer le poids sec (80°C, 24 h).

#### 4.5.4. MESURE DES CONCENTRATIONS EN SUCRES

Les concentrations extracellulaires en sucrose, glucose et fructose ont été déterminées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Pompe Waters modèle 6000A, injecteur automatique Gilson modèle 231/401, détecteur à indice réfractométrique Gilson modèle 132, Chauffe colonne Mandel Technology modèle 7980, Intégrateur Hewlet Packard modèle 3394A). La phase mobile, constituée d'eau, était pompée au débit de  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  dans la colonne (Biorad® HPX-87C, Biorad Aminex) maintenue à 80°C. Le volume d'injection était de 20  $\mu\text{l}$ .

#### 4.5.5. MESURE DES CONCENTRATIONS EN IONS

Les concentrations du milieu de culture en anions ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) et en cations ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) ont été analysées par chromatographie ionique. Le système de chromatographie, constitué d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur électrochimique opéré en mode conductivité (Dionex) était contrôlé par le logiciel Dionex AI-450.

Les anions étaient séparés sur une colonne de  $4 \times 250$  mm (IONPAC AS4A-SC, Dionex) équipée d'un supresseur anionique (Dionex, ASRS-1). La phase mobile était constituée d'une solution tampon de bicarbonate de sodium (1,8 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et 1,7 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) pompée au débit de  $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Les cations étaient séparés sur une colonne de  $4 \times 250$  mm (IONPAC CS-12, Dionex) équipée d'un supresseur cationique (Dionex, CSRS-1). La phase mobile était constituée d'une solution d'acide méthasulfonique (20 mM) pompée au débit de  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### **4.6. MESURES RESPIROMÉTRIQUES**

#### 4.6.1. ESTIMATION DU TAUX DE CONSOMMATION EN OXYGÈNE

Le taux de consommation en oxygène (OUR pour "Oxygen Uptake Rate") des cultures a été estimé en posant que le procédé est en régime pseudo-stationnaire vis-à-vis du transfert d'oxygène en raison des taux de respiration faibles des cellules végétales. De ce fait, si on pose que la variation de la concentration en oxygène dissous (DO) en fonction du temps est négligeable, le transfert de masse de l'oxygène est décrit par les équations suivantes:

$$\frac{d(DO)}{dt} \approx 0 \approx OTR - OUR \quad (3.3)$$

$$OTR = k_a \times (DO^* - DO) \approx OUR \quad (3.4)$$

avec OTR représentant le taux de transfert de l'oxygène (mmole.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), DO la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide (mmole.l<sup>-1</sup>), DO\* la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide à saturation et à l'équilibre avec la phase gazeuse (mmole.l<sup>-1</sup>) et k<sub>a</sub> le coefficient de transfert en oxygène du bioréacteur (h<sup>-1</sup>).

Le k<sub>a</sub> des cultures en bioréacteur de 2 litres a été évalué en fonction du volume de culture, en supposant que la viscosité du milieu varie peu du début à la fin de la culture et d'après l'équation 3.5 développée par D. Aubry (1996) pour les conditions expérimentales décrites plus haut (aération de surface 0,15 l.min<sup>-1</sup>, agitation de 60 rpm et température de 26°C):

$$k_a = 43,24 - 75,84 \times V + 45,20 \times V^2 - 8,98 \times V^3 \quad (3.5)$$

Avec *V* représentant le volume (l) de culture dans le bioréacteur. Le k<sub>a</sub> en flacon agité de 500 ml a été évalué à 10 h<sup>-1</sup> (Aubry 1996) pour les conditions expérimentales décrites plus haut (Flacon de 500 ml avec 250 ml de milieu, agitation de 120 rpm et température de 26°C). Le k<sub>a</sub> en bioréacteur de 5 litres a été évalué à 0,9 h<sup>-1</sup> (Aubry 1996) pour les conditions expérimentales décrites plus haut (aération de surface 0,45 l.min<sup>-1</sup>, agitation de 60 rpm et température de 26°C).

#### 4.6.2. ESTIMATION DU TAUX DE PRODUCTION DE CO<sub>2</sub>

Le pourcentage volumique de CO<sub>2</sub> contenu dans le gaz de sortie du bioréacteur a été mesuré à l'aide d'un analyseur de CO<sub>2</sub> (Rosemount analytical, modèle 870). Le taux de production de CO<sub>2</sub> est calculé à partir de la différence entre la concentration en CO<sub>2</sub> du gaz d'alimentation du bioréacteur et celle du gaz de sortie. La concentration dans le gaz d'alimentation est calculée en posant que l'air contient 0,03 % de CO<sub>2</sub> et que l'oxygène et l'azote n'en contiennent pas.

Le taux de production de CO<sub>2</sub> (CPR pour "CO<sub>2</sub> Production Rate") a été évalué selon les équations suivantes, en supposant que le transfert du CO<sub>2</sub> entre la phase liquide et la phase gazeuse est en pseudo-équilibre:

$$\frac{d(DCO_2)}{dt} \approx 0 \approx CTR - CPR \quad (3.6)$$

$$CTR = \frac{Q \times (CO_{2 \text{ out}} - CO_{2 \text{ in}})}{V_{\text{cult}} \times 0,0246} \approx CPR \quad (3.7)$$

avec DCO<sub>2</sub>, la concentration en CO<sub>2</sub> dissous dans la phase liquide (%), CTR, le taux de transfert du CO<sub>2</sub> (mmole.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), Q, le débit volumique total de gaz (l.h<sup>-1</sup>), CO<sub>2 out</sub> et CO<sub>2 in</sub> le pourcentage volumique de CO<sub>2</sub> dans les gaz de sortie et d'entrée respectivement (%), et V<sub>cult</sub> le volume de culture (l). Le facteur 0,0246 correspond au volume (l) d'une mmole de CO<sub>2</sub> à 1 atm. et 26°C.

#### **4.7. ENCAPSULATION DES EMBRYONS SOMATIQUES**

A la fin de la phase de production, une partie des embryons torpilles ont été récoltés et rincés stérilement à l'aide d'une solution de sucre à 20 g.l<sup>-1</sup> sur un

tamis de polypropylène de 500  $\mu\text{m}$ . Ces embryons ont ensuite été encapsulés selon la méthode décrite par C. Bazinet en 1994 qui est résumée ci-après.

Les embryons ont été dispersés à l'aide d'un agitateur magnétique dans une solution d'alginate à 1 % (Sigma, 14000 cps) préalablement autoclavée (15 min, 121 °C,  $1 \times 10^5$  Pa). Le mélange a ensuite été aspiré par une pompe péristaltique dans un capillaire en Téflon. Chaque embryon entouré d'alginate forme alors une gouttelette qui se solidifie lorsqu'elle entre en contact avec une solution stérile de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Les billes ainsi obtenues sont maintenues 20 min. sous agitation dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  pour permettre une gélification complète. Toutes ces opérations sont effectuées en conditions stériles.

#### **4.8. ESSAIS DE GERMINATION**

##### **4.8.1. SUR GÉLOSE**

Lors des prélèvements, une dizaine d'embryons torpilles ont été placés stérilement sur des boîtes de pétri contenant du milieu B5 (composition en annexe 2) dilué de moitié et additionné de 8  $\text{g.l}^{-1}$  d'agar (Sigma). Ces boîtes ont ensuite été placées dans une étuve obscure à 22°C pendant 2 semaines. Le nombre d'embryons germés a alors été mesuré, de même que le nombre de feuilles vraies et les éventuelles anomalies.

##### **4.8.2. EN SOL RECONSTITUÉ**

Les embryons encapsulés ont été placés stérilement dans des tubes de culture remplis de sol reconstitué (turfass) stérile humidifié avec du milieu B5 dilué de moitié. Ces tubes ont été placés sous lumière naturelle avec des cycles jour / nuit à 20°C. Lors des premières semaines, du milieu a été rajouté dans chaque tube afin d'alimenter les plants jusqu'à ce qu'ils deviennent autotrophes.

Par la suite, de l'eau distillée a été rajoutée chaque semaine afin de compenser l'évaporation. Les jeunes plantules qui possédaient 4 feuilles vraies et plus ont alors été rincées et transférées dans du terreau non stérile pour poursuivre leur développement.

## **5. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

### **5.1. SYNCHRONISATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS**

#### **5.1.1. MÉTHODE DE PRODUCTION CLASSIQUE**

Les premiers travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche s'inscrivent en continuité directe des travaux de Luc Lavoie (1997). Les 10 premières cultures en bioréacteur (cuvées B1 à B8 ainsi que B14 et B16) ont été opérées selon le procédé de production décrit dans son mémoire, avec une étape supplémentaire de filtration de l'inoculum (voir section suivante).

En accord avec ses conclusions, la concentration en  $\text{NH}_4^+$  du milieu de production a été augmentée de 2 à 15 mM pour toutes les cuvées afin de maximiser la production d'embryons.

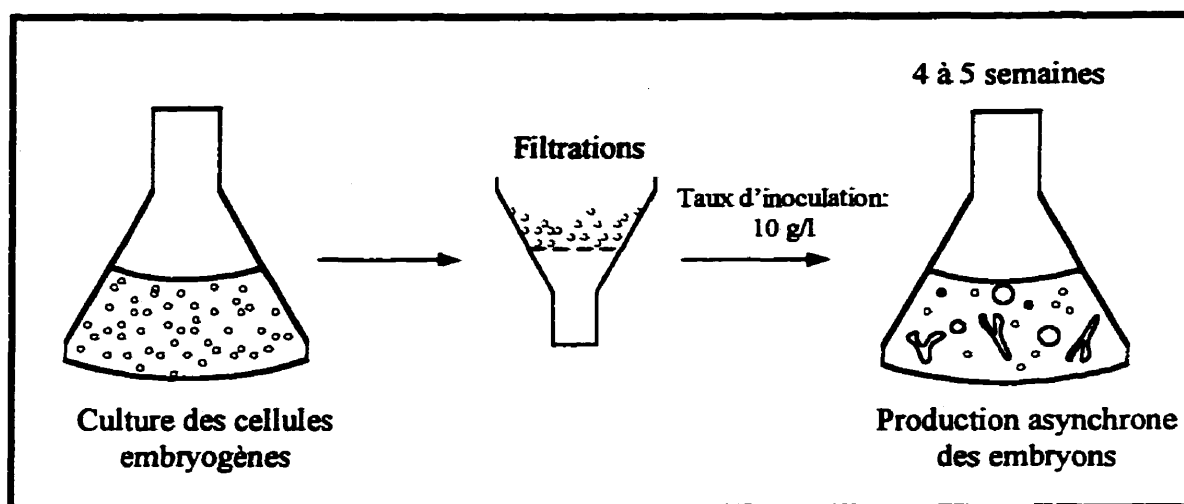
##### **5.1.1.1. Description du procédé de production classique**

Le procédé de production des embryons somatiques utilisé lors des cuvées B2 à B8, B14 et B16 est résumé à la figure 5.1. Ce mode de production est largement décrit dans la littérature et sera référé dans la suite du texte comme étant le procédé de production classique.

Les suspensions cellulaires ont été tamisées afin d'éliminer les cellules non embryogènes (CNE) (voir paragraphe 3.4.1.1). Cette étape permet également de sélectionner les masses proembryonnaires selon leur taille pour améliorer la synchronisation de la production d'embryons. Pour ce faire, les cellules ont été filtrées successivement sur plusieurs tamis de grosseurs de maille décroissantes (1000, 210 et 50  $\mu\text{m}$  successivement). Les cellules retenues sur le filtre de 50  $\mu\text{m}$  ont été remises en suspension dans le milieu de production à raison de 10  $\text{g.l}^{-1}$  de matière humide (soit



environ  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$  de matière sèche), en flacon agité ou en bioréacteur. Toutes les cultures ont été effectuées en cuvée.



**Figure 5.1: Représentation du procédé de production classique.**

#### 5.1.1.2. Résultats généraux

Les principaux résultats obtenus en mode de production classique sont présentés en détails à l'annexe 3. Le tableau 5.1 présente les résultats moyens de ces cuvées (moyenne de 5 cuvées en bioréacteurs de 2 litres, 10 cuvées pour la série F-r et 12 cuvées pour la série F-t). Seuls les embryons torpilles apparemment normaux ont été comptabilisés. Le nombre d'embryons torpilles, les productivités, les taux de croissance et les rendements de production ont tous été déterminés au temps d'apparition des premiers embryons germés. L'intervalle statistique indiqué représente l'écart type moyen.

**Tableau 5.1: Résultats obtenus par la méthode de production classique.**

	Bioréacteurs de 2 l	Flacons agités série F-r	Flacons agités série F-t
Durée avant germination en culture (j)	32 ± 10	19 ± 10	19 ± 11
Pourcentage max. de germination en culture	78 ± 26%	100 ± 0%	87 ± 21%
Production (ET.ml <sup>-1</sup> )	53 ± 13	36 ± 7	24 ± 19
Productivité en embryons (nb ET.l <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	$(1,9 \pm 0,8) \times 10^3$	$(2,0 \pm 0,8) \times 10^3$	$(1,7 \pm 3,0) \times 10^3$
Productivité en poids sec (g PS.l <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	0,16 ± 0,08	0,45 ± 0,19	0,60 ± 0,17
$\mu^{ps-app}$ (j <sup>-1</sup> )	0,07 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,04
$Y_p$ (ET. (g PS) <sup>-1</sup> )	$(12,8 \pm 2,1) \times 10^3$	$(4,2 \pm 1,2) \times 10^3$	$(5,8 \pm 5,6) \times 10^3$

#### 5.1.1.2.1. Potentiel embryogène de la lignée SP29

Les cuvées B2 à B8 ont été inoculées avec la lignée cellulaire SP développée par Luc Lavoie lors de ses travaux. La souche est ici désignée sous le code SP29 car le callus avait été repiqué 29 fois depuis son initiation, c'est-à-dire qu'il avait été maintenu en culture sur gélose près de 3 ans. Le tableau 5.1 indique que le nombre maximal d'embryons obtenu pour ces cuvées est en moyenne de  $53 \pm 13$  embryons torpilles (ET) par ml contre  $250 \pm 20$  ET.ml<sup>-1</sup> lors des travaux de Luc Lavoie (mêmes conditions expérimentales, lignée SP1).

Le potentiel embryogène de la lignée SP a donc considérablement diminué au fil des sous-cultures, phénomène largement décrit dans la littérature (voir paragraphe 2.3.3.4) et qui serait dû à un avantage sélectif des cellules non embryogènes (CNE) par rapport aux cellules embryogènes (CE) en présence de 2,4-D (Smith et Street 1974).

#### 5.1.1.2.2. Comparaison des cuvées en bioréacteurs et en flacons

Bien que la productivité en embryons soit à peu près identique pour les cuvées en flacons et en bioréacteurs (tab. 5.1: en moyenne  $1,9 \times 10^3$  ET.l<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>), les cuvées en flacons (séries F2 à F8) ont produit 32 % et 54 % moins d'embryons torpilles que les bioréacteurs (soit 36 ET.ml<sup>-1</sup> et 24 ET.ml<sup>-1</sup> pour les séries F-r et F-t respectivement contre 53 ET.ml<sup>-1</sup> en bioréacteur).

Ces résultats tiennent surtout au fait que la germination en culture des embryons a lieu plus tôt en flacon qu'en bioréacteur (germination à 19 jours en moyenne pour les flacons contre 32 jours pour les bioréacteurs). La germination en culture des embryons torpilles provoque l'arrêt du développement des autres classes d'embryons et bloque la conversion des embryons coeurs en embryons torpilles (voir chapitre 5.1.1.3.2).

La productivité en biomasse sèche (PS pour Poids Sec) est 3 à 4 fois supérieure en flacons par rapport aux bioréacteurs (soit  $0,45 \text{ g PS.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ,  $0,60 \text{ g PS.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et  $0,16 \text{ g PS.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour les cuvées F-r, F-t et les bioréacteurs respectivement). Ces données sont appuyées par les taux de croissance spécifique en biomasse sèche ( $\mu^P$ ) qui sont également supérieurs en flacons ( $0,18 \text{ j}^{-1}$  contre  $0,07 \text{ j}^{-1}$  en bioréacteurs).

#### 5.1.1.2.3. Qualité des embryons produits

La notion de qualité des embryons fait ici référence à leur capacité à germer correctement après la récolte et à produire des plants vigoureux possédant les mêmes caractéristiques morphologiques que les individus issus de graines.

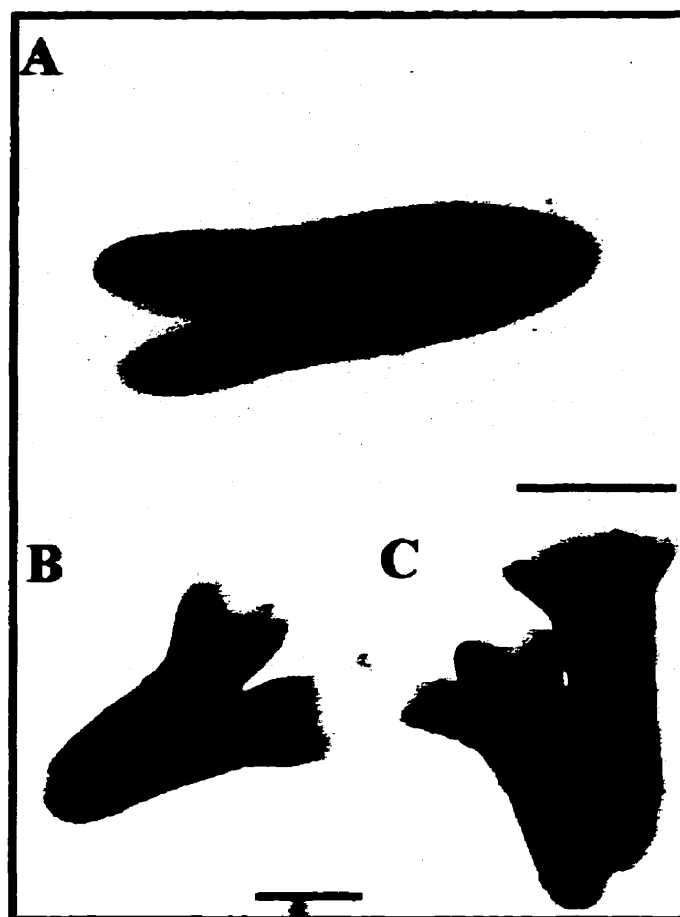
L'observation microscopique de la suspension embryonnaire en fin de culture révèle un mélange de cellules non embryogènes, d'embryons à tous les stades de développement et de jeunes plantules (embryons germés). Malgré les essais de filtration de l'inoculum, le développement des embryons en mode de production classique reste donc totalement asynchrone. De plus les embryons torpilles produits comportent de nombreuses anomalies (fig. 5.2). On rencontre notamment beaucoup d'embryons en amas ou possédant un nombre anormal de cotylédons. Ces embryons de mauvaise qualité produisent des plants anormaux qui ne sont pas viables à long terme.

Les essais de germination sur gélose ont démontré que 100 % des embryons récoltés sont capables de produire une plantule. Les plants produits avaient cependant une apparence anormale car ils possédaient de très nombreuses tiges et racines. Ce phénomène peut être dû soit à des anomalies chromosomiques, soit au phénomène d'embryogenèse secondaire. De nouveaux embryons se forment alors à la surface de l'embryon récolté. En germant, ils donnent l'impression d'un enchevêtrement de tiges et de racines provenant toutes du même embryon. Dans ce cas, il est très difficile de savoir qui de l'embryon récolté ou des embryons adventifs a effectivement germé.

### **5.1.1.3. Résultats typiques: cuvée B8**

#### **5.1.1.3.1. Qualité de l'inoculum**

L'observation de l'inoculum au microscope permet d'évaluer le pourcentage de cellules embryogènes qui le composent. Ce pourcentage est directement proportionnel au potentiel embryogène de la suspension cellulaire et indique donc la qualité de l'inoculum.



**Figure 5.2: Exemples d'anormalités observées chez les embryons produits *in vitro*.**

A: Embryon torpille normal; B: Embryon torpille à quatre cotylédons; C: Embryons torpilles avec cotylédons en corolle. (la barre représente 100  $\mu\text{m}$ ).

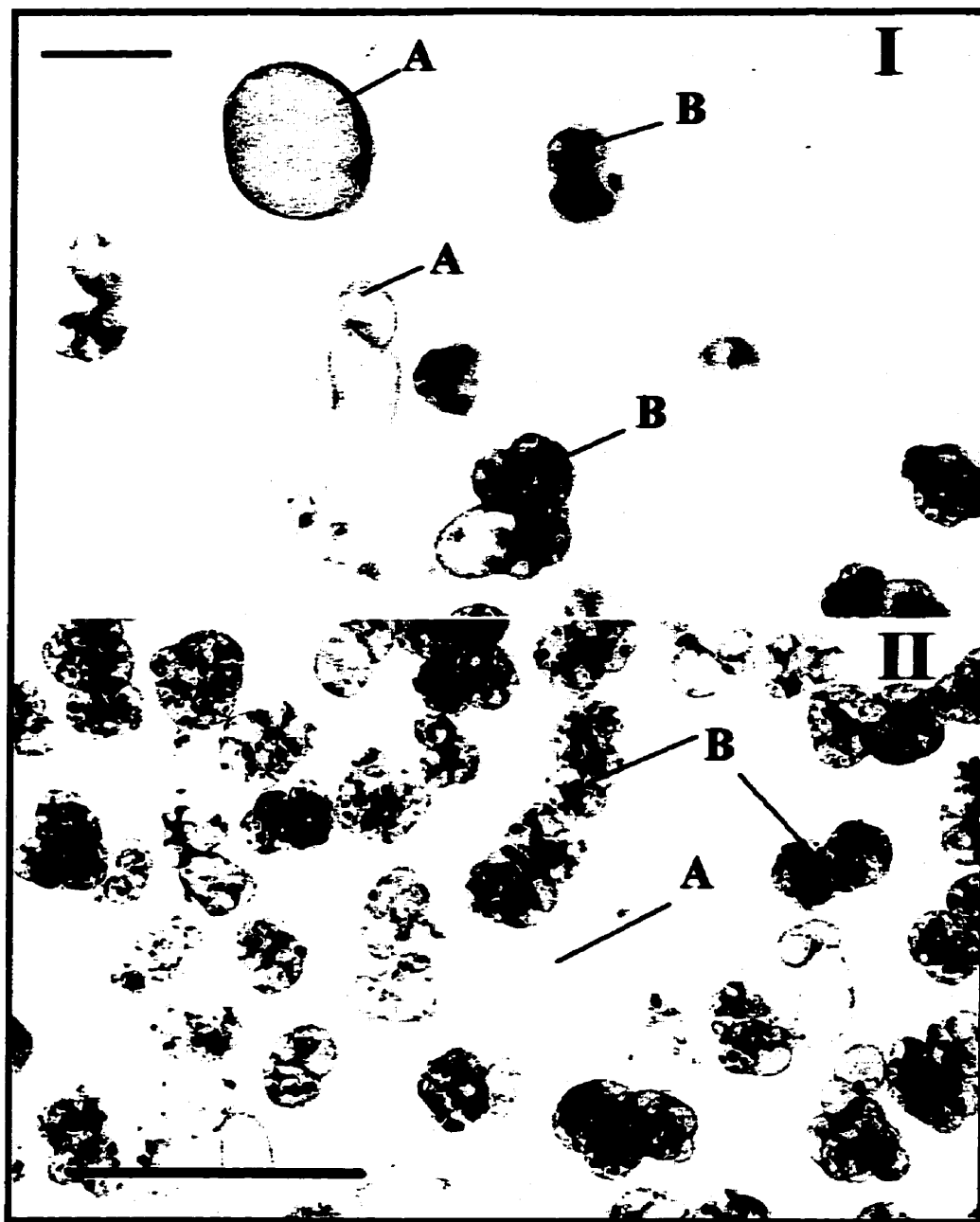
Au microscope, les CNE sont très nettement discernables des CE de par leurs différences morphologiques marquées. Les CE ont toutes les caractéristiques des cellules indifférenciées que l'on rencontre dans les méristèmes primaires des plantes (bourgeons et apex racinaires) et dans les tissus embryonnaires. Ce sont de petites cellules rondes très peu vacuolées qui possèdent un cytoplasme important et un gros

noyau. Cultivées en milieu liquide, elles sont organisées en amas denses d'une vingtaine de cellules appelées masses proembryonnaires (MPE - fig 5.3.I).

Les CNE au contraire ont des caractéristiques de cellules différenciées, comme les cellules parenchymateuses. Ce sont de grosses cellules allongées possédant un cytoplasme peu important et dont la majorité de l'espace intracellulaire est occupé par de grosses vacuoles. Cultivées en milieu liquide, on les retrouve le plus souvent isolées ou en amas de 3 à 5 cellules au plus (fig. 5.3.II).

Ces différences morphologiques sont accompagnées de différences de densité qui compliquent les opérations de tamisages. Les CE, plus denses que les CNE, forment à la surface des filtres des couches denses de cellules qui rendent les opérations de tri particulièrement difficiles. De plus, les MPE sont à peu près de la même taille que les grosses CE isolées, ce qui rend leur séparation impossible sans avoir recours à des gradients de densité (Bazinet 1994).

Dans le cas de B8, l'observation de l'inoculum au microscope a révélé que, même après filtration, près de 70 % des cellules étaient de nature non-embryogène. Le tamisage des suspensions cellulaires avant l'inoculation du milieu de production ne suffit donc pas à éliminer les CNE et à sélectionner les MPE.



**Figure 5.3: Inocula cellulaires.**

I) Inoculum issu de la lignée SP29. II) Inoculum issu de la lignée FP95. A: Cellules non embryogènes; B: cellules embryogènes. (La barre représente 50  $\mu$ m).



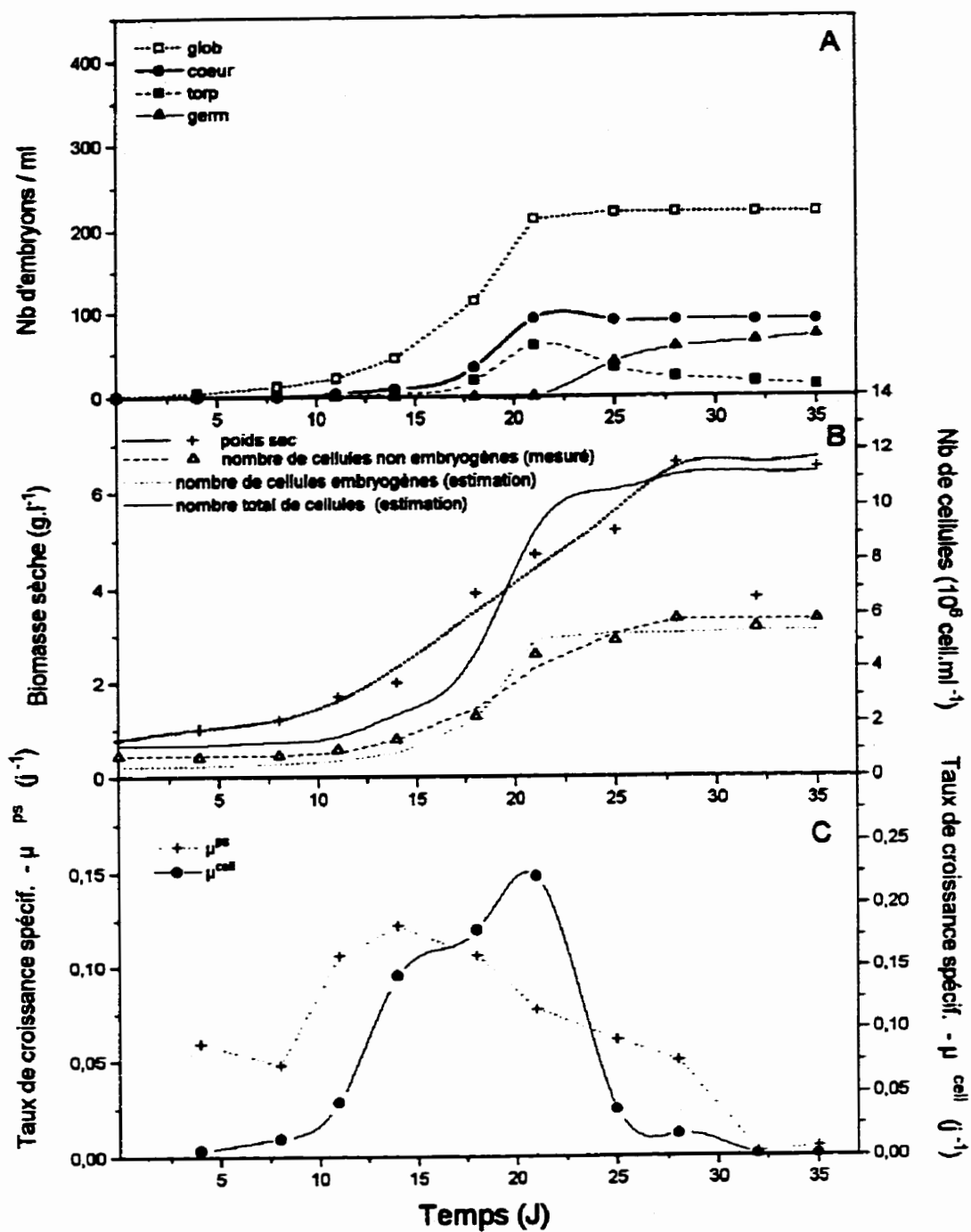
#### 5.1.1.3.2. Production des embryons et germination en culture.

La figure 5.4.A présente le profil d'apparition des différentes classes d'embryons au cours de la culture B8. Les données relatives au nombre d'embryons torpilles et germés proviennent des comptages effectués lors des différents échantillonnages. Le nombre d'embryons globulaires et coeurs a été estimé à partir du moment de leur apparition dans le milieu de culture et du pourcentage de chaque classe d'embryon mesuré lors du dernier échantillonnage. Le mode d'estimation est décrit en détail à l'annexe 5.

La cuvée B8 est totalement asynchrone, c'est-à-dire que les différents stades du développement sont tous présents en même temps dans le milieu de culture. La production d'embryons torpilles est maximale au bout de 3 semaines de production (I+21). La culture est alors composée de 53 % d'embryons globulaires (EG), 23 % d'embryons cordiformes (EC) et seulement 15 % d'embryons torpilles d'apparence normale (ET). On dénombre également 8 % d'embryons torpilles anormaux soit un pourcentage d'anormalité de 50 %. A I+35, 86 % des embryons torpilles ont germé, ce qui fait passer le nombre d'embryons torpilles normaux à seulement 3 % du nombre total d'embryons en culture.

La conversion des MPE en EG, des EG en EC et des EC en ET a lieu en même temps, comme c'est aussi le cas lors des travaux de Cazzulino et col. 1989, Ducos et col. 1993, Hari 1979 et Huang et col. 1992.

La conversion des EC en embryons torpilles (ET) cesse dès que les premiers embryons germés apparaissent dans le milieu de culture. De même, la conversion des embryons globulaires en embryons coeurs n'est pas complète. Ainsi, au dernier échantillonnage (I+35), la suspension embryonnaire contient 55 % de EG et 22 % de EC qui n'ont pas complété leur développement.



**Figure 5.4: Résultats de production de la cuvée B8**  
**(Méthode classique, bioréacteur, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).**

Ces blocages du développement embryonnaire ont été largement décrits dans la littérature et semblent aller de paire avec tout mode de production asynchrone. Ducos et collaborateurs (1993) ont par exemple rapporté qu'au bout de trois semaines de culture, seulement 5 % des embryons produits étaient au stade torpille, et ce aussi bien en flacons agités qu'en bioréacteurs.

#### 5.1.1.3.3. Qualité des embryons

La qualité des embryons produits est très médiocre. On rencontre notamment beaucoup d'embryons en amas ou possédant un nombre anormal de cotylédons. En fait, plus de 50 % des embryons matures formés ont une apparence anormale. Rappelons que seuls les embryons d'apparence normale ont été comptabilisés comme étant des embryons torpilles. Les embryons torpilles formés lors de la cuvée B8 ont de 1 à 2 mm de long, soit 4 à 8 fois plus que les embryons zygotiques de carotte au même stade de maturation (qui mesurent environ 200  $\mu\text{m}$  de long d'après les travaux de Smith en 1989, qui confirment nos propres mesures).

Cette particularité des embryons cultivés avait déjà été notée en 1989 par Carman, chez le blé. Cette taille anormale serait due à une vacuolisation des cellules embryonnaires provoquant une élongation prématurée des embryons. De même, les embryons de carotte obtenus lors des travaux de Molle et col. (1993) mesuraient de 400 à 2000  $\mu\text{m}$  de long soit 2 à 10 fois plus que des embryons zygotiques au même stade de maturation.

#### 5.1.1.3.4. Profil de croissance de la biomasse

Lors d'une culture de cellules, on peut mesurer l'augmentation de la biomasse de deux manières soit en suivant l'évolution du poids sec ou en mesurant la concentration cellulaire. En culture de cellules bactériennes, ces deux paramètres de

culture sont souvent directement proportionnels. Cependant, c'est loin d'être le cas en culture de cellules de plantes, notamment lorsqu'on étudie des cellules embryogènes.

Chez les bactéries en phase de croissance exponentielle par exemple, la taille des cellules est conservée au fil des générations. Le doublement du nombre de cellules est donc automatiquement accompagné par un doublement du poids sec. Avant la division, la taille de la cellule mère double de façon à ce que, après la division, chaque cellule fille ait une taille identique à celle de la cellule initiale. Lors du processus d'embryogenèse par contre, les cellules se divisent sans que la taille de la cellule mère ait doublé au préalable.

On assiste donc à une réduction drastique de la taille des cellules de l'embryon au cours de son développement de sorte que les cellules d'un embryon torpille sont beaucoup plus petites que n'importe quelle cellule de plante adulte (Ammirato et col. 1987). Dans le cas de la capselle (*Capsella bursapastoris*) par exemple, les cellules composant les tissus reproducteurs ont un diamètre moyen supérieur à 100  $\mu\text{m}$  alors que celui des cellules composant l'embryon torpille est d'environ 10  $\mu\text{m}$  (d'après photos de Raven et col. 1992<sup>d</sup>)

Ce phénomène implique que le poids sec et la concentration en cellules d'une culture de cellules embryogènes sont des mesures fondamentalement différentes et complémentaires. Idéalement, il faudrait suivre l'évolution de ces deux paramètres tout au long de la culture. En pratique, il est presque impossible de mesurer avec précision le nombre de cellules composant une suspension embryonnaire quand on a dépassé le stade MPE.

On a vu à la sous-section 4.5.2 qu'il faut désagréger les amas cellulaires afin de pouvoir compter les cellules qui les composent. Pour ce faire, on place les agrégats au contact d'une solution enzymatique qui digère partiellement la paroi pecto-cellulosique qui lie les cellules entre elles. Cependant, si on laisse les cellules trop longtemps au contact des enzymes, on obtient des protoplastes (cellules nues sans paroi

pecto-cellulosique) qui se fusionnent, rendant le comptage impossible. Lorsqu'on veut déterminer le nombre de cellules composant un amas dense (comme des embryons), il faut donc travailler par étapes successives, détacher progressivement les cellules de la surface de l'amas et les compter au fur et à mesure de l'opération. Ainsi, la mesure du nombre de cellules d'un échantillon contenant des embryons torpilles peut prendre jusqu'à trois jours.

De ce fait, seule les concentrations en cellules non embryogènes et en cellules composant les MPE ont été mesurées lors des échantillonnages. Au delà du stade MPE, la concentration en cellules embryogènes a été estimée en multipliant les concentrations de chaque classe d'embryons par le nombre moyen de cellule de cette classe d'embryon (par exemple: (concentration en EG  $\times$  nombre moyen de cellules des EG) + (concentration en EC  $\times$  nombre moyen de cellules des EC) + etc).

Les nombres moyens de cellules pour chaque classe d'embryons ont été mesurés lors de la récolte du réacteur (I+35) et sont présentés au tableau 5.2. Ces mesures ont porté sur des échantillons de 100 embryons ou plus et ont été effectuées en triplicats. L'intervalle statistique indiqué correspond à l'écart type moyen.

La figure 5.4.B présente l'évolution du nombre de cellules et du poids sec lors de la culture B8. L'inoculum est composé de seulement 33 % de cellules embryogènes malgré l'opération de filtration qui devait éliminer les CNE. En cours de culture, le pourcentage de CE au sein de la population cellulaire passe à 56 % à I+25 puis retombe à 48 % à I+35. Si on calcule le  $\mu^{cell}$  apparent (entre I+0 et I+35) pour les deux types cellulaires on obtient  $0,07 \text{ j}^{-1}$  pour les CE et  $0,05 \text{ j}^{-1}$  pour les CNE. Les CE possèdent donc un avantage sélectif par rapport aux CNE lors de B8.

**Tableau 5.2: Poids sec moyen et nombre de cellules moyen des principaux stades embryonnaires (lignée FP29, méthode de production classique).**

<i>Stade embryonnaire</i>	<i>Poids sec moyen de 1000 emb</i>	<i>Nombre de cellules moyen</i>	<i>Poids sec estimé de <math>10^6</math> cellules</i>
CNE	-	-	0,84 mg
MPE	-	20 <del>20</del>	0,37 mg
Globulaire	( 0,36 $\pm$ 0,09 ) mg	1000 $\pm$ 500	0,36 mg
Coeur	( 1,71 $\pm$ 0,11 ) mg	6000 $\pm$ 600	0,28 mg
Torpille	( 7,89 $\pm$ 0,51 ) mg	36000 $\pm$ 2000	0,22 mg
Plantule	( 14,54 $\pm$ 0,78 ) mg	40000 $\pm$ 5000	0,37 mg

L'accroissement du poids sec suit à peu près l'évolution du nombre de CNE. Ainsi, le poids sec d'un million de cellules (CE + CNE) est à peu près conservé tout au long de la culture (0,63 mg à I+0 et 0,60 mg à I+35, voir annexe 7). Ces résultats suggèrent que la taille globale des cellules (CNE + CE) est conservée tout au long de la culture.

La figure 5.4.C présente l'évolution du taux de croissance spécifique en poids sec ( $\mu^{ps}$ ) et du taux de croissance spécifique en cellules ( $\mu^{cell}$ ) en fonction du temps lors de la culture B8.  $\mu^{ps}$  et  $\mu^{cell}$  ont été calculés selon les équations 5.1 et 5.2:

$$\mu^{ps} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (5.1)$$

$$\mu^{cell} = \frac{\ln C_2 - \ln C_1}{t_2 - t_1} \quad (5.2)$$

Où  $X$  représente la concentration en poids sec ( $g.l^{-1}$ ),  $C$  la concentration cellulaire ( $nb \text{ cell}.l^{-1}$ ) et  $t$  le temps (j). Notons que puisque le poids sec des CNE est proportionnel au nombre de CNE,  $\mu^{ps}_{CNE} = \mu^{cell}_{CNE}$ .

$\mu^{cell}$  augmente de  $0,01 \text{ j}^{-1}$  à  $0,22 \text{ j}^{-1}$  entre I+4 et I+21 puis diminue rapidement pour atteindre une valeur presque nulle à I+35.  $\mu^{cell}_{CNE}$  augmente lentement puis se stabilise à  $0,15 \text{ j}^{-1}$  (croissance exponentielle) de I+14 à I+21 pour ensuite diminuer progressivement. Le  $\mu^{ps}$  révèle un palier aux environs de  $0,12 \text{ j}^{-1}$  de I+11 à I+18. Ce palier coïncide à peu près avec la période de croissance exponentielle des cellules non embryogènes où  $\mu^{cell}_{CNE} = \mu^{ps}_{CNE} = 0,15 \text{ j}^{-1}$ . L'accroissement du poids sec semble donc presque exclusivement attribuable à l'augmentation du nombre de cellules non embryogènes dans le milieu.

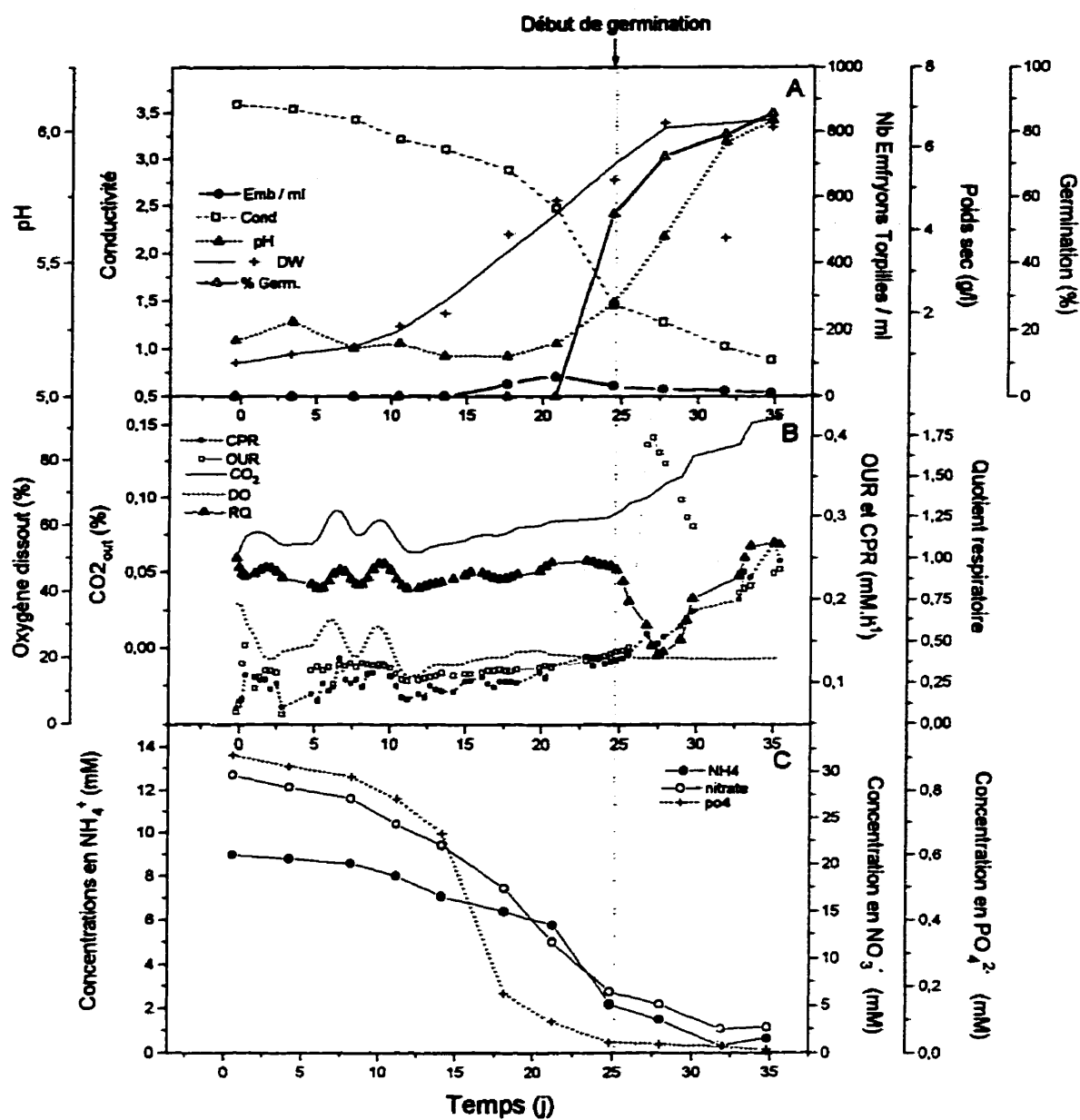


Figure 5.5: Graphique récapitulatif de la cuvée B8  
(Méthode classique, bioréacteur, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).



#### 5.1.1.3.5. pH, conductivité et principaux nutriments

La figure 5.5 présente l'évolution des différents paramètres de culture au cours de la cuvée B8. Bien que la concentration résiduelle du milieu de culture en plusieurs ions ait été déterminée ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), seules les concentrations en  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{PO}_4^{2-}$  sont présentées. Ce sont en effet les ions dont la fonction métabolique est la plus connue. Les ions nitrates et ammonium fournissent aux cellules l'azote entrant dans la composition des protéines, des nucléotides et des coenzymes alors que le  $\text{PO}_4^{2-}$  entre dans la composition de tous les intermédiaires énergétiques de la cellule (ATP, molécules phosphorylées, etc), des acides nucléiques et des phospholipides des membranes cellulaires (Raven et col. 1992<sup>5</sup>).

Les autres ions, bien qu'absolument nécessaires dans le milieu de culture, ont des fonctions moins bien connues et ne seront donc pas présentés ici. On peut cependant signaler que les concentrations en  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  diminuent très lentement dans le milieu de culture pour l'ensemble des cuvées, ce qui avait déjà été le cas lors des travaux de Archambault et col. (1994) et Lavoie (1997).

Le pH du milieu de culture reste à peu près stable à 5,2 jusqu'à l'apparition des premiers embryons germés (I+21). Dès que la germination commence, le pH augmente jusqu'à atteindre 6,0 à I+35. De même, on observe une chute brusque de la conductivité à I+21, certainement due à la brusque disparition du  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ . Il n'est cependant pas possible de dégager de tendances nettes quant à l'évolution des taux de consommation spécifiques au cours de la culture (voir annexe 7). On notera néanmoins que le taux de consommation spécifique du  $\text{NO}_3^-$  par rapport aux cellules ( $q_{\text{NO}_3}^c$ ) est toujours supérieur au taux de consommation spécifique en  $\text{NH}_4^+$  (rapport  $q_{\text{NH}_4}^c / q_{\text{NO}_3}^c$  supérieur à 1).

#### 5.1.1.3.6. ... Calculs respirométriques

La figure 5.5.B présente les principaux résultats respirométriques enregistrés lors de la cuvée B8. La concentration en oxygène dissous est stable à  $21 \pm 3 \%$ . Les résultats d'une étude d'Archambault et collaborateurs (1994) utilisant des cellules d'*Eschscholtzia californica* a démontré qu'une DO de 20 % assurait une production et une qualité maximales des embryons somatique dans des conditions expérimentales similaires à celles utilisées ici.

Le pourcentage de CO<sub>2</sub> dans le gaz en sortie du bioréacteur oscille autour de la valeur 0,07 % de I+0 à I+12 puis augmente jusqu'à atteindre 0,15 % à I+35. Le taux de production de CO<sub>2</sub> (CPR) et le taux de consommation en oxygène (OUR) sont stables à environ 0,10 mM.h<sup>-1</sup> jusqu'à I+25. A partir de I+25, le OUR augmente très rapidement jusqu'à atteindre 0,42 mM.h<sup>-1</sup> à I+ 27 puis diminue pour se stabiliser aux environs de 0,20 mM.h<sup>-1</sup> à partir de I+32. Le CTR augmente progressivement de I+25 à I+35 jusqu'à atteindre 0,25 mM.h<sup>-1</sup>.

Le quotient respiratoire (RQ = CTR / OUR) est très proche de 1 sur toute la durée de la culture, sauf à partir de I+25 (début de la germination en culture) où il diminue brusquement à 0,3. Il apparaît donc que l'apparition des embryons germés provoque une modification du métabolisme respiratoire de la culture. Cette modification du métabolisme est corrélée avec l'arrêt du développement des embryons à partir de I+25 (fig. 5.4.A).

#### 5.1.1.3.7. ... Cultures en flacon agités: Cuvée F8-r

##### Production et Synchronisation

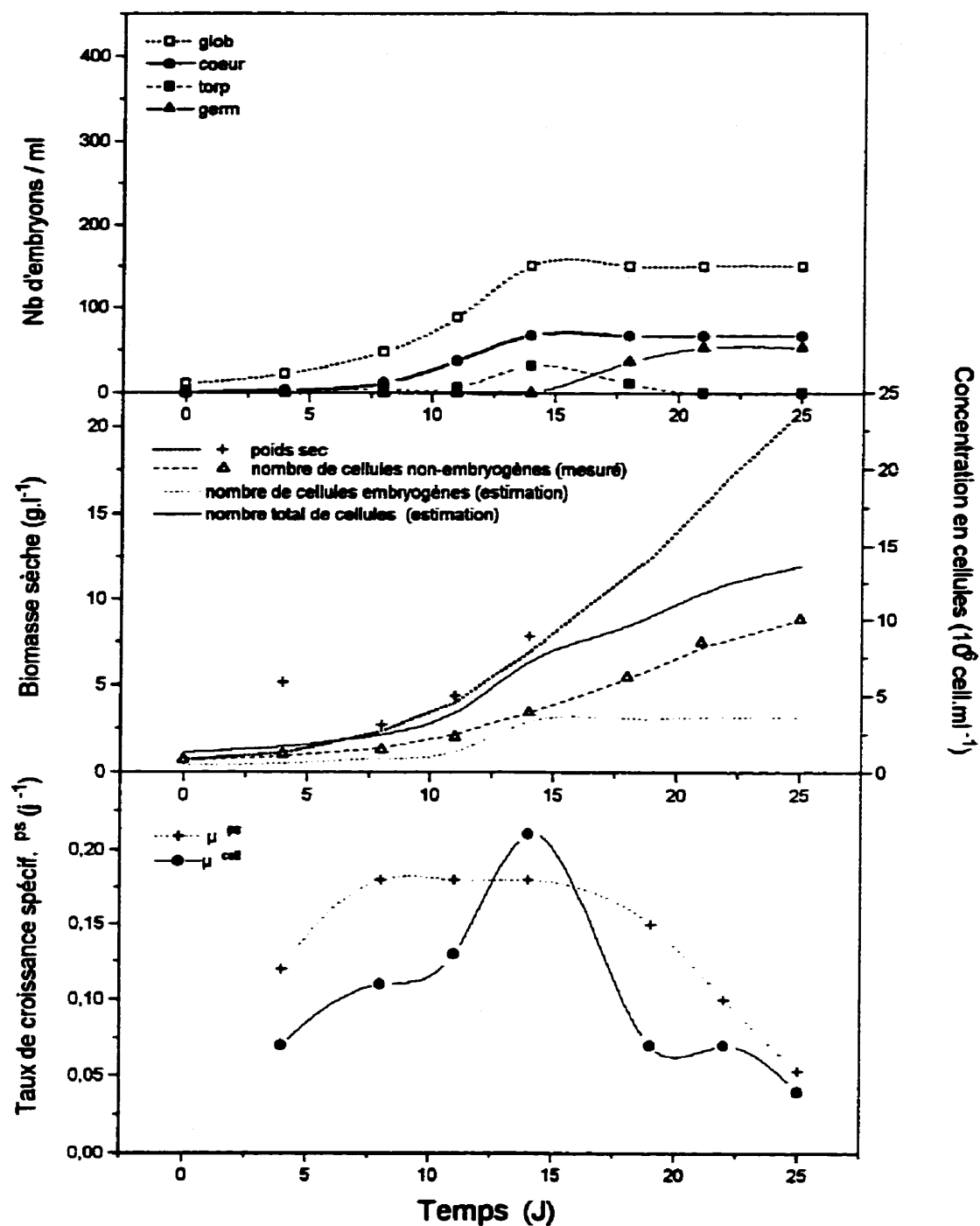
Une série de cuvées en flacons agités (F8-r et F8-t) ont été menées parallèlement à la cuvée B8. La figure 5.6 présente le profil de production et de croissance de la culture en flacon agité F8-r (moyenne de deux flacons).

Le nombre maximal d'embryons produits en flacons agités est 2 fois moins important que celui obtenu lors de la cuvée en bioréacteur. Ces résultats confirment ceux déjà obtenus chez la carotte avec le même bioréacteur par Archambault et ses collaborateurs (1995).

La culture en flacons agités est totalement asynchrone puisque toutes les phases du développement embryonnaire se chevauchent. La conversion des MPE en embryons globulaires et la conversion de ces derniers en embryons coeurs a lieu en même temps, de I+0 à I+11. De même, le passage de coeur à torpille a lieu alors que les EG finissent leur conversion en embryons coeurs (de I+11 à I+14). Enfin, à partir de I+18, la totalité des embryons torpilles germent.

Le nombre total d'embryons produits au cours de F8 est 32 % inférieur à celui obtenu lors de B8. De plus, le développement de 80 % des embryons produits est bloqué avant d'atteindre le stade torpille, ce qui se traduit par un pourcentage de conversion maximal des embryons globulaires en embryons torpilles de seulement 11 % contre 23 % lors de B8. Le pourcentage d'anormalité des embryons produits dépasse 40 %.

En flacons agités, l'apparition des différentes classes d'embryons a lieu beaucoup plus tôt qu'en bioréacteur. Par exemple, l'apparition des premiers embryons torpilles a lieu à I+4 en flacons alors qu'il faut attendre I+11 en bioréacteur.



**Figure 5.6: Résultats de production de la cuvée F8-r (Méthode classique, flacons agités, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).**

Cellules embryogènes et non embryogènes

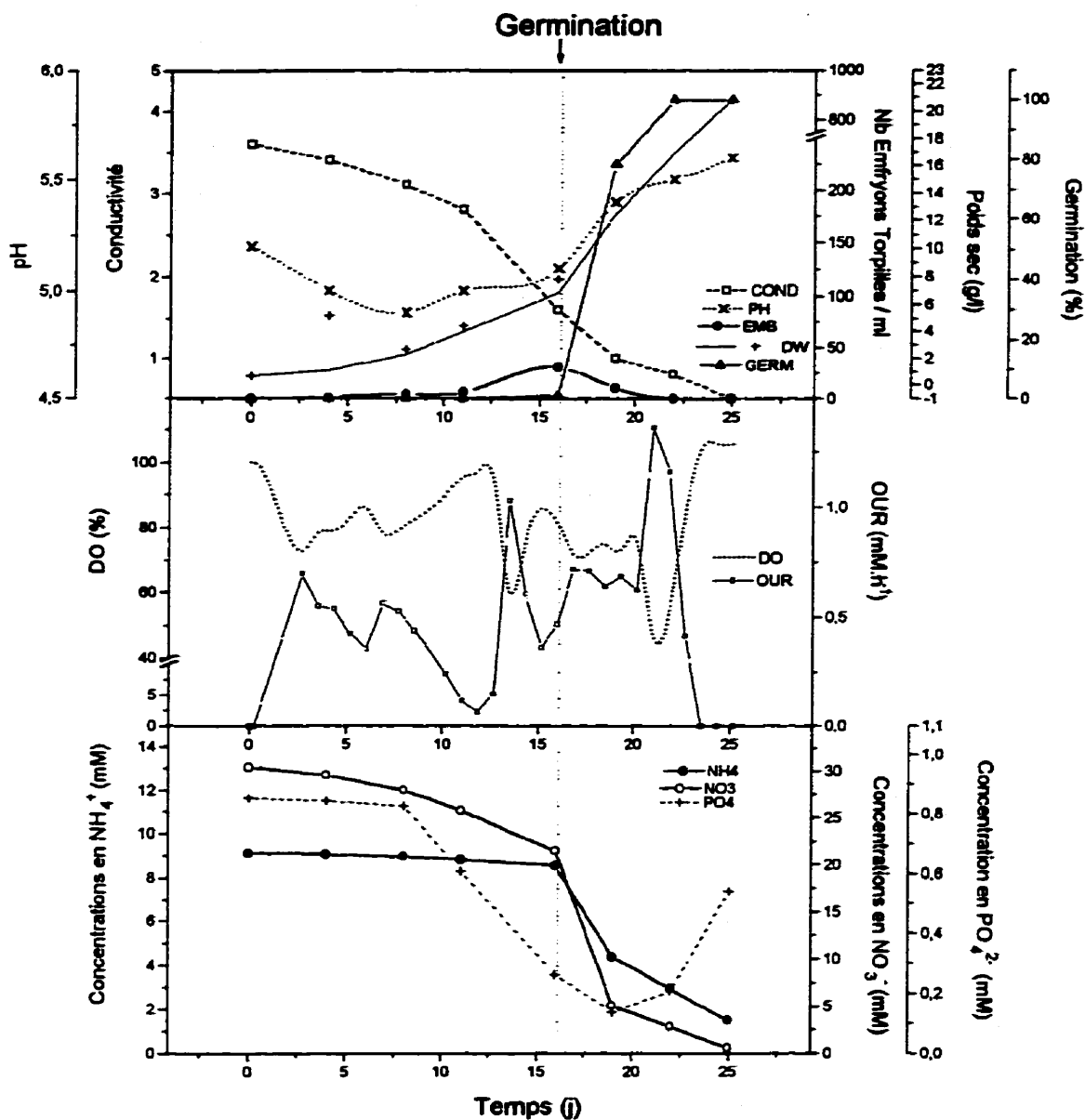
Le tableau 5.3 présente l'accroissement du nombre de cellules et les  $\mu^{\text{cell}}$  apparents ( $\mu^{\text{cell-ap}}$ ) des CE et des CNE entre I+0 et I+25 pour les cuvées B8 et F8-r. Les valeurs relatives aux cellules non embryogènes sont issues de comptages alors que la concentration en cellules embryogènes est estimée à partir des concentrations de chaque classe d'embryons et du nombre moyen de cellules par embryon (voir paragraphe 5.1.1.3.4).

**Tableau 5.3: Concentrations cellulaires lors des cuvées B8 et F8-r**

		Conc. cellulaire (nb $10^6$ cell.ml <sup>-1</sup> )	$\mu^{\text{cell-ap}}$ (j <sup>-1</sup> )
<b>B8</b> (DO = 20 %)	CE	0,4 à 5,3	0,10
	CNE	0,8 à 5,3	0,08
<b>F8-r</b> (DO > 20 %)	CE	0,5 à 3,6	0,08
	CNE	0,8 à 10,0	0,10

La concentration en cellules non embryogènes en fin de culture est nettement supérieure en flacon par rapport au bioréacteur puisqu'on obtient  $5,3 \times 10^6$  CNE.ml<sup>-1</sup> au bout de 25 jours lors de B8 contre  $10,0 \times 10^6$  CNE.ml<sup>-1</sup> en flacon agité sur le même intervalle de temps. Ainsi, alors que les CNE constituent 61 % des cellules de l'inoculum de départ, 25 jours après l'inoculation, elles représentent plus de 73 % du total des cellules pour la cuvée F8-r. En bioréacteur au contraire, le pourcentage de

CNE au sein de la population cellulaire passe de 67 % à 50 % lors des 25 premiers jours de la production.



**Figure 5.7: Graphique récapitulatif de la cuvée F8-r  
(Méthode classique, flacons agités, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).**

Ces résultats démontrent que la prolifération des cellules non embryogènes est stimulée en flacon agité et inhibée en bioréacteur. Les figures 5.5.B et 5.7.B montrent qu'en bioréacteur la concentration en oxygène dissous (DO) est maintenue à 20 % de la saturation de l'air alors qu'en flacons, la DO est toujours supérieure 20 %. Donc, dans les conditions expérimentales utilisées ici, des valeurs de DO supérieures à 20 % favorisent la prolifération des CNE ( $\mu^{\text{cell-ap}}_{\text{CNE}} = 0,10 \text{ j}^{-1}$ ) alors qu'une DO de 20 % limite leur division ( $\mu^{\text{cell-ap}}_{\text{CNE}} = 0,08 \text{ j}^{-1}$ ). Ces résultats confirment ceux obtenus chez *Eschscholtzia californica* par Archambault et col. (1994) qui démontrent que la production des cellules non embryogènes est beaucoup plus importante à 60 % qu'à 20 % de DO.

De même, la concentration en oxygène dissous influence le développement des cellules embryogènes puisque  $\mu^{\text{cell-ap}}_{\text{CE}} = 0,10 \text{ j}^{-1}$  en bioréacteur et  $0,08 \text{ j}^{-1}$  en flacons agités. Notons cependant que sur l'ensemble des cuvées effectuées en mode de production classique (tableau 5.1), la productivité en embryons est identique en flacons et en bioréacteurs.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Kessel et Carr (1972) chez la carotte selon lesquels une DO supérieure à une valeur limite ( $\text{DO}_{\text{lim}}$ ) favoriserait le développement des cellules différenciées (dans notre cas les CNE) alors que des DO inférieures à  $\text{DO}_{\text{lim}}$  favoriseraient l'embryogenèse. D'autres auteurs ont décrit le même phénomène chez l'épicéa (Kvaalen et col. 1991) et le blé (Carman et Campbell 1990).

#### Taux de croissance spécifique

La figure 5.6.C présente l'évolution de  $\mu^{\text{m}}$  et  $\mu^{\text{cell}}$  au cours de la culture F8-r. Le  $\mu^{\text{cell}}$  augmente progressivement de  $0,07 \text{ j}^{-1}$  à  $0,21 \text{ j}^{-1}$  de I+4 à I+14 puis diminue pour atteindre  $0,04 \text{ j}^{-1}$  en fin de culture. La période d'augmentation du taux de croissance spécifique des cellules correspond à la période de croissance des embryons

(formation des EC, EG et ET). On constate que  $\mu^{cell}$  diminue peu après que les premiers embryons germés soient apparus dans le milieu de culture, comme si le phénomène de germination inhibait la division cellulaire.

Le  $\mu^{cell-ap}$  après 25 jours de cultures est à peu près identique en flacon et en bioréacteur ( $0,09 \text{ j}^{-1}$ ) mais, dans le premier cas, l'accroissement du nombre de cellules concerne majoritairement des cellules non embryogènes. Ceci est confirmé par le fait que le  $\mu^{PS-ap}$  est supérieur en flacon (à I+25,  $\mu^{PS-ap} = 0,08 \text{ j}^{-1}$  et  $0,13 \text{ j}^{-1}$  pour B8 et F8-r respectivement) et que le nombre total d'embryons produits est 2 fois supérieur en bioréacteur par rapport aux flacons agités (voir annexe 3).

Par ailleurs, le poids sec moyen d'un million de cellules à la fin de la culture F8-r est plus de 2 fois supérieur à celui enregistré à la fin de B8 (1,54 mg et 0,60 mg respectivement), ce qui indique que les cellules sont en moyenne beaucoup plus grosses en flacons agités (CNE majoritaires).

#### Germination en culture

Tout comme l'apparition des différentes classes d'embryons a lieu plus tôt en flacon qu'en bioréacteur, le début de la germination en culture intervient 7 jours plus tôt lors de la cuvée F8-r qu'au cours de B8 (début de germination à I+18 et I+25 pour F8-r et B8 respectivement). Etant donné que le développement embryonnaire cesse dès que les premiers embryons commencent à germer (voir fig. 5.6.A, l'arrêt des conversions à I+18), la germination précoce en flacon explique pour une bonne part le peu d'embryons torpilles produits lors de la cuvée F8-r. De plus, le pourcentage maximal de germination est 18 % supérieur en flacon agité où la totalité des embryons torpilles produits germent en culture contre 85 % en bioréacteur.



### Taux de consommation et rendements

Les taux de consommation spécifiques des principaux nutriments par rapport aux cellules ( $q_N^c$ ) lors de la cuvée F8-r sont présentés à l'annexe 8. Ils sont globalement identiques à ceux obtenus lors de B8, sauf en ce qui concerne  $q_{NH_4}^c$  qui est légèrement inférieur en flacon. Par exemple, au moment où on atteint le nombre d'embryons maximum (à I+21 pour B8 et I+14 pour F8-r), on obtient un  $q_{NH_4}^c$  de 25  $\mu\text{mole.j}^{-1} \cdot (10^6 \text{cell})^{-1}$  pour B8 et 12  $\mu\text{mole.j}^{-1} \cdot (10^6 \text{cell})^{-1}$  pour F8-r. Le rapport  $q_{NH_4}^c/q_{NO_3}^c$  reste cependant inférieur à 1 pour les deux cultures.

Les rendements de consommation des nutriments par rapport aux cellules ( $Y_N^c$ ) obtenus en flacons sont globalement supérieurs à ceux observés en bioréacteur, sauf en ce qui concerne le  $NH_4^+$ . Une DO supérieure à 20 % semble permettre une meilleure utilisation des nutriments. Notons que les pourcentages de CE et de CNE au sein de la population cellulaire sont très différents en bioréacteur et en flacons agités. Il est donc difficile de savoir si ces rendements supérieurs sont dus à une modification du métabolisme global des cellules ou si ces résultats sont dus à la proportion différente de CE dans la culture.

#### 5.1.1.4. Conclusion

En résumé, la faible productivité des cuvées effectuées selon le mode de production classique et la mauvaise qualité des embryons produits sont attribuables, d'une part, à la mauvaise qualité des inocula employés et, d'autre part, au manque de synchronisation du développement des embryons lors de la production.

La lignée cellulaire SP29 est peu embryogène. Les suspensions cellulaires qui en sont issues sont composées majoritairement de cellules différenciées non embryogènes et de plus, ces cellules sont "habituées", c'est-à-dire qu'elles n'ont plus besoin de 2,4-D pour se diviser. Cette habitude des cellules cultivées en présence de

2,4-D pendant de longues périodes a, entre autre, été décrite par Smith et Street (1974). De plus, nous avons démontré que les CNE ont un avantage sélectif par rapport aux cellules embryogènes en flacons agités. Comme la phase d'initiation est effectuée en flacons agités, il en résulte que le nombre de CE (donc l'embryogénicité de la lignée cellulaire) ne cesse de diminuer au fil des repiquages.

Le tamisage de l'inoculum ne suffit pas à synchroniser la production des embryons. Ce manque de synchronisation semble être la cause de l'arrêt du développement des embryons immatures et contribue à produire des embryons de mauvaise qualité (pourcentage d'anormalités élevés et taille importante). De plus, la germination en culture est importante (jusqu'à atteindre 100 % en flacons agités).

#### 5.1.2. DÉVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE DE PRODUCTION PAR PALIERS DE DENSITÉ

Suite à ces conclusions, il a été décidé, d'une part, de développer une nouvelle lignée de cellules embryogènes et, d'autre part, de développer une nouvelle méthode de production visant à éliminer les CNE et à synchroniser le développement des embryons. Nous nous intéresserons dans un premier temps à la lignée cellulaire FP95 développée en Août 1995.

##### 5.1.2.1. Comportement de la lignée cellulaire FP95: cuvée B16

La lignée cellulaire FP95 a été testée sur deux courtes cuvées en mode de production classique (B14 et B16). Les conditions de cultures employées lors de ces deux cultures sont identiques à celles de la cuvée B8. La cuvée B14 ne sera pas commentée en raison de défauts du module d'agitation qui compliquent l'interprétation des résultats.

Les résultats de production de la cuvée B16 sont présentés à la figures 5.8 et à l'annexe 9. Le graphique récapitulatif de cette cuvée est présenté à l'annexe 10 pour

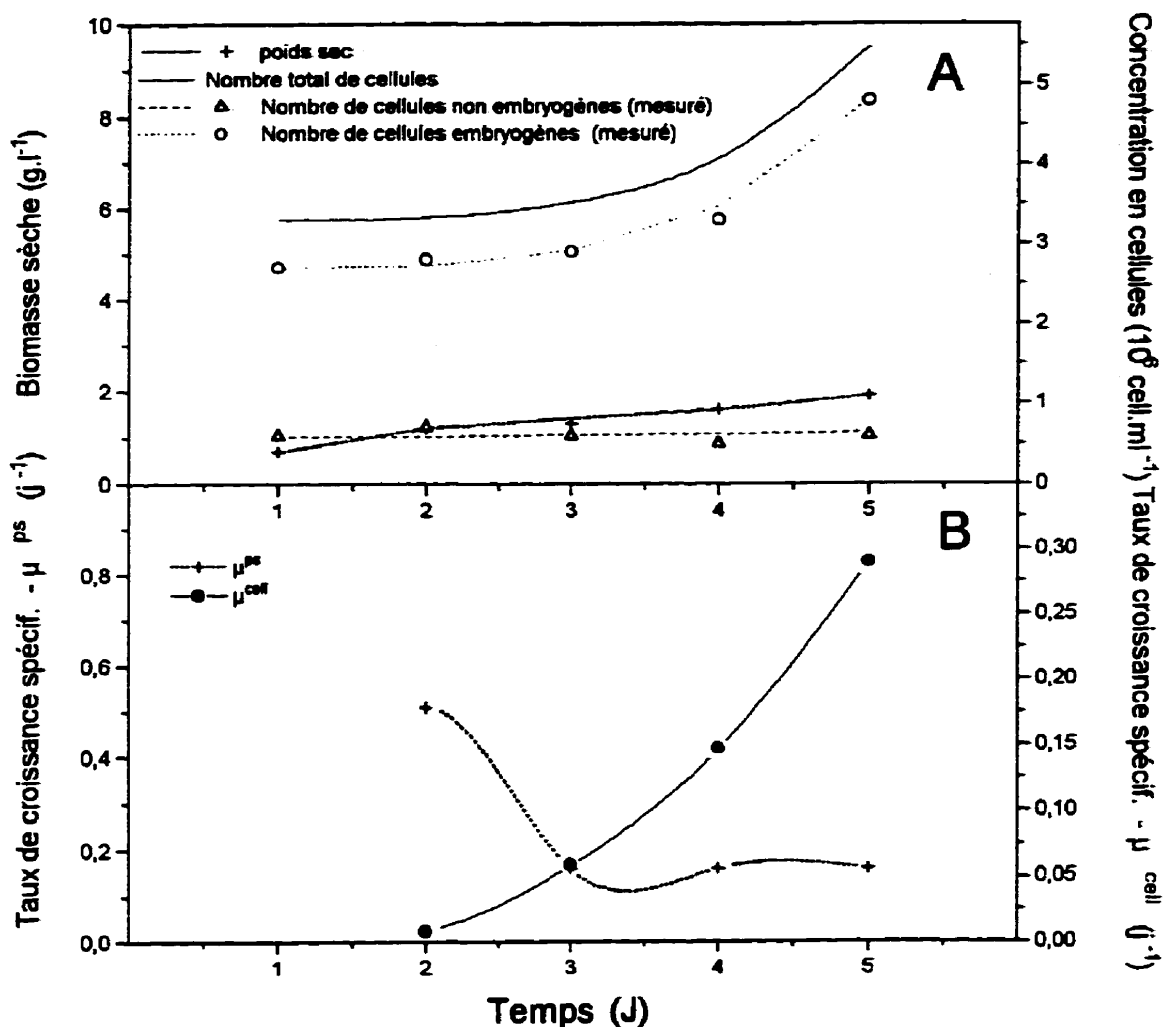
consultation. Les comptages ont révélé qu'après filtration, l'inoculum de la cuvée B16 était composé de 80 % de cellules embryogènes et 20 % de CNE seulement (voir figures 5.3 et 5.8.B). A la fin de la cuvée (I+5), les cellules embryogènes représentent déjà 88 % du nombre de cellules totales, ce qui correspond à un  $\mu^{\text{cell-sp}}_{\text{CE}}$  de  $0,12 \text{ j}^{-1}$  alors que le  $\mu^{\text{cell-sp}}_{\text{CNE}}$  est de  $0,01 \text{ j}^{-1}$  seulement. On peut donc considérer que la lignée cellulaire FP95 est très embryogène et que les CNE de cette suspension se divisent très lentement en absence de 2,4-D.

Le poids sec moyen des cellules de l'inoculum est divisé par 3 par rapport à celui de l'inoculum de la cuvée B8 (à I+0,  $10^6$  cellules pèsent 0,21 mg et 0,63 mg pour B16 et B8 respectivement). Puisque l'inoculum de la cuvée B16 comporte 80 % de CE alors que celui de la cuvée B8 n'en contiennait que 33 %, on peut conclure que les CE sont au moins 3 fois moins lourdes que les CNE. Cependant, les observations microscopiques révèlent que les CNE sont 5 à 10 fois plus grosses que les cellules embryogènes. Ces résultats confirment le fait que les CNE sont essentiellement composées d'eau (grosse vacuole) et sont donc moins denses que les CE (gros noyau et gros cytoplasme).

Le poids sec moyen de  $10^6$  cellules augmente de 0,21 mg à 0,39 mg de I+1 à I+4, ce qui démontre que globalement la taille des cellules augmente pendant cette période. Puis le poids sec moyen de  $10^6$  cellules redescend lors du dernier jour, ce qui semble indiquer que la division prend le dessus sur l'élongation au sein de la culture. Cette tendance est confirmée par le fait qu'en 5 jours,  $\mu^{\text{cell}}$  augmente progressivement de  $0,01 \text{ j}^{-1}$  à  $0,29 \text{ j}^{-1}$  alors qu'au contraire  $\mu^{\text{ps}}$  diminue de  $0,5 \text{ j}^{-1}$  à  $0,1 \text{ j}^{-1}$ .

Les taux de consommation spécifiques du  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  et  $\text{O}_2$  par rapport aux cellules augmentent légèrement de I+1 à I+4 pour diminuer lors du dernier jour (annexe 9). Ceci tend à démontrer que le métabolisme des cellules en élongation est supérieur à celui des cellules en division. Lors de la période d'élongation, les cellules

synthétisent les précurseurs qui leur seront nécessaires lors de la division, ce qui augmente leurs besoins nutritionnels. Elles peuvent également faire des réserves sous forme d'amidon, ce que les cellules en division ne font pas (Raven et col. 1992<sup>o</sup>).



**Figure 5.8: Résultats de production de la cuvée B16**  
(Méthode classique, bioréacteur, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).

Les rendements de consommation par rapport aux cellules augmentent constamment sur toute la durée de la culture, ce qui confirme que le métabolisme des cellules s'oriente progressivement vers la fabrication de nouvelles cellules et non pas vers l'augmentation du poids sec des cellules existantes.

En conclusion, la lignée cellulaire FP95 contient une large proportion de cellules embryogènes. Elles sera donc utilisée pour la suite du travail expérimental. Les opérations de filtration ne suffisent pas à éliminer la totalité des CNE de l'inoculum mais ces dernières se divisant très lentement en absence de 2,4-D, leur présence dans le milieu de production devient vite négligeable en comparaison de la concentration en CE.

#### 5.1.2.2. Développement de la méthode par paliers de densité

Une série d'expériences en flacons a été réalisée dans le but de déterminer la meilleure densité d'inoculation de la lignée cellulaire FP95 en mode de production classique. Lors de ces expériences, dont les résultats sont présentés au tableau 5.4, quatre séries de trois flacons contenant du milieu de production ont été inoculés avec 1, 10, 50 et 100 g.l<sup>-1</sup> (en poids humide) de cellules filtrées (voir paragraphe 4.4.1.1 pour la préparation des inocula).

Seuls les flacons inoculés à 1 g.l<sup>-1</sup> ont produit des embryons torpilles au bout de 21 jours de culture, avec un pourcentage de germination en culture de 19 %. Ces cultures sont typiques du mode de production classique asynchrone, c'est-à-dire que tous les stades embryonnaires sont présents dans le milieu de culture, auxquels viennent s'ajouter les jeunes plantules. On observe les mêmes anomalies décrites précédemment, même si le nombre maximum d'embryons torpilles produits est nettement supérieur à celui de la cuvette F8-r (1040 ET.ml<sup>-1</sup> contre 30 ET.ml<sup>-1</sup> pour F11 et F8-r respectivement), ce qui confirme la bonne embryogénicité de la lignée FP95.

Mais les résultats les plus intéressants concernent les flacons des séries F21, F31 et F41. D'une part, plus la densité d'inoculation est élevée et moins les embryons produits sont différenciés. En effet, alors qu'à  $10 \text{ g.l}^{-1}$ , la culture est essentiellement composée d'embryons globulaires, à  $50 \text{ g.l}^{-1}$  on y trouve une majorité de MPE et à  $100 \text{ g.l}^{-1}$ , les cellules non embryogènes constituent plus de 90 % de la suspension cellulaire. Il apparaît donc que plus la densité d'inoculation en cellules est élevée et plus les blocages interviennent tôt lors du développement embryonnaire.

Mais, ce qui est surtout remarquable, c'est que lorsque ces blocages interviennent, ils permettent d'obtenir des suspensions composées presque exclusivement d'une seule classe d'embryons: une culture synchrone. Ces résultats ne sont pas nouveaux. Les travaux de Warren et Fowler en 1981 avaient déjà démontré que le développement des embryons est plus hétérogène lorsque les inocula cellulaires sont faibles (moins de  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$  en matière humide). De même, l'existence de blocages développementaux à forte densité d'inoculation (phénomène d'auto-inhibition ou d'auto-antagonisme, à partir de  $5,0 \text{ g.l}^{-1}$  en matière humide) a déjà été largement documentée (Halperin 1967, Hari 1980, Iida et col. 1992, Molle et col. 1993, Nouaille et Pétiard 1988).

Jusqu'à présent, ces auteurs ont donc travaillé à basse densité d'inoculation afin d'éviter les blocages développementaux qui diminuent la productivité des cultures. Or, ce qui est intéressant ici, c'est que le phénomène d'auto-inhibition permet de bloquer la croissance de tous les embryons au même stade de leur développement, ce qui synchronise la production. De plus, ce blocage est facilement réversible par simple dilution du milieu de culture. Au lieu de chercher à éviter le blocage développemental à forte densité cellulaire on peut donc, au contraire, l'utiliser pour synchroniser la production des embryons. Cette idée a été à l'origine du procédé de production par paliers de densité présenté au paragraphe suivant.

**Tableau 5.4: Influence de la densité d'inoculation en cellules sur la production d'embryons torpilles en flacons agités.**

Culture	Densité d'inoculation (g PH.l <sup>-1</sup> )	Poids sec final (g PS.l <sup>-1</sup> )	Nb maximum d'embyons Torpilles (nb ET.ml <sup>-1</sup> )	% final de germination en culture (%)
f 11	1 g.l <sup>-1</sup>	6,31 ± 0,43	1040 ± 122	19 ± 4 %
f 21	10 g.l <sup>-1</sup>	10,01 ± 0,09	0	ND
f 31	50 g.l <sup>-1</sup>	0,77 ± 0,06	0	ND
f 41	100 g.l <sup>-1</sup>	10,53 ± 0,29	0	ND

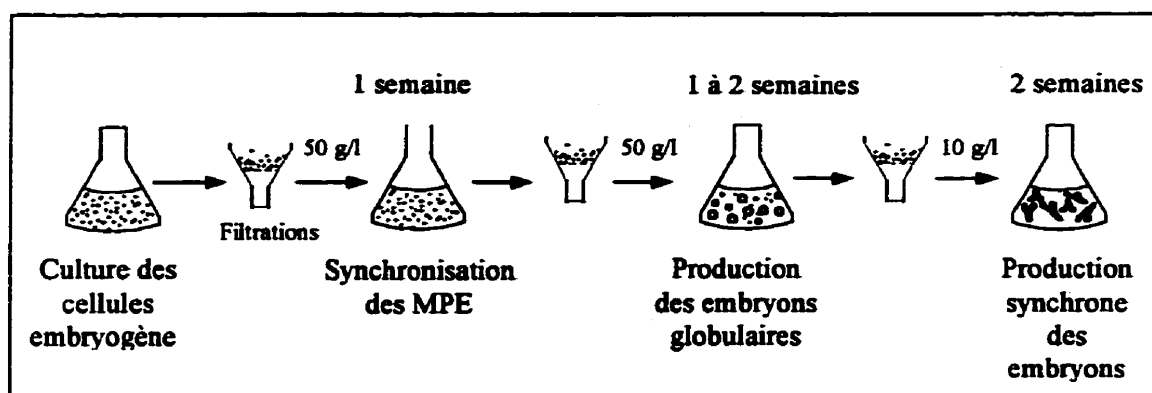
#### 5.1.2.3. Description du mode de production par paliers de densité

Le procédé de production par paliers de densité est schématisé à la figure 5.9.B. Les cellules embryogènes qui ont été cultivées dans le milieu d'initiation (avec 2,4-D) sont filtrées sur un tamis de 50 µm afin de retirer le milieu, puis elles sont rincées et remises en suspension dans du milieu de production à raison de 50 g de matière humide par litre. Cette phase de synchronisation des MPE dure environ 1 semaine.

La suspension cellulaire obtenue, alors composée de MPE de grosse taille (20 cellules et plus) et de CNE, est passée à travers une série de filtres en Nylon de 1000, 210 et 50 µm successivement afin de retirer la majorité des cellules non embryogènes. Les MPE retenues sur le filtre de 50 µm sont ensuite rincées et remises en

suspension à raison de 50 g de matière humide par litre de milieu de production (Phase de production et de synchronisation des embryons globulaires).

Au bout de 1 à 2 semaines, on obtient une suspension embryonnaire composée majoritairement d'embryons au stade globulaire auxquels viennent s'ajouter des MPE et quelques embryons cordiformes. Cette suspension est alors passée successivement à travers deux filtres de 500 et 210  $\mu\text{m}$ . Les embryons globulaires retenus sur le filtre de 210  $\mu\text{m}$  sont utilisés pour la phase de production synchrone des embryons torpilles (en flacon ou en bioréacteur) à raison de 10 g de matière humide par litre de milieu de production.



**Figure 5.9: Description schématique du mode de production par paliers de densité.**

On verra plus loin que la densité d'inoculation lors de chacune des étapes a une grande influence sur le temps nécessaire pour passer d'une phase de production à la suivante. On peut donc faire varier le temps total de production des embryons en modifiant la densité d'inoculation des différentes phases du procédé (voir sous-section 5.2.1). Les densités d'inoculation indiquées ici correspondent à celles qui ont été



utilisées lors des cuvées B9, B10 et B12. Pour les cuvées B11, B13 et B15, la densité d'inoculation lors de la dernière étape a été abaissée à 5 g.l<sup>-1</sup> (détails à l'annexe 4).

#### 5.1.2.4. Avantages du mode de production par paliers de densité

Le mode de production par paliers de densité utilise le phénomène d'auto-inhibition afin de synchroniser les embryons à deux stades de leur développement, soit le stade pro-embryonnaire (MPE) et le stade globulaire. L'utilisation de paliers de densité en cellules et en embryons permet de bloquer le développement des embryons en cours de production afin d'obtenir une population synchrone puis de réamorcer le développement embryonnaire simplement en modifiant la densité cellulaire.

Le milieu de production est renouvelé 2 fois au cours du procédé, ce qui n'est pas le cas en mode de production classique. Ce renouvellement du milieu permet d'éviter que des limitations nutritionnelles apparaissent en cours de culture et limite du même coup l'accumulation de substances inhibitrices. Les embryons sont filtrés et rincés trois fois au lieu d'une, ce qui permet d'éliminer toute trace de 2,4-D et d'éventuelles protéines extracellulaires qui pourraient perturber leur développement. Plusieurs auteurs (Molle et col. 1993, Huang et col. 1992) ont déjà constaté chez la carotte que le fait de renouveler une ou plusieurs fois le milieu lors de la production entraîne un accroissement du poids sec final et du nombre total d'embryons produits et permet une meilleure conversion des EG en ET.

Le mode de production par paliers de densité est également beaucoup plus malléable que le mode de production classique. En effet, une fois que les embryons globulaires (EG) ont été produits et sélectionnés, il est possible de les conserver à forte densité embryonnaire (10000 EG.ml<sup>-1</sup> et plus) pendant de longues périodes, à condition de renouveler le milieu de production tous les 10 jours. De ce fait, on peut obtenir des embryons torpilles en moins d'une semaine en utilisant la bonne densité d'inoculation en EG (entre 1,0 et 5,0 g.l<sup>-1</sup> en matière humide). Il est donc possible d'allonger ou de

rétrécir les durées de production pratiquement à volonté, ce qui est impossible avec la méthode de production classique.

### 5.1.3. PRODUCTION D'EMBRYONS PAR LA TECHNIQUE DES PALIERS DE DENSITÉ

Six cuvées en bioréacteur ont été effectuées selon la méthode par paliers de densité, soit les cuvées B9 à B13 et la cuvée B15. Ces cultures ont été opérées selon le même protocole, soit la production des embryons globulaires en flacons agités de 500 ml et la production des embryons torpilles en bioréacteur de 2 litres. Seule cette dernière phase de production sera étudiée en détails dans les sections qui suivent.

Les cuvées B9 et B12 sont les cuvées témoins qui seront utilisées dans la suite du travail pour évaluer l'efficacité des traitements anti-germination. Parallèlement à chaque cuvée en bioréacteur, quatre cuvées en flacons agités ont été opérées pour base de comparaison.

#### 5.1.3.1. Résultats généraux

##### 5.1.3.1.1. Comparaison des deux modes de production

Les principaux résultats obtenus en mode de production par paliers de densité (MPD) sont présentés en détails à l'annexe 4. Le tableau 5.5 présente les résultats moyens de ces cuvées (moyenne de 2 cuvées en bioréacteurs de 2 litres, 4 cuvées pour la série F-r et 4 cuvées pour la série F-t). L'intervalle statistique indiqué représente l'écart type moyen.

Seuls les embryons torpilles apparemment normaux ont été comptabilisés. La concentration en embryons torpilles, les productivités, les taux de croissance et les rendements de production ont été déterminés au temps d'apparition des premiers embryons germés. La durée avant germination en culture et le pourcentage maximal de

germination en culture portés sur la colonne "cuvées en bioréacteur" se rapportent à la cuvée B9 seulement car il n'y a pas eu de germination en culture lors de B12. Le temps I+0 dont il sera question dans la suite du texte correspond au temps d'inoculation du milieu de production en embryons globulaires.

En comparant les résultats présentés aux tableaux 5.1 et 5.5, on constate que la production maximale d'embryons torpilles en bioréacteur est multipliée par 18 par la méthode des paliers de densité et atteint  $975 \text{ ET.ml}^{-1}$  contre  $53 \text{ ET.ml}^{-1}$  pour la méthode classique. La productivité en embryons en MPD est 25 fois supérieure à celle obtenue par la méthode classique (MC) (soit  $2 \times 10^3 \text{ ET.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et  $51 \times 10^3 \text{ ET.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$  respectivement) mais la production en poids sec est seulement multipliée par 2.

Les rendements de production sont plus de 10 fois supérieurs avec la méthode par paliers de densité ( $141 \text{ ET.(g PS)}^{-1}$  et  $13 \text{ ET.(g PS)}^{-1}$  pour la MPD et la MC respectivement). Ces résultats confirment le fait que l'accroissement de biomasse sèche est directement relié à la production en embryons en MPD alors que lors de la cuvée B8, seule une faible proportion du poids sec se rapporte aux embryons.

Il n'y a pas eu de germination en culture lors de la cuvée B12. Bien que quelques embryons aient germés lors de B9, le pourcentage maximal de germination en culture demeure bien inférieur à celui obtenu avec la méthode classique (28 % de germination en culture pour B9 et 85 % pour la cuvée B8). Par la méthode classique, les premiers embryons germés apparaissent en moyenne 14 jours après le pic des embryons globulaires en bioréacteur. Ces temps de germination sont comparables à ceux observés lors de la cuvée B9, soit 13 jours.

**Tableau 5.5: Résultats moyens obtenus en mode de production par paliers de densité.**

	<i>Bioréacteurs de 2 l</i>	<i>Flacons agités série F-r</i>	<i>Flacons agités série F-t</i>
Durée avant germination en culture (j)	13 (B9 seulement)	$6 \pm 3$	$8 \pm 1$
Pourcentage max. de germination en culture	28 % (B9 seulement)	$23 \pm 19\%$	$26 \pm 22\%$
Production (ET.ml <sup>-1</sup> )	$975 \pm 57$	$1288 \pm 649$	$1650 \pm 815$
Productivité en embryons (nb ET.l <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	$(51 \pm 28) \times 10^3$	$(94 \pm 41) \times 10^3$	$(150 \pm 67) \times 10^3$
Productivité en poids sec (g PS.l <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	$0,36 \pm 0,24$	$0,62 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,08$
$\mu^{ps-app}$ (j <sup>-1</sup> )	$0,17 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,26$	$0,36 \pm 0,05$
$Y_p$ (ET. (g PS) <sup>-1</sup> )	$(141 \pm 31) \times 10^3$	$(151 \pm 56) \times 10^3$	$(192 \pm 42) \times 10^3$

#### 5.1.3.1.2. Cuvées en flacons agités

Alors qu'en MC, la productivité en embryons était identique en flacons et en bioréacteurs, en MPD la productivité est 86 % et 194 % supérieure en flacons (série F-r et F-t respectivement), bien que la germination ait lieu 7 jours plus tôt. De même, la productivité en poids sec est 72 % supérieure pour les cuvées F-r et 116 % supérieure pour les cuvées F-t (par rapport aux bioréacteurs).

En flacons agités (série F-r), les premiers embryons germés apparaissent en moyenne 6 jours après l'inoculation en globulaire (à I+6), soit 7 jours plus tôt que lors de B9. Le pourcentage maximal de germination en flacons agités est identique à celui enregistré lors de B9 (23 % et 28 % respectivement).

On peut donc conclure qu'en MPD, une concentration en oxygène dissous supérieure à 20 % (flacons agités) augmente la productivité en embryons et en poids sec. On observe également que la productivité en embryons est 1,6 fois plus importante pour les cuvées F-t (milieu stérilisé par autoclavage) que pour les cuvées F-r (milieu stérilisé par filtration). Il semble donc que l'autoclavage du milieu de production soit favorable à la maturation des embryons globulaires et permette la production d'un plus grand nombre d'embryons torpilles. Ce résultat avait déjà été signalé par Zrýd en 1988.

#### 5.1.3.1.3. Qualité des embryons produits

Les embryons produits par la méthode des paliers de densité sont d'excellente qualité. On observe beaucoup moins d'embryons en amas ou possédant un nombre anormal de cotylédons. Plus de 90 % des embryons matures formés sont isolés et présentent une apparence normale lors de l'observation microscopique.

De plus, les embryons torpilles formés sont de petite taille (de 200 à 500  $\mu\text{m}$  de long), ce qui correspond à la taille des embryons zygotiques de carotte au même stade de maturation. Le tableau 5.6 présente le nombre de cellules moyen et le poids sec moyen des différentes classes d'embryons produits lors de la cuvée B9 (lignée cellulaire FP95). Les mesures ont porté sur des échantillons de 100 embryons ou plus et ont été effectuées en triplicats. L'intervalle statistique indiqué correspond à l'écart type moyen.

**tableau 5.6: Poids sec moyen et nombre de cellules moyen des principaux stades embryonnaires (lignée SP95, méthode par paliers de densité).**

<i>Stade embryonnaire</i>	<i>Poids sec moyen de 1000 emb</i>	<i>Nombre de cellules moyen</i>	<i>Poids sec estimé de <math>10^6</math> cellules</i>
MPE	-	$20 \pm 20$	0,31 mg
Globulaire	( 0,21 $\pm$ 0,09 ) mg	$1000 \pm 500$	0,21 mg
Coeur	( 0,54 $\pm$ 0,11 ) mg	$5000 \pm 600$	0,10 mg
Torpille	( 1,47 $\pm$ 0,51 ) mg	$25000 \pm 2000$	0,06 mg
Plantule	( 2,12 $\pm$ 0,78 ) mg	$30000 \pm 5000$	0,07 mg

Les embryons coeurs et torpilles ainsi que les plantules produits en MPD sont constitués de moins de cellules que ceux produits par la méthode classique (voir tab. 5.2). Par exemple les embryons torpilles sont composés d'environ 25000 cellules en

MPD contre 35000 cellules en MC. De même, leur poids sec moyen est très inférieur (pour les embryons torpilles:  $1,47 \text{ mg.}(1000 \text{ ET})^{-1}$  en MPD contre  $7,89 \text{ mg.}(1000 \text{ ET})^{-1}$  en MC). En conséquence, le poids sec estimé d'un million de cellules est 2 à 5 fois supérieur en MC, ce qui indique que les cellules sont beaucoup plus vacuolées qu'en MPD. Les embryons produits en MPD ne présentent donc pas cette vacuolisation anormale qui avait été constatée en mode de production classique.

Les pourcentages de germination sur gélose après récolte sont de 100 % pour les deux cuvées (B9 et B12) et les plantules formées ont une apparence normale. Des essais d'encapsulation et de germination en sol reconstitué ont également donné d'excellents résultats (voir section 5.3).

#### 5.1.3.2. Résultats d'une cuvée typique: cuvée B9

##### 5.1.3.2.1. Qualité de l'inoculum

L'observation de l'inoculum au microscope a révélé qu'après filtration (voir section 3.4.1.2.), il demeurait très peu de cellules non embryogènes parmi les embryons globulaires. En fait, les comptages ont révélé la présence de seulement  $0,2 \times 10^6$  CNE.ml<sup>-1</sup> alors que l'estimation du nombre de cellules embryonnaires est de  $4,0 \times 10^6$  cellules par ml. On estime donc que 95 % des cellules de l'inoculum sont des cellules embryogènes, ce qui en fait un inoculum d'excellente qualité.

##### 5.1.3.2.2. Profils d'apparition des embryons et germination en culture.

La figure 5.10.A présente le profil d'apparition des différentes classes d'embryons au cours de la cuvée B9. Alors que les données relatives au nombre d'embryons torpilles et germés proviennent de comptages réels, les profils d'apparition

des embryons globulaires et coeurs ont été estimés à partir du pourcentage de chaque classe d'embryons déterminé lors du dernier échantillonnage et du nombre moyen de cellules par embryon (tableau 5.6). La méthode d'estimation est présentée en détails à l'annexe 6.

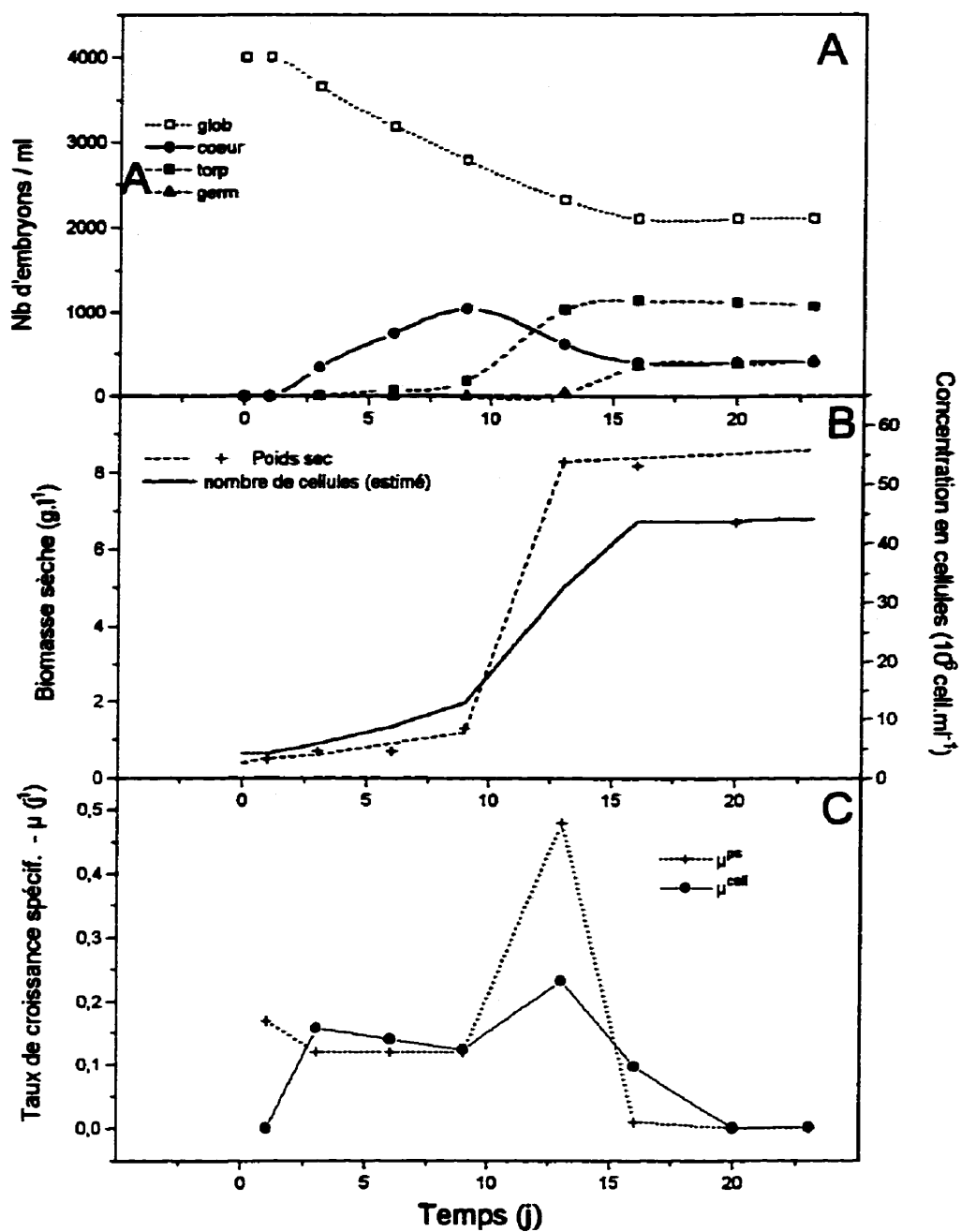
La culture B9 peut être scindée en 3 parties, soit de I+0 à I+9 la conversion des EG en embryons cordiformes, de I+9 à I+13 la conversion des EC en embryons torpilles et enfin de I+13 à I+23 la germination des embryons torpilles. Ces trois périodes ne se chevauchent pas, ce qui indique une bonne synchronisation de la culture.

Malgré cette meilleure synchronisation du développement embryonnaire, une grande proportion des embryons ne parviennent toujours pas à achever leur développement jusqu'au stade torpille. Ces blocages du développement semblent liés à l'apparition des embryons germés au sein de la culture (à I+13). Ainsi, à I+16 où on obtient le nombre maximal d'embryons torpilles, la suspension embryonnaire est composée de 52 % de EG, 10 % de EC, 29 % de ET et 9 % d'embryons germés. De ce fait, le pourcentage de conversion maximal des embryons globulaires en embryons torpille n'est que de 28 %.

#### 5.1.3.2.3. pH, conductivité et principaux nutriments

La figure 5.11 présente l'évolution des principaux paramètres de culture au cours de la cuvée B9. La conductivité du milieu est à peu près stable à 3,7 jusqu'à I+8 puis elle diminue rapidement pour atteindre 1,5 à I+17. Cette chute brutale de la conductivité est corrélée avec la disparition rapide des ions  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  de I+8 à I+19. On constate notamment que le phosphate est totalement consommé dès I+16.





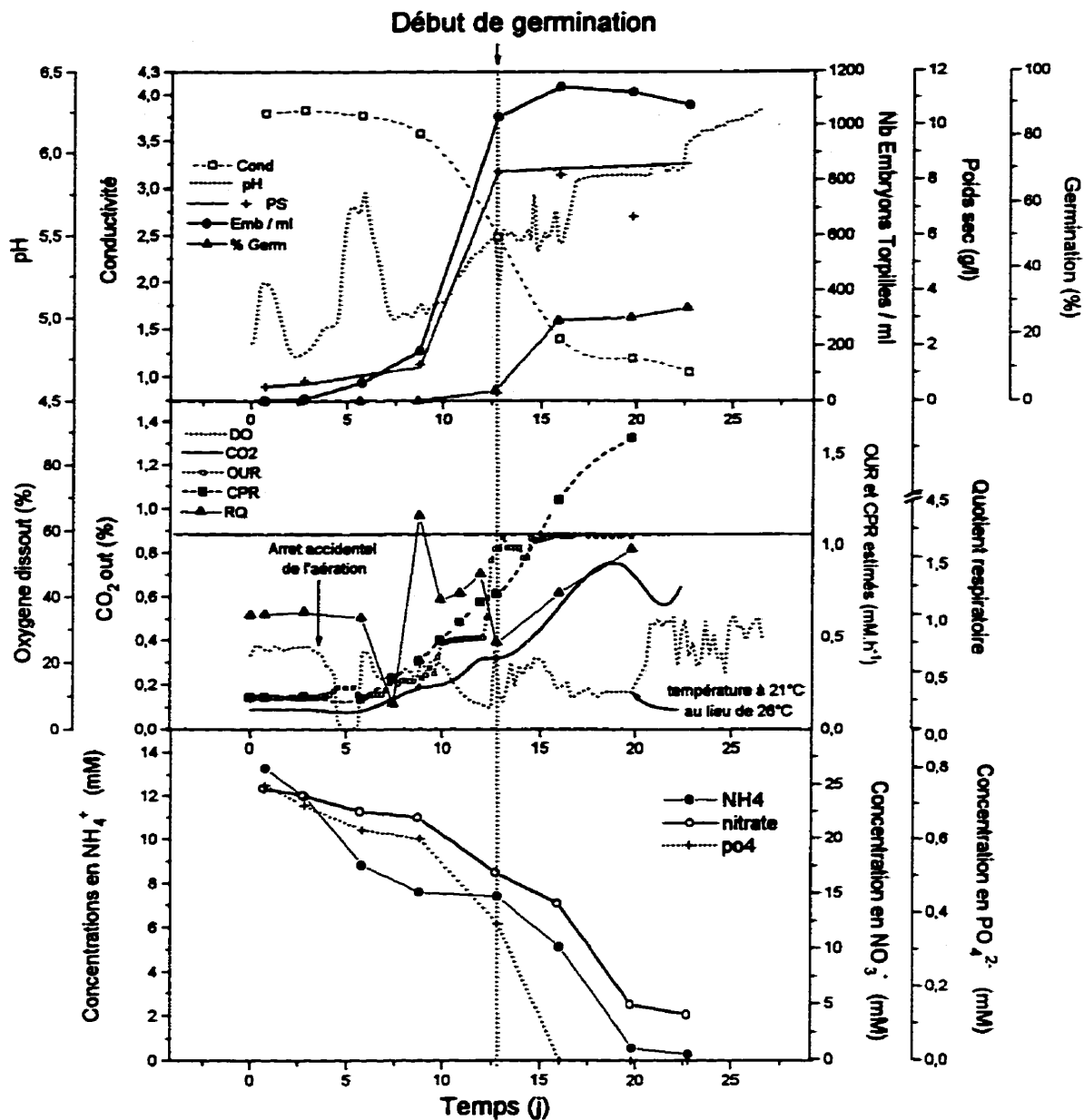
**Figure 5.10: Résultats de production de la cuvée B9**  
 (Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).

#### 5.1.3.2.4. Calculs respirométriques

La figure 5.11.B présente les principaux résultats respirométriques obtenus lors de la cuvée B9. La concentration en oxygène dissous (DO) varie beaucoup en cours de culture et ne parvient pas à se stabiliser à la valeur de consigne (20 %). Ces variations sont attribuables en partie à des défaillances techniques (arrêt accidentel de l'aération à I+4 et panne du système contrôlant la température à partir de I+20).

Dans un premier temps, la DO est stable à 20 % pendant les 4 premiers jours de fonctionnement. Puis, à I+4, la DO chute à 0 % pendant près de 24 heures à la suite de arrêt de l'aération. A la reprise de l'aération, la DO remonte à 20 % pendant 5 jours mais, à partir de I+9, elle diminue de nouveau pour atteindre 10 % à I+13. Pendant cette période, le pourcentage d'oxygène dans le gaz d'entrée, qui est ajusté manuellement en cours de culture (voir sous-section 3.2.2), n'est plus suffisant pour combler la demande en oxygène de la culture (avec ce mélange,  $OTR_{max} = 0,5 \text{ mM.h}^{-1}$ ).

A I+13, le mélange gazeux avec lequel est alimenté le bioréacteur est remplacé par de l'oxygène pur et la DO amorce une période d'oscillations entre 10 et 20 % pour finalement se stabiliser aux environs de 10 % jusqu'à I+19. A ce moment là, le contrôleur de température tombe en panne et la DO devient supérieure à 20 % malgré les efforts du contrôleur pour la ramener à la valeur de consigne (oscillations entre 35 et 20 % de I+19 à la fin). La concentration en  $\text{CO}_2$  du gaz de sortie est stable à 0,1 % jusqu'à I+6, augmente progressivement pour atteindre 0,7 % à I+19 puis diminue jusqu'à 0,6 % en fin de culture. le CPR suit la même tendance et atteint un maximum de  $1,5 \text{ mM.h}^{-1}$  à I+19.



**Figure 5.11: Graphique récapitulatif de la cuvée B9**  
**(Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).**

Le OUR est également stable jusqu'à I+6 puis augmente pour marquer un palier à  $0,5 \text{ mM.h}^{-1}$  de I+9 à I+13. On a vu que pendant cette période, le OUR a atteint la capacité maximale de transfert du bioréacteur avec le mélange gazeux utilisé ( $\text{OUR} = \text{OTR}_{\text{max}}$ ), ce qui entraîne la diminution de la DO jusqu'à 10 %. Dès que le bioréacteur est alimenté en oxygène pur (à partir de I+13) le OUR augmente très rapidement pour atteindre la valeur maximale de  $1,1 \text{ mM.h}^{-1}$ , qui correspond au nouveau  $\text{OTR}_{\text{max}}$  du bioréacteur sous  $\text{O}_2$  pur. Après une période d'oscillations de I+13 à I+15, le OUR se stabilise finalement à  $\text{OTR}_{\text{max}}$  jusqu'à la fin de la culture.

Quant au RQ, il est égal à 1,0 jusqu'à I+6 puis il augmente rapidement jusqu'à atteindre 1,9 à I+9. Le RQ amorce ensuite une diminution pour atteindre 1,0 à I+13 et augmente une nouvelle fois jusqu'à la valeur de 1,9 à I+21. La valeur de RQ renseigne ici sur la nature du métabolisme respiratoire employé par les cellules lors de la culture. Plus précisément, un RQ égal à 1 signifie que la culture produit autant de  $\text{CO}_2$  qu'elle consomme de  $\text{O}_2$ , c'est-à-dire que les cellules utilisent majoritairement la voie de la glycolyse (aérobie) où une molécule de glucose est totalement dégradée en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  selon le bilan suivant:



ce qui donne un RQ théorique de 1 ( $\text{CTR} / \text{OUR} = 1$ ). Par contre, un RQ supérieur à 1 signifie que la culture produit plus de  $\text{CO}_2$  qu'elle ne consomme de  $\text{O}_2$ , c'est-à-dire qu'une partie des cellules utilisent la voie de la fermentation alcoolique (anaérobie). Par l'intermédiaire de cette voie métabolique, une molécule de glucose est partiellement dégradée en  $\text{CO}_2$  et éthanol selon le bilan:



Etant donné qu'aucun oxygène n'est requis lors de la fermentation alcoolique, le RQ théorique correspondant est infini. Cependant, en conditions partiellement anaérobiques, seulement une partie des cellules fermente (celles situées au centre des embryons) pendant que l'autre partie (les cellules périphériques) utilise le métabolisme aérobique qui est énergétiquement le plus rentable. On obtient alors un RQ réel compris entre 1 et 10 (James 1953, Yatazawa et Furuhashi 1982). Pendant la culture B9, le RQ est supérieur à 1 de I+9 à I+21, ce qui confirme qu'une partie des cellules sont en limitation oxygène lorsque le  $OTR_{max}$  est atteint.

Plusieurs travaux ont démontré que les végétaux sont capables de survivre pendant de courtes périodes en condition d'anaérobie stricte ou partielle. Les graines immergées sont ainsi capables de germer en absence d'oxygène, bien que des conditions aérobiques soient nécessaires au développement postérieur de la plantule. On a ainsi relevé des RQ pouvant aller jusqu'à 7,5 lors de la germination de grains d'orge immergés (James 1953).

Les cellules de plantes et les fragments végétaux sont également capables de s'adapter à des conditions partiellement anaérobiques, bien que leur croissance soit alors stoppée (Perata et Alpi. 1991, Tate et Pargne 1991, Yatazawa et col. 1982). Ainsi, lorsqu'on place des tranches de carotte dans de l'eau aérée, ces dernières produisent presque instantanément de l'éthanol lorsque la DO est inférieure à 100 %. Dans le cas de tranches de carotte placées dans une solution de glucose à  $15 \text{ g.l}^{-1}$ , plus la DO est basse et plus on enregistre des RQ élevés. On a relevé des RQ de 4,8 , 2,5 , 2,4 et 1,0 pour des DO de 3 %, 12 %, 23 % et 476 % respectivement (James 1953).

### 5.1.3.2.5. Profil de croissance de la biomasse

La figure 5.10.B. présente l'évolution du nombre de cellules et du poids sec lors de la culture B9. Ici encore, la concentration en cellules embryogènes a été estimée en fonction du nombre d'embryon de chaque classe et du nombre moyen de cellules de chaque stade embryonnaire (voir au paragraphe 5.1.1.3.4.).

Les CE constituent 95 % de l'inoculum et 99 % des cellules en culture à I+23. La présence des CNE au sein de la suspension est donc négligeable. Les cellules observent une période de latence de I+0 à I+9 pendant laquelle leur poids sec moyen est stable à  $0,10 \text{ mg PS} \cdot (10^6 \text{ cell})^{-1}$ . Notons au passage que les cellules qui constituent les embryons globulaires à I+0 pèsent 6 fois moins que les cellules de l'inoculum de la cuvée B8, et sont donc beaucoup moins vacuolées que ces dernières.

De I+3 à I+9, les cellules connaissent une période de croissance pratiquement exponentielle pendant laquelle la concentration en cellules de la culture passe de  $6 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  à  $13 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $\mu^{\text{cell-exp}} \cong 0,14 \text{ j}^{-1}$ ). Cette phase de croissance exponentielle coïncide avec la période de conversion des embryons globulaires en embryons coeurs.

Le taux de croissance spécifique des cellules connaît un pic à I+13 ( $\mu^{\text{cell}} = 0,23 \text{ j}^{-1}$ ) qui correspond à la conversion des EC en ET. Puis, de I+13 à I+23, le rythme des divisions cellulaires ralentit et la concentration en cellules se stabilise pour atteindre  $44 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  en fin de culture. Le poids sec moyen des cellules se stabilise par ailleurs à 0,19 mg par million de cellules. Ce ralentissement de la division cellulaire et de l'accroissement du poids sec coïncide avec la période de limitation en oxygène décrite plus haut ( $\text{OUR} = \text{OTR}_{\text{max}}$ ).

Les travaux de Pépin et col. (1995) ont déjà établi une relation similaire entre la division cellulaire et la consommation en oxygène des cellules chez *Vitis vinifera* en flacon agité. Ainsi, le OUR augmente en même temps que le nombre de cellules, mais

lorsque le  $OTR_{max}$  est atteint, la division cellulaire cesse immédiatement. Des résultats similaires ont été obtenus chez *Eschscholtzia californica* (Sirois 1997) et *Daucus carota* (Perata et Alpi 1991).

De fait, le métabolisme fermentaire, de par son faible rendement énergétique (2 ATP au lieu de 36 lors de la respiration aérobie), ne peut supporter les dépenses énergétiques engendrées par la division cellulaire. De nombreuses études ont démontré que le taux de croissance spécifique des cellules de plantes diminue drastiquement lorsque la concentration en oxygène dissous du milieu chute en deçà d'une valeur critique ( $DO_{crit}$ ) (Tate et Pargne 1991, Yatazawa et Furuhashi 1982, James 1953, Jay et col. 1992). La valeur de  $DO_{crit}$  varie d'une espèce à l'autre.

Ainsi, à I+13, c'est-à-dire au moment où le  $OTR_{max}$  est atteint, l'ensemble des cellules cessent de se diviser et d'accumuler du poids sec ( $\mu^{cell}$  et  $\mu^{ps}$  très bas). On constate à la figure 5.10.A que le développement des embryons est stoppé, sauf en ce qui concerne les embryons torpilles dont la racine s'allonge (apparition des premiers embryons germés à I+13). Cet allongement de la racine ne se fait pas par l'intermédiaire de divisions cellulaires mais grâce à une vacuolisation et à une élongation de certaines cellules de l'embryon.

Il existerait un lien entre la concentration en oxygène dissous du milieu et l'élongation des cellules. En effet, il semble que chez les cellules en élongation, la voie des pentoses phosphates (VPP) l'emporte sur la glycolyse alors qu'il se passe le contraire chez les cellules en division (Roberts et Smith 1977, Darnell et col. 1988). La VPP est une voie secondaire du métabolisme du glucose qui fournit à la cellule l'énergie biosynthétique et les précurseurs nécessaires à la biosynthèses des acides nucléiques, du NAD, de l'ADP et de nombreux coenzymes. La VPP est en compétition directe avec la glycolyse, qui fournit à la cellule l'ATP dont elle a besoin pour se diviser. Ces deux voies métaboliques ont lieu dans le même compartiment cellulaire et possèdent de nombreux intermédiaires communs. Cependant, lorsque la pression partielle en oxygène

est faible, les oxydases mises en jeu lors de la VPP sont plus efficaces que celles de la chaîne respiratoire (qui réoxyde les coenzymes réduits issus de la glycolyse). De ce fait, lorsque la DO est basse, la VPP prend le dessus sur la glycolyse, ce qui stimulerait l'élongation des cellules et donc la germination des embryons (Roberts et Smith 1977, Khan 1977, Heydecker 1977). Pour revenir à la cuvée B9, ce serait donc la diminution de la DO de 20 % à 10 % à partir de I+13 qui serait responsable de l'apparition des premiers embryons germés dans le milieu de culture.

#### 5.1.3.2.6. Taux de consommation spécifiques et rendements par rapport aux substrats

Les taux de consommation spécifiques des principaux nutriments par rapport aux cellules ( $q^c$ ) et les rendements de consommation correspondants ( $Y^c_s$ ) sont présentés à l'annexe 11. Le  $q^c_{O_2}$  diminue de  $0,8 \text{ mmole.j}^{-1}.10^6\text{cell}^{-1}$  à  $0,3 \text{ mmole.j}^{-1}.10^6\text{cell}^{-1}$  de I+3 à I+16 puis se stabilise à cette valeur jusqu'à la fin de la culture. Le  $Y^c_{O_2}$  augmente jusqu'à  $376 \times 10^6$  cellules par mole à I+13 puis diminue rapidement et atteint  $5 \times 10^6$  cellules par mole de  $O_2$  à I+23. Ces données semblent confirmer l'apparition d'une limitation de la culture en oxygène à partir de I+13 où la DO devient inférieure à 20 %.

Les  $q^c_{NO_3}$ ,  $q^c_{NH_4}$  et  $q^c_{PO_4}$  diminuent au fur et à mesure du développement des embryons, ce qui confirme que leur métabolisme change en fonction de leur âge. Le  $q^c_{NH_4}$  est inférieur à  $q^c_{NO_3}$  jusqu'à I+13 puis la tendance s'inverse de sorte que le rapport  $q^c_{NH_4}/q^c_{NO_3}$  ne cesse de diminuer tout au long de la culture et passe de 7,9 à 0,3 de I+0 à I+23.

En 1965, Halperin et Wetherell avaient déjà déterminé que, chez la carotte sauvage, le besoin en  $NH_4^+$  des proembryons et des jeunes embryons est supérieur à celui des embryons différenciés. De même chez la capselle, le  $NH_4^+$  favorise l'initiation des MPE et la maturation des embryons alors que le  $NO_3^-$  accélère le développement des



embryons matures c'est-à-dire la différenciation (Zrýd 1988). Chez la carotte, l'absence de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu inhibe l'embryogenèse et stimule la différenciation des cellules pour donner naissance à des racines (Kamada et Harada 1978).

Ces résultats semblent indiquer que la consommation de  $\text{NH}_4^+$  favorise la division cellulaire alors que la consommation de  $\text{NO}_3^-$  provoque l'élongation et la différenciation cellulaire. D'après Roberts et Smith (1977), la réduction du  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NH}_4^+$  au sein des cellules augmente significativement le stock de coenzymes réduits dans le cytoplasme. Or ces coenzymes réduits sont un des substrats majeurs de la voie des pentoses phosphates qui est, semble-t-il, particulièrement mise à contribution chez les cellules en élongation (Darnell et col. 1988).

Le rapport  $q_{\text{NH}_4}^c/q_{\text{NO}_3}^c$  pourrait donc être un bon indicateur de l'âge physiologique des cellules, c'est-à-dire de leur aptitude à se diviser ou à se différencier. Plus le rapport est haut et plus les cellules seraient jeunes (non différenciées) et inversement plus le rapport est bas, plus les cellules seraient vieilles du point de vue physiologique (cellules différenciées). De fait, le rapport  $q_{\text{NH}_4}^c/q_{\text{NO}_3}^c$  chute justement en bas de 1 précisément au moment où les premiers embryons germés (fortement différenciés) apparaissent dans la culture, ce qui étaye cette hypothèse.

Dans le cas de la cuvée B9, les cellules cessent de se diviser à partir de I+13 et amorcent une phase de latence pendant laquelle le poids sec moyen et le nombre de cellules sont stables. Les rendements de consommation par rapport aux cellules, qui augmentent constamment jusqu'à I+13, diminuent ensuite drastiquement jusqu'à la fin de la culture. Ces données indiquent une nouvelle fois qu'avant I+13, le métabolisme global de la culture s'oriente vers la production de cellules et que brusquement, après I+13, le métabolisme change en raison d'une limitation en oxygène qui s'installe lorsque la DO chute en bas de 20 %.

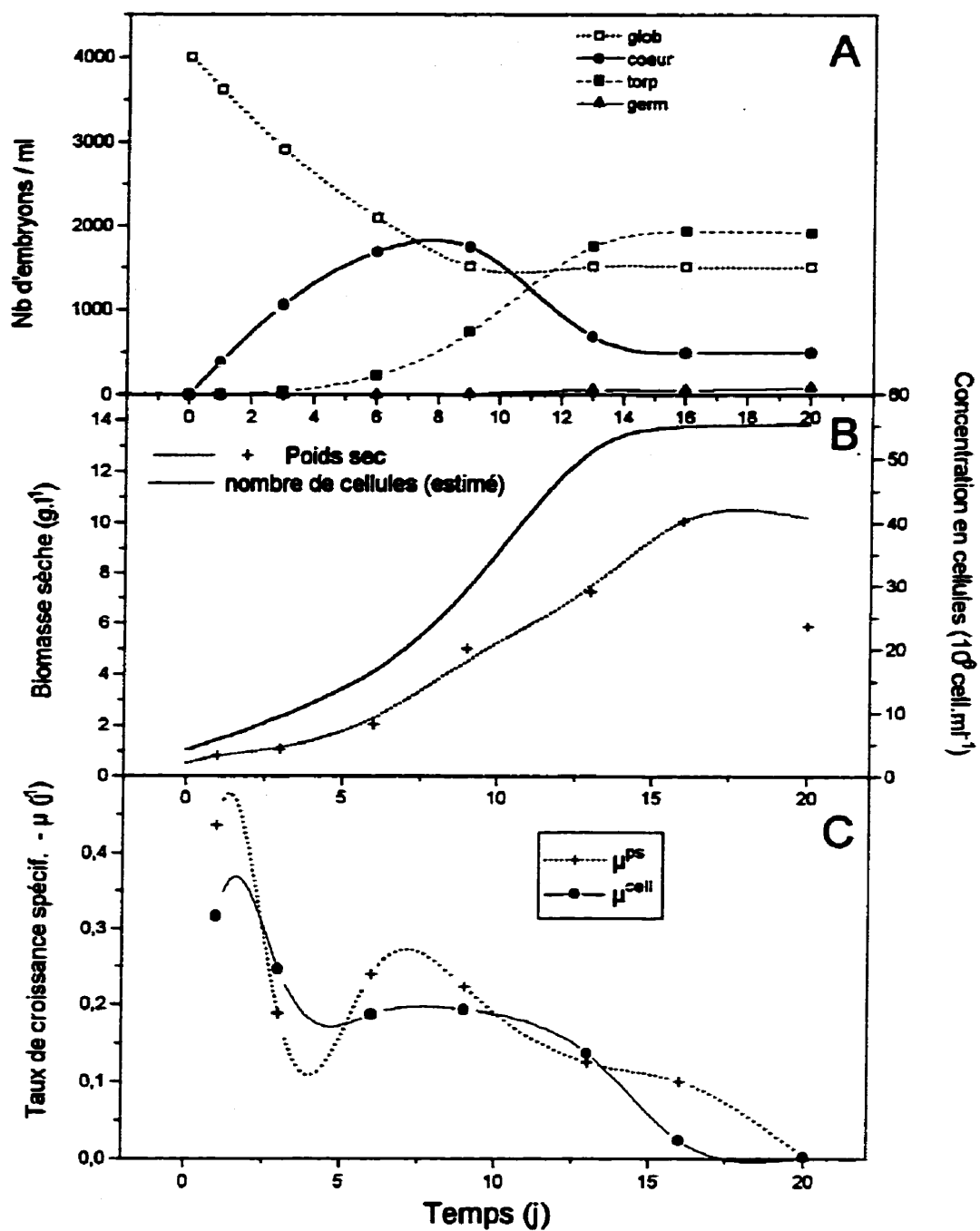
#### 5.1.3.2.7. Cultures en flacons agités: Cuvée F9-r

Parallèlement à la culture en bioréacteur, 4 cuvées en flacons agités ont été opérés pour comparaison. Parmi ces flacons, deux d'entre eux (série F9-r) ont été opérés avec le même milieu et le même inoculum que B9. Les résultats les concernant sont présentés en détails à l'annexe 4 (moyenne des deux flacons) et sont commentés ci-après.

##### *Profil d'apparition des embryons*

Le profil d'apparition des différentes classes d'embryons lors de la cuvée F9-r est présenté à la figure 5.12.A. Une production maximale de 1938 embryons torpilles par ml, soit presque deux fois plus que lors de la cuvée B9, a été obtenue. La conversion des EG en embryons cordiformes a lieu de I+0 à I+6, la conversion des EC en embryons torpilles de I+6 à I+13 alors que la germination des ET débute à I+9 et se poursuit jusqu'à la fin de la culture (I+20). Ces différentes périodes sont clairement distinctes, ce qui révèle une bonne synchronisation de la culture. On constate que l'apparition des différentes classes d'embryons est précoce par rapport à la cuvée B9. Par exemple, les premiers embryons germés apparaissent 4 jours plus tôt.

Il y a moins de blocages développementaux lors de F9-r que lors de B9. Ainsi, 62 % des embryons globulaires parviennent au stade cordiforme et 51 % parviennent jusqu'au stade torpille contre 47 % et 38 % respectivement lors de la cuvée B9. Ces résultats indiquent que le développement des embryons est favorisé en flacons agités, c'est-à-dire qu'une DO supérieure à 20 % stimule le développement embryonnaire.



**Figure 5.12: Résultats de production de la cuvée F9-r**  
**(Méthode par paliers de densité, flacons agités, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).**

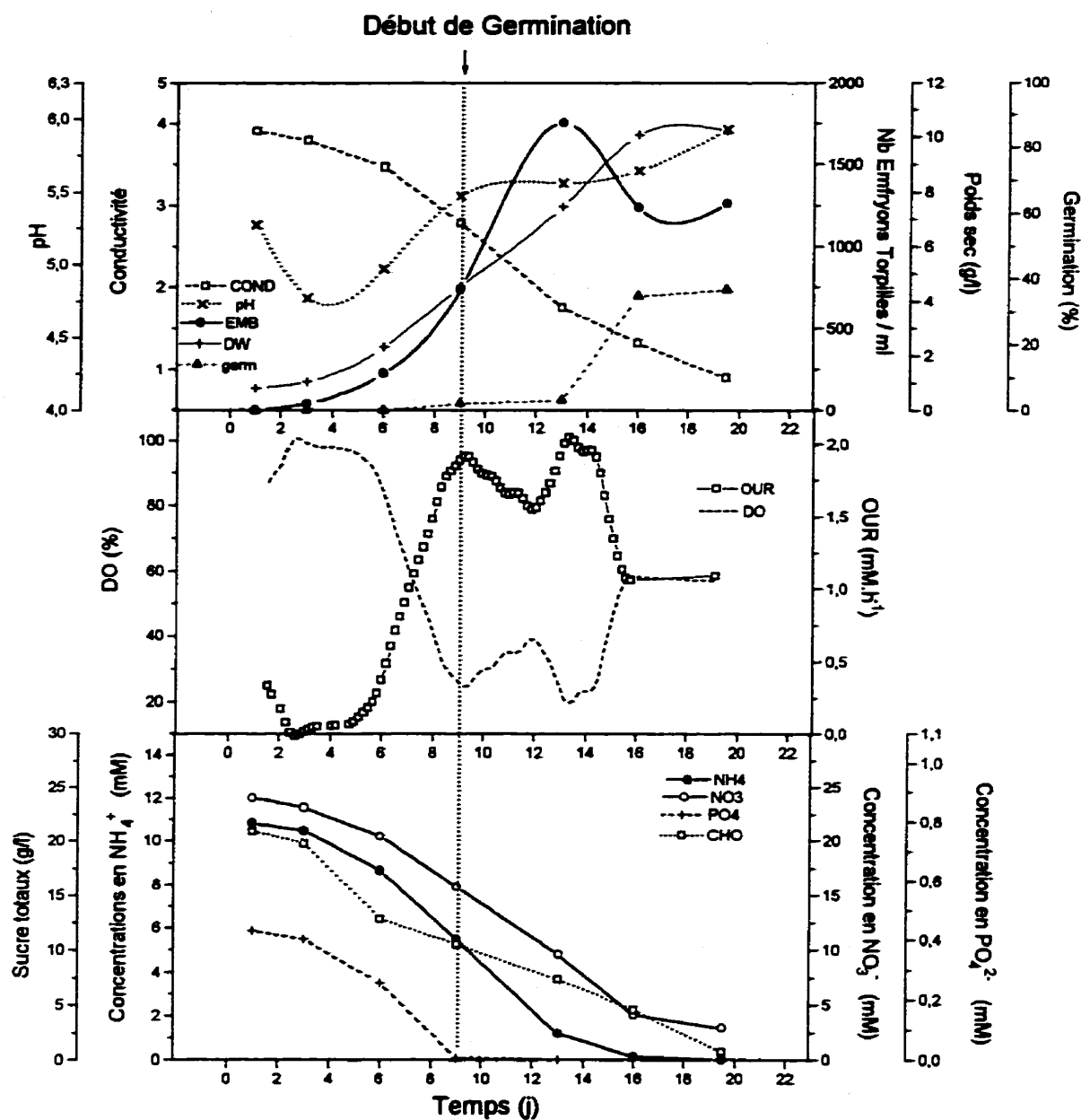
### Germination en culture

Le pourcentage maximal de germination en culture enregistré lors de F9-r est 7 fois inférieur à celui observé en bioréacteur (4 % et 28 % pour F9-r et B9 respectivement, voir annexe 4). Cependant, l'apparition des premiers embryons germés a lieu 4 jours plus tôt que lors de B9 (à I+9 et I+13 lors F9-r et B9 respectivement).

En flacons agités, la DO n'est pas contrôlée et suit l'évolution de la demande en oxygène de la culture. De ce fait, au cours de la cuvée F9-r, la DO est stable aux environs de 100 % pendant les 3 premiers jours puis elle diminue rapidement pour atteindre 22 % à I+9 (figure 5.13.B). Pendant cette période, le OUR suit l'accroissement du nombre de cellules qui passe de 9 à 30 millions cellules par ml. L'apparition des premiers embryons germés coïncide avec le premier creux de DO de la culture à I+9. Ce résultat semble confirmer hypothèse émise plus haut selon laquelle une limitation en oxygène pourrait déclencher la germination des embryons matures en stimulant l'élongation cellulaire.

Les embryons germés présents dans la culture de I+9 à I+13 présentent un très faible allongement de la racine (moins de 200  $\mu\text{m}$ ), tout comme ceux rencontrés au cours de la cuvée B9. Au microscope, on constate que les cellules de la partie racinaire deviennent moins denses et plus vacuolées.

En revanche, à partir de I+13, la racine des jeunes plantules est beaucoup plus longue (plusieurs mm) et dense. Cette augmentation de la taille de la racine des embryons germés coïncide avec une augmentation de la DO qui atteint 60 % à partir de I+14. Il apparaît donc que l'allongement de la racine au delà de 200  $\mu\text{m}$  est stimulé à haute DO mais que des DO inférieures à 20 % provoquent le déclenchement de la germination.



**Figure 5.13: Graphique récapitulatif de la cuvée F9-r  
(Méthode par paliers de densité, flacons agités, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>).**

On a vu que la germination s'effectue en deux étapes. Dans un premier temps, les cellules du pôle racinaire de l'embryon se gorgent d'eau (augmentation de la taille de la vacuole), ce qui provoque un allongement de la racine tout juste nécessaire pour provoquer la rupture de l'enveloppe de la graine. Dans un deuxième temps, les cellules de l'apex racinaire entrent en division et la racine s'allonge encore afin de permettre l'implantation dans le sol. La première étape a lieu en anaérobie alors que la deuxième nécessite des conditions aérobiques.

On observe la même chose au cours de la cuvée F9-r. En limitation d'oxygène (I+9), les cellules du pôle racinaire se vacuolisent et s'allongent, ce qui provoque une petite elongation de la racine ( $< 200 \mu\text{m}$ ). Puis, lorsque la DO remonte aux environs de 60 %, les cellules de la racine entrent en division, ce qui provoque une augmentation beaucoup plus importante de sa longueur (plusieurs mm).

Un faible allongement de la racine (de l'ordre de  $200 \mu\text{m}$ ) n'est pas un obstacle important à la manipulation des embryons. Cette pré-germination peut même être un atout par rapport aux graines puisque la germination en sol des embryons pré-germés est plus rapide que celle des embryons torpilles. Cette pratique de pré-germination (technique d'osmo-priming) est d'ailleurs déjà employée en agronomie afin de synchroniser la germination des graines et de diminuer leur temps de germination en sol (Khan 1977).

#### Cellules embryogènes et non embryogènes. Taux de croissance spécifique

Le tableau 5.7 présente l'accroissement du nombre de cellules et les  $\mu^{\text{cell}}$  apparents ( $\mu^{\text{cell-sp}}$ ) des CE et des CNE entre I+0 et I+20 lors des cuvées B9 et F9-r. La concentration en CNE est déterminée par comptage, la concentration en CE est estimée.

Lors de B9 et de F9-r, les CE sont largement majoritaires au sein de la culture puisqu'elles représentent 95 % des cellules de l'inoculum et 99 % du nombre total de cellules à I+20. Les CNE se divisent très lentement dans le milieu de production

et leur présence est donc négligeable pour ces cuvées. On observe le profil inverse de celui des cuvées B8 et F8-r (tableau 5.3) où les cellules embryogènes constituaient seulement 50 % et 27 % de la population cellulaire en bioréacteur et en flacon agité respectivement à I+25.

**Tableau 5.7: Concentrations en CE et CNE lors des cuvées B9 et F9-r.**

		Nombre de cellules (nb $10^6$ cell.ml <sup>-1</sup> )	$\mu^{\text{cell-ap}}$ ( $\bar{\sigma}^I$ )
<b>B9</b> (DO = 20 %)	CE	4,0 à 43,5	0,10
	CNE	0,2 à 0,5	0,05
<b>F9-r</b> (DO > 20 %)	CE	4,0 à 54,4	0,11
	CNE	0,2 à 0,9	0,07

La concentration en cellules embryogènes au bout de 20 jours de culture est plus élevée en flacon qu'en bioréacteur. La figure 5.13.B révèle qu'au cours de la cuvée F9-r, la DO est toujours supérieure à 20 %. Ces résultats tendent à prouver que la division cellulaire est limitée en bioréacteur où la DO est maintenue à 20 %, ce qui inhibe le développement des embryons et diminue le pourcentage de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles.

#### Taux de consommation et rendements

Les taux de consommation spécifiques relatifs aux cellules ( $q^c_s$ ) et les rendements de consommation correspondants ( $Y^c_s$ ) sont présentés à l'annexe 12. Les  $q^c_s$ ,

de tous les nutriments diminuent progressivement pendant la durée de la culture, ce qui avait déjà été le cas lors de la cuvée B9. Il semble donc que le métabolisme des embryons soit de moins en moins actif au fur et à mesure de leur maturation, comme c'est le cas *in vivo*. On notera que les  $q^c$ , sont globalement 40 à 80 % inférieurs à ceux relevés lors de la cuvée B9.

Le rapport  $q_{NH_4}^c / q_{NO_3}^c$  passe de 4,1 à 0,7 pendant les 6 premiers jours (passage EG → EC) puis se stabilise à 0,7 jusqu'à I+13 (passage EC → ET). Le rapport chute alors drastiquement dès l'apparition des premiers embryons germés, ce qui semble confirmer l'hypothèse selon laquelle le rapport  $q_{NH_4}^c / q_{NO_3}^c$  a un lien avec l'élongation des cellules.

Quant aux rendements de consommation, ils sont relativement faibles durant le premier jour pendant lequel les embryons s'adaptent au changement de milieu, puis ils augmentent très rapidement et se stabilisent jusqu'à I+13. Les  $Y_N^c$  sont globalement supérieurs à ceux calculés lors de B9 comme si le fait que la DO soit supérieure implique une meilleure efficacité métabolique des cellules (respiration aérobie plus efficace que le respiration anaérobie).

#### 5.1.4. CONCLUSION

La méthode par paliers de densité permet une meilleure synchronisation du développement des embryons que la méthode de production classique. La productivité des cultures en est améliorée en même temps que la qualité des embryons obtenus. Les pourcentages de germination observés en MPD sont également inférieurs à ceux obtenus en méthode de production classique (28 % au lieu de 85 % en bioréacteur).

Cependant, on observe toujours des blocages développementaux et seulement 30 à 40 % des embryons globulaires parviennent jusqu'au stade torpille. Ces blocages développementaux semblent dus, d'une part, à l'apparition des embryons



germés au sein de la culture et, d'autre part, à une limitation en oxygène lors des cuvées en bioréacteur.

La concentration en oxygène dissous du milieu de culture semble directement liée au pourcentage de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles et au déclenchement de la germination en culture. La diminution de la DO à 20 %, qui avait l'avantage de limiter le développement des CNE en mode de production classique, n'a plus de raison d'être en mode de production par paliers de densité puisque les cultures ne contiennent plus de CNE. Une augmentation de la concentration en oxygène dissous en bioréacteur pourrait au contraire augmenter la productivité du procédé par paliers de densité et réduire significativement la germination en culture.

## **5.2. CONTRÔLE DE LA GERMINATION EN CULTURE**

Malgré la meilleure synchronisation et la meilleure qualité des embryons produits par la méthode des paliers de densité, une partie des embryons germent toujours au sein du milieu de culture. Cette germination précoce est probablement responsable des blocages développementaux des embryons immatures et donc du faible pourcentage de conversion des EG en embryons torpilles.

Dans la suite du travail, diverses modifications des conditions de culture ont donc été testées afin de limiter la germination en culture et de maximiser le pourcentage de conversion des EG en embryons torpilles. Nous étudierons dans cette section l'effet de la densité d'inoculation en embryons globulaires, de la concentration en ABA exogène, de la concentration en Fe-EDTA et enfin de la pression osmotique du milieu sur la germination en culture des embryons.

### 5.2.1. INFLUENCE DE LA DENSITÉ D'INOCULATION EN EMBRYONS GLOBULAIRES

#### 5.2.1.1. Expériences en flacons agités

Le tableau 5.8 présente l'influence de la densité d'inoculation en embryons globulaires sur le pourcentage de germination en culture des embryons. Il est uniquement question ici de la dernière phase du procédé de production par paliers de densité, soit la phase de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles (voir fig. 5.9.B). Quatre séries de 3 flacons Erlenmeyer de 50 ml ont été inoculés à raison de 1, 10, 50 et 100 g d'embryons globulaires (matière humide) par litre de milieu de production. Au bout de 21 jours, les embryons torpilles apparemment normaux et les plantules ont été comptés.

La production d'embryons passe de 108 à 2103 ET.ml<sup>-1</sup> lorsque la densité d'inoculation augmente de 1 à 10 g.l<sup>-1</sup>, puis le nombre d'embryons produits diminue pour se stabiliser aux environs de 1300 ET.ml<sup>-1</sup> aux densités d'inoculation de 50 et 100 g.l<sup>-1</sup>. En fait, cette diminution du nombre d'embryons produits n'est que relative. En effet, un flacon de la série f32 a été remplacé sous agitation et au bout de 2 semaines de culture supplémentaires (I+35) 1754 ET.ml<sup>-1</sup> avaient été produits pour un pourcentage de germination en culture inchangé (3 %). Il apparaît donc que plus la densité d'inoculation en embryons globulaires est élevée, et plus le développement des embryons est lent.

On observe également que plus il y a d'embryons produits à 21 jours, et moins le pourcentage de germination en culture est important (1 % de germination pour 2000 ET.ml<sup>-1</sup> contre 45 % de germination pour 100 ET.ml<sup>-1</sup>). Par contre, plus la densité d'inoculation est élevée et plus la culture est synchrone (phénomène d'auto inhibition), ce qui produit des embryons de meilleure qualité (pourcentage d'anormalités inférieur).

Selon la densité d'inoculation en embryons globulaires employée, on peut donc privilégier soit le nombre soit la qualité des embryons produits. En terme de production de masse, il est probablement plus rentable de produire moins d'embryons de meilleure qualité (densité d'inoculation supérieure à 50 g.l<sup>-1</sup>) afin d'éviter d'avoir à trier les embryons après la récolte. Aucun procédé de triage à l'échelle industrielle n'a encore été mis au point jusqu'à présent.

**Tableau 5.8: Influence de la densité d'inoculation en embryons globulaires sur le pourcentage de germination en culture.**

Culture	Taux d'inoculation ((g PH).l <sup>-1</sup> )	Poids sec final ((g PS).l <sup>-1</sup> )	Nb maximum d'embryons (ET.ml <sup>-1</sup> )	% final de germination en culture
f 12	1 g.l <sup>-1</sup>	9,31 ± 0,99	108 ± 19	45 ± 4 %
f 22	10 g.l <sup>-1</sup>	10,24 ± 0,15	2103 ± 271	1 ± 1 %
f 32	50 g.l <sup>-1</sup>	12,02 ± 0,30	1270 ± 240	3 ± 1 %
f 42	100 g.l <sup>-1</sup>	12,89 ± 0,77	1236 ± 119	2 ± 2 %

#### 5.2.1.2. Expérience en bioréacteur: cuvée B13

Une cuvée en bioréacteur à 5 g.l<sup>-1</sup> (matière humide) d'embryons globulaires a été menée dans les mêmes conditions de culture que les cuvées B9 et B12 (10 g.l<sup>-1</sup> en

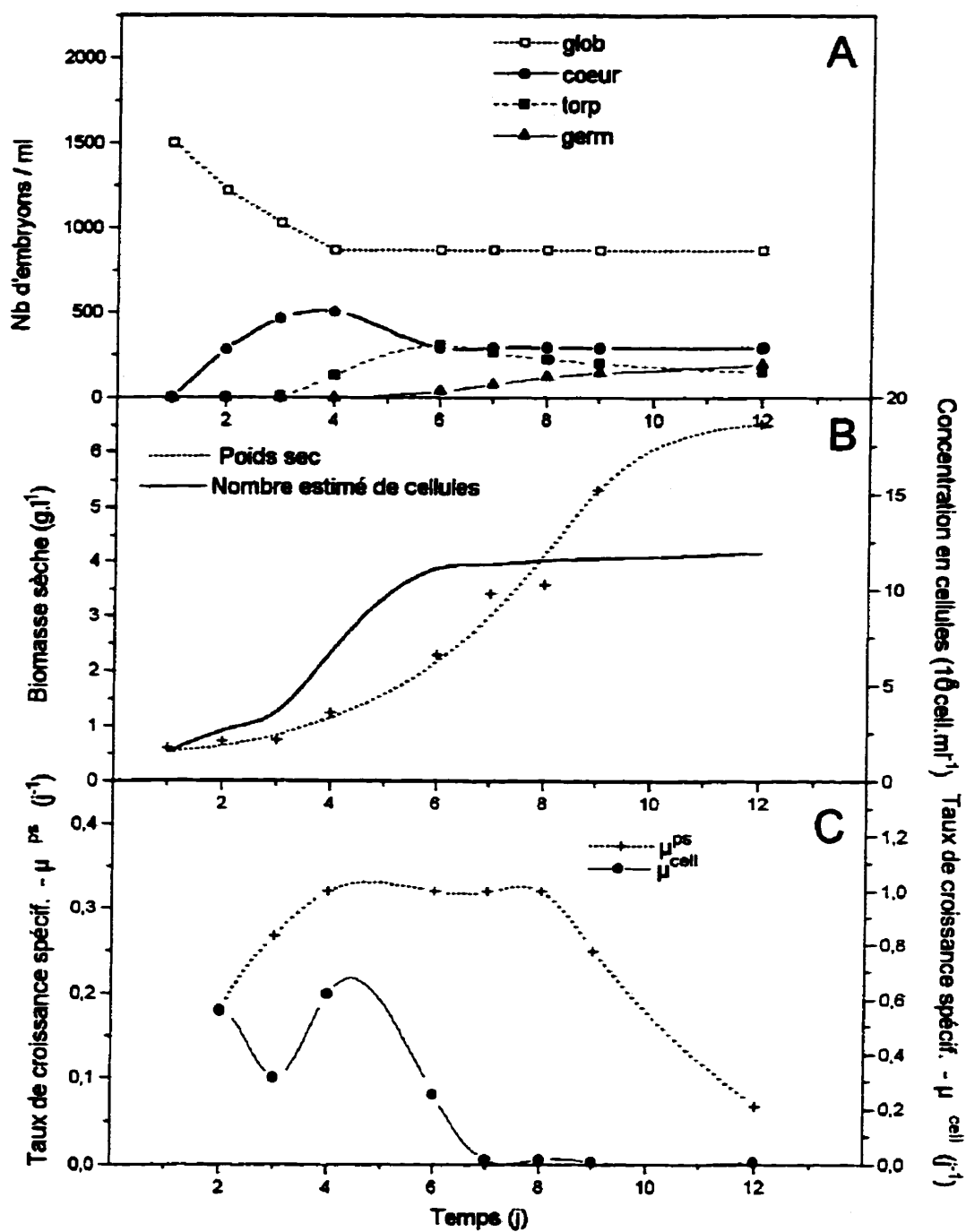
matière humide). Les résultats généraux de cette culture (B13), sont présentés à l'annexe 13 et à la figure 5.14.

#### 5.2.1.2.1. Profils d'apparition des embryons et germination en culture.

L'apparition des différentes classes d'embryons lors de la cuvée B13 est présenté à la figure 5.14.A. La synchronisation de la culture est médiocre en comparaison de la cuvée B9 puisque toutes les périodes de conversion se chevauchent. De fait, le pourcentage de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles est très faible puisque qu'un maximum de 305 embryons torpilles par ml sont formés, ce qui représente seulement 20 % du total des embryons en culture.

Par ailleurs le développement des embryons globulaires et cordiformes cesse dès l'apparition des premiers embryons germés. Or les premiers embryons germés apparaissent à I+6, soit 7 jours plus tôt que lors de la cuvée B9, ce qui explique la diminution du nombre d'embryons torpilles produits.

Notons que le pourcentage maximal de germination en culture atteint 56 % dans le cas de B13 (production maximale de 306 ET.ml<sup>-1</sup>) contre 28 % au cours de B9 (production maximale de 1032 ET.ml<sup>-1</sup>) et 4 % dans le cas de F9-r (pour une production de 1938 ET.ml<sup>-1</sup>). Il existe donc une relation directe entre le nombre d'embryons torpilles présents dans la culture et le pourcentage de germination en culture.



**Figure 5.14: Résultats de production de la cuvée B13**  
**(Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 5 g.l<sup>-1</sup>).**

De fait, on a vu à la section 1.3.3.6. que le développement des embryons est contrôlé par l'intermédiaire de protéines extracellulaires qui sont relâchées dans le milieu de culture. Les résultats des cuvées B9 et F9-r indiquent que le métabolisme des embryons ralentit au fur et à mesure de leur développement, comme c'est le cas *in vivo*. On constate également que le développement des embryons torpilles peut s'arrêter une fois la maturation achevée, mais que cela n'est possible que si les ET sont assez nombreux dans le milieu.

Cette série de résultats tend à confirmer l'hypothèse émise au chapitre 3. Tout ce passe comme si les embryons torpilles matures produisaient un signal dans le milieu de culture signifiant "stop, il faut entrer en période de quiescence". Ainsi, le développement des embryons cesse et ils ne germent pas. Cependant lorsque les embryons torpilles sont peu nombreux, il semble que la concentration de ce signal dans le milieu de culture ne soit pas assez élevée pour effectivement stopper leur développement. Les embryons matures commencent alors à germer et produisent un signal signifiant "Allez, il faut que les cellules se vacuolisent et s'allongent".

Or une cellule végétale ne peut se diviser et s'allonger en même temps (Raven et col. 1992<sup>b</sup>). Ce signal d'élongation émis dans le milieu de culture provoque donc l'arrêt de la division cellulaire au sein des embryons immatures, ce qui perturbe leur développement. Ce scénario pourrait expliquer le lien existant entre le nombre d'embryons torpilles produits, le pourcentage de germination en culture et l'arrêt du développement des embryons immatures.

#### 5.2.1.2.2. Métabolisme respiratoire

La figure 5.15.B présente l'évolution des taux de respiration obtenus lors de la cuvée B13. La concentration en oxygène dissous passe de 30 à 10 % entre 75 et 125 heures. Le contrôleur ne parvient alors pas à maintenir la DO à 20 % car le mélange gazeux à l'entrée du bioréacteur (air) n'est pas assez riche en O<sub>2</sub> pour combler la

demande en oxygène des cellules. Ce problème résulte de l'incapacité du système d'alimentation en gaz à fournir à la fois de l'azote et de l'oxygène lorsque deux réacteurs fonctionnent en même temps (ici B12 et B13). De fait dès 126 h, le bioréacteur B13 a été alimenté en oxygène pur, ce qui a permis à la DO de se stabiliser aux environs de 20 % jusqu'à la fin de la culture, mis à part une diminution à 10 % de 180 à 220 heures

La concentration en  $\text{CO}_2$  du gaz de sortie augmente lentement de 0,5 % à 1,1 % pendant les 6 premiers jours, puis se stabilise pendant une trentaine d'heures. Elle enregistre ensuite un creux de 175 à 200 heures puis se stabilise aux environs de 2,0 % pendant le reste de la culture.

Le CPR augmente progressivement pendant toute la durée de fonctionnement et passe ainsi de 0,5 à 4,5  $\text{mM.h}^{-1}$  soit en moyenne 3 fois plus que lors de la cuvée B9. Le OUR est stable (0,19  $\text{mM.h}^{-1}$  =  $\text{OTR}_{\text{max}}$  sous air) jusqu'à I+5. Il augmente ensuite rapidement jusqu'à atteindre l' $\text{OTR}_{\text{max}}$  sous  $\text{O}_2$  pur (1,1  $\text{mM.h}^{-1}$ ) un peu avant I+7. Le OUR amorce ensuite une période d'oscillation entre les valeurs 1,1 et 0,7 qui s'achève à I+10. Le OUR se stabilise alors à  $\text{OTR}_{\text{max}}$  jusqu'à la fin de la culture. On constate donc que le système est en limitation d'oxygène (OUR est égal à  $\text{OTR}_{\text{max}}$ ) pendant toute la durée de la culture, y compris entre 150 et 250 heures où il oscille selon le schéma suivant:

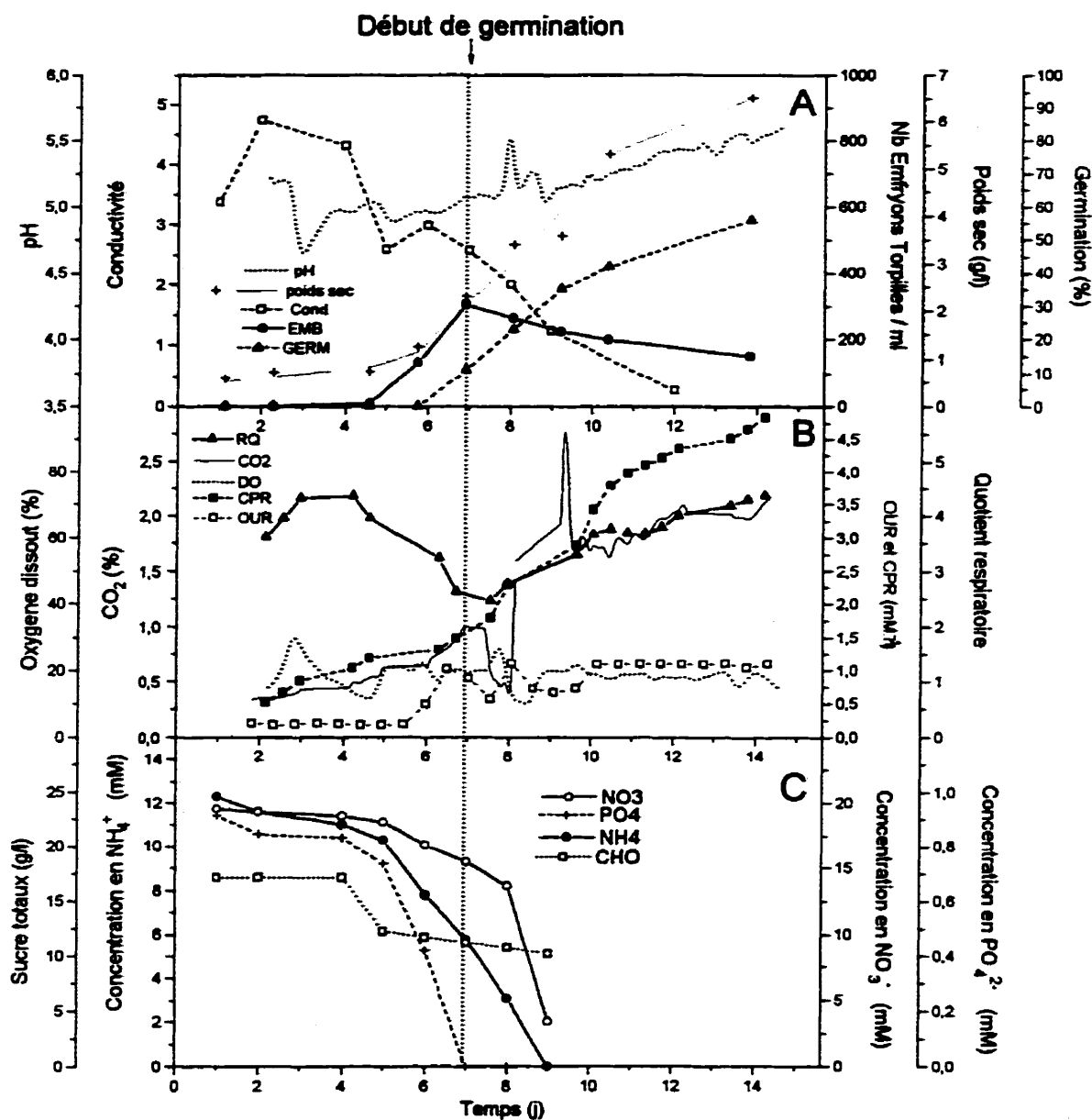
$$\text{OUR} = \text{OTR}_{\text{max}} \Rightarrow$$

diminution de la DO  $\Rightarrow$  diminution du OUR et augmentation de la DO  $\Rightarrow$

augmentation du OUR  $\Rightarrow$

$$\text{OUR} = \text{OTR}_{\text{max}} \Rightarrow \text{etc.}$$

Ce type d'oscillations a déjà été observé chez *Vitis vinifera* en bioréacteur (Pépin et col. résultats non publiés).



**Figure 5.15: Graphique récapitulatif de la cuvée B13**  
(Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 5 g.l<sup>-1</sup>).



On constate à la figure 5.15.B que le RQ est très élevé dès le début de la culture (3,5 à I+0) puis diminue de I+5 à I+7 où il passe de 4,5 à 2,5. Le RQ augmente ensuite sur la deuxième moitié de la culture pour revenir à sa valeur initiale (RQ = 4,5 à I+14). Ces valeurs de RQ supérieures à 1 traduisent la présence de la limitation en oxygène qui contraint les cellules à utiliser un métabolisme fermentaire plutôt que respiratoire. Par ailleurs, les  $q_{O_2}^c$  enregistrés lors de B13 sont de 2 à 6 fois supérieurs à ceux enregistrés lors de B9. il semble donc que le métabolisme respiratoire des cellules change en fonction du nombre de cellules en culture.

#### 5.2.1.2.3. Profil de croissance de la biomasse

Les figure 5.14.B et 5.14.C présentent l'évolution du poids sec, du nombre de cellule estimé, et des taux de croissance spécifiques par rapport aux cellules au poids sec lors de B13. Le  $\mu^{cell-spp}$  à I+9 est égal à  $0,23 \text{ j}^{-1}$  contre  $0,12 \text{ j}^{-1}$  lors de B9. La division cellulaire est donc plus importante lors des premiers jours de culture à la densité d'inoculation de  $5 \text{ g.l}^{-1}$ . Les cellules ont également un poids sec moyen plus important ( $0,46 \text{ mg PS.}(10^6 \text{ cell})^{-1}$  pour B13 contre  $0,10 \text{ mg PS.}(10^6 \text{ cell})^{-1}$  pour B9 à I+9), ce qui confirme qu'elles sont plus vacuolées que lors de la cuvée B9.

#### 5.2.1.2.4. Taux de consommation spécifiques et rendements par rapport aux substrats

Les taux de consommations spécifiques de la cuvée B13 sont globalement supérieurs à ceux de la cuvée B9 (annexes 13 et 11). A I+9 par exemple,  $q_{NO_3}^c = 885 \text{ } \mu\text{mole.j}^{-1}.(10^6 \text{ cell})^{-1}$  et  $q_{NH_4}^c = 263 \text{ } \mu\text{mole.j}^{-1}.(10^6 \text{ cell})^{-1}$  lors de B13 contre  $86 \text{ } \mu\text{mole.j}^{-1}.(10^6 \text{ cell})^{-1}$  et  $205 \text{ } \mu\text{mole.j}^{-1}.(10^6 \text{ cell})^{-1}$  respectivement lors de B9. On constate de plus que le  $PO_4^{2-}$  est totalement consommé à I+7 soit 9 jours plus tôt que lors de B9.

Les taux de production en  $CO_2$  sont de 4 à 6 fois supérieurs à ceux de B9, ce qui confirme la présence d'un métabolisme fermentaire plus important au sein de la

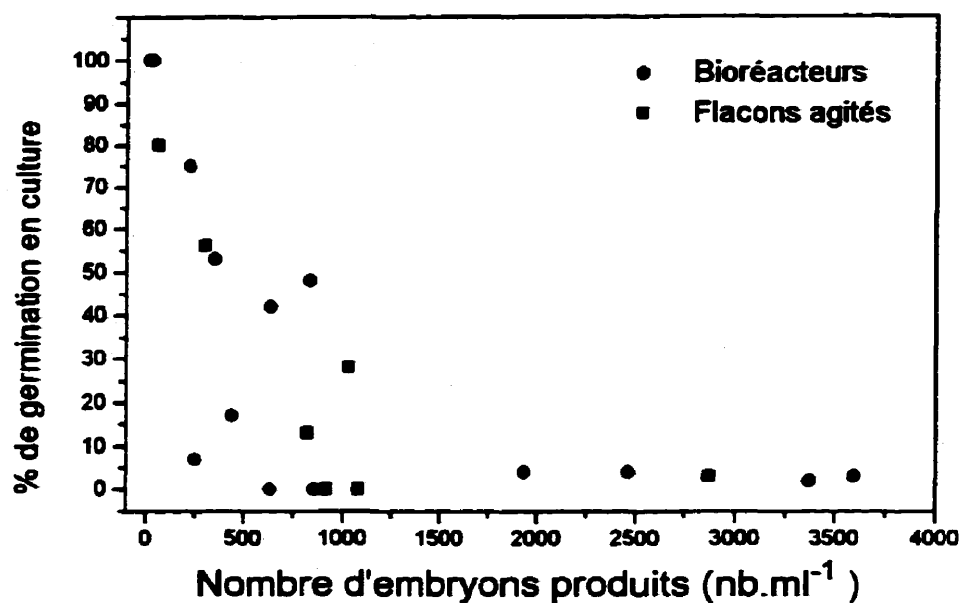
culture B13. Les rendements de consommation augmentent jusqu'à I+4 puis diminuent jusqu'à la fin de la culture, ce qui suit l'évolution de  $\mu^{cell}$ . En 1980, Dougal et ses collaborateurs avaient également démontré l'existence d'une relation du type  $Y_c = f(\mu)$  lors d'une culture de cellules de carotte sauvage en présence d'un substrat limitant. Le métabolisme des cellules serait en effet variable en fonction de leur état physiologique, donc de leur taux de croissance (modèle de Nyholm).

#### 5.2.1.2.5. Conclusion

Il existe un lien direct entre le pourcentage de germination en culture et le nombre d'embryons torpilles présents dans le milieu. Ce lien apparaît clairement à figure 5.16 qui représente l'évolution du pourcentage de germination maximal en culture en fonction du nombre d'embryons torpilles produits pour toutes les cuvées effectuées lors de ce projet de recherche (flacons et bioréacteurs). On constate que plus il y a d'embryons torpilles dans le milieu de culture et moins on observe de germination en culture. Il est donc possible de limiter la germination en culture en maximisant le nombre de ET produits.

On peut également allonger ou diminuer le temps de maturation des embryons en augmentant ou en diminuant la densité d'inoculation en embryons globulaires lors de la dernière étape du procédé de production par paliers de densité. Ainsi, la qualité des ET produits est d'autant meilleure que la densité d'inoculation en embryons globulaires est élevée, mais le développement des embryons est alors plus lent, ce qui augmente la durée des cultures.

Dans notre cas, une densité d'inoculation de  $10 \text{ g.l}^{-1}$  semble un bon compromis pour obtenir un maximum d'embryons de qualité en un minimum de temps ( $2500 \text{ ET.ml}^{-1}$  en 6 jours en flacons agités, cuvée F9-t). Cependant, des densités d'inoculation de  $5 \text{ g.l}^{-1}$  ou moins ont été utilisées dans la suite du travail afin de mieux déterminer l'impact des différents traitements sur la germination en culture.



**Figure 5.16: Pourcentage maximal de germination en culture en fonction du nombre d'embryons torpilles produits.**

Les résultats de la cuvée B13 démontent que le taux de croissance spécifique et le métabolisme des cellules sont beaucoup plus élevés lorsqu'il y a moins de cellules en culture dans le milieu. Les cellules sont également plus vacuolées à 5 qu'à 10 g d'embryons globulaires par litre.

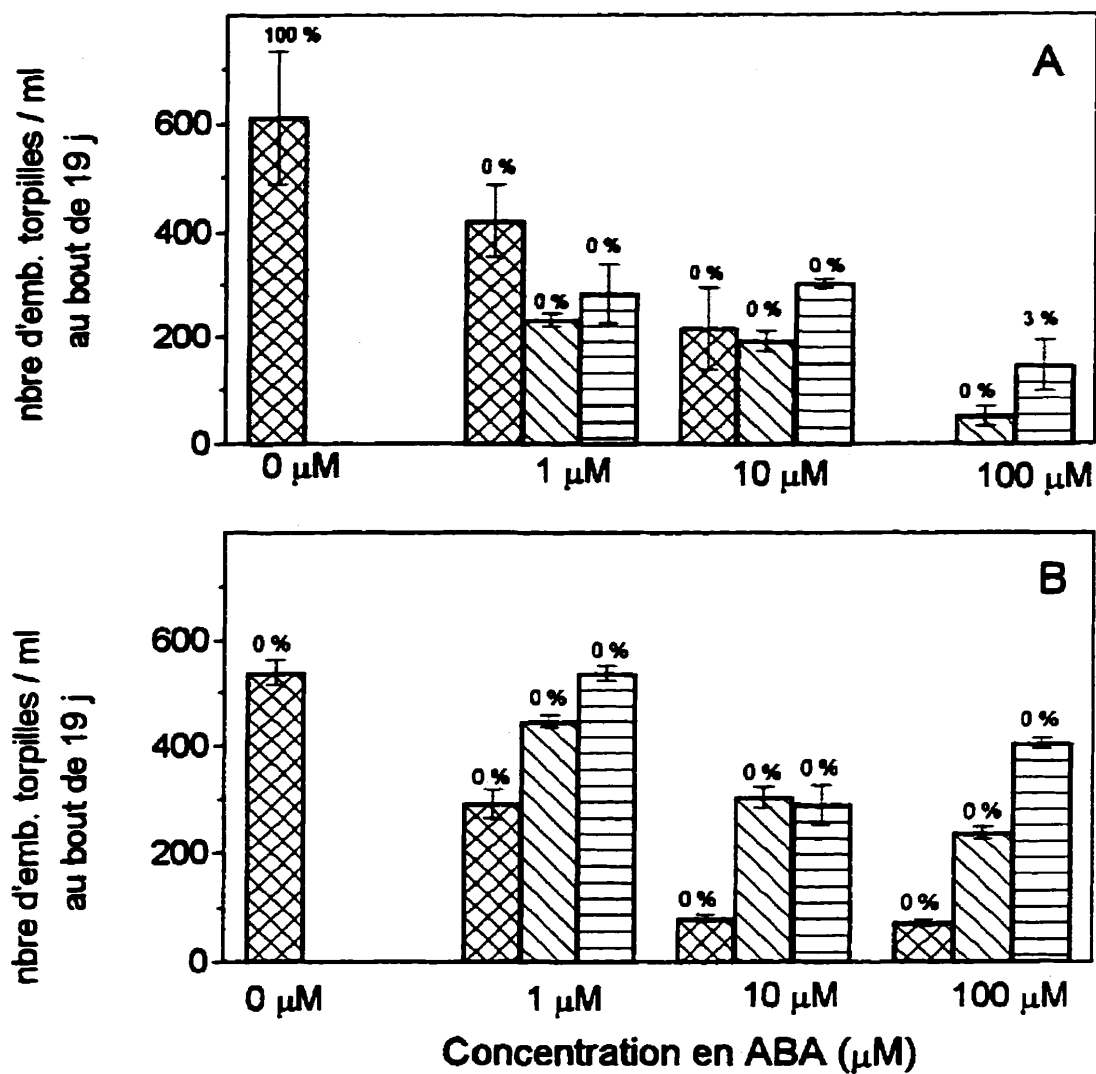
### 5.2.2. INFLUENCE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE

De nombreux auteurs ont eu recours à l'acide abscissique afin de limiter la germination en culture lors de la production d'embryons somatiques *in vitro*. Chez certaines espèces comme les conifères, la présence d'ABA dans le milieu de culture est même essentielle à la maturation des jeunes embryons. Cependant, la concentration employée et le temps d'ajout de l'ABA constituent des facteurs clef qui conditionnent la réussite du traitement.

Deux séries d'expériences ont donc été effectuées afin de déterminer l'influence de différents traitements à l'ABA sur la germination en culture des embryons. Les traitements ont été effectués soit sur des suspensions cellulaires (méthode de production classique), soit sur des embryons globulaires (dernière phase du mode de production par paliers de densité).




La figure 5.17 présente l'influence du temps d'ajout et de la concentration en ABA sur la germination en culture et la production d'embryons. La figure 5.17.A se rapporte à des flacons inoculés avec 1 g.l<sup>-1</sup> de cellules (en matière humide, lignée FP95-I-8) alors que la figure 5.17.B fait référence à des flacons inoculés avec 1 g.l<sup>-1</sup> d'embryons globulaires (matière humide, lignée FP95-I-23). Trois concentrations en ABA ont été testées, soit 1, 10 et 100 µM et les ajouts ont été effectués 0, 3 et 6 jours après l'inoculation.

Chaque point expérimental représente la moyenne de 3 flacons agités de 50 ml (volume utile de 25 ml). Au bout de 19 jours, les embryons torpilles d'apparence normale et les embryons germés ont été comptés. Les pourcentages portés au dessus de chaque colonne correspondent au pourcentage de germination en culture à 19 j pour chaque expérience.



**Figure 5.17: Influence du temps d'ajout et de la concentration en ABA sur la germination en culture et sur la production d'embryons.**

A: Méthode classique, B: Méthode par palliers de densité

-  Ajout d'ABA au temps (inoc + 0)
-  Ajout d'ABA au temps (inoc + 3)
-  Ajout d'ABA au temps (inoc + 6)

Les valeurs exprimées en pourcentages correspondent au taux de germination en culture au bout de 19 jours.

#### 5.2.2.1.1. Flacons inoculés en cellules

L'ajout d'ABA dans le milieu inhibe la germination en culture des embryons quelque soit la concentration et le temps d'ajout, sauf lorsque 100  $\mu$ M sont ajoutés à I+6 (3 % de germination contre 0 % dans tous les autres cas). Cependant, la présence d'ABA inhibe également la formation des embryons et ce d'autant plus que la concentration est élevée et l'ajout précoce (pas d'embryons produits lorsque 100  $\mu$ M d'ABA sont ajoutés à I+0).

La présence d'ABA inhibe la formation des embryons globulaires qui a lieu entre I+0 et I+4 environ. De ce fait, si l'application a lieu avant que tous les embryons globulaires ne soient formés, la quantité totale d'embryons produits diminue.

Au bout des 19 jours de traitement, une dizaine d'embryons torpilles ont été placés sur du milieu B5 solide afin de tester leur germinabilité. 100 % des embryons non traités ont produit des plantules alors qu'aucun des embryons traités à l'ABA n'a germé, sauf ceux traités à 100 $\mu$ M - I+6 (pourcentage de germination post-récolte de 20 %).

Ces résultats confirment que le temps d'ajout est très délicat lors d'un traitement à l'ABA et qu'un ajout précoce provoque la dormance des embryons produits. Fujii et col. (1993) ont observé de même que la conversion en plantes des embryons somatiques d'alfalfa après récolte est inhibée lorsque la concentration en ABA augmente dans le milieu de maturation. Ils ont également constaté qu'en présence d'ABA, la croissance des embryons s'arrête et la germination est inhibée.

#### 5.2.2.1.2. Flacons inoculés en embryons globulaires

L'exemple des cuvées B9 et B12 démontre que la méthode de production par paliers de densité limite par elle même la germination en culture. De même ici, on

constate que les embryons produits par MPD n'ont pas germé, qu'ils soient ou non traités à l'ABA. De ce fait, il n'est pas possible de déterminer l'influence de l'ABA sur la germination en culture lors de cette série d'expériences.

Il apparaît cependant que l'ajout d'ABA dans le milieu de culture inhibe la formation des embryons torpilles dans tous les cas sauf lorsque 1  $\mu$ M d'ABA est ajoutée à I+6. De même que précédemment, le nombre d'embryons torpilles produits est d'autant plus bas que la concentration est élevée et l'ajout précoce. En fait, il semblerait que l'ABA inhibe la division et l'élongation cellulaire (Raven et col. 1992<sup>b</sup>). Il n'est donc pas surprenant que les pourcentages de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles diminuent en présence d'ABA.

L'observation microscopique des suspensions embryonnaires a révélé que les embryons traités à I+6 présentent moins d'anormalités que les autres au moment de la récolte. Au bout des 19 jours de traitement, une partie des embryons produits ont été placés sur du milieu B5 solide afin de tester leur germinabilité. 100 % des embryons testés ont germé, quelque soit le traitement utilisé. Les plantules issues des embryons traités par 1  $\mu$ M à I+3 semblaient néanmoins de meilleure qualité que les autres, y compris celles issues d'embryons non traités.

#### 5.2.2.1.3. Conclusion

La présence d'ABA dans le milieu de culture, aux concentrations et aux temps d'ajouts utilisés, a effectivement supprimé le phénomène de germination en culture en mode de production classique. Cependant, à une exception près, la présence d'ABA dans le milieu de culture provoque une diminution de 50 à 100 % du nombre d'embryons torpilles produits, et ce aussi bien en mode de production classique que par la méthode des paliers de densité.

Ces expériences ont également prouvé que l'ajout d'ABA inhibe la formation des embryons globulaires et peut provoquer la dormance des embryons produits selon la méthode classique. Par contre, aucun phénomène de dormance n'a été observé en ce qui concerne les embryons produits par la méthode des paliers de densité.

A la vue de ces résultats, il a été décidé de ne pas poursuivre les expériences avec l'acide abscissique. Il semble en effet presque impossible de pouvoir situer avec précision à quel moment il faut appliquer le traitement pour ne pas inhiber la production, ne pas provoquer la dormance et empêcher tout de même la germination.

### 5.2.3. INFLUENCE DU FE-EDTA

D'après les travaux de Zryd (1988) effectués sur des embryons zygotiques excisés, la concentration en fer du milieu aurait une influence décisive sur la survie et le pourcentage de conversion des jeunes embryons. D'autre part, des expériences préliminaires effectuées en flacons et en bioréacteurs (cuvée B4) ont démontré une influence de la concentration en Fe-EDTA du milieu sur le pourcentage de germination en culture.

Une série d'expériences a donc été menée afin de préciser l'effet du Fe-EDTA sur le développement des embryons somatiques de carotte *in vitro*. Deux milieux de culture ont ainsi été utilisés, soit le milieu de production classique qui contient 0,1 mM de fer et le même milieu sans Fe-EDTA.



**Tableau 5.9: Effet du Fe-EDTA dans le milieu de culture sur le nombre d'embryons produits et sur le pourcentage de germination en culture en flacons agités.**

		<i>Nb max. d'embryons torpilles / ml</i>	<i>% final de Germ. en culture</i>
<i>Procédé de production classique (n = 3)</i>	avec Fe-EDTA  <i>souche FP95-I-8 à 1 g/l</i>	<b>283 ± 19</b> (21 j)	<b>&gt; 80 %</b> (21 j)
	sans Fe-EDTA  <i>souche FP95-I-8 à 1 g/l</i>	<b>244 ± 17</b> (21 j)	<b>&gt; 80 %</b> (21 j)
<i>Procédé par paliers de densité (n = 2)</i>	avec Fe-EDTA  <i>souche FP95-I-6 à 10 g/l</i>	<b>2466 ± 123</b> (16 j)	<b>15 %</b> (23 j)
	sans Fe-EDTA  <i>souche FP95-I-6 à 10 g/l</i>	<b>3596 ± 188</b> (23 j)	<b>13 %</b> (23 j)

#### 5.2.3.1. Expériences en flacons agités

Le tableau 5.9 présente l'effet de la présence ou de l'absence de Fe-EDTA dans le milieu sur le nombre d'embryons et les pourcentages de germination obtenus en

flacons agités. Les données relatives au procédé de production par paliers de densité se rapportent à la dernière phase du procédé, soit la conversion des embryons globulaires en embryons torpilles.

En flacons agités, la présence de Fe-EDTA dans le milieu n'a pas d'influence significative sur la germination en culture, et ce quelque soit la méthode de production utilisée. Par contre, le nombre d'embryons torpilles produits est 46 % supérieure en absence de Fe-EDTA par la méthode des paliers de densité alors qu'il n'a aucun effet sur la production en MC.

Ce résultat indique que le Fe-EDTA inhibe la maturation des embryons globulaires en embryons torpilles mais qu'il n'a pas d'effet négatif sur la production des embryons globulaires. Zrýd (1988) avait pour sa part déterminé que la présence de fer dans le milieu de culture inhibe le passage du stade globulaire au stade coeur des jeunes embryons excisés (sortis de l'enveloppe de la graine avant leur maturité).

#### 5.2.3.2. Expérience en bioréacteur

##### 5.2.3.2.1. Résultats généraux

Le tableau 5.10 présente le nombre d'embryons et les pourcentages de germination obtenus en bioréacteur en présence ou en absence de Fe-EDTA dans le milieu. De même que précédemment, les données relatives au procédé de production par paliers de densité (cuvées B9 et B10 respectivement) se rapportent à la seule phase de maturation des embryons globulaires en embryons torpilles.

**Tableau 5.10: Effet du Fe-EDTA dans le milieu de culture sur le nombre d'embryons produits et sur le pourcentage de germination en culture en bioréacteur.**

		<i>Nb max. d'embryons torpilles / ml</i>	<i>% final de Germ. en culture</i>
<i>Procédé de production classique (n = 1)</i>	avec Fe-EDTA <small>souche SP29-II-8 à 10 g/l</small>	<b>57</b> (21 j)	<b>&gt; 80 %</b> (32 j)
	sans Fe-EDTA <small>souche SP29-II-13 à 10 g/l</small>	<b>30</b> (18 j)	<b>20 %</b> (27 j)
<i>Procédé par paliers de densité (n = 1)</i>	avec Fe-EDTA <small>souche FP95-I-6 à 10 g/l</small>	<b>1032</b> (13 j)	<b>28 %</b> (23 j)
	sans Fe-EDTA <small>souche FP95-I-6 à 10 g/l</small>	<b>3021</b> (16 j)	<b>16 %</b> (23 j)

En bioréacteur, la présence de Fe-EDTA dans le milieu de production augmente significativement le pourcentage de germination en culture quelque soit le mode de production utilisé. En fait, le pourcentage de germination est multiplié par 4 et

par 2 en MC et MPD respectivement en présence de Fe-EDTA. Comme en flacons, on constate qu'avec la méthode par paliers de densité, la production d'embryons est multipliée par presque 3 lorsqu'on retire le Fe-EDTA du milieu de culture lors de la maturation des EG.

La présence de Fe-EDTA dans le milieu affecte les pourcentages de germination en culture en bioréacteur mais pas en flacons agités. La concentration en oxygène dissous du milieu constitue donc un paramètre important lorsqu'on étudie l'influence du Fe-EDTA sur la germination des embryons. Ce lien entre le fer et le métabolisme respiratoire n'est par ailleurs pas surprenant puisqu'il entre dans la composition de tous les cytochromes de la chaîne respiratoire.

Afin d'en savoir plus sur l'influence du Fe-EDTA sur le métabolisme respiratoire des embryons, regardons plus en détails le déroulement de la cuvée B10.

#### 5.2.3.2.2. Cuvée B10

Parallèlement à la culture témoins (B9), une cuvée sans Fe-EDTA a été opérée (B10) afin de déterminer l'effet de cet élément sur la germination en culture. B10 a été opéré dans les mêmes conditions et en même temps que B9, avec le même inoculum et la même densité d'inoculation.

#### *Profils d'apparition des embryons et germination en culture.*

La figure 5.18.A présente les profils d'apparition des différentes classes d'embryons lors de la cuvée B10 (sans Fe-EDTA). La culture est très bien synchronisée et présente très peu de blocages développementaux. De fait, le pourcentage de conversion des embryons globulaires en embryons torpilles atteint 72 % à I+30 contre 28 % lors de B9. La maturation des embryons globulaires s'étend sur une plus longue

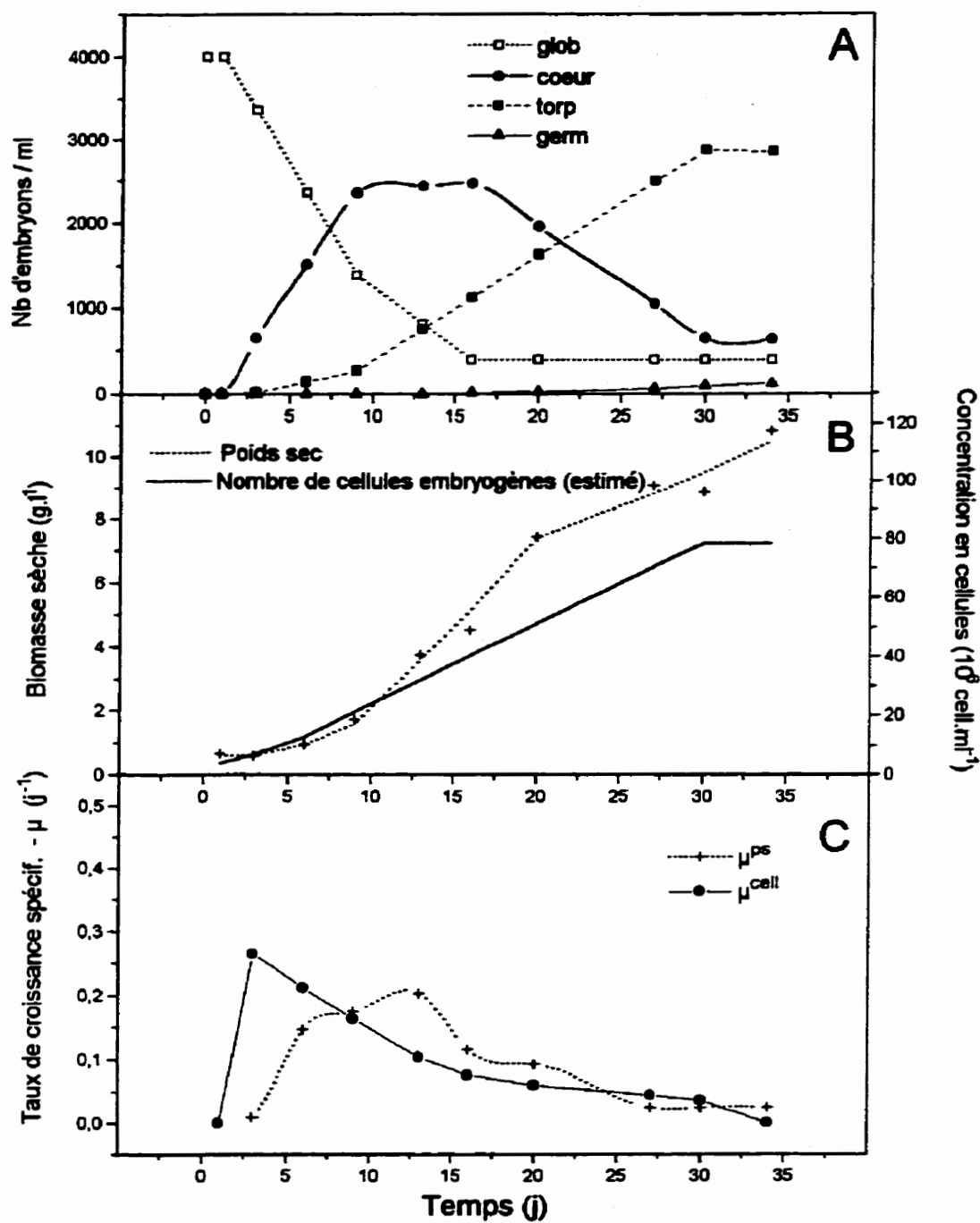
période en absence de Fe-EDTA puisque le nombre maximal d'embryons torpilles est atteint à I+30 lors de B10 soit 14 jours plus tard que lors de B9.

Le pourcentage maximal de germination en culture est presque dix fois inférieur à celui observé lors de B9 (3 % et 28 % respectivement au bout de 23 jours). La présence de Fe-EDTA dans le milieu de culture semble donc augmenter significativement le pourcentage de germination des embryons matures dans le bioréacteur.

### Calculs respirométriques

La figure 5.19.A présente l'évolution des taux de respiration lors de la cuvée B10. Sans entrer dans les détails, le OUR augmente progressivement au cours de la culture mais, contrairement à ce qu'on observe dans le cas de B9, le OTR<sub>max</sub> n'est jamais atteint. Ceci indique que le métabolisme respiratoire des cellules est inférieur en absence de Fe-EDTA. Par ailleurs, les  $q^{\circ}_{O_2}$  relevés au cours de B10 sont 10 % à 40 % inférieurs à ceux enregistrés lors de B9 (voir annexes 14 et 11). Quant aux rendements de consommation en oxygène, ils sont en moyenne 40 % supérieurs à ceux enregistrés lors de B9.

Le CPR augmente lui aussi tout au long de la culture mais il atteint seulement  $0,9 \text{ mM.h}^{-1}$  à I+30 alors qu'il atteignait  $1,6 \text{ mM.h}^{-1}$  à I+23 lors de B9. La valeur de RQ maximale relevée lors de B10 est 1,7 soit à peu près la même que celle relevée lors de B9. On en déduit que le Fe-EDTA agit plus sur l'intensité respiratoire de la culture (volume de  $\text{CO}_2$  rejeté par 1 g de poids sec en une heure) que sur le métabolisme respiratoire en lui-même.



**Figure 5.18: Résultats de production de la cuvée B10**  
 (Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 10 g.l<sup>-1</sup>, sans Fe-EDTA).

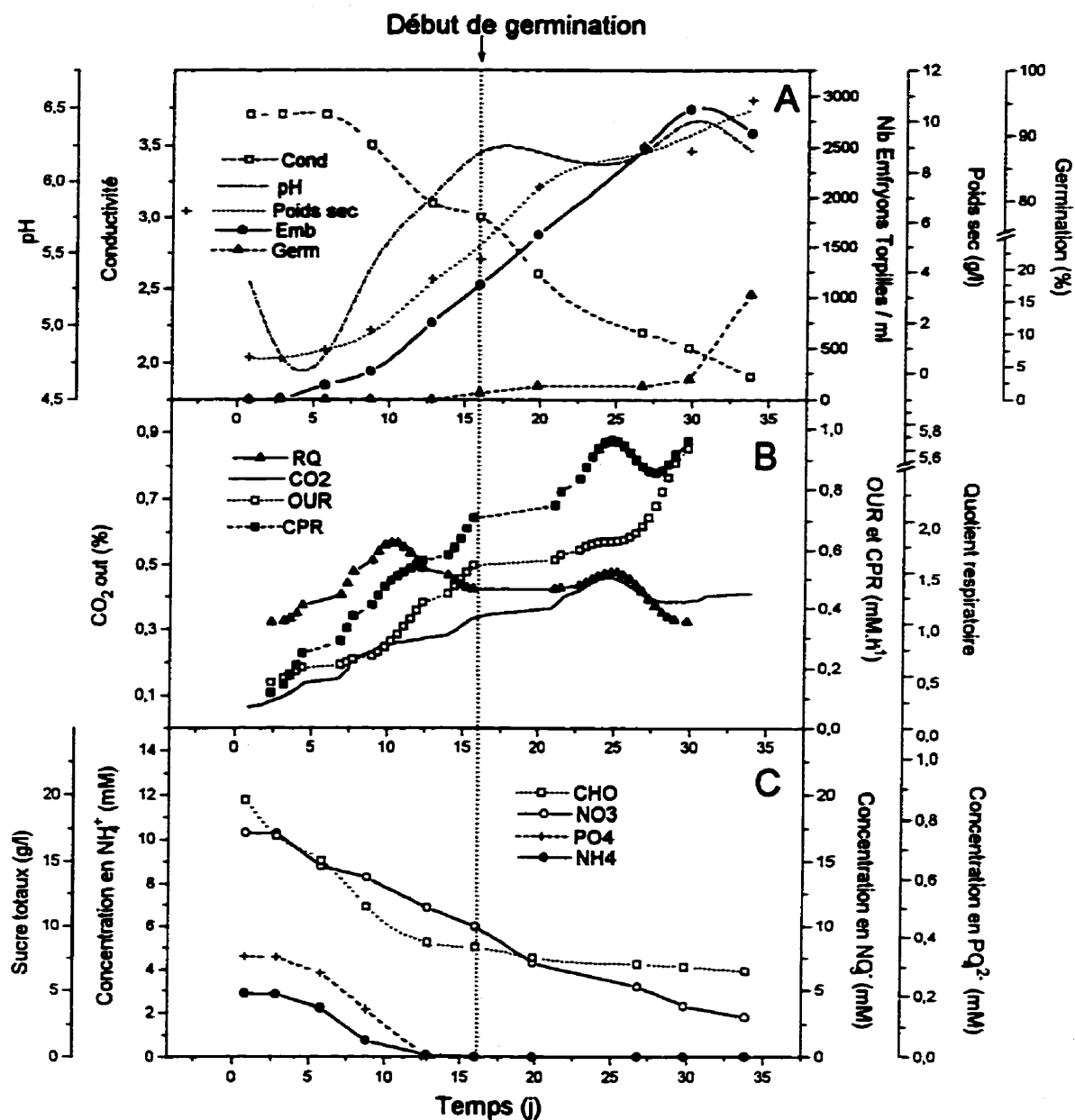
*Profil de croissance de la biomasse, consommation des nutriments*

Les figures 5.18.B et 5.18.C présentent l'évolution du nombre de cellules, du poids sec, de  $\mu^{\text{cell}}$  et de  $\mu^{\text{ps}}$  au cours de la cuvée B10. L'accroissement du nombre de cellules est linéaire et non pas exponentiel, ce qui semble indiquer que la culture est probablement en limitation vis-à-vis du Fe-EDTA. Le poids sec moyen des cellules passe de  $0,15 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cell})^{-1}$  à  $0,08 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cell})^{-1}$  de I+0 à I+9 puis se stabilise à  $0,12 \text{ mg} \cdot (10^6 \text{ cell})^{-1}$  de I+16 à I+34. En fin de culture, les cellules embryonnaires sont donc 1,5 fois plus légères que lors de B9.

Le  $\mu^{\text{cell}}$  présente un pic à I+6 ( $0,16 \text{ j}^{-1}$ ) puis diminue lentement jusqu'à la fin de la culture. Les taux de consommation spécifiques des nutriments principaux diminuent également de I+6 à I+34 comme si le métabolisme des embryons diminuait progressivement pour finalement s'arrêter une fois la maturation achevée (voir à l'annexe 14). On notera que les concentrations du milieu de culture en  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{2-}$  lors du premier échantillonnage (I+1) sont très différentes de celles enregistrées lors de B9 (voir fig. 5.11.C et 5.19.C). On a en effet  $[\text{NH}_4^+]_{\text{I+1}} = 14,2 \text{ mM}$  et  $5,5 \text{ mM}$  lors de B9 et B10 respectivement,  $[\text{NO}_3^-]_{\text{I+1}} = 24,7 \text{ mM}$  et  $17,2 \text{ mM}$  lors de B9 et B10 respectivement et finalement  $[\text{PO}_4^{2-}]_{\text{I+1}} = 0,8 \text{ mM}$  et  $0,4 \text{ mM}$  lors de B9 et B10 respectivement. Ces écarts ne peuvent pas être dus à une erreur dans la préparation du milieu de B10 puisque la même solution mère de macronutriments (qui contient les ions  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{2-}$ ) a été utilisée pour les deux milieux de culture.

Certains des échantillons ont été analysés une seconde fois pour retrouver des résultats similaires. On ne peut donc probablement pas non plus attribuer ces variations de concentrations à I+1 à une erreur lors de la calibration ou du fonctionnement de l'HPLC. En dernier recours, il faut donc envisager soit une erreur lors de la préparation des échantillons en vue de l'analyse, soit que les cellules aient pu consommer les ions disparus entre le moment d'inoculation et le premier échantillonnage 24 heures plus tard. Cette consommation brutale serait inexplicable. Quoi qu'il en soit, il

est difficile de déterminer si cette concentration en ions inférieure a pu influencer les pourcentages de germination en culture et le comportement général de la culture B10.



**Figure 5.19: Graphique récapitulatif de la cuvée B10**

(Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 10 g.Γ<sup>1</sup>, sans Fe-EDTA).



### Conclusion

Les résultats présentés dans cette sous-section démontrent que la présence de Fe-EDTA dans le milieu de production inhibe significativement la maturation des EG en ET. Par contre, le Fe-EDTA n'a apparemment pas d'influence sur la production des embryons globulaires. Il apparaît également que la durée de maturation des embryons est plus longue en présence de Fe-EDTA.

Les cellules embryonnaires sont moins grosses en absence de Fe-EDTA et leur métabolisme nutritionnel tout comme leur intensité respiratoire sont inférieurs à ceux relevés en présence de Fe-EDTA. Il apparaît que l'élongation des cellules est inhibée, ce qui limite à la fois la taille des cellules et la germination en culture. Steward et col. (1958) ont déjà prouvé que les concentrations relatives en fer, molybdène et manganèse des milieux de culture avaient une influence directe sur le processus de différenciation des cellules, et modulaient, entre autre, leur élongation ou leur division.

#### 5.2.4. INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE DU MILIEU

Chez les plantes, c'est la pression exercée par la vacuole sur la paroi pecto-cellulosique qui permet l'augmentation de la taille des cellules. De ce fait, l'élongation est toujours accompagnée d'une augmentation de la taille de la vacuole. Or, si on place des cellules végétales dans un milieu de culture riche en molécules plasmolysantes, la vacuole se vide par le processus d'osmorégulation et les cellules restent alors de petite taille (pas d'élongation).

Ces propriétés anti-élongation des solutions à faible potentiel osmotique peuvent être utilisées afin de créer une barrière mécanique à la germination des embryons cultivés *in vitro* et des graines (voir le paragraphe 2.5.3.2). Au cours de ce projet de recherche, un milieu de culture enrichi en sucrose ( $90 \text{ g.l}^{-1}$  soit environ 0,3 osmoles, au lieu de  $30 \text{ g.l}^{-1}$  qui correspond à 0,1 osmoles) a été utilisé dans le but de

tester l'influence d'un traitement à haute pression osmotique sur la germination en culture.

#### 5.2.4.1. Expériences en flacons agités

Le tableau 5.11 présente la production en embryons et les pourcentages de germination en culture obtenus en flacons agités en présence de 30 ou 90 g.l<sup>-1</sup> de sucrose dans le milieu. Les données relatives au procédé de production par paliers de densité se rapportent à la dernière phase du procédé, soit la maturation des embryons globulaires en embryons torpilles.

Le fait de placer les embryons dans un milieu riche en sucrose (potentiel osmotique faible) permet de supprimer totalement le phénomène de germination en culture, et ce quelque soit la méthode de production utilisée.

Par la méthode de production classique (inoculation en cellules) le nombre d'embryons torpilles produits est 76 % inférieur en présence de 90 g.l<sup>-1</sup> de sucrose par rapport au milieu de production conventionnel (30 g.l<sup>-1</sup> de sucrose). Inversement, par la méthode des paliers de densité, le nombre d'embryons produits est presque 4 fois supérieur à 90 g.l<sup>-1</sup> qu'à 30 g.l<sup>-1</sup> de sucrose. Ainsi, un milieu à bas potentiel osmotique inhibe la formation des embryons globulaires mais favorise la conversion des embryons globulaires en embryons torpilles.

Zrýd en 1988 a également déterminé que les embryons globulaires excisés ont un taux de conversion supérieur lorsqu'ils sont placés dans un milieu riche en sucrose (de 50 à 200 g.l<sup>-1</sup>).

**Tableau 5.11: Effet de deux concentrations en sucrose du milieu de culture sur la production d'embryons torpilles en flacons agités.**

		<i>Nb max. d'embryons torpilles / ml</i>	<i>% final de germ. en culture</i>
<i>Procédé de production classique (n = 3)</i>	Sucrose 30 g/l  <small>souche FP95I-8 à 1 g/l</small>	<b>283 ± 19</b> (21 j)	<b>&gt; 80 %</b> (21 j)
	Sucrose 90 g/l  <small>souche FP95I-8 à 1 g/l</small>	<b>74 ± 50</b> (21 j)	<b>0 %</b> (21 j)
<i>Procédé par paliers de densité (n = 2)</i>	Sucrose 30 g/l  <small>souche FP95I-19 à 5 g/l</small>	<b>224 ± 2</b> (8 j)	<b>18 %</b> (12 j)
	Sucrose 90 g/l  <small>souche FP95I-22 à 5 g/l</small>	<b>860 ± 42</b> (12 j)	<b>0 %</b> (12 j)

#### 5.2.4.2. Expérience en bioréacteur: cuvée B15

Une cuvée en bioréacteur à 90 g.l<sup>-1</sup> de sucrose (B15) a été opérée afin de déterminer l'effet de l'osmolarité du milieu sur la germination en culture des embryons. B15 a été opéré dans les mêmes conditions que B13, avec le même taux d'inoculation.

***Profils d'apparition des embryons et germination en culture.***

Le tableau 5.12 présente la production en embryons torpilles et les pourcentages de germination obtenus en bioréacteur en présence de 30 ou 90 g.l<sup>-1</sup> de sucrose dans le milieu (cuvées B13 et B15 respectivement, taux d'inoculation de 5 g.l<sup>-1</sup> en matière humide).

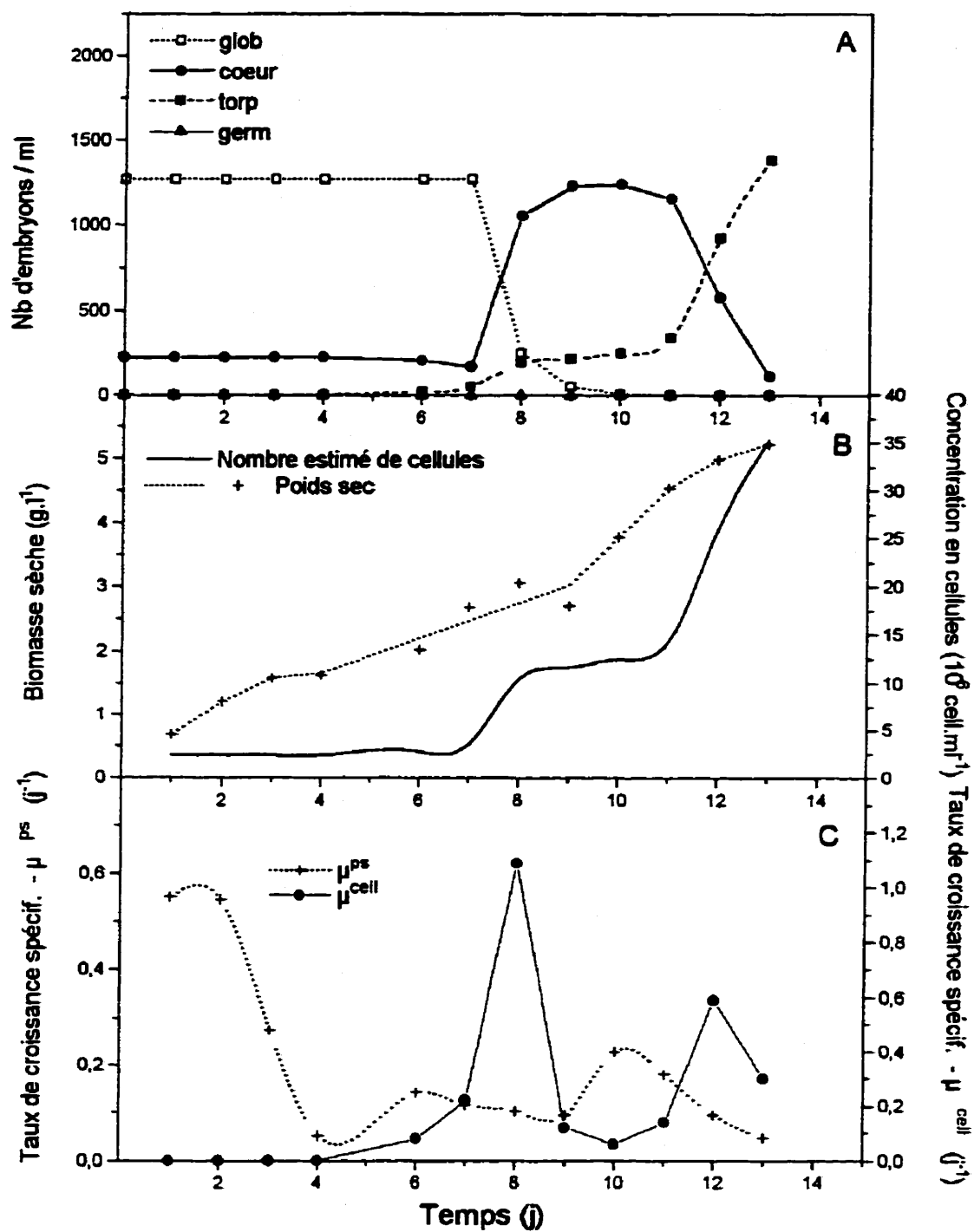
Le pourcentage de germination en culture passe à 0 % en présence du milieu à bas potentiel osmotique. De plus, le nombre d'embryons torpilles produits est 4,5 fois supérieur à 90 g.l<sup>-1</sup> de sucrose qu'avec le milieu de production classique.

La figure 5.20.A présente les profils d'apparition des différents stades embryonnaires au cours de la cuvée B15. On constate que de jeunes embryons cordiformes sont présents dans l'inoculum suite à un problème lors de la filtration. On peut délimiter 4 périodes distinctes lors de la cuvée B15, soit jusqu'à I+6 une longue période de latence (L1), de I+6 à I+9 le passage des embryons du stade globulaire au stade cordiforme (D1), de I+9 à I+11 une deuxième période de latence (L2) et de I+11 à I+13 le passage des embryons du stade cordiforme au stade torpille (D2).

**Tableau 5.12: Effet de deux concentrations en sucrose du milieu de culture sur la production d'embryons torpilles en bioréacteur.**

		<i>Nb max. d'embryons torpilles / ml</i>	<i>% final de germ. en culture</i>
<i>Procédé par paliers de densité</i>	Sucrose 30 g/l  <i>souche FP95I-19 à 5 g/l</i>	<b>306</b> (12 j)	<b>40 %</b> (12 j)
	Sucrose 90 g/l  <i>souche FP95I-22 à 5 g/l</i>	<b>1384</b> (13 j)	<b>0 %</b> (13 j)

La synchronisation de la culture est excellente puisque la conversion des EC en ET ne commence que lorsque tous les embryons globulaires sont parvenus au stade coeur. Le pourcentage de conversion des EG en embryons torpilles atteint 92 % lors de B15 alors qu'il n'est que de 23 % lors de B13. Notons que la conversion aurait sans doute été complète lors de B15 si la culture avait été prolongée de quelques jours.



**Figure 5.20: Résultats de production de la cuvée B15**  
 (Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 5 g.l<sup>-1</sup>, 90 g.l<sup>-1</sup> de sucre).

Ainsi, les blocages développementaux sont presque inexistants lorsqu'on travaille avec une population synchrone d'embryons. Ce phénomène a déjà été décrit chez la carotte par Molle et collaborateurs (1993).

Cette méthode de synchronisation mécanique de la production d'embryons a permis d'augmenter le pourcentage de conversion des EG en ET jusqu'à 90 % au bout de 21 jours de production. De plus, les embryons produits ont un taux de conversion en plantule de 77 %, ce qui démontre leur excellente qualité.

### *Calculs respirométriques*

On constate à la figure 5.21.B que la DO n'est pas égale à 20 % sur toutes la durée de la cuvée B15. Sans entrer dans les détails, on peut néanmoins signaler le fait que de I+0 à I+3, le gaz à l'entrée du bioréacteur (air) n'est pas suffisamment riche en oxygène pour combler la demande en oxygène des cellules (deux bioréacteurs étaient alors en fonctionnement en même temps dont un qui était alimenté en azote, ce qui rendait provisoirement impossible l'enrichissement du gaz d'entrée de B15 en  $O_2$ ). A I+4, une coupure de l'alimentation en air provoque un pic de DO pendant quelques heures (alimentation en  $O_2$  pur). La DO se stabilise ensuite à 20 % jusqu'à I+10 puis oscille autour de 20 % jusqu'à la fin de la culture.

Le OUR est stable à  $0,2 \text{ mM.h}^{-1}$  pendant les premières 75 heures (OUR =  $OTR_{\text{max}}$  sous air) puis augmente progressivement lorsque la disponibilité en oxygène devient plus grande jusqu'à atteindre  $1,1 \text{ mM.h}^{-1}$  ( $OTR_{\text{max}}$  sous  $O_2$ ) à I+10. Le OUR oscille ensuite selon la relation déjà évoquée au paragraphe 5.2.1.2.2. Les cellules sont donc en limitation en oxygène de I+0 à I+3 puis de I+10 à I+12. Cette limitation est confirmée par les valeurs de RQ mesurées lors de la cuvée, soit 2,5 en début de culture, à peu près 1,0 à I+5 et 2,0 à I+12. L'apparition massive des embryons torpilles dans le

milieu (période D2) coïncide justement avec la deuxième période de limitation en oxygène. L'augmentation du nombre de cellules lors de la formation des embryons torpilles provoque une augmentation du OUR jusqu'à ce que le  $OTR_{max}$  soit atteint.

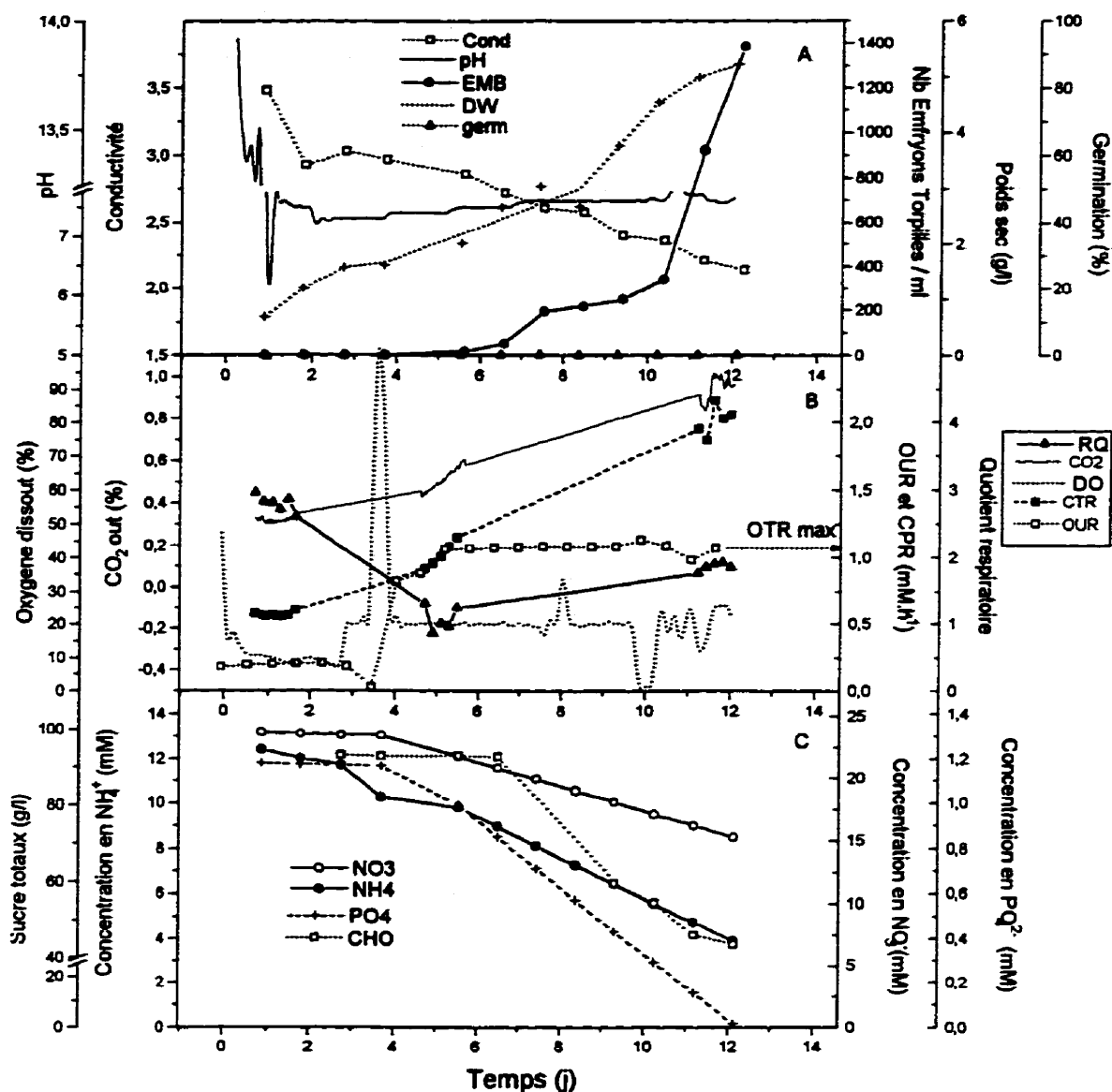
Les  $q^c_{O_2}$  relevés lors de B15 en limitation d'oxygène sont en moyenne 3 fois supérieurs au  $q^c_{O_2}$  maximum enregistré lors de B13, et 9 fois supérieurs au  $q^c_{O_2}$  maximum observé lors de B9 ( $q^c_{O_2_{max}} = 7,3; 2,3$  et  $0,8 \text{ mmole} \cdot (10^6 \text{ cell})^{-1}$  pour B15, B12 et B9 respectivement). Cette consommation supérieure en oxygène s'explique par les besoins énergétiques accrus des cellules pour lutter contre l'effet plasmolysant du milieu. Les cellules doivent en effet lutter contre le gradient de concentration en sucrose pour pouvoir conserver l'eau dont elles ont besoin pour survivre (processus d'osmorégulation). Le métabolisme de base des cellules est donc supérieur à  $90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sucrose qu'à  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , ce qui explique les besoins accrus en  $O_2$  des cellules.

Le nombre maximal d'embryons produits est plus important en bioréacteur qu'en flacons lorsque l'osmolarité du milieu de production est élevée ( $1384 \text{ ET} \cdot \text{ml}^{-1}$  et  $405 \text{ ET} \cdot \text{ml}^{-1}$  pour B15 et F15-r respectivement). Au contraire, la production est supérieure en flacons agités lorsque l'osmolarité du milieu de production est plus basse (voir les résultats de B13 et F13-r). Ce résultat indique que la DO la plus favorable à la maturation des embryons globulaires varie selon la pression osmotique du milieu ( $DO_{fav} > 20 \%$  à  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sucrose et  $DO_{fav}$  voisine de  $20 \%$  à  $90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sucrose).

### ***Profil de croissance de la biomasse***

Les graphiques 5.20.B et 5.20.C présentent l'évolution du nombre de cellules, du poids sec, de  $\mu^{cell}$  et de  $\mu^p$  lors de la cuvée B15. A I+12, on dénombre  $26 \times 10^6$  cellules par ml contre  $12 \times 10^6$  cellules par ml lors de B13. Ainsi,  $\mu^{cell-ap} = 0,21 \text{ j}^{-1}$  lors de B15 au lieu de  $0,17 \text{ j}^{-1}$  lors de la cuvée B13. La division cellulaire est donc favorisée en présence du milieu à bas potentiel osmotique.





**Figure 5.21: Graphique récapitulatif de la cuvée B15**

(Méthode par paliers de densité, bioréacteur, inoc. 5 g.l<sup>-1</sup>, 90 g.l<sup>-1</sup> de sucre).

Lors de la cuvée B15, l'accroissement du nombre de cellules n'est pas exponentiel et  $\mu^{cell}$  comporte deux pics, le premier à I+8 (1,09 j<sup>-1</sup>) et le second à I+12 (0,59 j<sup>-1</sup>). Ces pics coïncident respectivement avec la période de conversion des EG en

EC (D1) et avec la conversion des EC en ET (D2).  $\mu^{\text{pe}}$  présente également deux pics, mais ils sont totalement décalés par rapport aux pics de  $\mu^{\text{cell}}$  et coïncident avec les périodes de latence L1 et L2. En conséquence, le poids sec moyen des cellules augmente lors de L1 et L2 et diminue drastiquement lors de D1 et D2. Ainsi, le poids sec moyen des cellules d'embryons torpilles représente la moitié du poids sec moyen des cellules d'embryons globulaires.

De plus, le poids sec final des cellules est 70 % et 25 % inférieur à ceux enregistrés lors de B13 et B9 respectivement. Le poids sec moyen (donc la taille) des cellules est inférieur lorsqu'elles sont en contact avec un milieu de culture à bas potentiel osmotique, ce qui confirme le rôle "anti-élongation" de ce type de milieu.

Ces résultats révèlent que la production de poids sec ralentit au moment où la culture connaît des pics de production de cellules. Le gain de poids sec est donc découplé de la division chez les cellules embryonnaires: elles effectuent tout d'abord un cycle d'élongation pendant lequel le poids sec des cellules augmente (poids d'un million de cellules qui passe de 0,29 mg à 0,78 mg de I+1 à I+6) puis elles entament un cycle de division pendant lequel la taille et le poids sec des cellules diminuent (poids d'un million de cellules qui passe de 0,78 mg à 0,26 mg de I+6 à I+9). Une fois cette période de division achevée, les cellules amorcent une nouvelle phase d'élongation (de I+9 à I+11) puis un dernier cycle de division (de I+11 à I+13) jusqu'à obtenir un embryon torpille.

Cette évolution est identique à celle des cellules indifférenciées des bourgeons et des apex racinaires qui procèdent également à des étapes successives de multiplication et d'élongation (Lafon et col. 1985). De même *in ovulo*, les cellules embryonnaires procèdent d'abord à une série de divisions cellulaires très rapides sans élongation (stade globulaire) puis le rythme des divisions ralentit et les cellules commencent à se différencier et à se vacuoler (stade torpille) (Raghavan et col. 1980).

Notons de plus que les embryons globulaires en limitation de  $O_2$  cessent de se diviser alors que les embryons cordiformes en limitation de  $O_2$  peuvent poursuivre leur développement jusqu'au stade torpille. Il semble donc que la DO limite en deçà de laquelle la division cellulaire est inhibée diminue au fur et à mesure du développement des embryons.

#### 5.2.4.2.1. Métabolisme nutritionnel

Les taux de consommation spécifiques par rapport aux cellules mesurés lors de la cuvée B15 et les rendements de consommation correspondants sont présentés à l'annexe 15. Pendant L1, les cellules consomment des nutriments sans qu'il y ait de divisions et le métabolisme est alors orienté vers l'élongation. Les  $q^c$ , sont alors très faibles (limitation en oxygène) mais augmentent rapidement au début de D1 (de I+6 à I+7).

Le ratio  $q_{NH_4}^c / q_{NO_3}^c$  passe de 3,4 à 0,9 de I+2 à I+7 puis se stabilise à 0,9 pendant tout le reste de la culture. Si l'on confronte ces données avec l'évolution du poids sec moyen des cellules, on constate que le ratio  $q_{NH_4}^c / q_{NO_3}^c$  est supérieur à 1 au moment où les cellules sont en élongation puis qu'il devient inférieur à 1 à peu près au moment où les cellules entrent en phase de division (arrêt de l'élongation). Ces résultats entrent en contradiction avec ceux de toutes les autres cuvées effectuées lors de ces travaux. Lors de B9 par exemple, le ratio  $q_{NH_4}^c / q_{NO_3}^c$  est supérieur à 1 lorsque les cellules se divisent et inférieur à 1 lorsqu'elles sont en élongation.

Il apparaît donc que la consommation des différents ions est modifiée lorsque les cellules sont soumises à une pression osmotique élevée. En 1980, Ravaghavan et son équipe avaient déjà établi que la perméabilité des membranes cellulaires aux différents ions est modifiée à osmolarité élevée. On constate dans le cas de la cuvée B15 que le pH est beaucoup plus basique que lors des autres cuvées (pH supérieur à 7 lors de B15 et inférieur à 5,5 lors de B13 par exemple). Ce résultat

implique que de nombreux ions  $H^+$  ont été absorbés par les cellules lors de leur processus d'adaptation aux conditions plasmolysantes. Cette redistribution des ions  $H^+$  a modifié le fonctionnement des pompes ATPases et donc, par la même occasion, la perméabilité des membranes aux ions  $NH_4^+$  et  $NO_3^-$ .

On constate donc que le ratio  $q_{NH_4}^c / q_{NO_3}^c$  n'indique que partiellement l'état physiologique des cellules en culture. N'oublions pas qu'en période de stress (par exemple à haute pression osmotique) le métabolisme cellulaire doit s'adapter pour assurer la survie des cellules. Dans notre cas cette réponse métabolique au stress est favorable à l'embryogenèse somatique. Bien que les mécanismes impliqués nous soient inconnus, on peut néanmoins soupçonner que l'ABA, aussi appelée "hormone du stress", y joue un des premiers rôles (Grillo et col. 1995, Raven et col. 1992<sup>b</sup>).

Notons pour finir que le passage du ratio  $q_{NH_4}^c / q_{NO_3}^c$  en dessous de 1 (à I+7) coïncide avec le début de la consommation des sucres dans le milieu de culture et le déclenchement de la division des cellules. Il semble donc qu'un blocage métabolique ait été levé après 7 jours de culture.

#### 5.2.4.2.2. Conclusion

Les différentes expériences menées en flacons agités et en bioréacteurs ont démontré l'efficacité d'un traitement des embryons à haute pression osmotique pour éliminer la germination en culture. De plus, l'augmentation de la concentration en sucrose du milieu de culture a amélioré la synchronisation de la production des embryons et permis de multiplier par deux la productivité de la méthode par paliers de densité ( $106 \text{ ET} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  à  $90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sucrose contre  $51 \text{ ET} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  à  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sucrose).

Les embryons produits à haute pression osmotique ( $90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sucrose soit environ 0,3 osmole) possèdent des cellules moins vacuolées et de plus petite taille par rapport à ceux cultivés dans le milieu conventionnel ( $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de sucrose soit environ 0,1

osmole). De ce fait, ils sont morphologiquement très semblables aux embryons rencontrés *in vivo*.

L'excellente synchronisation de la culture a permis de déterminer que la maturation des embryons comporte plusieurs phases d'élongation et de division distinctes. Il est également apparu que le métabolisme nutritionnel et respiratoire des cellules en division et en élongation est très différent.

En conclusion, on obtient à haute pression osmotique une meilleure régulation de l'embryogenèse et de la germination chez la carotte. Rappelons que dans la nature, l'embryon est soumis lors de son développement à des pressions osmotiques élevées, de l'ordre de 0,5 osmole, ce qui correspond à environ 130 g.l<sup>-1</sup> de sucrose (Zrýd 1988, Ryczkowsky 1969, Wang et col. 1987 et Yeung et Brown 1982). En augmentant la concentration en sucrose du milieu de production, il est possible de diminuer l'écart entre les conditions de cultures *in vivo* et *in vitro*, ce qui permet aux embryons cultivés de poursuivre un développement identique à celui des embryons *in vivo* (Finkelstein et Crouch 1985).

#### 5.2.5. CONCLUSION SUR LA GERMINATION EN CULTURE

Les résultats présentés dans cette section ont démontré l'existence d'un lien direct entre le nombre d'embryons torpilles produits et le pourcentage de germination en culture. Ainsi, toute modification du procédé de production qui conduit à un meilleur taux de conversion des EG en ET contribue à éliminer le phénomène de germination en culture.

Ainsi, l'utilisation du procédé par paliers de densité permet de doubler le pourcentage de conversion des EG en ET (15 % et 28 % en MC et MPD respectivement), ce qui s'accompagne d'une diminution par 3 du pourcentage de germination en culture (85 % et 28 % en MC et MPD respectivement). De même avec

la méthode par paliers de densité, l'augmentation de la densité d'inoculation en EG, l'élimination du Fe-EDTA et l'augmentation de la concentration en sucrose dans le milieu de production lors de la phase de maturation des EG permettent de produire plus d'embryons torpilles et donc de limiter la germination en culture en bioréacteur.

Les résultats obtenus en flacons agités en MPD démontrent également que le pourcentage de conversion des EG en ET est supérieur lorsque la DO est supérieure à 20 %, ce qui entraîne des pourcentages de germination avant récolte inférieurs à ceux des cuvées en bioréacteurs. De tous les traitements testés lors de ce projet de recherche pour limiter la germination en culture, l'utilisation d'un milieu de production enrichi en sucrose (90 g.l<sup>-1</sup> au lieu de 30 g.l<sup>-1</sup>) a donné les résultats les plus intéressants puisque le nombre d'embryons torpilles produits en bioréacteur a été multiplié par 4,5 et que le pourcentage de germination a chuté à 0 %.

#### 5.2.6. SUGGESTIONS POUR LES TRAVAUX FUTURS

Les résultats de ces travaux ont permis de dégager un certain nombre de tendances susceptibles d'améliorer la qualité des embryons produits par la méthode des paliers de densité.

Il apparaît, entre autre, que les besoins respiratoires et nutritionnels des MPE et des embryons sont très différents. Par exemple, la formation des EG doit plutôt se faire à 20 % de DO où la division des cellules non embryogènes est inhibée alors que la maturation de ces embryons globulaires est stimulée en présence d'une concentration en oxygène dissous plus élevée.

**Tableau 5.13: Suggestion de conditions d'opérations lors des différentes phases de production en MPD.**

	<i>Phase de production des EG</i>	<i>Phase de maturation des EG en ET</i>
Taux d'inoculation (matière humide)	de 10 à 20 g.l <sup>-1</sup>	de 10 à 100 g.l <sup>-1</sup>
DO	20 %	> 20 %
Fe-EDTA	oui	non
Sucrose	30 g.l <sup>-1</sup>	90 g.l <sup>-1</sup>
Stérilisation du milieu	par filtration	par autoclavage

La présence de Fe-EDTA dans le milieu de production est nécessaire à la formation des embryons globulaires mais inhibe leur développement en embryons torpilles. De même, une augmentation de la concentration en sucrose du milieu de production inhibe la formation des EG mais entraîne un meilleur taux de conversion des EG en ET. Il apparaît également que la stérilisation du milieu par autoclavage stimule la maturation des EG mais inhibe celle des MPE.

Ainsi, si on scinde grossièrement le procédé de production par paliers de densité en deux étapes, soit une phase de production des EG et une phase de maturation de ces EG en embryons torpilles, on peut dégager quelques tendances qui permettraient d'adapter un peu mieux les conditions de cultures aux besoins des différents stades embryonnaires (tableau 5.13).

Bien sur, tous ces paramètres de cultures devraient être optimisés pour les deux phases de production, ce qui pourrait être fait par modélisation.



### **5.3. ENCAPSULATION DES EMBRYONS ET GERMINATION POST-RECOLTE**

#### **5.3.1. CHOIX DE LA MATRICE D'ENCAPSULATION**

A la sortie du bioréacteur, les embryons somatiques sont difficiles à manipuler en raison de leur petite taille et de leur fragilité. Afin de palier à cet inconvénient, les embryons peuvent être enrobés dans une matrice assurant leur protection et éventuellement leur alimentation lors de la germination.

Parmi les nombreux supports à l'encapsulation disponibles, l'alginate de calcium semble particulièrement approprié parce qu'il n'est pas toxique pour l'embryon, que son utilisation et sa préparation sont aisées et non stressantes pour les cellules et que son coût de revient est faible (Bazinet, 1994).

#### **5.3.2. TAUX DE GERMINATION ET DE CONVERSION POST-RÉCOLTE**

Le pourcentage de conversion des embryons somatiques en plante dépend directement de la qualité des embryons, elle-même reliée aux conditions de culture pendant chaque étape du développement embryonnaire (Redenbaugh et col. 1988). Ainsi, les pourcentages de germination et de conversion en plantes des embryons indiquent clairement si le procédé de production utilisé est bien adapté à leurs besoins tout au long de leur développement.

Après leur récolte, des embryons ont été encapsulés stérilement dans des billes d'alginate de calcium selon la méthode décrite à la section 3.7. Les embryons

encapsulés ont ensuite été rincés puis placés soit sur de la gélose (milieu B5 dilué de moitié avec 8 g.l<sup>-1</sup> d'agar) ou en sol reconstitué (Turfass stérile).

#### 5.3.2.1. Germination sur gélose

Le taux maximal de germination sur gélose varie de  $96 \pm 4$  % pour les embryons produits par la méthode classique (lignée SP29, 18 jours après le semis) à 100 % pour les embryons produits par paliers de densité (lignée FP95, 18 jours après le semis). Les pourcentages de germination des embryons nus (non-encapsulés) sur gélose sont de 100 % pour les deux procédés de production, mais ces taux élevés sont probablement dus au phénomène d'embryogenèse secondaire dans le cas des embryons produits par la méthode classique.

Les pourcentages de conversion en plante (apparition des deux premières vraies feuilles) sont de 100 % quelque soit la méthodes de production utilisée. L'encapsulation a cependant permis d'obtenir des plantules de meilleure qualité que celles issues des embryons non encapsulés. Les plants issus d'embryons encapsulés avaient le même aspect général que les plants témoins (issus de graines) alors que les plants issus des embryons nus présentaient un grand nombre de tiges et de racines, probablement dus à la germination d'embryons adventifs (embryogenèse secondaire).

#### 5.3.2.2. Germination en sol reconstitué stérile

Le pourcentage maximal de germination en sol reconstitué (Turfass stérile alimenté en solution nutritive) n'est que de  $13 \pm 7$  % pour les embryons produits par la méthode classique (lignée SP29, 18 jours après le semis) contre  $96 \pm 4$  % pour les embryons produits par paliers de densité (lignée FP95, 34 jours après le semis).

Seulement  $13 \pm 7$  % des plantules issues de la méthode classique ont atteint le stade foliaire 18 jours après le semis contre  $77 \pm 22$  % pour les plantules issues de la

méthode des paliers de densité 34 jours après le semis. Dans ce dernier cas, 100 % de conversion en plantules a été atteint 147 jours (presque 5 mois) après le semis. Quelques uns de ces jeunes plants de carotte ont par ailleurs été transplantés dans du substrat horticole non stérile où ils ont poursuivi leur développement de manière autotrophe.

### 5.3.3. CONCLUSION

L'encapsulation a permis d'obtenir des plantules de meilleure qualité que celles issues des embryons non encapsulés. De plus, les essais en sol reconstitué ont démontré que les embryons produits par paliers de densité sont de meilleure qualité que ceux issus de la méthode classique (taux de conversion en plantules de 13 % et 100 % respectivement). Dans la littérature, les pourcentages maximum de conversion en plantes des embryons encapsulés varient de 50 à 95 % en milieu nutritif aseptique (Kamada et Col. 1989, Li et Deng 1990, Molle et col. 1993) et chutent à 4 % en milieu horticole (Lu et col. 1990). Ces résultats confirment que la méthode de production par paliers de densité permet de produire sans sélection des embryons de qualité égale ou supérieure à ceux obtenus par la méthode classique après triage.

Il demeure nécessaire d'alimenter les embryons en solution nutritive jusqu'à ce qu'ils aient atteint le stade foliaire, ce qui implique le respect de la stérilité des tubes de culture pendant de longues périodes (2 à 3 mois). De plus, les gels d'alginate ne peuvent constituer à eux seuls une bonne matrice d'encapsulation. Ils ont une dureté insuffisante pour procurer une protection efficace contre le stress mécanique (Nouaille et Petiard, 1988). Ils sont également très perméables à l'eau, ce qui conduit à une déshydratation rapide des embryons à basse humidité relative et diminue leur taux de survie (Shigeta et col. 1990). Les travaux de Molle et col. (1993) ont démontré que lorsque du sucrose est introduit au sein de l'hydrogel, il diffuse rapidement dans le milieu environnant devenant alors indisponible pour l'embryon.

Afin de maintenir l'hydratation et le contenu nutritionnel du gel d'alginate, l'embryon encapsulé doit donc être enrobé d'une pellicule imperméable à l'eau. Des pesticides et des substances antibiotiques peuvent de plus être incorporés dans cette couche de protection hydrophobe afin d'assurer une protection sanitaire à l'embryon (Friend, 1993).

## 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lors de ce projet de recherche, un nouveau procédé de production a été mis au point afin de synchroniser le développement d'embryons somatiques (ES) de carotte produits *in vitro*. Ce procédé utilise des paliers de densités cellulaires et embryonnaires afin de bloquer réversiblement leur développement lors de la production. Une fois le blocage levé, les embryons poursuivent alors leur développement de manière synchrone.

La synchronisation de la production des embryons somatiques constitue une avancée importante dans le domaine de l'embryogenèse somatique. Elle permet la production d'embryons de qualité, ce qui constitue la condition *sine qua non* à une éventuelle utilisation commerciale des embryons somatiques. Jusqu'à présent, une seule équipe avait réussi à produire une population synchrone d'embryons, mais le montage compliqué qui avait été employé était incompatible avec une mise à l'échelle industrielle. La méthode de production par paliers de densité (MPD) mise au point ici présente le double avantage d'être simple, efficace et très malléable.

La culture synchrone des embryons permet par ailleurs une diminution significative de la germination en culture, qui peut même être totalement éliminée par un traitement à 90 g.l<sup>-1</sup> de sucrose lors de la dernière étape de la production en MPD. Pour la première fois, on dispose désormais d'une technique simple de conservation des embryons, qui permet de retarder le semis sans pour autant affecter leur taux de germination post-récolte.

Bien que la productivité du procédé par paliers de densité soit déjà largement suffisante pour satisfaire les besoins de l'industrie (un bioréacteur de 2 litres peut produire jusqu'à 4 millions d'embryons somatiques), la qualité des embryons et les

pourcentages de germination en sol sont encore inférieurs à ceux des vraies graines. Les conditions de cultures doivent donc encore être optimisées pour s'ajuster aux besoins des embryons tout au long de leur développement, et ainsi augmenter leur qualité.

Les résultats recueillis au cours de ce travail ont permis de déterminer que le métabolisme nutritionnel et respiratoire des embryons change au cours de leur développement. Les conditions de culture (taux d'inoculation, potentiel osmotique, composition du milieu, concentration en oxygène dissous, etc) doivent donc être différentes lors de chaque étape de la production par paliers de densité. Pour optimiser ces paramètres et augmenter encore la qualité des embryons produits, l'utilisation d'un modèle mathématique semble incontournable pour éviter de longues années de fastidieuses recherches du type "essai-erreur".

La synchronisation des cultures d'embryons est la clef de voûte du gigantesque édifice que constitue l'embryogenèse somatique. Plus qu'un simple outil de production, la méthode de production par paliers de densité constitue un pas décisif vers une meilleure connaissance des processus impliqués lors du développement et de la germination des embryons végétaux. Ainsi, malgré toutes les difficultés qui doivent encore être surmontées, la viabilité des semences artificielles est chaque jour un peu plus proche. Une nouvelle ère agronomique est déjà à notre porte, chargée d'espoirs et de peurs: celle des plantes transgéniques.

### **LISTE DE RÉFÉRENCES**

- Ammirato P.V. et Styer D.J. (1985). Strategies for large scale production of somatic embryos in suspension culture. Dans Biotechnologies in plant science : Relevance to agriculture in the 1980's, ed. : M. Zaitlin, M. Day et A. Hollaender, Academic Press, New York.
- Ammirato, (1987). Organizational events during somatic embryogenesis. Dans Plant Tissue and Cell Culture, 57-81.
- Ammirato, P.V. (1983). The regulation of somatic embryo development in plant cell culture: suspension culture techniques and hormone requirements. Bio/Technology, 1, 138-142.
- Ammirato, P.V. (1986). Carrot. Dans Handbook of plant cell culture, vol. 4, ed.: D.A. Evans, W.R. Sharp et P.V. Ammirato, Macmillan, New York.
- Archambault J., Williams, R.D., Lavoie, L., Pépin, M.-F., et Chavarie, C. (1994). Production of somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 44, 930-943.
- Archambault, J., Lavoie, L., Williams, R.D., et Chavarie, C. (1995). Nutritional aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed in bioreactors. Dans Current issues in plant molecular and cellular biology, ed : M. Terzi, R. Cella et A. Savigna, Kluwer Academic Press, 681-687.
- Attree, S.M., Moore, D., Sawhney, V.K., et L.C. Fowke. (1991). Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca Moench* Voss] somatic embryos: effect of non-plasmolysing water stress and abscisic acid. Annals of Botany, 68, 519-525.

- Aubry, D. (1995). Developpement et commande d'un bioprocédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plantes. Mémoire de maîtrise, Ecole Polytechnique de Montréal, Canada.
- Bajaj, Y.P.S. et Reinert, J. (1977). Cryobiology of plant cells cultures and establishment of gene-banks. Dans Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture, ed. : J. Reinert et Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, 757-789.
- Bazinet C., (1994). Une approche vers les semences synthétiques: contribution à l'amélioration de la qualité de l'embryogenèse somatique chez la carotte (*Daucus carota* L.) et à l'étude des propriétés physico-chimiques du support de l'encapsulation. Thèse de doctorat, UTC, Compiègne, France.
- Benson, E.E. et Withers, L.A. (1988). The application of germplasm storage in biotechnology. Dans Plant Cell Biotechnology, vol. 18, ed. : M.S.S. Paidis, F. Mavituna et J.M. Novais, NATO ASI Series H : Cell biology, Springer-Verlag., 431-443.
- Bewley, J.D. et Black, M. (1982<sup>a</sup>). Dormancy. Dans Physiology and biochemistry of seeds. Vol.2: Viability, Dormancy and environmental control, ed. J.D. Bewley et M. Black, Springer-Verlag., Chap. 2, 60-126.
- Bewley, J.D. et Black, M. (1982<sup>b</sup>). The control of dormancy. Dans Physiology and biochemistry of seeds. Vol.2: Viability, Dormancy and environmental control, ed. J.D. Bewley et M. Black, Springer-Verlag., Chap. 4, 199-264.
- Bewley, J.D. et Black, M.(1982<sup>c</sup>). Environmental control of germination. Dans Physiology and biochemistry of seeds. Vol.2: Viability, Dormancy and environmental control, ed. J.D. Bewley et M. Black, Springer-Verlag., Chap. 6, 276-334.



- Bhowmik, S.R. et Pan, J.C. (1992). Shelf life of green tomatoes stored in controled atmosphere and high humidity. J. of Food Sci. 57, 948-953.
- Biddington, N.L. (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. Plant Growth Regulation, 11, 173-187.
- Black, M. (1972). Control processes in germination and dormancy. Oxford University Press Publishers, 3-15.
- Caligari, P.D.S. et Shohet, S. (1993). Variability of somatic embryos. Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvement, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap. 9, 163-174.
- Carman, J.G. (1989). The in ovulo environment and its relevance to cloning wheat via somatic embryogenesis. In Vitro, 25, 1155-1162.
- Carman, J.G., et Campbell, W.F. (1990). Factors affecting somatic embryogenesis in wheat. Dans Biotechnology in agriculture and forestry, ed. : Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag., volume 13, 68-87.
- Carman, J.G., Jefferson, N.E. et Campbell, W.F. (1988<sup>a</sup>). Induction of embryonic *Triticum aestivum* L. calli; I) Quantification of genotype and culture medium effects. Plant Cell Tis. Org. Cult., 12, 83-95.
- Carman, J.G., Jefferson, N.E. et Campbell, W.F. (1988<sup>b</sup>). Induction of embryonic *Triticum aestivum* L. calli; II) Quantification of organic addenda and other culture variable effects. Plant Cell Tis. Org. Cult., 12, 97-110.
- Cazzulino, D.L., Pedersen, H., Chin, C-K., et D. Styer (1989). Kinetics of somatic embryo development in suspension culture. Biotechnology and Bioengineering, 35, 781-786.

- Chee, R. et Cantliffe, D.J. (1989). Inhibition of somatic embryogenesis in response to 2,4-D in *Ipomoea batatas* L. Lam. cultured *in vitro*. Plant Physiol., **135**, 398-403.
- Clarkson, D.T. (1985). Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **36**, 77-115.
- Collis-George, N. et Melville, M.D. (1974). Models of oxygen diffusion in respiring cells. J. Exp. Bot., **25**, 1053-1069.
- Constabel, F. et Kurz, W.G.W. (1982). Synchronization of division in cell suspension culture. Dans Plant tissue culture methods, 2<sup>nd</sup> édition, ed. : L.R. Wetter et F. Constabel, National Research Council of Canada Publishers, Chap.20, 122-127.
- Creaser-Pence, V. (1991). Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. Plant Cell Reports, **10**, 144-147.
- Darnell, J., Lodish, H. et Baltimore, D. (1988). La cellule, biologie moléculaire, ed. : J.M. Bélanger, Editions Vigot.
- Datta, S.K. et Potrykus, I. (1989). Artificial seeds in barley, encapsulation of microspore derived embryos. Theor. Appl. Genet., **77**, 820-825.
- De Vries, S.C., Booij, H., Vogels, R., loSchaivo, F., Terzi, M., et A. van Kammen (1988). Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone controled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. Genes and Development, **2**, 462-476.
- Demarly, Y. et Sibi, M. (1989). Amélioration des plantes et biotechnologies, ed. : J. Libbey.

- Dougal, D.K., et D. Verma (1980). Growth and anthocyanin production by carrot suspension cultures grown under chemostat conditions with phosphate as the limiting nutrient. In Vitro, 14, 180-182.
- Dougall D.K., Labrake, S. et Whitten, G.H. (1983). The effect of limiting nutrients, dilution rate, culture pH and temperature on the yield constant and anthocyanin accumulation of carrot cells grown in semicontinuous chemostat cultures. Biotechnol. Bioeng. 25, 569-579.
- Dougall, D.K., et Verma, D.C. (1978). Growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures with ammonium ion as sole nitrogen source. In Vitro, 14, 180-182.
- Ducos, J.P., Bollon, H., et Pettard, V. (1993). Production of carrot somatic embryos in a bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology, 39, 465-470.
- Finkelstein, R.R., et M.L. Crouch, (1986). Rapeseed embryos development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. Plant physiol., 81, 907-912.
- Finkelstein, R.R., et M.L. Crouch, (1987). Hormonal and osmotic effects on developmental potential of maturing rapeseed. HortScience, 22, 797-800.
- Friend, D.R. (1993). Hydrophobic coatings for synthetic seeds. Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvement, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap., 4, 47-64.
- Fujii, J.A.A., Slade, D. et Redenbaugh, K. (1993). Planting artificial seeds and somatic embryos. Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvement, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap. 11, 183-202.
- Fujimara, T. et Komamine, A. (1975). Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Sci. Let., 5, 359-364.

- Fujimara, T. et Komamine, A. (1979). Synchronisation of somatic embryogenesis in carrot suspension culture. Plant physiol., 64, 162-168.
- Gamborg, O.L., Miller R.A. et Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension culture of soybeans root cells. Exp. Cell Res., 50, 151-158.
- Gray, D.J. et Compton, M.E. (1993). Grape somatic embryo dormancy and quiescence : potential of dehydrated synthetic seeds for germplasm conservation. Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvment, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap. 20, 367-380.
- Gray, D.J., et A. Purohit (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Critical Review in Plant Science, 10, 33-61.
- Grillo, S., Leone, A., Xu, Y., Tucci, M., Francione, R., Hasegawa, P.M., Monti, L., et Bressan, R.A. (1995). Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild type and ABA-defective mutants of tomato. Physiologia Plantarum, 93, 498-504.
- Guiliano, G., Rossellini, D. et Terzi, M. (1983). A new method for the purification of the different stages of carrot embryoïds. Plant Cell Rep., 2, 216-220.
- Halperin, W. (1967). Population density effects on embryogenesis in carrot cell cultures. Exp. Cell. Research., 48, 170-177.
- Halperin, W. et Wetherell, D.F. (1964). Adventive embryony in tissue cultures of wild carrot, *Daucus carota*. Am. J. of Bot., 51, 274-283.
- Halperin, W., et Wetherell, D.F. (1965). Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. Nature, 205, 519-520.

- Hari V., (1979). Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 96, 227-231.
- Hari, V. (1980). Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis. Z. Pflanzenphysiol., 96, 227-302.
- Hendriks, T., et De Vries, S.C. (1995). The role of secreted proteins in carrot somatic embryogenesis. Dans Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, ed.: M. Terzi et col., Kluwer Academic Publisher, 359-368.
- Heydecker, (1977). Stress and seed germination. Dans The physiology and biochemistry of seed Dormancy and germination, ed. : A.A. Khan, Elsevier.
- Huang, L.-C., Vits, H., Staba, E.J., Cooke, T.J. et Hu, W.-S. (1992). Effect of cultivation age and embryo size on specific oxygen uptake rate in developing somatic embryos of *Daucus carota*. Biotechnology Letters, 14, 701-706.
- Iida, Y., Watabe, H.-I., Kamada, H., et Harada, H. (1992). Effects of abscisic acid on the induction of dessication tolerance in carrot somatic embryos. J. Plant Physiol., 140, 356-360.
- James, W.O. (1953). Plant respiration, Clarendon Press, Oxford.
- Jansen, M.A.K., Booij, H., Schel, J.H.N., et de Vries, S.C. (1990). Calcium increases the yeld of somatic embryogenesis in carrot embryogenic suspension cultures. Plant Cell Reports, 9, 221-223.
- Jay, V., Genestier, S. et Courduroux, J.C. (1994). Bioreactor studies of the effect of pH on carrot (*Daucus carota* L.) embryogenesis. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 36, 205-209.

- Jay, V., Genestier, S. et Courduroux, J.C.(1992). Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) cell cultures. Plant Cell Rep. **11**, 605-608 .
- Jolicoeur, M., Chavarie, C. , Carreau, P.J. et Archambault, J. (1992). Development of a helical-ribbon-impeller bioreactor for high density plant cell suspension culture. Biotechnol. Bioeng. **39**, 511-521.
- Kamada, H., et Harada, H. (1979). Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures II: Effect of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. Z. Pflanzenphysiol. Bd., **91**, 456-63.
- Kamada, H., et Harada, H. (1981). Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carotta* L. Plant & Cell Physio., **22**, 1423-1429.
- Kamada, H., Ishikawa, K., Saga, H., et Harada, H. (1993). Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. Plant Tissue Cult. Let., **10**, 38-44.
- Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T. et Harada, H. (1989). Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. In Vitro Cell Dev. Biol., **25**, 1163-1166.
- Kartha, C.C. (1976). Cell differentiation in tomato explants. Pflanzenphysiol, **77**, 292-301
- Kartha, K.K., Fowke, L.C., Leung, N.L., Caswell, K.L. et Hakman, I. (1988). Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). J. Plant Physiol., **132**, 529-539.
- Kessel, R.H.J. et Carr, A.H. (1972). The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue cultures. J. Expt. Bot., **23**, 996-1007.

- Khan, A.A. (1977). Preconditioning, germination and performance of seeds. Dans The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination, ed. : A.A. Khan, Elsevier Science Publisher, Chap13, 202-293.
- Kitto, S.L. et Janick, J. (1985). Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. J. of Am. Soc. of Hort. Sci. 110, 277-282.
- Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Tsukahara, M., Smith, J., Ito, M., Fukuda, H., Nomura, K., et Fujimura, T. (1992). Mechanism of somatic embryogenesis in cell cultures : Physiology, Biochemistry and molecular biology. In Vitro cell. Devpt. and Biol., 28, 11-14.
- Kong, L. et E.C. Yeung. (1995). Effects of silver nitrate end polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. Physiologia Plantarum, 93 298-304.
- Kreuger, M. et Van Holst, J.G. (1993). Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. Planta, 189, 243-248.
- Kvaalen, H., et von Arnold, S. (1991). Effect of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on differnt stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. Plant Cell. Tissue and Organ, 27, 49-57.
- Kysely, W. et Jacobsen, H.J. (1990). Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apice. Plant Cell Tis. Org. Cult., 20, 7-14.
- Lafon, J.P., Tharaud-Prayer, C. et Levy, G. (1985). Biologie des plantes cultivées, tome 1: organisation et physiologie de la nutrition. Editions Lavoisier.

- Lavoie, L. (1997). Production d'embryons somatiques de carotte (*Daucus carota*) en bioréacteur à rubans hélicoïdaux. Mémoire de maîtrise à l'école polytechnique de Montréal, Canada.
- Le Deunff, I. (1993). Conclusion and future. Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvment, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap. 24, 453-461.
- Lee, M. et Philipps, R.L. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Molec. Biol., 39, 413-437.
- Levin, R, Gata, V., Tal, B., Hirsh, S. et Denola, D. (1988). Automated plant tissue culture for mass propagation. Bio/technology, 6, 1035-1042.
- Li, X.Q. et Deng, M.L. (1990). The preparation process and germination conversion in unsterile soil of carrot artificial seeds. Dans Studies of artificial seeds of plants, ed. : X.Q. Li, Peking University press, 52-61.
- Litz, R.E., Mathews, V.H., Moon, P.A., Pliego-Alfaro, F., Yurgalevitch, C. et Dewald, S.G. (1993). Somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvment, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap. 22, 409-426.
- Lu, X., Zhang, T.H., Deng, M.L. et Li, X.Q. (1990). Absorption and desorbtion of nutrients by activated charcoal in the preparation of carrot artificial seeds. Dans Studies of artificial seeds of plants, ed. : X.Q. Li, Peking University press, 31-44.
- Martin, S.M. et Rose, D. (1976). Growth of plant cells (*Ipomea*) suspension cultures at controled pH levels. Can. J. Bot. 54, 1264-1270.
- Michaux-Ferrière, N. et Schwendiman, J. (1992). Histology of somatic embryogenesis. Dans Reproductive biology and plant breeding, ed, : Y. Dattée, C. Dumas et A. Gallais, Springer-Verlag, 247-259.



- Molle, F., Dupuis, J.M., Ducos, J.P., Anselm, A., Crolus-Savidan, I., Petiard, V. et Freyssinet, G. (1993). Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvement, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap. 15, 257-288.
- Murashige, T. et Nakano, R.T. (1965). Morphogenetic behaviour of tobacco tissue cultures and implication in plant senescence. Ibid., 52, 819-827.
- Murashige, T. et Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol. Plant. , 15, 473-497.
- Nadel, B.L., Altman, A., et Ziv, M. (1989). Regulation of somatic embryogenesis in celery cell culture - 1) Promoting effect of mannitol on somatic embryos development. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 18, 181-189.
- Norstog, K., et Klein, R.M. (1972). Development of cultured barley embryos - II) Precocious germination and dormancy. Can. J. Bot., 50, 1887-1894.
- Nouaille, C., et Petiard, V. (1988). Semences artificielles: Rêves et réalités. Biofutur, Avril, 33-38.
- Nuutila, A.M., Kurten, U., et Kauppinen, V. (1991). Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roth.) callus cultures: a statistical approach. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 24, 73-77.
- Onishi, N., Sakamoto, Y., et Hirosawa, T. (1994). Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. . Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39, 137-145.

- Palmgren, G., Mattsson, O., et Okkels, F.T. (1991). Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines and cell types of *Daucus carota* L. Plant Physiol. **95**, 174-178.
- Papenfuss, J.M. et Carman, J.G. (1987). Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. Crop. Sci., **27**, 588-593.
- Pépin, M.F., Archambault, J., chavarie, c., et Cormier, F. (1995). Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I) Shake flask culture. Biotechnology and Bioengineering, **47**, 131-138.
- Perata, P., et Alpi, A. (1991). Ethanol metabolism in suspension cultures carrot cells. Physiologia Plantarum, **82**, 103-108.
- Peschke, V.M. et Philipps, R.L. (1992). Genetic implication of somaclonal variations in plants. Adv. in Gen. **30**, 41-75.
- Preil, W., Florek, P., Wix, U., et Beck, A.(1988). Toward mass propagation by use of bioreactors. Acta Hort., **226**:99-105.
- Raghavan, V. (1980). Embryo culture. Dans International review of cytology. Supplement 11-B. Perspectives in plant cell and tissue culture, Academic Press, Chap.18, 209-240.
- Raghavan, V. et Srivastava, P.S. (1982). Embryo culture. Dans Experimental embryology of vascular plants, ed. : B.M. Johri, Elsevier, 152-238
- Ranjan, R., et Lewak, S. (1995). Interaction of jasmonic and abscisic acid in the control of lipases and proteases in germinating apple embryos. Physiologia Plantarum, **93**, 421-426.

- Raven, P.H., Evert, R.F. et Eichhorn, S.E. (1992<sup>a</sup>). The movement of substances into and out cells. Dans Biology of plants, 5<sup>ième</sup> édition, Worth Publishers. Chap.4, 62-73.
- Raven, P.H., Evert, R.F. et Eichhorn, S.E. (1992<sup>b</sup>). Regulating growth and development: The plant hormones. Dans Biology of plants, 5<sup>ième</sup> édition, Worth Publishers. Chap.25, 545-572.
- Raven, P.H., Evert, R.F. et Eichhorn, S.E. (1992<sup>c</sup>). Plant nutrition and soils. Dans Biology of plants, 5<sup>ième</sup> édition, Worth Publishers. Chap.27, 593-615.
- Raven, P.H., Evert, R.F. et Eichhorn, S.E. (1992<sup>d</sup>). Early developement of the plant body. Dans Biology of plants, 5<sup>ième</sup> édition, Worth Publishers. Chap.20, 441-453.
- Redenbaugh, K., Fujii, J.A.A. et Slade, D., (1993). Hydrated coatings for synthetic seeds. Dans Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvement, ed. : K. Redenbaugh, C.R.C. Press, chap. 3, 35-46.
- Redenbaugh, K., Paasch, B.D., Nichol, J.W., Kossler, M.E., Viss, P.R., et Walker, K.A. (1986). Somatic seeds : Encapsulation of assexual plant embryos. Bio/Technol. 4, 797-801.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P., et Fujii, J.A. (1987). Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. Hort. Science. 22, 803-808.
- Redenbaugh, K., Viss, P. et Kossier, M. (1988). Artificial seeds: encapsulation of somatic embryos. Dans Forest and crop biotechnology. Progress and Prospect, ed. : F.A. Valentine, Springer-Verlag.
- Reinert, J. (1959). Über die controlle des morphogenese und die induktion von adventivembruonen an gewebkulturen aus karotten. Planta. 53, 318-33.

- Reinert, J. et Black, D. (1968). Control of totipotency in plant cells growing in vitro. Nature, **220**, 1340-1341.
- Reisch, B. (1983). Genetic variability in regenerated plants. Dans Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breeding, vol. 1, ed. : D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato et Y. Yamada, Macmillan Publishing Co., Chap. 25, 748-769.
- Roberts, E.H. et Smith, R.D. (1977). Dormancy and the pentose phosphate pathway. Dans The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination, ed. : A.A. Khan, elsevier, chap. 18, 385-411.
- Rodriguez, D.L., Kitto, S.L. et Lomax, K.M. (1990). Mechanical purification of torpedo stage somatic embryos of *Daucus carota* L. Plant Cell Tissue Org. Cult., **23**, 9-13.
- Roustan, J.P., Latche, A. et Fallot, J. (1989). Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. Plant Cell Rep., **8**, 182-185.
- Ryczkowsky, M. (1969). Changes in osmotic value of the central vacuole and endosperm soap during the growth of the embryo and ovule. Z. Pflanzenphysiol., **61**, 422-439.
- Seneratna, T., McKersie, B., et Bowley, S.R. (1989). Artificial seeds of alfalfa (*Medicago Sativa* L.) induction of dessiccation tolerance in somatic embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol., **26**, 85-60.
- Shigeta, J., Mori, T. et Sato, K. (1993). Storage of encapsulated somatic embryos of carrot. Biotech. Techniq. **7**, 165-168
- Shigeta, J., Mori, T., Toda, K. et Ohtake, H. (1990). Effect of capsule hardness on frequency of encapsulated somatic embryos of carrot. Biotech. Techniq. **4**, 21-24.

- Sirois, J. (1997). Optimisation de la croissance de cellules d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur. Mémoire de maîtrise à l'école polytechnique de Montréal, Canada.
- Smith, D.L. et Krikorian, A.D. (1990). Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryo on hormone free medium: evaluation of the effect of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Cell Rep., **9**, 34-37.
- Smith, D.L., et Krikorian, A.D. (1988). Production of somatic embryos from carrot tissues in hormone-free medium. Plant Science, **58**, 103-110.
- Smith, S.M. et Street, H.E. (1974). The decline of embryogenic potential as callus and suspension culture of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann. Bot., **38**, 223-241.
- Stewart, F.C., Mapes, M.O. et Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. Am. J. Bot., **45**, 693-713.
- Stuart, D.A., Strickland, S.G. et Walker, K.A. (1987). Bioreactor production of Alfalfa somatic embryos. Hortscience, **22**, 800-809.
- Suhaila, M. et Saleh, A.B. (1982). Physical properties of polyethyleneimine alginate gels. Biotechnol. Lett. **4**, 611-614.
- Sussex, I.M. et Frei, K.A. (1968). Embryoid development in long term tissue cultures of carrot. Phytomorphology. **18**, 339-349.
- Tate, J.L., et Payne, G.F. (1991). Plant cells growth under different levels of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Plant Cell Reports, **10**, 22-25.
- Tay, L.F., Khoh, L.K., et Khor, E. (1993). Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. Biotechnol. Bioeng. **42**, 449-454.

- Tazawa, M., et Reinert, J. (1969). Extracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. Protoplasma, **68**, 157-173.
- Teng, W.-L., Liu, Y.-J., Tsai, Y.-C., et Soong, T.-S. (1994). Somatic embryogenesis of carrot in bioreactor culture systems. HortScience, **29**, 1349-1352.
- Terashima, T. et Nishimura, S. (1991). Mass propagation of somatic embryos in carrot (*daucus carota*) using bioreactor - Effect of stirring methods and dissolved oxygen concentration on the embryogenesis. Jpn. J. Breed., **41**, 234-244.
- Tessereau, H., Lecouteux, C., Florin, B., Schlienger, C. et Petiard, V. (1990). Use of a simplified freezing process and deshydration for the storage of embryogenic cell lines and somatic embryos in seeds. Dans Genesis of natural and artificial forms, ed. : Biopôle végétal d'Amiens, 123-133.
- Thomas, E. et Street, H.E. (1970). Organogenesis in cell suspension culture of *Atropa belladonna* L. Ibid., **36**, 123-145.
- Thorpe, T.A. (1988). In vitro somatic embryogenesis. Animal and Plant Science, 81-88.
- Tisserat, B. et Murashige, T. (1977). Effects of ethephon, ethylene and 2,4-D on asexual embryogenesis *in vitro*. Plant Physiol., **60**, 437-439.
- Torrey, J.G. (1958). Differential mitotic response of diploid and polyploid nuclei to auxin and kinetin treatment. Science, **128**, 1148-1151.
- Van Engelen, F.A. et De Vries, S.C. (1992). Extracellular proteins in plant embryogenesis. Trend in Genet., **8**, 66-71.
- Vasil, V., Redway, F. et Vasil, I.K. et col. (1990). Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). Bio/Tecnhnol., **8**, 429-434.

- Verma, D.C. et Dougall, D.K. (1977). Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. Plant Physiol., **59**, 81-85.
- Vits, H., Hu, W.S., Staba, E.J. et Cooke, T.J. (1992). Formulation of a morphogenetic model for embryo development in dicotyledonous plants. J. Theoretical Biol., **157**, 221-241.
- Von Arnold, S. et Hakman, I. (1988). Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). J. Plant Physiol., **132**, 164-172.
- Von Arnold, S., Egertsdotter, U., Mo, L.H. (1995). Importance of extracellular proteins for somatic embryogenesis in *Picea abies*. Dans Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, eds., M. Terzi et col., Kluwer Academic Publisher, 389-392.
- Walton, D.C. (1977). Absciscic acid and seed germination. Dans The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination, ed. : A.A. Khan, Elsevier Science Publisher. Chap7, 145-156
- Wang, T.L., Smith, C.M., Cook, S.K. (1987). An analysis of seed development in *Pisum sativum* III. The relationship between the r-locus, the water content and the osmotic potential of seed tissues *in vivo* and *in vitro*. Ann. Bot., **59**, 72-80.
- Warren, C.S. et Fowler, M.W. (1977). A physical method for separation of various stages in the embryogenesis of carrot cell cultures. Plant Sci. lett., **9**, 71-75.
- Warren, C.S. et Fowler, M.W. (1981). Physiological interactions during the initial stages of embryogenesis in culture of *Daucus carota* L. New phytologia., **87**, 481-486.
- Wetherell, D.F. (1984). Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. Plant Cell Tis. and Org. Cult., **3**, 221-227.

- Wetherell, D.F. et Dougall, D.K. (1976). Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissues. Physiol. Plant., 37, 97-103.
- Yatazawa, M., et Furuhashi, K. (1982). Respiration and fermentation of different callus tissues cultured under anaerobic conditions. Plant Tissue Culture, 261-262.
- Yeung, E.C. et Brown, D.C.W. (1982). The osmotic environment of developing embryos of *Phaseolus vulgaris*. Z. Pflanzenphysiol., 106, 149-156.
- Zrýd, J.P. (1988). Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. fondements théoriques et utilisations pratiques, Presses polytechniques romandes, 119-134.



## **ANNEXE 1: GÉNÉRALITÉS SUR LES PHYTOHORMONES**

---

### **Les auxines**

L'acide indole-3-acétique (IAA) est la seule auxine naturelle connue. Cette molécule proche de la sérotonine est produite principalement dans les bourgeons foliaires, les jeunes feuilles, les graines en développement et plus généralement les cellules méristématiques en division. L'acide indole-3-acétique supportant mal l'autoclavage, il a été remplacé dans les milieux de culture par l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D), une auxine de synthèse aussi utilisée comme herbicide.

Les auxines sont transportées unidirectionnellement (de la cime vers les racines) de cellule en cellule par transport actif à travers la membrane plasmique. Elles agissent sur la division et la différenciation des cellules. A haute concentration (près de la source de synthèse) l'IAA stimule la division cellulaire alors qu'à basse concentration (loin de la source de synthèse) il l'inhibe. Aux concentrations intermédiaires, il stimule l'élongation et la différenciation des cellules.

Dès la fécondation, les jeunes embryons zygotiques produisent de l'IAA. Chez la fraise, c'est cette libération d'auxine qui permet le développement du fruit et des tissus périphériques.

### **Les gibberellines**

Près de 80 gibberellines, dont l'acide gibberellique ( $GA_3$ ), ont été identifiées jusqu'à présent. Ces phytohormones sont produites dans les jeunes tissus des tiges et les graines en train de germer. Elles stimulent l'allongement des tiges et des racines en provoquant à la fois la division et l'élongation des cellules qui se gorgent d'eau. Dans la graine, elles permettent à la première racine de percer l'enveloppe et participent également à la mobilisation des réserves insolubles de la graine pour permettre la germination.

### **L'acide abscissique**

L'acide abscissique (ABA) est synthétisé dans les feuilles matures et dans les graines en développement. Il intervient dans toutes les réponses de la plante au stress, notamment au stress hydrique. L'acide abscissique inhibe la division et l'élongation cellulaire et joue un rôle dans le contrôle de la transpiration de la plante (ouverture et fermeture des stomates). Il participe également à la régulation du taux de synthèse des protéines et de l'éthylène.

Dans la graine, les tissus accessoires et l'embryon synthétisent de l'ABA qui jouerait un rôle dans la régulation de l'embryogenèse, le stockage des réserves, la résistance à la dessiccation et inhiberait la germination précoce.

### **L'éthylène**

L'éthylène ( $C_2H_4$ ) est une phytohormone gazeuse produite dans presque tous les tissus en réponse à un stress, et particulièrement au moment de la chute des feuilles et du mûrissement des fruits.

## ANNEXE 2: COMPOSITION DÉTAILLÉE DES MILIEUX DE CULTURE

	MS <sup>a</sup>		MI <sup>b</sup>		MP		MP1		MP2	
<i>Macronutriments</i>	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,6	-	-	1040	13,0	1200	15,0	-	-
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8	2500	25,0	1200	12,0	1010	10,0	2500	25,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	3,0	150	1,0	150	1,0	150	1,0	150	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	1,5	250	1,0	250	1,0	250	1,0	250	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	134	1,0	134	1,0	134	1,0	1005	7,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-	150	1,0	150	1,0	150	1,0	150	1,0
<i>Micronutriments</i>	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM
KI	0,830	5,0	0,750	4,5	0,750	4,5	0,750	4,5	0,750	4,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	100,0	3,000	50,0	3,000	50,0	3,000	50,0	3,000	50,0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-	10,00	60,0	10,00	60,0	10,00	60,0	10,00	60,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600	30,0	2,000	7,0	2,000	7,0	2,000	7,0	2,000	7,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250	1,0	0,250	1,0	0,250	1,0	0,250	1,0	0,250	1,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1	0,025	0,1	0,025	0,1	0,025	0,1	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1	0,025	0,1	0,025	0,1	0,025	0,1	0,025	0,1
Fe-EDTA	43,00	100,0	43,00	100,0	43,00	100,0	43,00	100,0	43,00	100,0

## ANNEXE 2: SUITE

	<b>MS<sup>a</sup></b>		<b>MI<sup>b</sup></b>		<b>MP</b>		<b>MP1</b>		<b>MP2</b>	
<i>Vitamines</i>	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM	mg.l <sup>-1</sup>	mM
Inositol	100,0	<b>ND</b>	100,0	<b>ND</b>	100,0	<b>ND</b>	100,0	<b>ND</b>	100,0	<b>ND</b>
Acide nicotinique	0,5	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>
Pyridoxine-HCl	0,5	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>	1,0	<b>ND</b>
Thiamine-HCl	0,1	<b>ND</b>	10,0	<b>ND</b>	10,0	<b>ND</b>	10,0	<b>ND</b>	10,0	<b>ND</b>

a: (Murashige et skoog 1962)

b: La composition du milieu B5 est identique à celle du milieu MI avec 20 g.l<sup>-1</sup> de sucrose au lieu de 30 g.l<sup>-1</sup> (Gamborg, Miller et Ojima 1968)

## ANNEXE 2: SUITE

	MS <sup>a</sup>		MI <sup>b</sup>		MP		MP1		MP2	
<i>Sucrose</i>	g.l <sup>-1</sup>	mM	g.l <sup>-1</sup>	mM	g.l <sup>-1</sup>	mM	g.l <sup>-1</sup>	mM	g.l <sup>-1</sup>	mM
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	30,0	10,7	30,0	10,7	30,0	10,7	30,0	10,7	30,0	10,7
<i>Hormones</i>	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM	mg.l <sup>-1</sup>	μM
2,4-D	-	-	0,2	0,9	-	-	-	-	-	-
Kinétine	0,04-10	ND	0,1	ND	-	-	-	-	-	-
IAA	1-30	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pH</i>	5,7		5,5		5,5		5,5		5,5	

a: (Murashige et skoog 1962)

b: La composition du milieu B5 est identique à celle du milieu MI avec 20 g.l<sup>-1</sup> de sucrose au lieu de 30 g.l<sup>-1</sup> (Gamborg, Miller et Ojima 1968)

**ANNEXE 3: RÉSULTATS OBTENUS EN MODE DE PRODUCTION CLASSIQUE**

Réacteur <sup>a</sup>	Flacons agités <sup>b</sup>	Date	Milieu <sup>c</sup>	Lignée cellulaire	Taux Inoc (g/l) <sup>d</sup>	Temps avant germ. <sup>e</sup> (i)	Poids sec (g.l <sup>-1</sup> )	Nb Emb <sup>f</sup> (emb.ml <sup>-1</sup> )	Taux max. de germ. <sup>g</sup>
B2	F2-r	1/6/95	MP1 (f)	SP29-I-4	12,5 g/l	36	0,4 à 5,6	97	> 80 % (53 j)
	F2-t		MP1 (f)	idem	idem	43	0,3 à 11,1	42	100 % (53 j)
			MissH (a)	idem	idem	43	0,4 à 11,5	6	100 % (53 j)
B3	F3-r	1/8/95	MP2 (f)	SP29-II-8	10,0 g/l	32	0,5 à 4,1	57	> 80 % (35 j)
	F3-t		MP2 (f)	idem	idem	13	0,3 à 4,9	38	100 % (18 j)
			MissH (a)	idem	idem	13	0,7 à 4,7	15	100 % (18 j)
B4	F4-r	29/9/95	MP2 (f)	SP29-II-13	10,0 g/l	27	0,7 à 3,2	32	20 % (33 j)
	F4-t		sans Fe	idem	idem	contaminés	-	-	-
			MissH (a)	idem	idem		0,6 à 2,8	14	80 % (17 j)
B5	F5-r	28/11/95	MP (f)	SP29-III-5	5 % en vol	20	0,9 à 7,0	59	> 80 % (23 j)
	F5-t		MP (f)	idem	idem	16	1,1 à 12,9	40	100 % (20 j)
			MP (a)	idem	idem	16	1,1 à 12,9	28	100 % (20 j)
B6	F6-r	10/1/96	MP (f)	SP29-III-7	10,0 g/l	47	0,4 à 7,0	48	> 80 % (53 j)
	F6-t		MP (f)	idem	idem	13	0,4 à 6,7	38	100 % (18 j)
			MP (a)	idem	idem	13	0,6 à 9,9	65	100 % (18 j)
B8	F8-r	24/1/96	MP (f)	SP29-III-9	10,0 g/l	21	0,7 à 4,5	60	> 80 % (35 j)
	F8-t		MP (f)	idem	idem	16	0,7 à 7,8	31	100 % (18 j)
			MP (a)	idem	idem	16	0,7 à 7,0	15	100 % (18 j)

Légende à la page suivante

**ANNEXE 3: SUITE**

Réacteur <sup>a</sup>	Flacons agités <sup>b</sup>	Date	Milieu <sup>c</sup>	Lignée cellulaire	Taux Inoc (g/l) <sup>d</sup>	avant germ. <sup>e</sup> (l)	Poids sec (g.l <sup>-1</sup> )	Nb Emb <sup>f</sup> (emb.ml <sup>-1</sup> )	Taux max. de germ. <sup>g</sup>
B14	F14-r F14-t	19/11/96	MP (f)	FP-95-I-23	10,0 g/l	14	0,6 à 1,1	-	-
			MP (f)	idem	idem	14	0,6 à 3,9	-	-
			MP (a)	idem	idem	14	0,6 à 5,3	-	-
B16		6/12/96	MP (f)	FP-95-I-25	10,0 g/l	5	0,7 à 1,9	-	-

a: Volume utile de 1,8 litre, sauf B3 (5 litres)

b: Moyenne de deux flacons agités de 500 ml

c: La composition détaillée des milieux est présentée en annexe 2. Mlssl désigne le milieu M1 sans hormones. La mention (f) indique un milieu stérilisé par filtration, la mention (a) indique un milieu stérilisé par autoclavage.

d: g de matière humide par litre de milieu.

e: Temps du prélèvement précédant l'apparition des premiers embryons germés dans le milieu.

f: Nombre maximal d'embryons torpilles apparemment normaux par ml.

g: Le temps du dernier prélèvement est indiqué entre parenthèses.

Réacteur <sup>a</sup>	Flacons <sup>b</sup>	Date	Milieu <sup>c</sup>	Lignée	Taux Inoc. (g/l) <sup>d</sup>	Temps av. germ <sup>e</sup> (j)	Poids sec (g/l)	Emb.max. <sup>f</sup> (nb ET/ ml)	% germ. final <sup>g</sup>	% conv max. <sup>h</sup>
B9	F9-r F9-t	26/3/96	MP (f)	FP95-I-6	10,0 g/l	13	0,4 à 8,3	1032	28 % (23 j)	28 %
			MP (f)	idem	idem	9	0,8 à 7,5	1938	4 % (23 j)	48 %
			MP (a)	idem	idem	6	0,8 à 9,4	2466	4 % (23 j)	62 %
B10	F10-r F10-t	26/3/96	MP (f) sans Fe-EDTA	FP95-I-6	10,0 g/l	16	0,6 à 10,4	2872	3 % (23 j)	72 %
			idem	idem	idem	13	0,7 à 9,7	3374	2 % (23 j)	84 %
			MP (a)	idem	idem	13	0,7 à 12,2	3596	3 % (23 j)	89 %
B11	F11-r F11-t	24/4/96	MP (f)	FP95-I-8	5,0 g/l	4	0,6 à 5,0	824	13 % (8 j)	46 %
			MP (f)	idem	idem	4	0,6 à 3,3	256	7 % (8 j)	14 %
			MP (a)	idem	idem	5	0,7 à 5,7	442	17 % (8 j)	26 %
B12	F12-r F12-t	30/9/96	MP (f)	FP95-I-19	10,0 g/l	-	0,8 à 4,8	918	0 %	31 %
			MP (f)	idem	idem	3	0,7 à 7,2	639	42 % (16 j)	26 %
			MP (a)	idem	idem	8	1,0 à 12,5	835	48 % (16 j)	28 %

Légende à la page suivante



Réacteur <sup>a</sup>	Flacons <sup>b</sup>	Date	Milieu <sup>c</sup>	Lignée	Taux Inoc. (g/l) <sup>d</sup>	Tps av. germ <sup>e</sup> (j)	Poids sec (g/l)	Emb.max. <sup>f</sup> (nb ET/ ml)	% germ. final <sup>g</sup>	% conv max. <sup>h</sup>
B13	F13-r F13-t	30/9/96	MP0 (f)	FP95-I-19	5,0 g/l	6	0,2 à 2,3	306	56 % (12 j)	23 %
			MP0 (f)	idem	idem	4	0,6 à 2,1	352	53 % (12 j)	23 %
			MP0 (a)	idem	idem	5	0,7 à 4,5	224	75 % (12 j)	14 %
B15	F15-r F15-t	27/10/96	MP0 (f) + 90 g/l de sucrose	FP95-I-22	5,0 g/l	-	0,7 à 5,2	1384	0 %	92 %
			idem	idem	idem	-	1,3 à 3,7	405	0 %	27 %
			idem (A)	idem	idem	-	0,8 à 4,4	860	0 %	57 %

a: Volume utile initial de 1,8 litre.

b: Moyenne de deux flacons agités de 500 ml, volume utile initial de 0,25 litre.

c: La composition détaillée des milieux est présentée en annexe 2. M1ss11 désigne le milieu M1 sans hormones. La mention (f) indique un milieu stérilisé par filtration, la mention (a) indique un milieu stérilisé par autoclavage.

d: g de matière humide par litre de milieu.

e: Temps du prélèvement précédant l'apparition des premiers embryons germés dans le milieu.

f: Nombre maximal d'embryons torpilles apparemment normaux par ml.

g: Taux maximal de germination en culture. Le temps du dernier prélèvement est indiqué entre parenthèses.

**ANNEXE 5: ESTIMATION DU NOMBRE D'EMBRYONS AU STADE GLOBULAIRE ET  
COEUR, EXEMPLE DE LA CUVÉE B8**

---

**Données disponibles**

*A chaque échantillonnage:*

La concentration en embryons torpilles (T), la concentration en embryons germés (P)

*En fin de cuvée (dernier échantillonnage):*

La concentration en embryons globulaires ( $G_f = 220 \text{ emb.ml}^{-1}$ ), en embryons coeurs ( $C_f = 90 \text{ emb.ml}^{-1}$ ), en embryons torpilles ( $T_f = 12 \text{ emb.ml}^{-1}$ ), en embryons torpilles anormaux ( $A_f = 6 \text{ emb.ml}^{-1}$ ) et en embryons germés ( $P_f = 72 \text{ emb.ml}^{-1}$ )

*En cours de cuvée*

Les premiers embryons globulaires sont apparus à I+4, les premiers embryons coeurs sont apparus à I+11, la concentration en embryons torpilles ( $T + P + A$ ) est stable de I+21 à I+35.

*De plus*

L'apparition des embryons torpilles dans le milieu de culture suit une évolution exponentielle ( $r^2 = 0,98$ ), comme c'est le cas dans 80 % des cultures.

On se propose d'estimer la concentration en embryons globulaires et coeur lors des échantillonnages. Pour se faire, on fait les hypothèses suivantes:

**H1) Puisque l'apparition des embryons torpilles dans le milieu de culture suit une évolution exponentielle, l'apparition des embryons globulaires et coeurs suit également une évolution exponentielle.**

**H2) Lorsque la concentration en embryons torpilles est stable, les concentrations en embryons globulaires et coeurs sont stables** ce qui signifie que lorsque le développement des embryons coeur est stoppé, le développement des embryons globulaires l'est également.

Dans le cas de B8, la concentration maximale d'embryons qui ont atteint le stade globulaire est de  $400 \text{ emb.ml}^{-1}$  ( soit  $G_f + C_f + T_f + P_f + A_f$ ) ce qui signifie que l'on passe de  $0 \text{ emb.ml}^{-1}$  à  $400 \text{ emb.ml}^{-1}$  entre I+0 et I+21. La concentration des embryons au stade globulaire et plus peut donc être estimée selon l'équation  $G_+ = G + C + T + A + P = 1,36 * 1,31^t$  où t représente le temps de fonctionnement en jours.

De même, la concentration maximale d'embryons qui ont atteint le stade coeur est de  $180 \text{ emb.ml}^{-1}$  ( $C_f + T_f + P_f + A_f$ ) ce qui signifie que l'on passe de  $0 \text{ emb.ml}^{-1}$  à  $180 \text{ emb.ml}^{-1}$  entre I+8 et I+21. La concentration des embryons au stade coeur et plus peut donc être estimée selon l'équation  $C_+ = C + T + A + P = 1,36 * 1,31^t$  où t représente le temps de fonctionnement en jours.

Finalement, la concentration en embryons globulaires et coeur est obtenue grâce aux équations suivantes:

$$G = G_+ - C_+$$

$$C = C_+ - T - A - P$$

On obtient alors le tableau de données suivant (les données estimées sont en italique):

Tps j	G emb.ml <sup>-1</sup>	C emb.ml <sup>-1</sup>	T emb.ml <sup>-1</sup>	A emb.ml <sup>-1</sup>	P emb.ml <sup>-1</sup>
0	0	0	0	0	0
4	<i>4</i>	0	0	0	0
8	<i>12</i>	0	0	0	0
11	<i>21</i>	<i>4</i>	1	1	0
14	<i>45</i>	<i>10</i>	4	2	0
18	<i>113</i>	<i>6</i>	19	19	0
21	<i>212</i>	<i>94</i>	60	30	0
25	<i>220</i>	<i>90</i>	34	17	40
28	<i>220</i>	<i>90</i>	22	11	57
32	<i>220</i>	<i>90</i>	17	9	65
35	220	90	12	6	72

Les profils d'apparition sont en accords avec ceux obtenus par comptage par Ducos et col. (1993), Fuji et col. (1990) et Hari (1979).

**ANNEXE 6: ESTIMATION DU NOMBRE D'EMBRYONS AU STADE GLOBULAIRE ET  
COEUR, EXEMPLE DE LA CUVÉE B9.**

---

**Données disponibles:**

*A chaque échantillonnage:*

La concentration en embryons torpilles (T), la concentration en embryons germés (P)

*En début de cuvée (inoculation):*

La concentration en embryons globulaires ( $G_i$ )

*En fin de cuvée (dernier échantillonnage):*

La concentration en embryons globulaires ( $G_f$ ), en embryons coeurs ( $C_f$ ), en embryons torpilles ( $T_f$ ) et en embryons germés ( $P_f$ )

*En cours de cuvée*

Les premiers embryons coeurs sont apparus à I+3, la concentration en embryons torpilles (T + P) est stable de I+16 à i+23.

*De plus*

L'apparition des embryons torpilles dans le milieu de culture suit une évolution exponentielle ( $r^2 = 0,98$ ), comme c'est le cas dans 80 % des cultures.

On se propose d'estimer la concentration en embryons globulaires et coeur lors des échantillonnages. Pour se faire, on fait l'hypothèse suivante:

***H) L'apparition des embryons coeurs dans le milieu de culture suit une évolution exponentielle, ce qui revient à dire que la disparition des embryons globulaires suit également une évolution exponentielle.***

Dans le cas de B9, la concentration en embryons globulaires dans le milieu passe de 4000 emb.ml<sup>-1</sup> à 2100 emb.ml<sup>-1</sup> de I+1 à I+13. Si on applique une évolution exponentielle entre ces deux points on obtient l'équation suivante:  $G = 4153,3 \cdot 0,95^t$  où t représente le temps d'opération en jours.

La concentration en embryons coeurs est obtenue grâce à l'équation suivante:  $C = 4000 - G - T - P$ . On obtient alors le tableau de données suivant (les données estimées sont en italique):

Tps j	G emb.ml <sup>-1</sup>	C emb.ml <sup>-1</sup>	T emb.ml <sup>-1</sup>	P emb.ml <sup>-1</sup>
0	4000	0	0	0
1	4000	0	0	0
3	<i>3654</i>	<i>338</i>	8	0
6	<i>3187</i>	<i>749</i>	64	0
9	<i>2780</i>	<i>1040</i>	180	0
13	<i>2317</i>	<i>618</i>	1032	33
16	<i>2100</i>	<i>400</i>	1143	357
20	<i>2100</i>	<i>400</i>	1125	375
23	2100	400	1075	425

## ANNEXE 7: RESULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B8

tps t	Glob. nb emb/ml	Coeur nb emb/ml	Torp. nb emb/ml	Torp-an nb emb/ml	Germ. nb emb/ml	% germ	% conv
0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	0	0	0	0	0	0
8	12	0	0	0	0	0	0%
11	21	3	1	1	0	0	0%
14	45	9	4	2	0	0	7%
18	113	34	19	9	0	0	11%
21	212	92	60	30	0	0	15%
25	220	90	34	17	40	54	8%
28	220	90	22	11	57	72	6%
32	220	90	17	8	65	79	4%
35	220	90	12	6	72	86	3%

tps t	cell - E (nb cell / ml) * 10e-6	cell - NE (nb cell / ml) * 10e-6	tot - Cellules (nb cell / ml) * 10e-6	masse mg P <sub>N</sub> / 100 cell	µc r-1
0	0,4	0,8	1,2	0,63	
4	0,4	0,8	1,2	0,79	0,00
8	0,5	0,8	1,3	0,90	0,01
11	0,6	0,9	1,5	1,08	0,04
14	0,9	1,4	2,3	1,01	0,14
18	2,1	2,5	4,7	0,75	0,18
21	5,1	4,0	9,1	0,49	0,22
25	5,3	5,3	10,5	0,54	0,04
28	5,3	5,8	11,1	0,59	0,02
32	5,4	5,8	11,1	0,59	0,00
35	5,4	5,8	11,2	0,60	0,00

tps t	q NO3 µmole / J * 106 cell	Yc/NO3 nb cell / µmole	q NH4 µmole / J * 106 cell	Yc/NH4 nb cell / µmole	q PO4 µmole / J * 106 cell	Yc/PO4 nb cell / mmole
8	147	94	29	478	4	4
11	371	110	73	559	9	5
14	391	298	77	1515	9	12
18	125	1027	48	2645	6	21
21	169	959	25	6508	18	9
25	136	255	15	2314	2	17
28	157	108	108	156	2	9
32	31	40	15	85	0	15
35	76	18	36	38	0	6

tps t	q O2 µmole / J * 106 cell	Yc/O2 nb cell / µmole	q CO2 µmole / J * 106 cell	RQ
8	3262	4	2521	0,8
11	2701	15	1562	0,6
14	1768	66	1990	1,1
18	866	148	1144	1,3
21	468	346	1109	2,4
25	408	85	1847	4,5
28	374	45	2024	5,4
32	386	3	2227	5,8
35	352	4	2124	6,0

## ANNEXE 8: RESULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE F8-R

tps	Glob. nb emb/ml	Coeur nb emb/ml	Torp. nb emb/ml	Torp-an nb emb/ml	Germ. nb emb/ml
0	10	0	0	0	0
4	21	3	1	1	0
8	48	11	4	3	0
11	88	37	6	4	0
14	150	67	31	22	0
18	150	67	10	7	36
21	150	67	0	0	53
25	150	67	0	0	53

tps	% germ	% conv	cell - E (nb cell / ml) * 10e-6	cell - NE (nb cell / ml) * 10e-6	tot - Cellules (nb cell / ml) * 10e-6
0	0	0%	0,5	0,8	1,3
4	0	4%	0,6	1,1	1,6
8	0	6%	0,9	1,6	2,6
11	0	4%	1,4	2,5	3,9
14	1	11%	3,3	3,9	7,3
18	78	4%	3,5	6,1	9,6
21	100	0%	3,6	8,2	11,8
25	100	0%	3,6	10,0	13,6

tps	masse mg PS / 10e6 cell	µc j-1	q NO3 µmole / J * 106 cell	Yc/NO3 nb cell / µmole
0	0,56			
4	0,70	0,07	94	629
8	0,91	0,11	165	552
11	1,04	0,13	206	537
14	0,95	0,21	187	837
18	1,31	0,07	429	141
21	1,44	0,07	67	922
25	1,54	0,04	40	847

tps	q NH4 µmole / J * 106 cell	Yc/NH4 nb cell / µmole	q PO4 µmole / J * 106 cell	Yc/PO4 nb cell / mmole
4	6	10021	1,4	42
8	10	8800	1,6	56
11	13	8565	18,8	6
14	12	13338	15,9	10
18	108	559	3,2	19
21	43	1454	-2,0	-31
25	25	1335	-6,1	-5



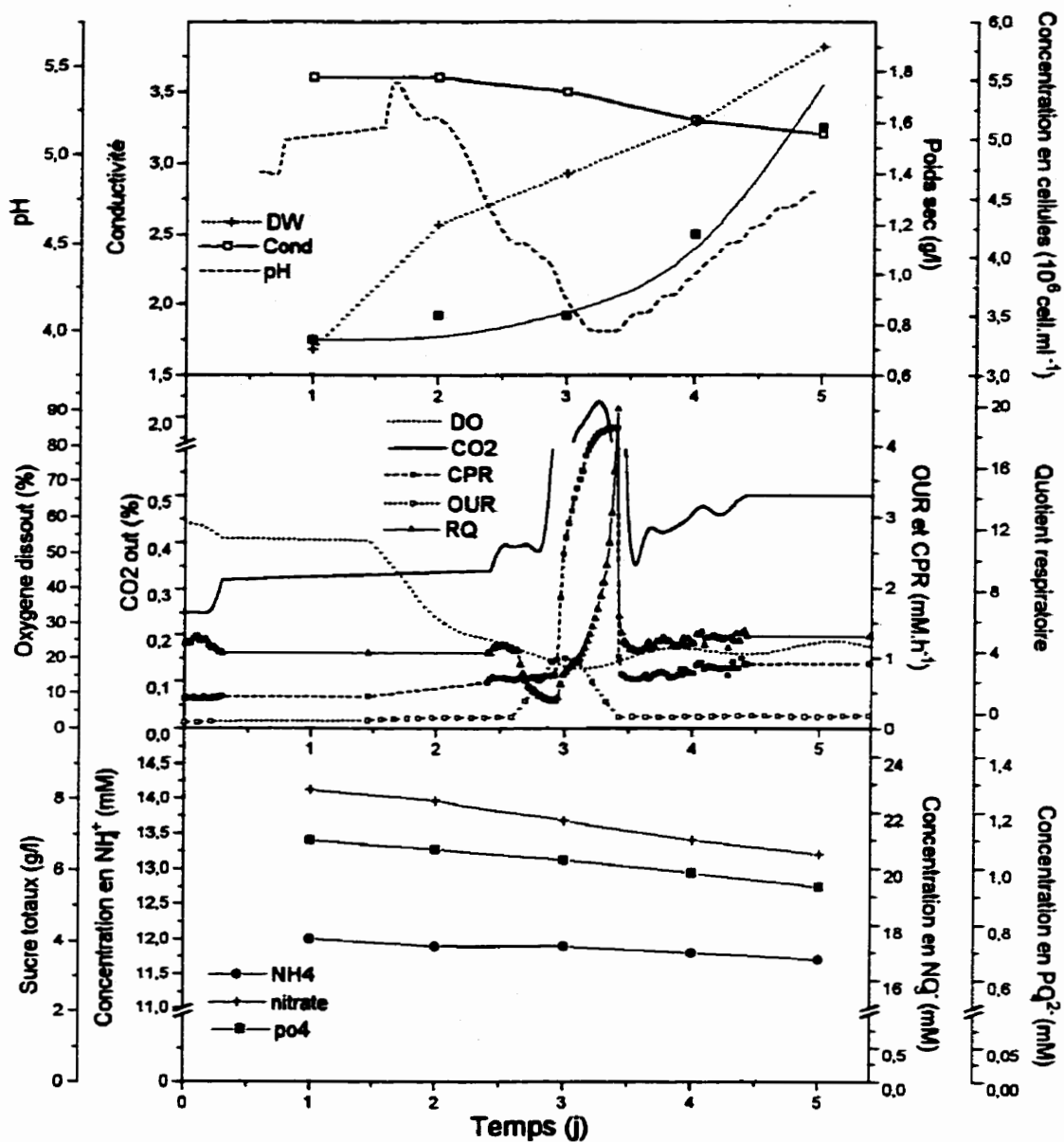
## ANNEXE 9: RESULTATS DÉTAILLÉS DE LA CUVÉE B16

tps	cell - E	cell - NE	tot - Cellules (nb cell / ml) $\times 10^6$	masse mg PS / $10^6$ cell	$\mu$ c j-1
1	2,70	0,60	3,30	0,21	
2	2,73	0,60	3,33	0,35	0,008
3	2,92	0,61	3,53	0,39	0,059
4	3,47	0,63	4,09	0,39	0,147
5	4,82	0,64	5,47	0,34	0,290

tps	q / NO3 $\mu$ mole / J $\times 10^6$ cell	Yc/NO3 nb cell / $\mu$ mole	q / NH4 $\mu$ mole / J $\times 10^6$ cell	Yc/NH4 nb cell / $\mu$ mole
1				
2	134,32	62	15,43	540
3	176,46	327	23,20	2487
4	178,72	766	23,50	5829
5	91,62	2744	20,64	12181

tps	q / PO4 $\mu$ mole / J $\times 10^6$ cell	Yc/PO4 nb cell / mmole	q / O2 $\mu$ mole / J $\times 10^6$ cell	Yc/O2 nb cell / $\mu$ mole
1				
2	9,553	1	11251	1
3	10,62	5	11213	5
4	10,75	13	10147	13
5	9,44	27	8122	31

# **ANNEXE 10: GRAPHIQUE RÉCAPITULATIF DE LA CUVÉE B16**



## ANNEXE 11: RESULTATS DETAILLES DE LA CUVÉE B9

tps j	GLOB. EG / ml	COEUR EC / ml	TORP. ET / ml	GERM. P / ml	% germ	% conv
0	4000	0	0	0	0	0
1	4000	0	0	0	0	0
3	3654	338	8	0	0	0
6	3187	749	64	0	0	2
9	2780	1040	180	0	0	5
13	2317	618	1032	33	3	26
16	2100	400	1143	357	24	29
20	2100	400	1125	375	25	28
23	2100	400	1075	425	28	27

Tps j	CE (nb cell ml) * 10e-6	CNE (nb cell ml) * 10e-6	tor cell (nb cell ml) * 10e-6	masse mg PS 10eo cell	$\mu$ C h-1
0	4.0	0.2	4.2	0.10	
1	4.0	0.2	4.2	0.11	0.000
3	5.5	0.2	5.3	0.10	0.153
6	8.5	0.3	8.3	0.10	0.141
9	12.5	0.3	12.8	0.10	0.125
13	32.2	0.4	32.6	0.25	0.234
16	43.4	0.4	43.8	0.19	0.098
20	43.5	0.4	43.9	0.19	0.001
23	43.7	0.5	44.2	0.19	0.002

tps (j)	q(NO3) $\mu\text{mole} / l * 10e6 \text{ cell}$	Yc/NO3 nb cell / $\mu\text{mole}$	q(NH4) $\mu\text{mole} / l * 10e6 \text{ cell}$	Yc/NH4 nb $\mu\text{mole}$	q(PO4) $\mu\text{mole} / l * 10e6 \text{ cell}$	Yc/PO4 nb cell / $\mu\text{mole}$
3	100	1363	775	175	5	30
6	88	1309	326	353	4	28
9	86	1212	205	509	4	26
13	25	6127	54	2829	3	51
16	70	1222	39	2194	0	0
20	5	95	3	157	0	0
23	7	261	2	879	0	0

tps (j)	q(O2) $\mu\text{mole} / l * 10e6 \text{ cell}$	Yc/O2 nb 106 cell / $\mu\text{mole}$	q(CO2) $\mu\text{mole} / l * 10e6 \text{ cell}$	RQ
3	832	163	826	1.0
6	545	211	500	0.9
9	749	139	983	1.3
13	404	376	833	2.1
16	329	259	1086	3.3
20	355	1	1393	3.9
23	380	5	1358	3.6

## ANNEXE 12: RESULTATS DETAILLES DE LA CUVÉE F9-R

tps	GLOB G/ml	COEUR C/ml	TORP T/ml	GERM P/ml	% germ	% conv
0	4000	0	0	0	0	0
1	3615	385	0	0	0	0
3	2903	1057	40	0	0	1
6	2089	1683	228	0	0	6
9	1504	1744	736	16	2	18
13	1504	685	1753	58	3	44
16	1504	498	1938	60	3	48
20	1504	494	1922	80	4	48

tps	CE (nb cell / ml) * 10e-6	CNE (nb cell / ml) * 10e-6	Ctot (nb cell / ml) * 10e-6	masse mg PS / 10e6 cell	µC j-l
0	4,00	0,20	4,20	0,12	
1	5,54	0,21	5,75	0,13	0,317
3	9,19	0,23	9,42	0,12	0,247
6	16,20	0,31	16,51	0,14	0,187
9	29,10	0,41	29,52	0,15	0,194
13	50,49	0,62	51,11	0,15	0,137
16	54,24	0,72	54,96	0,18	0,024
20	54,43	0,86	55,28	0,18	0,002

tps	q / NO3 µmole / J * 10e6 cell	Yc/NO3 nb cell / µmole	q / NH4 µmole / J * 10e6 cell	Yc/NH4 nb cell / µmole
1	176	1548	717	379
3	52	3775	27	7099
6	51	2811	35	4089
9	53	2788	36	4056
13	30	3470	21	5049
16	34	697	6	3638
20	6	278	1	2549

tps	q / PO4 µmole / J * 10e6 cell	Yc/PO4 nb cell / µmole	q / CHO mg / J * 10e6 cell	Yc/CHO nb cell / mg
1	117	2	648	0
3	2	90	105	2
6	3	52	134	1
9	3	51	25	6
13	0	3441	15	7
16	0	0	17	1
20	0	0	20	0

## ANNEXE 13: RESULTATS DETAILLES DE LA CUVÉE B13

Tps j	GLOB EG / ml	COEUR EC / ml	TORP ET / ml	GERM P / ml
1	1500	0	0	0
2	1219	281	0	0
3	1027	463	10	0
4	866	502	132	0
6	866	291	305	38
7	866	291	264	79
8	866	291	223	120
9	866	291	199	144
12	866	291	151	192

Tps j	Cellules (nb cell / ml) * 10e-6	masse mg PS / 10e6 cell	$\mu$ C j-1	% germ	% conv
1	1,50			0	0%
2	2,62	0,24	0,559	0	0%
3	3,59	0,23	0,314	0	1%
4	6,68	0,17	0,620	0	13%
6	11,08	0,20	0,254	11	25%
7	11,29	0,27	0,018	23	22%
8	11,50	0,36	0,018	35	18%
9	11,62	0,46	0,010	42	16%
12	11,86	0,55	0,007	56	12%

Tps j	q / NO3 $\mu$ mole / J * 10e6 cell	Yc/NO3 nb cell / $\mu$ mole	q / NH4 $\mu$ mole / J * 10e6 cell	Yc/NH4 nb / $\mu$ mole	q / PO4 $\mu$ mole / J * 10e6 cell	Yc/PO4 nb 106 cell / $\mu$ mole
1						
2	64	6723	247	1737	26	16
3	88	3057	172	1566	4	67
4	76	6070	113	4078	14	32
6	75	2644	112	1776	14	14
7	118	154	176	104	37	0
8	160	112	238	75	0	0
9	885	12	263	39	0	0
12	95	71	0	0	0	0

Tps j	q / O2 $\mu$ mole / J * 10e6 cell	Yc/O2 nb 106 cell / mole	TPS / CO2 $\mu$ mole / J * 10e6 cell	RQ
1				
2	1829	234	4391	
3	1337	201	5148	3,9
4	719	643	3703	5,2
6	433	459	2880	6,7
7	1892	10	3380	1,8
8	2338	8	4739	2,0
9	1446	7	5331	3,7
12	2227	3	8664	3,9

## ANNEXE 14: RESULTATS DETAILLES DE LA CUVÉE B10

Tps j	GLOB. EG/ml	COEUR EC/ml	TORP. ET/ml	GERM. P/ml	% GERM.	% CONV.
0	4000	0	0	0	0	0%
1	4000	0	0	0	0	0%
3	3349	641	10	0	0	0%
6	2350	1510	140	0	0	4%
9	1381	2349	270	0	0	7%
13	811	2438	751	0	0	19%
16	396	2468	1125	11	1	28%
20	396	1954	1624	26	2	41%
27	396	1044	2497	62	2	62%
30	396	640	2872	92	3	72%
34	396	636	2854	114	4	71%

Tps j	Cellules (nb cell / ml) * 10e-6	masse mg PS / 10e6 cell	$\mu$ C j-1
0	4,00		
1	4,00	0,15	0,000
3	6,80	0,09	0,266
6	12,91	0,07	0,213
9	21,09	0,08	0,164
13	32,00	0,11	0,104
16	40,19	0,13	0,076
20	51,10	0,14	0,060
27	70,19	0,13	0,045
30	78,37	0,12	0,037
34	78,35	0,13	0,000

Tps j	TCS / NO3 $\mu$ mole / l * 10e6 cell	Ye / NO3 nb cell / mmole	TCS / NH4 $\mu$ mole / l * 10e6 cell	Ye / NH4 nb cell / mmole	TCS / PO4 $\mu$ mole / l * 10e6 cell	Ye / PO4 nb cell / mmole
3	4	58	2	120	144	1430
6	38	4	19	9	1551	102
9	28	5	22	6	1827	71
13	18	5	5	16	1248	68
16	15	5	1	82	0	0
20	13	4	0	0	0	0
27	4	11	0	0	0	0
30	5	8	0	0	0	0
34	5	0	0	0	0	0

Tps j	TCS / CHO mg / (l * l * 10e6 cell)	Ye / CHO nb 10e6 cell / g	TCS / O2 $\mu$ mole / l * 10e6 cell	Ye / O2 nb cell / mmole	TPS / CO2 $\mu$ mole / l * 10e6 cell	RQ
3	317	1	600	344	413	0,7
6	31	5	333	474	483	1,5
9	36	4	329	393	536	1,6
13	24	4	400	213	397	1,0
16	4	16	253	269	424	1,7
20	4	14	378	141	343	0,9
27	1	41	290	134	348	1,2
30	1	36	306	114	300	1,0
34	1	0	279	0	254	0,9

# ANNEXE 15: RESULTATS DETAILLES DE LA CUVÉE B15

Tps j	GLOB. EG / ml	COEUR EC / ml	TORP. ET / ml	GERM. P / ml	% germ	% conv
0	1270	230	0	0	0	0
1	1270	230	0	0	0	0
2	1270	230	0	0	0	0
3	1270	230	0	0	0	0
4	1270	230	0	0	0	0
6	1270	210	20	0	0	1
7	1270	176	54	0	0	4
8	252	1052	196	0	0	13
9	50	1230	220	0	0	15
10	10	1240	250	0	0	17
11	0	1158	342	0	0	23
12	0	578	922	0	0	61
13	0	116	1384	0	0	92

Tps j	Cellules (nb cell / ml) * 10e-6	masse mg PS / 10e6 cell	µc j-l	q(NH4)/q(NO3)
0	2,4			
1	2,4	0,29	0,00	
2	2,4	0,50	0,00	3,4
3	2,4	0,65	0,00	3,4
4	2,4	0,69	0,00	80,1
6	2,8	0,78	0,08	0,4
7	3,5	0,71	0,22	0,9
8	10,4	0,26	1,09	0,9
9	11,7	0,26	0,12	0,9
10	12,5	0,30	0,06	0,9
11	14,3	0,32	0,14	0,9
12	25,9	0,19	0,59	0,9
13	35,2	0,15	0,30	0,9

Tps j	q / NO3 µmole / j * 10e6 cell	Yc/NO3 nb cell / µmole	q / NH4 µmole / j * 10e6 cell	Yc/NH4 nb cell / µmole	q / PO4 µmole / j * 10e6 cell	Yc/PO4 nb cell / mmole
2	47		161	0	2	
3	35	0	121	0	1	0
4	8	0	614	0	0	0
6	403	18	165	43	53	1
7	145	134	133	146	17	12
8	49	1361	45	1487	6	119
9	43	253	40	277	5	22
10	117	52	107	57	13	5
11	99	133	91	145	11	12
12	33	1355	30	1481	14	32
13	13	2067	12	2258	0	0

Tps j	q / O2 µmole / j * 10e6 cell	Yc/O2 nb cell / µmole	TPS / CO2 µmole / j * 10e6 cell	RQ
2	2003	21	5474	2,7
3	1855	22	6169	3,3
4	1686	25	8370	5,0
6	9115	5	8791	1,0
7	7385	6	7886	1,1
8	2507	17	2996	1,2
9	2232	19	2974	1,3
10	1978	21	3082	1,6
11	1650	25	2929	1,8
12	1007	41	1762	1,8
13	750	56	1562	2,1