

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES DE CAROTTE (*Daucus carota*)
EN BIORÉACTEUR À RUBANS HÉLICOÏDAUX

LUC LAVOIE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

MARS 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.

0-612-26491-2

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES DE CAROTTE (*Daucus carota*)

EN BIORÉACTEUR À RUBANS HÉLICOÏDAUX

présenté par: LAVOIE Luc

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

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

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

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

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

M. BAZINET Christophe, Ph.D., membre

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à Qing,
ma conjointe et soutien moral inconditionnel...

REMERCIEMENTS

Ce projet de maîtrise a été entrepris, poursuivi et complété grâce à l'aide financière du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et de la Fondation de Polytechnique.

Merci aux Professeurs Jean Archambault et Claude Chavarie pour leur encadrement académique durant ce projet. Merci à Marie-France Pépin pour son généreux support professionnel, ainsi qu'à Robert Williams et aux étudiants(tes) du laboratoire de culture de cellules de BIOPRO. Merci à tout le personnel de BIOPRO et du département de génie chimique de l'École Polytechnique pour leur assistance administrative ou technique.

Merci aux membres de ma famille et à mes amis(es) qui, de près ou de loin, m'ont soutenu et encouragé par leur confiance et leur patience.

RÉSUMÉ

De toutes les méthodes de propagation végétale asexuée, l'embryogenèse somatique a le plus de potentiel parce qu'elle permet d'obtenir en très grand nombre des clones complets exempts de pathogènes et parce que sa mise à l'échelle semble techniquement réalisable. Par contre, elle n'est encore utilisée qu'en recherche et on ne lui connaît à ce jour aucune application commerciale. Les principaux retards à appliquer l'embryogenèse somatique végétale sont liés au manque de compréhension de ce phénomène éminemment complexe, manque qui est en partie dû au fait que la plupart des études rapportées sont effectuées avec des cultures *in vitro* où les conditions physico-chimiques ne sont ni suivies ni contrôlées. Le présent projet de recherche propose donc de systématiser l'usage du bioréacteur à rubans hélicoïdaux dans l'étude de l'embryogenèse somatique.

L'objectif principal est d'évaluer comment le changement de la concentration initiale d'ammonium influence le développement d'une lignée de cellules embryogènes de carotte (*Daucus carota*) lorsqu'elle est cultivée en cuvée. Deux modes de culture sont utilisés, soit le flacon agité (méthode traditionnelle) et le bioréacteur à rubans hélicoïdaux avec contrôle de l'oxygène dissous à un niveau constant (20% de la saturation d'air dans l'eau). Des embryons somatiques de carotte sont produits au cours de six séries de cuvées effectuées en parallèle dans les deux modes de culture et où le milieu B5 de chaque série contient initialement 0, 2, 5, 10, 15 et 20 mM d'ammonium. L'évolution dans le temps des paramètres de croissance de la biomasse, du nombre d'embryons torpilles et de la concentration des macronutriments (glucides; anions nitrate, chlorure, phosphate et sulfate; et cations ammonium, sodium, potassium, magnésium et calcium) est suivie.

Les tendances observées sont globalement les mêmes en flacons et en bioréacteurs, dont une production maximale d'embryons somatiques pour une concentration initiale en ammonium de 15 mM. Toutefois, le mode bioréacteur

permet d'obtenir de 10% à 160% plus d'embryons qu'en flacons témoins selon la concentration initiale en ammonium alors que la production moyenne de biomasse est semblable dans les deux modes de culture ($\sim 13 \text{ g ms.L}^{-1}$) et que la biomasse sédimentée occupe en moyenne 10% moins d'espace du volume final d'une cuvée en bioréacteur que de celui d'une cuvée en flacon. De telles différences quantitatives, ainsi que celles rencontrées dans les mesures de rendements (croissance de la biomasse et production d'embryons) par rapport à l'absorption de dix macronutriments, semblent attribuables en partie aux effets directs ou indirects du contrôle de la concentration en oxygène dissous à un niveau constant de 20% que seule permet la culture en bioréacteurs. Ces différences sont discutées par rapport à certaines caractéristiques de la différenciation cellulaire.

Si les résultats de cette étude prouvent que la lignée embryogène considérée (SP1b) a des besoins particuliers en ammonium, ils montrent aussi qu'elle en a très certainement pour l'oxygène et possiblement pour le phosphate et le magnésium. Ainsi, il apparaît essentiel de pouvoir bien définir les besoins nutritionnels spécifiques à chaque lignée de cellules embryogènes et, si possible, à chacun des stades du développement embryonnaire. Dans ce contexte, le bioréacteur à rubans hélicoïdaux constitue un outil de recherche indispensable à l'amélioration des connaissances sur l'embryogenèse somatique végétale comme au développement d'applications pour celle-ci.

ABSTRACT

Among the various methods for asexual mass propagation of plants, somatic embryogenesis is the one with the greatest potential because it allows production of fully autonomous and disease-free clones, and its scale-up is technically feasible. However, somatic embryogenesis has only been used for research purposes and does not yet have any commercial application. The main obstacles for applying plant somatic embryogenesis are related to the lack of understanding of this complex phenomenon, a lack which partly results from studies made with *in vitro* cultures where physico-chemical conditions are usually neither monitored nor controlled. Hence, this research project proposed to use the double-helical-ribbon-impeller bioreactor for the study of somatic embryogenesis.

The main objective was to evaluate how changing the initial ammonium ion concentration affects the development of a carrot (*Daucus carota*) embryogenic cell line cultured under two modes of batch culture: traditional shake flasks method and the double-helical-ribbon-impeller bioreactor with controlled dissolved oxygen concentration at a constant level of 20% (% of air saturation in water). Carrot somatic embryos were produced during six series of experiments conducted simultaneously in both culture modes. The B5 media used in these six series contained initially 0, 2, 5, 10, 15 and 20 mM of ammonium. For each batch, parameters such as biomass growth, torpedo embryos' concentration and macronutrient (carbohydrates, ammonium, sodium, potassium, magnesium, calcium, nitrate, chloride, phosphate and sulphate) consumption were measured.

The main trends observed were similar in flasks and bioreactors, including maximal somatic embryo production when the media contained initially 15 mM of ammonium. However, the bioreactor mode allows production of 10% to 160% more embryos than the corresponding flasks depending on the initial ammonium concentration, while the average biomass production was similar in both modes (~ 13 g dw.L⁻¹) and the settled biomass at the end of a

bioreactor batch takes on average 10% less space than a flask one. Such quantitative differences, as well as, those found when measuring the yields (biomass growth and embryo production) with respect to the macronutrients' absorption, can partly be seen as direct or indirect effects of maintaining the dissolved oxygen concentration at 20%. These differences are discussed in reference to certain characteristics of cell differentiation.

The results of this study prove that the SP1b embryogenic cell line used has specific needs for ammonium, and they also show that it requires oxygen and possibly phosphate and magnesium. Thus, it appears to be essential to be able to define the particular nutritional requirements of any embryogenic cell line and, if possible, of each embryo developmental stage. In this context, the double-helical-ribbon-impeller bioreactor constitutes an invaluable research tool in order to improve the understanding of somatic embryogenesis and to develop useful applications for this promising propagation method.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iv
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	viii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DU CONTENU DE L'ANNEXE I	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xx
 CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	
1.1 LES HUMAINS, LES PLANTES ET LA BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE ..	1
1.2 PROBLÉMATIQUE	2
1.3 CONTENU DU MÉMOIRE	3
 CHAPITRE 2 - REVUE DE LITTÉRATURE	
2.1 L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE CHEZ LES VÉGÉTAUX	5
2.1.1 QUELQUES POINTS DE REPÈRE HISTORIQUE	5
2.1.2 DÉFINITIONS ET ASPECTS THÉORIQUES	6
2.1.3 MORPHOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET STRUCTURE	9
2.1.4 COMPOSANTE GÉNÉTIQUE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE	11
2.1.5 LES MARQUEURS DE DÉVELOPPEMENT	11
2.1.6 PRINCIPAUX PROBLÈMES DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE	13
2.1.6.1 Problèmes liés aux méthodes et aux conditions de culture	13
2.1.6.2 Problèmes possiblement d'origine biologique	15
2.1.6.3 Remarque générale concernant ces principaux problèmes	17
2.1.7 ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DES EMBRYONS SOMATIQUES	17
2.1.8 MATURATION ET STABILISATION DES EMBRYONS SOMATIQUES	18
2.1.9 APPLICATIONS POSSIBLES DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE	22
2.2 PARAMÈTRES DE CULTURE ET OBTENTION D'EMBRYONS SOMATIQUES	26
2.2.1 TISSUS et CELLULES EMBRYOGÈNES	26
2.2.2 PRÉPARATION D'UN INOCULUM	27
2.2.3 MILIEUX DÉFINIS CHIMIQUEMENT ET PRINCIPAUX NUTRIMENTS	29
2.2.4 LE CAS PARTICULIER DES SOURCES D'AZOTE et	

CELUI DU POTASSIUM	33
2.2.5 LES RÉGULATEURS DE CROISSANCE	35
2.2.6 L'OXYGÈNE	41
2.2.7 LES AUTRES GAZ	45
2.2.8 CONDITIONS PHYSIQUES DE CULTURE	48
2.3 PRODUIRE DES EMBRYONS SOMATIQUES EN BIORÉACTEURS	53
2.3.1 AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS	56
2.3.2 PRINCIPAUX TYPES DE BIORÉACTEURS UTILISÉS	58
2.3.3 STRATÉGIES POSSIBLES DE PRODUCTION	59
2.3.4 PRINCIPAUX RÉSULTATS RAPPORTÉS	61
2.3.5 POTENTIEL POUR LA MODÉLISATION ET L'OPTIMISATION	63
2.3.6 LIMITES	63
CHAPITRE 3 - OBJECTIF PRINCIPAL ET SOUS-OBJECTIFS	
3.1 OBJECTIF PRINCIPAL	65
3.2 SOUS-OBJECTIFS	66
CHAPITRE 4 - MATÉRIEL ET MÉTHODES	
4.1 DÉVELOPPEMENT ET MAINTIEN DES LIGNÉES EMBRYOGÈNES	67
4.1.1 MISE EN CULTURE TYPIQUE DES LIGNÉES EMBRYOGÈNES ..	67
4.1.2 REPIQUAGE ET ENTRETIEN DES LIGNÉES EN SUSPENSION LIQUIDE	70
4.2 CULTURE EN CUVÉE POUR LA PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES	70
4.2.1 MILIEUX DE CULTURE	70
4.2.2 DEUX MODES DE CULTURE CUVÉE	72
4.2.3 PRÉPARATION TYPIQUE D'UN INOCULUM POUR LA PRODUCTION D'EMBRYONS	75
4.2.4 STÉRILISATION	76
4.2.5 PROCÉDURE D'INOCULATION	77
4.3 CONDITIONS DE CULTURE	78
4.3.1 CULTURE EN FLACONS AGITÉS	78
4.3.2 CULTURE EN BIORÉACTEURS	78
4.4 ANALYTIQUE	80
4.4.1 ÉCHANTILLONNAGE et MESURES	80
4.4.2 ANALYSE DES MACRONUTRIMENTS	81
4.4.3 TESTS DE GERMINATION DES EMBRYONS SOMATIQUES	82
CHAPITRE 5 - RÉSULTATS ET DISCUSSION	
5.1 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES	84

5.1.1	RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES	84
5.1.2	LIGNÉES, CROISSANCE ET PRODUCTION	86
5.1.3	MILIEU DE CULTURE	87
5.1.4	CULTURE EN FLAcons ET CULTURE EN BIORÉACTEURS	88
5.1.5	PROCÉDÉ DE PRODUCTION	90
5.1.6	PARAMÈTRES RETENUS	91
5.2	PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES	92
5.2.1	PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS	92
5.2.1.1	Inoculation des cuvées et stabilité de la lignée SP1b	92
5.2.1.2	Temps de culture	95
5.2.1.3	Accroissement de la biomasse	95
5.2.1.4	Germination	99
5.2.1.5	Production maximale d'embryons somatiques	99
5.2.2	PRODUCTION TYPIQUE	102
5.2.2.1	Production d'embryons somatiques	102
5.2.2.2	Évolution de la biomasse dans le temps ...	108
5.2.2.3	Cinétiques d'absorption des macronutriments	119
5.2.3	CINÉTIQUE DE PRODUCTION	132
5.2.3.1	Rendements de croissance de la biomasse sèche	134
5.2.3.2	Rendements de production d'embryons somatiques	150
 CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS		
6.1	CONCLUSIONS	175
6.1.1	ATTEINTE DES OBJECTIFS ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES ..	175
6.1.2	PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES.....	176
6.1.3	IMPORTANCE D'UNE REPRÉSENTATION JUSTE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE	177
6.2	RECOMMANDATIONS	178
6.2.1	PROTOCOLE DE MODIFICATION DU MILIEU B5 EN AMMONIUM INITIAL	178
6.2.2	LES SOURCES D'AZOTE	180
6.2.3	AMÉLIORATIONS MÉTHODOLOGIQUES SOUHAITABLES	180
 LISTE DES RÉFÉRENCES		183
 ANNEXE I : FIGURES COMPLÉMENTAIRES À LA SOUS-SECTION 5.2.2		218

LISTE DU CONTENU DE L'ANNEXE I

ANNEXE I : FIGURES COMPLÉMENTAIRES À LA SOUS-SECTION 5.2.2	218
I.1 COMPLÉMENT AUX FIGURES 5.3, 5.4 et 5.5	220
I.2 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.6-(A)	221
I.3 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.7	224
I.4 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.8	226
I.5 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.9-(A)	229
I.6 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.10	231
I.7 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.11	232
I.8 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.13	234
I.9 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.14-(A)	237
I.10 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.15-(A)	239
I.11 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.16-(A)	242
I.12 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.17-(A)	244
I.13 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.18-(A)	246

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Principaux effets physiologiques des hormones végétales rapportés pour la culture <i>in vitro</i> de tissus végétaux et pour l'embryogenèse somatique	38
Tableau 2.2	Publications où sont rapportés des effets de l'oxygène sur l'obtention d'embryons somatiques par culture <i>in vitro</i>	43
Tableau 2.3	Publications faisant état de l'usage de bioréacteurs pour la culture d'embryons somatiques d'espèces végétales	54
Tableau 4.1	Formulation des milieux nutritifs synthétiques MS et B5	69
Tableau 4.2	Combinaisons de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) et de nitrate de potassium (KNO_3) permettant de modifier la concentration en ammonium du milieu B5	69
Tableau 5.1	Croissance et production de diverses lignées embryogènes en bioréacteurs	85
Tableau 5.2	Croissance et production de diverses lignées embryogènes en flacons agités	85
Tableau 5.3	Croissance et production de cultures embryogènes en bioréacteurs	93
Tableau 5.4	Croissance et production de cultures embryogènes en flacons agités	93
Tableau 5.5	Comparaison des deux modes de culture pour quatre paramètres qui sont reliés à la croissance de la biomasse	96

Tableau 5.6	Rendements de croissance par rapport aux glucides totaux (CHOt) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$...	135
Tableau 5.7	Rendements de croissance par rapport à l'anion nitrate (NO_3) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$...	136
Tableau 5.8	Rendements de croissance par rapport à l'anion chlorure (Cl) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$...	138
Tableau 5.9	Rendements de croissance par rapport au cation ammonium (NH_4) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$...	141
Tableau 5.10	Rendements de croissance par rapport au cation magnésium (Mg) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$...	146
Tableau 5.11	Rendements de croissance par rapport au cation calcium (Ca) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$...	146
Tableau 5.12	Rendements de croissance (Y_c): Résumé des principales tendances observées	148
Tableau 5.13	Rendements de production (Y_p): Résumé des principales tendances observées dans les cuvées en bioréacteurs 2-L	169
Tableau 5.14	Rendements de production (Y_p): Résumé des principales tendances observées dans les cuvées en flacons agités de 500-mL	170

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Représentation schématique de quatre stades morphologiques utilisés pour décrire le développement des embryons somatiques de carotte	10
Figure 5.1	Production maximale moyenne d'embryons somatiques en fonction du numéro de la sous-culture pour les douze cuvées en flacons contrôles dont les résultats sont regroupées en cinq valeurs moyennes	94
Figure 5.2	Production maximale d'embryons somatiques en fonction de la concentration initiale en ion ammonium et droites de régression sur les cinq premiers couples de valeurs pour chacun des deux modes de culture	100
Figure 5.3	Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série G	103
Figure 5.4	Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série E	103
Figure 5.5	Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	105
Figure 5.6	Taux de germination et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	107
Figure 5.7	Régression linéaire de $\ln(x/x_0)$ en fonction du temps où x_0 est la biomasse sèche initiale et x est la biomasse sèche au temps t , afin d'estimer le taux de croissance moyen (μ_{MOYEN} = pente) pour trois cuvées de la série J estimé par régression linéaire sur les 6 premiers points	108

Figure 5.8	Concentration de biomasse sèche en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	110
Figure 5.9	Concentrations de biomasse sèche et d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	111
Figure 5.10	Concentration de biomasse humide en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	113
Figure 5.11	Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons en fonction du temps pour la cuvée J en bioréacteur ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=15\text{mM}$)	115
Figure 5.12	Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour deux cuvées en flacons de la série J	115
Figure 5.13	Volume de biomasse sédimentée (VBS) et concentration d'embryons en fonction du temps pour les cuvées en bioréacteur et en flacon témoin de la série J	118
Figure 5.14	Concentrations d'embryons, de biomasse sèche et de glucides en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	120
Figure 5.15	Concentrations d'embryons et des cations calcium, magnésium, potassium et sodium en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	123
Figure 5.16	Concentrations d'embryons et d'ammonium en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	125
Figure 5.17	Concentrations d'embryons et des anions phosphate, chlorure, nitrate et sulfate en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	127
Figure 5.18	Concentrations d'embryons et de deux ions azotés en fonction du temps pour trois cuvées de la série J	128

Figure 5.19	Comparaison, pour la cuvée J, des mesures en continu de conductivité et de pH avec les cinétiques de production de la biomasse sèche et des embryons somatiques, ainsi qu'avec les cinétiques d'absorption du cation ammonium, des glucides et de l'anion phosphate	130
Figure 5.20	Concentrations d'embryons en fonction du temps pour six cuvées effectuées avec la lignée SP1b dans des bioréacteurs 2-L dont chaque milieu de culture B5 contient une concentration initiale différente d'ammonium (NH_4^+)	132
Figure 5.21	Rendements de croissance (Y_c) par rapport à l'anion phosphate (PO_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$	137
Figure 5.22	Rendements de croissance (Y_c) par rapport à l'anion sulfate (SO_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$	140
Figure 5.23	Rendements de croissance (Y_c) par rapport au cation sodium (Na) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$	143
Figure 5.24	Rendements de croissance (Y_c) par rapport au cation potassium (K) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$	144
Figure 5.25	Rendements de production (Y_p) par rapport aux glucides totaux (CHOt) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$	151
Figure 5.26	Rendements de production (Y_p) par rapport à l'anion nitrate (NO_3) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$	153

Figure 5.27	Rendements de production (Y_p) par rapport à l'anion phosphate (PO_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	155
Figure 5.28	Rendements de production (Y_p) par rapport à l'anion chlorure (Cl) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	156
Figure 5.29	Rendements de production (Y_p) par rapport à l'anion sulfate (SO_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	158
Figure 5.30	Rendements de production (Y_p) par rapport au cation ammonium (NH_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	160
Figure 5.31	Rendements de production (Y_p) par rapport au cation sodium (Na) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	161
Figure 5.32	Rendements de production (Y_p) par rapport au cation potassium (K) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	163
Figure 5.33	Rendements de production (Y_p) par rapport au cation magnésium (Mg) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	165
Figure 5.34	Rendements de production (Y_p) par rapport au cation calcium (Ca) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$	167

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

2,4-D	: Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (régulateur synthétique de croissance de type auxine)
ABA	: Acide abscisique (hormone végétale)
BAP	: 6-benzylamino purine (régulateur synthétique de croissance de type cytokinine)
GA ₃	: Acide gibbérellique (gibbérelline d'origine fongique)
GAs	: Groupe des gibbérellines d'origine végétale
IAA	: Acide indole-3-acétique (composé de référence pour les hormones du groupe des auxines)
KIN	: Kinétine ou 6-furfurylamino purine (régulateur synthétique de croissance de type cytokinine)
k _L a	: Coefficient global de transfert d'oxygène de la phase gazeuse au liquide (exprimé en h ⁻¹)
NAA	: Acide α-naphtalène acétique (régulateur de croissance de type auxine)
OUR	: Taux volumétrique d'utilisation de l'oxygène (Oxygen Uptake Rate)
[O ₂ d]	: Concentration d'oxygène dissous (généralement exprimée en % de saturation d'air dans l'eau pour un milieu liquide de culture)
SP1b	: Lignée de cellules de carotte de la variété Six Pack obtenue à partir de la fraction b du cal numéro 1
%VBS	: Pourcentage du volume de la suspension qui est occupé par la biomasse humide sédimentée

- VVM : Expression d'un débit gazeux en volume(s) de gaz par unité de volume d'un récipient de culture par minute
- Yc : Rendement de croissance de la biomasse sèche par rapport à l'absorption d'un macronutriment; s'exprime en gramme de matière sèche (g ms) par unité de mesure du macronutriment (g ou mmole)
- Yp : Rendement de production par rapport à l'absorption d'un macronutriment; s'exprime en nombres d'embryons torpilles (Es) par unité de mesure du macronutriment (g ou mmole)
- ZEA : Zéatine (hormone du groupe des cytokinines qui sont des dérivés d'adénine substitués en N⁶)

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1 LES HUMAINS, LES PLANTES ET LA BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE

De tout temps, les plantes et leurs dérivés sont absolument vitaux pour les êtres humains. Par exemple les végétaux comptent pour plus de 90% des ressources alimentaires globales de l'humanité, alors qu'environ 1% de celles-ci proviennent des océans et que le reste est comblé par les produits animaux, eux-même obtenus indirectement des plantes (Borlaug 1983). Outre leur rôle alimentaire, les végétaux fournissent aussi de nombreuses substances naturelles (cellulose, huiles, principes médicinaux actifs, insecticides, parfums, saveurs, pigments, enzymes, hormones, acides organiques, additifs alimentaires, etc.) ainsi que de la biomasse utilisable à des fins énergétiques, qui sont d'autant plus importantes au plan économique qu'elles sont nécessaires au plan humain. Ainsi, environ 25% des produits d'intérêt pharmaceutique qui sont présentement commercialisés proviennent du monde végétal (Kreis & Reinhard 1989).

Par ailleurs, la population mondiale ne cesse de croître et on prévoit qu'au cours des premières décennies du siècle prochain elle atteindra 8 milliards d'êtres humains, soit le double de ce qu'elle était en 1975, pour ensuite doubler à nouveau durant le demi siècle qui suivra (Borlaug 1983). Un tel accroissement démographique signifie que d'ici quelques années la quantité totale de biomasse végétale requise pour combler plusieurs besoins humains, dont celui fondamental de se nourrir, aura doublée par rapport à 1975, ce qui se traduit par une pression sans cesse croissante sur les terres cultivables. Le défi de produire toujours plus de produits végétaux essentiels à l'humanité est relevé quotidiennement par des intervenants de tous les domaines reliés à l'agriculture, à la biologie, à la foresterie et/ou à l'ingénierie. La biotechnologie végétale est l'un de ces domaines. Elle repose sur la combinaison de toutes les connaissances scientifiques et techniques disponibles pour améliorer les méthodes de production des plantes et de leurs dérivés.

La culture *in vitro* est un outil important de la biotechnologie végétale qui, entre autres choses, permet d'effectuer certaines étapes du cycle de vie des plantes et d'obtenir certains produits connexes sans avoir à

utiliser des terres cultivables. Dans cette perspective, il existe des méthodes de culture *in vitro* qui peuvent, si elles sont pratiquées sur des échelles assez grandes, réduire considérablement les pressions économiques et démographiques exercées sur ces terres tout en libérant les espèces végétales ainsi produites des aléas de la géographie, des saisons, de la maladie, du climat et même des régimes politiques (Fowler 1983). Parmi ces méthodes figure la multiplication végétale asexuée qui permet d'obtenir des plantes-soeurs génétiquement toutes semblables, appelées clones, à partir d'une seule plante-mère.

Les quatre principales approches de multiplication asexuée de la biotechnologie végétale sont la culture de jeunes pousses (bouturage), l'organogenèse, la culture de bourgeons axillaires et l'embryogenèse somatique (Hussey 1983, Krikorian 1982, Murashige 1978, Styer 1985, Vasil & Vasil 1980). Si l'organogenèse est peu appliquée en dehors de la recherche, il en va tout autrement des cultures de jeunes pousses et de bourgeons axillaires qui sont couramment utilisées commercialement (Giles & Morgan 1987, Levin et al. 1988, Lutz et al. 1985, Smith M.A.L. et al. 1989, Styer 1985). Ces types de culture étant cependant laborieux et dispendieux, ils ne conviennent conséquemment qu'à des espèces (plus souvent horticoles) qui en justifient les coûts à faibles volumes. Reste l'embryogenèse somatique qui, bien quelle soit théoriquement la plus simple et la plus prometteuse des quatres approches, ne connaît à ce jour aucune application commerciale.

1.2 PROBLÉMATIQUE

L'embryogenèse somatique est simple parce qu'elle permet d'obtenir en une seule étape un grand nombre d'organismes complets, séparés les uns des autres, exempts de pathogènes et qui, théoriquement, sont aptent à devenir des plantes autonomes. Par ailleurs, elle est la plus prometteuse des quatre approches car elle peut être effectuée dans des milieux liquides, ce qui constitue un atout pour l'automatisation, le développement de procédés, la culture en bioréacteurs et la mise à l'échelle. De plus, les applications potentielles de l'embryogenèse somatique ne se limitent pas à la multiplication asexuée. Elle permet, par exemple, l'obtention de

métabolites secondaires à haute valeur ajoutée (Ammirato 1983, El-Fiky et al. 1989, Fowler 1987, Greidziak et al. 1990, Janick et al. 1989, Nakagawa et al. 1982, Ranch 1993, Thorpe 1988).

S'il n'est pas possible d'invoquer une cause unique pour expliquer les retards à appliquer l'embryogenèse végétale somatique, on peut toutefois avancer sans risque de se tromper que cela concerne le manque de compréhension des nombreuses particularités de ce phénomène éminemment complexe. La plupart des connaissances actuelles sur l'embryogenèse végétale somatique proviennent d'études effectuées au moyen de modes de culture qui ne permettent pas le suivi et le contrôle de toutes les conditions physico-chimiques, notamment la culture en boîtes de Pétri (milieu gélosé) et la culture en flacons agités (milieu liquide). On n'a donc présentement accès qu'à une connaissance partielle des comportements et des besoins nutritionnels des cellules embryogènes cultivées *in vitro*.

Dans ce contexte, il apparaît urgent de systématiser l'usage des bioréacteurs dans l'étude de l'embryogenèse somatique des plantes, car ils permettent généralement de contrôler une grande partie des conditions de culture et de mieux suivre l'évolution dans le temps de différents paramètres, dont l'utilisation des nutriments par les cellules embryogènes. Cette urgence est la motivation centrale de ce projet de recherche où l'on propose de produire des embryons de carotte (*Daucus carota*) en bioréacteur à rubans hélicoïdaux afin d'étudier les cinétiques nutritionnelles de leur développement. Indirectement, on souhaite aussi confirmer la place de la culture en bioréacteurs dans l'acquisition de nouvelles connaissances sur l'embryogenèse végétale somatique et dans la mise au point de ses applications.

1.3 CONTENU DU MÉMOIRE

Afin de rendre compte adéquatement de l'ensemble de ce projet de recherche le présent mémoire est divisé en six chapitres. La revue de littérature (Chapitre 2) rassemble l'information nécessaire pour comprendre l'embryogenèse végétale somatique et la pertinence de la culture *in vitro* en bioréacteurs, ainsi que pour justifier les objectifs de cette recherche

qui sont formulés au Chapitre 3. Le Chapitre 4 fait état des méthodes et du matériel utilisés pour parvenir aux résultats qui sont présentés et discutés au Chapitre 5. Enfin le Chapitre 6 porte sur les conclusions et les recommandations découlant de ce projet.

CHAPITRE 2 - REVUE DE LITTÉRATURE

La revue de littérature qui suit compte trois sections qui sont elles mêmes subdivisées en autant de sous-sections et de parties qui s'avèrent nécessaires pour rendre le propos claire. À la première section on présente des aspects généraux mais importants de l'embryogenèse somatique, alors que les nombreux paramètres de culture à considérer dans l'obtention d'embryons somatiques sont l'objet de la seconde section. Enfin, la section 2.3 vise à faire le point sur la pertinence de la culture en bioréacteurs pour la production d'embryons somatiques. Il importe de souligner que l'information présentée dans ce chapitre provient de travaux effectués autant avec des milieux de culture solides que liquides car les résultats de tels travaux sont complémentaires. Dans le même ordre d'idées, on reconnaît qu'il y a complémentarité entre les résultats des recherches appliquées et des recherches fondamentales.

2.1 L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE CHEZ LES VÉGÉTAUX

2.1.1 QUELQUES POINTS DE REPÈRE HISTORIQUE

Selon Gautheret (1985 & 1982) l'embryogenèse somatique chez les végétaux aurait été observée et rapportée la première fois pour la carotte par Levine en 1947, alors que Halperin et Wetherell (1964a) mentionnent Levine (1950) et Wiggans (1954) comme étant parmi les pionniers. Toutefois, la très grande majorité des auteurs semble considérer que les recherches systématiques en embryogenèse somatique commencent vers 1957 avec l'allemand Reinert (1958) pour la culture sur gélose et avec l'équipe américaine de Steward (1958 a,b & c) pour la culture en milieu liquide. Cette découverte de l'embryogenèse végétale somatique confirmait de façon irréfutable le concept de totipotence cellulaire, concept formulé au début du siècle par le physiologiste allemand Haberlandt (Janick et al. 1989, Steward et al. 1970, Vasil & Vasil 1980). Celui-ci avait alors prédit que toute cellule végétale a le potentiel de se développer en une plante complète et qu'une meilleure maîtrise des paramètres de culture devait permettre de reproduire ce phénomène en laboratoire ainsi qu'*in vitro* (Gautheret 1985, Steward 1967).

Les pionniers de l'embryogenèse somatique ayant beaucoup travaillé avec des tissus de carotte (*Daucus carota*), cette espèce a fait l'objet du plus grand nombre d'études depuis 1958. Cependant ce phénomène suscitant beaucoup d'intérêts, les autres espèces végétales n'ont pas été laissées pour compte. Tisserat, Esan et Murashige récensaient en 1979 des travaux sur l'embryogenèse somatiques pour plus de 130 espèces dans 32 familles différentes. Une revue plus récente mentionne que des espèces végétales appartenant à plus de 56 familles peuvent maintenant donner des embryons somatiques *in vitro* (Kiyosue et al. 1993a).

2.1.2 DÉFINITIONS ET ASPECTS THÉORIQUES

Aussi dénommée embryogenèse adventive, embryogenèse asexuelle ou encore multiplication asexuée, l'embryogenèse somatique est le processus naturel par lequel un embryon se développe à partir d'une cellule somatique, c'est-à-dire d'une cellule non reproductrice du corps d'une plante (Ammirato 1983a, Sharp et al. 1980, Thorpe 1988, Tisserat et al. 1979, Williams & Maheswaran 1986). À la différence de l'embryon somatique, l'embryon zygotique qui se trouve généralement dans la graine d'une plante est celui qui se développe à partir d'un zygote, soit la cellule résultant de la fusion de gamètes mâle et femelle. Toutefois, qu'il soit somatique ou zygotique, tout embryon peut être défini comme un nouvel individu provenant d'une seule cellule qui n'a pas d'attachement vasculaire avec la plante mère (Haccius 1978).

Bien que cette définition générale soit confirmée par des observations expérimentales pour des embryons somatiques de carotte (Bachs-Hüsemann & Reinert 1970, Nomura & Komamine 1985, Williams & Maheswaran 1986), dans les cultures en suspension on considère habituellement que ceux-ci se forment à la surface de masses dites pro-embryogènes qui sont des amas de 50 à 100 μm de diamètre constitués de petites cellules (Jones 1974 a & b, McWilliam et al. 1974). Par ailleurs, et contrairement à ce que l'on a longtemps cru, tout indique que ces amas ne seraient pas des ensembles désorganisés de cellules indifférenciées mais des embryons somatiques dont le développement aurait été arrêté (Kiyosue et al. 1993a). De plus, alors que tous les embryons zygotiques d'une plante donnée sont des individus

différents possédant chacun un génôme unique, les embryons somatiques issus d'une même lignée de cellules embryogènes sont génétiquement semblables puisque ces dernières résultent initialement des divisions mitotiques successives de cellules somatiques identiques. Les embryons d'une même lignée sont donc, par définition, des clones d'une plante mère. Au plan terminologique, on utilise indifféremment les qualificatifs d'embryogène et d'embryogénique pour désigner les cellules somatiques qui sont à l'origine des embryons.

De façon générale les cellules embryogènes ressemblent à des cellules indifférenciées de méristème. Leurs attributs histologiques principaux sont: 1) de ne pas être volumineuses; 2) de posséder un nucléole particulièrement gros, ce qui est indicatif d'une activité métabolique intense des acides ribonucléiques (ARNs); 3) d'avoir un cytoplasme dense contenant des granules d'amidon, des petites gouttes lipidiques ainsi qu'un nombre variable de petites vacuoles selon l'espèce; et 4) d'être circonscrites par des parois cellulaires relativement minces (Fujimura & Komamine 1980a, Michaux-Ferrière & Schwendiman 1992, Sharp et al. 1980, Steward et al. 1970, Sussex 1972, Thorpe 1988, Vasil 1988).

L'embryogenèse somatique étant un phénomène naturel du monde végétal, il est implicitement admis que des cellules somatiques de n'importe quelle plante peuvent, *in vitro*, être aiguillées vers le processus embryogène en autant qu'elles sont soumises aux stimuli et aux conditions de culture appropriés (Ammirato 1983a, Kiyosue et al. 1993a). Pour le présent travail il n'est question que d'embryogenèse somatique *in vitro*, soit l'exploitation et l'utilisation du potentiel naturel des cellules végétales par la culture aseptique en laboratoire.

On a suggéré, au début des années 1980, une terminologie décrivant deux types d'embryogenèse somatique: le type direct ou "pré-déterminé" et le type indirect ou "induit". Dans le premier type les embryons résultent du développement de cellules dites "pré-déterminées" (*Pre-Embryogenic Determined Cells* ou PEDC), ils croissent directement sur le tissu cultivé sans passer par une phase intermédiaire, de sorte qu'ils sont souvent qualifiés d'adventifs (Evans et al. 1981, Sharp et al. 1980 & 1982). D'autre part,

dans l'embryogenèse somatique indirecte les embryons sont considérés provenir de cellules indifférenciées et en apparence non organisées ayant été "induites" (*Induced Embryogenic Determined Cells* ou IEDC), c'est-à-dire que ces cellules appartenant à un cal ou une suspension s'engagent dans la voie embryogène en réponse à la présence de certains stimuli environnementaux (Carman 1990). Il ne fait pas de doute que cette typologie aidera grandement à clarifier la communication entre les divers intervenants du domaine. Pour une revue des quatre ou cinq autres théories de l'embryogenèse qui sont antérieures à cette typologie le lecteur est invité à consulter le texte de Sharp, Sondahl, Caldas et Maraffa (1980).

Compte tenu de sa découverte relativement récente et de la façon dont elle a été étudiée, l'embryogenèse somatique est un phénomène biologique fort complexe qu'on connaît surtout de façon empirique et pour lequel il n'existe pas encore de théorie unique. L'effort de conceptualisation globale le plus récent date déjà d'une décennie, alors que Christianson (1985) suggérerait de modéliser les états biochimiques des cellules devenant embryogènes à la suite d'une induction. Depuis les travaux de l'équipe de LoSchiavo (1989), l'hyper-méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est parfois suggérée comme un mécanisme fondamental possible dans l'induction de l'embryogenèse somatique à l'aide d'auxines (régulateurs de croissance dont il est question à la sous-section 2.2.5). Par la suite, d'autres travaux ont introduit le concept de stress physiologique, rendant la distinction beaucoup moins nette entre les embryogenèses somatiques directe et indirecte. Ainsi, à la lumière de travaux effectués avec des tissus de carotte, il appert que plusieurs stress physiologiques comme la chaleur (Kamada et al. 1994, Zimmerman et al. 1989), la pression osmotique (Kamada et al. 1989 & 1993, Skriver & Mundy 1990), la présence d'ions de certains sels ou métaux lourds (Kamada et al. 1989, Kiyosue et al. 1989b & 1990a), l'hypochlorite (Kamada et al. 1989, Kiyosue et al. 1989a) ou encore la scarification mécanique de certains tissus (Smith & Krikorian 1989 & 1990a,c) peuvent induire la formation d'embryons somatiques. Dans cette perspective, des régulateurs de croissance tel que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) agiraient aussi comme des agents stressants. Aujourd'hui, l'induction à l'aide de régulateurs de croissance de type auxine (2,4-D ou autres) est certainement la façon la plus

courante d'obtenir des embryons somatiques à partir de tissus de différentes espèces végétales.

Pour l'embryogenèse somatique, comme pour les autres méthodes de régénération végétale *in vitro*, il reste encore beaucoup à faire avant de passer du présent stade empirique et descriptif à un stade théorique explicatif. Dans ce contexte, la poursuite de travaux de recherche appliquée avec un modèle comme la carotte permet à la fois d'améliorer les techniques de culture, d'accroître les connaissances fondamentales et d'évaluer dans quelle mesure les potentiels de développement de procédés commercialement rentables pourront se transférer éventuellement à d'autres espèces. La présente étude portant sur des lignées de *Daucus carota*, il est approprié de préciser que cette espèce est diploïde ($2n=18$ paires de chromosomes), qu'elle fait partie de la famille des ombelliféracées (classe des dicotylédones), qu'elle est originaire d'Europe et qu'elle constitue un légume racinaire populaire partout dans le monde dont la production ne cesse de croître (Molle et al. 1993).

2.1.3 MORPHOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET STRUCTURE

Les embryons somatiques et zygotiques d'une même variété végétale sont similaires autant d'un point de vue structural (Raghavan 1980) que développemental (Ammirato 1983a, Carman 1990, Kiyosue et al. 1993a, Sharp et al. 1980). Ces deux types d'embryons partagent, entre autres caractéristiques, une structure bipolaire (soit un méristème racinaire et un méristème apical disposés aux extrémités du même axe) qui leur confère l'importante capacité de pouvoir croître simultanément par la racine et par la tige sans devoir être manipulés préalablement (Ammirato 1987, Thorpe 1988). En fait, cette capacité constitue l'un des avantages de l'embryogenèse somatique sur les autres systèmes de propagation végétative qui requièrent généralement une ou plusieurs étapes intermédiaires, parfois coûteuses, avant de donner des propagules aptes à être plantés (Ammirato & Styer 1985, Fujii et al. 1987, Lutz et al. 1985).

Chez les plantes de la classe des dicotylédones, on reconnaît typiquement au moins trois états morphologiques successifs au développement d'un

embryon somatique qui sont analogues à ceux d'un embryon zygotique: le stade globulaire, le stade cordiforme et le stade torpille. Pour la carotte, Warren et Fowler (1978) ont déterminé que: 1) l'embryon somatique au stade globulaire est une sphère de 0,20 à 0,25 mm de diamètre se composant de 400 à 600 cellules; 2) que celui au stade cordiforme a -0,30 mm de longueur sur 0,25 mm de largeur et compte de 900 à 1300 cellules; 3) qu'au stade torpille l'embryon fait environ 0,50 mm de long sur 0,30 de large et se compose de 2000 à 3000 cellules. La référence à ces trois stades de développement est maintenant généralisée (Figure 2.1). Par ailleurs, dans certaines études on ajoute un stade intermédiaire entre le globulaire et le cordiforme que l'on désigne pas le terme oblong (Chi et al. 1994, Schiavone & Cooke 1985), alors que dans la majorité des autres travaux sur la carotte on fait précéder le stade globulaire par le stade d'amas cellulaire, aussi appelé stade pré-globulaire ou pré-embryonnaire (Cazzulino et al. 1990, Harrell et al. 1992, Huang et al. 1993, Nomura & Komamine 1985 & 1986b). Compte tenu que, pour la culture en suspension où l'induction embryogène se fait avec un ou plusieurs régulateurs de croissance, les descriptions classiques indiquent qu'un embryon (et particulièrement un de carotte) se développe d'abord à la surface d'un agrégat de cellules (diamètre = 50 à 100 μ m) avant de s'en détacher et de flotter librement dans le milieu (Carman 1990, Halperin 1966, Jones 1974 a & b, McWilliam et al. 1974, Nomura & Komamine 1986b), il apparaît utile et important de conserver le terme d'amas cellulaire pour désigner les embryons dans cet état antérieur au stade globulaire (Figure 2.1). Il est aussi intéressant d'ajouter que, d'un point de vue cinétique, les cellules embryogènes d'un amas cellulaire de carotte mettent une quinzaine de jours à passer au stade globulaire (Cazzulino et al. 1990).

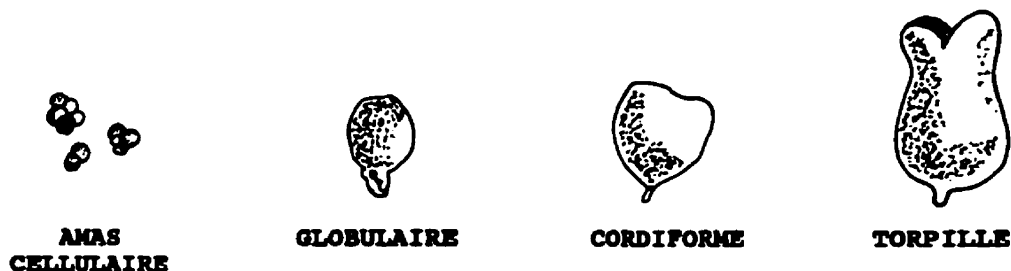


Figure 2.1

Représentation schématique de quatre stades morphologiques utilisés pour décrire le développement des embryons somatiques de carotte

2.1.4 COMPOSANTE GÉNÉTIQUE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

S'il est clair depuis longtemps que différentes variétés d'une même espèce végétale ont des potentiels embryogènes très variables, des chercheurs travaillant avec la luzerne ont identifié récemment des gènes particuliers dont la présence dans le génome d'une plante est essentielle pour que ses cellules somatiques aient la capacité de s'engager dans une voie embryogène (Bowley et al. 1993, Kielly & Bowley 1992). D'après ces mêmes recherches, il semblerait de plus que la stabilité génétique des cellules cultivées *in vitro* dépendrait de la présence de certains gènes. De telles découvertes sont importantes car elle permettent d'entrevoir le jour où le choix des lignées à développer pour l'obtention d'embryons somatiques se fera systématiquement et où le génie génétique permettra de transformer des cellules peu ou pas embryogènes, mais ayant des caractères agronomiques désirables, en des cellules embryogènes stables génétiquement. Donc la composante génétique de l'aptitude (ou inversement de l'inaptitude) à l'embryogenèse somatique pourrait être bientôt une variable contrôlable. Bien que le présent travail ne porte pas sur ces aspects génétiques, il est néanmoins utile de pouvoir s'y référer.

2.1.5 LES MARQUEURS DE DÉVELOPPEMENT

Dans le cadre d'une culture *in vitro*, il est évident qu'une multitude de changements biochimiques et physiologiques se produisent entre le moment où une cellule somatique s'engage dans la voie embryogène et celui où l'embryon torpille pleinement développé est apte à germer. Parce que la capacité d'identifier et d'évaluer précisément certains de ces changements peut s'avérer un atout majeur dans la compréhension et la maîtrise de l'embryogenèse somatique, il n'est pas surprenant que plusieurs chercheurs y travaillent. De façon générale on recherche des marqueurs ou des indicateurs fiables et spécifiques au processus embryogène. De plus, on comprend facilement que de tels marqueurs et des moyens simples pour les mesurer soient essentiels à la mise au point de procédés industriels de production d'embryons somatiques.

Certaines études relatives aux marqueurs de développement portent sur des modifications qualitatives et quantitatives qui se produisent dans la

composition d'acides aminés (Kamada & Harada 1984b) et d'acides gras (Warren & Fowler 1979), dans la synthèse d'acides nucléiques (Sengupta & Raghavan 1980 a & b, Ulrich et al. 1990), dans le métabolisme de polyamines (Khan & Minocha 1991, Minocha et al. 1991, Montague et al. 1978 & 1979, Robie & Minocha 1989) et dans l'émanation de composés volatiles (Kennedy et al. 1991), ainsi que sur l'accumulation de matériaux de réserve glucidiques (Keller et al. 1988, Ross & Murphy 1993, Wurtele et al. 1988) ou lipidiques (Dutta et al. 1991, Dutta & Appelqvist 1989). Cependant, les études les plus nombreuses sont celles concernant des protéines spécifiques ou encore des gènes encodant pour leur fabrication.

Parmi les études portant sur des marqueurs protéiques potentiels, on peut mentionner des travaux généraux (De Vries et al. 1992, Dodeman et al. 1992, Hari 1980, Ozawa et al. 1991, Racusen & Schiavone 1988, Slay et al. 1989, Sung & Okimoto 1981, Van Engelen & De Vries 1992) et d'autres ciblés plus particulièrement sur des protéines chromosomales (Fujimura et al. 1981, Gregor et al. 1974), des phosphoprotéines (Tan et al. 1994), des glycoprotéines de la classe des arabinogalactanes (Kreuger & Van Holst 1993, Stacey et al. 1990), des protéines cytoplasmiques (Hatzopoulos et al. 1990), la glycosylation de protéines extra-cellulaires qui joueraient un rôle important dans l'adhésion des cellules des amas pro-embryogènes (De Vries et al. 1988 a & b, LoSchiavo et al. 1990, Satoh et al. 1986, Sterk et al. 1989) et sur des enzymes comme des transférases (Baker et al. 1983, Sterk et al. 1991), des protéases (Carlberg et al. 1984), des estérases (Chibbar et al. 1988 & 1989), des peroxydases (Cordewener et al. 1991, Joersbo et al. 1989, Wochok & Burleson 1974), des phosphorylases (Keller et al. 1988, Wurtele et al. 1988) et des réductases (Kamada & Harada 1984a). Similairement, les études portant sur des marqueurs génétiques potentiels sont soit globales (Aleith & Richter 1990, Komamine et al. 1992, Nomura & Komamine 1986 a & c, Sterk & De Vries 1993, Sung & Okimoto 1983, Thomas & Wilde 1987, Wilde et al. 1988) ou très spécifiques (Borkird et al. 1988, Fujii & Uchimiya 1991, Kiyosue et al. 1992d & 1993b, Ma H et al. 1994, Puupponen-Pimia et al. 1993, Wurtele et al. 1993, Zimmerman et al. 1989).

Si ce sont surtout des biochimistes qui identifient des marqueurs et mettent au point des méthodes rapides et efficaces de détection, il ne fait pas de doute que les chercheurs en ingénierie des biosystèmes pourront en bénéficier grandement. En effet, une utilisation systématique de marqueurs fiables permettra de réduire temps et argent dans le développement des lignées embryogènes, l'optimisation des procédés et le contrôle des diverses étapes de la production d'embryons somatiques de qualité commerciale. Compte tenu de l'avancement évident dans ce domaine ainsi que de travaux prometteurs comme ceux de l'équipe japonaise de Kiyosue (Kiyosue et al. 1990b, 1991, 1992 a,c & d, 1993b), des équipes européennes de Pennell (Pennell et al. 1992) et de Sterk (Sterk et al. 1991) ainsi que de l'équipe américaine de Wurtele (Wurtele et al. 1993), tout porte à croire qu'avant la fin de la présente décennie on aura de bons indicateurs de développement qui deviendront indispensables à tout travail sérieux en embryogenèse somatique.

2.1.6 PRINCIPAUX PROBLÈMES DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

Quelque soit le type de milieu, le mode de culture et l'espèce utilisés, l'embryogenèse somatique comporte certains problèmes qui, pour la plupart, furent rencontrés dès les premiers travaux et le sont encore aujourd'hui malgré des connaissances accrues. De façon générale, on peut départager ces problèmes selon qu'ils sont liés aux méthodes et aux conditions de culture ou qu'ils ont possiblement des causes biologiques.

2.1.6.1 Problèmes liés aux méthodes et aux conditions de culture

L'un des problèmes les plus fréquemment mentionnés est l'hétérogénéité des cultures, soit la présence dans une culture donnée d'embryons somatiques qui sont à différents stades de développement. Une approche courante pour palier à cette absence de synchronie des cultures est de séparer les amas cellulaires embryogènes (généralement entre 50 et 100 μm de diamètre) des embryons aux stades de développement ultérieurs d'après leur grosseur ou leur densité, en ayant recours à la filtration, la centrifugation ou tout autre méthode permettant d'obtenir une suspension ou un cal plus homogène (Chée & Cantliffe 1992, Fujimura & Komamine 1979a, Giuliano et al. 1983, Halperin & Wetherell 1964b, Masuda et al. 1991, Mohanty 1992, Nomura &

Komamine 1985, Rodriguez et al. 1988, Warren & Fowler 1977, Wilde et al. 1988). Wetherell (1984) accroît le degré de synchronie de cultures déjà filtrées en les soumettant à un traitement plasmolytique qui aurait pour effet de rompre les liens entre les cellules des amas cellulaires et conséquemment de rendre un plus grand nombre de cellules embryogènes libres de se développer de manière indépendante et simultanée. Pour le cas particulier de cultures effectuées en bioréacteur, Archambault et collègues (1994a) suggèrent que le maintien de la concentration en oxygène dissous à un bas niveau pourrait favoriser la synchronisation de cultures embryogènes d'*E. californica*. Enfin, des équipes de recherche mettent à profit des technologies modernes de reconnaissance informatisées de l'image afin de contrôler des systèmes de triage des embryons à divers stades de développement (Grand d'Esnon et al. 1989, Hamalainen et al. 1993, Harrell et al. 1992, Uozumi et al. 1993).

Outre des embryons à différents stades de développement, une culture embryogène contient aussi des cellules non embryogènes. Des chercheurs japonais séparent des cellules embryogènes et non embryogènes de carotte en soumettant les cultures à un séchage qui tue ces dernières sans affecter les premières (Kiyosue et al. 1992b). Smith et Krikorian (1990b) parviennent à des résultats similaires avec la carotte, en utilisant un bas pH d'environ 4,0 pour éliminer les cellules non embryogènes.

Les embryons somatiques ayant une grande plasticité développementale, il arrive qu'apparaissent, en réponse à des variations dans les conditions de culture, des structures embryogènes inusitées qui compromettent parfois leur capacité à devenir des plantes véritables. Ainsi, il est fréquent que plusieurs embryons somatiques poussent en grappe de deux, trois et parfois plus à partir d'un même amas cellulaire, ou que des embryons adventifs croissent fusionnés à un embryon primaire. Ceci est en partie lié au manque de synchronie et se traduit par des plantes anormales possédant plus qu'une tige (Ammirato 1987). On peut parfois corriger ou prévenir de tels problèmes structuraux en traitant les embryons avec un régulateur de croissance comme l'acide abscisique (Kamada & Harada 1981). Le développement de cotylédons morphologiquement anormaux ou d'un nombre anormal de cotylédons comptent aussi depuis longtemps parmi les problèmes structuraux

de l'embryogenèse somatique (Sussex & Frei 1968). À cet égard, on rapporte que le nombre variable de cotylédons d'embryons de carotte (Li 1993, Molle et al. 1993) et que la morphologie anormale de cotylédons observés avec des embryons de raisin (Gray & Compton 1993) ne sont pas dûs à des changements génétiques puisque des plantes normales résultent de tels embryons somatiques. Par ailleurs, des lignées-soeurs obtenues d'un même cal ou par sous-culture d'une même suspension puis maintenues dans des conditions rigoureusement identiques produisent souvent des quantités et des qualités différentes d'embryons (Drew 1979, Lutz et al. 1985). Enfin, il arrive que des embryons apparemment normaux au plan morphologique ne peuvent pas se développer normalement ou se comportent anormalement au plan cellulaire (Michaux-Ferrière & Schwendiman 1992).

Les embryons somatiques n'ont pas généralement une période d'arrêt de leur développement après le stade torpille. Dans la plupart des cas ils continuent à se développer, germent et deviennent plantules. Ceci ne constitue pas en soi un problème dans la mesure où les embryons et les plants qui en résultent sont normaux, mais peut présenter des difficultés considérables dans certains contextes de recherche ou de production.

2.1.6.2 Problèmes possiblement d'origine biologique

L'un des aspects les plus problématiques de l'embryogenèse somatique est la variation somaclonale, soit l'ensemble des modifications phénotypiques qui s'expriment fortuitement chez l'embryon somatique et/ou chez la plante qui en résulte. La variation somaclonale est commune à toutes les méthodes de culture *in vitro* de cellules ou de tissus végétaux. Cette variation intéresse certains chercheurs pour le développement de variétés nouvelles et améliorées (Evans & Sharp 1986, Larkin et al. 1985, Scowcroft et al. 1987). Cependant elle ne permet rien de nouveau ou d'utile pour plusieurs autres spécialistes (Bayliss 1980, Caligari & Shohet 1993, Ranch 1993, Vasil 1988). Dans le cas de l'embryogenèse somatique, il est clair que toute forme de variation indésirable et incontrôlable constitue un problème majeur au développement de méthodes de clonage à grande échelle. Il est donc indiscutable qu'une compréhension des causes fondamentales de la variation somaclonale ainsi que la mise au point de moyens pour la mesurer et la contrôler sont aussi urgents qu'indispensables.

Caligari et Shohet (1993) indiquent que la variation somaclonale peut être d'origine épigénétique ou génétique. Une variation somaclonale de nature épigénétique ne serait pas transmissible génétiquement et, pour une lignée donnée, elle dépendrait autant de l'origine du tissu somatique initial, du génotype de l'espèce en cause et de l'âge de la lignée que des conditions générales de culture (Evans & Sharp 1986). Des phénomènes reliés à la durée comme le déclin de la totipotence (Smith & Street 1974) et la tendance des lignées embryogènes de carotte de passer d'un état diploïde normal à un état polyploïde anormal (Bayliss 1977 & 1980, Larkin et al. 1985) avec l'augmentation du nombre de sous-cultures devraient faire partie de cette catégorie puisqu'habituellement on les minimise ou on les élimine par l'utilisation de cellules jeunes entretenues suivant un régime cultural comportant des repiquages fréquents. Également, des anomalies morphologiques ou développementales d'embryons somatiques d'espèces aussi distantes que le sapin de Norvège (Roberts et al. 1993), le raisin (Gray & Compton 1993) et la carotte (Li 1993) sont démontrées être de nature épigénétique.

D'autre part, une variation somaclonale d'origine génétique serait transmissible génétiquement (Caligari & Shohet 1993). Elle se retrouverait dans la descendance de plantes anormales issues d'embryons somatiques. En conséquence, s'il était démontré que certaines variations phénotypiques de l'embryogenèse somatique sont de nature génétique, toute cette méthode de clonage *in vitro* serait remise en question car il est essentiel de maintenir et garantir l'intégrité génétique des embryons si l'on souhaite un jour l'utiliser dans des procédés fiables de propagation végétale industrielle (Ammirato 1983a, Caligari & Shohet 1993, Novak et al. 1989).

Jusqu'à aujourd'hui, on suppose implicitement que les variations somaclonales rencontrées sont seulement de nature épigénétique et donc sans conséquence au plan héréditaire, même si selon Caligari et Shohet (1993) il n'existe que peu ou pas d'études rigoureuses ayant vérifié ce postulat. Ces auteurs soulignent aussi que plusieurs aspects des conditions de culture, dont ceux concernant l'équilibre et la limitation nutritionnels, ont certainement des effets sur la variation somaclonale mais qu'ils sont peu étudiés. Dans cette perspective, ce projet de recherche peut

contribuer éventuellement à confirmer que l'origine de la variation somaclonale est seulement épigénétique en démontrant qu'elle est affectée par des paramètres insoupçonnés jusqu'ici et qu'elle peut être diminuée ou éliminée par des contrôles appropriés.

2.1.6.3 Remarque générale concernant ces principaux problèmes

Malgré les origines peu connues de la variation somaclonale, il semble que la plupart des problèmes de l'embryogenèse somatique sont plus liés à la méconnaissance et au peu de contrôle des effets qu'ont sur celle-ci les diverses conditions physico-chimiques de culture qu'avec des modifications biologiques ou génétiques fondamentales. Dans cette optique, l'usage de bioréacteurs adaptés à la culture d'embryons somatiques est prometteur car ils permettent d'avoir plus de précision dans le suivi et le contrôle des conditions de culture.

2.1.7 ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DES EMBRYONS SOMATIQUES

Que l'on se situe dans un contexte de production commerciale ou de recherche, le but de l'embryogenèse somatique est toujours d'obtenir de façon contrôlée des embryons qui sont aptes à se développer en plantes de génotypes et de phénotypes déterminés. Donc, la qualité d'un embryon somatique est d'autant meilleure que sa variation somaclonale est faible. Or, malgré les progrès de la biologie moléculaire, cette variation ne peut pas encore être évaluée de façon simple et directe (Caligari & Shohet 1993, De Klerk 1990). C'est pourquoi, quand vient le temps d'évaluer la qualité des embryons, on se réfère généralement à la notion de conversion.

La conversion d'un embryon somatique est définie comme sa capacité à germer en une pousse vigoureuse puis en une plante normale apte à croître de manière autotrophe. Les critères caractéristiques d'une conversion peuvent varier d'une espèce à l'autre (Fujii et al. 1989, Redenbaugh 1993, Stuart & Strickland 1984a & b). Jusqu'à maintenant on se base principalement sur des fréquences de conversion pour identifier, *a posteriori* toutefois, les conditions de culture et les traitements qui résultent en une meilleure qualité des embryons et une efficacité accrue des méthodes de production (Fujii et al. 1987). En l'absence de sélection

ou de traitement particuliers les taux de conversion d'embryons somatiques d'espèces différentes sont généralement faibles (30 à 70%). Par contre, pour des embryons somatiques soumis à une sélection et à un ou plusieurs types de traitement, on rapporte de meilleurs taux de conversion qui se situent entre 70% et 90% *in vitro* (Fujii et al. 1990) et à 64% en serres (Fujii et al. 1989) dans le cas relativement bien étudié de la luzerne, et entre 80% à 100% *in vitro* pour la carotte (Molle et al. 1993). Ces taux sont encourageants puisque les fournisseurs de semences agricoles garantissent habituellement pour la plupart des espèces commerciales de légumineuse des taux de germination *in vitro* supérieurs à 85% (Alain Charbonneau communication personnelle) et que les taux de germination des embryons sont forcément toujours supérieurs à leurs taux de conversion.

Parce que les résultats de conversion viennent tardivement après la production des embryons somatiques et parce qu'une étude bien faite de la conversion exige un travail considérable en plus de conditions matérielles particulières (serre, espace cultivable, climat adéquat), les recherches en embryogenèse somatique comptent peu de ces mesures. Ceci constitue un manque fort déplorable et confirme combien il est important que des spécialistes de la biologie moléculaire mettent rapidement au point une méthode simple, directe et sensible permettant de mesurer la variation somaclonale et la stabilité génétique des cellules embryogènes (Caligari & Shohet 1993, De Klerk 1990). Ce n'est qu'à partir de ce moment qu'il deviendra possible de contrôler la qualité des embryons somatiques en procédant, dès les premières étapes du développement des lignées, à une sélection systématique des cellules génétiquement inchangées qui mènent à la production d'embryons et de plantes complètement normales (Vasil 1988).

2.1.8 MATURATION ET STABILISATION DES EMBRYONS SOMATIQUES

À la différence d'un embryon zygotique de la même espèce, l'atteinte du stade torpille par un embryon somatique ne lui confère pas forcément la maturité nécessaire pour poursuivre un développement normal. En fait, plusieurs auteurs prétendent que la faiblesse des taux de germination et de conversion rapportés pour des embryons somatiques de nombreuses espèces résulte de ce qu'ils sont sélectionnés en fonction de leur apparence

morphologique plutôt que de leur maturité physiologique réelle (Fujii et al. 1993, Ranch 1993). Par ailleurs, les embryons somatiques n'ont pas généralement de période d'arrêt de leur croissance ou période de stabilité qui permettrait de les conserver facilement. Sans être des obstacles majeurs à la poursuite de certaines recherches fondamentales utiles, ces deux aspects (maturation et stabilisation) de l'embryogenèse somatique constituent toutefois des limites importantes à ses applications possibles impliquant des méthodes mécanisées de propagation à grande échelle (Ammirato 1983b, Barbotin et al. 1993).

La maturité d'un embryon somatique s'évalue habituellement par comparaison avec des embryons zygotiques du même cultivar (Finkelstein & Crouch 1987) en se référant à des critères tels que son contenu en eau, sa concentration endogène en acide abscisique (hormone végétale désignée ABA), son taux de respiration et son niveau de transcription génétique (Ranch 1993). Le manque de maturité des embryons somatiques se manifeste principalement par une germination précoce, asynchrone et/ou anormale au plan développemental. Ceci est dû nécessairement aux conditions de culture (Gray & Purohit 1991) et les facteurs susceptibles d'affecter la maturité sont soit de nature physique ou chimique (Bornman 1993). Des traitements par le froid et par la déshydratation sont classés parmi les facteurs physiques, alors que des traitements avec des régulateurs de croissance, des acides aminés et des sucres font partie des facteurs chimiques.

Gray et Compton (1993), s'intéressant aux facteurs physiques, soutiennent qu'une forme de repos est peut être essentielle à la maturation des embryons somatiques, au moins chez ceux appartenant à des espèces où un repos est requis pour la maturation complète et la germination des embryons zygotiques. Dormance et quiescence sont les deux formes de repos des embryons (zygotiques ou somatiques) auxquelles on se réfère le plus souvent dans la littérature. De façon générale, la distinction principale entre ces deux formes de repos est que la quiescence se termine simplement lorsqu'un embryon est imbibé d'eau, alors que la dormance ne cesse que si un embryon a d'abord été soumis à des conditions physiques particulières (gel, froid, etc.) durant un certain temps (variable selon l'espèce) avant d'être imbibé d'eau.

D'après plusieurs publications (Gray 1990, 1989 & 1987b, Gray & Compton 1993, Gray & Purohit 1991, Gray et al. 1987, Gray & Conger 1985, Janick et al. 1989, Kitto & Janick 1985a & b) une certaine déshydratation des embryons somatiques (plus ou moins prononcée selon les espèces) serait nécessaire à leur repos (dormance ou quiescence). De plus, tout embryon devrait avoir atteint un stade de résistance à la dessiccation pour survivre à la déshydratation (Gray & Compton 1993, Gray & Purohit 1991). L'acquisition de cette résistance à la dessiccation serait une étape centrale du développement embryonnaire, alors que la déshydratation constituerait un tournant physiologique où les processus biochimiques favorisant le développement de l'embryon seraient remplacés par ceux qui permettent le développement de la plante et qui se concrétisent dans le catabolisme du matériel de réserve lors de la réhydratation (Gray & Compton 1993, Kermode et al. 1986). Dans cette perspective, Gray et Compton (1993) déshydratent des embryons somatiques de raisins à l'aide de chambres à humidité contrôlée et leurs résultats concordent avec ceux rapportés pour d'autres espèces. Les plants de vigne obtenus ont un développement correct et synchronisé alors que ce n'est pas le cas pour ceux obtenus à partir d'embryons somatiques non déshydratés. Il semble donc qu'en établissant un protocole comportant l'induction d'une forme de tolérance à la dessiccation suivie d'une déshydratation et d'une période de quiescence ou de dormance on pourrait obtenir des embryons somatiques plus matures et dont le développement se rapproche de celui des embryons zygotiques.

Les travaux de Finkelstein et collègues (1985, 1986 & 1987) renseignent sur des moyens pour régulariser la maturation et possiblement induire une certaine forme de repos des embryons somatiques de colza. Ces travaux départagent les effets respectifs de l'ABA (facteur chimique) et de la dessiccation (facteur physique), puisqu'ils portent sur le processus de maturation menant à la quiescence des embryons. L'ABA serait associée à des événements critiques (tels que l'inhibition de l'absorption d'eau, l'arrêt de la germination et l'accumulation rapide de matériel de réserve) de la phase transitoire qui précède l'état de dessèchement des embryons zygotiques, mais elle ne les causerait pas. Ces auteurs croient plutôt qu'un métabolite de l'ABA comme l'acide phaséique agirait sur des gènes

spécifiques. De plus, la capacité à devenir des plantes normales serait acquise durant la période de dessèchement et pourrait être induite par une exposition à des gradients osmotiques élevés (sucrose, mannitol, sorbitol) car la seule inhibition de l'absorption de l'eau aurait un effet régulateur plus direct sur la maturation embryogène que la seule présence d'ABA. Iida et collègues (1992), étudiant les relations entre l'ABA et la dessiccation pour des embryons de carottes, soulignent l'importance de cette hormone et parmi leurs hypothèses ils suggèrent que ces deux facteurs agiraient de façon complémentaire et synergique.

Concernant toujours les facteurs chimiques, le rôle de certains nutriments dans le processus d'accumulation de matériel de réserve lors de la maturation des embryons somatiques de luzerne est l'objet d'investigations (Lai & McKersie 1993, Lai et al. 1992). Des effets de l'ABA sur ce même processus sont étudiés par Fujii, Slade et Redenbaugh (1989). Fujii et collègues (1990) observent, par ailleurs, que des concentrations faibles d'ABA arrêtent complètement le développement d'embryons somatiques immatures et marquent le début de leur maturation, alors que des concentrations d'ABA comparativement beaucoup plus grandes n'ont aucun effet sur des embryons initialement plus matures qui demeurent insensibles au régulateur de croissance, continuent de croître et germent. Donc le moment du traitement de maturation avec l'ABA serait un facteur crucial pour les lignées de luzerne étudiées. Il se peut qu'il soit tout aussi important pour d'autres espèces (Iida et al. 1992). Similairement, le moment où est effectuée la dessiccation d'un embryon somatique serait à prendre en considération (Gray & Compton 1993, Ranch 1993).

Puisque les travaux sur la maturation des embryons somatiques de plusieurs espèces suggèrent qu'une phase de maturation requiert souvent une période d'arrêt ou de stabilisation de la croissance, les recherches visant l'amélioration de la qualité des embryons somatiques par la maturation convergent parfois vers celles portant sur leur préservation et leur conservation (Florin et al. 1993). Généralement, les personnes qui se préoccupent de stabiliser la croissance des embryons s'intéressent aussi aux applications de l'embryogenèse somatique car sans stabilisation pas de préservation ou de conservation à long terme et, conséquemment, beaucoup

moins d'applications possibles. Les travaux relatifs à la stabilisation des embryons somatiques concernent évidemment la dessiccation, la déshydratation et l'usage de régulateurs de croissance, mais aussi des traitements par hypoxie, par réduction de température (allant jusqu'à la congélation) et par séchage à froid (Florin et al. 1993). Globalement, il reste beaucoup à faire pour déterminer les effets de chaque technique sur la qualité des embryons ainsi que les combinaisons de techniques les plus appropriées à chaque espèce (Florin et al. 1993, Fujii et al. 1993, Gray & Compton 1993).

2.1.9 APPLICATIONS POSSIBLES DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

Depuis sa découverte, l'embryogenèse somatique suscite l'intérêt de divers spécialistes de la biologie végétale car elle constitue un outil unique pour explorer des processus comme l'embryogenèse zygotique, la différenciation, la maturation, la croissance et le développement des végétaux qui sont trop compliqués ou difficiles à étudier *in vivo* (Ammirato 1983a, Evans et al. 1981, Kamada et al. 1994, Kiyosue et al. 1993a, Nomura & Komamine 1986a & b, Pennell et al. 1992, Thomas & Wilde 1987, Thorpe 1988). En fait, l'utilisation de l'embryogenèse somatique comme outil de recherche fondamentale est sans contredit son application la plus courante et, à ce jour, la plus profitable scientifiquement.

Par ailleurs, de toutes les méthodes de culture de tissus végétaux l'embryogenèse somatique a l'un des meilleurs potentiels d'application, principalement parce que des embryons somatiques normaux et de bonne qualité ont une structure bipolaire, s'obtiennent comme des entités individuelles séparées les unes des autres et peuvent être produits en très grand nombre dans des suspensions liquides. Dans cette perspective, la liste suivante résume d'autres usages envisagés pour l'embryogenèse somatique avec quelques unes de leurs principales références: 1) la multiplication à grande échelle de semis obtenus par clonage (Cazzulino et al. 1990, Chi et al. 1994, Denchev et al. 1992, Evans et al. 1981, Gray & Purohit 1991, Huang et al. 1993, Lutz et al. 1985, Sharp et al. 1982, Thorpe 1988); 2) la production de plantes exemptes de maladie ou de pathogène (Cazzulino et al. 1990, Evans et al. 1981, Li 1993, Ranch 1993,

Sharp et al. 1982); 3) la reproduction de variétés végétales améliorées (dont celles obtenues par des nouvelles techniques du génie génétique) qui peuvent être asexuées, instables génétiquement ou pour lesquelles il peut être préférable d'éviter les croisements hasardeux de la reproduction sexuée (Evans et al. 1981, Huang et al. 1993, Li 1993, Lutz et al. 1985, McKersie et al. 1989, Nomura & Komamine 1986b, Roberts et al. 1993, Sharp et al. 1982, Thorpe 1988, Vasil 1988); 4) l'obtention de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée (Ammirato 1983a, El-Fiky et al. 1989, Fowler 1987, Greidziak et al. 1990, Janick et al. 1989, Nakagawa et al. 1982, Ranch 1993, Thorpe 1988); 5) la conservation des génomes (*germplasm conservation*) de variétés végétales en voie d'extinction et de variétés dont les semences ne sont pas stables ou uniformes génétiquement (Ammirato 1983 a & b, Bowley et al. 1993, Gray & Compton 1993, Gray & Purohit 1991, McKersie et al. 1989, Sharp et al. 1982); 6) et enfin la commercialisation de semences dites synthétiques ou artificielles (Ammirato 1983a, Chi et al. 1994, Evans et al. 1981, Fujii et al. 1987, 1989, 1990 & 1993, Gray 1987a, 1987b & 1990, Gray & Compton 1993, Gray & Purohit 1991, Gray et al. 1987, Iida et al. 1992, Janick et al. 1989, Le Deunff Y 1993, Li 1993, McKersie et al. 1989, Molle et al. 1993, Nouaille & Petiard 1988, Ranch 1993, Redenbaugh 1993 & 1990, Redenbaugh et al. 1986, 1987a & b, Roberts et al. 1993, Sanada et al. 1993, Styer 1985). Il est intéressant de noter que certaines de ces applications potentielles auraient entre autres conséquences de pouvoir consacrer une plus grande proportion des terres arables à des cultures de végétaux qui sont directement consommables par des populations humaines plutôt qu'à la production de graines ou de tubercules destinés à la propagation végétale. Il convient également de mentionner que l'embryogenèse somatique devrait constituer un des moyens de régénération des végétaux qui assureront éventuellement l'autosuffisance alimentaire de colonies humaines vivant d'agriculture hydroponique dans des stations spatiales, d'où l'intérêt de la NASA pour celle-ci.

Parmi les applications possibles, la plus développée est vraisemblablement la conservation de génomes de variétés végétales particulières qui sont préservés présentement à l'état de plantes entières dans des stations agricoles gérées habituellement par des gouvernements. C'est dans cette optique que sont effectuées plusieurs des recherches sur la maturation et

la stabilisation des embryons somatiques, car du moment où sont obtenus de façon constante et reproductible des embryons de bonnes qualité pour une variété donnée, il suffit de pouvoir les préserver à long terme pour avoir une méthode idéale et économique de conservation de son génome (Gray & Compton 1993, Gray & Purohit 1991, McKersie et al. 1989).

L'idée d'utiliser l'embryogenèse somatique pour la production commerciale de semences artificielles ou synthétiques date des années 1970 et elle appartient à Toshio Murashige. Si cette idée en a intéressé plusieurs depuis 1978, les réalisations concrètes se font toujours attendre (Ammirato 1983a, Cazzulino et al. 1990, Redenbaugh et al. 1987b). Puisqu'on justifie plusieurs recherches en embryogenèse somatique par cette application potentielle, il importe de bien la décrire. L'équipe de Redenbaugh définit une semence artificielle comme un embryon somatique contenu dans une enveloppe protectrice à l'intérieur de laquelle pourraient être ajoutés des nutriments, des régulateurs de croissance, des agents de conservation, des produits contre des pathogènes ou même des organismes symbiotiques (Fujii et al. 1987, 1989, 1990 & 1993, Redenbaugh 1990 & 1993, Redenbaugh et al. 1986, 1987a & b, Sanada et al. 1993). Cette définition mettant d'abord l'accent sur la présence d'une enveloppe, elle est cependant trop restrictive car elle exclut d'emblée tout embryon somatique qui aurait conservé tout son potentiel régénérateur mais serait demeuré nu. Dans ce contexte, il semble préférable de se référer à une définition plus large et plus souple en considérant comme semence synthétique tout embryon somatique qui, une fois stabilisé, peut reproduire fidèlement le programme génétique de la plante-mère de la même manière que le ferait une semence naturelle (Gray & Purohit 1991). Cette dernière définition a l'avantage de replacer l'embryon somatique au centre du concept de semence artificielle et de reconnaître implicitement l'importance de sa qualité.

Par ailleurs, pour des raisons non clairement expliquées dans la littérature, plusieurs recherches du domaine des semences artificielles portent sur les méthodes et les conséquences de l'encapsulation d'embryons somatiques d'espèces variées (Bapat & Rao 1988, Barbotin et al. 1993, Fujii et al. 1987 & 1989, Garrett 1993, Ghosh & Sen 1994, Janick et al. 1989, Kim & Janick 1989 & 1990, Kitto & Janick 1985a & b, Li 1993, Liu et

al. 1992, Mariani et al. 1992, Molle et al. 1993, Redenbaugh et al. 1986, 1987a & b, Sanada et al. 1993, Tay et al. 1993, Timbert et al. 1995). Dans la plupart des cas, ces travaux concluent que la difficulté à obtenir de bonnes semences artificielles est due au manque de maturité ou de qualité des embryons, à la nécessité d'induire une phase de repos ou à l'absence d'une méthode adéquate de conservation. Or la solution à toutes ces difficultés relève principalement d'une meilleure compréhension du processus embryogène et vraisemblablement d'une capacité à contrôler parfaitement les conditions de culture.

Quelque soit l'application immédiate ou future de l'embryogenèse végétale somatique, son succès est essentiellement fonction de deux choses: l'état d'avancement des connaissances et sa rentabilité. L'importance de poursuivre les recherches pour mieux connaître l'embryogenèse et obtenir de façon reproductible des embryons de la meilleure qualité possible fait l'unanimité. Quant à la rentabilité d'une application, si les chercheurs reconnaissent généralement qu'elle dépend toujours en partie de la valeur économique de la variété en cause et de la compétitivité de l'application, plusieurs oublient qu'elle dépend aussi très souvent de la technologie et du degré d'automatisation en cause (Fujii et al. 1987, Styer 1985, Vasil 1988). Dans cette perspective, il ne fait aucun doute que l'usage de bioréacteurs bien adaptés à la culture des embryons somatiques est nécessaire autant à l'accroissement des connaissances qu'au développement d'applications commercialement réalistes.

2.2 PARAMÈTRES DE CULTURE ET OBTENTION D'EMBRYONS SOMATIQUES

Cette seconde section du Chapitre 2 porte sur des aspects importants des paramètres de culture *in vitro* qui doivent être considérés pour obtenir des embryons somatiques. Ces aspects sont revus systématiquement dans les huit sous-sections qui suivent en mettant l'accent sur le cas de la carotte lorsque l'information est disponible.

2.2.1 TISSUS et CELLULES EMBRYOGÈNES

Bien qu'en culture *in vitro* on reconnaisse que des embryons somatiques sont produits plus facilement à partir de tissus immatures, peu ou pas différenciés ou qui proviennent de jeunes pousses (Carman 1990, Nouaille & Pétiard 1988, Thorpe 1988, Vasil & Vasil 1980), pour plusieurs espèces on ne peut obtenir des embryons somatiques qu'en utilisant du tissu d'une seule partie ou de certaines parties spécifiques du corps d'un plant mature (Ammirato 1983a, Hu & Wang 1986). Cependant *Daucus carota* n'est pas l'une de ces espèces car des embryons somatiques ont été obtenus en cultivant des tissus provenant de pratiquement toutes les parties d'un plant de carotte dont entre autres: de la racine principale ou pivotante (Steward et al. 1958b), des racines adventives (Smith & Street 1974), des pétioles (Evans et al. 1981, Halperin 1964 & 1966), des pédoncules floraux (Halperin & Wetherell 1964a), de la portion à la base des cotylédons d'une plantule (Fujimura & Komamine 1979a), d'embryons zygotiques retirés de leurs enveloppes (Smith & Krikorian 1989 & 1990a & c, Steward et al. 1964), de protoplastes (Kameya & Uchimiya 1972) ou encore des portions du méricarpe de semences nouvellement germées (Smith & Krikorian 1989 & 1990a & c). Cette facilité à obtenir des embryons somatiques de carotte explique en grande partie pourquoi cette espèce est devenue l'un des modèles biologiques de l'embryogenèse somatique. Par ailleurs, il existe aussi des indications à l'effet que l'origine des tissus cultivés pour obtenir des embryons serait une variable importante de la variation somaclonale définie en 2.1.6.2 (Evans & Sharp 1986). On croit, par exemple, que des lignées cellulaires développées à partir de tissus de méristèmes auraient une meilleure stabilité génétique (Vasil 1987). Enfin la surface de tout tissu devant être désinfectée complètement avant sa mise en culture, il importe d'utiliser ou d'adapter une méthode chimique qui ne l'endommage pas (Evans et al. 1981, Hu & Wang 1986, Seabrook 1980).

Les caractéristiques histologiques générales des cellules embryogènes (sous-section 2.1.2) valent évidemment pour celles de *Daucus carota*. De plus, les suspensions cellulaires de carotte présentant habituellement des cellules de formes et de dimensions diverses, on a observé que dans certaines conditions de culture, 90% des cellules sphériques d'environ 12 μm de diamètre se différencient pour donner des embryons, 10% des cellules ovales font de même, mais qu'aucune cellule de forme allongée ne se différencie (Nomura & Komamine 1985). Ces résultats sur la composition cellulaire d'une lignée embryogène de carotte suggèrent aussi des scénarios possibles pour expliquer que des lignées-soeurs obtenues par sous-culture d'une même suspension et maintenues dans les mêmes conditions, produisent souvent des quantités et des qualités différentes d'embryons (Drew 1979, Lutz et al. 1985). Par ailleurs, il importe de rappeler que les cellules embryogènes de carotte cultivées en suspension forment des amas cellulaires de 50 à 100 μm de diamètre à partir desquels se développent des embryons (Halperin 1966, Jones 1974 a & b, McWilliam et al. 1974, Nomura & Komamine 1986b).

2.2.2 PRÉPARATION D'UN INOCULUM

L'inoculum d'une culture d'embryons somatiques est défini comme une portion de matériel vivant qui compte des cellules embryogènes dont on ensemence un milieu frais (solide ou liquide) afin d'amener celles-ci à se multiplier. Un tel inoculum peut provenir d'un cal ou d'une suspension et le type de multiplication (différenciée ou non) dépend de la composition du nouveau milieu de culture. À moins d'indications contraires, les inocula et les milieux inoculés dont il est question dans le présent mémoire sont sous forme liquide (culture en suspension).

Parce que les cellules embryogènes de carotte forment des amas et compte tenu des problèmes concomitants de synchronie et d'hétérogénéité des cultures embryogènes, de nombreux groupes de recherche utilisent des inocula résultants d'une ou plusieurs filtrations. Par exemple dans le cas de *Daucus carota*, on forme très souvent un inoculum à partir de la fraction de matériel qui n'est pas retenu par un filtre d'environ 100 μm mais qui l'est par un filtre de 43 à 55 μm (Coutos-Thevenot et al. 1990,

Dijkema et al. 1988, Fujimura & Komamine 1979a, Giuliano et al. 1983, Halperin 1964 & 1966, Hari 1980, Huang et al. 1992 & 1993, Jansen et al. 1990, Jay et al. 1992 & 1994, Michalczuk et al. 1992, Molle et al. 1993, Schiavone & Cooke 1985, Timmers et al. 1989, Wetherell 1984). D'autres équipes plus exigeantes n'utilisent que la fraction passant un tamisage de 63 μm mais retenue par un tamis de 37 μm (Kamada et al. 1989, Kamada & Harada 1979a & b, Satoh et al. 1986,) ou de 32 μm (Masuda et al. 1991). On profite parfois d'une filtration pour rincer le matériel embryogène à l'aide de milieu frais afin de le laver de substances potentiellement indésirables.

L'inoculation d'un certain volume de milieu frais à des fins de repiquage cellulaire pour l'entretien périodique d'une suspension embryogène diffère de celle à des fins de production d'embryons par rapport à la quantité d'inoculum utilisée. Alors que l'inoculum d'un repiquage cellulaire est typiquement fixé entre 15 et 25 % du volume total inoculé, la proportion d'inoculum pour la production d'embryons somatiques est comparativement plus faible et les façons d'exprimer celle-ci varient beaucoup d'un protocole à l'autre. Par exemple, on s'assure parfois de la présence d'un nombre minimal ou maximal de cellules ou d'amas par unité de volume total inoculé, alors que dans d'autres cas on considère le poids ou le volume de matériel embryogène décanté, filtré, sédimenté et/ou centrifugé.

Cette absence de ligne directrice claire quant à l'inoculation à des fins de production reflète en bonne partie la controverse entourant les effets proposés de la densité des suspensions sur l'embryogenèse somatique. Dans certains cas, il semble qu'une inoculation à faible densité (parfois si peu que 0,1 % du volume total inoculé) permettrait d'obtenir une meilleure production d'embryons somatiques (De Vries et al. 1988b, Kitto & Janick 1985b, Molle et al. 1993, Nouaille & Pétiard 1988, Sharp et al. 1980), alors que Ducos et collègues (1993) produisant des embryons somatiques de carotte dans un bioréacteur de dix litres obtiennent leurs meilleurs résultats pour une cuvée inoculée à 1,0% (v/v) comparativement à d'autres cuvées inoculées à 0,05% et 0,1%.

D'autre part, Halperin (1967) rapporte que pour des inocula représentant

moins que 20% du volume total d'une suspension cellulaire de carotte, les embryons obtenus sont d'autant moins nombreux et moins matures que la dilution est grande. S'inspirant d'observations analogues sur des cultures de cellules de mammifères, ce dernier propose que ce résultat peut être dû à une trop grande dilution dans le milieu de culture de "métabolites cruciaux". Concluant aussi à l'importance de la densité, Hari (1980) démontre cependant qu'une faible densité d'inoculum peut être compensée par l'ajout d'un extrait de milieu provenant d'une suspension cellulaire dense, ce qui suggère effectivement que la bonne complétion du processus embryogène requiert la présence de métabolites synthétisés par les cellules.

Des études confirment que les métabolites en cause sont vraisemblablement des protéines (De Vries et al. 1988a, Komamine et al. 1992, Sterk & De Vries 1993, Sung & Okimoto 1981) et qu'une densité minimale d'inoculum est nécessaire à l'obtention d'embryons normaux (Warren & Fowler 1981). D'après le professeur Kamada (communication personnelle) la densité d'inoculum serait un faux problème même si, lors de culture en suspension, elle aurait un effet indirect sur l'atteinte des seuils de concentration des substances stimulant l'embryogenèse et de celles qui, peut-être, l'inhibent. Ainsi, tant que l'équilibre entre ces substances demeure favorable à l'embryogenèse, la seule chose importante serait que tous les nutriments soient présents en concentrations suffisantes pour supporter l'activité embryogène de la culture. En conséquence, une limitation nutritionnelle quelconque qu'on ne détecte pas, comme cela semble être le cas avec Molle et collègues (1993), peut mener facilement à des conclusions erronées quant aux effets de la densité de l'inoculum.

2.2.3 MILIEUX DÉFINIS CHIMIQUEMENT ET PRINCIPAUX NUTRIMENTS

Le début de la culture de cellules et de tissus de végétaux se confond avec les découvertes des composantes essentielles des milieux de culture (Gautheret 1985, Murashige 1977). Un très grand nombre de milieux de culture ont été élaborés en fonction de besoins spécifiques, si bien que Huang et Murashige (1976) comparent la composition d'une quinzaine d'entre eux. D'après la littérature, les milieux de base les plus utilisés pour

l'obtention d'embryons somatiques sont le SH (Schenk & Hildebrandt 1972), le B5 (Gamborg et al. 1968) et le MS (Murashige & Skoog 1962), tous des milieux considérés comme fortement concentrés en sels minéraux (Ammirato 1983a). De plus, parmi ces trois milieux environ 70% des cultures embryogènes sont effectuées avec MS ou ses dérivés (Ammirato 1983a, Thorpe 1988).

De façon générale, un milieu de culture élémentaire compte au moins deux types de composantes: des sels minéraux et des éléments organiques. Les sels minéraux sont départagés en macronutriments et micronutriments selon qu'ils sont requis en concentrations plus (mM) ou moins (μ M) élevées pour la croissance et le développement des cellules végétales. Les macronutriments indispensables sont: l'azote qui sert dans la synthèse des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines, des chlorophylles et des enzymes; le phosphate qui est impliqué dans toutes les voies métaboliques importantes (synthèses de protéines, respiration cellulaire et photosynthèse) et qui est un élément des phospholipides; le potassium qui catalyse plusieurs réactions enzymatiques et qui entre dans la synthèse des protéines et des glucides; le calcium qui joue un rôle dans l'assimilation de l'azote, dans la croissance cellulaire ainsi que comme cofacteur de certaines enzymes; le soufre, communément fourni sous forme de sulfate, qui est un constituant de certains acides aminés et vitamines; et le magnésium qui est un élément essentiel de la chlorophylle, de certaines vitamines et qui entre dans la formation d'acides aminés, de lipides et de glucides. Bien qu'on considère le sodium et le chlore comme n'étant ni bénéfiques ni néfastes pour les cultures végétales, ils se retrouvent souvent en grandes proportions dans les milieux puisqu'ils y sont à titre de contre-ions de plusieurs macronutriments. Au moins huit micronutriments sont utilisés pour la culture de cellules et de tissus végétaux: le bore, le cobalt, le cuivre, l'iode, le manganèse, le molybdène, le zinc et le fer (Ozias-Akins & Vasil 1985). Habituellement le fer est mieux assimilé sous la forme d'un chélate avec l'acide éthylènediaminetétraacétique ou EDTA (Ammirato 1983a, Singh & Krikorian 1980).

Parmi les éléments organiques d'un milieu, on retrouve des glucides, des régulateurs de croissance et/ou des hormones, des vitamines, des acides

aminés et des amides, ainsi que divers acides organiques. Pour des cultures expérimentales il est toutefois préférable de réduire le nombre et la diversité des éléments organiques à l'essentiel, soit aux glucides et aux vitamines, de manière à minimiser le nombre de variables nutritionnelles. Les régulateurs de croissance sont l'objet d'une sous-section séparée (2.2.5).

Malgré l'importance des glucides comme source première de carbone pour combler les besoins énergétiques et structuraux de cellules végétales hétérotrophes (non photosynthétiques) cultivées *in vitro*, on ne compte que quelques études critiques sur ce sujet. Levi et Sink (1990), travaillant à l'obtention d'embryons somatiques d'asperges sur géloses à partir de cals, concluent que la production est meilleure quantitativement et qualitativement avec du sucrose qu'avec des concentrations équivalentes de glucose ou de fructose. Strickland et collègues (1987), comparant systématiquement une trentaine de glucides pour l'obtention d'embryons de luzerne sur milieux gélifiés, indiquent que le maltose à une concentration (p/v) de ~4% permet le meilleur rendement, qu'en ajoutant 1% de maltose à 3% de sucrose on obtient presque trois fois plus d'embryons qu'avec 4% de sucrose seul, mais que ces effets positifs du maltose dépendent de la présence du cation ammonium en concentration suffisante (optimum de ~15 mM). Un autre groupe, adoptant une approche statistique d'optimisation et de modélisation, détermine que 20,8 g.L⁻¹ (ou 2,08 %) de sucrose avec 35 mM d'azote inorganique total sont des concentrations permettant d'obtenir une production maximale d'embryons de bouleau (Nuutila et al. 1991).

Concernant la production d'embryons somatiques de carotte, Verma et Dougall (1977) comparent une douzaine de glucides et ils déterminent que c'est avec du sucrose (~2% p/v) qu'on en obtient le plus lors de cultures en suspension liquide. Ils soulignent aussi que le ou les types de glucide et les proportions qui sont le plus appropriés à une culture donnée sont susceptibles de varier d'une espèce ou d'une lignée à l'autre et parfois même d'un stade de développement à un autre. Depuis ces travaux, les études en embryogenèse somatique sur des lignées de carotte se font principalement avec du sucrose comme source de carbone mais à des concentrations très diverses (Thorpe 1988). L'équipe de Dijkema (1988) a

démonstré que le sucrose est complètement hydrolysé en glucose et en fructose par une invertase membranaire et que seuls ces monosaccharides sont absorbés par les cellules embryogènes de carotte.

Par ailleurs, et parce que la stérilisation est une étape essentielle de la préparation d'un milieu de culture, on note que jusqu'à 70% du sucrose peut être hydrolysé durant la stérilisation à l'autoclave (Levi & Sink 1990) et qu'un milieu ne contenant que du fructose et/ou du glucose devient inhibiteur de certaines cultures végétales après une telle stérilisation (Ozias-Akins & Vasil 1985, Stehsel & Caplin 1969). En n'utilisant que du sucrose et en ne prolongeant pas indûment les temps de séjour à l'autoclave on minimise les effets négatifs de cette méthode de stérilisation. En fait, parce que la plupart des composés organiques d'un milieu de culture (incluant les vitamines et les régulateurs de croissance) risquent d'être altérés durant leur passage à l'autoclave (121°C), il est préférable de travailler avec des volumes de milieu qui requièrent un temps de stérilisation ne dépassant pas 15 à 20 minutes (Huang & Murashige 1976, Ozias-Akins & Vasil 1985, Seabrook 1980). Selon les volumes, il faut donc parfois considérer d'autres méthodes (telle que la filtration) pour stériliser les substances organiques moins stables.

Huang et Murashige (1976) mentionnent une dizaine de précurseurs vitaminiques qui sont fréquemment utilisées en culture de cellules de plantes selon les besoins. Il semble cependant que seul la thiamine soit nécessaire à la croissance végétale (Evans et al. 1981, Huang & Murashige 1976, Ozias-Akins & Vasil 1985). Dans les trois milieux de base les plus utilisés (SH, B5 & MS) pour l'obtention d'embryons somatiques, on retrouve ainsi quatre précurseurs vitaminiques: l'acide nicotinique, la pyridoxine, l'inositol et la thiamine. Les proportions de ces quatre précurseurs dans les milieux B5 et MS sont indiquées au Tableau 4.1 dans la catégorie **vitamines**. On y note que B5 contient deux fois plus d'acide nicotinique et de pyridoxine que MS, cent fois plus de thiamine et que les deux milieux ont une même concentration en inositol (Wetter & Constabel 1982). Outre cette différence remarquable, les milieux B5 et MS sont aussi distincts quant à leurs concentrations respectives en ammonium, un nutriment important pour l'embryogenèse somatique.

2.2.4 LE CAS PARTICULIER DES SOURCES D'AZOTE et CELUI DU POTASSIUM

L'importance et le choix des sources d'azote inorganique appropriées pour l'embryogenèse somatique ont constitué au départ une certaine controverse parmi les pionniers du domaine. En effet, alors que Halperin et Wetherell (1965) sont les premiers à noter que l'ion ammonium semble nécessaire à l'obtention d'embryons somatiques dans certaines suspensions cellulaires de carotte, Reinert (1967) soutient qu'il n'en est rien avec ses cultures de cals embryogènes de carotte sur géloses pour lesquelles le nitrate seul suffit. Tazawa et Reinert (1969) établissent peu après que les cellules de leurs cals embryogènes se doivent de convertir une portion d'azote en ammonium par réduction du nitrate car il semble qu'une concentration d'au moins 5 mM d'ammonium intracellulaire est un prérequis pour que des embryons se forment. Ces auteurs maintiennent cependant que la présence du cation dans le milieu de culture n'est pas nécessaire.

Wetherell et Dougall (1976) sont convaincus que les travaux sur les besoins en azote qu'on effectue avec des géloses peuvent mener à des conclusions erronées parce que les portions de cals utilisées comme inocula sont susceptibles de contenir des composés azotés réduits, tels que de l'ammonium ou des acides aminés, même si les milieux ne contiennent que du nitrate. Ils proposent d'utiliser des cultures en suspension inoculées avec de faibles volumes d'inoculum pour clarifier ces besoins nutritionnels. Ils mettent ainsi fin à la controverse en rapportant des résultats qui indiquent qu'une source d'azote réduit doit être ajoutée absolument, ne serait-ce que 0,1 mM, à des milieux contenant de 5 à 95 mM de KNO_3 afin d'obtenir des embryons de carottes et que -10 mM d'ammonium (NH_4Cl) constitue un optimum lorsque la concentration en KNO_3 se situe entre 12 et 40 mM. Ces auteurs montrent aussi que des acides organiques azotés peuvent remplacer le chlorure d'ammonium à titre de complément au nitrate de potassium. De plus, ils suggèrent que certains acides aminés comme la glutamine ou l'alanine peuvent supporter la croissance et l'embryogenèse de suspensions cellulaires de carotte en tant que source unique d'azote alors que cela ne serait pas possible lorsque l'ion ammonium constitue cette seule source (Dougall & Verma 1978).

Bien que travaillant avec des cals de carotte cultivés sur des milieux gélosés, Kamada et Harada (1979b & 1984a&b) confirment plus tard l'ensemble des résultats précédents et ils proposent que les effets stimulants de composés azotés réduits (ammonium et/ou acides aminés) sur l'embryogenèse somatique s'expliquent par le fait que ces derniers sont immédiatement utilisables pour la synthèse de protéines essentielles telles que les enzymes du métabolisme de l'azote, ce qui permet la prolifération cellulaire rapide requise par la formation d'embryons.

Dans la même perspective, des travaux avec différentes lignées de cellules de luzerne (*Medicago sativa*) indiquent globalement qu'une source exogène d'ammonium est nécessaire à l'embryogenèse et que des milieux contenant de 10 mM à 25 mM de ce cation avec 25 mM de nitrate ou des concentrations élevées d'alanine (50 mM), d'arginine (30 mM), de glutamine (30 mM) ou de proline (100 mM) favorisent, selon le cas, une augmentation du nombre d'embryons et/ou de leur qualité (Meijer & Brown 1987, Stuart & Strickland 1984a&b, Walker & Sato 1981). Stuart et ses collègues (1985a) rapportent aussi que l'ammonium agirait en synergie avec ces acides aminés pour stimuler l'embryogenèse de lignées de luzerne et qu'une concentration de 5 à 7,5 mM d'ammonium serait optimale pour l'obtention d'embryons de céleri.

On retient de ces travaux et de ceux sur d'autres espèces (Ozias-Akins & Vasil 1985) que, dans l'ensemble, s'il est probable que tout milieu de production d'embryons doit contenir une ou plusieurs sources d'azote réduit en complément au nitrate, il est certain que la nature, les meilleures combinaisons et les concentrations de ces sources doivent être étudiées pour chaque espèce ainsi que pour chaque lignée considérées (Stuart et al. 1985b). Par ailleurs, d'autres résultats suggèrent que l'embryogenèse chez certaines lignées de luzerne dépendrait d'interactions entre le(s) régulateur(s) de croissance et l'ammonium (Sharp et al. 1980, Walker & Sato 1981) ainsi qu'entre le maltose et ce cation lorsqu'il est présent à une concentration optimale de 15 mM (Strickland et al. 1987).

En ce qui concerne le potassium, Tazawa et Reinert (1969) travaillant avec des cals de carotte cultivés sur géloses sont les premiers à remarquer que

ce cation a un effet positif pour l'obtention d'embryons lorsque le milieu de culture contient une certaine quantité d'ammonium comme source d'azote. C'est cependant à Brown et collègues (1976) que revient le mérite d'avoir étudié systématiquement les besoins en potassium de suspensions embryogènes de cellules de carotte. Ceux-ci font plusieurs constats intéressants dont: 1) que la croissance globale de la biomasse (évaluée à partir de la concentration de biomasse sèche finale) n'est pas affectée par la concentration en potassium; 2) que l'embryogenèse dépend en partie du potassium puisque le nombre final d'embryons tend à croître avec l'augmentation de la concentration du cation; 3) que l'usage du KCl comme source de potassium se traduit par une production maximale d'embryons pour une concentration de ~30 mM; 4) que l'usage du K_2SO_4 comme source de potassium se traduit par une production maximale d'embryons pour une concentration de ~20 mM; 5) que la croissance et l'embryogenèse sont inhibées par l'anion phosphate lorsque sa concentration excède 1 mM comme contre-ion de K^+ , mais qu'elles ne le sont pas par les contre-ions chlorure et sulfate. Par contre, ces chercheurs ne parviennent pas à démontrer qu'un accroissement de la concentration en ammonium de leur milieu de base (7,5 mM de L-glutamine) entraîne une augmentation de la production d'embryons de carotte et ce, même si la concentration en potassium est accrue (Brown et al. 1976).

2.2.5 LES RÉGULATEURS DE CROISSANCE

L'étude des substances et des mécanismes impliqués dans la régulation du cycle de vie des plantes constitue l'un des plus importants domaines de recherche de la physiologie végétale (Takahashi 1986). Dans ce contexte, et compte tenu de l'abondance de la littérature portant sur ce sujet fort complexe, cette sous-section vise seulement à fournir l'information permettant de mieux situer l'usage qui est fait de certains régulateurs de croissance en embryogenèse somatique.

La première précision qui s'impose est d'ordre terminologique car la littérature de ce jeune domaine de recherche est marquée depuis le début des années 1980 par une controverse entourant le concept d'hormone. Celui-

ci étant emprunté de la physiologie animale, certains reprochèrent alors aux physiologistes des plantes d'avoir été plus préoccupés à trouver des caractéristiques communes aux hormones végétales et animales qu'à étudier les caractéristiques uniques des premières (Davies 1987, Guern 1987). En conséquence, même si des composés naturels d'origine végétale tels que des brassinolides (Takahashi 1986), des oligosaccharides (Guern 1987) ou des polyamines (Davies 1987) seront vraisemblablement considérées un jour comme des hormones, il est préférable de s'en tenir au point de vue classique présentement admis voulant que les cinq groupes de substances possédant les caractéristiques typiques des hormones endogènes végétales sont: les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscisique et l'éthylène. En plus de ces hormones, il existe plusieurs autres substances naturelles d'origine végétale ou non qui agissent de façons diverses sur la physiologie des plantes et que Takahashi (1986) considèrent comme des régulateurs de la croissance végétale. Bien que ce vocable soit utilisé de manière restrictive par l'industrie agrochimique pour ne désigner que les substances obtenues par synthèse chimique (Davies 1987), dans le cadre de ce mémoire le terme régulateur de croissance est retenu et sa définition est élargie pour inclure toute substance (naturelle ou non) qui ne compte pas parmi les hormones végétales mais qui agit sur le développement de certaines plantes ou cellules végétales. Donc, parler d'une auxine, d'une cytokinine, d'une gibbérelline, de l'acide abscisique ou de l'éthylène c'est se référer essentiellement à une hormone végétale naturelle, alors que parler d'un régulateur de croissance de type auxine c'est faire référence à un composé naturel ou à un produit de synthèse qui agit (ou semble agir) comme une auxine.

Dans la littérature on associe chaque hormone (ou groupe d'hormones) végétale à un très grand nombre d'effets sur le développement des plantes, mais on en sait comparativement très peu sur les mécanismes biochimiques en cause (Davies 1987). Le Tableau 2.1 résume les effets dus aux hormones qui sont souvent rapportés comme pertinents pour la culture *in vitro* de tissus végétaux et de cellules de plantes. Outre le composé de référence (acide indole-3-acétique ou IAA), le groupe des auxines comprend ses précurseurs biochimiques et probablement certains de ses conjugués (Davies 1987). Ces hormones étant peu stables chimiquement, elles se prêtent mal

aux exigences de la culture *in vitro*. On utilise donc généralement des substances synthétiques plus stables qui ont des effets similaires à ces auxines. Parmi ces régulateurs de croissance de type auxine, l'acide α -naphtalène acétique (NAA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) sont les plus utilisés (Dougall 1980, Ozias-Akins & Vasil 1985). À la différence des auxines, les hormones du groupe des cytokinines (zéatine et certains autres dérivés d'adénine substitués en N⁶) sont couramment utilisées en culture de cellules ou tissus de plantes. À ces dernières s'ajoutent le 6-furfurylamino purine (kinétine) et le 6-benzylamino purine (BAP), deux régulateurs synthétiques de type cytokinine qui sont aussi très employés (Dougall 1980, Ozias-Akins & Vasil 1985).

Il existerait une soixantaine de gibbérellines (GAs) d'origine végétale, mais l'acide gibbérellique (GA₃) d'origine fongique étant plus facilement disponible c'est elle qu'on utilise principalement en culture *in vitro* dans les cas où une GAs s'avère avantageuse (Ammirato 1977 & 1983a, Davies 1987, Huang & Murashige 1976). L'acide abscisique (ABA) que l'on appelle aussi hormone de dormance ou encore dormine est utilisée en embryogenèse car il est démontré que dans certains cas elle agit positivement sur la maturation des embryons somatiques en empêchant ou en réduisant le développement de structures embryonnaires anormales (Ammirato 1977 & 1983a, Finkelstein & Crouch 1986 & 1987, Finkelstein et al. 1985, Kamada & Harada 1979a). Autrement, on considère que l'ABA comme la GA₃ inhibent l'embryogenèse végétale somatique (Fujimura & Komamine 1975). Quant à l'éthylène (C₂H₄), on ne l'emploie pas délibérément *in vitro* parce qu'il accélère la sénescence des cultures. Cependant, l'éthylène étant un gaz auquel on s'intéresse pour les effets de sa production par et sur des cellules ou des tissus cultivés, une partie de la sous-section 2.2.7 y est consacrée.

Le développement de lignées de cellules végétales embryogènes peut se faire sans recourir aux hormones ou régulateurs de croissance. Cependant la méthode d'induction la plus courante consiste à ajouter à un premier milieu de culture un ou plusieurs régulateurs de croissance de type auxine et/ou des autres types (Ammirato 1977, Fujimura & Komamine 1975). On uti-

Tableau 2.1

Principaux effets physiologiques des hormones végétales rapportés pour la culture *in vitro* de tissus végétaux et pour l'embryogenèse somatique (Davies 1987, Dougall 1980)

<u>HORMONE ou GROUPE D'HORMONES</u>	<u>COMPOSÉ NATUREL de RÉFÉRENCE</u>	<u>ABBREVIATION</u>	<u>PRINCIPAUX EFFETS</u>
Groupe des auxines	acide indole-3-acétique	IAA	Elles stimulent la différenciation cellulaire et l'induction racinaire. Elles suppriment la formation de jeunes pousses.
Groupe des cytokinines	zéatine et autres dérivés de l'adénine substitués en N ⁶	ZEA	Elles sont impliquées dans la division et la différenciation cellulaires des méristèmes adventifs.
Groupe des gibbérellines	ent-gibberellane	GAs	Connues pour casser la dormance de graines, elles sont peu utilisées en culture <i>in vitro</i> car elles supprimeraient l'organogenèse et l'embrogenèse somatique.
Acide abscisique	acide abscisique	ABA	L'ABA est impliqué dans la dormance des semences végétales en tant qu'inhibiteur de croissance. Il semble utile à la maturation des embryons somatiques de certaines espèces.
Éthylène	éthylène	C ₂ H ₄	De façon générale, ce gaz est produit par la plupart des végétaux en réponse à un stress et ses effets sont nombreux. En culture <i>in vitro</i> il accélère la sénescence de plusieurs tissus.

lise généralement au moins un régulateur de type auxine (Evans et al. 1981, Kamada et al. 1989) que l'on complète parfois avec un ou plusieurs régulateurs de type cytokinine (ou autre) s'il est nécessaire de moduler l'effet auxine du(des) premier(s) à des fins spécifiques (Ammirato 1977). Ainsi le 2,4-D est souvent utilisé seul à des concentrations variant selon les espèces pour le développement de lignées embryogènes puisqu'il est l'inducteur le plus efficace de tous les composés synthétiques connus (Ammirato 1983a). L'utilisation du 2,4-D seul étant la méthode d'induction retenue dans le cadre des travaux rapportés dans ce mémoire, il importe de revoir ici certaines des hypothèses et des concepts les plus fréquemment évoqués pour expliquer son action sur les cellules cultivées *in vitro*, même si les mécanismes moléculaires fondamentaux en cause ne sont pas encore élucidés (De Vries et al. 1988b, Jacobsen 1991, LoSchiavo et al. 1989).

Dougall (1980) rapporte que l'absence d'auxine dans une cellule inhibe la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) et donc la division cellulaire. Celui-ci souligne qu'il n'y aurait division des cellules que si la concentration intracellulaire en 2,4-D est supérieure à un certain seuil et que cette concentration serait contrôlée par la différence de pH entre l'intérieur des cellules et leur milieu de culture (Dougall 1980). Ceci est en accord avec des hypothèses formulées vers 1975 et voulant que les auxines naturelles agissent possiblement sur des systèmes qui contrôlèrent les courants ioniques à l'intérieur des membranes cellulaires (Sharp et al. 1980). Ces hypothèses sont aussi compatibles avec des observations voulant que le potentiel embryogène de lignées cellulaires de carotte contenant une concentration donnée de 2,4-D dépendrait de la présence d'une concentration minimale en ion ammonium (Sharp et al. 1980, Tazawa & Reinert 1969).

Sans contredire ces premiers éléments explicatifs, des études effectuées après 1978 suggèrent plutôt que la présence d'un régulateur exogène comme le 2,4-D agirait sur les cellules cultivées en affectant d'abord leurs niveaux de production d'auxines endogènes telle que l'IAA, niveaux qui eux détermineraient le potentiel embryogène de ces cellules ainsi que tout le

processus développemental des embryons (Fujimura & Komamine 1980b, Michalczuk et al. 1992, Tianran & Neumann 1985). Par exemple, la formation des amas cellulaires (première étape de l'embryogenèse somatique) et le passage de ceux-ci au stade globulaire requerraient des concentrations endogènes et/ou exogènes particulières d'auxine(s) et/ou de régulateur(s) de croissance de type auxine (LoSchiavo et al. 1991). De plus, il semble que si la présence de 2,4-D exogène en concentration suffisante induirait le développement d'embryons somatiques jusqu'au stade globulaire, elle constituerait toutefois un inhibiteur puissant de tout développement ultérieur (Borkird et al. 1986). C'est pourquoi les embryons ne peuvent généralement poursuivre leur développement qu'en étant transférés dans un milieu de culture secondaire dont la concentration en régulateur de croissance ou en hormone de type auxine est nulle ou à tout le moins très réduite. En fait on croit qu'au-delà du stade globulaire, les gradients de concentration en substance(s) de type auxine présente(s) et/ou produite(s) à l'intérieur des cellules d'embryons détermineraient le développement bipolaire caractéristique des stades cordiforme et torpille (Fujimura & Komamine 1979b, Liu et al. 1993, Michalczuk et al. 1992, Schiavone & Cooke 1987, Schiavone & Racusen 1990). Enfin, il est important de souligner qu'à la toute première étape du développement d'une lignée embryogène, lorsqu'on place un morceau de tissu végétal dans un milieu de culture primaire contenant du 2,4-D, toutes les cellules de ce tissu ne sont pas réceptives à l'action du régulateur. Les cellules réceptives forment des amas cellulaires où débute le processus de différenciation menant au stade globulaire alors que les autres, insensibles au 2,4-D, restent des cellules végétatives qui se multiplient sans se différencier (LoSchiavo et al. 1991). En conséquence, toute lignée embryogène consiste en un mélange hétérogène d'embryons (cellules différenciées) à différents stades de développement et de cellules indifférenciées.

La concentration de 2,4-D que doit contenir un milieu de culture primaire afin d'induire l'embryogenèse de cellules cultivées *in vitro* peut varier de 0,1 à plus de 10 mg.L⁻¹ selon les espèces et les variétés végétales (Fujimura & Komamine 1975, Huang & Murashige 1976). Chaque cas étant particulier, on procède empiriquement en cherchant à déterminer la quantité minimale de 2,4-D menant aux résultats souhaités. Certaines

présomptions, bien que controversées, suggèrent que la variation somaclonale pourrait être reliée à l'utilisation abusive des régulateurs de croissance. Dans cette optique, il est intéressant de noter que des travaux sur la production d'embryons de soya montrent qu'en comparaison à un milieu de culture primaire contenant une concentration donnée de 2,4-D, de meilleurs résultats sont obtenus si le milieu contient une concentration dix fois moindre d'un mélange de six régulateurs de type auxine (dont le 2,4-D) présents en proportions égales (Ranch 1993). C'est donc dire que l'usage du 2,4-D seul n'est pas toujours la méthode la plus appropriée et qu'il y a encore un très grand nombre d'avenues à explorer concernant l'emploi de régulateurs de croissance en embryogenèse.

2.2.6 L'OXYGÈNE

Puisque les embryons somatiques produits *in vitro* obtiennent leur énergie par l'oxydation des glucides, c'est à l'oxygène (dans ce cas accepteur final d'électrons de la respiration cellulaire) que l'on pense en premier quand on considère les gaz qui sont susceptibles d'influencer l'embryogenèse des végétaux. D'ailleurs l'importance évidente de l'oxygène est soulignée dans de nombreuses publications anciennes et récentes. Cependant lorsqu'on collige des travaux traitant concrètement des effets de l'oxygène sur l'obtention d'embryons somatiques, on est forcé de faire trois constats: 1) l'intérêt pour ce gaz ne commence réellement qu'une quinzaine d'années (Kessell & Carr 1972) après les premières recherches sur l'embryogenèse somatique vers 1957, 2) il y a relativement peu de publications disponibles sur le sujet et 3) on ne peut rien conclure de définitif à partir de celles-ci. Le Tableau 2.2 rend compte de quatorze articles scientifiques traitant de certains effets de la concentration en oxygène sur l'obtention d'embryons somatiques. Pour les cultures en suspension on parle généralement de concentration en oxygène dissous ($[O_2d]$) qui, sauf indication contraire, correspond au % de saturation d'air dans l'eau ou dans le milieu de culture, alors que pour celles sur géloses on parle de concentration d'oxygène ($[O_2]$) dans la phase gazeuse du récipient de culture.

Pour la culture sur gélose, bien qu'aucun des travaux rapportés au Tableau 2.2 ne concerne des lignées de carotte, ceux-ci laissent entendre que l'oxygène est nécessaire à l'embryogenèse (Dunwell 1979) mais qu'une concentration plutôt faible dans la phase gazeuse ($\sim 9\%$ ou $3,2 \text{ mmol.L}^{-1}$) est préférable (Carman 1988 & 1989). De leur côté, Kvaalen et von Arnold (1991) sont particulièrement sagaces lorsque, essayant de concilier les résultats divergents des rares études pertinentes, ils remarquent qu'une faible concentration d'oxygène semble favoriser l'embryogenèse quand on la combine avec des milieux contenant de fortes concentrations d'azote réduit et qu'inversement une concentration élevée d'oxygène semble stimuler celle-ci lorsqu'elle est combinée avec des milieux contenant peu d'azote réduit (Kvaalen & von Arnold 1991).

Pour neuf des articles rapportés au Tableau 2.2, les embryons furent cultivés en milieux liquides (suspensions) dans des bioréacteurs (S-B). De ces articles, les quatre portant sur des lignées de carotte cultivées en milieu MS ne permettent pas de trancher quant au choix d'une concentration optimale d'oxygène (Jay et al. 1992, Kessell et al. 1977, Kessell & Carr 1972, Nishimura et al. 1993). D'une part, Kessell et Carr (1972) déterminent un seuil critique de 16% d'oxygène dissous (% de saturation d'air dans l'eau) en-dessous duquel l'embryogenèse se trouve favorisée. Ce seuil est aussi corrélé avec un accroissement de la concentration en adénosine-5'-triphosphate (ATP) intracellulaire (Kessell et al. 1977). D'autre part, Jay et collègues (1992) obtiennent 3,5 fois plus d'embryons en contrôlant la concentration à 100% d'oxygène dissous par rapport à 10% , alors que Nishimura et collègues (1993) dénombrent au moins cent embryons de plus par mL lorsque la concentration en oxygène dissous est maintenue au-delà de 88% par rapport à $\sim 53\%$. S'il faut reconnaître que la méthode de contrôle des gaz utilisée par l'équipe française (Jay et al. 1992) est techniquement meilleure que celle des équipes anglaises (Kessell et al. 1977, Kessell & Carr 1972), il demeure qu'on ne peut pas rejeter la valeur seuil de 16% en se basant seulement sur l'expérimentation à deux concentrations extrêmes comme 10% et 100% .

Tableau 2.2

Publications où sont rapportés des effets de l'oxygène sur l'obtention d'embryons somatiques par culture *in vitro*

PUBLICATION		CULTURE			PRINCIPALES OBSERVATIONS
AUTEUR(S)	ANNÉE	MATÉRIEL	TYPE	MIL.	
Archambault J et al.	1994a	Cellules de <i>Eschscholtzia californica</i> transformées avec A.r.	S-B S-F	B5	a) peu d'ES et de biomasse sèche lorsque $[O_2d] < 10\%$ b) peu d'ES mais beaucoup de biomasse pour $[O_2d] = 60\%$ c) $[O_2d]$ contrôlée à -20% - Meilleure production d'ES
Carman JG	1988 & 1989	Graines de <i>Triticum a.</i>	Gel	2xMS	Plus d'ES adventifs pour $[O_2] = 9\%$ de la phase gazeuse
Chen THH et al.	1987	Cellules de luzerne	S-B	Kao	Formation accrue d'ES pour $13,5\% \leq [O_2d] \leq 50\%$
Dunwell JM	1979	Anthères de <i>N. tabacum</i>	Gel	H	Développement d'ES inhibé en absence d' O_2 dans la phase gazeuse
Greidziak N et al.	1990	Cellules de <i>Digitalis lanata</i>	S-B & S-F	Nm V-M	Bon développement d'ES lorsque $[O_2d]$ décroît linéairement de 100 à 5 unités relatives (?) sur 24 jours
Huang L-C et al.	1992	Cellules & ES de <i>D. carota</i>	S-F	MS	Relation entre développement des ES & réduction du taux vol. d'util. d' O_2 (OUR)
Jay V et al.	1992	Cellules de <i>Daucus carota</i>	S-B	MS	600 ES.mL ⁻¹ pour $[O_2d] = 100\%$ 170 ES.mL ⁻¹ pour $[O_2d] = 10\%$
Kessell RHJ & Carr AH	1972	Cellules de <i>Daucus carota</i>	S-B	MS	Maintien de $[O_2d]$ sous $\sim 16\%$ ($\sim 0,04$ mmole.L ⁻¹) favorise l'embryogenèse
Kessell RHJ et al.	1977	Cellules de <i>Daucus carota</i>	S-B	MS	$[O_2d]$ sous le seuil de 16% cause aussi l'accroissement de l'ATP intracellulaire
Kvaalen H & von Arnold S	1991	Graines de <i>Picea abies</i>	Gel	LP & $\frac{1}{2}$ LP	Faible $[O_2]$ (pression partielle = 5 kPa) favorable avec LP mais pas avec $\frac{1}{2}$ LP
Nishimura S et al.	1993	Cellules de <i>Daucus carota</i>	S-B	MS+ ala	~ 390 Es.mL ⁻¹ quand $[O_2d]$ maintenue $> 88\%$ (7,5 ppm)
Preil W et al.	1988	Cellules de <i>Euphorbia p.</i>	S-B	MS	Meilleure croissance des cellules pour $[O_2d] = 60\%$
Stuart DA et al.	1987	Cellules de luzerne	S-B & S-F	SH+ NH ₄ ⁺	$[O_2d] > 70\%$ serait nécessaire au développement des ES

Gel : gélose

S-F : suspension en flacons agités

S-B : suspension en bioréacteurs

ES : embryons somatiques

Par ailleurs, les travaux en bioréacteurs effectués avec des embryons de luzerne (mais avec des milieux différents) ne sont pas plus concluants puisque, d'un côté, on avance qu'il y a formation accrue de ceux-ci quand la concentration en oxygène dissous se situe entre 13,5% et 50% (Chen et al. 1987), alors que de l'autre on suggère qu'une concentration supérieure à 70% serait nécessaire à leur développement complet (Stuart et al. 1987). Dans ces circonstances, il ne faut pas négliger l'information qui peut être tirée des trois autres études du Tableau 2.2 impliquant l'usage de bioréacteurs même si elles portent sur trois espèces différentes cultivées dans trois milieux différents. En fait, les résultats de ces trois études sont compatibles et ils indiquent qu'en suspension: 1) la biomasse des cultures embryogènes croît mieux avec une concentration en oxygène dissous de ~60% (Archambault et al. 1994a, Preil et al. 1988); 2) on observe un bon développement embryonnaire lorsque la concentration en oxygène décroît linéairement en cours de culture (Greidziak et al. 1990); 3) il y a peut-être pour chaque espèce ou même pour chaque lignée une concentration en oxygène dissous permettant une meilleure production d'embryons; 4) que les effets de l'oxygène se combine vraisemblablement à ceux d'autres facteurs (concentrations d'autres gaz, cisaillement, milieu de culture) pour influencer l'embryogenèse somatique.

S'il est clair que la disparité des observations fournies dans cette douzaine de publications s'explique en partie par la disparité des types, des modes et des milieux de culture utilisés ainsi que celle des espèces en cause, une tendance semble toutefois se dessiner. En combinant les observations rapportées (particulièrement les trois dernières du paragraphe précédent) avec des résultats indiquant que le taux volumétrique d'utilisation de l'oxygène (Oxygen Uptake Rate ou OUR) des embryons somatiques de carotte diminue avec leur développement (Huang et al. 1992) il est logique de considérer sérieusement qu'il pourrait y avoir une concentration optimale d'oxygène pour chacun des stades du développement embryogène. Ceci aurait aussi été observé par des pionniers de l'embryogenèse (Kamada & Harada 1979b, Newcomb & Wetherell 1970) et une étude sur une espèce de patate douce le confirmerait non seulement pour l'oxygène, mais aussi pour l'éthylène et le dioxyde de carbone, deux gaz dont il est question à la sous-section suivante (Bieniek et al. 1991). Il

est donc inévitable que la pertinence des travaux futurs portant sur l'oxygène dépendra en partie de la capacité des chercheurs à déterminer comment et pourquoi chaque stade de développement des embryons somatiques d'une lignée donnée est affecté par des variations de concentrations de ce gaz en tenant compte des relations possibles avec d'autres paramètres de culture tel que les sources d'azote. Or dans cette perspective, il est clair que le bioréacteur constitue un outil incontournable de recherche.

2.2.7 LES AUTRES GAZ

Différents composés volatiles sont produits généralement lors de la culture *in vitro* d'embryons somatiques. Ainsi dans le cas de la carotte, il est possible d'associer des concentrations particulières de certains terpènes à chaque stade de développement des embryons (Kennedy et al. 1991), ce qui suggère que de tels composés pourraient servir de marqueurs ou d'indicateurs de l'état des cultures. Ceci étant dit, il reste que pour la culture d'embryons somatiques comme pour celle des cellules de plantes en général, l'éthylène (C_2H_4) et le dioxyde de carbone (CO_2) sont des gaz considérés plus importants parce qu'ils sont produits en plus grandes quantités que tous les autres. La présente sous-section se limite donc à regrouper, dans les deux parties suivantes, des éléments d'information pertinents qui concernent le C_2H_4 et le CO_2 .

L'éthylène est défini classiquement comme une hormone végétale et on considère habituellement qu'il accélère la sénescence des tissus cultivés *in vitro* (Tableau 2.1). Sur la base d'une revue très bien documentée, Biddington (1992) constate toutefois que l'éthylène influence probablement plusieurs aspects du développement des tissus végétaux qui ne sont pas encore appréhendés adéquatement, car on lui attribue des effets divers et parfois même contradictoires dans des systèmes similaires de culture. On retient néanmoins que: 1) la biosynthèse de l'éthylène est relativement bien connue (Yang & Hoffman 1984, Yang 1985); 2) certains éléments des milieux de culture tels que les ions argent, calcium, cobalt, magnésium et phosphate (ceux-ci devant parfois être présents en forte concentration), ainsi que des hormones, des régulateurs de croissance ou d'autres

substances produites par les cellules en développement sont susceptibles d'accroître ou de diminuer, selon le cas, la biosynthèse de l'éthylène (Biddington 1992); 3) pour les cultures en suspension, le C_2H_4 est décrit dans la littérature comme inhibant, stimulant ou sans aucun effet sur la croissance cellulaire selon les espèces, les conditions et les méthodes de culture utilisées (Biddington 1992); 4) l'hypothèse voulant que le CO_2 soit un inhibiteur ou un obstacle à l'action de l'éthylène (Yang 1985) n'est pas confirmée expérimentalement et elle est même infirmée dans certains cas (Biddington 1992).

Par ailleurs, les études concernant plus spécifiquement les effets de l'éthylène sur l'embryogenèse somatique constituent sûrement l'un des exemples les plus éloquents de la diversité et de la complexité des interactions physico-chimiques prévalant dans les cultures végétales, ainsi que du manque de connaissances qui en découle. En effet, des travaux laissent entendre que l'éthylène (produit par les cultures ou ajouté à celles-ci) agirait comme inhibiteur de l'embryogenèse pour des espèces aussi variées que l'hévéa (Auboiron et al. 1990), différents types de conifère (Biddington 1992) et la carotte (Roustan et al. 1989 a&b, 1990 a&b), alors que d'autres travaux suggèrent le contraire pour des espèces de riz (Dunwell 1979), de citrus (Biddington 1992) et de maïs (Vain et al. 1989) ou encore concluent que l'éthylène n'affecte pas l'embryogenèse de la luzerne (Meijer 1989) et même de la carotte (Smith & Krikorian 1990c). Donc, il en va vraisemblablement du C_2H_4 comme d'un grand nombre de paramètres en cause dans l'embryogenèse quant aux variations entre espèces et même entre variétés. Il est cependant important de retenir que ce gaz est produit par les cellules végétales en réponse à divers stress physiologiques. Conséquemment, les méthodes de culture et particulièrement celles relatives à l'agitation (modes et/ou régimes) dans le cas des suspensions pourraient être des variables déterminantes dans la biosynthèse de l'éthylène, car elles constituent des sources de stress potentiel (Auboiron et al. 1990, Biddington 1992).

Alors que le dioxyde de carbone ou gaz carbonique (CO_2) est la source de carbone de tous les végétaux photosynthétiques, il n'est qu'un gaz

résultant de l'oxydation des glucides lorsqu'on cultive des cellules végétales hétérotrophes en présence ou non de lumière. C'est sans doute à cause de ce rôle secondaire apparent que le CO_2 est très peu étudié pour ses effets dans des conditions de culture *in vitro*. Néanmoins on suggère que le gaz carbonique affecterait positivement des cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* (Archambault 1991, Maurel & Pareilleux 1985 & 1986), de tabac (Martin 1980a), de *Papaver somniferum* (Hammel et al. 1979) et de roses (Nesius & Fletcher 1973 & 1975), certaines cultures d'anthères (Johansson & Eriksson 1984), ainsi que des cultures embryogènes de sapin de Norvège (Kvaalen & Von Arnold 1991) et de *Digitalis lanata* (Greidziak et al. 1990). On rapporte aussi l'inverse, soit que différentes concentrations en dioxyde de carbone n'affecteraient ni le taux de croissance d'une suspension cellulaire de *C. roseus*, ni celui d'une suspension de *D. carota* (Tate & Payne 1991).

Bien que de telles observations soient trop éparses pour mener à une théorie, il y a une hypothèse intéressante qui ressort des articles mentionnés précédemment. Cette hypothèse est fondée sur le fait que les cellules de plantes ont naturellement la capacité de fixer le CO_2 au phosphoénolpyruvate (3 atomes de carbone) pour produire l'oxaloacétate (4 atomes de carbone), une molécule cumulant plusieurs fonctions métaboliques fondamentales dont celle d'être un des précurseurs de la synthèse des acides aminés et celle d'être le composé sur lequel repose la régulation du cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) qui est au centre de la respiration cellulaire (Lehninger 1982). Cette réaction, dite anaplérotique parce qu'elle fournit continuellement l'oxaloacétate au cycle de Krebs, est catalysée par la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCase). Puisque cette enzyme est active dans certaines cultures de cellules végétales, on postule que les cellules combleraient au moins une partie de leurs besoins métaboliques en carbone par la fixation non-photosynthétique du CO_2 (Payne et al. 1990). Cette hypothèse est parfaitement plausible quand on utilise des milieux de culture ne contenant qu'une source inorganique d'azote, car l'élaboration d'acides aminés draine probablement du cycle de Krebs une forte proportion des composés organiques tels que l'oxaloacétate (Payne et al. 1990). De plus,

elle est aussi valable pour les cultures embryogènes effectuées avec des milieux simples où les seuls éléments organiques sont des glucides, des vitamines, des hormones et/ou des régulateurs de croissance. Enfin, cette possibilité qu'il y ait fixation non-photosynthétique du CO_2 par des cellules cultivées *in vitro* justifie la nécessité des bioréacteurs comme outil de recherche et de production. En effet, la culture en bioréacteur, avec un système approprié de mesure et de contrôle du dioxyde de carbone, constitue le seul moyen de bien évaluer et de comprendre l'importance de ce gaz afin qu'il passe de son statut actuel de variable aléatoire à celui d'un nutriment dont la production et la fixation par les cellules végétales seront maîtrisées (Archambault et al. 1994a, Kessell & Carr 1972, Smith et al. 1990).

2.2.8 CONDITIONS PHYSIQUES DE CULTURE

Les principaux paramètres physiques susceptibles d'affecter les cultures *in vitro* de cellules et tissus végétaux sont la lumière, la température, le pH, la pression osmotique et l'humidité. D'autres facteurs tels que l'agitation et l'aération s'ajoutent à ceux-ci pour les cultures en suspension. Cette sous-section propose une revue sommaire de ces paramètres en mettant l'accent sur l'embryogenèse somatique quand la documentation le permet.

La différenciation de tissus végétaux cultivés en présence de lumière est parfois associée avec la production de certains métabolites secondaires (Seibert & Kadkade 1980, Smith & Krikorian 1990a), dont d'ABA dans le cas de suspensions embryogènes de carotte (Michler & Lineberger 1987). Or ceci n'est pas forcément souhaitable lorsqu'on veut que des embryons passent du stade d'amas cellulaire à celui de torpille. Par ailleurs, il est établi que la lumière n'est pas requise pour induire l'embryogenèse chez la carotte (Seabrook 1980). Dans ce contexte, et suivant les rares études disponibles, on comprend que l'obscurité pourrait favoriser certains aspects du processus embryogène ou à tout le moins ne serait néfaste pour aucun. Ainsi la culture sans lumière permettrait une maturation plus normale des embryons de certaines lignées de carotte (Ammirato & Steward 1971) et de carvi (Ammirato 1974), alors qu'elle mènerait à une production

d'embryons de carotte quantitativement supérieure à celle de tout autre traitement lumineux (Michler & Lineberger 1987).

La température est un facteur largement oublié en culture *in vitro*, sauf pour l'étude de traitements par le froid visant à induire des états physiologiques particuliers avec certains tissus (Ammirato 1983a, Thorpe 1980). Les travaux font surtout référence à des études effectuées dans les années 1960 et 1970 qui indiquent globalement: 1) que différentes cultures végétales croissent de manière optimale à des températures se situant entre 25 et 30°C, les taux de croissance chutant dramatiquement quand les températures sont en dehors de cette plage (Martin 1980a) et 2) qu'il est habituellement préférable de maintenir la température d'une culture constante plutôt que de la faire variée en s'inspirant de fluctuations diurnes auxquelles sont soumises les plantes dans leur habitat naturel (Seabrook 1980).

Bien que l'importance du pH pour les cultures végétales soit largement admise, l'information sur ce sujet reste rare (Dougall 1980, Dougall & Verma 1978), ce qui est plutôt étrange quand on considère que les aspects fondamentaux du pH sont très bien connus pour les plantes ou leurs cellules *in vivo* (Kurkdjian & Guern 1989, Raven 1985, Raven & Smith 1974, Smith & Raven 1976). Le pH de la plupart des milieux couramment utilisés pour la culture *in vitro* est ajusté à environ 5,5 avant stérilisation (Ozias-Akins & Vasil 1985). Bien que classé parmi les facteurs physiques, le pH n'en demeure pas moins entièrement dépendant des fluctuations de la composition chimique du milieu durant la culture. Comme elle, le pH évolue dans le temps avec la dégradation et la production d'acides et de bases, minérales ou organiques (Martin 1980a). Ainsi, à partir d'une étude sur la production d'embryons de luzerne dans un bioréacteur de type gazosiphon, Stuart et collègues (1987) rapportent que d'une valeur initiale de 5,8 le pH descend à moins de 5,0 en une heure pour remonter graduellement durant les jours suivants. Ils indiquent aussi que plus d'embryons sont obtenus lorsqu'on maintient le pH à 5,5 par titration plutôt que de le laisser fluctuer.

Dans le contexte particulier de la production d'embryons de carotte on note: 1) que le pH optimal de cultures effectuées en flacons agités serait autour de 5,4 et qu'il varierait principalement avec l'assimilation d'ammonium, de nitrate et de sucrose (Wetherell & Dougall 1976); 2) et qu'un milieu gélosé maintenu à un pH de ~4,0 permet la multiplication des amas cellulaires pré-globulaires qui, cependant, ne peuvent pas se développer davantage à moins que le milieu soit amené et maintenu à pH 5,8 (Smith & Krikorian 1988, 1990a,b & c). Dans ce dernier cas, il ne fait pas de doute que le pH affecte directement l'embryogenèse somatique car les inocula et le milieu utilisés par Smith et Krikorian ne contiennent aucun régulateur de croissance ou hormone exogènes. Tous ces constats sont à la fois confirmés et précisés par une étude effectuée récemment en bioréacteur (Jay et al. 1994). Dans cette étude, on suggère de plus que la réponse des embryons aux changements de pH dépendrait tellement du stade de développement qu'ils ont atteint, qu'on peut envisager l'utilisation de régimes particuliers de contrôle du pH pour accroître la synchronisation (et donc l'homogénéité) des cultures embryogènes et pour amener un nombre optimal d'embryons à se développer jusqu'au stade torpille.

La pression osmotique, comme le pH, est un paramètre physique directement relié à la composition chimique changeante d'un milieu de culture et ses particularités dans le monde des plantes sont aussi bien connues (Raven 1985). Un milieu de base tel que B5 ou MS (Tableau 4.1), par exemple, exerce sur les cellules végétales une pression osmotique spécifique qui est fonction des concentrations de ses différents constituants. De toutes les substances communément ajoutées à un milieu de base, la concentration des glucides est celle qu'on modifie le plus souvent afin d'accroître la pression osmotique d'un milieu. Ainsi, des milieux fortement concentrés en sucrose favoriseraient l'embryogenèse pour des lignées de diverses espèces et ils contribueraient à l'obtention de plus fortes proportions d'embryons multiples et anormaux dans le cas de la carotte (Ammirato 1987). La pression osmotique utilisée comme agent stressant permet aussi d'induire l'embryogenèse chez des lignées de carotte (Kamada et al. 1989 & 1993) ainsi que chez plusieurs lignées cellulaires de plantes médicinales (Koichiro Shimomura, communication personnelle). Enfin, le traitement par plasmolyse dont il est fait mention à la sous-section 2.1.6 permettrait

d'accroître le degré de synchronie de suspensions embryogènes de carotte (Wetherell 1984), alors que la dessiccation par osmose d'embryons de colza contribuerait à leur maturation (Finkelstein & Crouch 1986 & 1987). Si ces travaux montrent que la pression osmotique peut avoir des effets intéressants sur certaines dimensions de l'embryogenèse, ils indiquent surtout par leur rareté que beaucoup reste à faire pour utiliser et contrôler pleinement ce paramètre.

On considère généralement que l'environnement des cultures embryogènes comme celui des autres types de culture *in vitro* a une humidité relative d'environ 100% (Thorpe 1980). Cette condition de forte humidité est connue pour occasionner parfois la vitrification des embryons (Ranch 1993) ou des propagules (Levin et al. 1988, Park et al. 1989) de certaines lignées végétales, ce qui résulte inmanquablement en de jeunes plantes anormales aux plans morphologique et métabolique. La vitrification est un phénomène dont les causes fondamentales sont inconnues et qui dépend sûrement de plusieurs facteurs tant biotiques qu'abiotiques. Ceci dit, puisqu'aucun des documents consultés pour ce travail ne concerne précisément les effets de l'humidité sur le développement des embryons entre le stade d'amas cellulaire et le stade torpille, il n'y a pas de raison de croire que ce paramètre a nécessairement un effet sur l'embryogenèse de toutes les lignées. Par ailleurs, une fois atteint le dernier stade de développement il est possible d'amener les embryons somatiques de certaines espèces à maturité en les déshydratant dans des chambres à humidité contrôlée (Gray & Compton 1993).

À moins d'indications contraires, toute l'information des sous-sections précédentes s'applique autant à la culture d'embryons sur gélose qu'à celle en milieu liquide. Toutefois, certains des pionniers de la culture en suspension liquide observent qu'elle permet un développement plus uniforme des tissus végétaux (Halperin & Wetherell 1965) et ils soulignent que le progrès de ce mode de culture dépend de la capacité à établir et à maintenir des conditions de culture qui se traduisent en des résultats reproductibles (Halperin 1967). L'agitation est une de ces conditions et elle est essentielle pour assurer en tout temps l'homogénéité d'une cuvée. Ce paramètre a cependant une importance particulière car il détermine à la

fois le cisaillement mécanique imposé aux cellules et les échanges gazeux de la culture (taux d'aération, taux d'oxygénation, dégazage, etc). Or il est bien connu que les cellules végétales sont très sensibles au cisaillement mécanique (Ammirato 1983a, Ballica & Ryu 1993, Fowler 1987, Jolicœur et al. 1992, Kamen et al. 1992, Martin 1980b, Nishimura et al. 1993, Panda et al. 1989, Styer 1985, Tanaka 1981, 1982 & 1987, Yokoi et al. 1993) et que certains échanges gazeux doivent être mieux étudiés et compris si l'on souhaite en venir à bien contrôler le développement embryogène. Conséquemment, l'agitation d'une culture en suspension doit être ajustée de façon empirique selon l'espèce, la lignée, le type de flacon, le volume de milieu et le genre d'agitateur utilisés. De plus, les chercheurs qui souhaitent appliquer l'embryogenèse à la propagation végétale considèrent la culture en suspension comme une nécessité pour l'utilisation du bioréacteur, celui-ci constituant un moyen unique de pousser plus loin les connaissances car il permet un meilleur contrôle de l'agitation, de l'aération et du régime gazeux des cultures (Ammirato & Styer 1985, Styer 1985). La prochaine et dernière section de ce chapitre porte sur l'usage des bioréacteurs pour la production d'embryons somatiques.

2.3 PRODUIRE DES EMBRYONS SOMATIQUES EN BIORÉACTEURS

La culture de cellules végétales indifférenciées dans des bioréacteurs de tous genres est pratiquée depuis au moins quarante ans puisque le premier brevet français y ayant trait fut déposé en 1956 par Rontier et Nickell (Nouaille & Pétiard 1988). Ce genre de culture vise généralement la production de métabolites secondaires (principes actifs médicaux, additifs alimentaires, parfums, saveurs, pigments, enzymes, insecticides). Dans ce contexte, le bioréacteur est principalement un moyen de cultiver de grands volumes de cellules de plantes à des concentrations assez fortes (≥ 30 g de biomasse sèche par litre de suspension) pour justifier la mise à l'échelle de procédés industriels rentables (Tanaka 1981 & 1987). Les travaux dans ce domaine étant aussi nombreux que prometteurs, la littérature est très abondante et elle inclut plusieurs revues thématiques intéressantes dont: Balandrin et al. (1985), Beck et al. (1987), Dougall (1985), Fowler (1983 & 1987), Fujita et Tabata (1987), Kreis et Reinhard (1989), Kurz (1986), Martin (1980b), Nickell (1980), Panda et al. (1989), Scragg et Fowler (1985), Staba (1980), Taticek et al. (1991).

En comparaison, la culture d'embryons somatiques en bioréacteurs est plus récente et beaucoup moins documentée comme le Tableau 2.3 en fait foi. La différence majeure entre les cultures en bioréacteurs pour l'obtention d'embryons somatiques et celles pour la production de métabolites secondaires tient à ce que les premières sont développées en fonction d'impératifs plutôt qualitatifs que quantitatifs, tandis que c'est l'inverse pour les autres. Ceci s'explique par le fait que le métabolite d'intérêt d'une culture de cellules indifférenciées ne représente habituellement qu'une fraction de la biomasse totale, alors que chaque embryon mature d'une culture embryogène constitue un produit final désiré. En conséquence le bioréacteur n'est pas ici une simple étape transitoire devant permettre une mise à l'échelle éventuelle, mais bien un outil de développement immédiat des procédés car les volumes des bioréacteurs utilisés en laboratoires devraient suffire dans la plupart des applications prévisibles de l'embryogenèse somatique (Huang et al. 1993). En somme, on a recours aux bioréacteurs parce que ceux-ci permettent à la fois un meilleur suivi et un meilleur contrôle des paramètres de culture, deux

Tableau 2.3

Publications faisant état de l'usage de bioréacteurs pour la culture d'embryons somatiques d'espèces végétales

AUTEUR(S) et ANNÉE	ESPÈCE(S)	TYPE D'AGITATION et/ou D'AÉRATION	VOLUME (L)	RÉSULTATS et/ou REMARQUES
Ammirato & Styer (1985)	Carotte (<i>Daucus carota</i>)	Mécanique: cylin- dre filtrant rotatif;	nd	Considérations générales avec exemples
Archambault et al. (1994a)	<i>Eschschol- zia cali- fornica</i>	Mécanique (ruban hélicoïdal dou- ble); aération de surface aidée de chicanes	11	Quantité et qua- lité des Es éga- les ou supérieu- res à ceux obte- nus en flacons
Chen et al. (1987)	Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	1) Pneumatique (0,5 VVM)	2	Flacons (~40 Es. mL ⁻¹) > Barreau magnétique (~10 Es.mL ⁻¹) > Pneu- matique (0 Es)
		2) Barreau magné- tique à 2 pales (60 & 180 RPM)	1	
Ducos et al. (1993)	Carotte (<i>Daucus carota</i>)	Mécanique: 3 tur- bines RUSHTON à 4 pales (100 RPM) Bullage d'air où Qg= 0,1 à 0,2 VVM	10	Production max de ~1000 Es.mL ⁻¹ en bioréacteur de 10 litres inoculé à 1,0% (v/v)
Greidziak et al. (1990)	<i>Digitalis lanata</i>	Pneumatique: 0,1 VVM ($k_La \approx 8 \text{ h}^{-1}$); 0,5 VVM ($k_La \approx 13h^{-1}$); 1 VVM ($k_La \approx20 \text{ h}^{-1}$)	5	Selon les paramè- tres choisis, [Es] & formation de métabolite sont semblables aux cuvées en flacons
Harrell et al. (1992)	Patate dou- ce (<i>I. ba- tatas</i>)	Pneumatique: bul- lage d'air (Qg=?) durant $\frac{1}{2}$ sec. à chaque 30 sec.	0,6	Modélisation de la croissance des cals embryogènes
Jay et al. (1992)	Carotte (<i>D. carota</i>)	Mécanique: 1 (?) turbine à 4 pales (50 à 150 RPM) et Qg= 150 mL.min ⁻¹	1,7	[O ₂ d] affecte l'embryogenèse et est mieux étudiée en bioréacteur
Jay et al. (1994)	Carotte (<i>D. carota</i>)	Mécanique: 1 (?) turbine à 4 pales (50 à 100 RPM) et Qg= 150 mL.min ⁻¹	1,7	Contrôle de l'em- bryogenèse par ajustements du pH

Tableau 2.3 (SUITE)

Publications faisant état de l'usage de bioréacteurs pour la culture d'embryons somatiques d'espèces végétales

<u>AUTEUR(S) et ANNÉE</u>	<u>ESPÈCE(S)</u>	<u>TYPE D'AGITATION et/ou D'AÉRATION</u>	<u>VOLUME (L)</u>	<u>RÉSULTATS et/ou REMARQUES</u>
Kessell & Carr (1972)	Carotte (<i>D. carota</i>)	Mécanique: aubes à 6 pales (90 à 160 RPM); Bullage par le fond ($Q_g = 1$ ou 2 L.min^{-1} selon demande en O_2)	4	Maintien de $[O_2d]$ sous une valeur seuil favorise l'embryogenèse
Kessell et al. (1977)	Carotte (<i>D. carota</i>)	Mécanique: aubes à 6 pales (90 RPM); Bullage par le fond ($Q_g = 1$ ou 2 L.min^{-1} selon demande en O_2)	4	Contrôle de $[O_2d]$ vs liens avec le métabolisme énergétique des embryons somatiques
Molle et al. (1993)	Carotte (<i>D. carota</i>)	Mécanique: turbines RUSHTON à 3 pales; Aération: ?	10	Quantité ($\sim 400 \text{ Es.mL}^{-1}$) et conversion mêmes qu'en flacons
Nishimura et al. (1993)	Carotte (<i>D. carota</i>)	Barreau magnétique (50-200 RPM) Bullage & contrôle de $[O_2d] > 88\%$; Aération: ?	0,5	Ce bioréacteur performerait mieux qu'un de même volume agité mécaniquement
Preil et al. (1988)	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Vibratoire: fréquence = ?; Aération de surface & bullage ($Q_g = ?$) de O_2 dans milieu	2	Comparaison de cultures à différents niveaux de $[O_2d]$; Optimisation possible
Stuart et al. (1987)	Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	1) Mécanique: hélice (100 RPM) & aération de surface ou bullage ($\sim 1 \text{ VVM}$) 2) Pneumatique	2 ?	Pneumatique $\geq$ Flacons ($\sim 200 \text{ Es.mL}^{-1}$) > Mécanique ($\sim 112 \text{ Es.mL}^{-1}$)
Styer (1985)	Carotte (<i>D. carota</i>)	Mécanique: cylindre filtrant rotatif; Bullage ($Q_g = ?$)	?	Suggéré pour la culture en continu de cellules embryogènes

aspects qui sont absolument essentiels pour mieux comprendre ce processus biologique complexe ainsi que pour mettre au point des méthodes systématiques, constantes et fiables de production *in vitro* d'embryons somatiques de bonne qualité. Inversement, même s'ils sont inspirés des équipements conçus pour obtenir des métabolites secondaires, les bioréacteurs dédiés à la production d'embryons doivent être adaptés aux besoins particuliers de la différenciation cellulaire végétale et aux impératifs qualitatifs qui sont propres à l'embryogenèse somatique (Preil et al. 1988).

Dans cette perspective, le but de cette troisième et dernière section est de faire le point sur la culture d'embryons somatiques en bioréacteurs à la lumière des informations revues dans les deux sections précédentes. Sauf quelques exceptions, les publications présentées au Tableau 2.3 sont les seules faisant état de recherches portant spécifiquement sur l'usage de bioréacteurs pour cultiver des embryons somatiques d'espèces végétales. Les éléments réunis ci-après font donc référence principalement à ces publications, mais également à des documents plus généraux quoique tout aussi pertinents. On note au Tableau 2.3 que plus de la moitié des quinze publications concernent la carotte (*Daucus carota*), l'une des espèces modèles de l'embryogenèse végétale somatique. Ceci indique que la majorité des travaux impliquant l'usage de bioréacteurs visent d'abord une meilleure connaissance de ce processus unique. Sans négliger cette dimension, les travaux rapportés dans les six autres publications visent sans doute également des applications technologiques à brève échéance.

2.3.1 AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

La culture d'embryons en milieu liquide effectuée dans des bioréacteurs comporte plusieurs avantages en comparaison de celle, plus courante et plus traditionnelle, effectuée en flacons agités. Ainsi, la culture en bioréacteurs permet de travailler avec des volumes plus grands de suspension (couramment entre 1 et 10 litres par rapport à 20 et 200 mL en flacons), ce qui peut se traduire par des économies de matériel, d'espace et de temps dépendamment des applications (Ammirato & Styer 1985, Park et

al. 1989, Styer 1985). Dans le même ordre d'idées, il est plus facile d'intégrer un bioréacteur à un procédé automatisé que ne le sont plusieurs petits flacons séparés. Ceci est particulièrement évident dans le cas d'opérations qui sont effectuées aseptiquement comme le transfert des cultures d'un récipient à un autre, le changement d'un milieu ou son renouvellement en nutriments, l'évaluation de l'état d'une suspension, ou encore l'identification et le tri des embryons (Ducos et al. 1993, Grand d'Esnon et al. 1989, Hamalainen et al. 1993, Harrell et al. 1992, Levin et al. 1988, Uozumi et al. 1993). Tout bioréacteur a un système d'agitation qui assure l'homogénéité de la suspension et qui rend aussi possible la prise d'échantillons représentatifs (Ammirato & Styer 1985, McDonald & Jackman 1989). Les bioréacteurs sont habituellement conçus pour permettre le suivi et/ou le contrôle de paramètres comme le pH, la concentration en oxygène dissous ($[O_2d]$) ou celle de certains autres gaz (CO_2 , C_2H_4), le potentiel d'oxido-réduction des suspensions, la température, l'aération et l'agitation, ce qui fournit des données plus nombreuses et de meilleure qualité, donc plus riches d'enseignement (Archambault et al. 1994a, Ducos et al. 1993, Jay et al. 1992 & 1994, Kessell & Carr 1972, Kessell et al. 1977, McDonald & Jackman 1989, Smith et al. 1990, Stuart et al. 1987). De telles données sont parfois plus appropriées à l'élaboration de modèles mathématiques que celles pouvant être obtenues de cuvées en flacons agités (Chen et al. 1987, Harrell et al. 1992, McDonald & Jackman 1989, Miller & Melick 1987, Smith et al. 1990, Spieler et al. 1985). Enfin, l'usage de bioréacteurs donne le choix parmi plusieurs stratégies de culture ou combinaisons de stratégies pour la production d'embryons, ce qui constitue un avantage très appréciable sur la culture conventionnelle en flacons agités (Ammirato & Styer 1985, Nouaille & Pétiard 1988, Styer 1985).

La culture d'embryons somatiques en bioréacteurs comporte également des inconvénients. Par exemple, il est difficile d'établir et de maintenir un régime équilibré d'agitation qui soit à la fois assez vigoureux pour prévenir les problèmes de transfert de matière liés au volume accru de suspension ainsi qu'à ses propriétés rhéologiques, mais aussi suffisamment doux pour ne pas abîmer les embryons qui ont, globalement, la même sensibilité physique et les mêmes caractéristiques physiologiques que les cellules végétales dont ils sont constitués. En fait, dans la littérature

on traite moins l'agitation comme un problème ou un inconvénient, que comme un paramètre important qu'il faut très bien maîtriser (Archambault et al. 1994a, Chen et al. 1987, Denchev et al. 1992, Preil et al. 1988, Stuart et al. 1987, Styer 1985). Le dégazage de substances volatiles hors d'une suspension embryogène ou, inversement, leur rétention dans celle-ci sont d'autres inconvénients qui dépendent en partie de l'agitation et/ou de l'aération. On invoque parfois ces phénomènes à l'égard du dioxyde de carbone, de l'éthylène et de l'oxygène, pour expliquer certains résultats désirés ou non qui sont obtenus en bioréacteurs (Archambault et al. 1994a, Chen et al. 1987, Denchev et al. 1992, Ducos et al. 1993, Greidziak et al. 1990, Jay et al. 1992). Cependant ceci reste à être démontré puisqu'aucune mesure directe de l'un ou l'autre de ces phénomènes n'est encore rapportée et les effets des gaz sur l'embryogenèse végétale somatique méritent d'être étudiés plus systématiquement et plus en détails. Par ailleurs, selon l'espèce, le milieu de culture et le mode d'agitation, certaines suspensions embryogènes forment une écume tendant à retenir en surface une portion de la biomasse qui, par conséquent, dégénère. Or en bioréacteur ce problème peut prendre des proportions qui rendent certaines sondes inutilisables et même la culture impossible. De façon générale, tous ces inconvénients peuvent être évités en choisissant des bioréacteurs et des conditions d'opération qui soient bien adaptés aux particularités de chaque espèce et en apportant des solutions technologiques innovatrices.

2.3.2 PRINCIPAUX TYPES DE BIORÉACTEURS UTILISÉS

Les bioréacteurs utilisés pour la culture *in vitro* d'embryons somatiques, comme ceux servant à la culture de cellules végétales indifférenciées, peuvent être classifiés en quatre catégories selon leur type d'agitation: 1) **pneumatique** (air pulsé dans la suspension); 2) **mécanique** (agitateur quelconque baignant dans la suspension et entraîné par un moteur externe auquel il est fixé mécaniquement); 3) **magnétique** (agitateur ou barreau métallique baignant dans la suspension et entraîné par le champs magnétique d'un aimant rotatif externe); 4) **vibratoire** (vibrateur baignant dans la suspension et entraîné par un moteur externe). D'après le Tableau 2.3 on a surtout recours à des bioréacteurs à agitation mécanique, ce qui s'explique sans doute par la diversité des agitateurs disponibles (mobiles

à débit axial et/ou radial) et par la possibilité de combiner différents mobiles ou d'en concevoir de nouveaux. Ceci dit, ici comme avec la culture de cellules indifférenciées, le modèle d'agitateur mécanique utilisé est susceptible d'influencer les résultats d'une culture (Martin 1980b, Panda et al. 1989, Prokop & Rosenberg 1989, Scragg & Fowler 1985, Taticek et al. 1991). De même en va-t-il des choix de courant d'écoulement des bulles d'air (ou du mélange gazeux) dans la suspension d'un bioréacteur à agitation pneumatique (Denchev et al. 1992). Outre les types de bioréacteurs indiqués au Tableau 2.3, le fermenteur à tambour rotatif (Tanaka et al. 1983) convient à la culture en suspension d'embryons de *Panax ginseng* (Shimomura & Lavoie, non publié).

L'embryogenèse somatique étant un processus de différenciation cellulaire éminemment complexe, on comprend que le simple transfert de la technologie des bioréacteurs conçus initialement pour la culture de cellules végétales à la production d'embryons donne parfois des résultats surprenants. Il ne s'agit là cependant que d'une étape préliminaire qui doit être suivie d'adaptations tenant compte à la fois des découvertes les plus récentes sur l'embryogenèse et des besoins spécifiques de chaque lignée embryogène d'intérêt (Preil et al. 1988). Dans cette optique, la technologie des bioréacteurs est prometteuse car, étant très diversifiée, elle permet de mieux étudier les exigences particulières de chaque lignée et elle offre aussi la souplesse nécessaire pour mener au développement de procédés industriels exempts d'empirisme et répondant à toutes les exigences des procédés modernes de production.

2.3.3 STRATÉGIES POSSIBLES DE PRODUCTION

L'approche la plus courante pour obtenir des embryons somatiques de plantes comporte deux étapes: celle d'induction où des cellules réceptives d'un tissu somatique de plante sont amenées à proliférer sous forme d'amas cellulaires embryogènes dans un premier milieu de culture contenant une certaine quantité d'hormone(s) ou de régulateur(s) de croissance, puis l'étape de production où les cellules induites peuvent poursuivre et compléter leur développement dans un second milieu dépourvu de toute substance susceptible d'entraver le processus de différenciation. Cette

approche en deux temps est retenue dans tous les travaux rapportés au Tableau 2.3 et, même si les publications ne fournissent pas tous les détails, on peut supposer que la première étape est effectuée en flacons agités dans chaque cas, alors qu'un bioréacteur est utilisé pour la seconde étape. Malgré ce constat, il faut souligner que la séquence flacons agités (étape 1) et bioréacteurs (étape 2) n'est pas la seule possible, pas plus que ne le sont les approches et les méthodes de culture rapportées dans la littérature. En d'autres mots, la technologie des bioréacteurs permet plusieurs stratégies de production d'embryons somatiques.

Ainsi, dépendamment de la lignée on peut vouloir obtenir une quantité ou une qualité différente de biomasse durant l'étape d'induction et, pour ce faire, avoir recours à un certain type de bioréacteur plutôt qu'au mode flacon (Drew 1980, Kessell & Carr 1972, Kreis & Reinhard 1989, Molle et al. 1993). De plus, selon les conditions et les objectifs propres à la première étape, on peut opter pour une autre méthode que la cuvée, car la technologie des bioréacteurs permet aussi la culture semi-continue, continue ou séquentielle (Ammirato & Styer 1985, Nouaille & Pétiard 1988, Styer 1985). Similairement, la phase de production peut être effectuée autrement qu'en cuvée, même si beaucoup de travail reste à faire à ce sujet (Preil et al. 1988, Styer 1985). À cet égard, il est clairement démontré avec la culture en flacons qu'une alimentation séquentielle de milieu frais se traduit par des embryons somatiques de carotte de meilleure qualité et produits en plus grand nombre (Huang et al. 1993). Par ailleurs, en procédant à des filtrations ou à des changements de milieux appropriés, il est tout à fait possible d'exécuter les deux étapes du procédé d'obtention d'embryons dans un seul bioréacteur (Ammirato & Styer 1985, Stuart et al. 1987). Il est aussi concevable de trier des embryons selon leur grosseur ou leur stade de développement et de les séparer en autant de bioréacteurs reliés en série (chacun ayant un milieu et des conditions uniques) qu'il le faut pour assurer un produit final de qualité constante (Ducos et al. 1993, Harrell et al. 1992, Molle et al. 1993, Nouaille & Pétiard 1988). On peut donc imaginer des étapes supplémentaires à un procédé automatisé de production d'embryons somatiques, comme par exemple une étape de maturation ou de stabilisation

par dessèchement qui serait induite durant un séjour des embryons dans un bioréacteur contenant une ou plusieurs solutions aux gradients osmotiques élevés (Fujii et al. 1993, Ranch 1993).

2.3.4 PRINCIPAUX RÉSULTATS RAPPORTÉS

Comme les embryons somatiques de la plupart des espèces végétales passent par différents stades de développement (ceux d'amas cellulaire, de globulaire, de cordiforme et de torpille étant retenus pour la carotte), les résultats quantitatifs présentés dans la littérature sont, pour une même espèce, parfois difficilement comparables puisque certains auteurs ne rendent compte que des embryons à un certain stade (généralement le dernier), alors que d'autres en considèrent plus d'un ou l'ensemble des stades. Dans ce contexte, et l'intérêt étant d'obtenir des embryons de qualité aptes à former des plantes normales, il apparaît plus cohérent de se limiter au dénombrement des embryons atteignant le stade précédant immédiatement la germination.

Dans le cas de la carotte, le stade précédant la germination serait le stade torpille où la forme des embryons (longueur ≥ 1 mm) est facilement identifiable à l'oeil nu. Suivant cette règle, et pour les publications où cela est possible (Tableau 2.3), on note les concentrations maximales suivantes pour la production d'embryons de carotte: ~ 1000 Es.mL⁻¹ en bioréacteur à agitation mécanique avec aération par le fond (Ducos et al. 1993), ~ 400 Es.mL⁻¹ en bioréacteur à agitation mécanique (Molle et al. 1993) et ~ 390 Es.mL⁻¹ en bioréacteur à barreau magnétique avec contrôle de la concentration d'oxygène dissous à plus de 88% (Nishimura et al. 1993). Dans ces trois publications on rapporte que la production maximale d'embryons en bioréacteurs est toujours égale ou supérieure à celle en flacons agités (presque le double dans Nishimura et al. 1993), un résultat qu'on relève aussi pour trois autres espèces (Archambault et al. 1994a, Greidziak et al. 1990, Stuart et al. 1987) dont la luzerne (*Medicago sativa*) qui a pourtant la réputation d'être difficile à cultiver en milieux liquides (Chen et al. 1987, Stuart et al. 1987). C'est dire qu'en choisissant les conditions, la méthode de culture et le bioréacteur

appropriés on peut obtenir plus d'embryons par unité de volume comparativement à la culture en flacons agités. Par ailleurs, même si de nombreux autres paramètres concernant la croissance de la biomasse, la consommation des nutriments et la production d'embryons sont quantifiables autant en flacons qu'en bioréacteurs, seuls ces derniers permettent la mesure en continu de diverses variables physiques avec lesquelles de tels ces paramètres peuvent être corrélés.

Neuf des seize publications du Tableau 2.3 portent une attention particulière à l'influence de la concentration en oxygène dissous sur la culture d'embryons (Archambault et al. 1994a, Chen et al. 1987, Greidziak et al. 1990, Jay et al. 1992, Kessell & Carr 1972, Kessell et al. 1977, Nishimura et al. 1993, Preil et al. 1988, Stuart et al. 1987) et leurs principaux résultats, présentés à la sous-section 2.2.6, indiquent que la technologie des bioréacteurs permet de saisir des nuances possiblement fondamentales qui ne sont pas accessibles par la culture en flacons. Ceci est aussi vrai pour d'autres gaz comme l'éthylène ou le dioxyde de carbone même si seulement quelques uns des travaux effectués à ce jour en bioréacteurs les prennent en considération (Archambault et al. 1994a, Ducos et al. 1993, Greidziak et al. 1990, Kessell & Carr 1972, Preil et al. 1988).

En somme, avec la culture en bioréacteurs il devient non seulement possible de mettre à jour des relations nouvelles entre certains facteurs, mais surtout, pour chaque lignée embryogène prise individuellement, de déterminer systématiquement les conditions permettant d'atteindre des objectifs qualitatifs spécifiques (Preil et al. 1988). Il n'est donc pas surprenant que la qualité des embryons produits en bioréacteurs est généralement au moins semblable (Ammirato & Styer 1985, Chen et al. 1987, Ducos et al. 1993, Molle et al. 1993, Preil et al. 1988, Tautorius et al. 1992), très rarement inférieure (Chen et al. 1987, Stuart et al. 1987) et parfois supérieure (Archambault et al. 1994a, Greidziak et al. 1990) à celle des embryons obtenus en flacons.

2.3.5 POTENTIEL POUR LA MODÉLISATION ET L'OPTIMISATION

L'utilisation des bioréacteurs permet donc de pousser plus loin la mesure, le suivi, le contrôle et l'ajustement des conditions physiques de culture en fonction du temps. Or le temps est un facteur tellement fondamental de l'embryogenèse somatique que l'avenir est à l'identification, pour chaque lignée, des besoins physico-chimiques spécifiques à chaque stade de développement (nutriments, gaz dissous, pH, hormones, régulateurs de croissance, température, pression osmotique, humidité, luminosité, suppression d'inhibiteurs, ajouts de promoteurs chimiques, etc). Cependant, afin de comprendre la complexité de ces besoins et de leur interdépendance il faut pouvoir élaborer des modèles cinétiques à partir de données fiables (Cazzulino et al. 1990, Chen et al. 1987, Chi et al. 1994, Fowler 1987, Harrell et al. 1992, McDonald & Jackman 1989, Miller & Melick 1987, Payne et al. 1990, Smith et al. 1990). Évidemment, la culture en bioréacteurs convient mieux au développement de tels modèles, ainsi qu'à leur utilisation pour optimiser la production d'embryons somatiques de chaque lignée. C'est à cette condition que de véritables procédés industriels pourront être faits sur mesure.

2.3.6 LIMITES

D'un point de vue fondamental, l'utilisation de bioréacteurs ne peut que mener à une meilleure compréhension du processus biologique complexe qu'est l'embryogenèse végétale somatique et conséquemment contribuer à résoudre certains de ses plus épineux problèmes. Cependant la perception de nouvelles connaissances et la conception de solutions dépendent entièrement de la perspicacité et de la persévérance des personnes oeuvrant dans le domaine. C'est donc dire que la volonté humaine est la première limite aux applications fructueuses de la technologie des bioréacteurs à l'embryogenèse somatique.

L'autre limite importante qu'on ne peut ignorer est d'ordre économique. En effet, compte tenu que les cellules végétales croissent lentement, les coûts globaux de production des procédés biotechnologiques les impliquant sont généralement assez élevés. Par exemple, l'un des rares procédés de production d'un métabolite secondaire à avoir atteint le stade commercial

en plus de quarante ans de recherche est celui de la firme japonaise MITSUI qui cultive à grande échelle des cellules indifférenciées de *Lithospermum erythrorhizon* afin d'obtenir la *shikonin*, un mélange de naphthoquinones ayant des propriétés antiseptiques et colorantes qu'on utilise dans la préparation d'onguents médicaux ainsi que comme pigment rouge dans des fards à lèvres (Fujita & Tabata 1987). Or on aurait cessé les opérations de ce procédé depuis quelques années pour des raisons économiques (Docteur Shimomura, communication personnelle). Tout procédé biotechnologique potentiel doit donc absolument faire l'objet d'une analyse rationnelle et détaillée des coûts d'opérations (Goldstein et al. 1980, Scragg & Fowler 1985).

Dans cette perspective, on comprend que l'acceptation ou le refus d'un procédé quelconque de production d'embryons dépend ultimement de la valeur commerciale de l'espèce en cause. Certaines espèces agricoles, horticoles et forestières sont toutefois susceptibles d'assurer la rentabilité d'un tel procédé (Fujii et al. 1987, Gray & Compton 1993, Gray & Purohit 1991, Gupta & Durzan 1988, Levin et al. 1988, Lutz et al. 1985, Nouaille & Petiard 1988, Ranch 1993, Redenbaugh 1990, Redenbaugh et al. 1987b, Roberts et al. 1993, Sanada et al. 1993, Styer 1985, Vasil 1988). Si l'on souhaite réellement développer des applications reconnues pour l'embryogenèse végétale somatique, c'est sur ces espèces que doivent être concentrés les efforts d'utilisation de la technologie des bioréacteurs.

CHAPITRE 3 - OBJECTIF PRINCIPAL ET SOUS-OBJECTIFS

En référence aux caractéristiques générales, aux particularités et aux potentialités nombreuses de l'embryogenèse végétale somatique *in vitro* qui sont revues au chapitre précédent, il est légitime de postuler que les problèmes majeurs de ce processus complexe peuvent être mieux compris par des études de cinétique nutritionnelle lors desquelles la culture traditionnelle en flacons agités et celle en bioréacteurs sont effectuées simultanément, puisque ce second mode de culture permet de mesurer et de contrôler un plus grand nombre de paramètres. C'est en se fondant sur ce postulat que l'objectif principal ainsi que les sous-objectifs du présent projet de recherche sont formulés et présentés dans ce troisième chapitre.

3.1 OBJECTIF PRINCIPAL

Pour les raisons historiques et pratiques déjà considérées, la carotte (*Daucus carota*) est une espèce modèle largement utilisée pour l'étude de l'embryogenèse végétale somatique. Pour cette espèce ainsi que certaines autres, l'ion ammonium est un macronutriment généralement essentiel au bon développement d'embryons somatiques quand on les obtient dans un milieu synthétique contenant du nitrate mais dépourvu de toute source organique d'azote. Ce fait qui est établi pour des lignées embryogènes cultivées en boîtes de Pétri (gélouses) et en flacons agités (suspensions) n'a jamais été vérifié avec des cultures en bioréacteurs. Similairement, il est probable que certains gaz, dont l'oxygène, affectent le processus embryogène de différentes manières, mais leurs influences sont mal connues parce que difficiles à étudier. Or, le mode bioréacteur permet le suivi et le contrôle de plusieurs paramètres de culture dont l'agitation, l'aération et la concentration de certains gaz. Par ailleurs, il est démontré que le modèle de bioréacteur dont le mobile d'agitation consiste en un enroulement de deux rubans hélicoïdaux convient à la culture d'embryons somatiques d'*Eschscholtzia californica* (Archambault et al. 1994a), de suspensions à haute concentration en cellules végétales (Jolicoeur et al. 1992, Pépin 1996), ainsi que de suspensions de cellules d'insectes (Kamen et al. 1991 & 1992) qui ont la réputation d'être encore plus sensibles au cisaillement mécanique que les cellules végétales

(Prokop & Rosenberg 1989). Dans ce contexte, l'objectif principal de cette recherche est d'étudier comment le changement de la concentration initiale en ion ammonium influence le développement d'une lignée embryogène de carotte cultivée en cuvée suivant deux modes de culture: le flacon agité et le bioréacteur à rubans hélicoïdaux.

3.2 SOUS-OBJECTIFS

De cet objectif principal découlent les huit sous-objectifs suivants:

- i) Partant de tissus somatiques d'une variété de carotte commerciale, développer des lignées embryogènes pouvant croître en suspension liquide et dans au moins un des milieux définis qui sont utilisés couramment en culture de cellules végétales;
- ii) Définir une méthode de culture cuvée (milieu et conditions physiques) qui permette de produire systématiquement des embryons somatiques en flacons agités et en bioréacteur à rubans hélicoïdaux, la concentration de l'oxygène dissous étant contrôlée dans ce second mode de culture;
- iii) Sélectionner une lignée embryogène qui soit bien adaptée à ces deux modes de culture *in vitro*;
- iv) Effectuer simultanément dans les deux modes de culture des séries de cuvées différant par leurs concentrations initiales en ion ammonium;
- v) Durant chaque cuvée, suivre l'évolution dans le temps de paramètres liés aux changements de la biomasse, à la production d'embryons torpilles, à l'absorption de l'ammonium ainsi qu'à l'absorption de neuf autres macronutriments;
- vi) Établir des relations entre la concentration initiale en ammonium et les cinétiques des paramètres mesurés;
- vii) Comparer les relations paramétriques des cuvées en bioréacteurs à celles en flacons et tenter d'expliquer les divergences ou les similitudes mesurées en fonction des principales différences (notamment le contrôle de l'oxygène dissous) entre ces deux modes de culture *in vitro*;
- viii) Discuter les tendances observées en référence à la littérature lorsque cela est possible et pertinent, afin d'élargir le système-modèle de l'embryogenèse végétale somatique pour y inclure dorénavant la culture en bioréacteur à rubans hélicoïdaux.

CHAPITRE 4 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre se divise en quatre sections qui portent respectivement sur le développement et le maintien des lignées embryogènes, sur la culture en cuvée pour la production d'embryons somatiques, sur les conditions particulières à chacun des deux modes de culture et sur les méthodes d'analyse.

4.1 DÉVELOPPEMENT ET MAINTIEN DES LIGNÉES EMBRYOGÈNES

4.1.1 MISE EN CULTURE TYPIQUE DES LIGNÉES EMBRYOGÈNES

D'après la littérature, il est possible et relativement facile d'obtenir une lignée de cellules embryogènes à partir d'un fragment d'à peu près n'importe quel tissu d'un plant de carotte. Dans le cadre de la présente recherche, des graines de carotte sont utilisées comme matériel de départ afin de travailler avec des lignées nouvelles et pour éliminer leur âge comme source de variation importante. Les graines de carotte mises à l'essai sont fournies par la firme Semences BC inc. de Laval (Québec, Canada) et elles appartiennent à trois variétés différentes, soient la "Fancy Pack", la "NAVAJO" et la "Six Pack" qui sont toutes des hybrides F_1 de première génération.

La surface scarifiée des graines est lavée et désinfectée de la façon suivante: 1) trempage et agitation vigoureuse durant deux minutes dans une solution aqueuse d'éthanol (70% v/v); 2) même chose durant vingt minutes dans une solution commerciale diluée d'hypochlorite de sodium (concentration final d'environ 1,1% p/v d'hypochlorite NaClO); 3) double rinçage avec de l'eau distillée stérilisée; 4) répétition du trempage et de l'agitation dans la solution commerciale diluée d'hypochlorite de sodium durant vingt minutes; et 5) triple rinçage avec de l'eau distillée stérilisée. Suite à cette désinfection, les graines sont mises sur un papier filtre stérile reposant dans une boîte de Pétri contenant environ 2 mL d'eau distillée stérilisée (à raison de 3 à 5 graines par boîte), puis les boîtes de Pétri fermées hermétiquement sont rangées dans l'obscurité et à la température ambiante afin de permettre aux graines de germer.

Après germination des graines (5 à 10 jours), les hypocotyles (portion de la tigelle sous les cotylédons) sont coupées en cinq ou six petits morceaux qui sont transférés aseptiquement sur une gélose nutritive contenue dans une boîte de Pétri. Les géloses nutritives se composent soit de milieu MS (Murashige & Skoog 1962) ou de milieu B5 (Gamborg et al. 1968) dont les formulations sont présentées au Tableau 4.1. Ces milieux contiennent de 8 à 9 g.L⁻¹ de poudre d'agar non purifiée, 0,2 mg.L⁻¹ d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), ainsi que 30 g.L⁻¹ de sucre de qualité alimentaire et leur pH est ajusté à -5,6 à l'aide d'hydroxyde de potassium (KOH) avant d'être stérilisés dans un autoclave (121°C, 100 kPa, 20 minutes). Chaque boîte de Pétri contenant une gélose et un morceau de méristème est ensuite scellée hermétiquement, identifiée et incubée à 28°C dans l'obscurité (éliminant ainsi la photosynthèse comme mode d'obtention d'énergie) afin de permettre le développement des cals.

Après une période de quatre à six semaines d'incubation, les cals de plus d'un centimètre cube qui n'apparaissent pas contaminés sont vérifiés pour leur potentiel embryogène. Pour ce faire, un petit fragment de cal est transféré sur une gélose de composition identique sauf pour l'absence de régulateur de croissance, permettant ainsi au processus de différenciation cellulaire de suivre son cours. Ce type de transfert est aussi fait dans ~20 mL du milieu liquide approprié ne contenant ni régulateur de croissance, ni agar. Dans tous les cas, le test consiste à vérifier si des embryons se forment à la surface du cal ou dans la suspension durant les semaines suivantes. Suite à ce test, les cals jugés embryogènes sont maintenus à l'obscurité dans un incubateur à 28°C. Ils sont repiqués toutes les six à huit semaines en transférant ~1 g d'une portion saine et hydratée du cal sur une gélose fraîchement préparée et contenant du 2,4-D. Les récipients utilisés pour l'entretien des cals sont des boîtes de Pétri ou des petits bocaux de verre (diamètre ~5 cm, hauteur ~7 cm) stérilisables. Chaque lignée embryogène est ainsi conservée tant que son cal ne montre pas de signe particulier de dégénérescence et elle peut être utilisée au besoin pour la production d'embryons somatiques.

Tableau 4.1
Formulation des milieux nutritifs synthétiques MS et B5

	MS	B5
<u>Macronutriments</u>	<u>mM</u>	<u>mM</u>
NH ₄ NO ₃	20,6	0,0
KNO ₃	18,8	25,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,0	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	1,0
KH ₂ PO ₄	1,2	0,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,0	1,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,0	1,1
<u>Micronutriments</u>	<u>μM</u>	<u>μM</u>
KI	5,0	4,5
H ₃ BO ₃	100,0	50,0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	100,0	0,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0	60,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	30,0	7,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,0	1,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1	0,1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	0,1
Sel ferrique de EDTA ^A	100,0	100,0
<u>Vitamines</u>	<u>mg.L⁻¹</u>	<u>mg.L⁻¹</u>
Inositol	100,0	100,0
Acide nicotinique	0,5	1,0
Pyridoxine.HCl	0,5	1,0
Thiamine.HCl	0,1	10,0

^A acide éthylènediaminetétraacétique

Tableau 4.2
Combinaisons de nitrate d'ammonium (NH₄NO₃) et de nitrate de potassium (KNO₃) permettant de modifier la concentration en ammonium du milieu B5 dont la base contient au départ 2 mM de NH₄⁺

[NH ₄ ⁺] VISÉE mM	NH ₄ NO ₃		KNO ₃		[NH ₄ ⁺] TOTALE mM	[NO ₃ ⁻] TOTALE mM
	mM NH ₄ ⁺ AJOUTÉE	NO ₃ ⁻ mM	K ⁺ mM	NO ₃ ⁻ mM		
5	3	3	22	22	5	25
10	8	8	17	17	10	25
15	13	13	12	12	15	25
20	18	18	7	7	20	25

4.1.2 REPIQUAGE ET ENTRETIEN DES LIGNÉES EN SUSPENSION LIQUIDE

Lorsque désirée, une nouvelle lignée en suspension liquide est obtenue en inoculant un Erlenmeyer de 125 mL qui contient 50 mL de milieu liquide (MS ou B5 selon le cas), 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D et 30 g.L⁻¹ de sucrose, avec ~1 g de cal frais que l'on fractionne et disperse soigneusement dans le milieu. Une telle suspension, comme toutes les suspensions en flacons du présent travail, est maintenue dans le noir et à une température de 26°C sur le plateau rotatif à mouvement horizontal d'un incubateur-agitateur (Series 25, New Brunswick Scientific Co, New Jersey, USA) qui est ajusté à 120 révolutions par minute (RPM), où chaque révolution a un rayon d'environ 2 cm. À la différence d'un cal, une lignée cellulaire en suspension liquide est repiquée tous les quatorze à dix-sept jours en mélangeant un certain volume de la vieille suspension (inoculum) avec un volume environ quatre fois supérieur (~20% v/v) de milieu frais. La pratique habituelle consiste à transférer environ 10 mL d'inoculum, à l'aide d'une pipette stérile, dans un flacon de 125 mL contenant de ~40 mL de milieu, 30 g.L⁻¹ de sucrose et 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

4.2 CULTURE EN CUVÉE POUR LA PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES

L'expérimentation est entièrement effectuée avec des cultures en suspension liquide et suivant une méthode de culture que l'on nomme cuvette, parce que tous les nutriments (sauf les gaz) sont solubilisés à leurs concentrations maximales dans le milieu de culture au moment de l'inoculation. Les particularités de cette méthode sont détaillées dans les sous-sections suivantes.

4.2.1 MILIEUX DE CULTURE

Les deux milieux de culture MS et B5 (Tableau 4.1) sont utilisés durant les expériences préliminaires qui visent, entre autre, à déterminer lequel est le mieux approprié aux objectifs poursuivis et à la lignée embryogène sélectionnée. Suivant les résultats de ces premières expériences (Section

5.1), seul le milieu B5 est retenu pour la seconde partie des travaux. De plus, l'unique glucide utilisé pour toutes les cultures en suspension est le sucrose de qualité alimentaire dans une proportion de 30 g.L⁻¹ et le pH du milieu frais est ajusté à 5,6 avec une solution de KOH avant la stérilisation.

L'un des principaux objectifs de ce projet étant d'estimer l'importance relative du macronutriment ammonium (NH_4^+) pour la production d'embryons, des cuvées comptant des concentrations de 0, 2, 5, 10, 15 et 20 mM de ce cation sont comparées. Toutes ces cuvées sont effectuées en milieu B5 dont la formulation est modifiée afin d'avoir la concentration d'ammonium souhaitée sans changer les concentrations des autres nutriments. Ainsi, le milieu sans ammonium (0 mM NH_4^+) compte exactement les proportions de nutriments et de vitamines qui sont indiquées au Tableau 4.1, sauf que le 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est remplacé par 1 mM de K_2SO_4 , ce qui n'affecte pas la concentration de l'anion sulfate mais augmente celle du cation potassium de 25 à 27 mM, soit moins de 8% de sa concentration normale qui provient du KNO_3 et du KI. Le milieu avec 2 mM d'ammonium est le B5 régulier tel que formulé au Tableau 4.1 et qui contient initialement 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Pour les quatre autres milieux (5, 10, 15 et 20 mM NH_4^+), une solution spéciale de macronutriments est préparée. Celle-ci contient quatre des cinq composés dans les proportions indiquées au Tableau 4.1 pour B5 sauf pour le nitrate de potassium (KNO_3) qui en est complètement absent. Ainsi pour un milieu donné, la stratégie consiste à ajouter à cette solution spéciale de macronutriments contenant déjà 2 mM d'ammonium, la juste combinaison (Tableau 4.2) de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) et de nitrate de potassium (KNO_3) de façon à obtenir la concentration désirée de NH_4^+ et à maintenir celle du NO_3^- à 25 mM. Comme on peut le constater à la colonne centrale du Tableau 4.2, le seul inconvénient de cette stratégie est que la concentration du potassium (K^+) varie. Malgré que ce cation influence possiblement l'embryogenèse somatique, on suppose qu'une fluctuation de sa concentration de ~27 mM à ~7 mM ne constitue pas une variable et donc n'affecte pas les résultats. Évidemment cette variation pourrait être contournée par des ajouts de KCl et elle pourrait même être complètement

évitée en remplaçant le NH_4NO_3 et le KNO_3 par du chlorure d'ammonium (NH_4Cl). Ces deux méthodes auraient cependant pour effet de faire varier la concentration de Cl^- , un anion peu considéré dans la littérature mais que le professeur Archambault soupçonne d'être néfaste pour les cultures de cellules de plantes (communication personnelle).

L'approche adoptée pour obtenir des embryons repose sur le double principe voulant: 1) que la présence d'un ou plusieurs régulateur(s) de croissance de type auxine en concentration suffisante dans un milieu de culture primaire permet d'obtenir une lignée embryogène où il y a à la fois induction du développement d'embryons somatiques jusqu'au stade globulaire et inhibition de leur développement subséquent; et 2) que le transfert d'une lignée embryogène ainsi obtenue dans un milieu de culture secondaire (où la concentration en régulateur de croissance de type auxine est nulle ou du moins très réduite) permet aux embryons de poursuivre leur développement et, si les autres conditions sont favorables, de le compléter. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) seul et dans une proportion de 0,2 mg.L⁻¹ joue ce rôle d'inducteur-inhibiteur pour toutes les cultures en suspension. Ainsi, lorsque l'on désire obtenir des embryons de l'une des lignées embryogènes sélectionnées, l'approche consiste à inoculer un certain volume de milieu frais d'où ce régulateur est absent avec un petit volume (5 à 10% v/v) d'une suspension de cette lignée âgée d'environ dix jours. Le 2,4-D résiduel devenant très dilué, il n'inhibe plus la différenciation des cellules d'embryons.

4.2.2 DEUX MODES DE CULTURE CUVÉE

L'oxygène gazeux est un nutriment central dans tous les processus vivants aérobies, et l'un des objectifs de cette recherche est de prendre cela en considération. Dans ce contexte, en plus de comparer les cuvées pour différentes concentrations en ion ammonium, le protocole expérimental prévoit aussi de les comparer indirectement par rapport à la concentration d'oxygène dissous exprimée en pourcentage de saturation d'air dans l'eau à 26°C et à 1 atmosphère. Ceci est fait en mettant systématiquement en parallèle deux modes de culture cuvées: d'une part le mode flacon agité où

la concentration d'oxygène dissous dans le milieu varie en fonction des conditions physico-chimiques de culture, de la densité de la suspension, ainsi que de la respiration cellulaire, et d'autre part le mode bioréacteur où cette concentration est mesurée en continu afin de la maintenir au niveau prédéterminé de 20%.

La première des deux composantes principales de la culture en flacon agité est le flacon de verre conique (Erlenmeyer) d'une capacité de 500-mL fermé à l'aide d'un bouchon de coton (ouate enveloppée d'une gaze), le tout étant stérilisé à l'autoclave avec du milieu frais. La seconde composante est l'incubateur-agitateur (Series 25, New Brunswick Scientific Co, New Jersey, USA), un appareil électrique qui permet de contrôler la luminosité, la température interne, ainsi que le nombre de révolutions par minute (RPM) et le rayon de rotation du plateau horizontal.

L'autre mode de culture est le bioréacteur à rubans hélicoïdaux, dont les caractéristiques générales de l'agitateur sont connues pour différentes applications du génie chimique (Carreau et al. 1976, Jolicoeur et al. 1992, Kamen et al. 1992, Patterson et al. 1979, Yap et al. 1979) et qui sert maintenant couramment pour la culture de cellules vivantes incluant la production d'embryons somatiques (Archambault et al. 1994a&b, Kamen et al. 1991, Pépin 1996). Les principaux éléments du bioréacteur utilisé ici sont: un vase en pyrex d'une capacité de deux litres qui est de forme cylindrique (diam.intér.-11,5 cm) et arrondie à la base; un couvercle rond (diam.-13,0 cm & épaisseur -1,6 cm) en acier inoxydable retenu sur l'épaulement du vase par un collier de serrage; un agitateur (diam.supér.-10 cm; pas -8 cm; haut.total -11,4 cm) constitué de deux rubans hélicoïdaux (chacun: larg.-2,2 cm & long.-44,0 cm) à enroulement senestre autour d'un axe central vertical (long.-13,7 cm) auquel ils sont soudés; un moteur électrique à vitesse variable de marque "STIR-PAK" (Cole-Parmer, Model 4554-10) suspendu au-dessus du couvercle et permettant d'entraîner l'agitateur; ainsi qu'un arbre aseptique de transmission (Bellco Glass Inc., NJ, USA) vissé au centre du couvercle et dont l'axe mobile est joint par son extrémité inférieure à l'axe de l'agitateur, et par son extrémité supérieure à l'axe vertical rotatif du moteur électrique. Un joint torique d'élastomère (diam.-0,635 cm) est encastré dans une rainure pratiquée à

-0,3 cm du pourtour de la face interne du couvercle de façon à pouvoir fermer le bioréacteur hermétiquement sur tout le périmètre de l'épaulement du vase. Toujours à la face intérieure du couvercle, trois chicanes d'acier ($\sim 3,5 \times 5,0 \times 0,16$ cm) sont vissées en trois points équidistants, et elles sont ajustées de manière à former un angle d'environ 10° par rapport au rayon du couvercle. Le rôle de ces chicanes de surface est de briser les zones mortes de mixage qui sont susceptibles de se former dans la portion centrale supérieure de la suspension et d'augmenter le coefficient volumétrique de transfert global de matière ($k_L a$). Toutes les parties en acier et les soudures sont faites d'acier inoxydable poli de catégorie #316.

Le couvercle est percé de huit trous taraudés de diamètres différents. Outre celui du centre où se visse l'arbre de transmission, quatre des sept trous placés latéralement permettent de maintenir verticalement divers éléments à l'aide de raccords mâles de type SWAGELOK^{MC}. Ces éléments sont: 1) une sonde polarographique pour mesurer la concentration en oxygène dissous (Ingold^{MC} diam.=1,9 cm & long.=15,0 cm); 2) une sonde à pH (Phoenix^{MC} diam.=1,2 cm & long.=18,0 cm); 3) une sonde à conductivité ionique de fabrication maison (diam.=1,27 cm & long.=15 cm); et 4) un tuyau d'échantillonnage en acier inoxydable (diam.=1,27 cm). Les extrémités des sondes et du tuyau d'échantillonnage sont ajustées à la même hauteur que la partie inférieure des chicanes ($\sim 5,5$ cm sous la face interne du couvercle) de manière à ce qu'elles baignent en tout temps dans la suspension, sans toutefois nuire au mouvement de l'agitateur. Dans chacun des trois autres orifices du couvercle est visé un raccord cannelé sur lequel s'insère un tube de silicone souple dont les dimensions varient selon la fonction. Le plus grand de ces orifices sert successivement pour transvider l'inoculum d'une culture puis pour y attacher le tube d'un condenseur de vapeur d'eau durant la cuvée. L'un des deux petits raccords cannelés est directement attaché à un filtre stérile (Millipore^{MD}) puisqu'il sert d'évent lors de la stérilisation du bioréacteur ainsi qu'à l'admission des gaz pulsés durant une cuvée et le raccord du troisième orifice est relié à un réservoir de deux litres par un tube (~ 1 m) en silicone souple afin de permettre le remplissage du bioréacteur avec du

milieu de culture après la stérilisation.

Un autre aspect du bioréacteur 2-L est son dispositif d'échantillonnage, soit le tuyau d'échantillonnage dont l'extrémité intérieure baigne dans la suspension et l'extrémité extérieure est reliée à un tube à embout conique au verre dépoli par l'intermédiaire d'une section de tube en silicone souple. À ce dispositif s'ajoute une seringue de 50-mL et une fiole d'échantillonnage en verre de 125-mL dont la forme et la texture du goulot permettent l'emboîtement parfait de l'embout conique en verre dépoli. Cette fiole est aussi pourvue d'une buse latérale à laquelle est fixée un filtre stérile (Millipore^{MD}). L'ensemble des conditions de culture et d'opération du bioréacteur sont décrites à la Section 4.3.

4.2.3 PRÉPARATION TYPIQUE D'UN INOCULUM POUR LA PRODUCTION D'EMBRYONS

La préparation d'un inoculum se fait en flacon agité et elle diffère principalement d'un repiquage d'entretien bimensuel par les volumes en cause. En effet, le repiquage d'une suspension cellulaire embryogène se résume généralement à transférer environ 10 mL de cette suspension, à l'aide d'une pipette stérile, dans un flacon de 125-mL contenant ~40 mL (~20% v/v) de milieu frais, 30 g.L⁻¹ de sucrose et 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. La préparation d'un inoculum est similaire quant à la composition du milieu, mais le volume final d'inoculum nécessaire dépend du pourcentage d'inoculation, du nombre de cuvées et du volume de suspension requis pour chaque cuvée. Ainsi, pour une série expérimentale typique comportant une cuvée en bioréacteur 2-L (milieu frais ~1900 mL) et quatre cuvées en flacons agités de 500-mL (milieu frais ~190 mL) qu'on prévoit inoculer dans une proportion de 5% à 10% (v/v), il faut préparer un minimum de 140 mL (i.e. 100 mL + [4*10 mL]) à 280 mL d'inoculum. Dans le cadre du présent mémoire, l'expression "série de cuvées" désigne un ensemble de cuvées ayant un même inoculum.

Une autre différence importante entre la préparation d'un inoculum et un repiquage d'entretien routinier est le facteur temps. Bien qu'une suspension de cellules somatiques de carotte est repiquée après une

quinzaine de jours de culture, elle est apte à servir d'inoculum après environ dix jours, puisque, selon les études de croissance effectuées, les cellules d'une lignée typique sont alors en fin de phase exponentielle. Par ailleurs, il est courant dans le domaine de l'embryogenèse somatique de filtrer un inoculum dans le but de synchroniser la culture ou de sélectionner des cellules potentiellement plus embryogènes. Cependant la filtration impliquant plusieurs manipulations, il est peu probable qu'elle puisse être effectuée de façon rigoureusement identique d'une inoculation à l'autre. Donc cette pratique n'est pas appliquée ici, car elle risque d'induire un biais dans le protocole où les cuvées sont évaluées et comparées en fonction d'une production exprimée en nombres d'embryons ayant atteint le stade torpille. De plus, en n'utilisant aucun des moyens mentionnés à la Section 2.1.6 pour modifier la synchronie des cultures, on est à même d'estimer l'effet de certaines conditions physico-chimiques sur leur accroissement et de mieux juger de la valeur globale d'un procédé.

4.2.4 STÉRILISATION

De façon générale, un flacon de 500-mL contenant tout le volume de milieu frais requis (~190 mL) et fermé d'un bouchon de coton recouvert de papier d'aluminium est stérilisé pour 30 minutes avant l'inoculation. De même, un bioréacteur 2-L monté comme il se doit (avec couvercle, sondes, dispositif d'échantillonnage fermé avec un bouchon de coton, tubes de silicone, entonnoir d'inoculation enveloppé de papier d'aluminium, etc.) et contenant ~1000 mL de milieu frais, avec son réservoir de 2-L contenant le reste du même milieu (~1000 mL) sont stérilisés pour 50 minutes. Un condenseur en verre, des tubes, des cylindres gradués, ainsi que tout autres instruments ou pièces d'équipement nécessaires à une culture ou à l'inoculation et susceptibles de venir en contact avec les phases liquide ou gazeuses d'une suspension sont enveloppés de papier d'aluminium et stérilisés pour 30 minutes. Toutes les stérilisations sont effectuées dans un autoclave (121°C, 100 kPa), et tous les objets ou solutions ainsi stérilisés sont par la suite placés dans une hotte à courant laminaire afin de refroidir jusqu'à la température de la pièce. Une fois refroidie, la sonde à oxygène dissous du bioréacteur est branchée à une pile portative de façon à la maintenir polarisée.

4.2.5 PROCÉDURE D'INOCULATION

Avant de procéder à une série d'inoculations, le flacon contenant l'inoculum et ceux contenant le milieu frais stérilisé (flacons receveurs) sont pesés. De plus, les surfaces externes de tous les objets à être manipulés sont aspergées d'une solution d'éthanol (70% v/v) et elles sont asséchées, afin de réduire leurs charges microbiennes respectives.

Qu'il s'agisse de l'inoculation d'un flacon ou d'un bioréacteur, celle-ci est toujours effectuée dans une hotte à courant laminaire à l'aide d'un cylindre gradué, d'un brûleur au gaz et d'un petit chalumeau portatif. Brûleur et chalumeau servent à créer un environnement localement léthal pour des microorganismes ou des spores, ainsi qu'à chauffer et à assécher les surfaces stériles dans le but d'éliminer tout risque de contamination. Ces précautions étant prises, l'inoculation d'un flacon de 500-mL consiste à mesurer le volume approprié d'inoculum, à le transvider dans le flacon receveur et à fermer celui-ci de son bouchon de coton. L'inoculation d'un bioréacteur 2-L se fait de la même manière, sauf qu'après avoir transvidé le volume d'inoculum par l'entonnoir, celui-ci est retiré du couvercle pour être remplacé par un condenseur pré-stérilisé. Du milieu stérile est ensuite transvasé par gravité du réservoir au bioréacteur, jusqu'à ce que le niveau de la suspension dans ce dernier soit à environ 1,5 cm du couvercle. Quand une série d'inoculations est terminée, le flacon contenant l'inoculum résiduel et les flacons receveurs sont pesés à nouveau afin de déterminer les quantités exactes d'inoculum utilisé, puis un échantillon de 15 à 20 mL d'inoculum est prélevé dans chaque nouvelle suspension afin d'être analysé (temps zéro de chaque cuvée).

4.3 CONDITIONS DE CULTURE

4.3.1 CULTURE EN FLACONS AGITÉS

Suite à son inoculation, et pour toute la durée d'une cuvée, un flacon typique de 500-mL est maintenu à l'obscurité dans l'incubateur-agitateur où la température est contrôlée à 26°C et dont la vitesse d'agitation du plateau est réglée à 120 RPM. Les courtes séances d'échantillonnage constituent les seuls moments où un flacon n'est pas maintenu dans ces conditions.

4.3.2 CULTURE EN BIORÉACTEURS

L'agitation d'une suspension embryogène dans le bioréacteur dépend de l'agitateur à rubans hélicoïdaux qui est relié au moteur électrique à vitesse variable par l'intermédiaire de l'arbre aseptique de transmission. Puisque l'enroulement de l'agitateur est senestre, la rotation du moteur est réglée dans le sens horaire de manière à induire un effet de pompage descendant dans la partie centrale de l'agitateur d'une part, et un effet de cisaillement ascendant entre les lames de l'agitateur et la paroi cylindrique du bioréacteur d'autre part (Jolicoeur et al. 1992). En référence à des travaux précédents, la vitesse de l'agitateur (n) est fixée à 60 RPM, ce qui correspond à une vitesse de bout d'agitateur ($\pi * n * \text{diam. agitateur}$) de 31,4 cm.s⁻¹ et à un $k_L a$ de surface de 0,9 h⁻¹ (Archambault et al. 1994b).

Comme pour les flacons agités, la pression et la température d'opération du bioréacteur sont respectivement de 1 atmosphère et 26°C. Pour maintenir cette température, le bioréacteur repose sur une plaque chauffante électrique (THERMOLYNE^{MC}, Type 1000) munie d'un contrôleur à intégration proportionnelle (Modèle TC300 de Viconics) l'activant en fonction des lectures qui lui sont retransmises par le détecteur de température collé à mi-hauteur sur la surface externe du vase de pyrex. De plus, la portion vitrée du bioréacteur est entièrement couverte d'une feuille double en aluminium afin que la suspension s'y développe à l'obscurité.

Un aspect important de l'utilisation de sondes est qu'elles doivent être calibrées avant d'être montées sur le couvercle du bioréacteur et stérilisées. Puisque la lecture et l'acquisition des données provenant de chaque sonde se font avec le logiciel ID^{MC} (BIO-EXPERT Inc, Québec), c'est avec ce logiciel que sont enregistrées les valeurs de calibration. La sonde à conductivité est calibrée en milli-Siemens (mS) avec de l'eau pure désionisée pour le zéro, et avec quatre ou cinq concentrations différentes de nitrate d'ammonium en solutions aqueuses pour différentes valeurs connues. Similairement, la sonde à pH est calibrée avec deux solutions tampons commerciales de pH 4 et pH 7. Quant à la sonde à oxygène dissous (OD), on la calibre dans un certain volume d'eau pure désionisée que l'on sature avec de l'azote (N₂) pour la valeur de 0% OD puis avec de l'air pour la valeur de 100% OD. Une fois calibrées, les sondes sont installées sur le bioréacteur et stérilisées avec celui-ci.

En cours de culture, les lectures des trois sondes sont enregistrées de façon continue par un ordinateur de type PC-AT (80286; 16 MHz) à l'aide du logiciel ID^{MC}. Cependant, à la différence des lectures de conductivité et de pH, celles de pourcentage d'oxygène dissous (%OD) servent aussi à maintenir, par rétroaction, la concentration d'oxygène à un niveau équivalent à 20% de saturation d'air dans l'eau. En fonction de cette consigne, un algorithme de calcul incorporé au logiciel utilise les lectures de %OD afin de décider des temps d'ouvertures de trois valves solénoïdes qui contrôlent indépendamment les écoulements respectifs de l'oxygène pur, de l'azote pur et de l'air, ces trois gaz se mélangeant pour former un seul écoulement de surface dans la tête du bioréacteur. L'écoulement de ce mélange gazeux est filtré (laine de verre et filtres Millipore^{MC}) afin de prévenir toutes formes de contamination et son débit est fixé à -0,2 L.min⁻¹ (-0,1 VVM) à l'aide de débitmètres.

Suite à l'inoculation et à la mise en marche d'un bioréacteur, après avoir vérifié le fonctionnement des sondes et des instruments périphériques, il importe de placer le dispositif d'échantillonnage dans une position telle que l'extrémité de son tube à embout conique en verre dépoli baigne, en tout temps, dans un flacon de 125-mL contenant une solution aqueuse

stérile composée de neuf volumes d'éthanol 70% (v/v) pour un volume de formaldéhyde. On empêche les vapeurs de cette solution d'entrer en contact avec la phase gazeuse de la culture en fermant hermétiquement, à l'aide d'une ou deux pinces amovibles, le tube en silicone souple qui joint le tuyau d'échantillonnage et le tube de verre à embout conique.

4.4 ANALYTIQUE

4.4.1 ÉCHANTILLONNAGE et MESURES

Les cuvées d'une même série sont échantillonnées ensemble, tous les trois ou quatre jours, à raison d'environ 30 mL pour le bioréacteur et de 15 à 20 mL pour celles en flacons. Bien que les procédures diffèrent selon le mode de culture, à l'issue d'une série d'échantillonnages on a, pour chaque flacon et chaque bioréacteur, un petit échantillon stérile de 2 à 3 mL dans une boîte de Pétri et un plus gros échantillon (~15 mL) dans une bouteille non-stérile.

Les échantillons des boîtes de Pétri étant stériles, ils servent ultérieurement pour les tests de germination. Les échantillons en bouteilles servent pour toutes les autres mesures ou analyses, et chacun est traité de manière semblable. La conductivité de l'échantillon est mesurée en mS avec un conductimètre portatif de marque OAKTON^{MC}, alors que son pH l'est avec un potentiomètre de table (Fisher Accumet, modèle 805MP). La concentration d'embryons (Es.mL⁻¹) ayant atteint le stade torpille (>1 mm) est évaluée par comptage à l'oeil nu à deux ou trois reprises en étendant chaque fois de 1 à 3 mL d'échantillon (ce volume dépendant de la densité de la suspension) sur un plateau de comptage, et la valeur moyenne des décomptes est retenue comme résultat de production. Un volume connu de l'échantillon est centrifugé à 200 G durant cinq minutes pour évaluer le volume de biomasse sédimentée (exprimé en pourcentage du volume total de la suspension). La concentration de biomasse humide (g mh.L⁻¹) est déterminée en pesant le résidu demeuré sur un filtre en fibre de verre (Gelman Sciences^{MC}, Type A/E) après filtration

sous vide d'un volume connu de suspension. Suite à la déshydratation de ce résidu et du filtre dans une l'étuve (80°C, 24 h), la concentration de biomasse sèche (g ms.L⁻¹) est calculée. De plus, le filtrat résultant de la filtration sous-vide est refiltré (Millipore^{MC}, Type HA 0,45 µm) pour l'analyse chromatographique de onze macronutriments. Cet échantillon final de filtrat est généralement congelé avant les analyses de macronutriments, puisque celles-ci sont effectuées lorsque le nombre d'échantillons le justifie.

4.4.2 ANALYSE DES MACRONUTRIMENTS

La technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) est utilisée pour mesurer dans le filtrat les concentrations extracellulaires de onze macronutriments, soient: celles des trois glucides glucose, fructose et sucrose; celles des trois anions nitrate (NO₃⁻), chlorure (Cl⁻) et sulfate (SO₄²⁻); ainsi que celles des cinq cations ammonium (NH₄⁺), sodium (Na⁺), potassium (K⁺), magnésium (Mg²⁺) et calcium (Ca²⁺). Pour l'analyse des glucides le système HPLC compte une pompe Waters (Modèle 6000A) permettant d'obtenir un débit d'eau comme phase mobile de 1,0 mL.min⁻¹ avec une pression comprise entre 5000 et 7000 kPa, un injecteur automatique Gilson (Modèle 231/401), un détecteur réfractométrique Gilson (Modèle 132), un chauffe-colonne ManTech (Modèle 7980), un intégrateur Hewlett-Packard (Modèle HP3394A) et une colonne Biorad (Modèle HPX87C) tempérée à 80°C permettant la séparation sélective des glucides.

Ce système HPLC sert également à l'analyse des cations et des anions, sauf pour le détecteur, la colonne et la phase mobile. Dans les deux cas on travaille avec un détecteur de conductivité Alltech (Modèle 320) maintenu à 35°C et calibré entre 0 et 1 mS pour des injections de 20µL. Pour les anions on utilise une colonne Alltech Universal Anion gardée à 35°C avec comme phase mobile une solution aqueuse d'acide hydroxybenzoïque (5 mM) dont le pH est ajusté à 7,9 avec du LiOH et le débit est de 1,0 mL.min⁻¹ lorsque la pression se situe entre 4000 et 8000 kPa. Pour les cations on utilise une colonne Alltech Universal Cation 7U tempérée à 35°C avec comme

phase mobile une solution aqueuse d'acide citrique (7 mM) dont le débit est de 0,8 mL.min⁻¹ quand la pression est comprise entre 3500 et 7000 kPa. Toutes les analyses par HPLC ainsi effectuées permettent une bonne discrimination des macronutriments. Elles ont une limite de sensibilité d'environ 0,05 mM et leurs résultats sont reproductibles (Archambault et al. 1994a).

Pour certaines cuvées la concentration de l'anion nitrate est estimée avec une sonde ionique spécifique au NO₃⁻ branchée à un potentiomètre de table plutôt qu'avec le HPLC, alors que dans tous les cas la concentration de l'anion phosphate (PO₄³⁻) est évaluée par colorimétrie (Spectrophotomètre Sequoia-Turner, modèle 390) suivant la méthode de l'acide ascorbique décrite dans Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Greenberg et al. 1985).

Pour un échantillon donné, les méthodes décrites précédemment permettent d'obtenir les mesures des concentrations des macronutriments dans le filtrat (Conc_F). Afin de convertir ces mesures en résultats de concentrations des macronutriments dans la suspension (Conc_S), il faut effectuer une correction en considérant la proportion de liquide qui est demeurée dans la biomasse humide lors de la filtration sous vide de la suspension. On calcul donc suivant la relation:

$$\text{Conc}_S = \text{Conc}_F * ((\text{PTÉ} - \text{PLBH})/\text{PTÉ}) \quad (\text{équation 4.1})$$

où PTÉ = Poids Total de l'Échantillon

et PLBH = Poids de Liquide dans la Biomasse Humide

4.4.3 TESTS DE GERMINATION DES EMBRYONS SOMATIQUES

Dans le but de fournir une certaine appréciation de la qualité des embryons somatiques produits dans une cuvée à un moment donné, on procède à un test simple de germination *in vitro*. Lors de l'échantillonnage d'une série de cuvées, ce test est effectué sur l'échantillon du bioréacteur et sur celui d'au moins un des flacons qui l'accompagnent. Pour une cuvée donnée, le test de germination consiste à choisir arbitrairement et à

transférer, sous conditions aseptiques, de cinq à dix embryons de l'échantillon stérile (conservé dans une boîte de Pétri) sur une gélose nutritive (~20 mL de milieu B5 avec ~9 g.L⁻¹ de poudre d'agar non purifiée et 30 g.L⁻¹ de sucrose) contenue dans un petit bocal (diamètre ~5 cm & hauteur ~10 cm) de verre sur lequel se visse un couvercle. Bocal, milieu et couvercle sont préalablement stérilisés et refroidis. Après un transfert d'embryons, le bocal est refermé, identifié et placé sur une étagère, à la température ambiante et sous l'éclairage normal de la pièce. Au cours des sept à vingt jours suivants, la proportion d'embryons ayant germé est enregistrée et un examen visuel sommaire des plantules est fait afin d'estimer, selon les apparences morphologiques, la qualité de leurs racines, de leurs tigelles et de leurs cotylédons.

CHAPITRE 5 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le présent chapitre se divise en une courte première section portant sur les résultats qui ont permis d'arrêter le choix des paramètres de culture (milieu et lignée appropriés, conditions d'inoculation et d'opérations, types de mesures effectuées, etc.) et une seconde section portant sur la production d'embryons somatiques. Ces deux sections, 5.1 et 5.2, sont subdivisées respectivement en six et trois sous-sections. De façon générale, constats et interprétations sont présentés avec les résultats auxquels ils se rapportent, gardant les conclusions pour le Chapitre 6.

5.1 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES

Malgré la revue de littérature préalable, au moment d'entreprendre le travail expérimental il reste des décisions à prendre concernant certains paramètres de culture. Celles-ci sont prises en référence aux expériences préliminaires discutées dans les six sous-sections suivantes.

5.1.1 RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

Le travail expérimental préliminaire consiste à obtenir une lignée de cellules somatiques de carotte qui soit stable et suffisamment embryogène pour que le compte des embryons ayant atteint le stade torpille ($\geq 1\text{mm}$) soit une donnée significative, ainsi qu'à établir les conditions de culture les plus appropriées aux étapes subséquentes du protocole expérimental. Les principaux résultats des expériences préliminaires sont résumés au Tableau 5.1 pour les cuvées en bioréacteurs et au Tableau 5.2 pour celles des flacons témoins correspondants. Tel qu'expliqué au Chapitre 4 et en référence à des travaux antérieurs (Archambault et al. 1994a), toutes les cuvées en bioréacteurs ont été effectuées à 26°C en contrôlant la concentration de l'oxygène dissous à 20% de la saturation en air dans l'eau et en maintenant la vitesse de rotation de l'agitateur à 60 RPM dans le sens approprié afin de bénéficier de l'effet de pompage désiré. À la colonne "PAIR" du Tableau 5.2 est indiquée, pour chaque flacon, la cuvée en bioréacteur correspondante et, indirectement, la sous-culture et la période de culture.

Tableau 5.1
Croissance et production de diverses lignées embryogènes en bioréacteurs

CUVÉE	MILIEU	INOCULATION		DURÉE (h)	ACCROISSEMENT de BIOMASSE (g ms.L ⁻¹)	EMBRYONS		GERMINATION	
	$\Sigma[\text{NH}_4]_i$ (mM)	%v/v	Li- gnée			[] _{MAX} E.mL ⁻¹	TEMPS (h)	% _{MAX}	TEMPS (h)
¹ H12	B5-2mM	10,0	DC3	792	0,3 à 13,1	171	475	80	248
A-1	² B5-2mM	12,8	DC3	504	0,3 à 4,4				
A-2	B5-2mM	² -25	DC3	840	3,5 à 8,6	40	240	ND	
B	B5-2mM	10,4	SP1a	672	0,5 à 9,2	5	504	10	504
C	MS-21mM	10,3	DCN5b	840	0,6 à 14,5	54	816	70	216
D	B5-5mM	6,9	SP1a	576	0,6 à 11,5	27	408	100	144 à 408
E	B5-2mM	8,7	SP1b	600	0,5 à 13,3	98	600	83	456

¹ H12 a été effectuée avec un bioréacteur de 11 litres.

² Le milieu de l'étape I (croissance) contenait 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D et toute la biomasse humide demeurée dans le réacteur après drainage du milieu utilisé a servi comme inoculum pour la seconde étape (-25% v/v).

Tableau 5.2
Croissance et production de diverses lignées embryogènes en flacons agités

CUVÉE	MILIEU	INOCULATION		DURÉE (h)	ACCROISSEMENT de BIOMASSE (g ms.L ⁻¹)	EMBRYONS		GERMINATION	
	$\Sigma[\text{NH}_4]_i$ (mM)	%v/v	PAIR			[] _{MAX} E.mL ⁻¹	TEMPS (h)	% _{MAX}	TEMPS (h)
T3	B5-2mM	10,6	B	672	0,6 à 15,4	11	504	100	432
T4	B5-2mM	9,5	B	672	0,6 à 14,3	7	600	100	432
T5	MS-21mM	10,0	C	732	0,4 à 18,7	30	492	40	660
T6	MS-21mM	10,0	C	660	0,3 à 14,7	48	492	50	396
T7	B5-5mM	5,0	D	576	0,8 à 15,4	30	408	80	408
T8	B5-5mM	4,8	D	576	0,7 à 13,3	29	480	70	480
T9	B5-2mM	4,8	D	576	1,2 à 16,1	5	480	ND	
T10	B5-2mM	9,3	E	600	0,5 à 15,7	54	456	100	552
T11	B5-2mM	10,3	E	600	0,5 à 14,7	48	552	100	600

5.1.2 LIGNÉES, CROISSANCE ET PRODUCTION

Les lignées désignées SP (pour variété Six Pack) et DCN (pour *Daucus carota*, variété Navajo) sont obtenues à partir de graines et suivant la méthode décrite au Chapitre 4. Quant à la lignée désignée DC3, elle provient d'une mise en culture effectuée par le Dr. Robert Williams de BIOPRO à partir de tissu d'une carotte achetée dans un marché d'alimentation. De nombreuses autres lignées de ces variétés ainsi que de la variété Fancy Pack furent obtenues avec deux milieux (B5 et MS) à l'aide de régulateurs de croissance différents, mais après sélection seulement celles rapportées aux Tableaux 5.1 et 5.2 sont utilisées pour la culture en bioréacteurs. De façon générale, la sélection d'une lignée s'effectue d'après le nombre d'embryons somatiques adventifs proliférant sur un cal de cette lignée alors que celui-ci est placé sur un gel nutritif sans régulateur de croissance, ou selon le nombre d'embryons somatiques obtenus en suspension dans un milieu liquide exempt de régulateur de croissance. De toutes les lignées étudiées, la SP1b s'avère être la plus embryogène en bioréacteurs comme en flacons.

À l'origine des lignées-soeurs SP1a et SP1b, il y a une même graine de la variété Six Pack désignée par le chiffre "1" dont le cal fut partagé en deux (a et b) lors de la mise en suspension liquide. Ces deux lignées et leurs sous-cultures furent manipulées et maintenues de la même façon. Or, la comparaison des résultats pour les cuvées B et E et de leurs flacons témoins correspondants (T3,T4 & T10,T11) indique que la lignée SP1b donne environ vingt fois plus et cinq fois plus d'embryons somatiques que la lignée SP1a en bioréacteurs et en flacons respectivement. Ceci met en évidence la dimension empirique et aléatoire du développement de lignées embryogènes. Bien que cette dimension soit reconnue par tous les spécialistes du domaine, la littérature n'y apporte pas d'explication définitive. On en déduit que des facteurs inconnus, donc non contrôlés, jouent un rôle important dans l'acquisition du potentiel embryogène et que le processus de sélection doit être systématique et cohérent afin d'en minimiser les effets.

Par ailleurs, un observateur attentif pourrait argumenter que la meilleure productivité de SP1b dans la cuvée E résulte peut être du plus faible

volume d'inoculum utilisé dans ce cas (8,7% v/v) en comparaison de SPLa dans la cuvée B (10,4% v/v). Cet argument ne tient pas devant la comparaison des flacons témoins correspondants, car T3, T4, T10 et T11 ont été inoculés dans des proportions semblables (~10%) au bioréacteur de la cuvée B et les résultats de production pour T10 et T11 sont quand même dix fois supérieurs à ceux de B et cinq fois supérieurs à ceux de T3 et T4.

5.1.3 MILIEU DE CULTURE

Les milieux B5 et MS sont parmi les milieux nutritifs synthétiques les plus couramment utilisés en culture de cellules de plantes. Leur différence principale tient à ce que la concentration en ion ammonium du second est plus de dix fois celle du premier (Tableau 4.1). Compte tenu que le thème central de ce projet est de contribuer à l'étude des effets de ce cation sur l'embryogenèse somatique et qu'il est préférable de travailler avec des milieux connus, la question se pose à savoir s'il faut explorer ces effets pour des concentrations initiales d'ammonium autour de, et supérieures à 2 mM (B5) ou autour de, et supérieures à 21 mM (MS).

Aux Tableaux 5.1 et 5.2, les résultats des concentrations maximales d'embryons somatiques indiquent que la lignée SPLa est la moins productive. Cette lignée est utilisée dans deux séries de cuvées ne différant que par la concentration initiale en ammonium de leurs milieux de culture B5: d'une part la série B en bioréacteur avec les flacons témoins T3 et T4 où le milieu B5 régulier contient 2 mM d'ammonium et d'autre part la série D en bioréacteur avec les flacons témoins T7 et T8 où le milieu B5 est modifié pour contenir 5mM du cation. La série D inclut aussi la cuvée T9 qui est issue d'un inoculum commun (ainsi que dans les mêmes proportions ~5%) mais contenant du B5 régulier. La comparaison des résultats de ces deux séries indique que le milieu enrichi en ammonium permet d'obtenir de cinq à six fois plus d'embryons en bioréacteur et de trois à quatre fois plus en flacons. Ceci confirme que ce cation est important dans l'embryogenèse somatique chez la carotte (Halperin & Wetherell 1965, Kamada & Harada 1979b & 1984a&b, Wetherell & Dougall 1976).

Par ailleurs, les productions maximales en bioréacteurs de 5 Es.mL⁻¹ pour la cuvée B (B5, 2 mM NH₄⁺), de 27 Es.mL⁻¹ pour la cuvée D (B5, 5 mM NH₄⁺) et de 54 Es.mL⁻¹ pour la cuvée C (MS, 21 mM NH₄⁺), portent à croire que, même si la lignée de la cuvée C est différente de celle des deux autres, en augmentant la concentration d'ammonium à 21 mM plus d'embryons seront obtenus. Suivant ces résultats, il faudrait poursuivre les travaux avec le milieu MS comme base. Cette déduction hâtive mènerait cependant à mésestimer l'importance de la lignée, soit que, pour une même espèce, une bonne lignée embryogène en milieu B5 peut produire plus d'embryons qu'une lignée faiblement embryogène en milieu MS. C'est exactement la situation que l'on constate en comparant les résultats des cuvées en bioréacteurs C et E alors qu'environ deux fois plus d'embryons sont produits en milieu B5 régulier (cuvée E) qu'en milieu MS régulier (cuvée C), avec les lignées SP1b et DCN5b respectivement. Considérant l'importance de l'ion ammonium, ce résultat indique que DCN5b est probablement une lignée peu embryogène. De plus, il ressort que les effets de l'ammonium sur l'embryogenèse somatique peuvent être mieux étudiés à partir d'un milieu de base contenant une faible concentration de ce cation quitte à l'augmenter progressivement, que de commencer avec une concentration particulièrement élevée comme dans MS et de ne pas savoir s'il est préférable de poursuivre avec des concentrations supérieures ou inférieures. Selon cette comparaison de la productivité de quatre cuvées en bioréacteurs (B, C, D et E), il est donc préférable de travailler avec B5 comme milieu de base et d'utiliser la lignée productive SP1b.

5.1.4 CULTURE EN FLACONS ET CULTURE EN BIORÉACTEURS

À la sous-section précédente, différentes comparaisons entre les cuvées en bioréacteurs B, C, D et E permettent de faire certaines déductions parce que leurs résultats de production respectifs sont significativement distincts. Or il n'est pas possible d'arriver aux mêmes constats si l'on se base uniquement sur les résultats des cuvées correspondantes en flacons témoins. Par exemple, les résultats de production maximale d'embryons somatiques des cuvées témoins de la série C (30 Es.mL⁻¹ pour T5 et 48 Es.mL⁻¹ pour T6) ne peuvent être considérés comme significativement différents

de ceux pour les cuvées témoins de la série D (30 Es.mL⁻¹ pour T7 et 29 Es.mL⁻¹ pour T8), ou encore de ceux des témoins de la série E (54 Es.mL⁻¹ pour T10 et 48 Es.mL⁻¹ pour T11). Globalement donc, le bioréacteur semble s'avérer un outil de culture et de production d'embryons somatiques pouvant permettre une caractérisation plus subtile des lignées et des conditions de culture qu'en flacons agités.

Comparant les quatre cuvées en bioréacteurs B, C, D et E à leurs homologues en flacons témoins, on constate que des lignées peu embryogènes comme DCN5b et SP1a donnent des quantités au moins semblables d'embryons en bioréacteurs et en flacons, alors que la lignée la plus productive SP1b donne deux fois plus d'embryons en bioréacteurs qu'en flacons. Donc, les conditions physico-chimiques de culture que le bioréacteur permet de contrôler directement (agitation et concentration en oxygène dissous) ou indirectement (cisaillement et échanges gazeux) apparaissent importantes même dans les pires cas. Sans déprécier ou exclure la culture en flacons agités, ces résultats confirment que les connaissances en embryogenèse somatique ne pourront pas atteindre la pertinence et la maturité requises pour que les applications escomptées puissent voir le jour sans les apports de la culture contrôlée en bioréacteurs (Ammirato & Styer 1985, Archambault et al. 1994a, Ducos et al. 1987, Grand d'Esnon et al. 1989, Hamalainen et al. 1993, Harrell et al. 1992, Jay et al. 1992 & 1994, Kessell & Carr 1972, Kessell et al. 1977, Levin et al. 1988, McDonald & Jackman 1989, Nouaille & Pétiard 1988, Park et al. 1989, Smith et al. 1990, Stuart et al. 1987, Styer 1985, Uozumi et al. 1993).

Les deux colonnes les plus à droite des Tableaux 5.1 et 5.2 concernent la germination *in vitro* des embryons somatiques sur des géloses nutritives et dans des conditions stériles. Pour chaque cuvée, le pourcentage indiqué est celui du meilleur taux de germination et le temps est celui du moment où les embryons concernés par ce taux sont échantillonnés et transférés sur la gélose. Ces résultats sont rapportés afin d'illustrer que toutes les cuvées, en bioréacteurs comme en flacons, permettent la production d'embryons capables de germer dans des conditions stériles. Il serait cependant erroné de parler de conversion (Fujii et al. 1989, Redenbaugh

1987 & 1993, Stuart & Strickland 1984a & b) et très spéculatif de pousser plus loin l'interprétation de ces résultats car il est apparu en cours d'expérimentation que, bien qu'initialement semblables en apparence, les plantules ne sont pas toutes de la même qualité. Ainsi, des plantules aux tissus vitrifiés, donc trop fragile pour devenir des plantes en bonne santé, sont comptées au même titre que des plantules normales. Conséquemment, seuls les résultats quantitatifs sont considérés ici.

5.1.5 PROCÉDÉ DE PRODUCTION

Compte tenu que chacune des cellules embryogènes d'une culture donnée a théoriquement le potentiel pour devenir un embryon somatique, il semble logique de supposer qu'un plus grand nombre de ces cellules cultivées dans un milieu dépourvu de régulateurs de croissance devrait résulter en une production accrue d'embryons. Dans cette perspective, un procédé en deux étapes est concevable: une première étape de prolifération des cellules embryogènes dans un milieu contenant un ou plusieurs régulateurs de croissance appropriés, suivie d'une seconde étape de production dans un milieu sans régulateur. Les cuvées A-1 et A-2 du Tableau 5.1 constituent respectivement de telles étapes successives de prolifération et de production pour la lignée DC3 effectuées dans un bioréacteur à rubans hélicoïdaux de deux litres. La cuvée H12 implique aussi la lignée DC3 mais cette fois dans un bioréacteur de onze litres muni d'un agitateur semblable et sans étape préalable de prolifération. Bien qu'une comparaison des cuvées A et H12 ne puisse être absolument décisive sur la pertinence d'un procédé en deux étapes, elle peut tout de même être indicative d'une tendance. Ainsi, parce que la cuvée H12 est nettement plus productive que la cuvée A-2, respectivement 171 et 40 Es.mL⁻¹, un procédé en une seule étape est choisi pour l'ensemble des cuvées expérimentales du présent travail. Donc chacune des cuvées des travaux rapportés subséquemment résulte de l'inoculation directe d'un volume de milieu frais sans régulateur de croissance avec un certain volume (entre 5 et 11 % v/v) de suspension cultivée dans un milieu similaire contenant 0,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Ce choix de proportions d'inoculum relativement élevées tient compte de la controverse sur la concentration d'inoculum

déjà présentée à la sous-section 2.2.2 de la revue de littérature.

5.1.6 PARAMÈTRES RETENUS

Les résultats présentés dans cette section permettent de déterminer les paramètres de culture retenus pour la production d'embryons somatiques de carotte. Ainsi, le milieu B5 semble convenir à l'étude expérimentale de différents aspects nutritionnels de l'embryogenèse somatique et plus particulièrement ceux relatifs à l'ion ammonium. Puisque la lignée SP1b est bien adaptée à ce milieu, elle y est maintenue et sous-cultivée pour les cuvées subséquentes. Les résultats préliminaires en bioréacteurs étant cohérents et fiables, toutes les cuvées en bioréacteurs 2-L sont donc effectuées dans l'obscurité, à une température de 26°C, avec une concentration de 20% d'oxygène dissous et avec une agitation de 60 RPM. Par ailleurs, même si la quantité et la qualité des embryons somatiques obtenus en bioréacteurs semblent généralement supérieures à celles des embryons obtenus en flacons agités, il reste que la culture en flacons constitue la meilleure source de comparaison et de confirmation des résultats générés par la culture en bioréacteurs. Il est aussi établi que les cuvées ne doivent compter qu'une seule étape de production et que l'inoculum de chaque cuvée en bioréacteur doit également servir à l'ensemencement de quatre flacons de 500-mL: deux flacons contrôles contenant du milieu B5 régulier (2 mM NH_4^+) qui constituent un point de référence quant à la stabilité de la lignée embryogène et deux flacons témoins contenant le même milieu que le bioréacteur correspondant qui permettent une comparaison directe des deux modes de culture. Dans ce contexte, il est utile de rappeler que le terme "série de cuvées" fait référence à l'ensemble constitué d'une cuvée en bioréacteur ainsi que des cuvées en flacons témoins et en flacons contrôles ayant un même inoculum. Une telle série est désignée par la même lettre majuscule que la cuvée correspondante en bioréacteur.

5.2 PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES

Cette seconde section présente de l'information pouvant être obtenue de cuvées différentes où des embryons somatiques de carotte sont produits dans des conditions similaires de culture, sauf pour la concentration initiale du milieu en ion ammonium qui est variée. Pour bien rendre compte de cette information, elle est subdivisée en trois sous-sections: la première donnant un aperçu général des résultats, la seconde où les résultats détaillés d'une culture typique sont présentés et la troisième où certains aspects importants de la cinétique nutritionnelle de l'embryogenèse somatique sont comparés.

5.2.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

Le protocole expérimental suivi comporte l'utilisation du milieu standard B5 pour six concentrations initiales différentes en ion ammonium: 0, 2, 5, 10, 15 et 20 mM. Ceci correspond à six cuvées en bioréacteurs 2-L et à vingt-et-une cuvées en flacons de 500-mL. Le Tableau 5.3 présente les six cuvées en bioréacteurs 2-L et le Tableau 5.4 porte parallèlement sur les cuvées correspondantes en flacons (flacons témoins et flacons contrôles confondus). Au Tableau 5.4 on note aussi que toutes les cuvées dont la concentration initiale en ammonium est de 2 mM sont des flacons contrôles, sauf T10 et T11 qui sont à la fois des témoins et des contrôles.

5.2.1.1 Inoculation des cuvées et stabilité de la lignée SP1b

Selon les résultats présentés aux Tableaux 5.3 et 5.4, une variation arbitraire du volume de l'inoculum (entre 5% et 10% du volume de milieu frais inoculé) n'a pas d'influence sur l'accroissement de biomasse sèche, sur la production d'embryons somatiques et sur leur germination. En conséquence on ne peut vraisemblablement pas relier les différences observées à une variation des volumes de l'inoculum, ce qui tend à confirmer que sa concentration est effectivement un faux problème (sous-section 2.2.2).

Les données d'inoculation des Tableaux 5.3 et 5.4 indiquent que cinq sous-cultures (numérotées 7, 9, 10, 12 et 13) de la même lignée SP1b ont servi à ensemer les vingt-sept cuvées (6 en bioréacteurs et 21 en flacons). D'après les numéros des sous-cultures et compte tenu que la lignée SP1b

Tableau 5.3
Croissance et production de cultures embryogènes en bioréacteurs

CUVÉE NOM	[NH ₄] _i mM	INOCULATION		DURÉE (h)	ACCROISSEMENT de BIOMASSE (g ms.L ⁻¹)	EMBRYONS		GERMINATION	
		%v/v	¹ #ss cltr.			[] _{MAX} E.mL ⁻¹	TEMPS (h)	% _{MAX}	TEMPS (h)
G	0	7,7	9	864	0,40 à 14,38	39	768	75	360
E	2	8,7	7	600	0,48 à 13,28	98	600	83	456
K	5	5,0	13	816	0,47 à 10,24	155	744	90	336
I	10	5,0	10	984	0,37 à 10,68	168	576	80	408&576
J	15	5,0	12	720	0,38 à 12,58	273	648	100	576
L	20	5,0	13	816	0,48 à 9,94	242	744	70	336à480

¹ # de sous-culture de la lignée SP1b

Tableau 5.4
Croissance et production de cultures embryogènes en flacons agités

CUVÉE NOM	[NH ₄] _i mM	INOCULATION		DURÉE (h)	ACCROISSEMENT de BIOMASSE (g ms.L ⁻¹)	EMBRYONS		GERMINATION	
		%v/v	PAIR			[] _{MAX} E.mL ⁻¹	TEMPS (h)	% _{MAX}	TEMPS (h)
T16	0	7,5	G	768	0,36 à 15,44	19	600	100	432
T17	0	8,0	G	768	0,42 à 16,04	22	600	ND	
T10	2	9,3	E	600	0,51 à 15,68	54	456	100	552
T11	2	10,3	E	600	0,47 à 14,69	48	552	100	600
T18	2	9,0	G	768	0,51 à 17,23	26	432	100	360à696
T19	2	7,5	G	768	0,44 à 16,34	30	528	100	432à768
T22	2	7,5	I	672	0,67 à 16,04	27	480	80	408
T23	2	6,5	I	672	0,56 à 19,14	30	480	70	312
T26	2	4,9	J	720	0,51 à 16,41	47	648	100	264
T27	2	4,9	J	720	0,54 à 15,17	56	648	50	648
T30	2	5,0	K	672	0,63 à 14,42	25	480	60	480
T31	2	5,0	K	672	0,51 à 15,29	21	408	50	672
T35	2	5,0	L	672	0,61 à 14,31	21	408	50	672
T36	2	5,0	L	672	0,60 à 14,62	34	408	50	576à672
T28	5	5,0	K	672	0,61 à 12,17	50	576	70	480
T29	5	5,0	K	672	0,62 à 14,25	68	480	60	408
T20	10	6,0	I	672	0,44 à 13,53	131	672	100	240à576
T21	10	5,5	I	672	0,48 à 13,28	115	672	100	312
T25	15	5,0	J	720	0,44 à 13,63	244	720	100	432
T33	20	5,0	L	672	0,58 à 10,42	110	672	80	672
T34	20	5,0	L	672	0,62 à 10,10	122	576	60	576

est repiquée tous les quatorze à dix-sept jours, celle-ci est agée d'environ trois mois (sous-culture #7) lors de la première série de cuvées (E) et d'environ six mois (sous-culture #13) lors des deux dernières séries de cuvées (K et L). Dans ce contexte il est important de considérer la dimension de stabilité dans le temps de la lignée SP1b.

Les six paires de cuvées en flacons contrôles (T10&T11, T18&T19, T22&T23, T26&T27, T30&T31, T35&T36) sont choisies pour discuter de cette dimension puisqu'elles ont des conditions de culture identiques et que chacune d'elles compte un volume à peu près semblable du même milieu de culture BS régulier (2 mM d'ammonium) inoculé par une sous-culture de la même lignée. Lorsqu'on regroupe les résultats de production (concentration maximale d'embryons) de ces douze cuvées par numéro de sous-culture et qu'on calcule des moyennes, on obtient cinq valeurs car la moyenne pour la sous-culture #13 est celle des quatre cuvées T30, T31, T35 et T36. Les valeurs moyennes ainsi obtenues sont présentées à la Figure 5.1 avec leurs marges d'erreur respectives, la moyenne globale de 37 Es.mL⁻¹ et la plage correspondant à un écart type de ± 12 Es.mL⁻¹. Tenant compte d'une marge d'erreur de $\pm 10\%$ (voir paragraphe 5.2.1.5) toutes les valeurs moyennes se situent

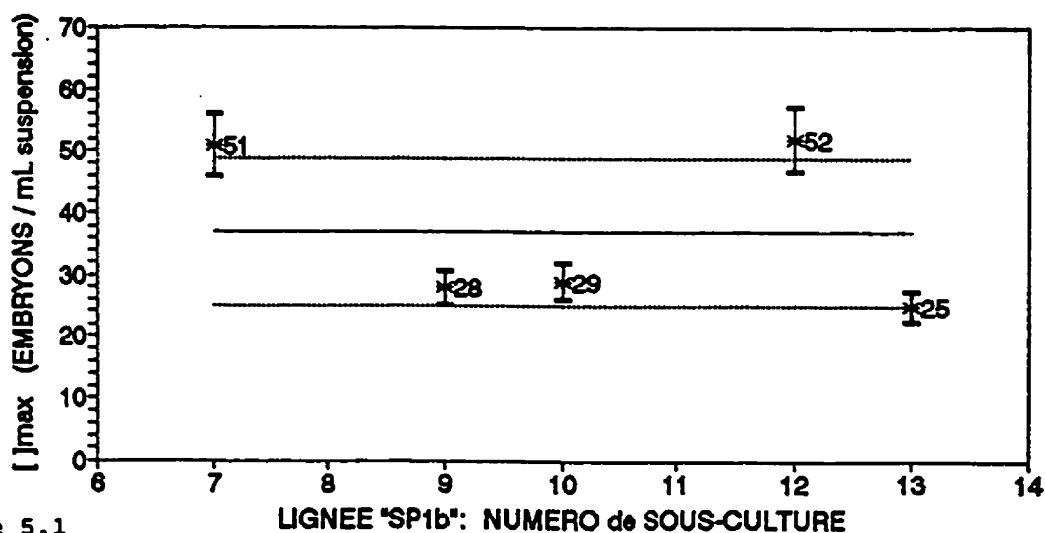


Figure 5.1

Production maximale moyenne d'embryons somatiques en fonction du numéro de la sous-culture pour les douze cuvées en flacons contrôles dont les résultats sont regroupés en cinq valeurs moyennes

Valeur moyenne d'un groupe de flacons	: *
Incertitude de $\pm 10\%$ sur la moyenne d'un groupe	: -
Moyenne des douze cuvées (37 Es.mL ⁻¹)	: —
Valeur d'un écart type (12 Es.mL ⁻¹)	:

à l'intérieur d'un écart type, si bien que la production d'embryons de la lignée SP1b semble stable et constante durant la période de trois mois (sous-cultures #7 à #13) qui couvre les travaux effectués en bioréacteurs. Ce résultat est particulièrement important car il montre que sur une période relativement courte l'âge des sous-cultures n'est pas une variable significative. Tate et Payne (1991) surestimeraient donc la variabilité pouvant en découler lorsqu'ils prétendent qu'il n'est pas approprié de mettre ensemble les données de cuvées inoculées avec des sous-cultures d'âges différents de la même lignée pour chercher à dégager des tendances.

5.2.1.2 Temps de culture

Si on compare la durée des cuvées en bioréacteurs (Tableau 5.3) et en flacons (Tableau 5.4), on remarque qu'il y a plus de variation dans le premier groupe que dans le second. La principale cause de cette différence réside dans les particularités relatives à l'échantillonnage dans l'un et l'autre mode de culture. Avec un flacon contenant au départ 220 mL de suspension, il est facile d'échantillonner à chaque fois des volumes similaires de 15 à 20 mL en utilisant une pipette de 10 mL. Ceci permet de prendre une dizaine d'échantillons à intervalles réguliers sur une période de 672 à 720 heures. D'autre part, l'échantillonnage avec le bioréacteur de 2-L se fait en aspirant dans le volume (~300 mL au début d'une cuvée) situé au-dessus de l'agitateur. Ce volume étant plus grand, une cuvée peut donc durer plus longtemps en bioréacteur qu'en flacon. Cependant il est concrètement plus difficile d'en retirer des échantillons de volume constant, de sorte que la durée d'une cuvée en bioréacteur dépend de la variation des volumes échantillonnés. Néanmoins, toutes les cuvées en bioréacteurs furent assez longues pour atteindre des concentrations maximales d'embryons et épuiser les glucides ainsi que certains autres nutriments (sous-section 5.2.3).

5.2.1.3 Accroissement de la biomasse

La colonne centrale des Tableaux 5.3 et 5.4 contient, pour chaque cuvée, les données brutes relatives à l'accroissement de la biomasse sèche. Dans tous les cas, la première valeur est celle mesurée juste après l'inoculation de la cuvée alors que la seconde valeur est la plus élevée à avoir été mesurée au cours de celle-ci. Parce que l'accroissement de la

biomasse semble être constant d'une cuvée à l'autre et d'un mode de culture à l'autre, les moyennes de quatre paramètres sont évalués afin de mieux la caractériser (Tableau 5.5). Six données contribuent aux moyennes en bioréacteurs pour chacun des quatre paramètres, alors que vingt-et-une contribuent aux moyennes en flacons pour les trois premiers paramètres. La moyenne en flacons pour le quatrième paramètre (volume final de biomasse sédimentée) est obtenue à partir de cinq données car aucune n'est disponible pour les cuvées en milieu B5 régulier (2 mM d'ammonium).

Par rapport à la concentration maximale de biomasse sèche, on constate au Tableau 5.5 que la différence de 2,75 g ms.L⁻¹ mesurée entre la moyenne pour les cuvées en flacons et celle pour les cuvées en bioréacteurs n'est pas significative compte tenu des écarts types ($\hat{E}$ -T). Le constat est le même en ce qui concerne le taux de croissance moyen (μ_{MOYEN}) qui, pour chaque cuvée, a été calculé par régression linéaire de $\ln(x/x_0)$ en fonction du temps (t) durant la phase de croissance exponentielle. Ces résultats pour deux paramètres indiquent que les cuvées en bioréacteurs et en flacons effectuées avec des concentrations initiales identiques de nutriments, à l'exception de l'ion ammonium, produisent des concentrations maximales de biomasse globalement semblables.

Les deux autres paramètres du Tableau 5.5 sont le rapport du poids humide (g HUMIDE) de la biomasse à son poids sec (g SEC) et le volume de biomasse

Tableau 5.5
Comparaison des deux modes de culture pour quatre paramètres qui sont reliés à la croissance de la biomasse

PARAMÈTRES	BIORÉACTEURS		FLAcons	
	MOYENNE	$\hat{E}$ -T	MOYENNE	$\hat{E}$ -T
[BIOMASSE] _{MAX} (g ms.L ⁻¹)	11,85	1,67	14,68	2,05
Taux de croissance, μ_{MOYEN} (d ⁻¹)	0,17	0,02	0,18	0,02
RATIO g HUMIDE / g SEC	21,1	2,0	31,4	2,9
Volume final de Biomasse Sédimentée (% du volume total)	56	5	66	5

1 Écart-Type

présente en fin de cuvée. Si ces paramètres sont constants pour un mode de culture donné, ils diffèrent cependant d'un mode à l'autre. D'une part, la moyenne de toutes les valeurs de ratio $g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$ pour les six cuvées en bioréacteurs (21,1) est une demie fois moindre que pour les vingt-et-une cuvées en flacons (31,4). De façon générale on peut en déduire que les constituants majeurs de la biomasse en suspension contiendraient moins d'eau dans les cuvées en bioréacteurs que dans celles en flacons et qu'ils seraient donc en moyenne plus dense. D'autre part, la biomasse sédimentée occupe en moyenne dix pour cent (10%) moins d'espace du volume final d'une cuvée en bioréacteur que de celui d'une cuvée en flacon. Cela indique qu'en fin de cuvée la biomasse serait globalement moins volumineuse en bioréacteurs qu'en flacons. Suite à ces constatations, la question se pose à savoir en quoi les constituants de la biomasse en bioréacteurs sont-ils différents de ceux de la biomasse en flacons, alors qu'il s'agit toujours de la même lignée cellulaire croissant dans un même milieu de base B5?

Pour répondre à cette interrogation il faut se rappeler (voir sous-section 2.2.5) que la biomasse d'une culture embryogène induite à l'aide de 2,4-D se compose essentiellement de cellules en suspension, chacune d'elles poursuivant l'une des deux formes possibles de développement cellulaire: différenciée ou indifférenciée (LoSchiavo et al. 1991). Dans ce contexte, toute cellule différenciée fait forcément partie d'un embryon somatique ayant atteint un certain stade de développement (amas cellulaire, globulaire, cordiforme ou torpille) puisque tout embryon constitue un ensemble structuré de tissus spécialisés se formant à partir de cellules différenciées qui se développent et se multiplient les unes en fonction des autres. Un embryon au stade torpille compterait ainsi de deux à trois milles cellules organisées en tissus physiologiquement fonctionnels (Warren & Fowler 1978). Quant aux cellules indifférenciées d'une culture embryogène, elles croissent et se multiplient individuellement sans subir les contraintes qui leurs seraient imposées si elles se développaient à l'intérieur d'un tissu. Or en l'absence d'une limite tissulaire à leur expansion, les cellules indifférenciées sont dépendantes des conditions osmotiques du milieu de culture, se gonflant d'eau lorsque leur concentration intracellulaire est plus élevée que la concentration extracellulaire et vice versa. C'est ce qui expliquerait que des cellules

indifférenciées prennent habituellement de l'expansion en fin de cuvée, au moment où la majorité des nutriments du milieu extracellulaire ont été absorbés et métabolisés (Pépin et al. 1995). Par ailleurs les cellules indifférenciées d'une cuvée donnée ne sont pas généralement homogènes (Nomura & Komamine 1985). En somme, les constituants de la biomasse d'une culture végétale embryogène sont toujours des cellules indifférenciées et des embryons (cellules différenciées), de sorte que la question posée précédemment n'en est plus une de distinction entre ces constituants, mais plutôt une de différence dans les proportions respectives de chacun.

Dans cette optique, et compte tenu que des cuvées correspondantes en bioréacteur et en flacons débutant avec des concentrations identiques de nutriments et d'inoculum produisent des concentrations maximales de biomasse globalement semblables (confirmé par les deux premiers paramètres du Tableau 5.5) mais des concentrations différentes d'embryons, il y a vraisemblablement une relation inverse entre la concentration d'embryons et celle des cellules indifférenciées. Ainsi, plus une cuvée serait embryogène, plus sa biomasse se composerait d'une forte proportion de cellules différenciées organisées de façon compacte à l'intérieur de tissus d'embryons et d'une faible proportion de cellules indifférenciées se développant librement dans la suspension ce qui, en moyenne, devrait se traduire par un ratio G_{HUMIDE}/G_{SEC} et un volume final de biomasse sédimentée faibles. Puisqu'il y a toujours une plus forte concentration d'embryons produits dans une cuvée donnée en bioréacteur que dans les cuvées correspondantes en flacons (Tableaux 5.3 et 5.4), on comprend que les cuvées en bioréacteurs se caractérisent en moyenne par un plus faible ratio G_{HUMIDE}/G_{SEC} ainsi qu'un moindre volume final de biomasse sédimentée (Tableau 5.5) que les cuvées en flacons. Les résultats tendent donc à démontrer que ces deux paramètres considérés sous la forme de moyennes globales sont possiblement de bons indicateurs du type de biomasse qui est produite dans une cuvée. Lorsque ceux-ci sont à la baisse, la biomasse d'une cuvée se composerait d'une plus grande proportion d'embryons que de cellules indifférenciées et l'inverse se vérifierait lorsqu'ils sont à la hausse.

5.2.1.4 Germination

Les deux colonnes les plus à droite des Tableaux 5.3 et 5.4 concernent la germination *in vitro* d'embryons somatiques et ayant été choisis au hasard puis placés sur des géloses nutritives. Pour chaque cuvée, le pourcentage indiqué est celui du meilleur taux de germination et le temps correspond au moment où les embryons concernés par ce taux sont échantillonnés et placés sur la gélose (5 à 10 embryons par gélose). Ces résultats sont rapportés à titre indicatif afin d'illustrer que toutes les cuvées, en bioréacteurs comme en flacons, permettent la production d'embryons capables de germer dans des conditions aseptiques. Quant à la valeur de ces résultats, elle est la même que pour les résultats discutés à la sous-section 5.1.4.

5.2.1.5 Production maximale d'embryons somatiques

Les Tableaux 5.3 et 5.4 contiennent aussi l'ensemble des résultats bruts de production d'embryons somatiques. Pour chaque cuvée, la concentration maximale d'embryons (Es.mL⁻¹) torpilles (≥1 mm) est indiquée avec le temps où cette mesure a été effectuée. Avant de discuter de ces résultats, il est utile d'évaluer la marge d'erreur qui leur est associée. Les quatre cuvées des flacons contrôles T30, T31, T35 et T36 (Tableau 5.4) se prêtent très bien à cette évaluation car elles sont en tous points semblables: même milieu B5, mêmes source et proportion d'inoculum, maintien dans le même incubateur-agitateur durant la même période de temps et enfin séances simultanées d'échantillonnage. Pour ces quatre cuvées contrôles la concentration maximale d'embryons produits varie entre 21 et 34 Es.mL⁻¹, la moyenne est de 25 Es.mL⁻¹ et la marge d'erreur sur cette mesure est d'environ ±10%. Cette marge correspond à l'erreur expérimentale maintes fois estimée en laboratoire lors des décomptes d'embryons.

La Figure 5.2 présente la production maximale d'embryons des deux modes de culture en fonction de la concentration initiale en ion ammonium. Les résultats de production en bioréacteurs sont ceux du Tableau 5.3 alors que les données pour la production en flacons sont obtenues du Tableau 5.4 de la façon suivante: 1) valeur de la seule cuvée T25 pour la concentration initiale en ammonium de 15 mM; 2) valeurs moyennes des paires de flacons

témoins correspondants pour les concentrations initiales en ion ammonium de 0, 5, 10 et 20 mM; 3) valeur moyenne des douze flacons (10 flacons contrôles et flacons témoins T10 et T11) pour la concentration initiale en ammonium de 2 mM. Même en considérant la marge d'incertitude de $\pm 10\%$, les résultats de la Figure 5.2 montrent que le mode bioréacteur est globalement plus productif que le mode flacon pour les concentrations initiales étudiées. En fait, d'après les valeurs maximales présentées aux tableaux 5.2 et 5.3, le bioréacteur permet d'obtenir de 10% à 160% plus d'embryons qu'en flacons témoins selon la condition initiale. Il semble aussi qu'une concentration initiale en ammonium de 15 mM correspond à une production maximale dans les deux modes de culture. À cette concentration la supériorité du bioréacteur sur le flacon est cependant moins nette, quoique dans ce cas la valeur d'une seule cuvée en flacon témoin soit disponible pour la comparaison. Cette concentration d'ammonium se compare à l'optimum de 10 mM mesuré pour des lignées embryogènes de carotte cultivées en flacons où la proportion de nitrate se situe entre 12 et 40 mM (Wetherell & Dougall 1976), ainsi qu'à des optima compris entre 10 et 25 mM pour différentes lignées embryogènes de luzerne (Meijer & Brown 1987, Stuart et al. 1985a, Stuart & Strickland 1984a&b, Walker & Sato 1981).

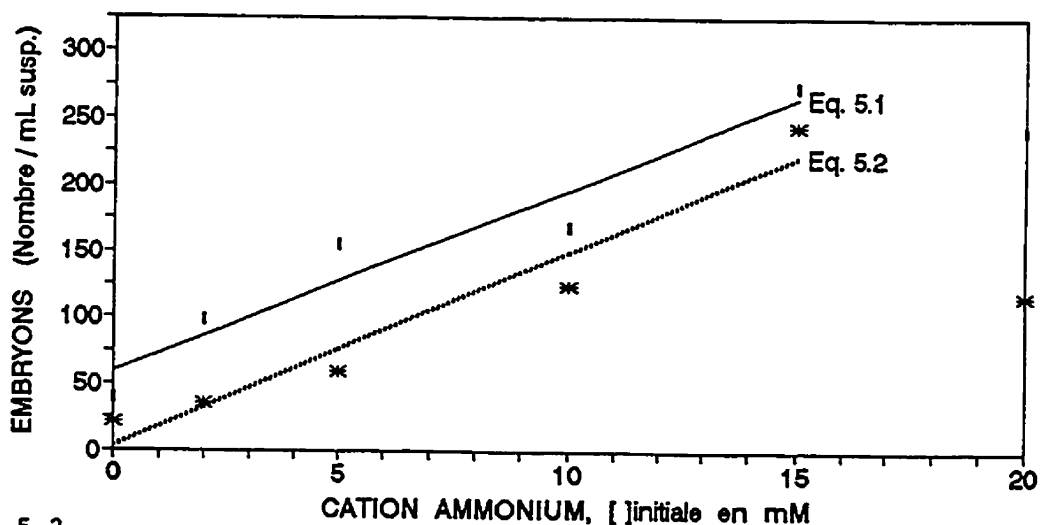


Figure 5.2

Production maximale d'embryons somatiques en fonction de la concentration initiale en ion ammonium et droites de régression sur les cinq premiers couples de valeurs pour chacun des deux modes de culture

Bioréacteurs 2-L et droite de régression : | et _____
 Flacons 500-mL et droite de régression : * et

À la Figure 5.2 on a, pour chacun des deux modes de culture, une droite obtenue par régression linéaire des cinq premières valeurs. Les équations des deux droites sont:

En bioréacteurs:

$$[Es]_{MAX} = (13,8 * [NH_4]_{INITIALE}) + 58,5 \quad \text{avec } r^2 = 0,93 \quad (\text{équation 5.1})$$

En flacons:

$$[Es]_{MAX} = (14,5 * [NH_4]_{INITIALE}) + 3,3 \quad \text{avec } r^2 = 0,95 \quad (\text{équation 5.2})$$

La pente et sa marge d'erreur pour chacune des droites de régression sont respectivement de $13,8 \pm 2,2 \text{ Es.mL}^{-1} \cdot (\text{mM } NH_4^+_{INITIALE})^{-1}$ pour les cuvées en bioréacteurs et de $14,5 \pm 2,0 \text{ Es.mL}^{-1} \cdot (\text{mM } NH_4^+_{INITIALE})^{-1}$ pour les valeurs moyennes de production maximale mesurées en flacons agités. Donc, globalement, la relation entre la production maximale d'embryons d'une cuvée et la concentration initiale en ion ammonium serait similaire en bioréacteurs et en flacons avec un coefficient d'environ $14 \text{ Es.mL}^{-1} \cdot (\text{mM } NH_4^+_{INITIALE})^{-1}$ alors que la différence entre les ordonnées à l'origine des deux droites signifierait que, pour une concentration initiale en ammonium comprise entre 0 et 15 mM, environ 55 Es.mL⁻¹ (ou 55000 Es.L⁻¹) de plus sont produits en bioréacteurs par rapport aux flacons témoins, soit -26% de plus.

En résumé, les résultats de cette sous-section indiquent globalement que des variations dans les volumes d'inocula et dans l'âge des sous-cultures ne semble pas avoir d'influence appréciable sur la durée des cuvées, sur l'accroissement de la biomasse sèche, sur la production maximale d'embryons somatiques ou sur leur germination. Il est aussi clair que la concentration initiale en ion ammonium ainsi que certains aspects du mode de culture affectent la croissance de la biomasse et la production d'embryons somatiques. Par ailleurs, la façon de concevoir la composition de la biomasse d'une culture embryogène ayant été définie, on peut maintenant procéder à une discussion plus détaillée des résultats quantitatifs obtenus pour les différents paramètres mesurés.

5.2.2 PRODUCTION TYPIQUE

Cette sous-section porte principalement sur les données relatives aux profils des cinétiques nutritionnelles de trois cuvées de la série J, soient: les cuvées du bioréacteur J et du flacon témoin T25 effectuées avec du milieu B5 enrichi en ion ammonium (concentration initiale de 15 mM), ainsi que celle du flacon contrôle T26 effectuée avec du B5 régulier (2 mM d'ammonium). Les résultats de cette série de cuvées sont discutés en détails parce que les concentrations les plus élevées d'embryons furent obtenues avec le milieu B5 contenant initialement 15 mM d'ammonium et parce les cuvées avec ce milieu paraissent balancées du point de vue nutritionnel. Des résultats analogues pour les cinq autres séries de cuvées sont regroupés à l'Annexe I. À moins d'indications contraires, les conclusions de la présente sous-section valent aussi pour ces cinq autres séries.

5.2.2.1 Production d'embryons somatiques

De façon générale, pour les séries K (5 mM NH_4^+), I (10 mM NH_4^+), J (15 mM NH_4^+) et L (20 mM NH_4^+) on observe que la production d'embryons torpilles en bioréacteur est plus grande que celle en flacon témoin et que cette dernière est plus grande que la production en flacon contrôle (2 mM NH_4^+). Toutefois, comme le montre la Figure 5.3, la relation est différente avec la série G (0 mM NH_4^+) car les cuvées en bioréacteur et en flacon témoin ne contiennent que du nitrate comme source d'azote alors que le flacon contrôle T19 contient toujours 2 mM d'ammonium. Pour cette série on remarque que la production d'embryons est retardée d'une centaine d'heures en bioréacteur et en flacon témoin par rapport au flacon contrôle, puisque les cellules embryogènes n'obtiennent leur azote du nitrate qu'après avoir élaboré les enzymes permettant de le réduire (Kamada & Harada 1979b & 1984a&b, Tazawa & Reinert 1969). Ainsi, la concentration maximale d'embryons produits durant la cuvée T19 est de 30 Es.mL⁻¹, ce qui est moins qu'en bioréacteur (39 Es.mL⁻¹) mais plus que dans le flacon témoin (22 Es.mL⁻¹). De ces résultats on déduit: 1) que SP1b n'a pas absolument besoin d'une quantité minimale d'ammonium pour permettre l'embryogenèse, différant ainsi de lignées embryogènes où le nitrate devait être complété par une source d'azote réduit pour qu'elle ait lieu (Wetherell & Dougall

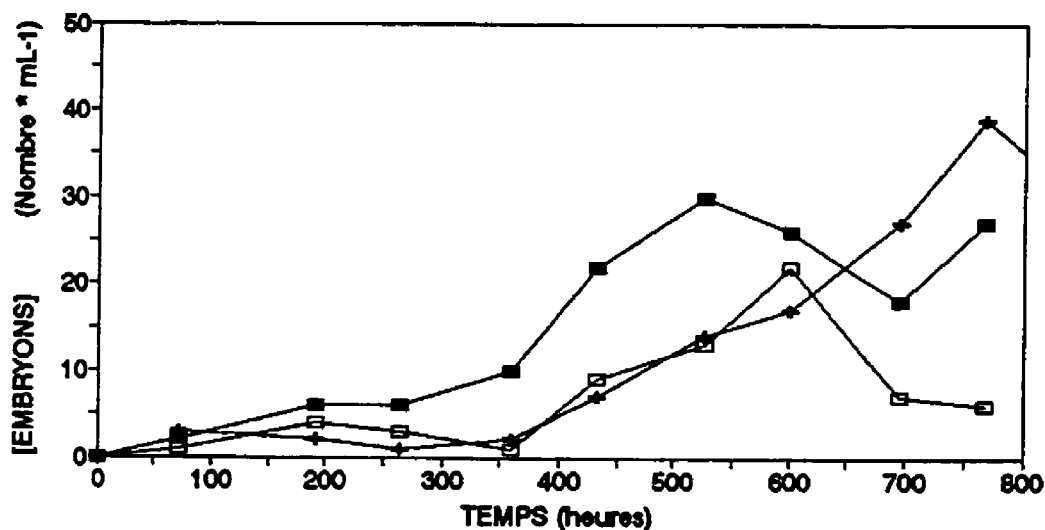


Figure 5.3
Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série G

Bioréacteur (G, [NH₄⁺]_{INITIALE}=0 mM) : +
 Flacon témoin (T17, [NH₄⁺]_{INITIALE}=0 mM) : □
 Flacon contrôle (T19, [NH₄⁺]_{INITIALE}=2 mM) : ■

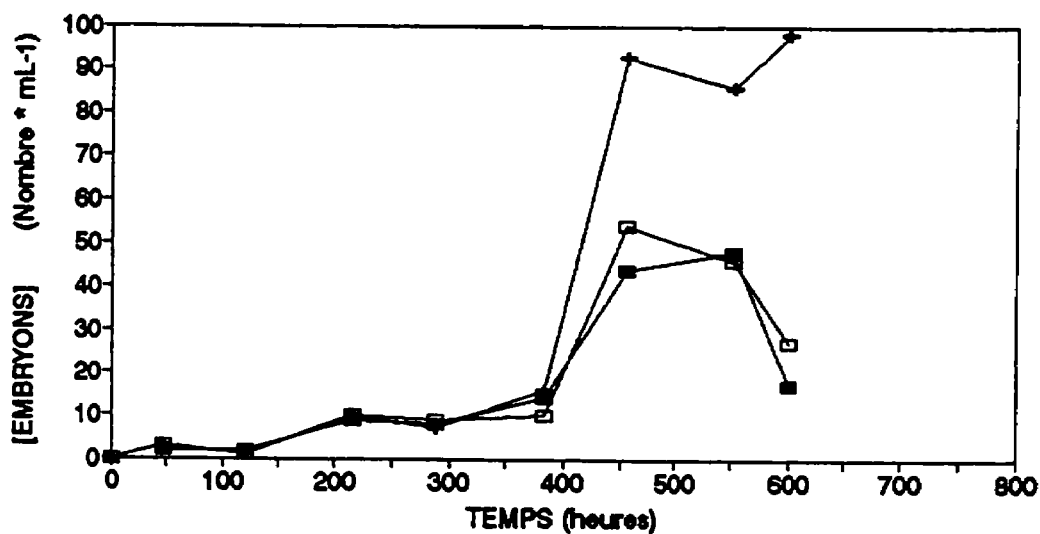


Figure 5.4
Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série E

Bioréacteur (E, [NH₄⁺]_{INITIALE}=2 mM) : +
 Flacon témoin (T10, [NH₄⁺]_{INITIALE}=2 mM) : □
 Flacon témoin (T11, [NH₄⁺]_{INITIALE}=2 mM) : ■

1976) et, 2) qu'il faut travailler avec des concentrations initiales en ammonium bien supérieures à 2 mM si l'on souhaite mesurer l'effet de cette cation sur le développement d'embryons jusqu'au stade torpille puisque la production à 2 mM n'est guère mieux que celle sans ammonium du tout. Par ailleurs, la Figure 5.4 montre que la relation est particulière dans le cas de la série E où du milieu B5 régulier est utilisé pour les trois cuvées. En effet, la production d'embryons n'est semblable dans ces cuvées que pour les quatre cents premières heures environ. Au-delà de cette période, la production en bioréacteur est deux fois plus élevée que celles des flacons. Si les résultats des six séries de cuvées mettent en évidence la concentration d'ammonium comme une variable possiblement déterminante pour la production d'embryons somatiques, les résultats de la série E indiquent plus spécialement que le mode de culture (bioréacteur ou flacon agité) est aussi une variable importante.

Dans cette perspective, on note trois points intéressants à la Figure 5.5: 1) la production en flacon témoin est toujours inférieure à celle en bioréacteur même si cette dernière fléchit en fin de cuvée; 2) la première débute une centaine d'heures après la seconde; 3) entre 320 et 650 heures, le taux d'accroissement de la production est semblable dans les deux modes de culture car la pente de la droite de régression pour les résultats en bioréacteur est de $-614 \pm 43 \text{ Es.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et celle pour les résultats en flacon témoin est de $-641 \pm 51 \text{ Es.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Or on constate, en se référant aux figures de production d'embryons en fonction du temps pour les cinq séries où la concentration initiale d'ammonium est plus grande que 0 mM (Figures 5.4, 5.5 et celles de la Section I.1 à l'Annexe I), que le premier de ces trois points se vérifie dans chaque série et qu'un délai semblable à celui mentionné au second point est observé aussi dans la série I (10 mM NH_4^+). Enfin on note un certain parallélisme entre les pentes des courbes de production (bioréacteur et flacon témoin) des séries I (10 mM NH_4^+) et L (20 mM NH_4^+), mais sur des périodes différentes.

Sans qu'il soit nécessaire d'entrer dans les détails et bien que les trois points de comparaison notés pour la série J ne se retrouvent pas de la même façon et avec la même fréquence dans toutes les séries, il reste que

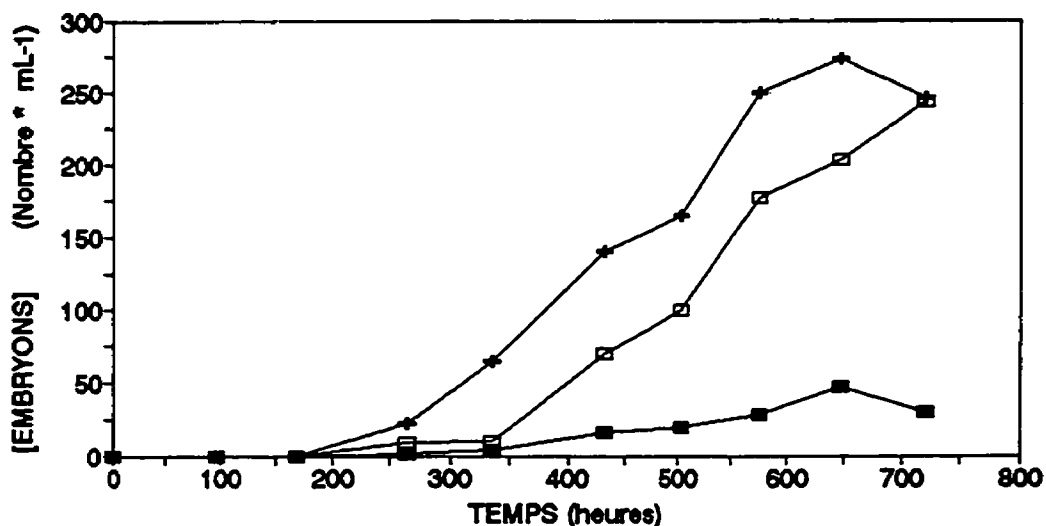


Figure 5.5

Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série J

Bioréacteur (J, [NH ₄ ⁺] _{INITIALE} =15 mM)	: +
Flacon témoin (T25, [NH ₄ ⁺] _{INITIALE} =15 mM)	: □
Flacon contrôle (T26, [NH ₄ ⁺] _{INITIALE} =2 mM)	: ■

la production en bioréacteur est supérieure à celle en flacon témoin dans chacune des six séries (incluant la série G avec 0 mM NH₄⁺, Figure 5.3). On en déduit donc que les conditions physiques de culture en bioréacteur sont plus favorables que celles en flacons agités pour l'obtention d'un plus grand nombre d'embryons somatiques complètement développés en torpilles.

La principale différence entre les deux modes de culture est qu'en bioréacteur la concentration d'oxygène dissous est maintenue à 20% de la saturation en air durant toute la cuvée par le contrôle du mélange gazeux, alors qu'en flacon agité cette concentration fluctue beaucoup au cours d'une cuvée (Pépin et al. 1995). Il est donc probable qu'une certaine stabilité du niveau d'oxygène dissous dans le milieu de culture soit plus favorable, au plan nutritionnel, que l'instabilité caractéristique du mode flacon pour produire des embryons torpilles. Il se peut aussi que le rythme métabolique imposé par le contrôle de l'oxygène dissous favorise

simplement la différenciation cellulaire ou qu'il soit moins propice à la production et à l'accumulation de substances inhibitrices dans les cultures en bioréacteurs.

Par ailleurs, des travaux en culture de cellules de plantes avec des bioréacteurs à rubans hélicoïdaux tournant à des vitesses de l'ordre de 60 RPM indiquent que le coefficient global de transfert d'oxygène de la phase gazeuse au liquide (k_La) est environ vingt fois moindre que dans des flacons agités à ~120 RPM (Archambault et al. 1994a & b, Kamen et al. 1991, Pépin et al. 1995). En effet, le k_La du bioréacteur 2-L utilisé est de $0,9 \text{ h}^{-1}$ (Archambault et al. 1994b), alors que celui des flacons agités est de 18 h^{-1} (Pépin et al. 1995). La culture en bioréacteur affecte donc nécessairement l'ensemble des échanges entre la phase gazeuse et la suspension, dont ceux du dioxyde de carbone et de l'éthylène qui, bien que cela reste à être démontré formellement dans le cas de la carotte, jouent peut être des rôles dans l'embryogenèse somatique (Auboiron et al. 1990, Biddington 1992, Roustan et al. 1989a&b et 1990 a&b, Smith & Krikorian 1990c, Tate & Payne 1991).

Les trois graphiques de la Figure 5.6 mettent en relief les taux de germination et les concentrations d'embryons en fonction du temps pour les cuvées de la série J. Tel que déjà indiqué (sous-section 5.2.1.4), l'irrégularité dans la qualité des pousses considérées pour l'évaluation des taux de germination fait en sorte que ce paramètre doit être considéré avec grande prudence. Ceci dit, la Figure 5.6 montre néanmoins deux tendances: 1) sans égard au mode de culture et à la concentration initiale en ammonium, il semble que les premiers embryons produits dans une cuvée germent mieux que ceux produits à la fin; et 2) puisque les embryons obtenus en bioréacteur germent bien sur une période de plus de 300 heures, ils sont possiblement de meilleure qualité que ceux produits en flacons agités.

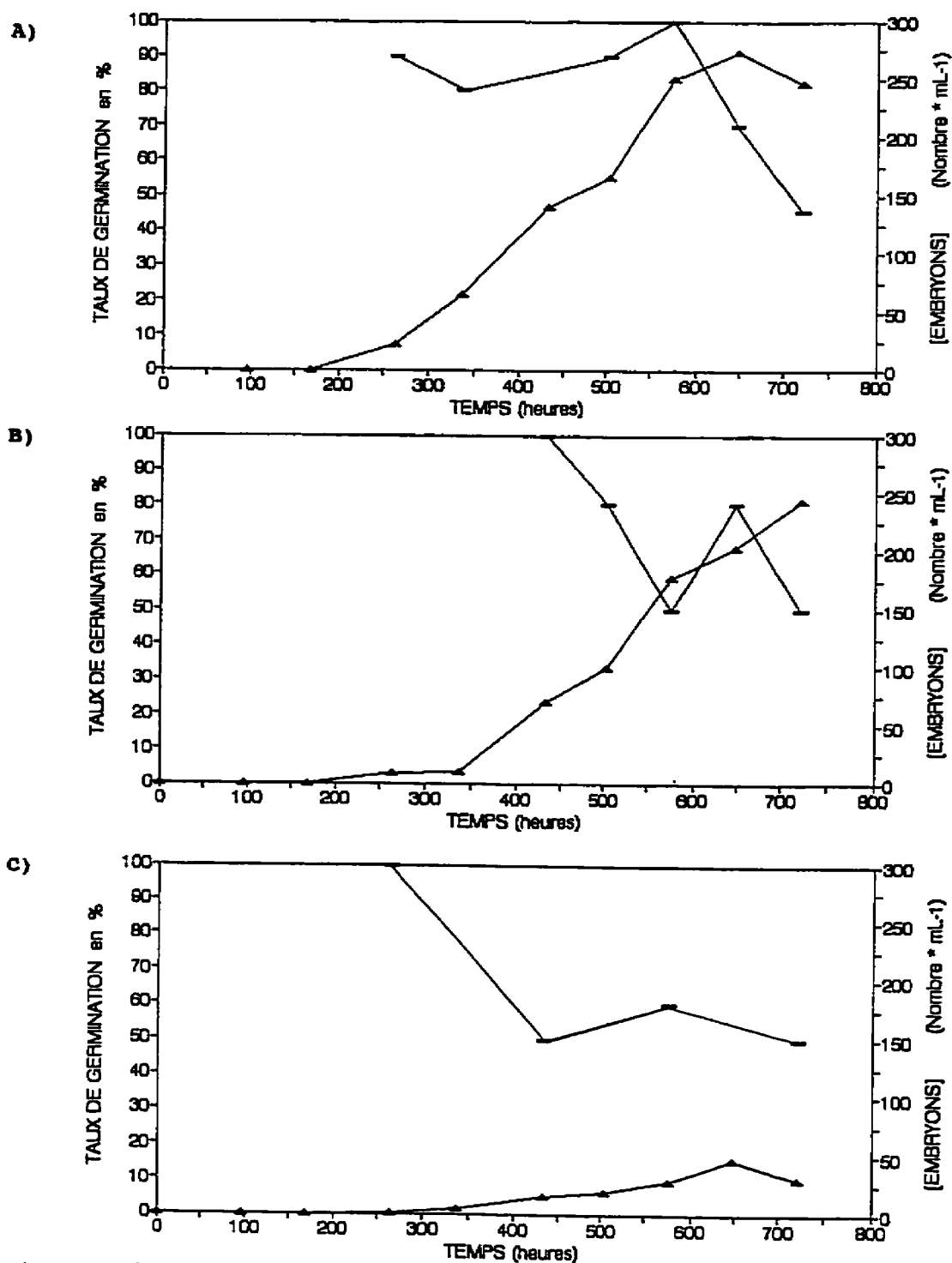


Figure 5.6

Taux de germination et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série J:

A) Bioréacteur J; B) Flacon témoin T25; C) Flacon contrôle T26.
 Taux de germination en % : - [embryons somatiques] : ▲

5.2.2.2 Évolution de la biomasse dans le temps

Malgré les différences dans la production d'embryons somatiques, le taux moyen de croissance de la biomasse des trois cuvées de la série J est le même ($-0,18 \text{ d}^{-1}$) comme le démontre la Figure 5.7 ci-bas. La valeur de ce paramètre est constante pour toutes les séries quelque soit le mode de culture ou la concentration initiale en ion ammonium (Tableau 5.5). Comme le montrent les Figures 5.8 à 5.13 cependant, un même μ_{MOYEN} n'implique pas que les cinétiques de production de biomasse sont similaires. Par ailleurs, la valeur de $0,18 \text{ d}^{-1}$ est semblable à celle que mesurent Jay et collègues (1992) dans une cuvée en bioréacteur contrôlée à 10% d'oxygène dissous.

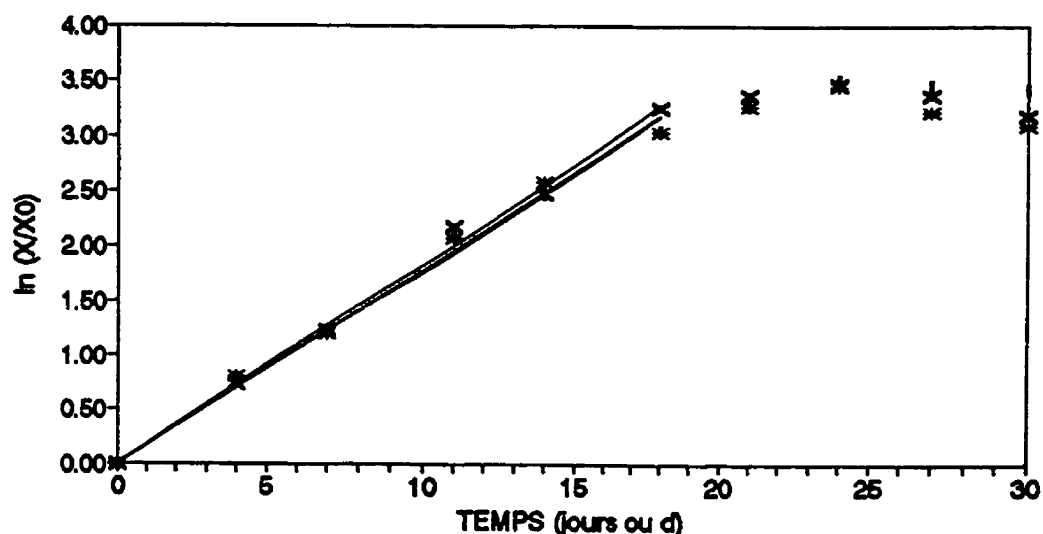


Figure 5.7

Régression linéaire de $\ln(x/x_0)$ en fonction du temps où x_0 est la biomasse sèche initiale et x est la biomasse sèche au temps t , afin d'estimer le taux de croissance moyen (μ_{MOYEN} = pente) pour trois cuvées de la série J estimé par régression linéaire sur les 6 premiers points (_____)

Bioréacteur (J, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=15 \text{ mM}$)	:
Flacon témoin (T25, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=15 \text{ mM}$)	: •
Flacon contrôle (T26, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}= 2 \text{ mM}$)	: X

Avant de discuter plus à fond des paramètres caractérisant la biomasse, il importe de faire un rappel concernant le concept de biomasse. Dans la discussion relative au Tableau 5.5 il est dit qu'en général la biomasse d'une suspension embryogène se compose, dans des proportions variables, de cellules indifférenciées et d'embryons somatiques (cellules différenciées) à différents stades de développement. Étant donné que seuls les embryons torpilles sont dénombrés, il n'est pas possible d'estimer quelles sont les proportions exactes de cellules indifférenciées et celles des embryons à chacun des quatre stades de développement (amas cellulaire, globulaire, cordiforme et torpille). Donc, la composition de la biomasse mesurée ne peut être exprimée qu'en référence à un ensemble de profils possibles.

À la Figure 5.8, on remarque qu'entre 250 et 600 heures il y a plus de biomasse sèche produite en flacon contrôle (2 mM NH_4^+) qu'en flacon témoin (15 mM NH_4^+) et plus dans ceux-ci qu'en bioréacteur (15 mM NH_4^+). Comment interpréter de telles différences sachant que ces trois cuvées comptent initialement des concentrations identiques de tous les éléments et que tous les macronutriments sont complètement absorbés du milieu de culture avant la fin de chaque cuvée. D'une part, la quantité différentielle de nutriments qui ne forme pas de biomasse sèche (cette quantité étant plus grande en bioréacteur qu'en flacon témoin et qu'en flacon contrôle) sert vraisemblablement à des fins énergétiques et, en conséquence, se compose sans doute principalement de glucides. D'autre part, la même quantité différentielle de nutriments qui forme une partie de la biomasse sèche sert nécessairement à former des structures cellulaires et des réserves d'énergie pour les cellules différenciées ou non. Cette interprétation à deux volets implique que la culture produisant le moins de biomasse sèche, en l'occurrence celle en bioréacteur, aurait un taux de respiration cellulaire plus élevé et donc une plus forte production de dioxyde de carbone. On aurait l'inverse pour la culture en flacon contrôle T26, alors que la culture du flacon témoin T25 se situerait quelque part entre ces deux tendances, mais probablement plus près de la culture en bioréacteur car leurs courbes de concentration en biomasse sèche comportent des différences moins marquées qu'avec celle du flacon contrôle.

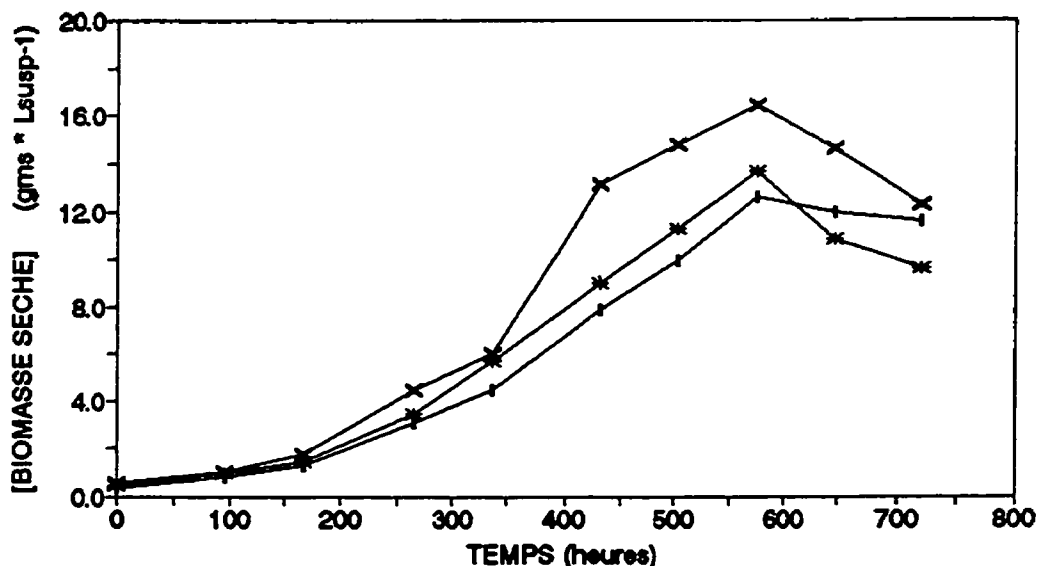


Figure 5.8

Concentration de biomasse sèche en fonction du temps pour trois cuvées de la série J

Bioréacteur (J, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=15 \text{ mM}$) : |
 Flacon témoin (T25, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=15 \text{ mM}$) : *
 Flacon contrôle (T26, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}= 2 \text{ mM}$) : x

Les constats précédents mettent en évidence l'importance d'évaluer adéquatement la respiration cellulaire ainsi que d'effectuer des bilans de masse sur le carbone et l'oxygène dans les travaux futurs. Enfin, il est intéressant de souligner que pour les cuvées des cinq autres séries (Annexe I, Section I.4) la relation entre leurs courbes de production de biomasse sèche suit la même tendance (plus de biomasse sèche en contrôle qu'en témoin et plus dans ce dernier qu'en bioréacteur), avec cependant des différences entre les courbes qui varient d'une série à l'autre. Il semble aussi que les profils de concentration de la biomasse sèche dans le temps d'un bioréacteur et de son témoin sont d'autant plus semblables que la concentration initiale en ammonium est élevée.

Complémentairement, on présente à la Figure 5.9 la croissance de la biomasse sèche (Figure 5.8) et la production d'embryons somatiques (Figure 5.5) afin de relier ces deux paramètres pour les cuvées considérées de la série J. Ainsi, les graphiques A et C de la Figure 5.9 indiquent que les

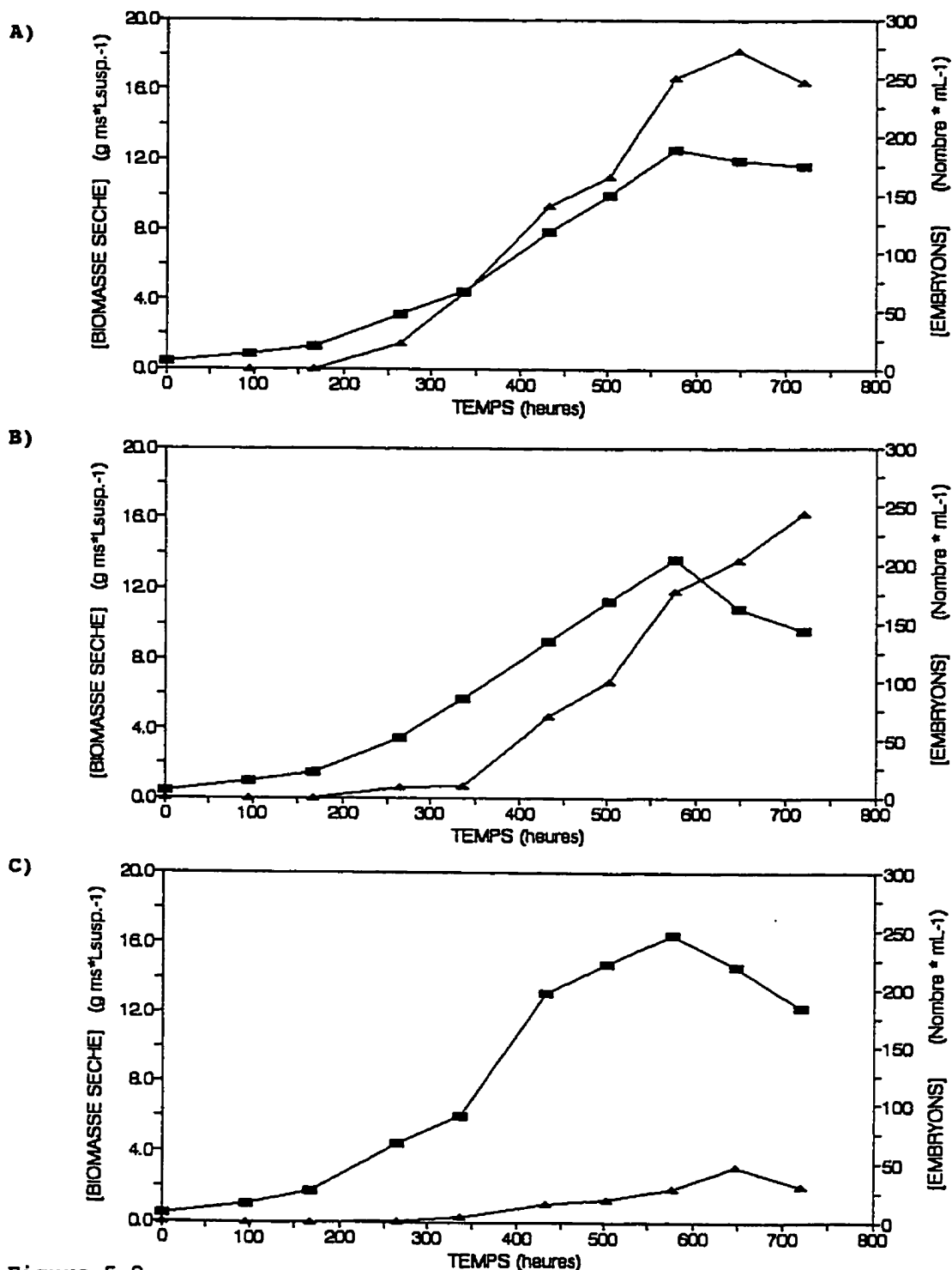


Figure 5.9
Concentrations de biomasse sèche et d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série J:
A) Bioréacteur J; B) Flacon témoin T25; C) Flacon contrôle T26.
[embryons] : ▲ [biomasse sèche] : ■

relations sont inversées: la production d'embryons torpilles est plus grande en bioréacteur et plus faible en flacon contrôle, alors que la concentration de biomasse sèche est au plus bas en bioréacteur et au plus haut en flacon contrôle. De plus, les courbes de croissance et de production de la cuvée en flacon témoin (Figure 5.9-B) s'apparentent à celles du bioréacteur, ce qui suggère que dans la mesure où la concentration initiale en ammonium est suffisante la production d'embryons somatiques en suspension liquide est un processus relié à la croissance. Reprenant l'interprétation du paragraphe précédent, on déduit que l'accroissement de la respiration cellulaire serait liée à une production plus grande d'embryons ou au développement d'un plus grand nombre de ceux-ci jusqu'au stade torpille. Cependant, puisqu'on ne connaît pas la composition exacte de la biomasse de chaque cuvée, il est impossible d'émettre une hypothèse plus précise.

S'il semble néanmoins logique de considérer qu'une activité métabolique particulière comme la différenciation puisse se manifester par une respiration cellulaire accrue. On mentionne d'ailleurs dans la littérature que les étapes initiales du développement embryonnaire sont accompagnées par un accroissement du métabolisme (Dijkema et al. 1988). Dans une telle perspective, l'avantage potentiel du bioréacteur sur le flacon agité pour la production d'embryons torpilles pourrait s'expliquer comme étant une conséquence, directe ou indirecte, du contrôle de la concentration en oxygène dissous. Il s'agit d'une conséquence directe si 20% d'oxygène dissous est en tout temps une concentration minimale ou optimale nécessaire à la différenciation cellulaire. Il y a conséquence indirecte si le régime d'agitation et le niveau du débit gazeux qui permettent de maintenir constante la concentration d'oxygène dissous ont un effet sur le taux de transfert gazeux du dioxyde de carbone (et/ou d'un autre gaz), effet qui stimule l'embryogenèse somatique à cause de la fixation non-photosynthétique du CO_2 (Payne et al. 1990), ou pour tout autre raison.

D'autres hypothèses peuvent être émises, mais l'impossibilité de pouvoir les vérifier ou les préciser démontre un autre besoin méthodologique important, soit l'urgence de développer une méthode simple et exacte permettant de discriminer rapidement, ainsi que de dénombrer en tout temps

dans la biomasse, les embryons somatiques à leurs différents stades de développement. Des progrès récents portant sur l'identification, le tri, la classification et l'évaluation des embryons somatiques indiquent qu'une telle méthode est possible mais qu'il reste encore des efforts à faire pour la rendre simple et pratique (Cazzulino et al. 1990, Chi et al. 1994, Grand d'Esnon et al. 1989, Hamalainen et al. 1993, Harrell et al. 1992).

La concentration de biomasse humide en fonction du temps pour les trois cuvées de la série J est présentée à la Figure 5.10. Tel qu'attendu, la relation globale entre les trois courbes est analogue à celle pour la biomasse sèche (Figure 5.8). Plus de biomasse humide est obtenue en flacon contrôle qu'en flacon témoin et plus dans ces flacons qu'en bioréacteur. Puisque la biomasse d'une culture végétale embryogène se compose de proportions variables de cellules différenciées (embryons somatiques) et de cellules indifférenciées, que la densité des cellules différenciées est plus grande que celle des cellules indifférenciées et que ces dernières sont plus largement dépendantes des conditions osmotiques du milieu de culture parce qu'elles ne se développent pas à l'intérieur d'un tissu

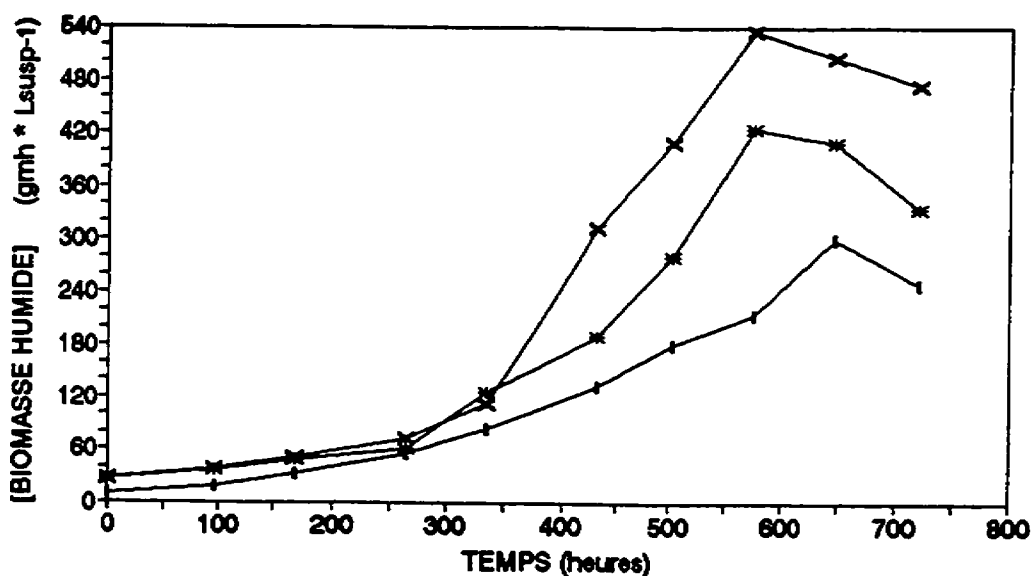


Figure 5.10

Concentration de biomasse humide en fonction du temps pour trois cuvées de la série J

Bioréacteur (J, [NH₄⁺]_{INITIALE}=15 mM) : |
 Flacon témoin (T25, [NH₄⁺]_{INITIALE}=15 mM) : •
 Flacon contrôle (T26, [NH₄⁺]_{INITIALE}= 2 mM) : X

structuré, une comparaison des Figures 5.8 et 5.10 renseigne de façon intéressante sur la composition probable de la biomasse. On constate que pour la cuvée en bioréacteur et la cuvée témoin T25, l'écart est toujours plus grand entre leurs courbes de biomasse humide (Figure 5.10) qu'entre celles de la biomasse sèche (Figure 5.8) et que cet écart tend à s'accroître avec le temps. Des constats similaires s'appliquent si l'on compare la cuvée en bioréacteur à celle du contrôle T26, ou les deux cuvées en flacons agités. En supposant qu'un tel accroissement d'écart est principalement dû à des cellules indifférenciées se gonflant d'eau suite à l'abaissement de la pression osmotique, on peut conclure que la biomasse de la cuvée contrôle (T26) contient plus de ces grosses cellules que la biomasse de la cuvée témoin (T25) et que celle-ci en contient plus que la biomasse de la cuvée en bioréacteur. Si l'information additionnelle tirée de cette comparaison ne fournit pas une description détaillée de la biomasse, elle permet quand même d'avoir une meilleure idée de sa composition et de préciser un peu les hypothèses formulées précédemment. Elle suggère que la concentration initiale en ammonium et le mode de culture se combinent pour affecter non seulement la production d'un nombre plus ou moins grand d'embryons torpilles, mais aussi l'ensemble du processus de différenciation. Dans cette optique, la culture contrôlée en bioréacteur avec un milieu contenant initialement 15 mM d'ammonium favoriserait d'abord la différenciation cellulaire, ce qui entraînerait ensuite l'obtention de plus fortes concentrations de torpilles dont les cellules denses contribuent pour une plus faible proportion du poids humide de la biomasse.

Le rapport entre la concentration en biomasse humide et celle en biomasse sèche ($\text{Ratio } g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$) est un quatrième paramètre caractérisant la biomasse. Pour des raisons évoquées précédemment en référence au Tableau 5.5, on suppose que la valeur de ce ratio est proportionnelle à la fraction de cellules indifférenciées, au contenu élevé en eau, qui sont présentes dans la biomasse humide. L'évolution du ratio $g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$ dans le temps pour les trois cuvées de la série J est présentée aux Figures 5.11 et 5.12 avec la production d'embryons torpilles. On remarque que ce ratio évolue de façon nettement différente dans la cuvée en bioréacteur (Figure

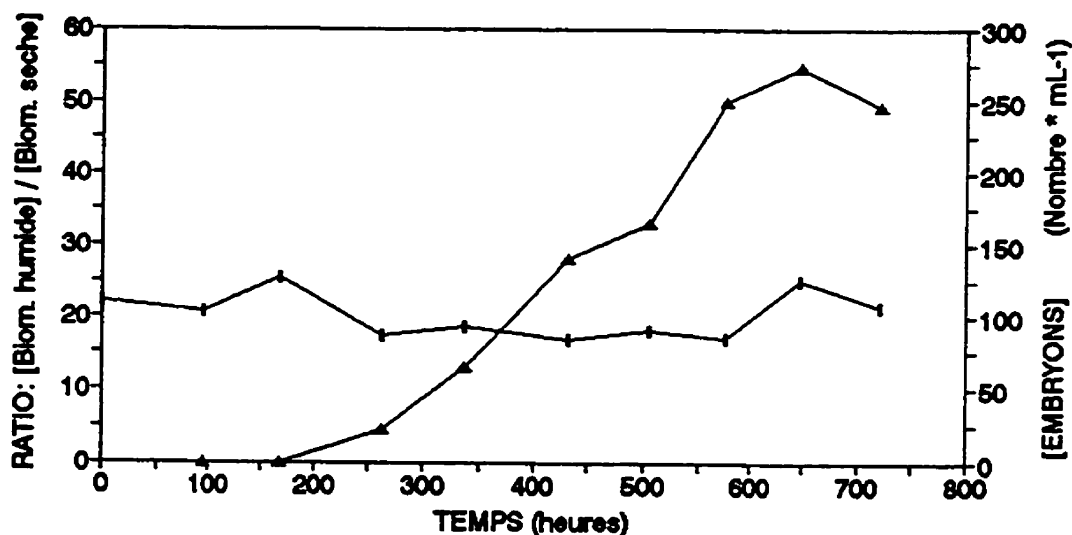


Figure 5.11
Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons en fonction du temps pour la cuvée J en bioréacteur ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=15\text{mM}$)
Ratio : | [embryons somatiques] : Δ

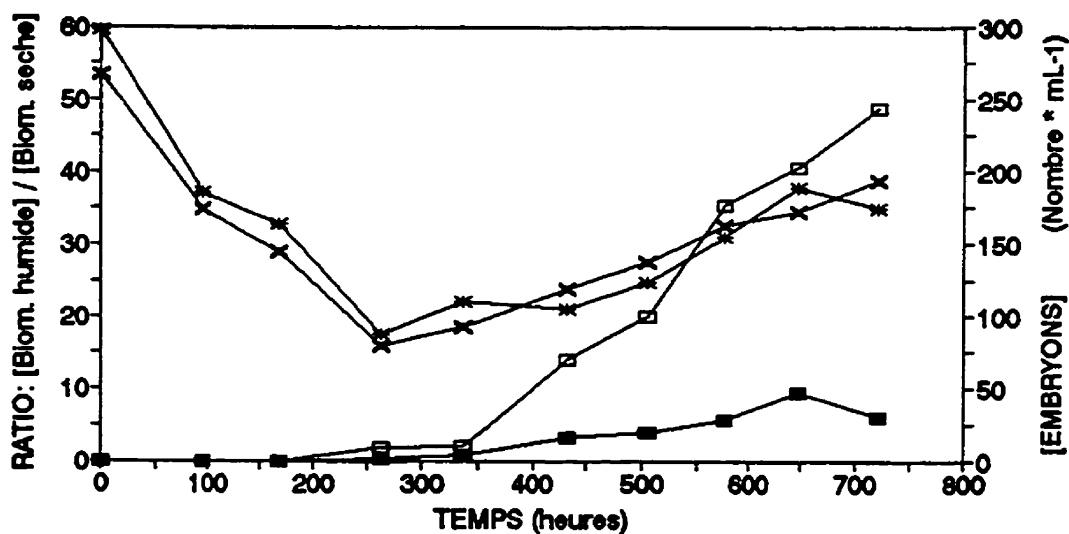


Figure 5.12
Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour deux cuvées en flacons de la série J
Flacon témoin (T25, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=15\text{ mM}$) Ratio : * [embryons] : $\square$
Flacon contrôle (T26, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=2\text{ mM}$) Ratio : x [embryons] : $\blacksquare$

5.11) comparativement à celles en flacons agités (Figure 5.12). Il demeure constant (moyenne $\approx 20,3$) tout au cours de la culture en bioréacteur, alors qu'il suit un profil à peu près identique pour les deux cultures en flacons même si elles comptent des concentrations initiales d'ammonium différentes. Dans le cas des cultures en flacons, le ratio passe d'abord d'une valeur maximale à une valeur minimale entre l'inoculation et l'apparition des premiers embryons torpilles (~ 250 h), puis il s'accroît lentement jusqu'à la fin des cultures en demeurant à des valeurs presque toujours supérieures à celles en bioréacteur.

Si le ratio $g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$ a la valeur indicative supposée, la composition de la biomasse de la cuvée en bioréacteur devrait rester la même tout au long de la culture ou, en d'autres mots, la proportion de cellules indifférenciées ne devrait pas s'accroître par rapport à celle de cellules différenciées. Ce résultat confirmerait que la culture contrôlée en bioréacteur désavantage la prolifération des cellules indifférenciées et qu'elle favorise celle des cellules différenciées, suggérant plus particulièrement que le maintien de la concentration en oxygène dissous à 20% est directement en cause dans la constance du ratio $g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$. Suivant ce même raisonnement, le profil d'évolution en deux temps du ratio $g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$ pour les cuvées en flacons agités (Figure 5.12) indiquerait que ce mode de culture avantage initialement la multiplication de cellules indifférenciées, que cet avantage diminue et laisse place à une certaine différenciation cellulaire jusqu'à ~ 250 h, puis que les deux types de cellules croissent simultanément par la suite dans un contexte probable de compétition pour les nutriments.

Cette interprétation des Figures 5.11 et 5.12 pourrait signifier au moins quatre choses très importantes. Premièrement, la concentration initiale en ion ammonium ne serait pas une variable déterminante dans le processus de différenciation cellulaire puisqu'il n'y a pas de différence entre le profil pour le flacon témoin (T25, 15mM NH_4^+) et celui pour le flacon contrôle (T26, 2mM NH_4^+). Deuxièmement, il se peut que la cuvée du contrôle (T26) compte autant d'embryons (donc de cellules différenciées) que celle du flacon témoin, mais ceux-ci parviennent en moins grand nombre au stade

torpille par manque d'ammonium. Troisièmement, puisque la proportion d'embryons torpilles dans la cuvée en témoin (T25) augmente sans cesse à partir de -250 h, les cellules différenciées domineraient la situation de compétition pour les nutriments. Enfin, la production moindre d'embryons en flacon témoin (15 mM NH_4^+) par rapport au bioréacteur (15 mM NH_4^+) résulterait de la compétition nutritionnelle entre les cellules différenciées (embryons) et les cellules indifférenciées dont la présence en plus grande proportion serait favorisée par le non contrôle de certaines conditions de culture, en particulier du niveau d'oxygène dissous à un niveau relativement faible. De plus, si le profil d'évolution dans le temps du ratio $g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$ des cuvées en flacons (Figure 5.12) est directement relié à leur profil de concentration en oxygène dissous (pas mesuré) comme cela semble être le cas en bioréacteur, celle-ci serait donc élevée au début des cuvées, elle diminuerait graduellement jusqu'à -250 h, puis elle poursuivrait une augmentation lente mais graduelle jusqu'à la fin des cuvées. Or, un tel profil d'oxygène dissous s'apparente très bien à celui effectivement mesuré pour des cultures de cellules de raisins en flacons agités (Pépin et al. 1995). Un tel profil de concentration en oxygène dissous signifierait que la respiration des cultures en flacons diminuerait graduellement entre 250 h et la fin des cuvées, moment où le métabolisme des cellules ralentit et cesse.

À la lumière de ces considérations, l'avantage du mode de culture en bioréacteur sur celui en flacon agité pour la production d'embryons tiendrait vraisemblablement au fait que la concentration en oxygène dissous est maintenue constante et basse dans le premier alors qu'elle varie dans le second. Donc, le contrôle de cette variable (O_2 dissous) à un niveau faible (mais pas nécessairement à 20%) et constant (mais pas forcément toujours constant) est sûrement essentiel en tout ou en partie à l'embryogenèse somatique. Enfin il apparaît que le ratio $g_{\text{HUMIDE}}/g_{\text{SEC}}$, en tant qu'indice potentiel de la composition de la biomasse, fournit une information plus juste lorsque considéré d'un point de vue cinétique, que lorsqu'il est utilisé sous forme de moyenne globale pour une cuvée entière comme au Tableau 5.5.

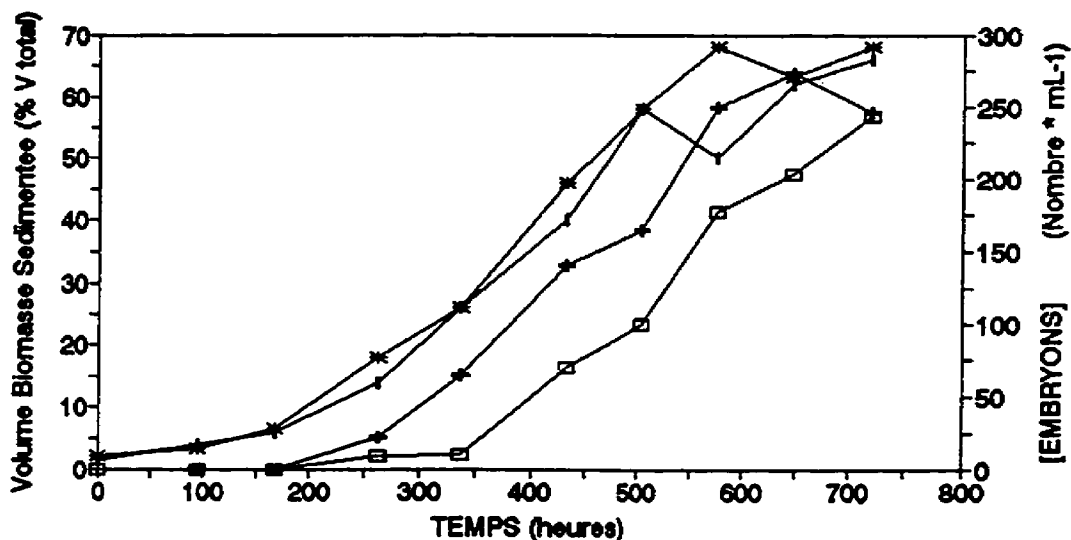


Figure 5.13

Volume de biomasse sédimentée (VBS) et concentration d'embryons en fonction du temps pour les cuvées en bioréacteur et en flacon témoin de la série J ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 15 \text{ mM}$)

Bioréacteur (J)

% VBS : |

[embryons] : +

Flacon témoin (T25)

% VBS : *

[embryons] : □

La Figure 5.13 présente, pour les deux cuvées débutées avec 15 mM d'ammonium, l'évolution dans le temps du dernier paramètre caractéristique de la biomasse, soit le pourcentage du volume de la suspension qui est occupé par la biomasse humide sédimentée (%VBS), ainsi que la concentration d'embryons. On observe que le profil du %VBS est similaire pour les deux cuvées. Puisque que la concentration de biomasse humide du flacon témoin (T25) est toujours supérieure à celle du bioréacteur (Figure 5.10), cette similarité de %VBS devrait signifier que la densité (masse/volume) de la biomasse en flacon est toujours supérieure à celle en bioréacteur. Or ceci est en contradiction avec le fait que la biomasse contenant une plus forte proportion d'embryons, en l'occurrence celle produite en bioréacteur, doit avoir une densité plus grande.

Comme le %VBS s'obtient en mesurant le volume du culot de sédimentation résultant de la centrifugation d'un volume connu de suspension, on conçoit que le %VBS est un paramètre pleinement significatif lorsqu'utilisé pour

caractériser la biomasse de cultures dont la composition est homogène. Cependant, la possibilité que ce paramètre mène à des interprétations contradictoires devient évidente dans le contexte de cultures embryogènes très hétérogènes où s'entremêlent des embryons somatiques à différents stades de développement avec des cellules indifférenciées généralement moins denses et de formes diverses. En fait, l'expérience démontre que le %VBS a une certaine utilité pour caractériser les cultures embryogènes lorsqu'on peut discriminer dans le culot la portion composée de torpilles et celle composée de cellules indifférenciées. Il serait donc pertinent de modifier la méthode d'évaluation de ce paramètre en y incluant, par exemple, l'utilisation d'un colorant spécifique pour les cellules indifférenciées ou pour les cellules différenciées (embryons complets ou non) de façon à pouvoir estimer visuellement la contribution de chaque type de cellules au volume du culot sédimenté. Dans cette perspective, il est permis de douter que le volume final de biomasse sédimentée, paramètre ponctuel rapporté au Tableau 5.5, puisse avoir la valeur prédictive qu'on lui prête concernant la composition de la biomasse et la concentration d'embryons somatiques d'une culture donnée. Ainsi, le fait que la biomasse sédimentée occupe en moyenne 10% moins d'espace du volume final des cuvées en bioréacteurs que celui des cuvées en flacons (Tableau 5.5) est probablement une coïncidence et il n'a pas forcément la signification mentionnée à la fin de la sous-section 5.2.1.3.

5.2.2.3 Cinétiques d'absorption des macronutriments

Les Figures 5.14 à 5.18 présentent, en fonction du temps, la concentration des embryons torpilles ainsi que celles de dix macronutriments (glucides considérés ensemble, cinq cations et quatre anions) du milieu B5 pour les trois cuvées de la série J. À partir de ces résultats il est possible d'évaluer les cinétiques d'absorption des nutriments et de les relier à la formation de biomasse et à la production d'embryons somatiques.

La Figure 5.14 illustre les variations de concentration des glucides avec les courbes de production d'embryons somatiques et de biomasse sèche. On remarque qu'à 500 heures la concentration totale des glucides est inférieure à $5,0 \text{ g.L}_{\text{SUSP}}^{-1}$ dans les deux flacons et supérieure à $6,5 \text{ g.L}_{\text{SUSP}}^{-1}$ dans le bioréacteur, puis qu'à 600 heures elle est de zéro dans les flacons et

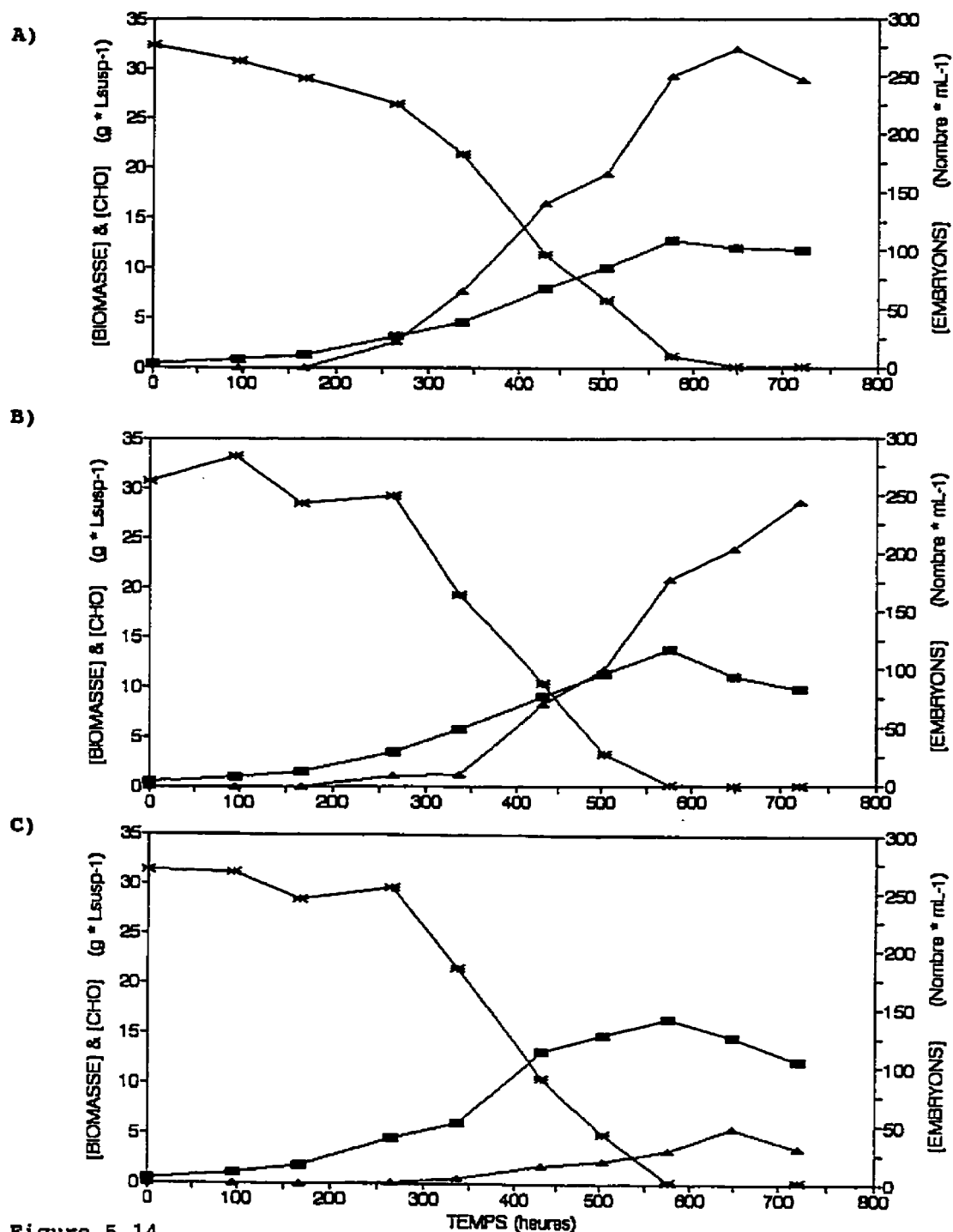


Figure 5.14

Concentrations d'embryons, de biomasse sèche et de glucides en fonction du temps pour trois cuvées de la série J:

A) Bioréacteur J;

B) Flacon témoin T25;

C) Flacon contrôle T26.

[embryons somatiques] : ▲

[biomasse sèche] : ■

[glucides totaux] : *

supérieure à 1,0 g.L_{SUSP.}⁻¹ dans le bioréacteur. Bien que ces résultats ne soient que marginalement différents, il semble tout de même qu'indépendamment des concentrations initiales en ammonium les glucides disparaissent plus vite des deux cuvées en flacons agités que de celle du bioréacteur. Étant donné qu'il y a plus de biomasse produite dans les cuvées en flacons agités que dans celle en bioréacteur, il est possible qu'en flacons les cellules (différenciées ou non) absorberaient une part des glucides sans les consommer, tandis qu'en bioréacteur des cellules analogues en consommeraient une plus forte proportion à des fins énergétiques. Cette divergence de comportement nutritionnel des cellules pourrait ainsi refléter en partie les effets de deux régimes d'agitation particulièrement différents. Quoique cette observation et cette interprétation devront être vérifiées et confirmées, elles peuvent être vues comme allant dans le même sens que les hypothèses précédentes puisqu'elles renforcent la perception à l'effet que la culture contrôlée en bioréacteur favoriserait une activité métabolique intense (consommation de glucides et respiration cellulaire accrues) des cellules d'embryons somatiques en formation, contrairement à la culture en flacon agitée où les cellules (différenciées ou non) orienteraient plutôt leur activité vers le stockage de nutriments et donc la formation de biomasse.

Outre ces différences marginales entre les deux modes de culture, on note à la Figure 5.14 que la concentration de biomasse sèche des trois cuvées n'augmente plus après la disparition des glucides des suspensions. Cette relation est vraie pour toutes les cultures en bioréacteurs (Annexe I, Section I.9) comme pour toutes celles en flacons agités (résultats non présentés). En fait, elle illustre une évidence qui se vérifie lors de toute culture en cuvée de matériel vivant, soit que les processus de croissance cessent lorsque s'épuisent les sources de carbone. Suivant un concept discuté plus loin dans ce chapitre, on peut dire que les cultures sont alors limitées en glucides. Dans cette perspective, le fait que la concentration d'embryons somatiques augmente parfois un peu après l'épuisement des glucides (Figures 5.14-B&C et I.9.2) constitue une preuve que, selon les conditions de culture, des cellules embryogènes peuvent emmagasiner certaines quantités de glucides.

La Figure 5.15 concerne les changements de concentrations en fonction du temps de quatre des cinq cations, l'ammonium étant considéré à la figure suivante. On constate que ces cations (calcium, magnésium, potassium et sodium) sont tous absorbés mais qu'aucun ne l'est complètement. Parmi ceux-ci, le calcium est le plus absorbé durant les trois cuvées. On en déduit qu'avec le milieu B5 régulier, les concentrations de ces quatre cations sont probablement adéquates pour la culture en flacons comme pour celle en bioréacteur. À priori il ne semble pas y avoir de relation particulière entre la production d'embryons dans les trois cuvées et l'un de ces cations. On note cependant à l'Annexe I (Section I.10) que le magnésium, le sodium et le calcium sont tous absorbés complètement lorsque l'ammonium est absent du milieu de culture (cuvée G), alors que le magnésium et le calcium le sont aussi quand le milieu ne contient que 2 mM d'ammonium (cuvée E). Dans ces cas, il est possible qu'un déficit en ammonium soit en partie compensé par d'autres cations. Ceci reste à être étudié systématiquement.

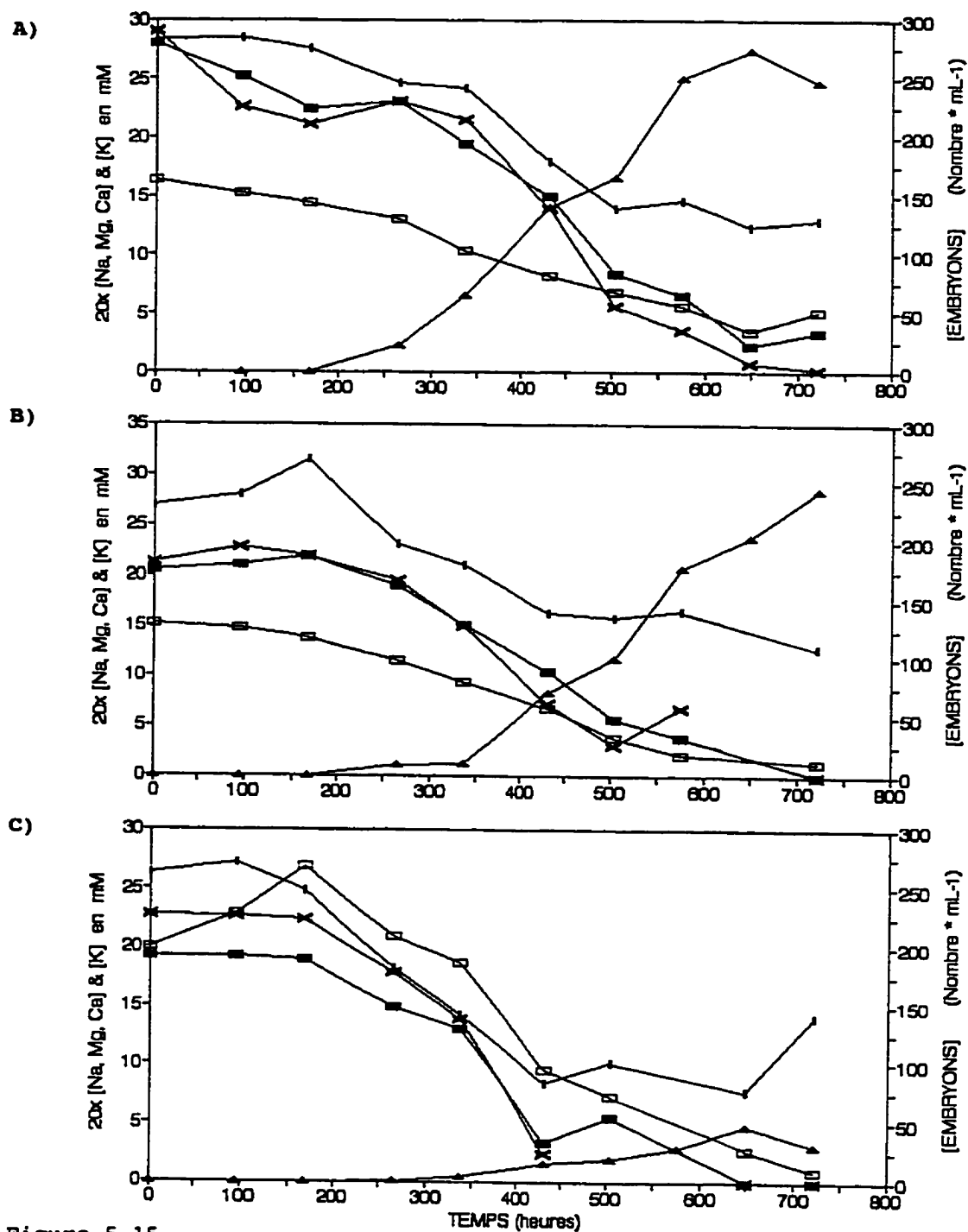


Figure 5.15

Concentrations d'embryons et des cations calcium, magnésium, potassium et sodium en fonction du temps pour trois cuvées de la série J:

A) Bioréacteur J; B) Flacon témoin T25; C) Flacon contrôle T26.

[embryons somatiques] : ▲

[calcium] x20 : X

[potassium] : □

[magnésium] x20 : ■

[sodium] x20 : |

L'ammonium, seul autre cation du milieu B5 et variable centrale de ce projet de recherche, est traité séparément à la Figure 5.16. On y note d'abord que la concentration initiale en ammonium semble légèrement moindre dans le flacon témoin T25 que dans le bioréacteur. Ce résultat est certainement dû à une erreur d'analyse ou de manipulation expérimentale car la seconde valeur (à -100 heures) est plus grande. Outre cet artefact expérimental, les graphiques A et B de la Figure 5.16 montrent que l'absorption d'ammonium est relativement semblable en bioréacteur et en flacon témoin, si bien que d'un point de vue nutritionnel rien ne laisse présager de la productivité embryogène supérieure du bioréacteur. Dans ces deux cas, le cation disparaît du milieu après ~550 heures de culture, moment à partir duquel il devient possiblement limitant. Enfin, une comparaison des graphiques pour les cuvées T25 et T26 indique très nettement que le manque d'ammonium est responsable du nombre plus faible d'embryons somatiques produits en flacon contrôle (comme pour toutes les cultures effectuées avec du B5 régulier contenant initialement 2mM NH_4^+), puisque la concentration en ammonium est la seule et unique différence dans les conditions physico-chimiques de culture de ces deux cuvées.

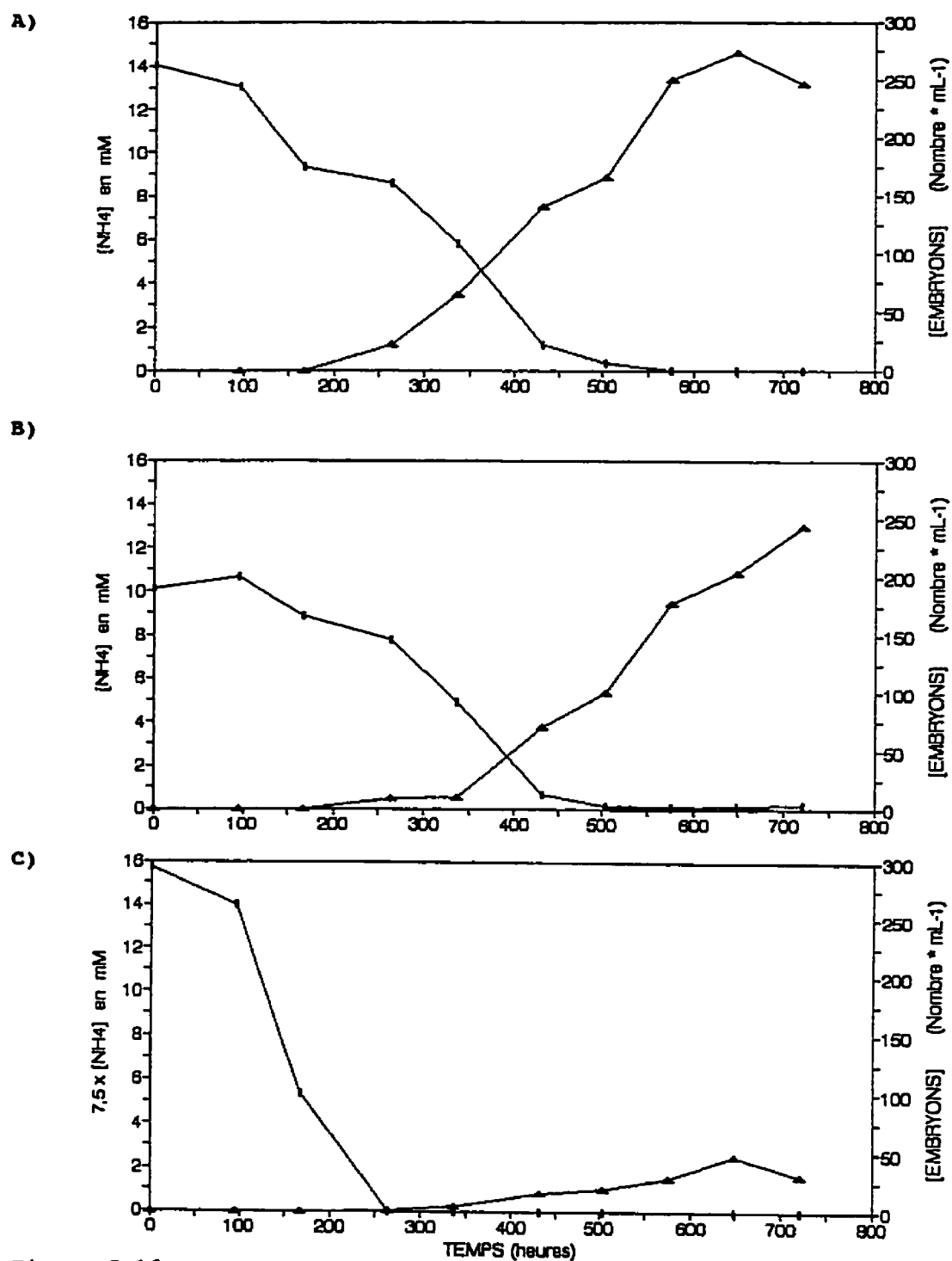


Figure 5.16

Concentrations d'embryons et d'ammonium en fonction du temps pour trois cuvées de la série J:

A) Bioréacteur J; B) Flacon témoin T25; C) Flacon contrôle T26.
 [embryons somatiques] : ▲ [ammonium] x7,5 pour C : |

La Figure 5.17 présente l'absorption des quatres anions principaux du milieu B5 (phosphate, chlorure, nitrate et sulfate) en fonction du temps. Parmi ceux-ci, seul le phosphate est complètement absorbé dans les trois cuvées. En conséquence la possibilité que le phosphate soit limitant dans les trois cuvées devrait être considérée sérieusement (comme dans le cas du cation ammonium d'ailleurs) lors d'une optimisation éventuelle des milieux de culture. De plus, les courbes d'absorption du nitrate et du sulfate ont des allures à peu près semblables pour les trois cuvées, alors que ce n'est pas le cas pour le chlorure. Ce dernier étant absorbé de façon variable dans les trois cultures, il joue peut être un rôle non négligeable dans l'embryogenèse. Les rendements de la sous-section suivante sont susceptibles d'en dire plus long à ce sujet.

Puisque l'ammonium paraît être limitant dans la cuvée contrôle (Figure 5.16-C) et que les courbes d'absorption de l'anion nitrate ne présentent pas de différences marquées entre les cuvées (Figure 5.17), il est intéressant de comparer, à la Figure 5.18, les profils d'absorption de ces deux seules sources d'azote du milieu B5. Ainsi, le graphique 5.18-C ne montre aucun changement particulier dans la courbe du nitrate suite à la disparition plus rapide de l'ammonium du milieu de culture (~250 heures), alors qu'on aurait pu s'attendre à ce que la consommation de cet anion s'accroisse afin de compenser une demande éventuelle en azote. Ceci suggère que le nitrate et l'ammonium sont utilisés à des fins métaboliques différentes, ce qui est tout à fait en accord avec l'explication de Kamada et Harada (1979b & 1984a&b) voulant que les effets stimulants de composés azotés réduits (acides aminés et/ou ammonium) sur l'embryogenèse somatique tiennent à ce qu'ils sont immédiatement utilisables pour la synthèse de protéines essentielles (incluant des enzymes du métabolisme de l'azote comme la nitrate-réductase) à la prolifération cellulaire rapide qui est requise lors de la formation d'embryons.

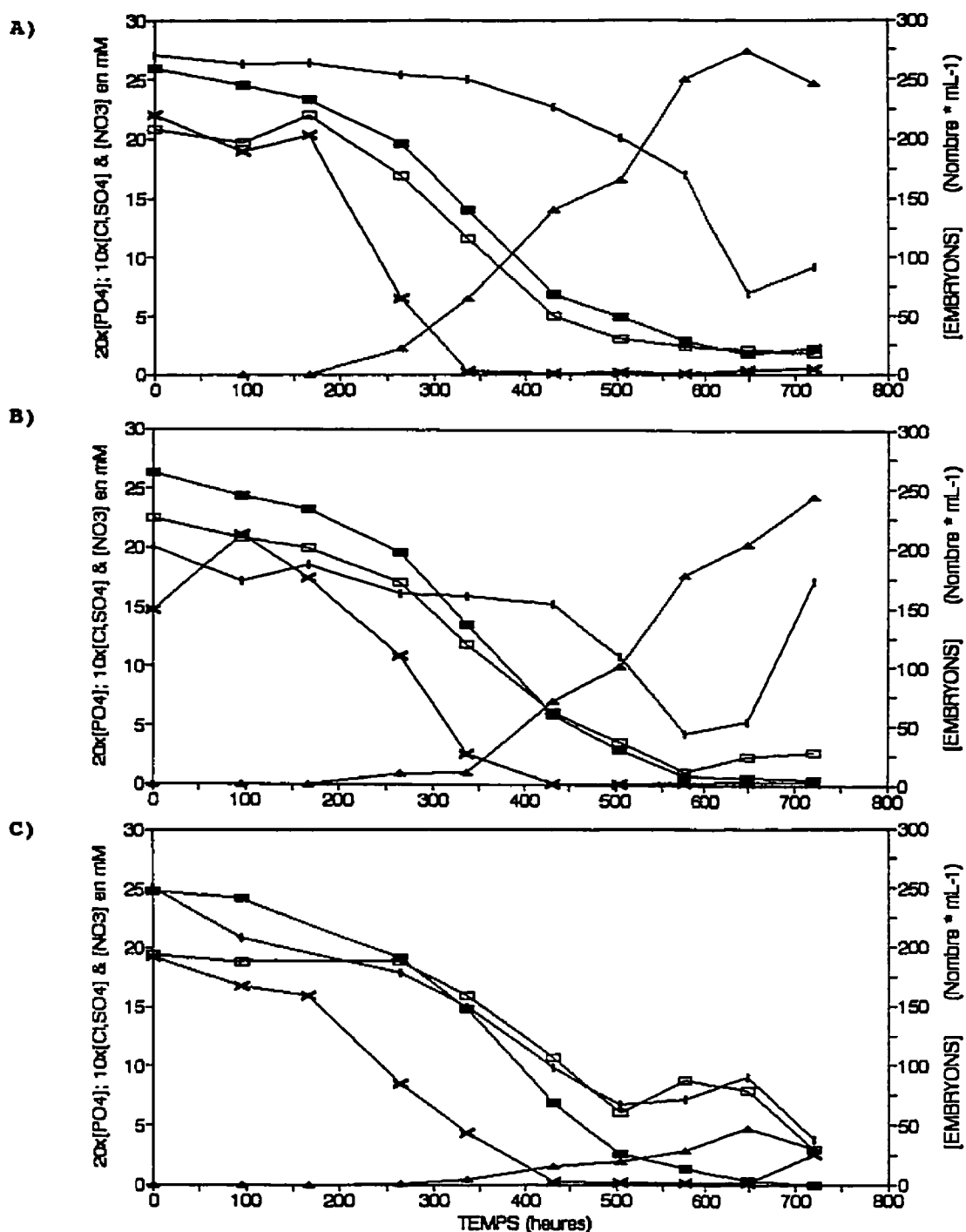


Figure 5.17

Concentrations d'embryons et des anions phosphate, chlorure, nitrate et sulfate en fonction du temps pour trois cuvées de la série J:

A) Bioréacteur J; B) Flacon témoin T25; C) Flacon contrôle T26.

[embryons somatiques]	: ▲	[chlorure] x10	:
[phosphate] x20	: X	[sulfate] x10	: □
[nitrate]	: ■		

Pour terminer cette sous-section, la combinaison des graphiques de la Figure 5.19 permet de mettre en parallèle certaines des cinétiques précédentes de la cuvée J avec les mesures de conductivité et de pH effectuées en continu dans la suspension à l'aide du système d'acquisition de données ID^{MC} (BIO-EXPERT Inc).

De façon générale, la courbe de conductivité du graphique 5.19-A montre que ce paramètre décroît au cours de la cuvée J, passant graduellement de ~4,0 à ~0,5 mS. Ainsi, l'allure de cette courbe correspond globalement à l'absorption graduelle des macronutriments par les cellules (graphiques A des Figures 5.14 à 5.18). Plus spécifiquement, on note deux chutes abruptes de la conductivité, soit durant les trente premières heures et à ~130 heures. La chute du début de la cuvée est probablement due à l'absorption rapide d'une partie des nutriments. Considérant le graphique 5.19-C, la seconde chute peut, à première vue, être associée à une absorption apparemment accrue de l'ammonium autour de 130 heures. Toutefois, l'examen des cinétiques d'absorption d'ammonium et des mesures en continu de la conductivité pour les trois cuvées en bioréacteurs où ces mesures furent effectuées avec une certaine fiabilité (résultats non montrés) ne permet pas de conclure à une telle association. En conséquence, cette seconde chute est vraisemblablement un artefact électronique. Donc, tel que mesurée, la conductivité traduit bien la cinétique globale d'absorption des macronutriments mais elle n'informe pas, par exemple, sur la disparition d'un nutriment particulier de la suspension comme l'indique le graphique C de la Figure 5.19 pour les glucides, l'anion phosphate et le cation ammonium. Similairement, ces mesures de conductivité ne fournissent pas de renseignements pouvant être liés spécifiquement à l'évolution de la biomasse ou au développement des embryons torpilles (Figure 5.19-B) de la cuvée J.

La courbe des mesures de pH dans la suspension est plus accidentée que celle de la conductivité (Figure 5.19-A). On remarque d'abord une augmentation rapide du pH durant les trente premières heures, augmentation probablement liée au faible pouvoir tampon du milieu B5 ainsi qu'à des phénomènes d'absorption rapide de nutriments, de relâchement par des cellules de composés organiques dans la suspension ou à la combinaison de

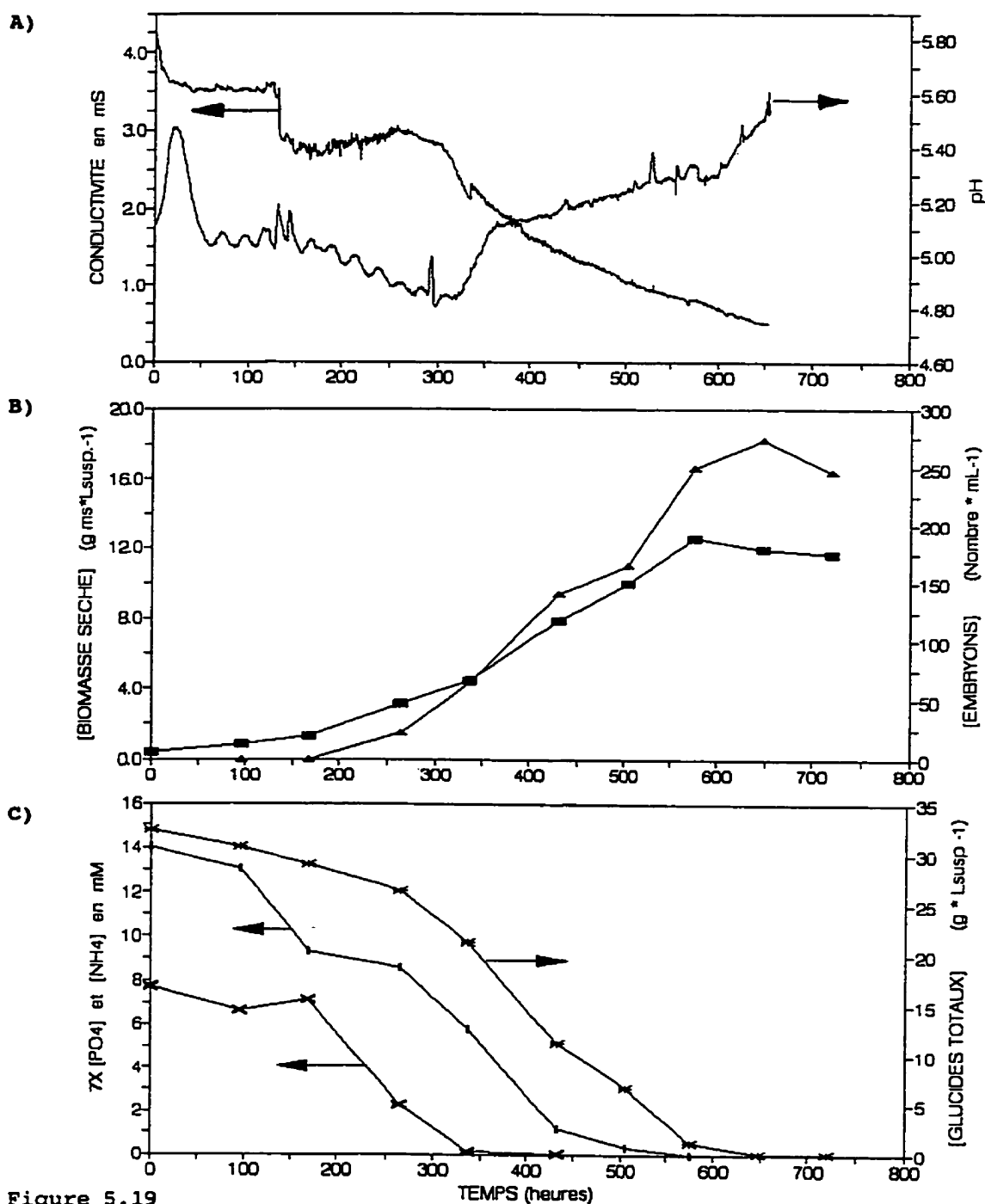


Figure 5.19

Comparaison, pour la cuvée J, des mesures en continu de conductivité et de pH avec les cinétiques de production de la biomasse sèche et des embryons somatiques, ainsi qu'avec les cinétiques d'absorption du cation ammonium, des glucides et de l'anion phosphate

A) Conductivité et pH de la suspension;

B) Concentrations de biomasse sèche (■) et d'embryons somatiques (▲);

C) Concentrations d'ammonium (○), de glucides (*) et de phosphate (X).

ces deux phénomènes. Par la suite, la tendance générale est à une diminution du pH jusqu'à ~330 heures suivi d'un accroissement graduel jusqu'à l'arrêt de l'acquisition à ~650 heures. Comparant ce profil aux cinétiques des graphiques B et C, le rapprochement le moins spéculatif qui peut être fait est celui entre la disparition du phosphate (Figure 5.19-C) et la remontée du pH à partir de ~330 heures. Or on ne retrouve pas systématiquement un tel lien pour les deux autres cuvées en bioréacteurs où les mesures de pH n'ont pas été problématiques (non montrés). Enfin, aucune des quatre autres cinétiques montrées aux graphiques B et C de la Figure 5.19 ne semble pouvoir être décrite ou prédite par les mesures de pH tel qu'effectuées.

Les constats effectués à partir des parallèles précédents entre les graphiques de la Figure 5.19 indiquent en somme que, si la conductivité et le pH traduisent l'activité ionique globale et complexe d'un milieu de culture, elles ne constituent toutefois pas présentement des mesures permettant de comprendre ou d'expliquer des événements spécifiques du développement d'une culture embryogène. Ainsi, ces mesures ne sont pas rapportées à l'Annexe I pour d'autres cuvées en bioréacteurs et ne sont pas utilisées ou discutées dans le reste de ce mémoire. Ceci dit, il demeure que si la sensibilité des mesures du pH et de la conductivité pouvait être améliorée, ces paramètres physiques pourraient peut-être devenir des sources utiles d'information pour la culture *in vitro* d'embryons somatiques de plantes.

5.2.3 CINÉTIQUE DE PRODUCTION

En guise de transition entre la sous-section précédente et celle-ci, la Figure 5.20 illustre les courbes de production d'embryons somatiques en fonction du temps pour les six cuvées en bioréacteurs 2-L où la seule variable est la concentration initiale en ion ammonium. Bien que cette production fluctue considérablement d'une cuvée à l'autre, on y note que le délai d'apparition des premiers embryons torpilles (~200 h) est le même dans tous les cas. Ceci démontre que la concentration initiale en ammonium n'a pas d'influence sur la vitesse du processus embryogène mais plutôt sur l'ampleur de celui-ci; une quantité plus grande d'embryons se développant complètement lorsque cette concentration s'accroît en deçà d'un certain seuil. Dans le cas de la lignée SP1b, il apparaît que 15 mM d'ammonium est une concentration initiale près d'un optimum pour l'embryogenèse. Ayant maintenant une meilleure compréhension de la dynamique probable des cultures étudiées, il est intéressant de comparer les deux modes de culture sur le plan des rendements de croissance et de production.

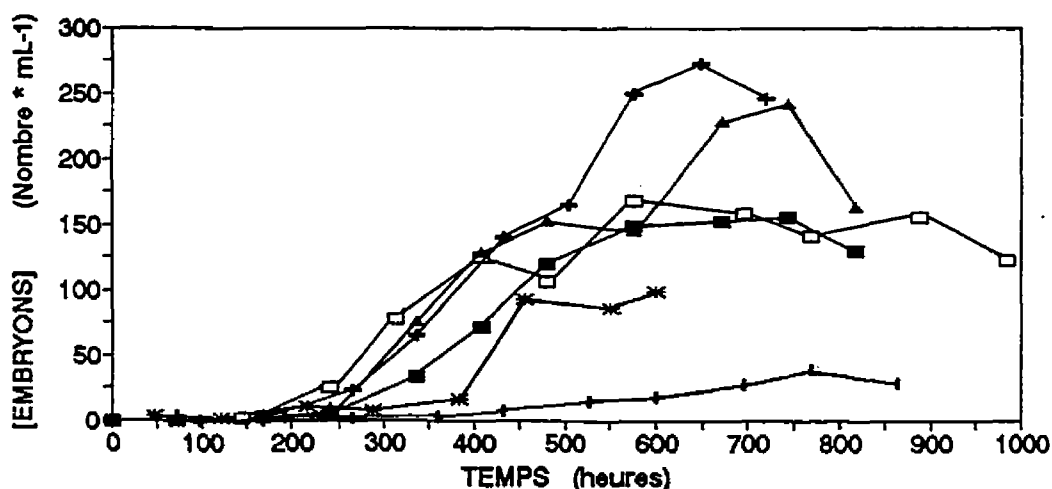


Figure 5.20

Concentrations d'embryons en fonction du temps pour six cuvées effectuées avec la lignée SP1b dans des bioréacteurs 2-L dont chaque milieu de culture B5 contient une concentration initiale différente d'ammonium (NH₄⁺)

0 mM NH ₄ ⁺ :		10 mM NH ₄ ⁺ :	□
2 mM NH ₄ ⁺ :	*	15 mM NH ₄ ⁺ :	+
5 mM NH ₄ ⁺ :	■	20 mM NH ₄ ⁺ :	▲

Cette dernière sous-section de la section 5.2 porte sur la comparaison du mode bioréacteur et du mode flacon pour les rendements de croissance de la biomasse sèche ainsi que pour les rendements de production d'embryons torpilles par rapport à l'absorption des dix macronutriments principaux du milieu B5 en fonction du temps. La procédure suivie pour calculer, comparer et rapporter ces rendements compte quatre étapes: 1) pour chaque cuvée où les données le permettent, une régression linéaire est établie entre la variable dépendante (soit la concentration en biomasse sèche ou celle en embryons torpilles) et la variable indépendante (la concentration de l'un des dix macronutriments considérés); 2) lorsque le coefficient de corrélation (r^2) de la régression est plus grand ou égal à 0,80 et que l'erreur sur la pente est plus petite que 25%, on retient la valeur de cette pente comme rendement de la variable dépendante; 3) quand cela est pertinent, les rendements par rapport à un même nutriment pour les cuvées d'un même mode de culture et d'une même concentration initiale en ammonium sont regroupés et une valeur moyenne est calculée; 4) une courbe des rendements en fonction de la concentration initiale en ammonium est tracée pour chaque type de rendement, chaque macronutriment et chaque mode de culture. Les quarante courbes ainsi obtenues sont organisées en vingt paires de graphiques afin de pouvoir les comparer selon le mode de culture. Lorsqu'une paire de graphiques montre un rendement constant dans les deux modes de culture, les valeurs sont rapportées sous forme de tableau avec leurs moyennes. Dans chaque autre cas, la comparaison et la discussion portent sur la paire de graphiques. Au plan rédactionnel, la charge électronique (valence) de chacun des ions mentionnés est omise des tableaux, figures et paragraphes qui suivent afin d'alléger l'écriture, de faciliter la lecture et d'éviter les confusions.

Il faut aussi spécifier qu'on ne peut pas évaluer si les tendances observées dans cette sous-section sont statistiquement significatives car, pour chacune des six concentrations initiales en ammonium, chaque résultat repose sur une seule cuvée en bioréacteur et au mieux sur deux cuvées en flacons (sauf pour la concentration en ammonium de 2 mM et pour certains nutriments où parfois plusieurs cuvées ont été analysées). Néanmoins, dans un contexte où la littérature relative à la culture d'embryons somatiques en suspension contient peu d'information concernant les rendements de

croissance et de production, cet exercice demeure valable et les tendances intéressantes pourront faire l'objet de travaux ultérieurs de validation. Les résultats qui suivent peuvent mener à la formulation de meilleurs milieux de culture, au développement de modèles de production, à l'élaboration de stratégies d'alimentation des cuvées, ainsi qu'à une meilleure compréhension générale de l'embryogenèse végétale somatique. Il est au moins certain que la connaissance des rendements de croissance et de production contribue à mieux définir les projets futurs de recherche dans le domaine.

La notion de limitation nutritionnelle est déjà mentionnée à quelques reprises dans les interprétations des Figures 5.14 à 5.18 et elle est utilisée fréquemment dans la présente sous-section. Il importe donc de préciser qu'une culture embryogène est limitée en un nutriment quelconque lorsque la croissance de la biomasse et/ou la production d'embryons somatiques cesse(nt) ou semble(nt) cesser à cause de l'épuisement de ce nutriment dans le milieu. Il est aussi tout à fait concevable qu'une même culture puisse être limitée par plusieurs nutriments.

5.2.3.1 Rendements de croissance de la biomasse sèche

Parmi les dix rendements de croissance de la biomasse sèche (Y_c), six apparaissent constants dans les deux modes de culture, soient ceux par rapport aux glucides totaux (Tableau 5.6), aux anions nitrate (Tableau 5.7) et chlorure (Tableau 5.8), ainsi qu'aux cations ammonium (Tableau 5.9), magnésium (Tableau 5.10) et calcium (Tableau 5.11). Les quatre autres rendements sont comparés à partir d'autant de paires de figures et sont ceux par rapport au phosphate (Figure 5.21), au sulfate (Figure 5.22), au sodium (Figure 5.23) et au potassium (Figure 5.24).

Considérant globalement les valeurs de moyenne et d'écart-type du Tableau 5.6, le rendement de croissance par rapport aux glucides totaux ($CHOT$) apparaît constant quelque soit la concentration initiale en ammonium et il est le même en bioréacteurs comme en flacons agités. Indifféremment du mode de culture, on peut donc prendre pour acquis qu'avec une base de milieu B5 contenant initialement 30 g.L^{-1} de sucrose environ $0,45 \text{ g}$ de biomasse sèche est produit pour chaque gramme de glucide (fructose,

Tableau 5.6

Rendements de croissance par rapport aux glucides totaux (CHOT) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$

$[\text{NH}_4]_i$ (mM)	BIORÉACTEURS (2-L)		FLACONS (500-mL)	
	Yc (CHOT) g ms. g ⁻¹	Erreur %	Yc (CHOT) g ms. g ⁻¹	Erreur %
0	0,438	4,5	0,445	4,9
2	0,444	5,1	0,510	14,2
5	0,722	14,5	0,431	6,9
10	0,348	10,7	0,454	4,6
15	0,374	2,8	0,378	6,7
20	0,527	11,0	0,396	5,5
MOYENNE :	0,475		0,436	
ÉCART-TYPE:	0,124		0,042	

glucose et sucrose) consommé dans une suspension de la lignée embryogène SP1b. En comparaison avec la littérature, il est intéressant de noter que la valeur de Yc en bioréacteur pour une concentration initiale d'ammonium de 20 mM (0,527 g ms.gCHOT⁻¹) est semblable à celle de 0,5 g ms.g⁻¹ obtenue par Kessell et Carr (1972) pour un rendement mesuré par rapport au sucrose (concentration initiale de 25 g.L⁻¹) durant la phase de croissance exponentielle de suspensions de cellules embryogènes de carotte cultivées en bioréacteur avec milieu MS (21 mM d'ammonium) et contrôle d'oxygène dissous à 16%.

Les résultats de Yc par rapport au nitrate (Tableau 5.7) mènent à des constats similaires aux précédents lorsqu'on ne considère globalement que la concentration initiale en ammonium. Il semble toutefois que la culture en flacons agités permet d'obtenir un rendement moyen ~15% supérieur à la culture en bioréacteurs (~0,53 contre ~0,46 g ms.mmole⁻¹NO₃). Si cet écart est significatif il faudrait éventuellement en chercher l'explication dans les différences entre ces deux modes de culture au plan de l'évolution temporelle du niveau d'oxygène dissous dans le milieu. De plus, la valeur de Yc en flacons pour B5 (initialement ~25 mM de nitrate) avec une concentration initiale d'ammonium de 20 mM est de 0,428 g ms.mmole⁻¹NO₃, soit ~34% de plus que celle de 0,32 g ms.mmole⁻¹NO₃ obtenue par Huang et collègues (1993) aussi en flacons mais avec le milieu MS qui contient

Tableau 5.7

Rendements de croissance par rapport à l'anion nitrate (NO_3) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$

$[\text{NH}_4]_i$ (mM)	BIOREACTEURS (2-L)		FLACONS (500-mL)	
	Yc (NO_3) g ms.mmole ⁻¹	Erreur %	Yc (NO_3) g ms.mmole ⁻¹	Erreur %
0	0,402	4,4	0,628	5,2
2	0,520	6,3	0,532	24,4
5	0,543	17,3	0,571	8,2
10	0,390	4,6	0,523	7,6
15	0,484	6,6	0,487	5,1
20	0,397	14,0	0,428	6,7
MOYENNE :	0,456		0,528	
ÉCART-TYPE:	0,062		0,063	

initialement -39 mM de nitrate. Donc non seulement le mode de culture, mais aussi la formulation du milieu de culture influencerait le rendement de croissance par rapport au nitrate.

À la Figure 5.21 on note que les deux courbes relatives aux rendements de croissance (Yc) par rapport au phosphate ont des allures semblables si l'on fait abstraction des valeurs pour une concentration initiale en ammonium de 0 mM. Pour les concentrations en ammonium comprises entre 2 mM et 10 mM, Yc diminue d'environ 8,00 à 4,50 g ms.mmole⁻¹PO₄ dans les deux modes de culture, alors que pour les concentrations comprises entre 10 mM et 20 mM il reste constant à ~4,00 g ms.mmole⁻¹PO₄ en bioréacteurs et ~5,00 g ms.mmole⁻¹PO₄ en flacons agités. On peut donc en déduire que le rendement de croissance de la biomasse sèche par rapport à l'anion phosphate demeure constant dans les deux modes en autant que le milieu de culture B5 contient initialement au moins 10 mM d'ammonium. En comparaison avec la littérature, la valeur de Yc en bioréacteur avec B5 (~1,1 mM de phosphate) pour une concentration initiale d'ammonium de 20 mM est de -3,9 g ms.mmole⁻¹PO₄ ce qui est -19% inférieur à celle de -4,8 g ms.mmole⁻¹PO₄ mesurée par Kessell et Carr (1972) durant la phase de croissance exponentielle de suspensions de cellules embryogènes de carotte cultivées en bioréacteur avec du milieu MS (~1,2 mM de phosphate initial) et un contrôle en oxygène dissous à 16% de la saturation en air dans l'eau.

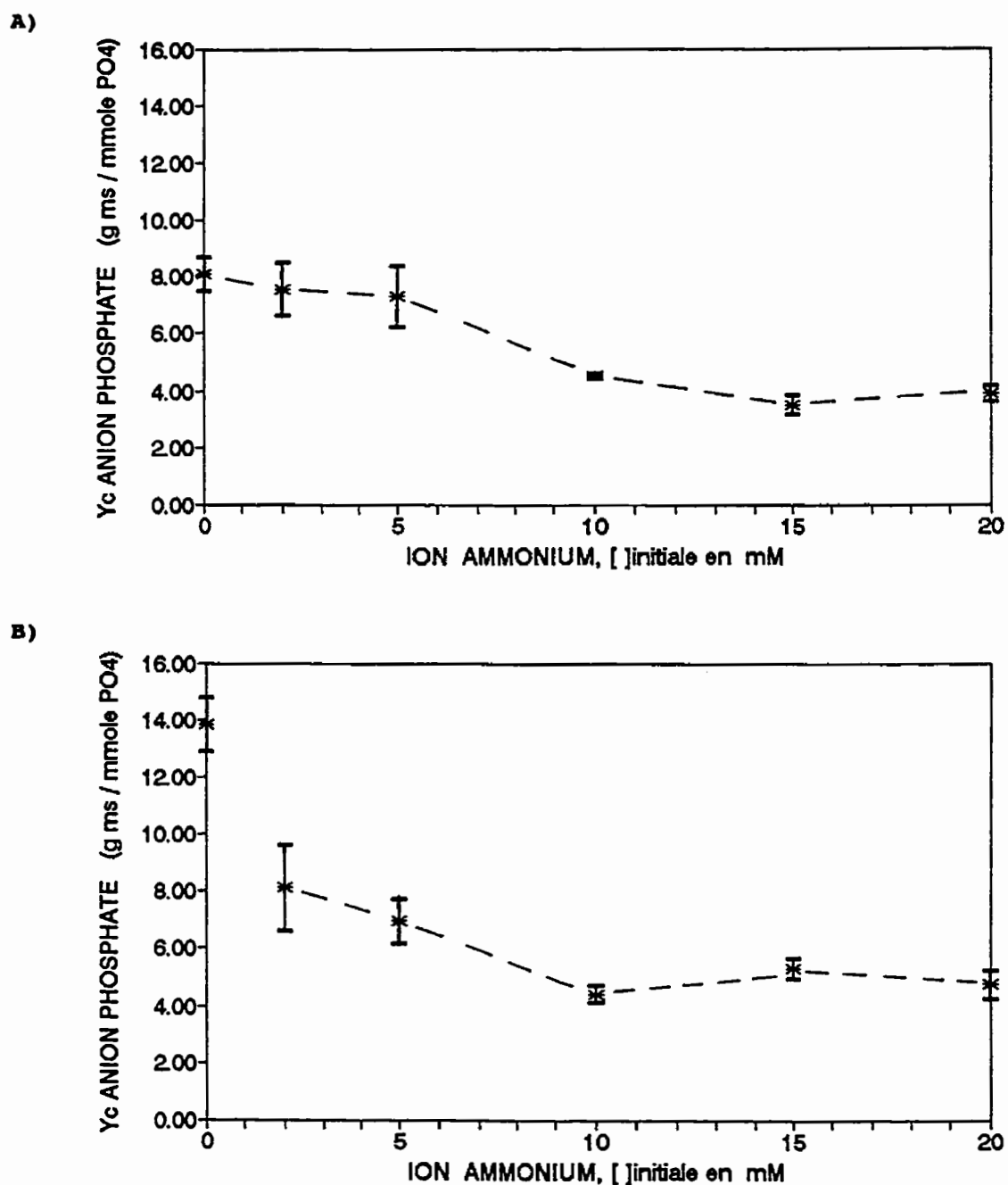


Figure 5.21

Rendements de croissance (Y_c) par rapport à l'anion phosphate (PO_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

D'après les résultats du Tableau 5.8, l'anion chlorure est un des ions pour lequel il est le plus difficile d'obtenir une certaine cohérence dans le calcul des rendements de croissance. En bioréacteurs, d'une part, les marges d'erreur pour deux des cinq valeurs sont supérieures à 25% de sorte que l'on se retrouve avec deux valeurs situées autour de 6 g ms.mmole⁻¹Cl dont la marge d'erreur est entre 13 et 17% et une valeur deux fois plus grande (~12,55 g ms.mmole⁻¹Cl) avec la plus faible marge d'erreur (8,4%). Dans ce contexte il n'est pas vraiment pertinent d'estimer une mesure statistique de tendance centrale (moyenne et écart-type). En flacons agités, d'autre part, toutes les marges d'erreur sont inférieures à la limite de 25% si bien qu'en faisant exception de la valeur extrême d'environ 15,37 g ms.mmole⁻¹Cl la variation des cinq autres rendements est acceptable. Ainsi, en ne tenant compte que des cinq premières valeurs ([NH₄]_i de 0 à 15 mM), le rendement de croissance par rapport au chlorure peut être considéré constant et il correspond à une valeur moyenne de ~9,19 g ms.mmole⁻¹Cl avec un écart-type de ~1,23 g ms.mmole⁻¹Cl. Puisqu'il est probable que les tendances sont similaires dans les deux modes de culture, il est permis de supposer que le rendement de croissance par rapport au chlorure est aussi constant en bioréacteurs. Par contre des investigations supplémentaires sont requises pour déterminer adéquatement la valeur de cette constante supposée.

Tableau 5.8
Rendements de croissance par rapport à l'anion chlorure (Cl) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium [NH₄]_i

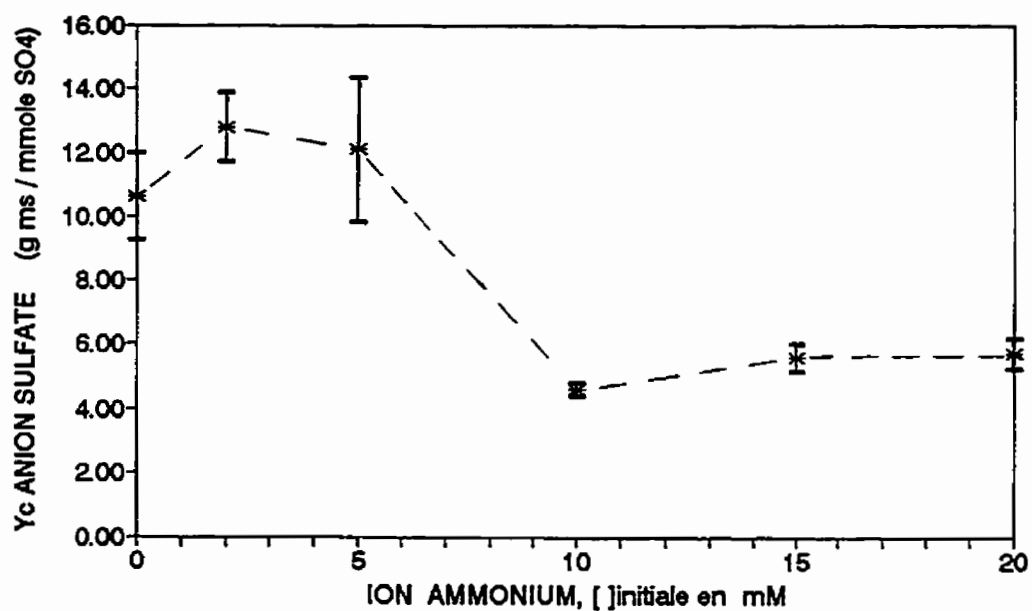
[NH ₄] _i (mM)	BIOREACTEURS (2-L)		FLACONS (500-mL)	
	Y _c (Cl) g ms.mmole ⁻¹	Erreur %	Y _c (Cl) g ms.mmole ⁻¹	Erreur %
0	5,331	16,5	11,563	9,6
2	6,612	13,0	8,543	6,9
5	9,220	36,5	8,172	6,0
10	8,331	33,1	8,517	1,9
15	12,554	8,4	9,130	18,5
20	ND		¹ 15,369	7,3
MOYENNE :	voir		9,185 (5)	
ÉCART-TYPE:	texte		1,228 (5)	

¹ valeur exclue du calcul de la moyenne

La Figure 5.22 indique dans les deux modes de culture que le rendement de croissance (Y_c) par rapport à l'absorption de l'anion sulfate tend à diminuer avec l'augmentation de la concentration initiale en ammonium. Cependant l'allure de cette tendance diffère quelque peu d'un mode à l'autre. En bioréacteurs, la diminution de $Y_c[SO_4]$ est relativement prononcée puisque le rendement passe de presque 13 g ms.mmole⁻¹SO₄ à environ 5 g ms.mmole⁻¹SO₄ sur l'intervalle de concentrations initiales 0 à 10 mM d'ammonium, pour ensuite rester constant (~5,5 g ms. mmole⁻¹SO₄) entre 10 et 20 mM. En flacons agités par ailleurs, Y_c passe d'environ 12 à 6 g ms.mmole⁻¹SO₄ sur toute l'intervalle de concentrations initiales en ammonium (0 à 20 mM), de sorte que la diminution moins prononcée et plus graduelle se poursuit faiblement entre 10 et 20 mM. Ainsi, pour le mode bioréacteur on peut dire, comme dans le cas de l'anion phosphate (Figure 5.21), que le rendement de croissance de la biomasse sèche par rapport à l'anion sulfate est constant en autant que le milieu de culture B5 contient initialement au moins 10 mM d'ammonium. Quant aux cuvées en flacons agités, il semble que l'accroissement de la concentration initiale en ammonium favorise une diminution du rendement de croissance par rapport au sulfate. Si cette tendance était vérifiée, il y aurait probablement une concentration initiale maximale d'ammonium à partir de laquelle le rendement par rapport au sulfate demeurerait constant comme cela se produit en bioréacteurs.

Les rendements de croissance de la biomasse sèche par rapport à l'ammonium sont rapportés au Tableau 5.9 pour des cuvées dont la concentration initiale en ammonium varie de 2 à 20 mM. On constate d'abord que Y_c semble constant pour un mode de culture donné. Ce résultat est particulièrement intéressant et important car il indique que la concentration en ammonium ne limiterait pas la croissance de la biomasse dans aucune des cuvées. Le rendement de croissance moyen en bioréacteurs est de -0,56 g ms.mmole⁻¹NH₄, où trois des cinq valeurs considérées dans cette moyenne ont une marge d'erreur qui varie entre 10 et 17%. Dans le cas des flacons agités, la valeur de Y_c pour une concentration initiale en ammonium de 2 mM ayant une trop grande marge d'erreur (41,7%), le rendement de croissance moyen et son écart-type (-0,72 g ms.mmole⁻¹NH₄ et -0,15 g ms.mmole⁻¹NH₄) sont obtenus à partir des quatre autres valeurs. Malgré que ces deux moyennes sont du

A)



B)

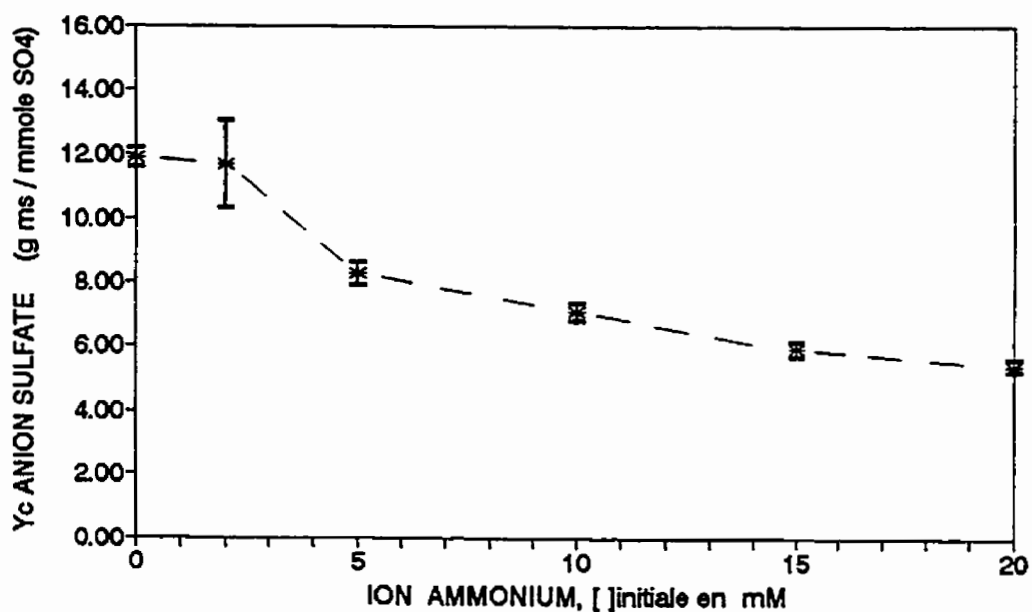


Figure 5.22

Rendements de croissance (Y_c) par rapport à l'anion sulfate (SO_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

Tableau 5.9

Rendements de croissance par rapport au cation ammonium (NH_4) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$

$[\text{NH}_4]_i$ (mM)	BIORÉACTEURS (2-L)		FLACONS (500-mL)	
	Yc (NH_4) g ms.mmole ⁻¹	Erreur %	Yc (NH_4) g ms.mmole ⁻¹	Erreur %
2	0,324	1,8	1,238	41,7
5	0,606	16,8	0,764	7,2
10	0,598	10,7	0,597	6,7
15	0,816	11,7	0,955	7,1
20	0,457	6,3	0,577	7,7
MOYENNE :	0,560		0,723 (4)	
ÉCART-TYPE:	0,165		0,152 (4)	

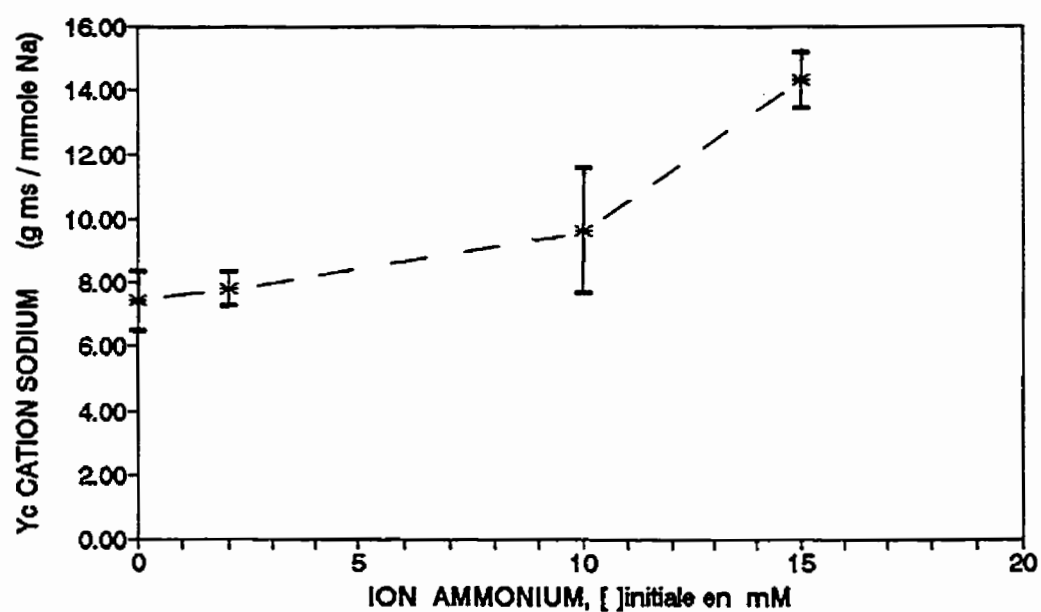
même ordre de grandeur lorsqu'on considère leurs écarts-types, on remarque tout de même que celle en flacons est environ supérieure de 22% à celle en bioréacteurs. Si cette différence est significative, la culture en flacons permettrait d'obtenir plus de biomasse sèche qu'en bioréacteur pour des concentrations équivalentes en ammonium. C'est d'ailleurs ce qu'on constate précédemment à des degrés divers pour la série J (Figure 5.8) et pour les séries E, K, I et L (Annexe I, section I.4).

D'un point de vue comparatif, la valeur de Yc en bioréacteur pour B5 avec une concentration initiale d'ammonium de 20 mM (0,457 g ms.mmole⁻¹ NH_4) est nettement inférieure au rendement d'environ 0,90 g ms.mmole⁻¹ NH_4 qui est rapporté par Kessell et Carr (1972) pour des suspensions de cellules embryogènes de carotte cultivées en bioréacteur avec un milieu MS (-21 mM NH_4 initial) et un contrôle d'oxygène dissous à 16% de la saturation en air dans l'eau. Pour la culture en flacons par ailleurs, le rendement obtenu pour B5 avec une concentration initiale d'ammonium de 20 mM (0,577 g ms.mmole⁻¹ NH_4) est -41% supérieur à celui mesuré par Huang et collègues (1993) dans MS. Cette absence de concordance entre les valeurs obtenues ici et celles rapportées dans la littérature reflète les différences importantes qui peuvent exister d'une lignée à l'autre et d'un ensemble de conditions de culture à un autre.

La Figure 5.23-A montre qu'en bioréacteurs le rendement de croissance par rapport à l'absorption du sodium s'accroît avec la concentration initiale des cultures en ammonium, passant progressivement de $-7,43 \text{ g ms.m mole}^{-1}\text{Na}$ lorsque le milieu ne contient pas d'ammonium à $-14,32 \text{ g ms.m mole}^{-1}\text{Na}$ lorsque la concentration initiale du cation est de 15 mM. N'ayant pas de résultat pour une concentration de 20 mM, on ne peut pas savoir si cette tendance se poursuit au-delà de 15 mM. Pour les cultures en flacons agités (Figure 5.23-B) on note aussi un léger accroissement de Y_c qui passe de $-10,68$ à $-13,28 \text{ g ms.m mole}^{-1}\text{Na}$ sur l'intervalle de concentrations allant de 2 à 15 mM d'ammonium. Toutefois, on observe ici une nette diminution de Y_c ($-7,03 \text{ g ms.m mole}^{-1}\text{Na}$) pour une concentration initiale en ammonium de 20 mM, ce qui laisse croire que son accroissement cesse quelque part entre 15 et 20 mM. En supposant que l'absorption du sodium s'effectue de façon semblable dans les deux modes de culture, une telle diminution se produit probablement aussi en bioréacteur.

La Figure 5.24-A sur les rendements de croissance par rapport à l'absorption du potassium en bioréacteurs peut être interprétée d'au moins deux façons. Si la valeur à 10 mM est juste, alors $Y_c[\text{K}]$ s'accroît avec la concentration initiale des cultures en ammonium sur l'intervalle de 0 à 10 mM ($-0,56$ à $-2,07 \text{ g ms.m mole}^{-1}\text{K}$) et il n'est pas évident de conclure s'il y a stabilisation ou diminution de $Y_c[\text{K}]$ pour les concentrations initiales se situant entre 10 et 20 mM. D'autre part, en supposant que la valeur de $Y_c[\text{K}]$ à 10 mM est surévaluée, on peut présumer que ce rendement s'accroît graduellement entre 0 et 20 mM en demeurant à peu près constant entre 5 et 15 mM. La Figure 5.24-B ne comptant pas de valeur de $Y_c[\text{K}]$ pour la concentration initiale en ammonium de 10 mM, les résultats en flacons agités ne permettent pas de trancher entre ces deux possibilités. De plus, ces résultats ne nous permettent pas de savoir si la relation entre Y_c et la variable indépendante est analogue dans les deux modes de culture. En somme, l'ensemble des rendements de croissance par rapport à l'absorption du potassium demeure ambigu. Cet aspect devrait donc être approfondi en considérant le fait que la méthode adoptée pour modifier la concentration initiale en ammonium des cuvées implique une certaine variation du potassium et ce, même s'il est démontré que la croissance globale de la

A)



B)

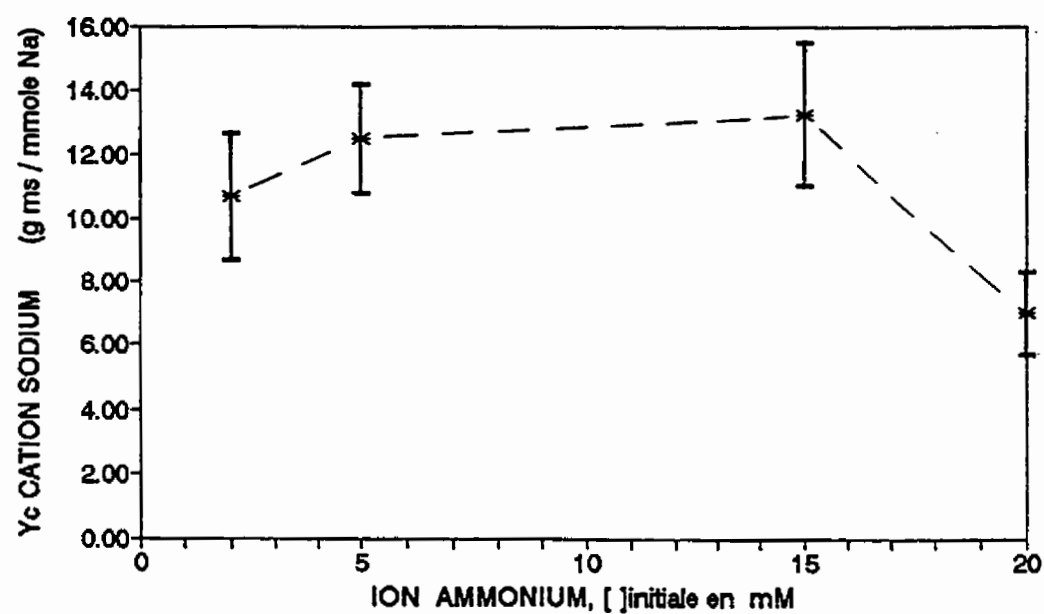


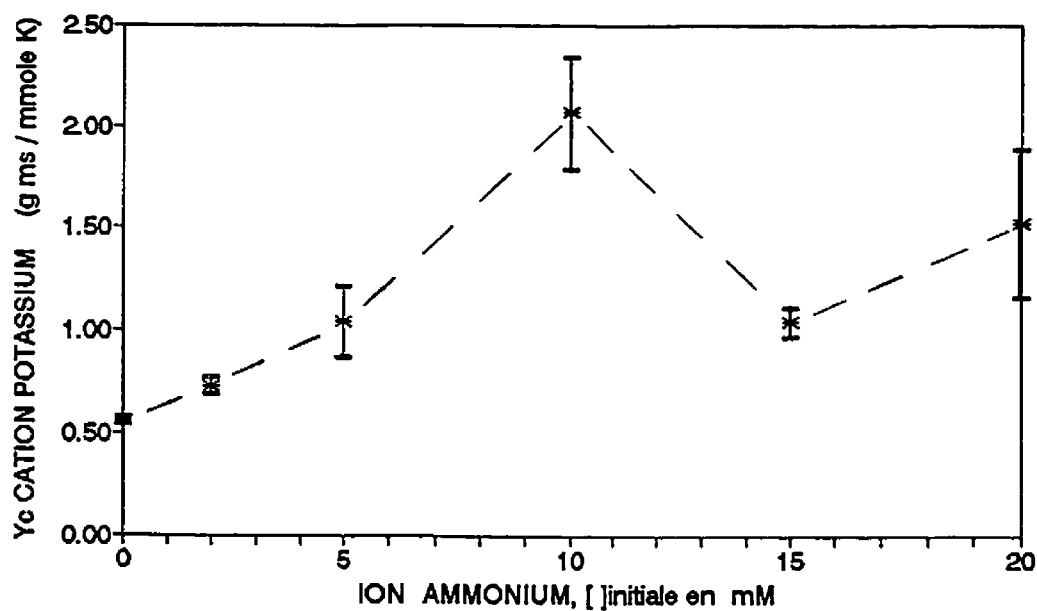
Figure 5.23

Rendements de croissance (Y_c) par rapport au cation sodium (Na) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

A)



B)

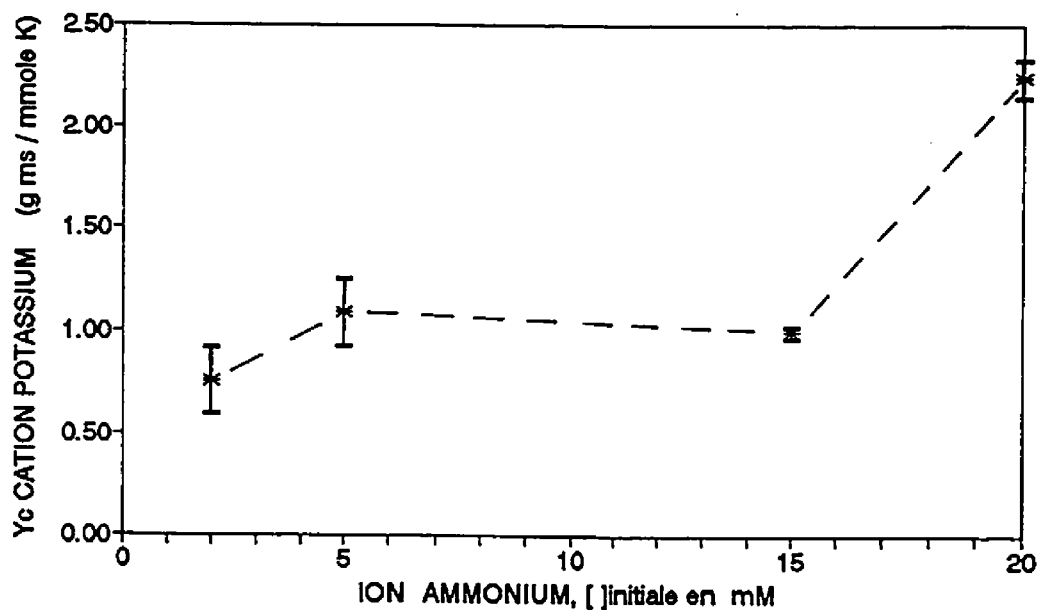


Figure 5.24

Rendements de croissance (Y_c) par rapport au cation potassium (K) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons témoins

biomasse embryogène d'une autre lignée de carotte n'est pas affectée par la concentration en potassium (Brown et al. 1976). De plus, la seule comparaison quantitative pouvant être effectuée n'informe guère car $Y_c[K]$ en bioréacteur pour B5 (potassium ≈ 25 mM) comptant initialement 20 mM d'ammonium est de $-1,521$ g ms.mmole⁻¹K, ce qui est plus de trois fois supérieur à la valeur de $-0,475$ g ms.mmole⁻¹K mesurée par Kessell et Carr (1972) durant la phase de croissance exponentielle de cellules embryogènes de carotte cultivées en bioréacteur avec milieu MS (potassium ≈ 20 mM) et contrôle d'oxygène dissous à 16%.

Les rendements de croissance par rapport au magnésium (Tableau 5.10) indiquent que pour la culture en bioréacteurs la moyenne des six valeurs est de $-11,38$ g ms.mmole⁻¹Mg (écart-type $\approx 1,42$ g ms.mmole⁻¹Mg) lorsqu'on inclut les deux valeurs de Y_c qui ont des marges d'erreur comprises entre 20 et 25%. Pour la culture en flacons quatre valeurs sont disponibles et leur moyenne est $-13,76$ g ms.mmole⁻¹Mg (écart-type $\approx 1,19$ g ms.mmole⁻¹Mg). Même si la moyenne en flacons agités est $\sim 17\%$ supérieure à celle en bioréacteurs, le faible nombre de valeurs contribuant à la seconde et les fortes marges d'erreur reliées à la première ne permettent pas de juger si cette différence est significative. Néanmoins en considérant les écarts-types on peut tout de même parler d'un rendement de croissance moyen qui, globalement, est constant dans les deux modes de culture et se situe possiblement autour de 12 g ms.mmole⁻¹Mg.

Les constats qui peuvent être formulés concernant les rendements de croissance par rapport au calcium (Tableau 5.11) sont en tous points semblables à ceux faits précédemment pour le magnésium. Six valeurs de $Y_c[Ca]$ sont disponibles pour la culture en bioréacteurs comparativement à quatre pour la culture en flacons et il y a plus de variation dans le premier de ces groupes de valeurs que dans le second. Dans ce contexte, on peut difficilement apprécier la signification réelle d'une moyenne en bioréacteurs ($-10,27$ g ms.mmole⁻¹Ca) qui est $\sim 12\%$ inférieure à celle en flacons ($-11,66$ g ms.mmole⁻¹Ca), mais en tenant compte des écarts-types respectifs ($-2,24$ et $-1,35$ g ms.mmole⁻¹Ca) on peut quand même considérer que le rendement de croissance moyen est constant dans les deux modes de

Tableau 5.10

Rendements de croissance par rapport au cation magnésium (Mg) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$

$[\text{NH}_4]_i$ (mM)	BIOREACTEURS (2-L)		FLACONS (500-mL)	
	Yc (Mg) g ms.mme ⁻¹	Erreur %	Yc (Mg) g ms.mme ⁻¹	Erreur %
0	9,902	11,3	ND	
2	12,841	4,9	15,582	11,9
5	11,589	21,9	13,317	13,2
10	13,582	23,8	ND	
15	10,049	7,6	13,849	5,9
20	10,344	7,8	12,300	15,1
MOYENNE :	11,384		13,762	
ÉCART-TYPE:	1,418		1,189	

Tableau 5.11

Rendements de croissance par rapport au cation calcium (Ca) pour deux modes de culture et six concentrations initiales en ion ammonium $[\text{NH}_4]_i$

$[\text{NH}_4]_i$ (mM)	BIOREACTEURS (2-L)		FLACONS (500-mL)	
	Yc (Ca) g ms.mme ⁻¹	Erreur %	Yc (Ca) g ms.mme ⁻¹	Erreur %
0	9,344	16,6	ND	
2	11,384	4,1	12,237	17,1
5	14,729	20,5	10,676	9,7
10	7,999	23,7	ND	
15	8,859	9,6	10,137	4,4
20	9,295	15,0	13,573	7,8
MOYENNE :	10,269		11,656	
ÉCART-TYPE:	2,239		1,349	

culture et qu'il se situe probablement autour de $11 \text{ g ms.mmole}^{-1}\text{Ca}$.

Le Tableau 5.12 donne un aperçu global des principales tendances relevées dans cette partie relative aux rendements de croissance (Y_c) par rapport à l'absorption de dix macronutriments. Comparant d'abord les deux modes de culture, on constate que les tendances sont souvent semblables dans l'un ou l'autre mode et que si un rendement donné est constant, la valeur moyenne en flacons agités est, au moins quatre fois sur six, plus grande que celle en bioréacteurs. Ainsi, d'après le premier de ces constats, le contrôle subtil de l'agitation et le maintien de l'oxygène dissous à un niveau stable que permet le mode bioréacteur n'impliqueraient pas un bouleversement radical du processus général de croissance de la biomasse par rapport à la culture en flacons agités. Quant au second constat, il suppose certaines différences quantitatives entre les deux modes de culture, ce qui va dans le sens des différences autant quantitatives que qualitatives qui sont discutées dans les sous-sections précédentes. Ces différences apparaissent de façon plus marquée à la partie suivante au regard des rendements de production.

Toujours au Tableau 5.12, si on ne considère par ailleurs que les résultats par rapport aux quatre anions, on remarque pour deux d'entre eux (phosphate et sulfate) que les valeurs de Y_c tendent à diminuer avec les concentrations initiales d'ammonium. Cependant, cette diminution ne couvre tout l'intervalle de concentrations (0 à 20 mM) que pour l'anion sulfate et la culture en flacons agités. Pour ce même anion et la culture en bioréacteurs comme pour le phosphate dans les deux modes de culture, Y_c diminue sur l'intervalle 0 à 10 mM et il est constant entre 10 et 20 mM. On déduit donc de ces résultats que dans l'ensemble (et quelque soit le mode de culture) les concentrations dans le milieu B5 des quatre anions étudiés permettent d'obtenir des rendements de croissance constants lorsque la concentration initiale en ammonium est d'au moins 10 mM.

Du côté des cations autres que l'ammonium, le Tableau 5.12 indique que les rendements de croissance par rapport au magnésium et au calcium sont constants dans les deux modes de culture pour des concentrations initiales

Tableau 5.12
Rendements de croissance (Yc): Résumé des principales tendances observées

<u>MACRONU- TRIMENTS</u>	<u>MODE DE CULTURE</u>	
	<u>BIORÉACTEUR</u>	<u>FLACON AGITÉ</u>
Glucides (Tableau 5.6)	Constant -0,45 g ms.g ⁻¹ CHOt	Constant -0,45 g ms.g ⁻¹ CHOt
<u>ANIONS:</u>		
Nitrate (Tableau 5.7)	Constant -0,46 g ms.mmole ⁻¹ NO ₃	Constant-13% >bioréacteur -0,53 g ms.mmole ⁻¹ NO ₃
Phosphate (Figure 5.21)	Dans les deux modes: diminution entre 2 & 10 mM, puis à peu près constant (-4,5 ± 1,0 g ms.mmole ⁻¹ PO ₄) entre 10 & 20 mM	
Chlorure (Tableau 5.8)	Possiblement constant Résultats insuffisants	Constant -9,19 g ms.mmole ⁻¹ Cl
Sulfate (Figure 5.22)	Diminution prononcée entre 0 & 10 mM, puis constant à -6,00 g ms.mmole ⁻¹ SO ₄	Diminution graduelle 0 & 20 mM
<u>CATIONS:</u>		
Ammonium (Tableau 5.9)	Constant -0,56 g ms.mmole ⁻¹ NH ₄ ∴ la concentration en ammonium ne limiterait pas la croissance de la biomasse dans aucune des cuvées	Constant-22% >bioréacteur -0,72 g ms.mmole ⁻¹ NH ₄
Sodium (Figure 5.23)	Augmentation entre 0 & 15 mM	Faible augmentation entre 2 & 15 mM, puis diminution entre 15 & 20 mM
Potassium (Figure 5.24)	Au moins deux interprétations possibles Résultats ambigus et à approfondir dans les deux modes	Augmentation entre 2 & 5 mM et peut être même entre 2 & 20 mM
Magnésium (Tableau 5.10)	Constant -11,38 g ms.mmole ⁻¹ Mg	Constant-17% >bioréacteur -13,76 g ms.mmole ⁻¹ Mg
Calcium (Tableau 5.11)	Constant -10,27 g ms.mmole ⁻¹ Ca	Constant-12% >bioréacteur -11,66 g ms.mmole ⁻¹ Ca

NOTE: Les valeurs exprimées en mM correspondent à des concentrations initiales en ammonium.

en ammonium comprises entre 0 et 20 mM. Bien que les résultats relatifs au sodium et au potassium apparaissent insuffisants, ils ne contredisent toutefois pas le fait qu'une concentration initiale en ammonium autour de 15 mM pourrait permettre d'obtenir de meilleurs rendements de croissance pour ces deux cations. Sous toutes réserves, les résultats permettent d'inférer que, quelque soit le mode de culture, les concentrations de ces quatre cations dans le milieu B5 régulier se traduisent par de meilleurs rendements de croissance de la biomasse lorsque la concentration initiale en ammonium est d'environ 15 mM.

Par ailleurs, le fait que la concentration du cation ammonium est variable alors que le rendement de croissance par rapport à celui-ci reste constant dans les deux modes de culture (Tableaux 5.9 & 5.12) peut être interprété comme un indice que l'ammonium n'est pas un macronutriment limitant la croissance de la biomasse dans aucune des cuvées étudiées. Cependant cela ne signifie pas que l'ammonium n'a pas un effet déterminant sur la composition de la biomasse, un des aspects importants discutés à la partie suivante.

S'il est utile d'évaluer les rendements de croissance des cultures embryogènes pour tenter de mieux comprendre leurs besoins nutritionnels, il apparaît toutefois que la comparaison des valeurs de Y_c pour un nutriment donné et par rapport à l'accroissement de la concentration initiale en ammonium entre 0 et 20 mM ne permet pas de déterminer irréfutablement si le nutriment limite ou non la croissance globale de la biomasse. Cela est particulièrement évident dans le cas des glucides. En effet, alors que les résultats bruts indiquent que la croissance de la biomasse de toutes les cuvées cesse après la disparition des glucides de la suspension (Figure 5.14 & Figures de la Section I.9 de l'Annexe), ce qui suppose que ceux-ci la limitent au moins en partie, $Y_c[\text{CH}_2\text{O}]$ est constant d'une cuvée à l'autre comme pour les rendements de croissance par rapports au nitrate ou au calcium par exemple, des macronutriments qui ne sont sûrement pas limitants. Ceci dit, les résultats de rendements de croissance renferment sûrement des informations qui sont omises dans la présente analyse mais qui seront peut être mieux perçues par l'étude des rendements de production.

5.2.3.2 Rendements de production d'embryons somatiques

Cette partie traite des rendements de production (Y_p) par rapport à l'absorption en fonction du temps des dix macronutriments principaux du milieu B5. Pour chaque macronutriment et pour chaque mode de culture, on représente graphiquement les valeurs de Y_p calculées en fonction de la concentration initiale en cation ammonium des cuvées. Les vingt graphiques ainsi obtenues sont regroupés en dix paires, soit une paire pour chaque macronutriment. Puisqu'en comparant les deux graphiques de chaque paire aucun des dix rendements de production n'apparaît constant dans les deux modes de culture à la fois, la discussion porte donc sur dix figures (5.25 à 5.34) comptant chacune une paire de graphiques. Enfin lorsque pour un graphique donné il semble pertinent de tracer une droite de régression, celle-ci est en trait plein si toutes les valeurs du rendement en cause sont considérées et elle est en trait pointillé si une ou plusieurs valeurs sont exclues du calcul de régression linéaire.

La Figure 5.25 présente les rendements de production (Y_p) par rapport aux glucides totaux (CHOt). Deux interprétations semblent possibles concernant les résultats de la culture en bioréacteurs (Figure 5.25-A). Si l'on fait exception de la valeur de Y_p pour une concentration initiale d'ammonium de 5 mM, on a un accroissement continu dont la pente de la droite de régression sur les cinq valeurs retenues est de $-439 \text{ Es.g}^{-1}\text{CHO} \cdot (\text{mM}_{\text{INITIALE}}\text{NH}_4)^{-1}$ ($r^2=0,986$). Par contre, en tenant compte des six valeurs de Y_p on constate une augmentation très marquée entre 0 et 5 mM suivit d'une réduction ou d'un plafonnement entre 5 et 20 mM. À la lumière des résultats pour la culture en flacons agités (Figure 5.25-B), où le nombre de torpilles par gramme de glucides s'accroît avec la concentration initiale d'ammonium à un taux constant ($r^2=0,916$) d'environ 245 ($\text{Es.g}^{-1}\text{CHO} \cdot (\text{mM}_{\text{INITIALE}}\text{NH}_4)^{-1}$), la première interprétation apparaît comme la plus plausible. Dans ce contexte l'ensemble des résultats de la Figure 5.25 indique que la culture en bioréacteurs permet d'obtenir des rendements de production par rapport aux glucides qui sont constamment supérieurs à ceux en flacons agités. Compte tenu de certaines explications proposées aux sous-sections précédentes voulant que la différenciation cellulaire serait avantageée en bioréacteurs par le contrôle de conditions particulières de culture, le présent constat

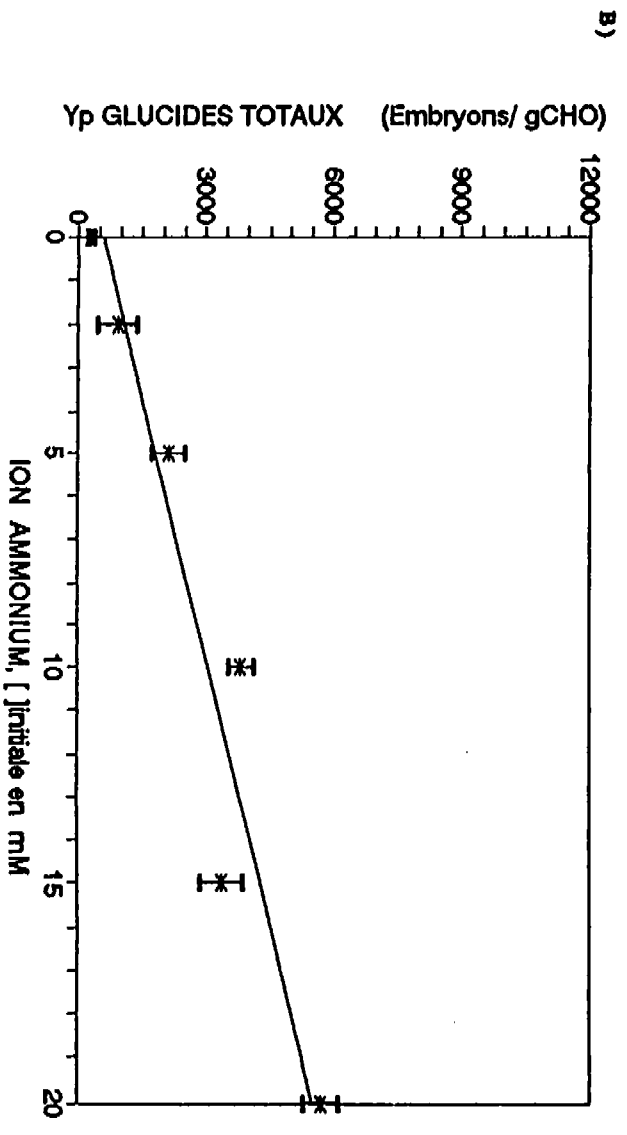
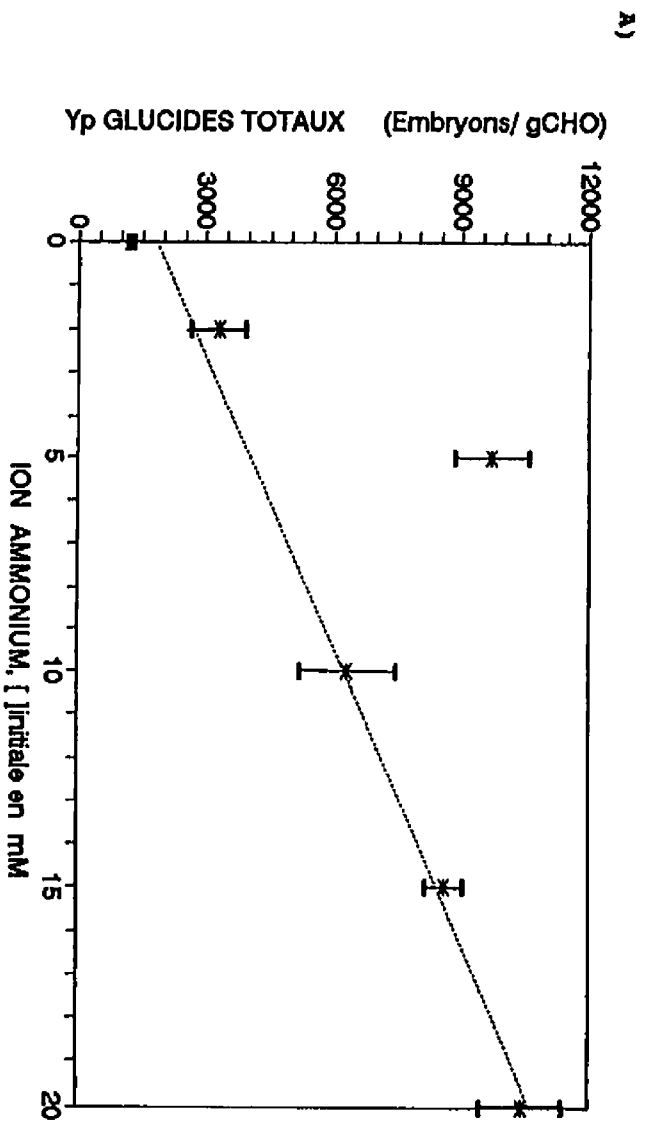


Figure 5.25
Rendements de production (Yp) par rapport aux glucides totaux (CHOt) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$:

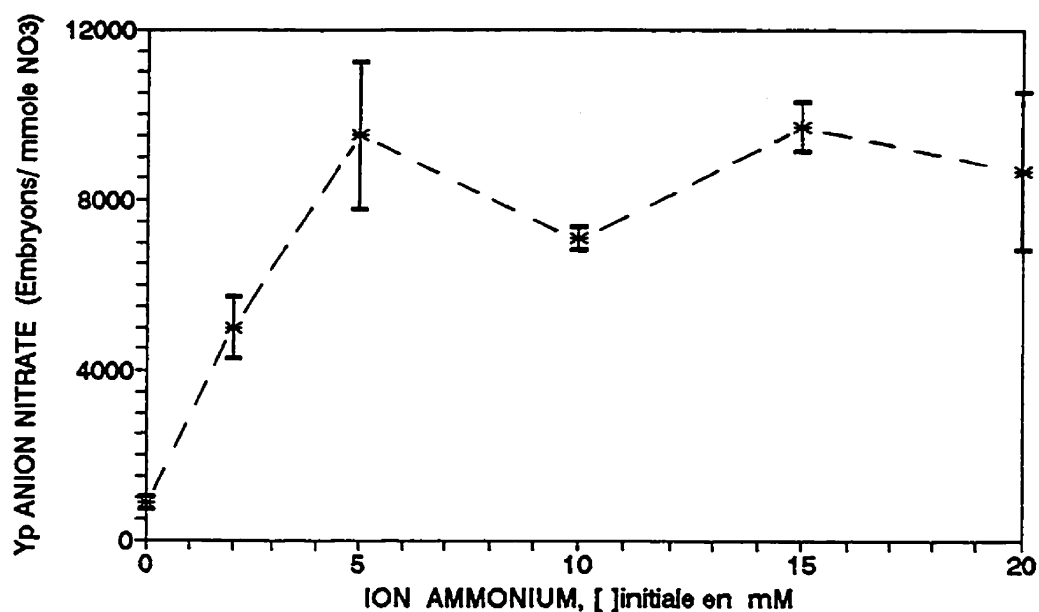
A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

suggère que cet avantage a nécessairement un lien avec des conditions qui favoriseraient un métabolisme différent pour les glucides. Ce métabolisme étant aérobie le maintien de l'oxygène dissous à un niveau constant de 20% est vraisemblablement en cause. Il est aussi possible que les effets d'un faible $k_L a$ (~20 fois moindre dans un bioréacteur 2-L agité à 60 RPM par rapport à un flacon agité à ~120 RPM) sur la concentration en gaz carbonique puisse y être pour quelque chose si, par exemple, la fixation non-photosynthétique de ce gaz est un facteur important (Payne et al. 1990).

À la Figure 5.26, les rendements de production par rapport au nitrate pour les cuvées en bioréacteurs sont toujours plus grands que pour celles en flacons agités. De plus, les valeurs de $Y_p[NO_3]$ en bioréacteurs (Figure 5.26-A) passent abruptement de ~900 à ~9500 Es.mmoles⁻¹NO₃ sur l'intervalle de concentration initiale en ammonium entre 0 et 5 mM, pour ensuite se maintenir autour de 9000 Es.mmoles⁻¹NO₃ entre 5 et 20 mM. On distingue un profil analogue pour les valeurs de $Y_p[NO_3]$ en flacons (Figure 5.26-B), sauf que l'accroissement est moins abrupte (~350 à ~5000 Es.mmoles⁻¹NO₃ sur un intervalle deux fois plus long: 0 à 10 mM) et que le plafonnement se situe entre 5000 et 6000 Es.mmoles⁻¹NO₃ pour les concentrations en ammonium entre 10 et 20 mM. En somme, le nombre maximum d'embryons par millimole de nitrate obtenus dans du milieu B5 (25 mM initial de cet anion) est d'environ 9500 en bioréacteurs et 6000 en flacons agités. Le plafonnement de certains types de rendements de production et la supériorité presque généralisée des valeurs obtenues en bioréacteurs sont discutés à la fin de cette partie. Pour le moment il est intéressant de constater que les valeurs maximales de $Y_p[NO_3]$ en bioréacteurs sont obtenues dans des milieux contenant initialement 5 mM et plus d'ammonium, alors que celles en flacons agités le sont seulement dans des milieux à 10 mM et plus. Ceci signifie que l'atteinte des meilleurs rendements de production par rapport à l'anion nitrate serait plus dépendante des conditions de culture qui sont contrôlées en bioréacteurs (concentration en oxygène dissous et homogénéité de la suspension) mais qui ne le sont pas en flacons agités, qu'elle ne le serait de la concentration initiale en ion ammonium.

A)



B)

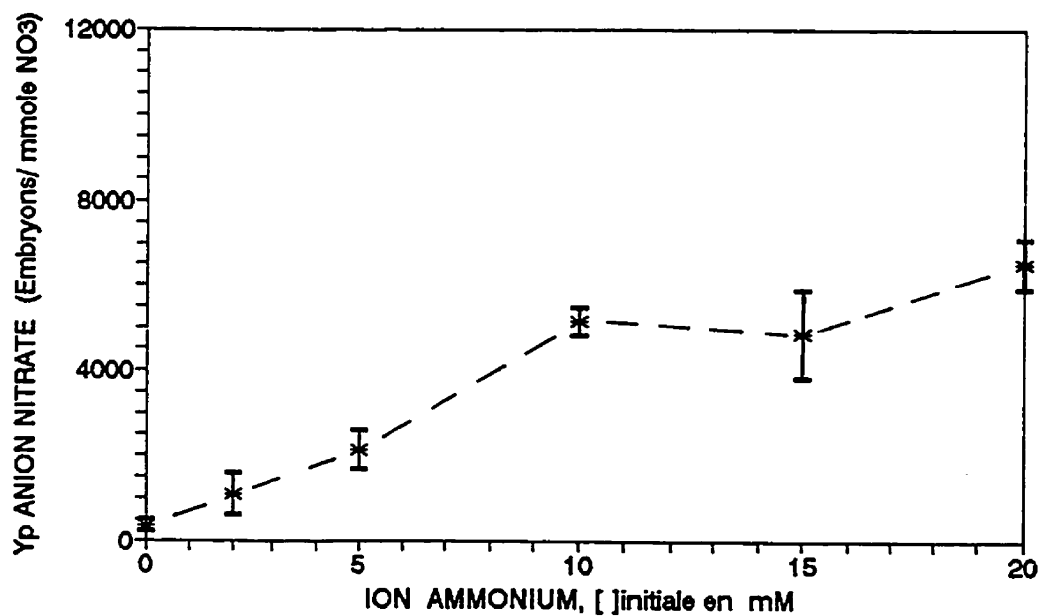


Figure 5.26

Rendements de production (Yp) par rapport à l'anion nitrate (NO₃) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium [NH₄]_i:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

De toute évidence les résultats de la Figure 5.27 doivent être analysés de la même manière que ceux de la figure précédente, et les conclusions qui en découlent sont semblables. Ainsi, en bioréacteurs (Figure 5.27-A) les rendements de production par rapport à l'anion phosphate passent de ~ 16000 à ~ 93000 Es.m μ ole $^{-1}$ PO $_4$ entre 0 et 5 mM de concentration initiale en ammonium puis, si on excepte la valeur possiblement trop faible à 15 mM, ils se maintiennent à un niveau maximal autour de 90000 Es.m μ ole $^{-1}$ PO $_4$ entre 5 et 20 mM. Quant aux valeurs moyennes de rendement des cuvées en flacons (Figure 5.27-B) elles passent de ~ 7000 à ~ 36000 Es.m μ ole $^{-1}$ PO $_4$ sur l'intervalle de concentrations initiales en ammonium de 0 et 10 mM puis, en excluant aussi la valeur trop faible à 15 mM, elles semblent plafonner autour de 37000 Es.m μ ole $^{-1}$ PO $_4$. On a donc un écart de ~ 90000 Es.m μ ole $^{-1}$ PO $_4$ entre cette valeur moyenne maximale de Y $_p$ en flacons agités et celle en bioréacteurs. Comme pour le nitrate, les raisons probables d'un tel écart sont discutées globalement à la fin de cette partie. Par ailleurs, on constate à nouveau que les valeurs maximales de Y $_p$ [PO $_4$] en bioréacteurs sont obtenues dans des milieux contenant initialement 5 mM et plus d'ammonium, alors que celles en flacons agités (bien qu'elles ne soient pas très élevées) le sont dans des milieux de 10 mM et plus en ammonium. À cet égard, l'interprétation la plus plausible est la même que précédemment, soit que l'atteinte des meilleurs rendements de production par rapport à l'anion phosphate serait plutôt dépendante des conditions de culture qui sont contrôlées en bioréacteurs, mais qui ne le sont pas en flacons agités, qu'elle ne le serait de la concentration initiale en ammonium.

La Figure 5.28 montre que dans les deux modes de culture les rendements de production par rapport à l'anion chlorure augmentent avec l'accroissement de la concentration initiale en ammonium. Compte tenu que pour une concentration initiale donnée d'ammonium la valeur de Y $_p$ [Cl] obtenue en bioréacteur est toujours de deux à trois fois supérieure à celle obtenue en flacons, les pentes des deux droites de régression sont respectivement de ~ 14162 Es.m μ ole $^{-1}$ Cl.(mM $_{INITIALE}$ NH $_4$) $^{-1}$ ($r^2=0,876$) en bioréacteurs (Figure 5.28-A) et de ~ 11871 Es.m μ ole $^{-1}$ Cl.(mM $_{INITIALE}$ NH $_4$) $^{-1}$ ($r^2=0,927$) en flacons agités (Figure 5.28-B). Selon cette tendance commune aux deux modes de culture,

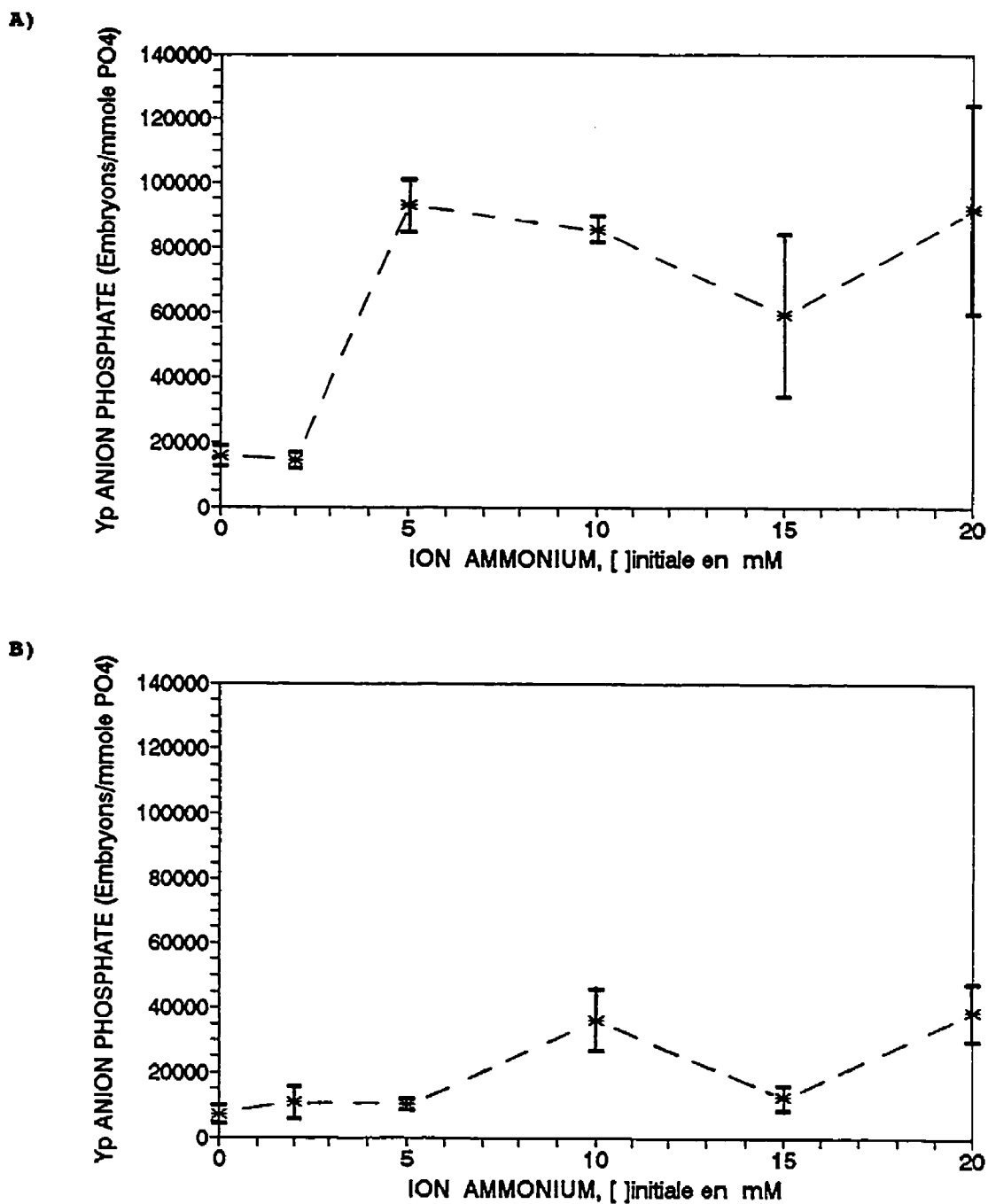


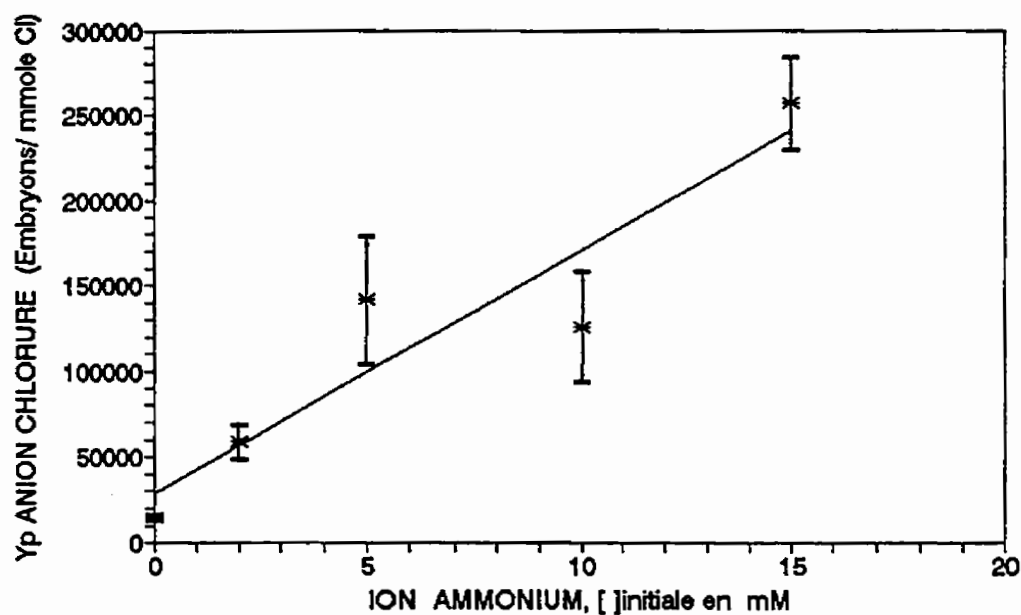
Figure 5.27

Rendements de production (Y_p) par rapport à l'anion phosphate (PO_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

A)



B)

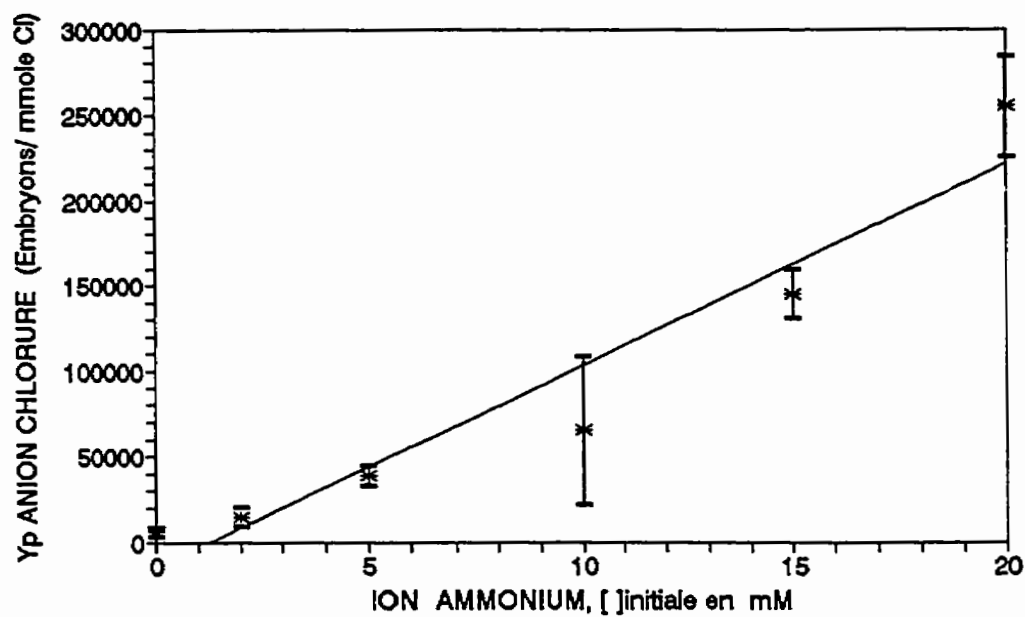


Figure 5.28

Rendements de production (Yp) par rapport à l'anion chlorure (Cl) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$:

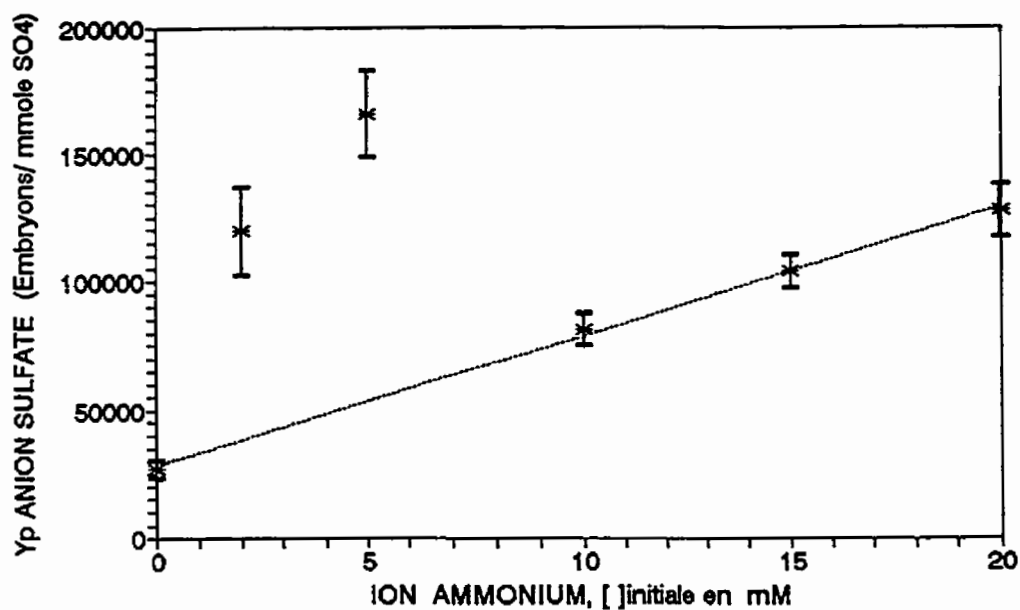
A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

on peut donc supposer que la concentration en anion chlorure du milieu B5 suffit à soutenir la production accrue d'embryons somatiques qu'implique une augmentation de la concentration initiale en cation ammonium. Quant aux différences entre les deux modes de culture, elles sont discutées globalement à la fin de cette partie.

L'analyse des résultats de rendements de production par rapport à l'anion sulfate (Figure 5.29) indique une augmentation rapide entre 0 et 5 mM d'ammonium suivie d'une diminution ou même d'un plafonnement pour les cuvées en bioréacteurs (Figure 5.29-A). Cependant étant donné que chacune des valeurs de la Figure 5.29-A ne concerne qu'une seule cuvée en bioréacteur, que la valeur en flacons pour la concentration initiale en ammonium de 2 mM (Figure 5.29-B) est une moyenne de sept résultats expérimentaux (conséquemment plus juste que la valeur correspondante en bioréacteur) et que les valeurs de $Y_p[SO_4]$ des cuvées en flacons (Figure 5.29-B) augmentent continuellement avec l'accroissement de la variable indépendante, il apparaît plus cohérent de chercher une tendance similaire pour les cuvées en bioréacteurs. Dans cette optique (et faisant exception des rendements de production pour les concentrations initiales en ammonium de 2 et 5 mM) on a la droite de régression de la Figure 5.29-A dont la pente est de $-5034 \text{ Es.m mole}^{-1} SO_4. (mM_{INITIALE} NH_4)^{-1}$ ($r^2=0,998$). Comparativement, la pente de la droite de régression de la Figure 5.29-B est de $-3289 \text{ Es.m mole}^{-1} SO_4. (mM_{INITIALE} NH_4)^{-1}$ ($r^2=0,960$) en excluant la valeur à 15 mM qui est vraisemblablement surévaluée. S'il est justifié d'établir une même tendance pour les deux modes de culture, on retient de cette analyse que les valeurs de $Y_p[SO_4]$ en bioréacteurs sont toujours plus grandes que celles en flacons et que le taux d'accroissement de ces valeurs en fonction de la concentration initiale en ammonium est environ 35% supérieur en bioréacteurs. Ces deux constats étant forcément reliés aux différences dans les conditions de culture des deux modes, ils sont discutés globalement à la fin de cette partie. Par contre, tout comme précédemment pour l'anion chlorure, on peut conclure que la concentration en anion sulfate du milieu B5 suffit dans les deux modes de culture à soutenir la production accrue d'embryons somatiques qu'implique une augmentation de la concentration initiale en cation ammonium.

A)



B)

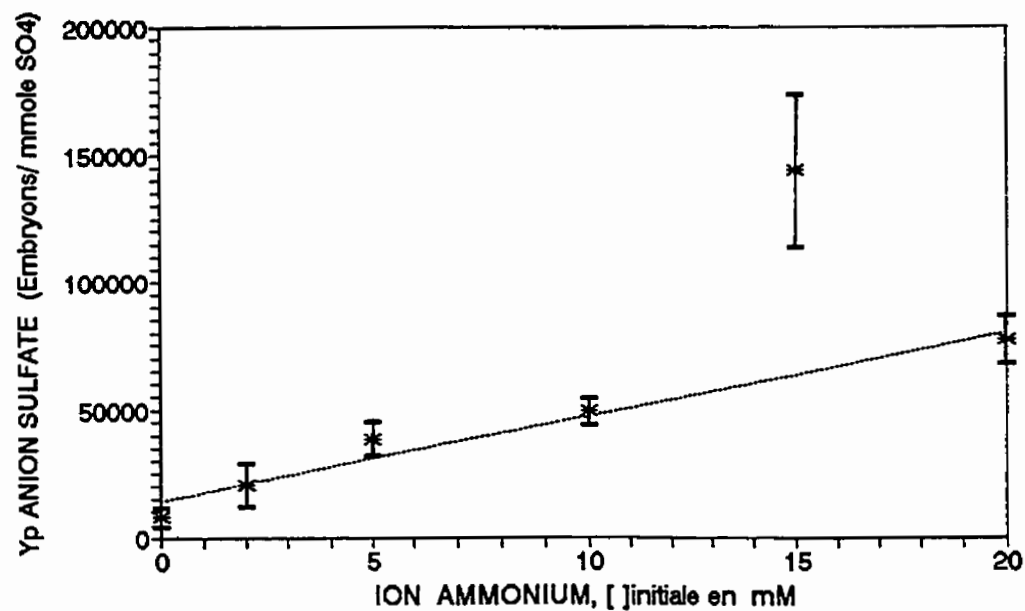


Figure 5.29

Rendements de production (Yp) par rapport à l'anion sulfate (SO₄) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium [NH₄]_i:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

La Figure 5.30 indique qu'en bioréacteurs comme en flacons agités les rendements de production d'embryons torpilles par rapport à l'absorption du cation ammonium augmentent avec l'accroissement de sa concentration initiale sur l'intervalle 2 à 15 mM, et que dans les deux cas il y a possiblement diminution de $Y_p[NH_4]$ entre 15 et 20 mM. Ainsi, le rendement maximal de production est atteint pour une concentration initiale de 15 mM d'ammonium et il correspond à $\sim 17400 \text{ Es.mmmole}^{-1}NH_4$ en bioréacteurs et à $\sim 10450 \text{ Es.mmmole}^{-1}NH_4$ en flacons. De plus, sur l'intervalle 2 à 15 mM, toutes les valeurs de rendements en bioréacteurs sont égales ou plus grandes aux valeurs obtenues en flacons alors que la pente de la droite de régression de la Figure 5.30-A est plus du double de celle de la Figure 5.30-B (~ 1049 versus $\sim 506 \text{ Es.mmmole}^{-1}NH_4 \cdot (mM_{INITIALE}NH_4)^{-1}$ avec des coefficients r^2 de 0,962 et 0,861 respectivement). La supériorité encore une fois évidente de la culture en bioréacteurs sur celle en flacons est discutée à la fin de cette partie. Enfin, d'après les résultats de la Figure 5.30, la concentration initiale d'ammonium qui est optimale pour la production d'embryons somatiques en milieu B5 et avec la lignée de carotte SP1b se situe très certainement autour de 15 mM dans les deux modes de culture.

Les valeurs de rendements de production par rapport au cation sodium des graphiques de la Figure 5.31 s'accroissent avec l'augmentation de la concentration initiale en ammonium dans les deux modes de culture. Pour le mode bioréacteurs (Figure 5.31-A), en excluant la valeur à 5 mM à cause de sa trop grande marge d'erreur ($\pm 84\%$) mais en conservant tout de même celle à 20 mM (erreur = $\pm 33\%$), on obtient par régression linéaire une corrélation ($r^2=0,986$) dont la pente de la droite est d'environ $21952 \text{ Es.mmmole}^{-1}Na \cdot (mM_{INITIALE}NH_4)^{-1}$. Pour le mode flacons agités (Figure 5.31-B), seulement quatre valeurs sont disponibles et le calcul de la droite de régression donne une pente d'environ $12950 \text{ Es.mmmole}^{-1}Na \cdot (mM_{INITIALE}NH_4)^{-1}$ ($r^2=0,998$). On en déduit que la concentration en sodium du milieu B5 régulier permet, à l'intérieur des conditions propres à chaque mode de culture, de soutenir la production accrue d'embryons qu'implique une augmentation de la concentration initiale en ammonium de 0 et 20 mM.

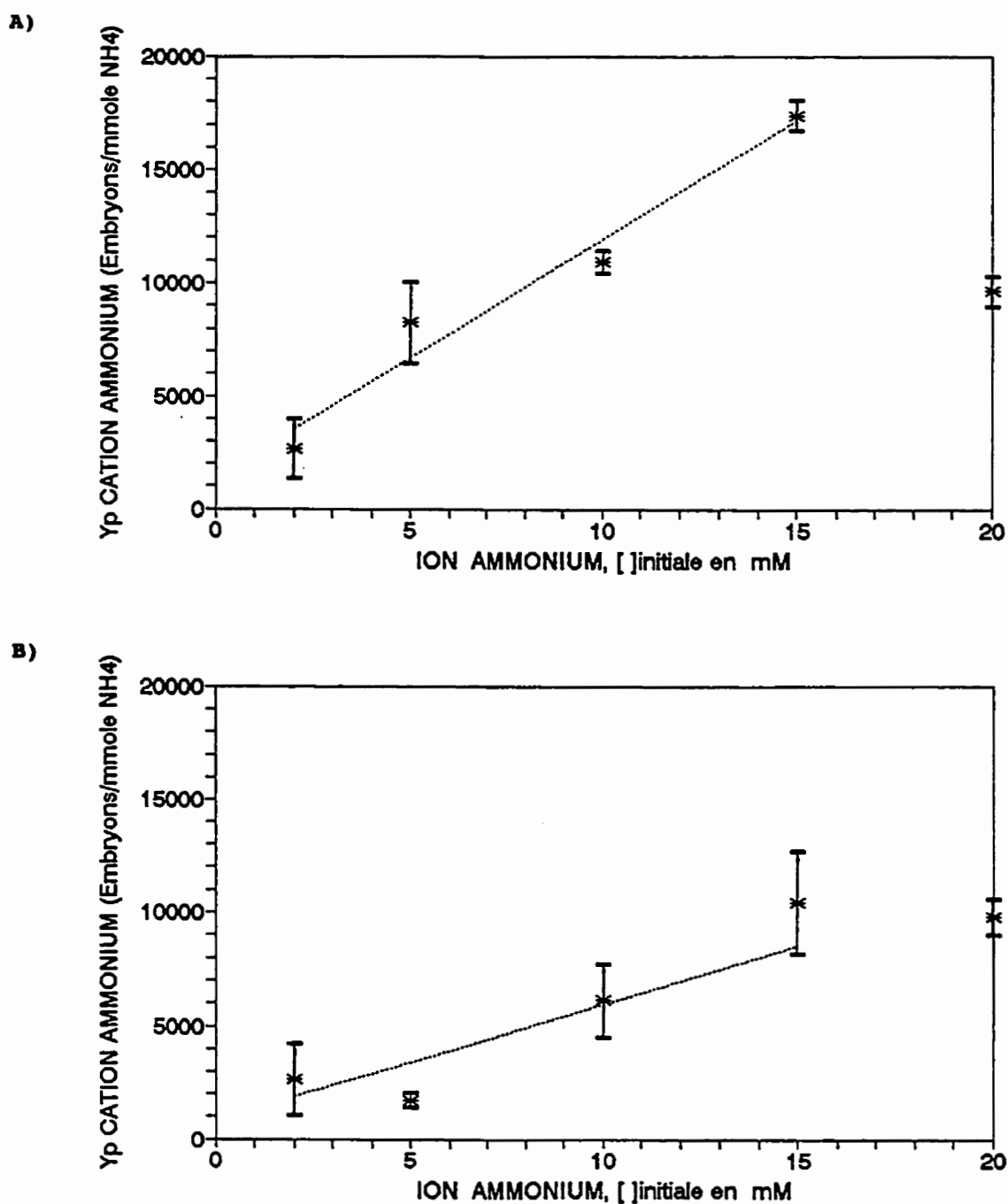
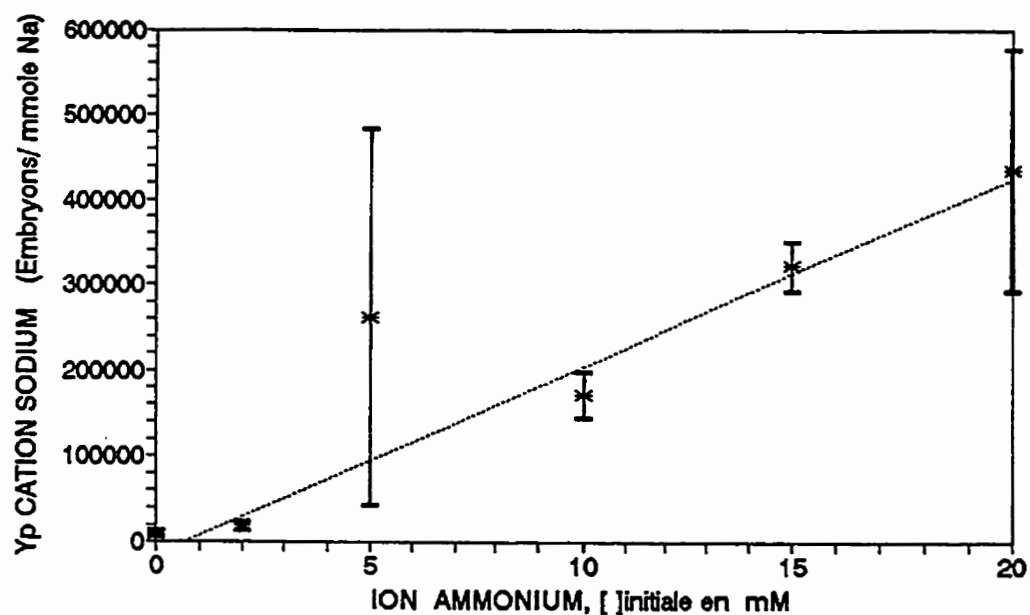


Figure 5.30
 Rendements de production (Y_p) par rapport au cation ammonium (NH_4) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$:
 A) Bioréacteurs B) Flacons agités

A)



B)

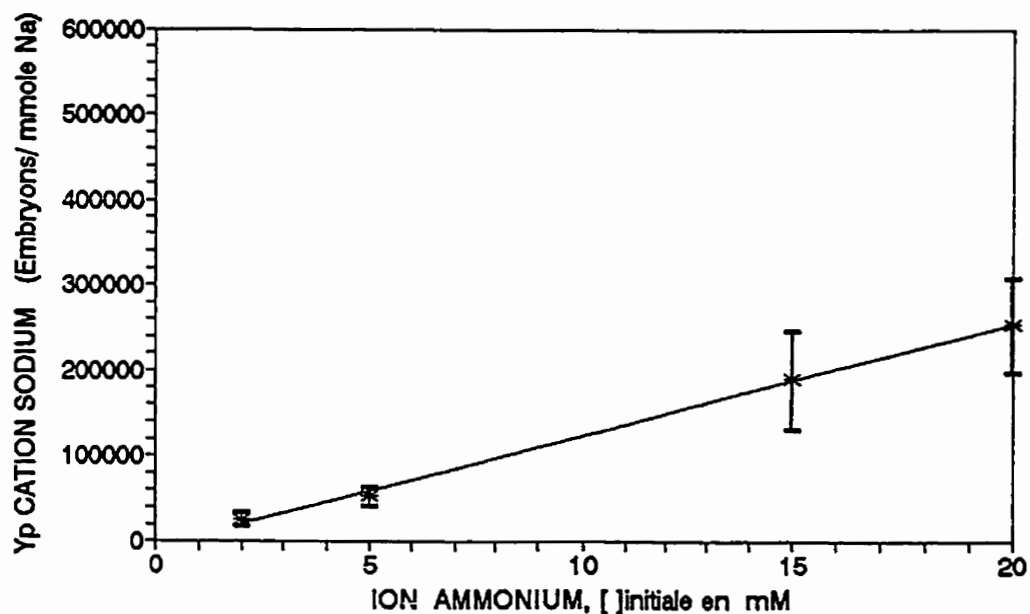


Figure 5.31

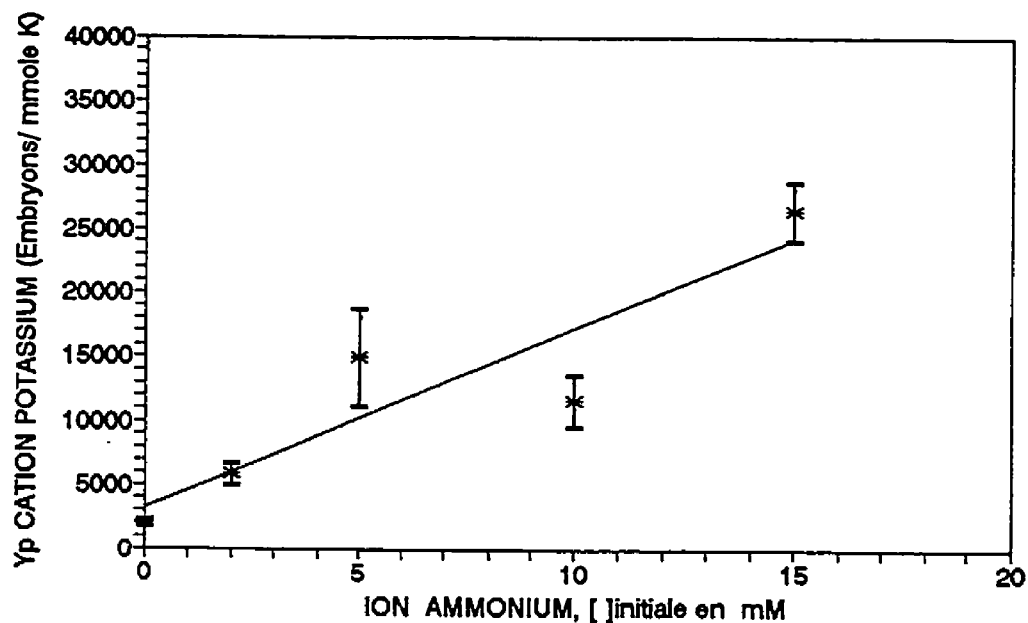
Rendements de production (Y_p) par rapport au cation sodium (Na) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[NH_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

Les valeurs de rendements de production par rapport à l'absorption du potassium (Figure 5.32) indiquent que, dans chaque cuvée et dans chaque mode de culture, la quantité de K^+ suffit à soutenir l'accroissement de production résultant de l'augmentation de la concentration en ammonium. On note aussi que les rendements des cuvées en bioréacteurs sont quelque peu supérieurs à ceux des cuvées en flacons pour une même concentration initiale en ammonium, bien que la pente de la droite de régression de la Figure 5.32-A ($\sim 1400 \text{ Es.m mole}^{-1} K. (\text{mM}_{\text{INITIALE}} \text{NH}_4)^{-1}$ avec $r^2=0,829$) est légèrement moindre que celle de la Figure 5.32-B ($\sim 1758 \text{ Es.m mole}^{-1} K. (\text{mM}_{\text{INITIALE}} \text{NH}_4)^{-1}$ avec $r^2=0,942$). Considérant que chacune des valeurs de $Y_p[K]$ repose sur peu de données expérimentales et qu'il n'y a pas de valeur pour la cuvée en bioréacteur débutée avec 20 mM d'ammonium, ces différences ne peuvent pas être concluantes. Par ailleurs on explique au chapitre précédent (sous-section 4.2.1 et Tableau 4.2) que, de tous les macronutriments du milieu B5, le potassium est le seul dont la concentration initiale est affectée par les modifications requises pour faire varier la concentration initiale en ammonium. Ainsi, la concentration initiale du potassium est de ~ 27 mM quand celle en ammonium est à 0 mM, elle est à ~ 25 mM lorsque celle en ammonium est de 2 mM (B5 régulier), mais elle est réduite à environ 22, 17, 12 et 7 mM quand celle de l'ammonium est ajustée à 5, 10, 15 et 20 mM respectivement. Dans ce contexte, même si les résultats de la Figure 5.32 confirment que le potassium n'est limitant dans aucune cuvée (et donc que l'hypothèse de la sous-section 4.2.1 est valable au moins partiellement), il demeure néanmoins possible, tenant compte des conclusions de Brown et ses collègues (1976), que la production d'embryons et conséquemment les rendements de production par rapport au potassium auraient été plus élevés dans les cuvées contenant initialement plus de 5 mM d'ammonium, si la concentration en K^+ avait été maintenue constante d'une cuvée à l'autre.

A)



B)

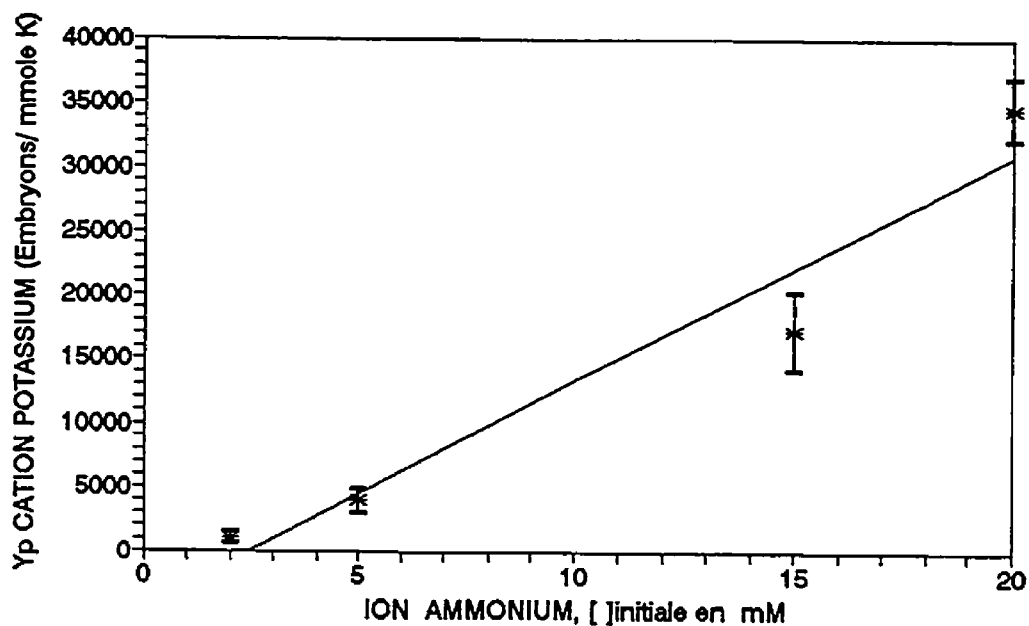


Figure 5.32

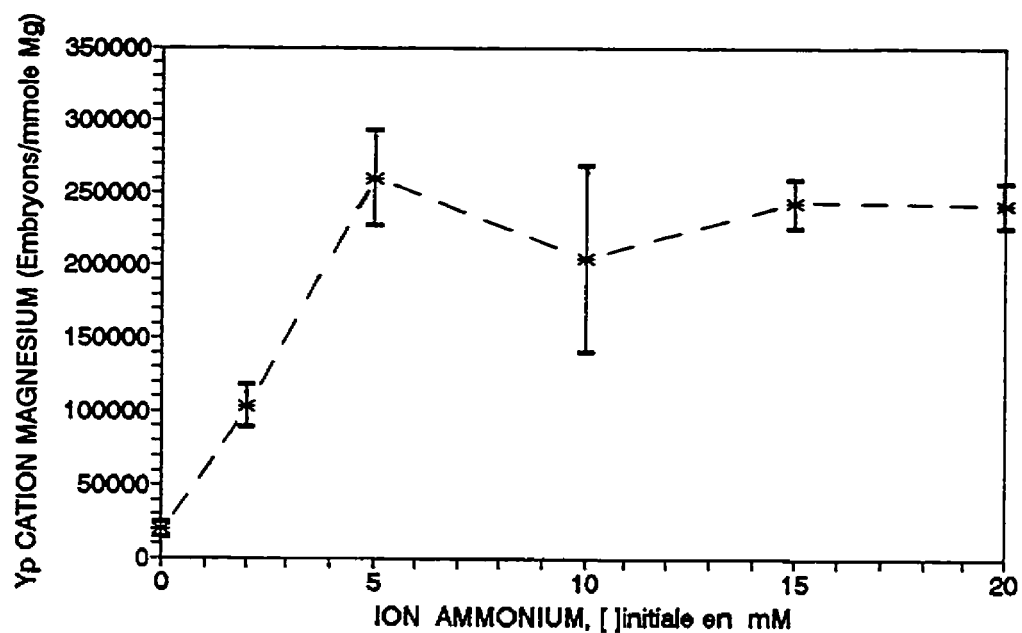
Rendements de production (Yp) par rapport au cation potassium (K) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

Comparativement à toutes les valeurs de rendements de production évaluées, celles par rapport au cation magnésium (Figure 5.33) sont les seules où les résultats en bioréacteurs ne sont pas tous égaux ou supérieurs à ceux en flacons. En effet, alors que les valeurs en bioréacteurs sont plus grandes que celles en flacons pour des concentrations initiales d'ammonium de 2 et 5 mM, elles le sont inférieures pour 15 et 20 mM. Par ailleurs, le profil des rendements en bioréacteurs (Figure 5.33-A) s'apparente à ceux des anions nitrate (Figure 5.26) et phosphate (Figure 5.27) puisque la valeur de $Y_p[Mg]$ en fonction de la concentration initiale en ammonium passe d'un minimum à un maximum de $-260000 \text{ Es.m mole}^{-1} \text{ Mg. (mM}_{\text{INITIALE}} \text{NH}_4)^{-1}$ sur l'intervalle 0 à 5 mM et qu'elle plafonne ensuite autour de ce maximum pour 5 à 20 mM. L'absorption du magnésium n'ayant pas été mesurée pour les cuvées en flacons comptant initialement 10 mM d'ammonium (Figure 5.33-B), il n'est pas possible de déterminer si les valeurs de $Y_p[Mg]$ pour ce mode de culture suivent aussi un tel profil. Toutefois, en se référant aux plafonnements constatés avec le nitrate et le phosphate (Figures 5.26 & 5.27), on peut supposer qu'il y aurait accroissement entre 0 et 10 mM d'ammonium et qu'il y aurait plafonnement autour de $302000 \text{ Es.m mole}^{-1} \text{ Mg. (mM}_{\text{INITIALE}} \text{NH}_4)^{-1}$ sur l'intervalle 10 à 20 mM. Quoiqu'il en soit, on constate quand même qu'un milieu B5 contenant au moins 5 mM d'ammonium permet d'obtenir un rendement maximal par rapport au magnésium en bioréacteur alors que ce n'est pas le cas en flacons. En conséquence, ici aussi l'atteinte des meilleurs rendements de production serait plus dépendante de certaines conditions de culture qui sont contrôlées en bioréacteurs mais qui ne le sont pas en flacons que de la concentration initiale en ammonium.

A)



B)

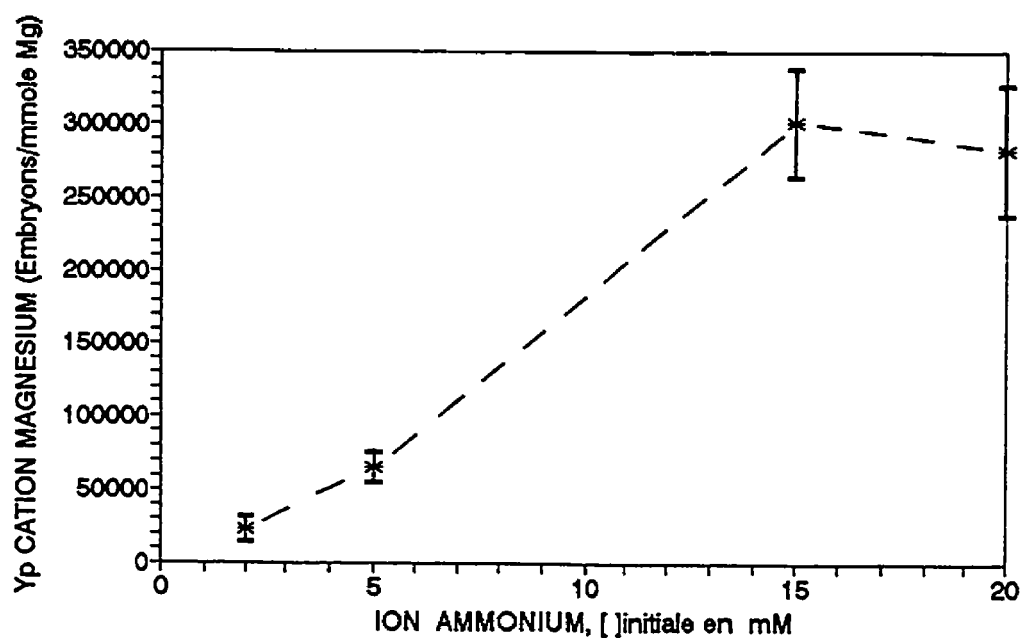


Figure 5.33

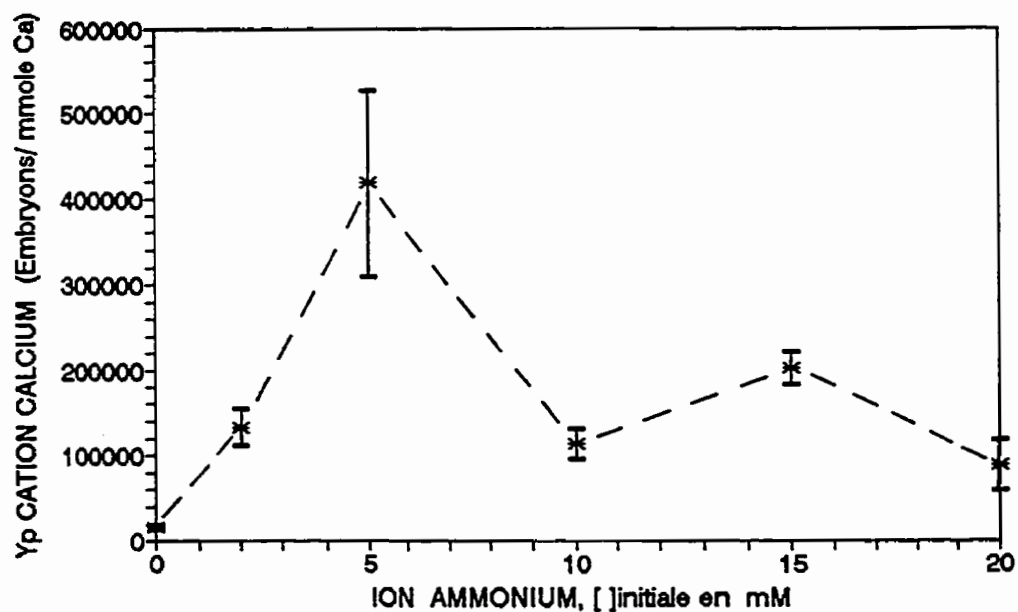
Rendements de production (Yp) par rapport au cation magnésium (Mg) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

Des résultats de rendements de production par rapport au cation calcium pour les cuvées en bioréacteurs (Figure 5.34-A), deux possibilités principales sont concevables. Ou bien on considère que les valeurs de $Y_p[Ca]$ augmentent entre 0 et 5 mM d'ammonium, diminuent entre 5 et 10 mM, puis demeurent à peu près constantes entre 10 et 20 mM, ou bien on exclut la valeur de $Y_p[Ca]$ à 5 mM d'ammonium et on estime qu'il y a augmentation entre 0 et 2 mM puis que les rendements de production à 2, 10, 15 et 20 mM plafonnent autour d'une constante dont la moyenne serait d'environ 134300 Es.m mole⁻¹Ca. À la différence d'une situation un peu comparable rencontrée avec les résultats pour $Y_p[SO_4]$ (Figure 5.29), ici la tendance observée pour les cuvées en flacons (Figure 5.34-B) aide peu à choisir parmi ces deux possibilités car elle ne correspond à aucune d'elles. Cependant étant donné que chacune des valeurs de la Figure 5.34-A ne concerne qu'une seule cuvée, que la valeur en flacons pour la concentration initiale en ammonium de 5 mM (Figure 5.34-B) est une moyenne de deux résultats expérimentaux (donc probablement plus juste que la valeur correspondante en bioréacteur) et comme les valeurs de $Y_p[Ca]$ en flacons augmentent graduellement avec l'accroissement de la variable indépendante, il apparaît plus plausible d'interpréter les résultats des cuvées en bioréacteurs (Figure 5.34-A) comme plafonnant entre 2 et 20 mM, quitte à ce qu'il puisse en fait y avoir un certain accroissement sur cet intervalle. S'il y a un plafonnement c'est qu'il y a une forme de limitation nutritionnelle dans les cuvées en bioréacteurs sur cet intervalle et si, comme en flacons, il y a un accroissement on peut supposer que la concentration en cation calcium du milieu B5 suffit dans les deux modes de culture à soutenir la production accrue d'embryons qu'implique l'augmentation de la concentration initiale en cation ammonium. Enfin, on retient aussi de cette analyse que les valeurs de $Y_p[Ca]$ en bioréacteurs sont plus grandes que celles en flacons sauf pour une concentration initiale en ammonium de 20 mM (Figure 5.34).

A)



B)

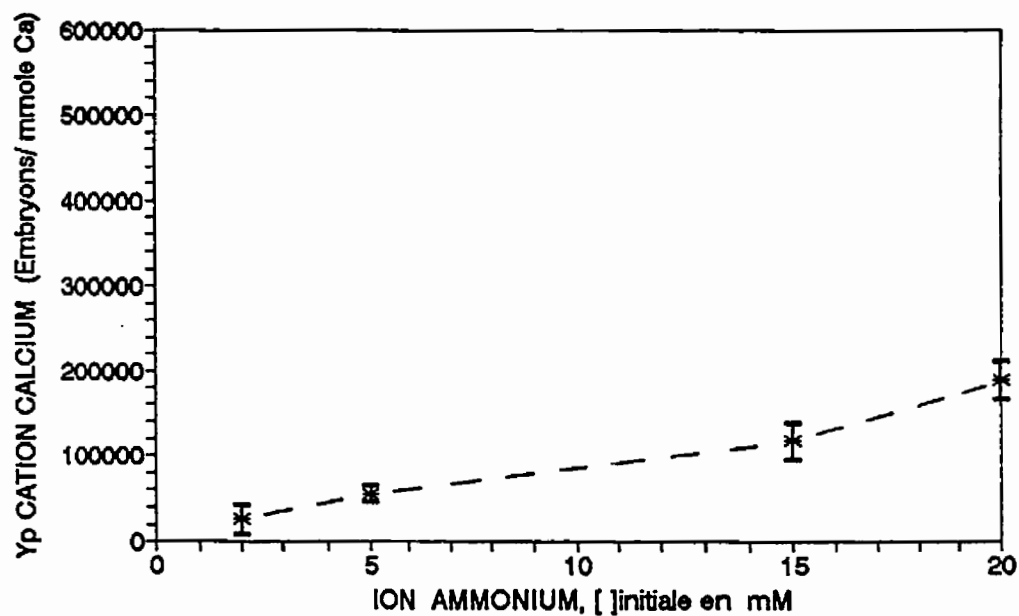


Figure 5.34

Rendements de production (Y_p) par rapport au cation calcium (Ca) pour différentes concentrations initiales en cation ammonium $[\text{NH}_4]_i$:

A) Bioréacteurs

B) Flacons agités

Avant de terminer cette dernière partie du Chapitre 5, il importe d'en faire une synthèse et, au besoin, de contraster les principales tendances observées parmi les résultats de rendements de production afin d'en discuter plus globalement. Pour ce faire, ces tendances sont résumées schématiquement au Tableau 5.13 pour les cultures en bioréacteurs et au Tableau 5.14 pour les cuvées en flacons agités. Dans ces tableaux, les symboles ↑, ↓ ou -cst signifient respectivement que les valeurs de Y_p pour l'intervalle en cause peuvent être considérées comme augmentant, diminuant ou demeurant constantes. Une combinaison de deux de ces trois symboles est parfois utilisée afin de désigner des résultats menant à une ambiguïté qui a été discutée préalablement. La colonne de droite des Tableaux 5.13 et 5.14 indique si les valeurs de Y_p tendent ou non à plafonner pour le nutriment et le mode de culture en question.

Retournant systématiquement à chaque graphique de chacune des dix figures précédentes, on remarque d'abord dans les quatorze cas sur dix-huit où il a été possible de déterminer une valeur de Y_p pour les cuvées ne contenant pas d'ammonium initialement ($[\text{NH}_4]_i = 0 \text{ mM}$) que cette valeur correspond toujours au point minimum du graphique. On note donc que quelque soit le mode de culture, l'absence initiale d'ammonium dans le milieu constitue une limitation nutritionnelle à la production d'embryons somatiques sans toutefois la rendre complètement impossible. Par ailleurs, d'après les mesures de $Y_p[\text{NH}_4]$ dans les deux modes de culture (Figure 5.30), une concentration initiale en ammonium de 15 mM serait près d'un optimum pour l'utilisation du milieu B5 dans la culture de SP1b.

Les Tableaux 5.13 et 5.14 indiquent que les valeurs de Y_p par rapport au nitrate, au phosphate et au magnésium plafonnent dans les deux modes de culture. Les points d'interrogation (?) du Tableau 5.13 indiquent qu'il y a peut être aussi des plafonnements par rapport au sulfate et au calcium mais qu'il s'agit d'interprétations douteuses puisqu'il y aurait alors contradiction entre les résultats des cuvées en bioréacteurs et ceux des cuvées en flacons. S'en tenant aux plafonnements des valeurs de $Y_p[\text{NO}_3]$, $Y_p[\text{PO}_4]$ et $Y_p[\text{Mg}]$, ceux-ci peuvent être interprétés comme des signes qu'il y a

Tableau 5.13
Rendements de production (Yp): Résumé des principales tendances observées
dans les cuvées en bioréacteurs 2-L

MACRO- NUTRIMENT	INTERVALLE de CONCENTRATION INITIALE en NH ₄					PLAFON- NEMENT
	0 à 2 mM	2 à 5 mM	5 à 10 mM	10 à 15 mM	15 à 20 mM	
Glucides (Figure 5.25-A)	↑	↑	↑	↑	↑	non
<u>ANIONS</u>						
Nitrate (Figure 5.26-A)	↑	↑	-cst	-cst	-cst	oui
Phosphate (Figure 5.27-A)	-cst	↑	-cst	-cst	-cst	oui
Chlorure (Figure 5.28-A)	↑	↑	↑	↑	↑	non
Sulfate (Figure 5.29-A)	↑	↑	↓	↑ _{ou} -cst	↑ _{ou} -cst	?
<u>CATIONS</u>						
Ammonium (Figure 5.30-A)	NA	↑	↑	↑	↓	non
Sodium (Figure 5.31-A)	↑	↑	↑	↑	↑	non
Potassium (Figure 5.32-A)	↑	↑	↓ _{ou} -cst	↑	ND	non
Magnésium (Figure 5.33-A)	↑	↑	-cst	-cst	-cst	oui
Calcium (Figure 5.34-A)	↑	↑ _{ou} -cst	↓ _{ou} -cst	-cst	-cst	?
NA = Non Applicable			ND = Non Disponible			

Tableau 5.14

Rendements de production (Yp): Résumé des principales tendances observées dans les cuvées en flacons agités de 500-mL

MACRO-NUTRIMENT	INTERVALLE de CONCENTRATION INITIALE en NH ₄					PLAFON-NEMENT
	0 à 2 mM	2 à 5 mM	5 à 10 mM	10 à 15 mM	15 à 20 mM	
Glucides (Figure 5.25-B)	↑	↑	↑	↑	↑	non
ANIONS						
Nitrate (Figure 5.26-B)	↑	↑	↑	-cst	-cst	oui
Phosphate (Figure 5.27-B)	↑	-cst	↑	-cst	-cst	oui
Chlorure (Figure 5.28-B)	↑	↑	↑	↑	↑	non
Sulfate (Figure 5.29-B)	↑	↑	↑	↑	↑	non
CATIONS						
Ammonium (Figure 5.30-B)	NA	↑ ou -cst	↑	↑	↑	non
Sodium (Figure 5.31-B)	ND	↑	ND	(5 à 15)↑	↑	non
Potassium (Figure 5.32-B)	ND	↑	ND	(5 à 15)↑	↑	non
Magnésium (Figure 5.33-B)	ND	↑	ND	(5 à 15)↑	-cst	oui
Calcium (Figure 5.34-B)	ND	↑	ND	(5 à 15)↑	↑	non
NA = Non Applicable			ND = Non Disponible			

peut être, dans chaque cas, une forme de limitation nutritionnelle au développement des embryons somatiques jusqu'au stade torpille. Dans cette optique, le fait que les valeurs de Y_p par rapport à un de ces trois ions plafonnent à partir d'une certaine concentration initiale en ammonium (≥ 5 mM en bioréacteurs et ≥ 10 mM en flacons agités) signifierait qu'au moins un de ces ions n'est pas présent en concentration suffisante dans le milieu de culture pour soutenir l'effet positif sur l'embryogenèse de l'augmentation en ammonium. Évidemment, comme il y a plafonnement par rapport à trois macronutriments, il est possible que le milieu de culture soit limitant pour un, deux ou trois de ceux-ci selon les inter-relations entre eux dans le métabolisme cellulaire. Si la limitation ne concerne qu'un seul des trois ions, alors les activités métaboliques des deux autres en dépendraient. Similairement, si la limitation concerne deux des trois ions, alors l'activité métabolique du troisième dépendrait de l'un et/ou de l'autre.

Les résultats ne permettent pas de savoir lequel (ou lesquels) de ces trois ions est (ou sont) limitant(s). Néanmoins, s'il fallait faire un choix entre les anions nitrate et phosphate dont le milieu B5 contient des concentrations initiales respectives de 25 et 1,1 mM, on pourrait supposer que le second est probablement limitant car il est essentiel à la construction des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) ainsi qu'au bon déroulement de tout le métabolisme énergétique des cellules, alors que comme source d'azote le nitrate est d'autant moins important que la concentration en ammonium augmente. Cependant s'il fallait trancher entre l'anion phosphate et le cation magnésium (1 mM dans B5) le choix serait impossible compte tenu que ce cation est tout aussi indispensable au métabolisme énergétique aérobie des cellules que le phosphate. En effet d'après Lehninger (1982), presque toutes les enzymes de la glycolyse cellulaire se lient spécifiquement aux complexes que forme le cation Mg^{2+} avec le groupement phosphate des intermédiaires de la glycolyse, de l'adénosine di-phosphate (ADP) et de l'adénosine tri-phosphate (ATP). De plus, les diverses chlorophylles du règne végétal étant des complexes moléculaires du magnésium, il n'est pas impossible (bien que plus spéculatif que l'hypothèse précédente) qu'une plus grande quantité de ce

celui-ci soit nécessaire au développement des cellules du pôle apical des embryons de carottes et donc à leur maturation jusqu'à la forme torpille. Seule une comparaison entre des cuvées effectuées à partir d'un inoculum commun, mais où les concentrations en magnésium et en phosphate du milieu B5 seraient modifiées, permettrait de vérifier ces hypothèses.

La possibilité de faire de telles inférences quant aux limitations nutritionnelles potentielles du milieu B5 montre à quel point le protocole expérimental suivi et la mesure des rendements de production peuvent être utiles dans une démarche systématique visant l'optimisation de tout milieu de culture. Toutefois, il est clair que cette démarche est imparfaite et qu'elle comporte certaines contradictions. En effet, si le plafonnement des valeurs de Yp par rapport à un nutriment donné et en fonction de l'accroissement de la concentration initiale en ammonium doit être considéré comme un indice de limitation nutritionnelle, pourquoi un tel plafonnement n'est-il pas observé pour les glucides que l'on sait limiter au moins en partie la croissance de la biomasse (Figure 5.14 & Figures de la Section I.9 de l'Annexe) et conséquemment l'obtention d'embryons somatiques? Sans condamner l'ensemble de la démarche adoptée, cette contradiction souligne la difficulté à interpréter les rendements de production avec le concept de limitation nutritionnelle tel que défini. Cette difficulté tient entre autre aux faits que l'embryogenèse somatique est un processus de différenciation cellulaire lié à la croissance et que la limitation nutritionnelle est un aspect intrinsèque de la méthode cuvée, car à moins qu'une culture ne produise une substance inhibant son propre développement ou qu'il y ait ajouts de nutriments (dans lequel cas il faut plutôt parler de cuvée-alimentée) toute culture-cuvée doit nécessairement devenir limitée en un matériau quelconque et éventuellement cesser de se développer.

La comparaison des Tableaux 5.13 et 5.14 met aussi en évidence qu'en bioréacteurs les plafonnements des valeurs de Yp se manifestent toujours dans des milieux de culture contenant initialement moins d'ammonium qu'en flacons agités: 5 mM versus 10 mM pour le nitrate, 5 mM versus 10 mM pour le phosphate et 5 mM versus 15 mM pour le magnésium. Dans chacun de ces cas, cette différence est interprétée précédemment comme une preuve que

l'atteinte des meilleurs rendements de production dépendrait plus des conditions de culture qui sont contrôlées en bioréacteurs mais qui ne le sont pas en flacons agités, qu'elle ne dépendrait de la concentration initiale en ammonium. En d'autres termes, les conditions en bioréacteurs (principalement le contrôle de la concentration en oxygène dissous et le maintien de l'homogénéité de la suspension) étant plus favorables à l'embryogenèse somatique que ne le sont celles en flacons, les limitations nutritionnelles de B5 se révéleraient pour une concentration en ammonium moindre dans le premier mode que dans le second.

Un aspect que l'on mentionne tout au long de cette partie, mais dont il est plus approprié de traiter globalement maintenant, est le fait que les valeurs de Y_p obtenues en bioréacteurs sont généralement supérieures ou au moins égales à celles obtenues en flacons agités. On ne compte que trois exceptions où la valeur moyenne de Y_p en flacons est plus grande que celle en bioréacteurs: $Y_p[Mg]$ pour les cultures contenant initialement 15 et 20 mM d'ammonium (Figure 5.33), ainsi que $Y_p[Ca]$ pour les cultures ayant une concentration initiale en ammonium de 20 mM (Figure 5.34). Si elle est significative, la supériorité des valeurs de Y_p en bioréacteurs sur celles en flacons peut s'expliquer par les différences dans la composition de la biomasse des cuvées, différences qui découleraient elles mêmes des conditions de culture particulières dans un mode et dans l'autre. Dans le bioréacteur utilisé, le contrôle de l'oxygène dissous et de l'agitation favoriserait la différenciation cellulaire, de sorte qu'il y aurait un nombre moindre de cellules indifférenciées compétitionnant avec les cellules différenciées (embryons) pour les macronutriments considérés. Inversement, la culture non contrôlée en flacons agités ne serait pas autant favorable au processus de différenciation si bien que la proportion plus grande de cellules indifférenciées qui en résulte se traduirait par une compétition accrue pour les mêmes macronutriments et donc par des rendements de production moindres par rapport leur absorption.

Enfin, il convient de rappeler qu'il n'est pas possible d'évaluer si les tendances observées dans les calculs de rendements de cette partie sont statistiquement significatives car, pour chacune des six concentrations initiales en ammonium, chaque résultat repose sur une seule cuvée en

bioréacteur et sur un nombre variable de cuvées en flacons. L'estimation des rendements de production reste un exercice tout de même valable qui, comme l'étude des rendements de croissance, renferme aussi probablement des informations omises dans la présente analyse.

CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

6.1 CONCLUSIONS

6.1.1 ATTEINTE DES OBJECTIFS ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En référence aux résultats du Chapitre 5, il appert que les huit sous-objectifs formulés au Chapitre 3 sont tous atteints.

i) Diverses lignées embryogènes capables de croître en suspension dans le milieu B5 furent obtenues à partir de tissus somatiques de carottes appartenant à différentes variétés commerciales, dont la variété Six Pack.

ii) Une méthode de culture cuvée qui permet de produire systématiquement des embryons somatiques en flacons agités et en bioréacteur à rubans hélicoïdaux a été définie et mise en application.

iii) La lignée SP1b a été sélectionnée comme embryogène et bien adaptée à la culture *in vitro* en flacons agités, ainsi qu'en bioréacteur avec contrôle de la concentration en oxygène dissous à 20%.

iv) Des séries de cuvées débutées avec des concentrations différentes en cation ammonium ont été effectuées simultanément dans les deux modes de culture.

v) Pour chaque cuvée, l'évolution dans le temps de paramètres liés aux changements de la biomasse, à la production d'embryons torpilles, à l'absorption de l'ion ammonium ainsi qu'à l'absorption de neuf autres macronutriments a été suivie.

vi) Des relations ont été établies entre la concentration initiale en cation ammonium et les cinétiques des paramètres mesurés.

vii) Les relations paramétriques des cuvées en bioréacteurs et en flacons ont été comparées puis, quand cela était possible, leurs divergences ou leurs similitudes ont été expliquées en fonction des principales différences (notamment le contrôle de la concentration de l'oxygène dissous) entre ces deux modes de culture *in vitro*.

viii) Lorsque cela était possible et pertinent les tendances observées ont été discutées en référence à la littérature.

De façon générale ce projet de recherche permet de constater que, pour la lignée SP1b cultivée en milieu B5 et indifféremment du mode de culture, si la présence initiale du cation ammonium n'est pas absolument nécessaire à l'obtention d'embryons somatiques (des embryons furent produits avec du

nitrate comme seule source initiale d'azote) son absence constitue toutefois une limite nutritionnelle et qu'une concentration initiale en ammonium d'environ 15 mM permet à un maximum d'embryons de compléter leur développement. Quelque soit l'espèce végétale en cause, on peut supposer que toute lignée embryogène cultivée en milieu B5 aura des besoins particuliers en ammonium, tout comme on peut aussi supposer que certaines lignées auront des besoins particuliers vis-à-vis d'autres ions, tel que cela semblent être le cas de SP1b avec le phosphate et le magnésium. L'étude des besoins nutritionnels spécifiques à chaque lignée végétale embryogène apparaît donc comme une condition nécessaire pour améliorer à la fois la compréhension de l'embryogenèse, la quantité d'embryons somatiques obtenues et leur qualité.

Dans cette perspective, les travaux présentés ici indiquent que les principales tendances nutritionnelles peuvent être déterminées en flacons agités ou en bioréacteur à rubans hélicoïdaux. Ces mêmes travaux montrent aussi que plus d'embryons et moins de biomasse indifférenciée sont obtenus dans ce bioréacteur. Or si l'on se réfère aux rares publications où sont comparées des productions d'embryons somatiques de plantes en flacons et en bioréacteurs (Tableau 2.3), c'est la première fois que la production en bioréacteurs est constamment supérieure à celle en flacons agités. Ce fait constitue une preuve qu'un meilleur contrôle des conditions de culture se traduit par une production améliorée d'embryons somatiques dans la mesure où les conditions fixées tendent à mieux correspondre à leurs besoins physiologiques. L'originalité et le mérite de ce projet tiennent en partie à l'approche et aux résultats présentés à l'appui de cette preuve, même si l'analyse des rendements de croissance et de production comporte certaines lacunes.

6.1.2 PRODUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES

Les résultats de ce projet sont spécifiques à la lignée SP1b et à la méthode de culture cuvée. Néanmoins, dans l'optique d'obtenir des embryons somatiques à partir de cellules d'une espèce végétale quelconque, ceux-ci suggèrent: 1) que la culture en bioréacteur peut être un atout important; 2) que du B5 avec une concentration initiale en cation ammonium à 15 mM

constitue un bon milieu de départ; 3) qu'il est nécessaire de contrôler l'oxygène dissous; 4) qu'il serait souhaitable d'en faire autant pour le dioxyde de carbone et pour d'autres gaz pouvant avoir un effet sur l'embryogenèse; 5) qu'il faut pouvoir évaluer rapidement si les ions phosphate et le magnésium sont présents en concentrations suffisantes; 6) qu'il y aurait lieu de modifier la méthode cuvée pour celle de cuvée-alimentée en glucides de façon à ce que les cultures ne soient pas limitées par le manque de carbone, mais par l'épuisement d'un autre nutriment. Quoique simples, ces quelques lignes directrices n'auraient pu être formulées à l'issue de la seule revue de littérature du Chapitre 2.

6.1.3 IMPORTANCE D'UNE REPRÉSENTATION JUSTE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

Le fait que la production d'embryons somatiques en bioréacteur à rubans hélicoïdaux est constamment meilleure que celle en flacons agités confirme indirectement deux autres points importants: 1) l'identification de besoins qui changent dans le temps est l'une des principales difficultés de l'embryogenèse somatique *in vitro* et 2) certaines méthodes traditionnelles de culture doivent être remises en question. Ainsi, même si l'on reconnaît aux embryons somatiques au moins quatre stades de développement en fonction de changements morphologiques observables, le développement physiologique réel des embryons d'une lignée quelconque peut comporter plus ou moins de stades correspondant à autant d'ensembles de besoins spécifiques, chaque ensemble pouvant en conséquence requérir des conditions physico-chimiques différentes de culture. En d'autres mots, le succès de la maîtrise de l'embryogenèse somatique des végétaux dépend de l'utilisation de tous les moyens disponibles pour mesurer régulièrement les besoins d'une culture et pour y apporter les correctifs nécessaires. À cet égard il est souhaitable que des marqueurs de développement fiables et facilement mesurables soient bientôt mis au point, puisque les moyens technologiques de corriger les conditions de culture ne semblent pas comporter de difficultés particulières.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats de cette étude laisse entendre qu'il y a lieu de questionner la pertinence de certaines méthodes de culture. En effet, la filtration des lignées embryogènes dans le but de

les synchroniser (Chée & Cantliffe 1992, Fujimura & Komamine 1979a, Giuliano et al. 1983, Halperin & Wetherell 1964b, Masuda et al. 1991, Mohanty 1992, Nomura & Komamine 1985, Rodriguez et al. 1988, Warren & Fowler 1977, Wetherell 1984, Wilde et al. 1988) ne constitue-t-elle pas une façon d'adapter les lignées aux conditions de culture plutôt que l'inverse souhaité? Par ailleurs, ne fait-on pas abstraction des besoins nutritionnels des cellules pour l'oxygène (ou d'autres gaz) quand on cultive des embryons sur géloses ou en flacons agités? Il importe donc de travailler avec un modèle conceptuel propre à ce processus biologique complexe qu'est l'embryogenèse somatique. Conséquemment, il faut éviter de lui transposer des modèles empruntés à la culture de microorganismes ou à la culture de cellules de plantes visant l'obtention de métabolites secondaires, car dans ces systèmes les cellules se multiplient sans se différencier de sorte qu'à un ensemble de conditions correspond un produit ou une gamme de produits résultant de voies métaboliques spécifiques et parfois connues. L'embryogenèse est un processus de différenciation tissulaire comportant une multitude de changements métaboliques pouvant requérir autant d'ensembles particuliers de conditions physico-chimiques différentes de culture. Dans ce contexte, on espère que l'information précise mais évidemment incomplète qui est rassemblée dans la revue de littérature du Chapitre 2 et que la discussion des résultats analysés au Chapitre 5 donnent une représentation juste et adéquate de l'embryogenèse végétale somatique, car ceci apparaît crucial pour progresser dans sa compréhension et sa maîtrise.

6.2 RECOMMANDATIONS

6.2.1 PROTOCOLE DE MODIFICATION DU MILIEU B5 EN AMMONIUM INITIAL

La méthode retenue pour modifier la concentration initiale en ammonium du milieu B5 consiste à combiner dans les proportions appropriées (Tableau 4.2) du nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) et du nitrate de potassium (KNO_3) de façon à obtenir la concentration désirée de NH_4^+ et à maintenir celle du NO_3^- à 25 mM. Tel qu'expliqué à la sous-section 4.2.1, l'inconvénient de cette stratégie est que la concentration du potassium varie de -27 mM à -7 mM selon le cas et la validité des résultats présentés au Chapitre 5

repose sur l'hypothèse que cette variation n'affecte ni la croissance de la biomasse ni la production d'embryons. Cependant, il est permis de s'interroger sur le bien fondé de cette hypothèse car certaines études mentionnées à la sous-section 2.2.4 proposent que le potassium influence peut être l'embryogenèse somatique (Brown et al. 1976, Tazawa et Reinert 1969).

D'une part, on constate que la croissance globale de la biomasse sèche n'est pas affectée par la variation de la concentration du potassium puisqu'elle demeure à peu près constante d'une cuvée à l'autre et d'un mode de culture à l'autre (Tableaux 5.3 et 5.4 ainsi que sous-section 5.2.1.3). L'ambiguïté dans les mesures de rendements de croissance par rapport à ce cation (Figure 5.24 et discussion correspondante) ne permet toutefois ni de confirmer ni d'infirmer ce constat. D'autre part, la production maximale d'embryons (Figure 5.2 et discussion correspondante) augmente pour une concentration initiale en cation ammonium qui passe de 0 à 20 mM et, dans les deux modes de culture, elle atteint une valeur supérieure lorsque la concentration d'ammonium est de 15 mM. Or suivant la méthode adoptée, quand on augmente la concentration en ammonium entre 2 et 20 mM on diminue celle du cation potassium de ~25 à 7 mM. Donc l'hypothèse relative au potassium semble valable, tout comme semblaient le confirmer les rendements de production par rapport à ce cation (Figure 5.32 et discussion correspondante). De plus, ceci confirme qu'à la différence de certains résultats de Brown et de ses collègues (1976) il n'est pas nécessaire, du moins dans le cas de la lignée SP1b, d'augmenter la concentration en potassium pour obtenir une plus forte production maximale d'embryons et que l'ammonium est vraisemblablement plus important que le potassium pour l'embryogenèse. Cela précisé, il est néanmoins possible que si la concentration du potassium avait été maintenue constante dans toutes les cuvées, la production maximale d'embryons somatiques aurait été plus élevée dans les cuvées contenant initialement plus de 5 mM d'ammonium. Ceci mériterait d'être vérifié avec des cultures en bioréacteurs où l'on utiliserait seulement du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pour modifier la concentration initiale de l'ammonium, même si le chlorure (Cl^-) est considéré comme un anion potentiellement néfaste pour les cultures

embryogènes.

6.2.2 LES SOURCES D'AZOTE

À la lumière de travaux effectués avec des lignées embryogènes de carotte (Kamada & Harada 1979b & 1984a&b, Wetherell & Dougall 1976) et de luzerne (Meijer & Brown 1987, Stuart et al. 1985a, Stuart & Strickland 1984a&b, Walker & Sato 1981), il y aurait lieu d'évaluer en bioréacteur à rubans hélicoïdaux les effets d'une utilisation individuelle de certains acides aminés (par exemples: alanine, arginine, glutamine et proline) comme source unique d'azote ou en combinaison avec différentes concentrations de nitrate. Selon ces travaux, l'usage d'un ou plusieurs acides aminés dans des proportions appropriées pourrait se traduire par une qualité accrue des embryons produits alors qu'une étude systématique des besoins en nitrate pour l'embryogenèse somatique contribuerait à mettre fin à la controverse sur les sources d'azote. Similairement, il serait intéressant de vérifier à l'aide du bioréacteur les liens possibles entre certains régulateurs de croissance et le cation ammonium (Sharp et al. 1980, Walker & Sato 1981) ou entre le maltose et celui-ci (Strickland et al. 1987), des liens qui ont été observés pour des lignées de luzerne.

6.2.3 AMÉLIORATIONS MÉTHODOLOGIQUES SOUHAITABLES

Il est souligné, à la partie 5.2.2.2, que l'étude de l'embryogenèse somatique en bioréacteur à rubans hélicoïdaux bénéficierait de pouvoir effectuer des bilans de masse sur l'oxygène et sur le carbone. Dans cette perspective, il est souhaitable de mesurer l'oxygène consommé et/ou le dioxyde de carbone produit par les cultures embryogènes afin de préciser les hypothèses relatives aux différences métaboliques entre les cellules indifférenciées et les cellules d'embryons somatiques. Cette approche contribuerait également à vérifier si les cultures embryogènes comblent effectivement une partie de leurs besoins métaboliques en carbone par la fixation non-photosynthétique du CO₂ (Payne et al. 1990).

À la partie 5.2.2.2 on soulève aussi l'urgence de développer une méthode simple et fiable permettant de discriminer rapidement ainsi que de

dénombrer en tout temps, dans la biomasse d'une lignée embryogène, les embryons somatiques à leurs différents stades de développement (amas cellulaire, globulaire, cordiforme et torpille). À cet effet il y a lieu de s'inspirer de travaux récents en imagerie électronique portant sur l'identification, le tri, la classification et l'évaluation d'embryons (Cazzulino et al. 1990, Chi et al. 1994, Grand d'Esnon et al. 1989, Hamalainen et al. 1993, Harrell et al. 1992). Toujours à la partie 5.2.2.2, on met en évidence que le pourcentage du volume de la suspension qui est occupé par la biomasse humide sédimentée (%VBS) est un paramètre n'ayant aucune valeur s'il n'est pas complété par une évaluation des proportions relatives de cellules différenciées (embryons complets ou non) et de cellules indifférenciées. On suggère de considérer l'utilisation d'un colorant spécifique à l'un de ces types de cellules afin de procéder à une telle évaluation.

Certaines explications proposées au Chapitre 5 concernant l'avantage du bioréacteur à rubans hélicoïdaux sur le flacon agité et font référence au contrôle de la concentration en oxygène dissous, ou encore à des effets indirects possibles de celui-ci sur le transfert d'autres gaz dont le dioxyde de carbone et l'éthylène. De telles hypothèses restent à être vérifiées et confirmées par d'autres études nutritionnelles, mais aussi par des recherches fondamentales (biochimie & physiologie végétales, biologie moléculaire, chimie analytique, etc) qui devraient permettre de faire des liens plus fondamentaux avec le métabolisme énergétique des cellules embryogènes engagées dans les processus complexes de différenciation et de spécialisation tissulaire. Il importe donc de développer des outils permettant de bien distinguer ces cellules de celles demeurant indifférenciées et de les quantifier (ce qui pourrait ne pas être possible par la simple utilisation d'un colorant) afin de pouvoir relier l'absorption des macronutriments non seulement à la croissance de la biomasse et à la concentration d'embryons torpilles, mais aussi à des concentrations précises de chacun des deux types de cellules. Il s'agit là d'une condition essentielle pour que puissent être mis au point des modèles mathématiques autant descriptifs que prédictifs du développement nutritionnel de l'embryogenèse végétale somatique.

Enfin, il faudrait que chaque expérience soit effectuée en un nombre suffisant de cultures simultanées (c'est-à-dire partant du même inoculum) pour que ses résultats soient statistiquement significatifs. Cela est évidemment très exigeant dans le cadre de cultures embryogènes en bioréacteurs car chacune demande beaucoup de précaution, de préparation et de temps. Toutefois c'est là une condition à l'établissement de tendances irréfutables et, éventuellement, au développement de modèles mathématiques valables.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- ALEITH, F. & RICHTER, G. (1990) Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. Planta. 183(1):17-24.
- AMMIRATO, P.V. (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. In GREEN, SOMERS, HACKETT & BIESBOER éds. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss:New York. Pp 57-81.
- AMMIRATO, P.V. & STYER, D.J. (1985) Strategies for large-scale manipulation of somatic embryos in suspension culture. In ZAITLIN, DAY, & HOLLANDER éds. Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties. Academic Press:NY. Pp 161-78.
- AMMIRATO, P.V. (1983a) Embryogenesis. Chapter 3 In EVANS, SHARP, AMMIRATO & YAMADA éds. Handbook of Plant Cell Culture. Vol 1. MacMillan:NY. Pp 82-123.
- AMMIRATO, P.V. (1983b) The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspension culture techniques and hormone requirements. BIO/TECHNOLOGY. 1(March):68-74.
- AMMIRATO, P.V. (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway: Interactions of abscisic acid, zeatin, and gibberellic acid. Plant Physiol. 59:579-586.
- AMMIRATO, P.V. (1974) The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway. Bot Gaz. 135(4):328-37.
- AMMIRATO, P.V. & STEWARD, F.C. (1971) Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. Bot Gaz. 132:149-58
- ARCHAMBAULT, J., WILLIAMS, R.D., LAVOIE, L., PÉPIN, M.F., CHAVARIE, C., (1994a) Production of somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotech&Bioeng. 44:930-43.
- ARCHAMBAULT, J., LAVOIE, L., WILLIAMS, R.D., CHAVARIE, C. (1994b) Nutritional aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed in bioreactors. Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Proceedings of the VIIITH International Congress on Plant Tissue and Cell

Culture, Florence, Italy (June 1994). Edited by TERZI, M., CELLA, R. & FALAVIGNA, A., Kluwer Academic Publishers (1995). Pp 681-7.

ARCHAMBAULT, J. (1991) Large-scale (20L) culture of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells. Enzyme Microb Technol. 13:882-92.

AUBOIRON, E., CARRON, M-P. & MICHAUX-FERRIÈRE, N. (1990) Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 21:31-7.

BACKS-HÜSEMANN, D. & REINERT, J. (1970) Embryobildung durch isolierte einzelzellen aus gewebeulturen von *Daucus carota*. (Embryo formation by isolated single cells from tissue cultures of *Daucus carota*). Protoplasma. 70:49-60.

BAKER, S.R., JONES, L.H. & YON, R.J. (1983) Ornithine carbamoyltransferase activity and embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Phytochemistry. 22(10):2167-9.

BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A., WURTELE, E.S. & BOLLINGER, W.H. (1985) Natural Plant Chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. SCIENCE. 228:1154-60.

BALLICA, R. & RYU, D.D.Y. (1993) Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: Production of tropane alkaloids. Biotech&Bioeng. 42:1181-91.

BAPAT, V.A. & RAO, P.S. (1988) Sandalwood plantlets from "synthetic seeds". Plant Cell Reports. 7:434-6.

BARBOTIN, J-N., SAUCEDO, J.E.N., BAZINET, C., KERSULEC, A., THOMASSET, B., THOMAS, D. (1993) Immobilization of whole cells and somatic embryos: coating process and cell-matrix interactions. Chapter 5 In REDENBAUGH, éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 65-103.

BAYLISS, M.W. (1980) Chromosomal variation in plant tissues in culture. Chapter 5 In VASIL éd. International Review of Cytology. Supplement 11-A: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Academic Press. Pp 113-143.

BAYLISS, M.W. (1977) Factors affecting the frequency of tetraploid cells in predominantly diploid suspension culture of *Daucus carota*. Protoplasma. 92:109-15.

BECK, C., STIEFEL, H., STINNETT, T. (1987) Cell-Culture Bioreactors. Chemical Engineering. New-York. 94(2):121-9.

BIDDINGTON, N.L. (1992) The influence of ethylene in plant tissue culture. Plant Growth Regulation. 11:173-87.

BIENIEK, M.E., HARRELL, R.C., CANTLIFFE, D.J. (1991) Ethylene, CO₂ and O₂ changes during somatic embryo development in liquid cultures of *Ipomoea batatas*. Poster #P-1053 In 1992 World Congress on Cell and Tissue Culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Part II. 28(3):104A.

BORKIRD, C., CHOI, J.H., JIN, Z-H., FRANZ, G., HATZOPOULOS, P., CHORNEAU, R., BONAS, U., PELEGRI, F., SUNG, Z.R. (1988) Developmental regulation of embryonic genes in plants. Proc Natl Acad Sci. USA. 85:6399-6403.

BORKIRD, C., CHOI, J.H., SUNG, Z.R. (1986) Effect of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. Plant Physiol. 81:1143-6.

BORLAUG, N.E. (1983) Contributions of conventional plant breeding to food production. SCIENCE. 219:689-93.

BORNMAN, C.H. (1993) Maturation of somatic embryos. Chapter 6 In REDEN-BAUGH éd. SYNSEEDS Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 105-14.

BOWLEY, S.R., KIELLY, G.A., ANANDARAJAH, K., MCKERSIE, B.D., SENARATNA, T. (1993) Field evaluation following two cycles of backcross transfer of somatic embryogenesis to commercial alfalfa germplasm. Canadian J Plant Science. 73(1):131-7.

BROWN, S., WETHERELL, D.F., DOUGALL, D.K. (1976) The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. Physiol Plant. 37:73-9.

CALIGARI, P.D.S. & SHOHEI, S. (1993) Variability in somatic embryos. Chapter 9 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 163-74.

CARLBERG, I., SODERHALL, K., GLIMELIUS, K., ERIKSSON, T. (1984) Protease activities in non-embryogenic and embryogenic carrot cell strains during callus growth and embryo formation. Physiologia Plantarum. 62:458-64.

CARMAN, J.G. (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior. In Vitro Cell Dev Biol. 26:746-753.

CARMAN, J.G. (1989) The *in ovulo* environment and its relevance to cloning wheat via somatic embryogenesis. In Vitro Cellular Dev Biol. 25:1155-1162.

CARMAN, J.G. (1988) Improved somatic embryogenesis in wheat by partial simulation of the *in-ovulo* oxygen, growth-regulator and desiccation environments. Planta. 175:417-24.

CARREAU, P.J., PATTERSON, W.I., YAP, C.Y. (1976) Mixing of viscoelastic fluids with helical-ribbon agitators. Part I - Mixing time and flow patterns. Can J Chem Eng. 54(June):135-42.

CAZZULINO, D.L., PEDERSEN, H., CHIN, C-K., STYER, D. (1990) Kinetics of carrot somatic embryo development in suspension culture. Biotech&Bioeng. 35(8):781-6.

CHÉE, R.P. & CANTLIFFE, D.J. (1992) Improved production procedures for somatic embryos of sweetpotato for a synthetic seed system. HortScience. 27(12):1314-6.

CHEN, T.H.H., THOMPSON, B.G., GERSON, D.F. (1987) *In vitro* production of alfalfa somatic embryos in fermentation systems. J Ferment Technol. 65(3):353-7.

CHI, C-M., VITS, H., STABA, E.J., COOKE, T.J., HU, W-S. (1994) Morphological kinetics and distribution in somatic embryo cultures. Biotech&Bioeng. 44:368-78.

CHIBBAR, R.N., POLOWICK, P.L., NEWSTED, W.J., SHYLUK, J., GEORGES, F. (1989) Identification and isolation of a unique esterase from the medium

of non-embryogenic cell line of cultured carrot cells. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 18:47-53.

CHIBBAR, R.N., SHYLUK, J., GEORGES, F., MALLARD, C.S., CONSTABEL, F. (1988) Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. J Plant Physiol. 133:367-70.

CHRISTIANSON, M.L. (1985) An embryogenic culture of soybean: Towards a general theory of somatic embryogenesis. In ZAITLIN, DAY & HOLLAENDER éds. Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties. Academic Press:NY. Pp 83-103.

CORDEWENER, J., BOOIJ, H., VAN DER ZANDT, H., VAN ENGELN. F., VAN KAMMEN, A., De VRIES, SC (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. Planta (Berlin). 184:478-86.

COUTOS-THEVENOT, P., JOUANNEAU, J.P., BROWN, S., PETIARD, V., GUERN, J. (1990) Embryogenic and non-embrogenic cell lines of *Daucus carota* cloned from meristematic cell clusters: Relation with cell ploidy determined by flow cytometry. Plant Cell Reports. 8:605-8.

DAVIES, P.J. (1987) The Plant Hormones: Their Nature, Occurence, and Functions. Introduction In DAVIES éd. Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development. Martinus Nijhoff Publishers. Pp 1-11.

De KLERK, G.J. (1990) How to measure somaclonal variation. Acta Bot Neerl. 39:129.

DENCHEV, P.D., KUKLIN, A.I., SCRAGG, A.H. (1992) Somatic embryo production in bioreactors. Journal of Biotechnology. 26:99-109.

De VRIES, S.C., HENDRIKS, T., De JONG, A.J., HARTOG, M.V., MEIJER, E.A., VAN KAMMEN, A. (1992) Secreted proteins as modulators of plant embryogenesis. Abstract In KASHA et al. (Organizers). Proceedings of the 3rd Canadian workshop on Plant Tissue Culture and Genetic Engineering. Guelph. p 2.

De VRIES, S.C., BOOIJ, H., JANSSENS, R., VOGELS, R., SARIS, L., LOSCHIAVO, F., TERZI, M., VAN KAMMEN, A. (1988a) Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extra-

cellular proteins. Genes&Development. 2:462-76.

De VRIES, S.C., BOOIJ, H., MEYERINK, P., HUISMAN, G., WILDE, H.D., THOMAS, T.L., VAN KAMMEN, A. (1988b) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. Planta (Berlin). 176:196-204.

DIJKEMA, C., De VRIES, S.C., BOOIJ, H., SCHAAFSMA, T.J., VAN KAMMEN, A. (1988) Substrate utilization by suspension cultures and somatic embryos of *Daucus carota* L. measured by ^{13}C NMR. Plant Physiol. 88:1332-7.

DODEMAN, V.L., Le DEUNFF, Y., REMY, R., DUCREUX, G. (1992) Zygotic and somatic embryo protein patterns in *Daucus carota* L. Abstract In DATTEÉ éd. Biologie de la Reproduction et Amélioration des Plantes. Livre des résumés et des posters XIIIème Congrès EUCARPIA. Angers, France. Pp 353-4.

DOUGALL, D.K. (1985) Chemicals from plant cell cultures: Yield and variation. In ZAITLIN, DAY & HOLLAENDER éds. Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties. Academic Press:NY. Pp 179-90.

DOUGALL, D.K. (1980) Nutrition and metabolism. Chapter 2. In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 21-58.

DOUGALL, D.K. & VERMA, D.C. (1978) Growth and embryo formation in wild-carrot suspension cultures with ammonium ion as a sole nitrogen source. In Vitro. 14(2):180-2.

DREW, R.L.K. (1980) A cheap, simple apparatus for growing large batches of plant tissue in submerged liquid culture. Plant Sc Letters. 17:227-36.

DREW, R.L.K. (1979) The development of carrot (*Daucus carota* L) embryoids (derived from cell suspension culture) into plantlets on a sugar-free basal medium. Hort Res. 19:79-84.

DUCOS, J.P., BOLLON, H., PETTARD, V. (1993) Production of carrot somatic embryos in a bioreactor. Applied Microbiol and Biotechnol. 39:465-70.

DUNWELL, J.M. (1979) Anther culture in *Nicotiana tabacum*: The role of culture vessel atmosphere in pollen embryo induction and growth. Journal of Experimental Botany. 30(116):419-28.

- DUTTA, P.C., APPELQVIST, L-A., GUNNARSSON, S., VON HOFSTEN, A. (1991) Lipid bodies in tissue culture, somatic and zygotic embryo of *Daucus carota* L.: A qualitative and quantitative study. Plant Science. 78:259-67.
- DUTTA, P.C. & APPELQVIST, L-A. (1989) The effects of different cultural conditions on the accumulation of depot lipids notably petroselinic acid during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. Plant Science. 64(2):167-77.
- EL-FIKY, F.K., REMMEL, R.P., STABA, E.J. (1989) *Ammi visnaga*: Somatic embryo induction and furanochrome production in embryos, seedlings, and plants. Planta Medica. 55:446-51.
- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. (1986) Somaclonal and gametoclonal variation. In EVANS, SHARP & AMMIRATO éds. Handbook of Plant Cell Culture. Vol 4: Techniques and Applications. Pp 97-131.
- EVANS, D.A., SHARP, W.R., FLICK, C.E. (1981) Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In THORPE éd. Plant Tissue Culture. Methods & Applications in Agriculture. Academic Press:NY. Pp 45-113.
- FINKELSTEIN, R.R. & CROUCH, M.L. (1987) Hormonal and osmotic effects on developmental potential of maturing rapeseed. HortScience. 22(5):797-800.
- FINKELSTEIN, R.R. & CROUCH, M.L. (1986) Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. Plant Physiol. 81:907-12.
- FINKELSTEIN, R.R., TENBARGE, K.M., SHUMWAY, J.E., CROUCH, M.L. (1985) Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. Plant Physiol. 78:630-6.
- FLORIN, B., TESSERAU, H., LECOUTEUX, C., DIDIER, C., PETIARD, V. (1993) Long-term preservation of somatic embryos. Chapter 8 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 133-61.
- FOWLER, M.W. (1987) Process systems and approaches for large scale plant cell culture. In GREEN, SOMERS, HACKETT & BIESBOER éds. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss:New York. Pp 459-71.

FOWLER, M.W. (1983) Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In MANTELL & SMITH éds. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. Pp 3-37.

FUJII, J-A. A., SLADE, D., REDENBAUGH, K. (1993) Planting artificial seeds and somatic embryos. Chapter 11 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press, Fla. Pp 183-202.

FUJII, J-A. A., SLADE, D., OLSEN, R., RUZIN, S.E., REDENBAUGH, K. (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. Plant Science. 72:93-100.

FUJII, J-A. A., SLADE, D., REDENBAUGH, K. (1989) Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seeds. In Vitro Cellular Dev Biol. 25:1179-82.

FUJII, J-A.A., SLADE, D.T., REDENBAUGH, K., WALKER, K.A. (1987) Artificial seeds for plant propagation. Trends in Biotechnology. 5(Dec):335-9.

FUJII, N. & UCHIMIYA, H. (1991) Conditions favorable for the somatic embryogenesis in carrot cell culture enhance expression of the rolC promoter-GUS fusion gene. Plant Physiol. 95:238-41.

FUJIMURA, T., KOMAMINE, A., MATSUMOTO, H. (1981) Changes in chromosomal proteins during early stages of synchronized embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z Pflanzenphysiol. 102:293-8.

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. (1980a) The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. New Phytol. 86:213-8.

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. (1980b) Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z Pflanzenphysiol. 99:1-8.

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. (1979a) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Physiol. 64:162-4.

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. (1979b) Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z Pflanzenphysiol. 95:13-9.

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. (1975) Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Science Letters. 5:359-64.

FUJITA, Y. & TABATA, M. (1987) Secondary metabolites from plant cells: Pharmaceutical applications and progress in commercial production. In GREEN, SOMERS, HACKETT, BIESBOER éds. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss:New York. Pp 169-85.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 50:151-8.

GARRETT, R.E. (1993) Encapsulation machinery. Chapter 12 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 115-32.

GAUTHERET, R.J. (1985) History of plant tissue and cell culture: A personal account. In VASIL éd. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Volume 2. Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation, and Cryopreservation. Academic Press. Pp 1-59.

GAUTHERET, R.J. (1982) Plant tissue culture: The History. In FUJIWARA éd. Plant Tissue Culture. Proc 5th Intl Cong of Plant Tissue and Cell Culture. Tokyo:Maruzen. Pp 7-12.

GHOSH, B. & SEN, S. (1994) Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. Plant Cell Reports. 13:381-5.

GILES, K.L. & MORGAN, W.M. (1987) Industrial-scale plant micropropagation. Trends in Biotechnology. 5:35-9.

GIULIANO, G., ROSELLINI, D., TERZI, M. (1983) A new method for the purification of the different stages of carrot embryoids. Plant Cell Reports. 2:216-8.

GOLDSTEIN, W.E., INGLE, M.B., LASURE, L. (1980) Product cost analysis. Chapter 9 In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 191-234.

GRAND d'ESNON, A., CHEE, R., HARRELL, R.C., CANTLIFFE, D.J. (1989) Qualitative and quantitative evaluation of liquid tissue cultures by artificial vision. LE TECHNOSCOPE DE BIOFUTUR. 26:3-9.

GRAY, D.J. & COMPTON, M.E. (1993) Grape somatic embryo dormancy and quiescence: potential of dehydrated synthetic seeds for germplasm conservation. Chapter 20 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 367-79.

GRAY, D.J. & PUROHIT, A. (1991) Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Critical Rev in Plant Sciences. 10(1):33-61.

GRAY, D.J. (1990) Synthetic seed for clonal production of crop plants. In TAYLORSON éd. Recent Advances in the Development and Germination of Seeds. Plenum Press, New York. p 29.

GRAY, D.J. (1989) Effects of dehydration & exogenous growth regulators on dormancy, quiescence and germination of grape somatic embryos. In Vitro Cell Dev Biol. 25:1173-8.

GRAY, D.J. (1987a) Introduction to the Symposium. In Synthetic seed technology for the mass cloning of crop plants: Problems and perspectives. HortScience. 22(5):796-7.

GRAY, D.J. (1987b) Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. In Synthetic seed technology for the mass cloning of crop plants: Problems and perspectives. HortScience. 22(5):810-4.

GRAY, D.J., CONGER, B.V., SONGSTAD, D.D. (1987) Desiccated quiescent somatic embryos of orchardgrass for use as synthetic seeds. In Vitro Cellular and Developmental Biology. 23(1):29-33.

GRAY, D.J. & CONGER, B.V. (1985) Quiescence in somatic Es of orchardgrass (*Dactylis glomerata*) induced by desiccation. Am J Bot. 72:816.

GREENBERG, A.E. (APHA), TRUSSELL, R.R. (AWWA), CLESCERI, L.S. (WPCF), FRANSON, M-A. H. (1985) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th Edition. (Ascorbic Acid Method for analysis of phosphate. Pp 448-50)

- GREGOR, D., REINERT, J., MATSUMOTO, H. (1974) Changes in chromosomal proteins from embryo induced carrot cells. Plant and Cell Physiol. **15**:875-81.
- GREIDZIAK, N., DIETRICH, B., LUCKNER, M. (1990) Batch cultures of somatic embryos of *Digitalis lanata* in gaslift fermenters. Development and cardenolide accumulation. Planta Medica. **56**:175-8.
- GUERN, J. (1987) Regulation from within: The hormone dilemma. Annals of Botany. Supplement 4. **60**:75-102.
- GUPTA, P.K. & DURZAN, D.J. (1988) Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. BIO/TECHNOLOGY. **5**(Feb.):147-51.
- HACCIUS, B. (1978) Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. Phytomorphology. **28**:74-81.
- HALPERIN, W. (1967) Population density effects on embryogenesis in carrot-cell cultures. Experimental Cell Research. **48**:170-3.
- HALPERIN, W. (1966) Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Amer J Bot. **53**:443-53.
- HALPERIN, W. (1964) Morphogenetic studies with partially synchronized cultures of carrot embryos. SCIENCE. **146**:408-10.
- HALPERIN, W. & WETHERELL, D.F. (1965) Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. Nature (London). **205**(Jan):519-20.
- HALPERIN, W. & WETHERELL, D.F. (1964a) Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Amer J Bot. **51**:274-83.
- HALPERIN, W. & WETHERELL, D.F. (1964b) Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. SCIENCE. **147**:756-8.
- HAMALAINEN, J.J., KURTÉN, U., KAUPPINEN, V. (1993) Classification of plant somatic embryos by computer vision. Biotech&Bioeng. **41**:35-42.
- HAMMEL, K.E., CORNWELL, K.L., BASSHAM, J.A. (1979) Stimulation of dark CO₂ fixation by ammonia in isolated mesophyll cells of *Papaver somniferum* L.

Plant and Cell Physiol. 20(8):1523-9.

HARI, V. (1980) Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis. Z Pflanzenphysiol. 96:227-31.

HARRELL, R.C., BIENIEK, M., CANTLIFFE, D.J. (1992) Noninvasive evaluation of somatic embryogenesis. Biotech&Bioeng. 39:378-83.

HATZOPOULOS, P., FONG, F., SUNG, Z.R. (1990) Absciscic acid regulation of DC8, a carrot embryonic gene. Plant Physiol. 94:690-5.

HU, C. & WANG, P. (1986) Embryo culture: Technique and applications. In EVANS, SHARP & AMMIRATO éds. Handbook of Plant Cell Culture. Vol 4: Techniques and Applications. Pp 43-96.

HUANG, L-C., CHI, C-M., VITS, H., STABA, J., COOKE, T.J., HU, W-S. (1993) Population and biomass kinetics in fed-batch cultures of *Daucus carota* L. somatic embryos. Biotech&Bioeng. 41:811-8.

HUANG, L-C., VITS, H., STABA, E.J., COOKE, T.J., HU, W-S. (1992) Effect of cultivation age and embryo size on specific oxygen uptake rate in developing somatic embryos of *Daucus carota* L. Biotechnology Letters. 14(8):701-6.

HUANG, L-C. & MURASHIGE, T. (1976) Plant tissue culture media: Major constituents, their preparation and some applications. TCA Manual. 3(1):539-48.

HUSSEY, G. (1983) *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops. In MANTELL & SMITH éds. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. Pp 111-138.

IIDA, Y., WATABE, K-I., KAMADA, H., HARADA, H. (1992) Effects of absciscic acid on the induction of dessication tolerance in carrot somatic embryos. J Plant Physiol. Vol 140. Pp 356-60.

JACOBSEN, H-J. (1991) Somatic embryogenesis in seed legumes: The possible role of soluble auxin receptors. Israel Journal of Botany. 40:139-43.

JANICK, J., KITTO, S.L., KIM, Y-H. (1989) Production of synthetic seed by desiccation and encapsulation. In Vitro Cellular Dev Biol. 25:1167-72.

JANSEN, M.A.K., BOOIJ, H., SCHEL, JAN H.N., De VRIES, S.C. (1990) Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. Plant Cell Reports. 9(4):221-3.

JAY, V., GENESTIER, S., COURDUROUX, J-C. (1994) Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36:205-9.

JAY, V., GENESTIER, S., COURDUROUX, J-C. (1992) Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures. Plant Cell Reports. 11:605-8.

JOERSBO, M., ANDERSEN, J.M., OKKELS, F.T., RAJAGOPAL, R. (1989) Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. Physiologia Plantarum. 76:10-16.

JOHANSSON, L. & ERIKSSON, T. (1984) Effects of carbon dioxide in anther cultures. Physiol Plant. 60:26-30.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J., ARCHAMBAULT, J. (1992) Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotech&Bioeng. 39:511-21.

JONES, L.H. (1974a) Factors influencing embryogenesis in carrot cultures (*Daucus carota* L). Ann Bot. 38:1077-88.

JONES, L.H. (1974b) Long term survival of embryoids of carrot (*Daucus carota* L). Plant Science Letters. 2:221-4.

KAMADA, H., TACHIKAWA, Y., SAITOU, T., HARADA, H. (1994) Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. Plant Tissue Culture Letters. 11(3):229-32.

KAMADA, H., ISHIKAWA, K., SAGA, H., HARADA, H. (1993) Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. Plant Tissue Culture Letters. 10(1):38-44.

KAMADA, H., KOBAYASHI, K., KIYOSUE, T., HARADA, H. (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. In Vitro Cellular Dev Biol. 25(12):1163-6.

KAMADA, H. & HARADA, H. (1984a) Changes in nitrate reductase activity during somatic embryogenesis in carrot. Biochem Physiol Pflanzen. 179:403-10.

KAMADA, H. & HARADA, H. (1984b) Changes in endogenous amino acid compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. Plant and Cell Physiol. 25(1):27-38.

KAMADA, H. & HARADA, H. (1981) Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. Plant and Cell Physiol. 22(8):1423-9.

KAMADA, H. & HARADA, H. (1979a) Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures: (Part I) Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. Z Pflanzenphysiol. 91:255-66.

KAMADA, H. & HARADA, H. (1979b) Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures: (Part II) Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. Z Pflanzenphysiol. 91:453-63.

KAMEN, A.A., CHAVARIE, C., ANDRÉ, G., ARCHAMBAULT, J. (1992) Design parameters and performance of a surface baffled helical ribbon impeller bioreactor for the culture of shear sensitive cells. Chemical Engineering Science. Vol 47. No 9-11. Pp 2375-80.

KAMEN, A.A., TOM, R.L., CARON, A.W., CHAVARIE, C., MASSIE, B., ARCHAMBAULT, J. (1991) Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotech&Bioeng. 38:619-28.

KAMEYA, T. & UCHIMIYA, H. (1972) Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. Planta(Berlin). 103:356-60.

KELLER, G.L., NIKOLAU, B.J., ULRICH, T.H., WURTELE, E.S. (1988) Comparison of starch and ADP-glucose pyrophosphorylase levels in nonembryogenic cells and developing embryos from induced carrot cultures. Plant Physiol. 86: 451-6.

KENNEDY, A.H., CHAMBERLAIN, D., WILSON, G., RYAN, M.F. (1991) Volatiles identified from five stages of embryo development separated from a heterogeneous suspension culture of *Daucus carota*. Plant Cell Reports. 10:435-8.

- KERMODE, A.R., BEWLEY, J.D., DASGUPTA, J., SANTOSH, M. (1986) The transition from seed development to germination: A key role for desiccation? HortScience. 21(5):1113-8.
- KESSELL, R.H.J., GOODWIN, C., PHILP, J., FOWLER, M.W. (1977) The relationship between dissolved oxygen concentration, ATP and embryogenesis in carrot (*Daucus carota*) tissue cultures. Plant Science Letters. 10:265-74.
- KESSELL, R.H.J. & CARR, A.H. (1972) The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*). Journal of Experimental Botany. Vol 23. 77:996-1007.
- KHAN, A.J. & MINOCHA, S.C. (1991) Polyamines and somatic embryogenesis in carrot (Part II): the effects of cyclohexylammonium phosphate. J Plant Physiol. 137:446-52.
- KIELLY, G.A. & BOWLEY, S.R. (1992) Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. Genome. 35:474-7.
- KIM, Y-H. & JANICK, J. (1990) Synthetic seed technology: Improving desiccation tolerance of somatic embryos of celery. Acta Hort. 280:23-8.
- KIM, Y-H. & JANICK, J. (1989) ABA and polyox-encapsulation or high humidity increases survival of desiccated somatic embryos of celery. HortScience. 24(4):674-6.
- KITTO, S.L. & JANICK, J. (1985a) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. J Amer Soc Hort Sci. 110(2):277-82.
- KITTO, S.L. & JANICK, J. (1985b) Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. J Amer Soc Hort Sci. 110(2):283-6.
- KIYOSUE, T., SATOH, S., KAMADA, H., HARADA, H. (1993a) Somatic embryogenesis in higher plants. J of Plant Research (Special Issue). 3:75-82.
- KIYOSUE, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., KAMADA, H., HARADA, H. (1993b) cDNA cloning of ECP40, an embryogenic-cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. Plant Molecular Biology. 21:1053-68.

KIYOSUE, T., NAKAYAMA, J., SATOH, S., ISOGAI, A., SUZUKI, A., KAMADA, H., HARADA, H. (1992a) Partial amino-acid sequence of EPC31, a carrot embryogenic-cell protein, and enhancement of its accumulation by abscisic acid in somatic embryos. Planta. **186**:337-42.

KIYOSUE, T., NAKAJIMA, M., YAMAGUCHI, I., SATOH, S., KAMADA, H., HARADA, H. (1992b) Endogenous levels of abscisic acid in embryogenic cells, non-embryogenic cells and somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.). Biochem Physiol Pflanzen. **188**:343-7.

KIYOSUE, T., SATOH, S., KAMADA, H., HARADA, H. (1992c) Immunological detection of an embryogenic-cell protein (ECP31) during stress-induced somatic embryogenesis in carrot. Can J Bot. **70**:651-3.

KIYOSUE, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., HIGASHI, K., SATOH, S., KAMADA, H., HARADA, H. (1992d) Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. Plant Molecular Biology. **19**:239-49.

KIYOSUE, T., SATOH, S., KAMADA, H., HARADA, H. (1991) Purification and immuno-histochemical detection of an embryogenic cell protein in carrot. Plant Physiol. **95**:1077-83.

KIYOSUE, T., TAKANO, K., KAMADA, H., HARADA, H. (1990a) Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metals ions. Can J Bot. **68**(10): 2301-3.

KIYOSUE, T., DONG, J.G., SATOH, S., KAMADA, H., HARADA, H. (1990b) Detection of an embryogenic cell antigen in carrot. Plant Cell Physiol. **31**(7): 947-50.

KIYOSUE, T., KAMADA, H., HARADA, H. (1989a) Induction of somatic embryogenesis from carrot seeds by hypochlorite treatment. Plant Tissue Culture Letters. **6**(3):138-43.

KIYOSUE, T., KAMADA, H., HARADA, H. (1989b) Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. Plant Tissue Culture Letters. **6**(3):162-4.

KOMAMINE, A., KAWAHARA, R., MATSUMOTO, M., SUNABORI, S., TOYA, T., FUJIWARA, A., TSUKAHARA, M., SMITH, J., ITO, M., FUKUDA, H., NOMURA, K.,

- FUJIMURA, T. (1992) Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, biochemistry, and molecular biology. In Vitro Cell Dev Biol. 28P:11-4.
- KREIS, W. & REINHARD, E. (1989) The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors. Planta Medica. 55:409-16.
- KRIKORIAN, A.D. (1982) Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. Biological Reviews. 57:151-218.
- KREUGER, M. & VAN HOLST, G-J. (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. Planta. 189:243-8.
- KURKDJIAN, A. & GUERN, J. (1989) Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 40:271-303.
- KURZ, W.G.W. (1986) Biological and environmental factors of product synthesis, accumulation, and biotransformation by plant cell cultures. New-Zealand J Technol. 2:77-81.
- KVAALEN, H. & VON ARNOLD, S. (1991) Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27:49-57.
- LAI, F-M. & MCKERSIE, B.D. (1993) Effect of nutrition on maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L) somatic embryos. Plant Science. 91(1):87-95.
- LAI, F-M., SENARATNA, T., MCKERSIE, B.D. (1992) Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. Plant Science. 87(1):69-77.
- LARKIN, P.J., BRETTELL, R.I.S., RYAN, S.A., DAVIES, P.A., PALLOTTA, M.A., SCOWCROFT, W.R. (1985) Somaclonal variation: Impact on plant biology and breeding strategies. In ZAITLIN, DAY & HOLLAENDER éds. Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties. Academic Press: NY. Pp 83-100.
- Le DEUNFF (1993) Conclusions and future. Chapter 24 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 453-461.

LEHNINGER, Albert L. (1982) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York. 1011 pages.

LEVI, A. & SINK, K.C. (1990) Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in asparagus. J Plant Physiol. **137**: 184-9.

LEVIN, R., GABA, V., TAL, B., HIRSCH, S., De NOLA, D., VASIL, I.K. (1988) Automated plant tissue culture for mass propagation. BIO/TECHNOLOGY. **6**(Sept):1035-40.

LEVINE, M. (1950) The growth of normal plant tissue in vitro as affected by chemical carcinogens and plant growth substances: I - The culture of the carrot taproot meristem. Amer J Bot. **37**:445-8.

LEVINE, M. (1947) Differentiation of carrot tissue grown in vitro. Bull Torrey Bot Club. **74**:321-8.

LI, X-Q. (1993) Somatic embryogenesis and synthetic seed technology using carrot as a model system. Chapter 16 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 289-304.

LIU, C-M., XU Z-H., CHUA, N-H. (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. The Plant Cell. **5**(June):621-30.

LIU, J.R., JEON, J.H., YANG, S.G., LEE, H.S., SONG, N.H., JEONG, W.J. (1992) Dry type of carrot (*Daucus carota* L) artificial seeds. Scientia Horticulturae. **51**:1-11.

LOSCHIAVO, F., FILIPPINI, F., COZZANI, F., VALLONE, D., TERZI, M. (1991) Modulation of auxin-binding proteins in cell suspensions. I - Differential responses of carrot embryo cultures. Plant Physiol. **97**:60-4.

LOSCHIAVO, F., GIULIANO, G., De VRIES, S.C., GENGA, A., BOLLINI, R., PITTO, L., COZZANI, F., NUTI-RONCHI, V., TERZI, M. (1990) A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. Mol Gen Genet. **223**:385-93.

LOSCHIAVO, F., PITTO, L., GIULIANO, G., TORTI, G., NUTI-RONCHI, V., MARAZZITI, D., VERGARA, R., ORSELLI, S., TERZI, M. (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theor Appl Genet. 77(3):325-31.

LUTZ, J.D., WONG, J.R., ROWE, J., TRICOLI, D.M., LAWRENCE, R.H. Jr (1985) Somatic embryogenesis for mass cloning of crop plants. In HENKE, HUGHES, CONSTANTIN & HOLLAENDER éds. Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Plenum. New York. Pp 105-16.

MA, H., McMULLEN, M.D., FINER, J.J. (1994) Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. Plant Molecular Biology. 24:465-73.

MARIANI, P., ROSSI, V., De PAOLI, G. (1992) Germination of eggplant encapsulated somatic embryos. Abstract In DATTÉE éd. Biologie de la Reproduction et Amélioration des Plantes. Livre des résumés et des posters. XIIIème Congrès EUCARPIA. Angers, France. Pp 361-2.

MARTIN, S.M. (1980a) Environmental factors: B) Temperature, Aeration, and pH. In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Fl. Chapter 6(B). Pp 143-8.

MARTIN, S.M. (1980b) Mass culture systems for plant cell suspensions. In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Florida. Chap 7. Pp 149-66.

MASUDA, K., TAKAHASHI, S., NOMURA, K., INOUE, M. (1991) A simple procedure for the isolation of pure nuclei from carrot embryos in synchronized cultures. Plant Cell Reports. 10:329-33.

MAUREL, B. & PAREILLEUX, A. (1986) Carbone dioxide fixation and growth of heterotrophic cell suspensions of *Catharanthus roseus*. J Plant Physiol. 122:347-55.

MAUREL, B. & PAREILLEUX, A. (1985) Effect of carbone dioxide on the growth of cell suspensions of *Catharanthus roseus*. Biotechnol Lett. 7:313-8.

- MCDONALD, K.A. & JACKMAN, A.P. (1989) Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. Plant Cell Reports. **8**:455-8.
- McKERSIE, B.D., SENARATNA, T., BOWLEY, S.R., BROWN, D.C.W., KROCHKO, J.E., BEWLEY, J.D. (1989) Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L). In Vitro Cellular Dev Biol. **25**(12):1183-8.
- McWILLIAM, A.A., SMITH, S.M., STREET, H.E. (1974) The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). Ann Bot. **38**:243-50.
- MEIJER, E.G.M. (1989) Developmental aspects of ethylene biosynthesis during somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa*. Journal of Experimental Botany. **40**(213):479-84.
- MEIJER, E.G.M. & BROWN, D.C.W. (1987) Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell Tissue Organ Culture. **10**:11-9.
- MICHALCZUK, L., COOKE, T.J., COHEN, J.D. (1992) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry. **31**(4):1097-1103.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N. & SCHWENDIMAN, J. (1992) Histology of somatic embryogenesis. In DATTÉE, DUMAS & GALLAIS eds. Reproductive Biology and Plant Breeding (Biologie de la Reproduction et Amélioration des Plantes). Springer-Verlag. XIIIth EUCARPIA Congress. Angers, France. Pp 247-59.
- MICHLER, C.H. & LINEBERGER, R.D. (1987) Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **11**:189-207.
- MILLER, R. & MELICK, M. (1987) Modeling Bioreactors. Chemical Engineering. New York. **94**(2):111-20.
- MINOCHA, S.C., PAPA, N.S., KHAN, A.J., SAMUELSEN, A.I. (1991) Polyamines and somatic embryogenesis in carrot: Part III - Effects of Methylglyoxal-bis (guanylhyazone). Plant Cell Physiol. **32**(3):395-402.

MOHANTY, B.D. (1992) Synchronization of somatic embryogenesis in Tea (*Thea sinensis* L.). In HAMMERSCHLAG et al. (Organizers). Symposium on in vitro culture and horticultural breeding. Baltimore, Maryland. p 64.

MOLLE, F., DUPUIS, J.M., DUCOS, J.P., ANSELM, A., CROLUS-SAVIDAN, I., PETIARD, V., FREYSSINET, G. (1993) Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. Chapter 15 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 257-87.

MONTAGUE, M.J., ARMSTRONG, T.A., JAWORSKI, E.G. (1979) Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*: Part II - Changes in arginine decarboxylase activity. Plant Physiol. 63:341-5.

MONTAGUE, M.J., KOPPENBRINK, J.W., JAWORSKI, E.G. (1978) Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*: Part I - Changes in intracellular content and rates of synthesis. Plant Physiol. 62:430-3.

MURASHIGE, T. (1978) The impact of plant tissue culture on agriculture. In THORPE éd. Frontiers of Plant Tissue Culture. Calgary Univ Press. Alberta. Canada. Pp 15-26.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473-97.

NAKAGAWA, K., MIURA, Y., FUKUI, H., TABATA, M. (1982) Clonal propagation of medicinal plants through the induction of somatic embryogenesis from the cultured cells. In FUJIWARA éd. Plant Tissue Culture. Proc 5th Intl Cong of Plant Tissue and Cell Culture. Tokyo:Maruzen. Pp 701-2.

NESIUS, K.K. & FLETCHER, J.S. (1975) Contribution of nonautotrophic carbon dioxide fixation to protein synthesis in suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Plant Physiology. 55:643-5.

NESIUS, K.K. & FLETCHER, J.S. (1973) Carbon dioxide and pH requirements of non-photosynthetic tissue culture cells. Plant Physiology. 28:259-63.

NEWCOMB, W. & WETHERELL, D.F. (1970) The effects of 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue cultures. Bot Gaz. 131:242-45.

NICKELL, L.G. (1980) Products. Chapter 10 In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 235-269.

NISHIMURA, S., TERASHIMA, T., HIGASHI, K., KAMADA, H. (1993) Bioreactor culture of somatic embryos for mass propagation of plants. Chapter 10 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 175-81.

NOMURA, K. & KOMAMINE, A. (1986a) Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology. 3:456-66.

NOMURA, K. & KOMAMINE, A. (1986b) Somatic embryogenesis in cultured carrot cells. Develop Growth Differ. 28(6):511-7.

NOMURA, K. & KOMAMINE, A. (1986c) Polarized DNA synthesis and cell division in cell clusters during somatic embryogenesis from single carrot cells. New Phytol. 104:25-32.

NOMURA, K. & KOMAMINE, A. (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at high frequency in a carrot suspension culture. Plant Physiol. 79:988-91.

NOUAILLE, C. & PETIARD, V. (1988) Semences artificielles: Rêves et réalités. Biofutur. 67(avril):33-8.

NOVAK, F.J., ALZA, R., VAN DUREN, M., PEREA-DALLAS, M., CONGER, B.V., XIAOLONG, T. (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp). BIO/TECHNOLOGY. 7:154-9.

NUUTILA, A.M., KURTÉN, U., 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. 24:73-7.

OZAWA, K., LING, D.H., KOMAMINE, A. (1991) A two-dimensional electrophoretic analysis of protein during somatic embryo formation in cell suspension cultures of *Oryza*. Poster #P-1156 In 1992 World Congress on Cell and Tissue Culture. In Vitro Cellular & Develop Biology. Part II. 28(3):129A.

OZIAS-AKINS, P. & VASIL, I.K. (1985) Nutrition of plant tissue cultures. In VASIL éd. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Volume 2. Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation, and Cryopreservation. Academic Press. Pp 129-147.

PANDA, A.K., MISHRA, S., BISARIA, V.S., BHOJWANI, S.S. (1989) Plant cell reactors: A perspective. Enzyme Microb Technol. 11(July):386-97.

PARK, J.M., HU, W-S., STABA, J.E. (1989) Cultivation of *Artemisia annua* L. plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source. Biotech&Bioeng. 34:1209-13.

PATTERSON, W.I., CARREAU, P.J., YAP, C.Y. (1979) Mixing with helical-ribbon agitators. Part II - Newtonian fluids. AIChE Journal. 25(3):508-16.

PAYNE, G.F., DAVISON, S.W., TATE, J.L. (1990) Experimental constraints to studying the effects of dissolved oxygen and dissolved carbon dioxide on plant cell growth. Developments in Industrial Microbiology (J of Ind Microbiology). Suppl #5. 31:293-301.

PENNELL, R.I., JANNICHE, L., SCOFIELD, G.N., BOOIJ, H., De VRIES, S.C., ROBERTS, K. (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. J Cell Biology. 119(5):1371-80.

PÉPIN, M.F. (1996) Étude de l'étape de croissance de cellules de *Vitis vinifera* cultivées en bioréacteur pour la production d'anthocyanes. Thèse de Doctorat en génie chimique. École Polytechnique de Montréal.

PÉPIN, M.F., CORMIER, F., CHAVARIE, C., ARCHAMBAULT, J. (1995) Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspensions cultures. I - Shake flasks cultures. Biotech&Bioeng. 47:131-8.

PREIL, W., FLOREK, P., WIX, U., BECK, A. (1988) Towards mass propagation by use of bioreactors. Acta Horticulturae. 226:99-106.

PROKOP, A., ROSENBERG, M.Z. (1989) Bioreactor for mammalian cell culture. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 39:29-71.

PUUPPONEN-PIMIA, R., SALOHEIMO, M., VASARA, T., RA, R., GAUGEZ, J., KURTEN, U., KNOWLES, J.K.C., KERANEN, S., KAUPPINEN, V. (1993) Characterization of a birch (*Betula pendula* Roth.) embryogenic gene, *BP8*. Plant Molecular Biology. 23(2):423-8.

RACUSEN, R.H. & SCHIAVONE, F.M. (1988) Detection of spatially- and stage-specific proteins in extracts from single embryos of the domesticated carrot. Development. 103:665-74.

RAGHAVAN, V. (1980) Embryo Culture. Chapter 18 In International Review of Cytology. Supplement 11-B: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Academic Press. Pp 209-40.

RANCH, J.P. (1993) The potential for synthetic soybean seed. Chapter 18 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 330-50.

RAVEN, J.A. (1985) Regulation of pH and generation of osmolarity in incomplet vascular plants: A cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. New Phytol. 101:25-77.

RAVEN, J.A. & SMITH, F.A. (1974) Significance of hydrogen ion transport in plant cells. Can J Bot. 52:1035-48.

REDENBAUGH, K. (1993) Introduction. Chapter 1 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 3-10.

REDENBAUGH, K. (1990) Application of artificial seed to tropical crops. HortScience. 25(3):251-5.

REDENBAUGH, K., SLADE, D., VISS, P., FUJII, J.A. (1987a) Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. Hort Science. 22(5):803-9.

REDENBAUGH, K., VISS, P., SLADE, D., FUJII, J.A. (1987b) Scale-up: Artificial Seeds. In GREEN, SOMERS, HACKETT & BIESBOER éds. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R Liss:New York. Pp 473-93.

REDENBAUGH, K., PAASCH, B.D., NICHOL, J.W., KOSSLER, M.E., VISS, P.R., WALKER, K.A. (1986) Somatic seeds: Encapsulation of asexual plant embryos.

BIO/TECHNOLOGY. 4(Sept):797-801.

REINERT, J. (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. Naturwissenschaften. 46:344-5

REINERT, J. (1967) Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucus carota*. Phytomorphology. 17(March-Dec):510-6.

ROBERTS, D.R., WEBSTER, F.B., FLINN, B.S., LAZAROFF, W.R., CYR, D.R. (1993) Somatic embryogenesis of spruce. Chapter 23 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 427-50.

ROBIE, C.A. & MINOCHA, S.C. (1989) Polyamines and somatic embryogenesis in carrot: I- The effects of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine. Plant Science. 65(1):45-54.

RODRIGUEZ, D.L., LOMAX, K.M., KITTO, S.L. (1988) Purification and concentration of somatic carrot embryos. Abstract #605. HortScience. 23(3)Section 2:147.

ROSS, J.H.E. & MURPHY, D.J. (1993) Differential accumulation of storage products in developing seeds and somatic cell cultures of *Daucus carota* L. Plant Science. 88:1-11.

ROUSTAN, J-P., LATCHE, A., FALLOT, J. (1990a) Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. Biologia Plantarum(PRAHA). 32(4):273-6.

ROUSTAN, J-P., LATCHE, A., FALLOT, J. (1990b) Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action: Effect of arginine decarboxylase activity. Plant Science. 67(1):89-95.

ROUSTAN, J-P., LATCHE, A., FALLOT, J. (1989a) Effet de l'acide salicylique et de l'acide acétylsalicylique sur la production d'éthylène et l'embryogenèse somatique de suspensions cellulaires de carotte (*Daucus carota* L.). Comptes Rendus des Séances. Académie des Sciences (Paris). Série III. Sciences de la Vie. 308:395-9.

ROUSTAN, J-P., LATCHE, A., FALLOT, J. (1989b) Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. Plant Cell Reports. **8**:182-5.

SANADA, M., SAKAMOTO, Y., HAYASHI, M., MASHIKO, T., OKAMOTO, A., OHNISHI, N. (1993) Celery and lettuce. Chapter 17 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 305-27.

SATOH, S., KAMADA, H., HARADA, H., FUJII, T. (1986) Auxin-controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells. Plant Physiol. **81**:931-3.

SCHENK, R.U. & HILDEBRANDT, A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot. **50**:199-204.

SCHIAVONE, F.M. & RACUSEN, R.H. (1990) Microsurgery reveals regional capabilities for pattern reestablishment in somatic carrot embryos. Developmental Biology. **141**:211-9.

SCHIAVONE, F.M. & COOKE, T.J. (1987) Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: Developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. Cell Differentiation. **21**:53-62.

SCHIAVONE, F.M. & COOKE, T.J. (1985) A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell cultures. Can J Bot. **63**:1573-8.

SCOWCROFT, W.R., BRETTELL, R.I.S., RYAN, S.A., DAVIES, P.A., PALLOTTA, M.A. (1987) Somaclonal variation and genomic flux. In GREEN, SOMERS, HACKETT & BIESBOER éds. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R Liss:New York. Pp 275-86.

SCRAGG, A.H. & FOWLER, M.W. (1985) The mass culture of plant cells. In VASIL éd. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 2. Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation, and Cryopreservation. Academic Press. Pp 103-28.

SEABROOK, J.E.A. (1980) Laboratory Culture. Chapter 1 In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp

1-20.

SEIBERT, M. & KADKADE, P.G. (1980) Environmental factors:A) Light. Chapter 6(A) In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 123-42.

SENGUPTA, C. & RAGHAVAN, V. (1980a) Somatic embryogenesis in carrot cell sus-pension: Part I - Pattern of protein and nucleic acid synthesis. Journal of Experimental Botany. 31(120):247-58.

SENGUPTA, C. & RAGHAVAN, V. (1980b) Somatic embryogenesis in carrot cell sus-pension: Part II - Synthesis of ribosomal RNA and poly(A)⁺RNA. Journal of Experimental Botany. 31(120):259-68.

SHARP, W.R., EVANS, D.A., SONDAHL, M.R. (1982) Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In FUJIWARA éd. Plant Tissue Culture. Proc 5th Intl Cong of Plant Tissue & Cell Culture. Tokyo. Pp 759-62.

SHARP, W.R., SONDAHL, M.R., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B. (1980) The physiology of *In Vitro* asexual embryogenesis. Hortic Rev. 2:268-310.

SINGH, M. & KRIKORIAN, A.D. (1980) Chelated iron in culture media. Ann Bot. 46:807-9.

SKRIVER, K. & MUNDY, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. The Plant Cell. 2(June):503-12.

SLAY, R.M., GRIMES, H.D., HODGES, T.K. (1989) Plasma membrane proteins associated with undifferentiated and embryonic *Daucus carota* tissue. Protoplasma. 150:139-49.

SMITH, D.L. & KRIKORIAN, A.D. (1990a) Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: External pH control over morphogenesis. American Journal of Botany. 77(12):1634-47.

SMITH, D.L. & KRIKORIAN, A.D. (1990b) Low external pH replaces 2,4-D in maintaining and multiplying 2,4-D-initiated embryogenic cells of carrot. Physiologia Plantarum. 80:329-36.

SMITH, D.L. & KRIKORIAN, A.D. (1990c) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: Evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Cell Reports. 9:34-7.

SMITH, D.L. & KRIKORIAN, A.D. (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. Amer J Bot. 76(12):1832-43.

SMITH, D.L. & KRIKORIAN, A.D. (1988) Production of somatic embryos from carrot tissues in hormone-free medium. Plant Science. 58:103-10.

SMITH, F.A. & RAVEN, J.A. (1976) H⁺ transport and regulation of cell pH. In LÜTTGE & PITTMAN éds. Transport in Plants II. Part A: Cells. Springer-Verlag, New-York. Pp 317-46.

SMITH, J.M., DAVISON, S.W., PAYNE, G.F. (1990) Development of a strategy to control the dissolved concentrations of oxygen and carbon dioxide at constant shear in a plant cell bioreactor. Biotech&Bioeng. 35(11):1088-1101.

SMITH, M.A.L., SPOMER, L.A., MEYER, M.J., MCCLELLAND, M.T. (1989) Non-invasive image analysis evaluation of growth during plant micropropagation. Plant Cell Tissue & Organ Culture. 19:91-102.

SMITH, S.M. & STREET, H.E. (1974) The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann Bot. 38:223-41.

SPIELER, H., ALFERMANN, A.W., REINHARD, E. (1985) Biotransformation of B-methyldigitoxin by cell cultures of *Digitalis lanata* in airlift and stirred tank reactors. Appl Microbiol Biotechnol. 23:1-4.

STABA, E.J. (1980) Secondary metabolism and biotransformation. Chapter 3 In STABA éd. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 59-98.

STACEY, N.J., ROBERTS, K., KNOX, J.P. (1990) Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during embryogenesis in *Daucus carota* L. Planta(Berlin). 180(2):285-92.

STEHSEL, M.L. & CAPLIN, S.M. (1969) Sugars: Autoclaving vs sterile filtration on the growth of carrot root tissue in culture. Life Sciences. 8(Part II):1255-9.

STERK, P. & De VRIES, S.C. (1993) Molecular markers for plant embryos. Chapter 7 In REDENBAUGH éd. SYNSEEDS. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. Boca Raton, Fla. Pp 115-32.

STERK, P., BOOIJ, H., SCHELLEKENS, G.A., VAN KAMMEN, A., De VRIES S.C. (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. Plant Cell. 3:907.

STERK, P., BOOIJ, H., CORDEWENER, J., VAN ENGELEN, F., De VRIES, S.C., VAN KAMMEN, A. (1989) Carrot somatic embryogenesis depends on the presence of correctly glycosylated extracellular proteins. Journal of Cellular Biochemistry. Supplement (13 Part D):290. Abstract #M252.

STEWART, F.C., AMMIRATO, P.V., MAPES, M.O. (1970) Growth and development of totipotent cells: Some problems, procedures, and perspectives. Ann Bot. 34:761-87.

STEWART, F.C. (1967) Totipotency of angiosperm cells its significance for morphology and embryology. Phytomorphology. 17(March-Dec):499.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., KENT, A.E., HOLSTEN, R.D. (1964) Growth and development of cultured plant cells. SCIENCE. 143:20-7.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., SMITH, J. (1958a) Growth and organized development of cultured cells. I- Growth and division of freely suspended cells. Amer J Bot. 45:693-704.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K. (1958b) Growth and organized development of cultured cells. II- Organization in cultures grown from freely suspended Cells. Amer J Bot. 45:705-8.

STEWART, F.C. (1958c) Growth and organized development of cultured cells. III- Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. Amer J Bot. 45:709-13.

STRICKLAND, S.G., NICHOL, J.W., McCALL, C.M., STUART, D.A. (1987) Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. Plant Science. 48:113-21.

STUART, D.A., STRICKLAND, S.G., WALKER, K.A. (1987) Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. HortScience. 22(5):800-3.

STUART, D.A., NELSEN, J., McCALL, C.M., STRICKLAND, S.G., WALKER, K.A. (1985a) Physiology of the development of somatic embryos in cell cultures of alfalfa and celery. In ZAITLIN, DAY & HOLLAENDER éds. Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties. Academic Press: NY. Pp 35-47.

STUART, D.A., NELSEN, J., STRICKLAND, S.G., NICHOL, J.W. (1985b) Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. In HENKE, HUGHES, CONSTANTIN & HOLLAENDER éds. Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Plenum. NY. Pp 59-73.

STUART, D.A. & STRICKLAND, S.G. (1984a) Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L: I) The role of amino acid additions to the regeneration medium. Plant Science Letters. 34:165-74.

STUART, D.A. & STRICKLAND, S.G. (1984b) Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L: II) The interaction of amino acids with ammonium. Plant Science Letters. 34:175-81.

STYER, D.J. (1985) Bioreactor technology for plant propagation. In HENKE, HUGHES, CONSTANTIN & HOLLAENDER éds. Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Plenum. NY. Pp 117-30.

SUNG, Z.R. & OKIMOTO, R. (1983) Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots. Proc Natl Acad Sci USA. 80:2661-5.

SUNG, Z.R. & OKIMOTO, R. (1981) Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. Proc Natl Acad Sci USA. 78(6):3683-7.

SUSSEX, I.M. (1972) Somatic embryos in long-term carrot tissue cultures: Histology, cytology, and development. Phytomorphology. 22:50-8.

SUSSEX, I.M. & FREI, K.A. (1968) Embryoid development in long-term tissue cultures of carrot. Phytomorphology. 18(Sept):339-49.

TAKAHASHI, N. (1986) Introduction. Chapter 1 In TAKAHASHI éd. Chemistry of Plant Hormones. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 1-7.

TAN, S.K., KAMADA, H., HARADA, H. (1994) Phosphoproteins in carrot embryogenic cells. Abstract#307(3aE09) In Plant Cell Physiology. 35(Supplement).

TANAKA, H. (1987) Large-scale cultivation of plant cells at high density: A review. Process Biochemistry. Aug:106-13.

TANAKA, H., NISHIJIMA, F., SUWA, M., IWAMOTO, T. (1983) Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotech&Bioeng. 25:2359-70.

TANAKA, H. (1982) Oxygen transfer in broths of plant cells at high density. Biotech&Bioeng. 24:425-42.

TANAKA, H. (1981) Technological problems in cultivation of plant cells at high density. Biotech&Bioeng. 23:1203-8.

TATE, J.L. & PAYNE, G.F. (1991) Plant cell growth under different levels of oxygen and carbon dioxide. Plant Cell Reports. 10:22-5.

TATICEK, R.T., MOO-YOUNG, M., LEGGE, R.L. (1991) The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 24:139-58.

TAUTORUS, T.E., LULSDORF, M.M., KIKCIO, S.I., DUNSTAN, D.I. (1992) Bioreactor culture of black spruce (*Picea mariana* Mill) and interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) somatic embryos. Poster In KASHA et al (Organizers). Proceedings of the 3rd Canadian workshop on Plant Tissue Culture and Genetic Engineering. Guelph, June 1992. p 36.

TAY, L-F., KHOH, L-K., LOH, C-S., KHOR, E. (1993) Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. Biotech&Bioeng. 42:449-54.

TAZAWA, M. & REINERT, J. (1969) Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. Protoplasma. 68:157-73.

THOMAS, T.L. & WILDE, D. (1987) Analysis of carrot somatic embryo gene expression programs. In GREEN, SOMERS, HACKETT & BIESBOER éds. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R Liss:New York. Pp 83-93.

THORPE, T.A. (1988) In Vitro Somatic Embryogenesis. ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences. 1(1):81-8.

THORPE, T.A. (1980) Organogenesis *in Vitro*: Structural, physiological, and biochemical aspects. Chapter 4 In International Review of Cytology. Supplement 11-A: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Academic Press. Pp:71-111.

TIANRAN, L. & NEUMANN, K-H. (1985) Embryogenesis and endogenous hormone content of cell cultures of some carrot varieties (*Daucus carota* L.). Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 98:227-35.

TIMBERT, R., BARBOTIN, J-N., KERSULEC, A., BAZINET, C., THOMAS, D. (1995) Physico-chemical properties of the encapsulation matrix and germination of carrot somatic embryos. Biotech&Bioeng. 46:573-8.

TIMMERS, A.C.J., De VRIES, S.C., SCHEL, J.H.N. (1989) Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). Protoplasma. 153:24-9.

TISSERAT, B., ESAN, E.B., MURASHIGE, T. (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. Horticultural Reviews. 1:1-78.

ULRICH, T.U., WURTELE, E.S., NIKOLAU, B.J. (1990) Sequence of EMB-1, an mRNA accumulating specifically in embryos of carrot. Nucleic Acids Research. 18(9):2826.

UOZUMI, N., YOSHINO, T., SHIOTANI, S., SUEHARA, K.I., ARAI, F., FUKUDA, T., KOBAYASHI, T. (1993) Application of image anlysis with neural network for plant somatic embryo culture. J Fermentation Bioengineering. 76(6): 505-9.

VAIN, P., FLAMENT, P., SOUDAIN, P. (1989) Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. J Plant Physiol. 135: 537-40.

VAN ENGELEN, F.A. & De VRIES, S.C. (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. Trends Genet. 8:66-70.

VASIL, I.K. (1988) Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. BIO/TECHNOLOGY. 6:397-402.

VASIL, I.K. (1987) Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. J Plant Physiol. 128:193-218.

VASIL, I.K. & VASIL, V. (1980) Clonal Propagation. Chapter 6 In International Review of Cytology. Supplement 11-A: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Academic Press. Pp:145-73.

VERMA, D.C. & DOUGALL, D.K. (1977) Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. Plant Physiol. 59:81-5.

WALKER, K.A. & SATO, S.J. (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Culture. 1:109-21.

WARREN, G.S. & FOWLER, M.W. (1981) Physiological interactions during the initial stages of embryogenesis in cultures of *Daucus carota* L. New Phytol. 87:481-6.

WARREN, G.S. & FOWLER, M.W. (1979) Changing fatty acid composition during somatic embryogenesis in cultures of *Daucus carota*. Planta. 144:451-4.

WARREN, G.S. & FOWLER, M.W. (1978) Cell number and cell doubling times in the development of carrot embryoids in suspension culture. Experientia. 34:356.

WARREN, G.S. & FOWLER, M.W. (1977) A physical method for the separation of various stages in the embryogenesis of carrot cell cultures. Plant Science Letters. 9:71-6.

WETHERELL, D.F. (1984) Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. Plant Cell Tissue Organ Culture. 3:221-7.

- WETHERELL, D.F. & DOUGALL, D.K. (1976) Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physio Plant. 37:97-103.
- WETTER, L.R. & CONSTABEL, F., eds. (1982) Plant Tissue Culture Methods. 2nd Ed. National Research Council of Canada. PRL, Saskatoon. 145 pages.
- WILDE, H.D., NELSON, W.S., BOOIJ, H., De VRIES, S.C., THOMAS, T.L. (1988) Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. Planta. 176:205-11.
- WIGGANS, S.C. (1954) Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. Amer J Bot. 41:321-6.
- WILLIAMS, E.G. & MAHESWARAN, G. (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Annals of Botany. 57:443-62.
- WOCHOK, Z.S. & BURLESON, B. (1974) Isoperoxidase activity and induction in cultured tissues of wild carrot: A comparison of proembryos and embryos. Physiol Plant. 31:73-5.
- WURTELE, E.S., WANG, H., DURGERIAN, S., NIKOLAU, B.J., ULRICH, T.H. (1993) Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. Plant Physiol. 102:303-12.
- WURTELE, E.S., KELLER, G.L., NIKOLAU, B.J., ULRICH, T.H. (1988) Quantitation of starch and ADP-glucose pyrophosphorylase in non-embryogenic cells and embryogenic cell clusters from carrot suspension cultures. J Plant Physiol. 132:683-9.
- YANG, S.F. (1985) Biosynthesis and action of ethylene. HortScience. 20:41-5.
- YANG, S.F. & HOFFMAN, N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann Rev Plant Physiol. 35:155-89.
- YAP, C.Y., PATTERSON, W.I., CARREAU, J.P. (1979) Mixing with helical-ribbon agitators. Part III: Non-newtonian fluids. AIChE Journal. 25(3):516-21.

YOKOI, H., KOGA, J., YAMAMURA, K., SEIKE, Y., TANAKA, H. (1993) High density cultivation of plant cells in a new aeration-agitation type fermentor, Maxblend Fermentor^R. J of Fermentation and Bioengineering. 75(1):48-52.

ZIMMERMAN, J.L., APUYA, N., DARWISH, K., O'CARROLL, C. (1989) Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development. The Plant Cell. 1(12):1137-46

ANNEXE I: FIGURES COMPLÉMENTAIRES À LA SOUS-SECTION 5.2.2

Parmi les six séries de cuvées effectuées au cours de la seconde partie du travail expérimental, trois des cinq cuvées de la série J sont utilisées à la sous-section 5.2.2 pour illustrer une PRODUCTION TYPIQUE d'embryons somatiques de la lignée SP1b. Ainsi la quinzaine de figures présentées à la sous-section 5.2.2 concernent surtout les résultats de ces trois cuvées. Or les mêmes mesures et les mêmes traitements de données ont été effectués pour toutes les cuvées de toutes les séries. La présente annexe vise à compléter les figures de la sous-section 5.2.2 en rendant compte de résultats mesurés et de tendances observées dans les cinq autres séries de cuvées, dont principalement des cuvées en bioréacteurs. Les sections I.1 à I.13 sont nommées en fonction des figures de la sous-section 5.2.2 auxquelles elles correspondent afin de permettre une référence simple et directe, alors que par soucis de clarté une figure est ici identifiée d'après le numéro de sa section et l'ordre dans lequel elle y apparaît.

I.1 COMPLÉMENT AUX FIGURES 5.3, 5.4 et 5.5

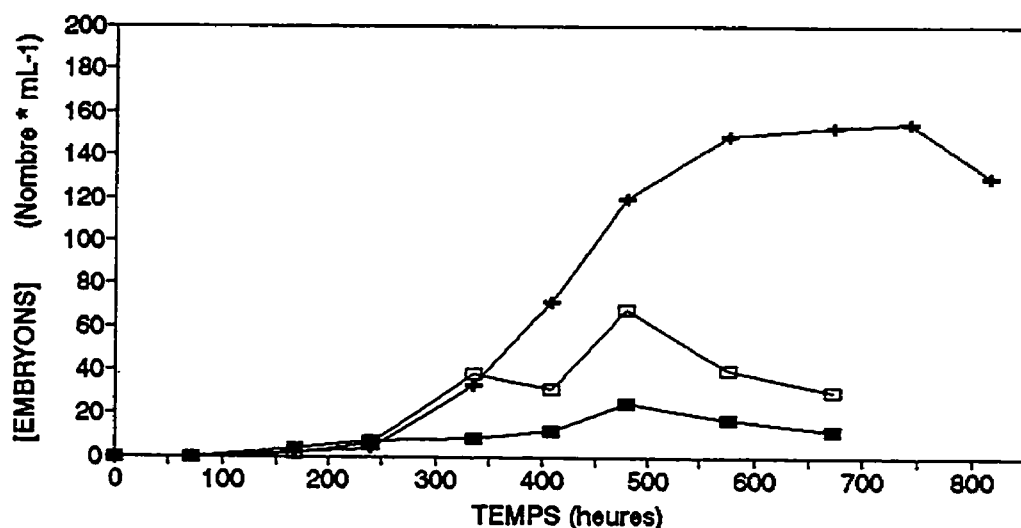


Figure I.1.1
Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série K

Bioréacteur (K, [NH₄⁺]_{INITIALE} = 5 mM) : +
Témoin (T29, [NH₄⁺]_{INITIALE} = 5 mM) : □
Contrôle (T30, [NH₄⁺]_{INITIALE} = 2 mM) : ■

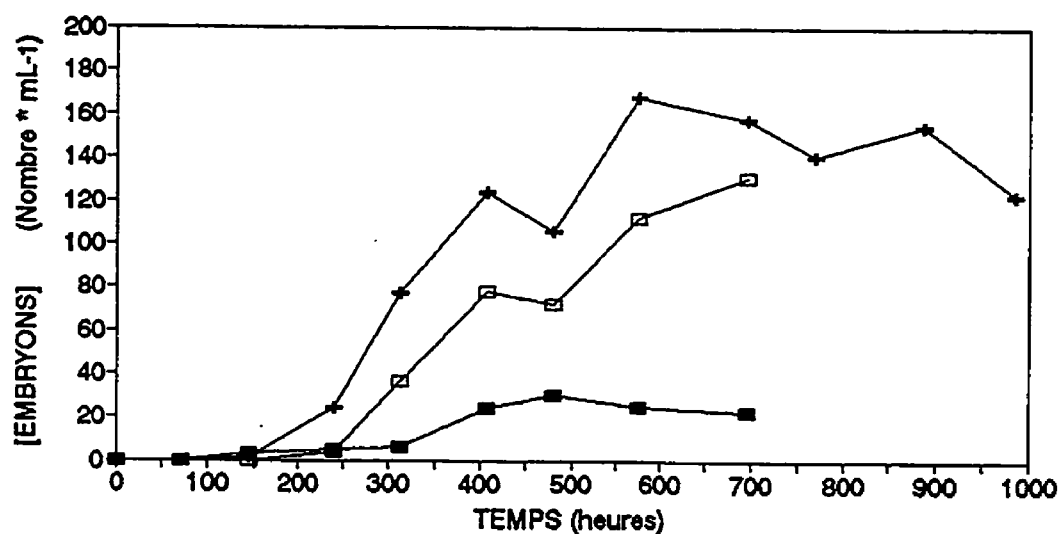


Figure I.1.2
Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série I

Bioréacteur (I, [NH₄⁺]_{INITIALE} = 10 mM) : +
Témoin (T20, [NH₄⁺]_{INITIALE} = 10 mM) : □
Contrôle (T23, [NH₄⁺]_{INITIALE} = 2 mM) : ■

I.1 COMPLÉMENT AUX FIGURES 5.3, 5.4 et 5.5 (suite)

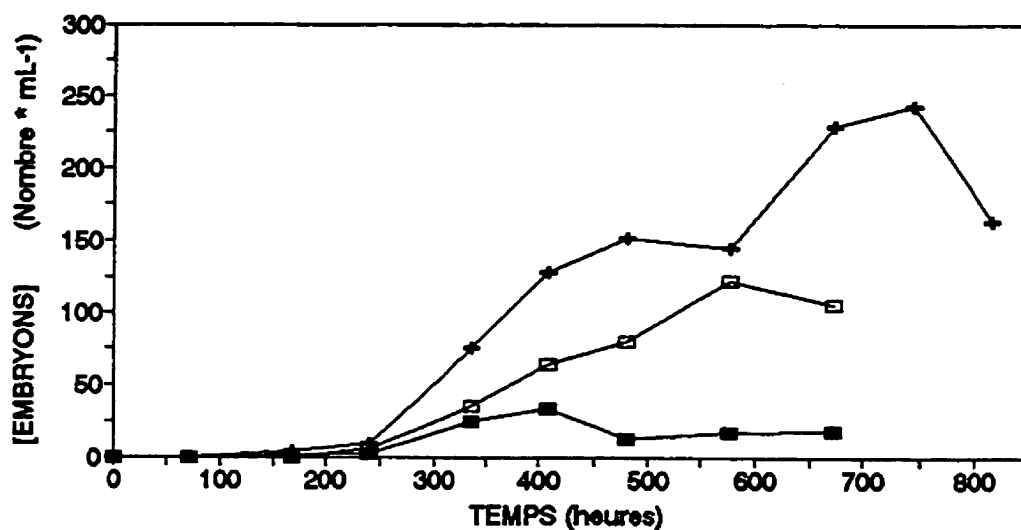


Figure I.1.3
Concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour trois cuvées de la série L

Bioréacteur (L, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=20 \text{ mM}$) : +
Témoin (T34, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=20 \text{ mM}$) : □
Contrôle (T36, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=2 \text{ mM}$) : ■

I.2 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.6-(A)

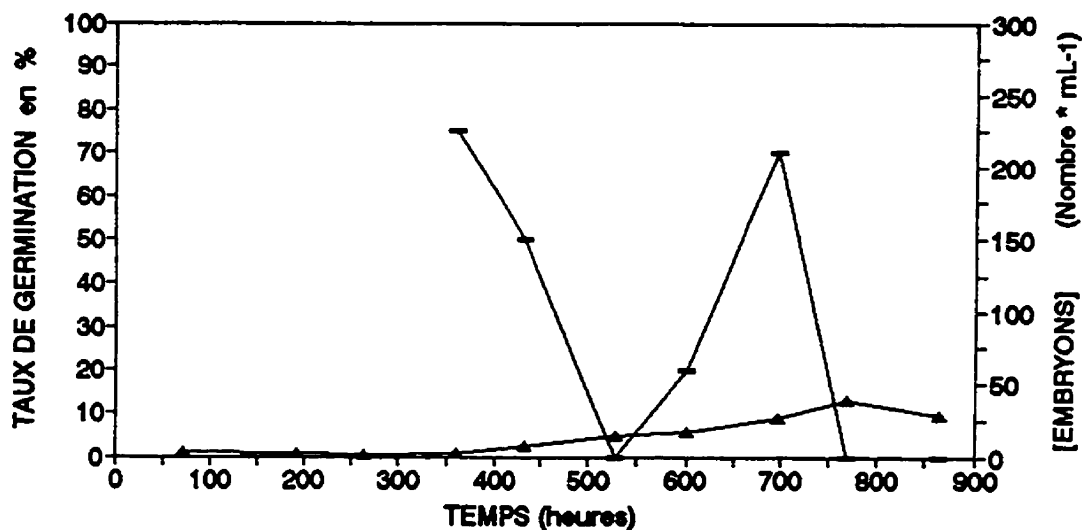


Figure I.2.1
Taux de germination et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}= 0 \text{ mM}$) en bioréacteur
Taux de germination en % : — [embryons somatiques] : ▲

I.2 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.6-(A) (suite)

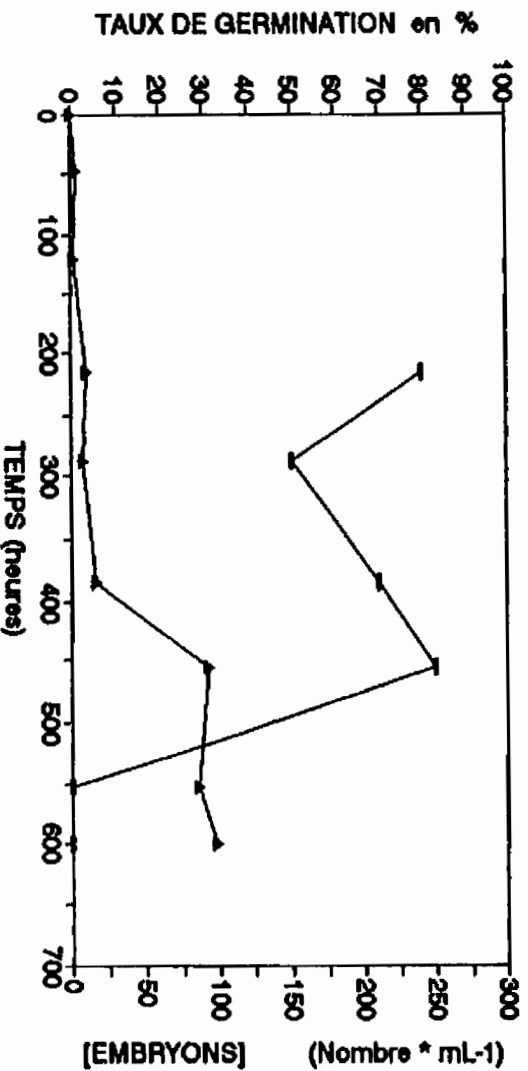


Figure I.2.2
Taux de germination et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{initiale}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur
Taux de germination en % : [embryons somatiques] : ▲

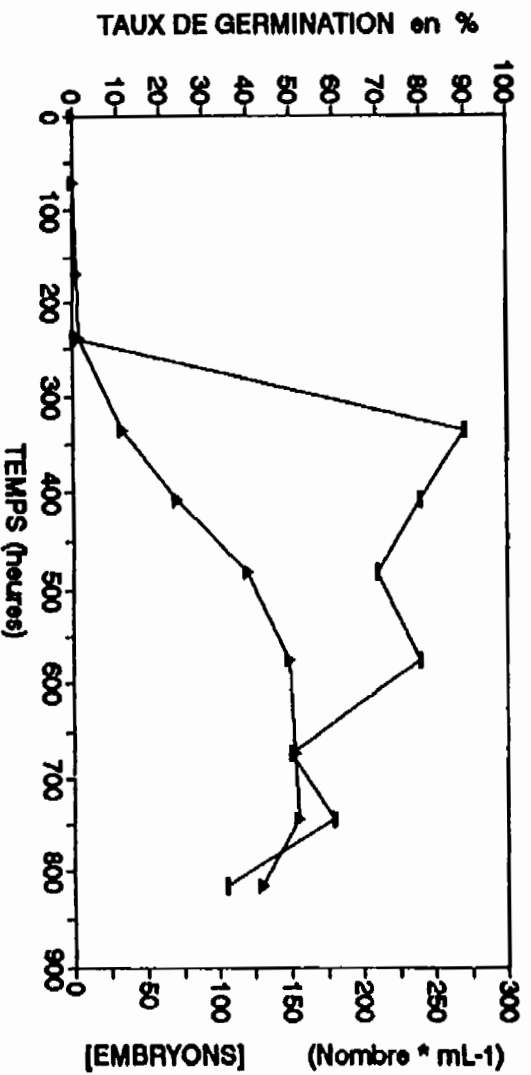


Figure I.2.3
Taux de germination et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{initiale}} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur
Taux de germination en % : [embryons somatiques] : ▲

I.2 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.6-(A) (suite)

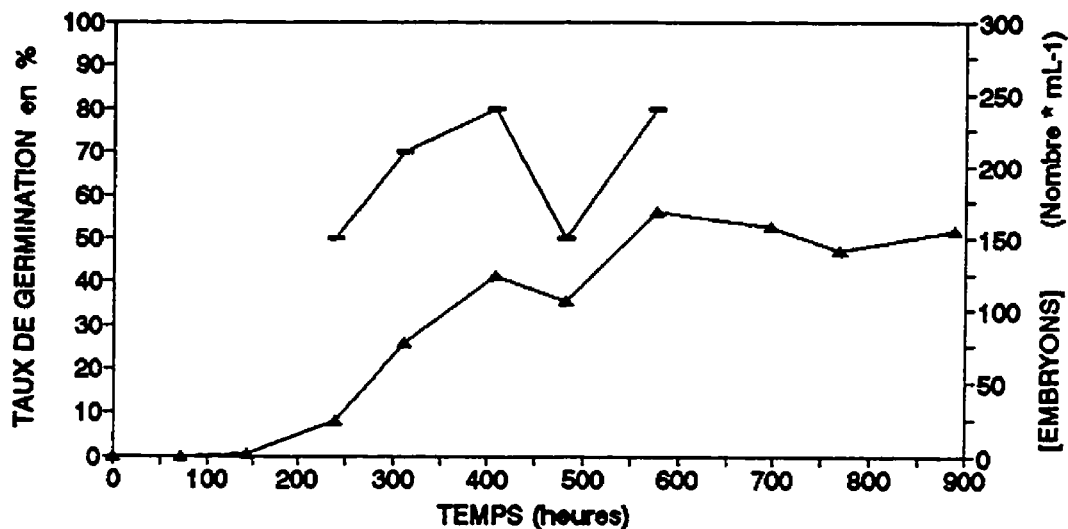


Figure I.2.4

Taux de germination et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) en bioréacteur

Taux de germination en % : — [embryons somatiques] : ▲

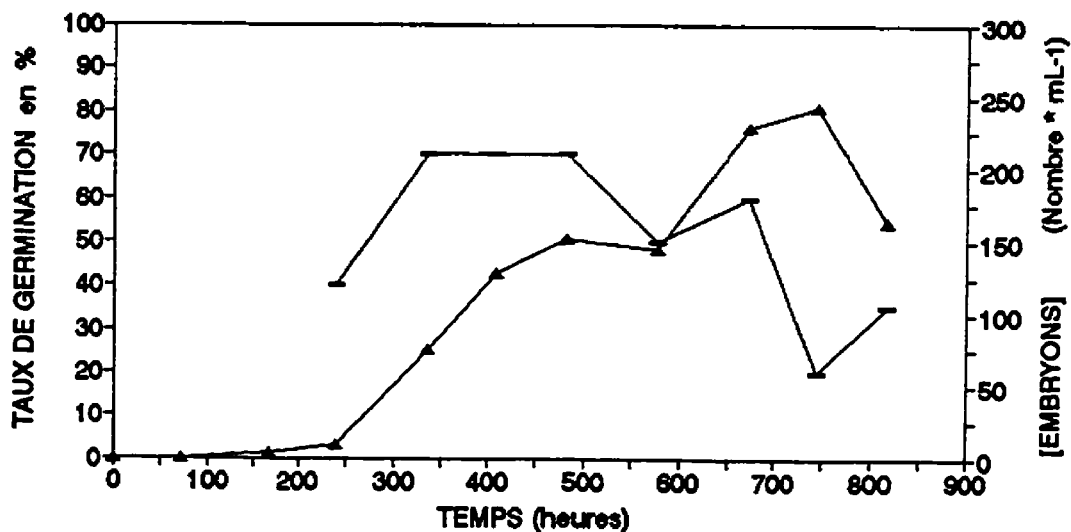


Figure I.2.5

Taux de germination et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) en bioréacteur

Taux de germination en % : — [embryons somatiques] : ▲

I.3 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.7

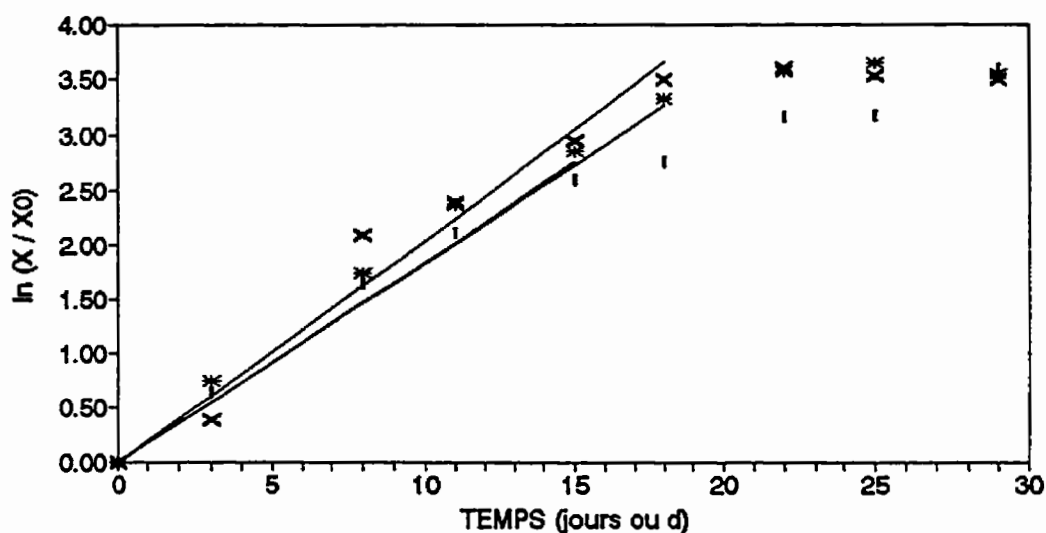


Figure I.3.1

μ_{MOYEN} pour 3 cuvées de la série G estimé par régression linéaire (____)

Bioréacteur (G, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) : |

Témoin (T17, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) : *

Contrôle (T19, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

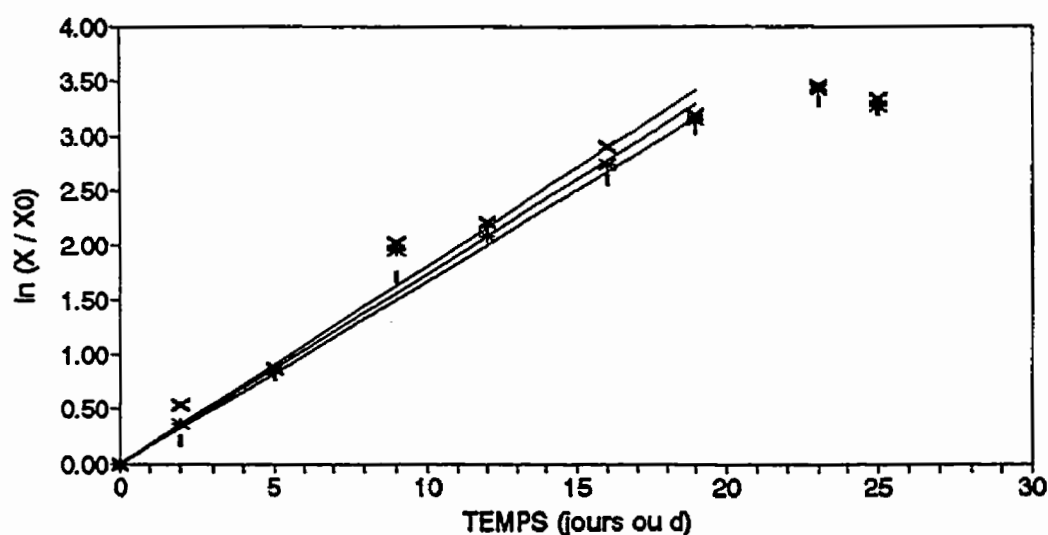


Figure I.3.2

μ_{MOYEN} pour 3 cuvées de la série E estimé par régression linéaire (____)

Bioréacteur (E, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : |

Témoin (T10, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : *

Témoin (T11, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

I.3 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.7 (suite)

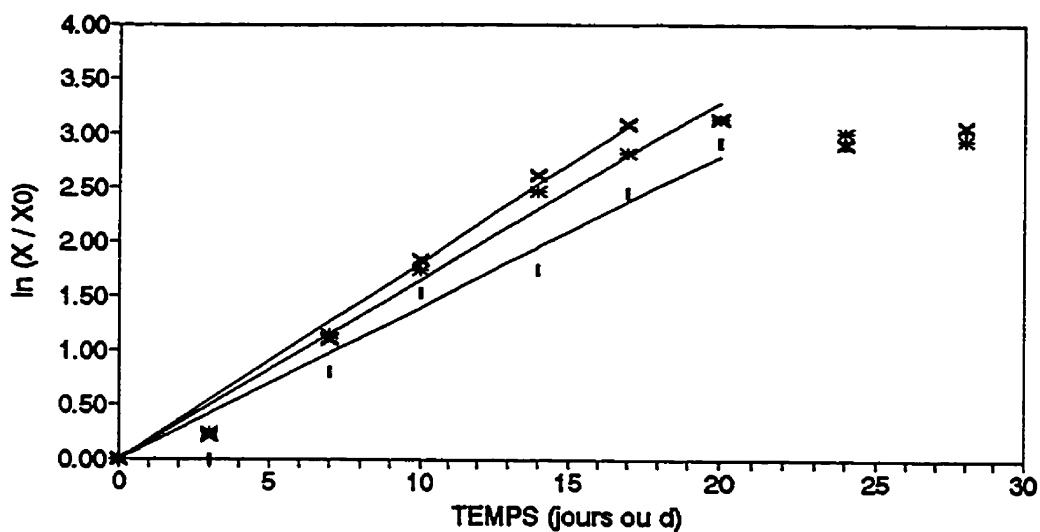


Figure I.3.3

μ_{MOYEN} pour 3 cuvées de la série K estimé par régression linéaire (____)

Bioréacteur (K, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) : |

Témoin (T29, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) : *

Contrôle (T30, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

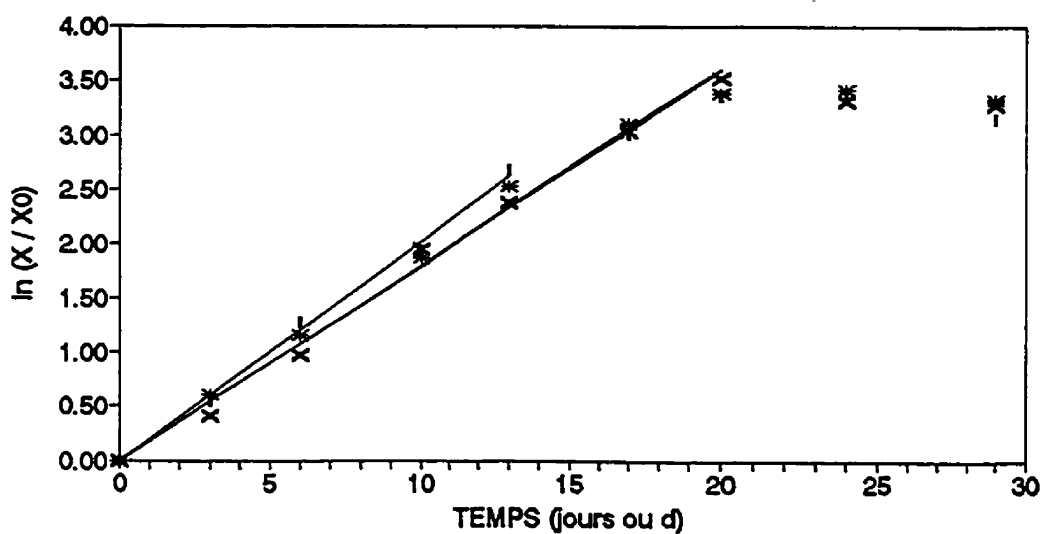


Figure I.3.4

μ_{MOYEN} pour 3 cuvées de la série I estimé par régression linéaire (____)

Bioréacteur (I, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) : |

Témoin (T20, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) : *

Contrôle (T23, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

I.3 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.7 (suite)

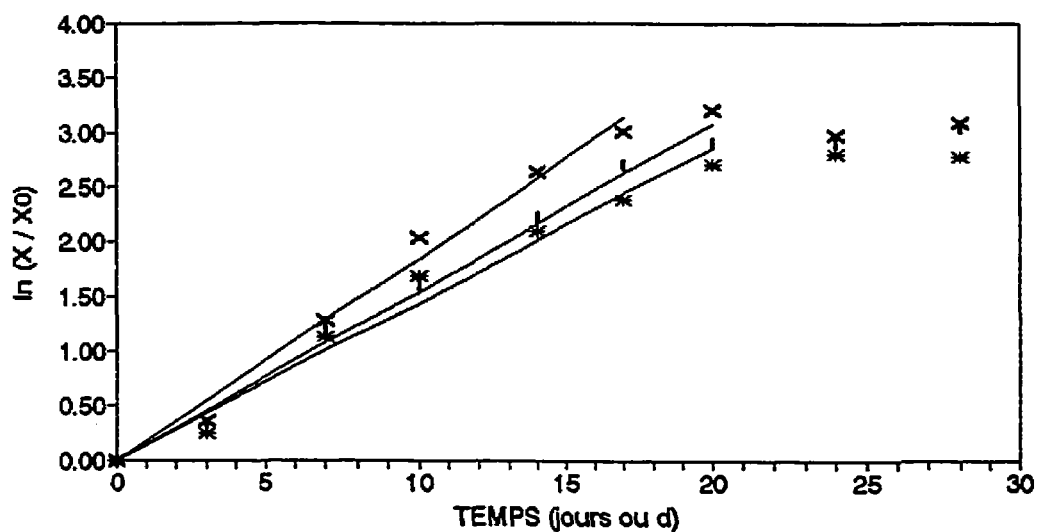


Figure I.3.5

μ_{MOYEN} pour 3 cuvées de la série L estimé par régression linéaire (—)

Bioréacteur (L, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) : |

Témoïn (T34, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) : *

Contrôle (T36, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : X

I.4 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.8

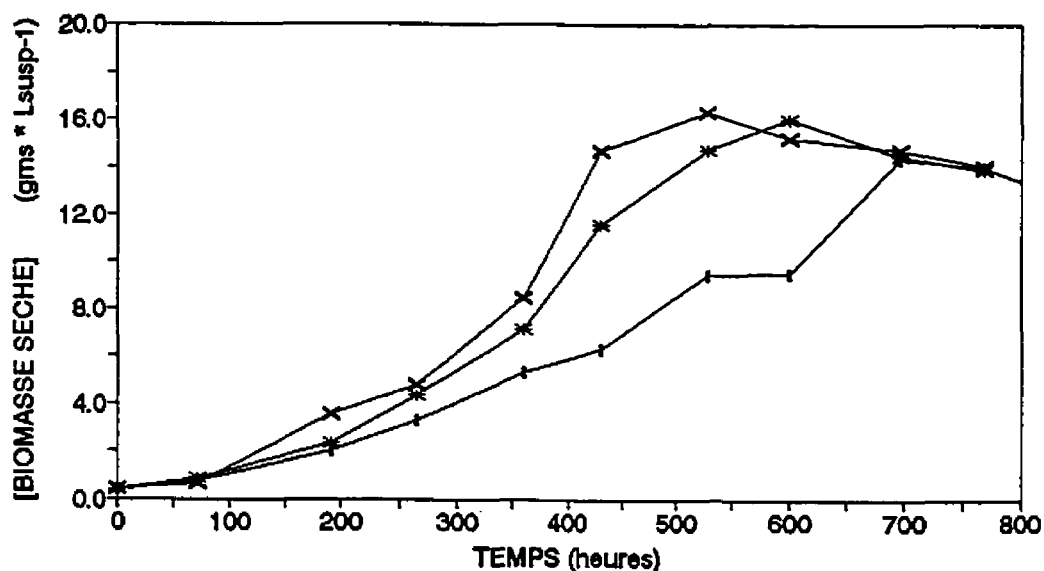


Figure I.4.1

Concentration de biomasse sèche en fonction du temps pour trois cuvées de la série G

Bioréacteur (G, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) : |

Témoïn (T17, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) : *

Contrôle (T19, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : X

I.4 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.8 (suite)

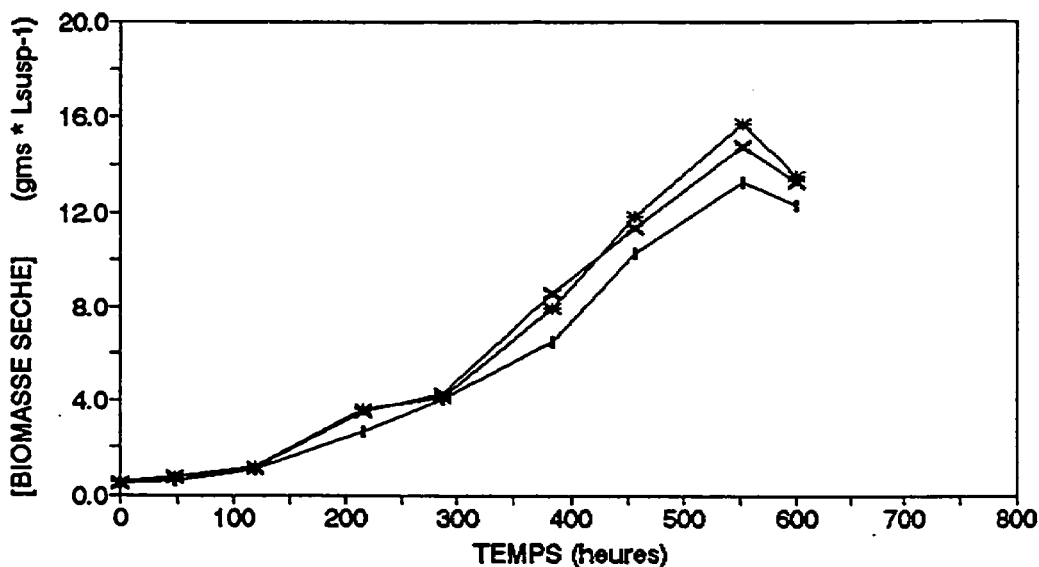


Figure I.4.2

Concentration de biomasse sèche en fonction du temps pour trois cuvettes de la série E

Bioréacteur (E, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : |
 Témoin (T10, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : *
 Témoin (T11, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

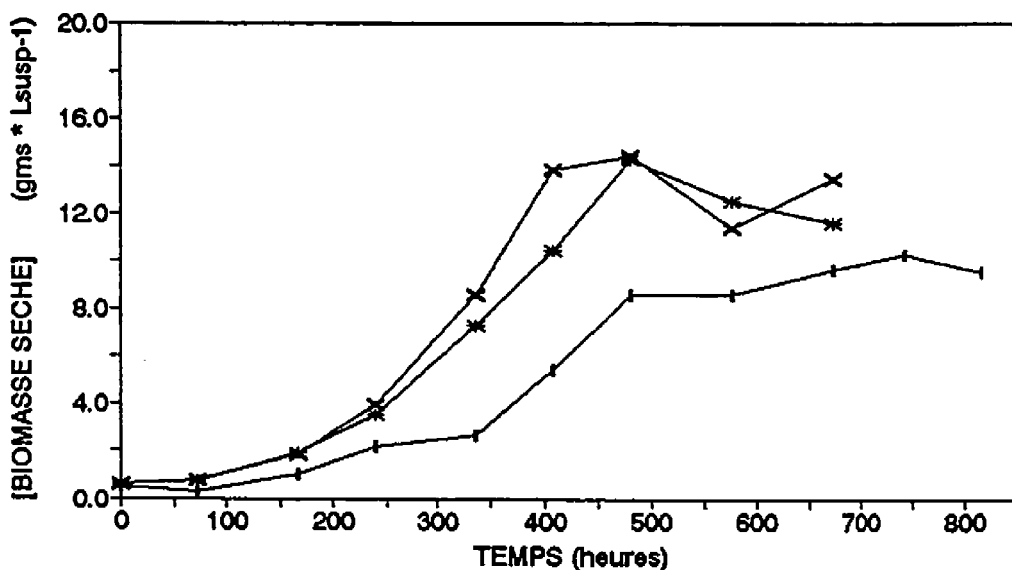


Figure I.4.3

Concentration de biomasse sèche en fonction du temps pour trois cuvettes de la série K

Bioréacteur (K, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) : |
 Témoin (T29, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) : *
 Contrôle (T30, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

I.4 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.8 (suite)

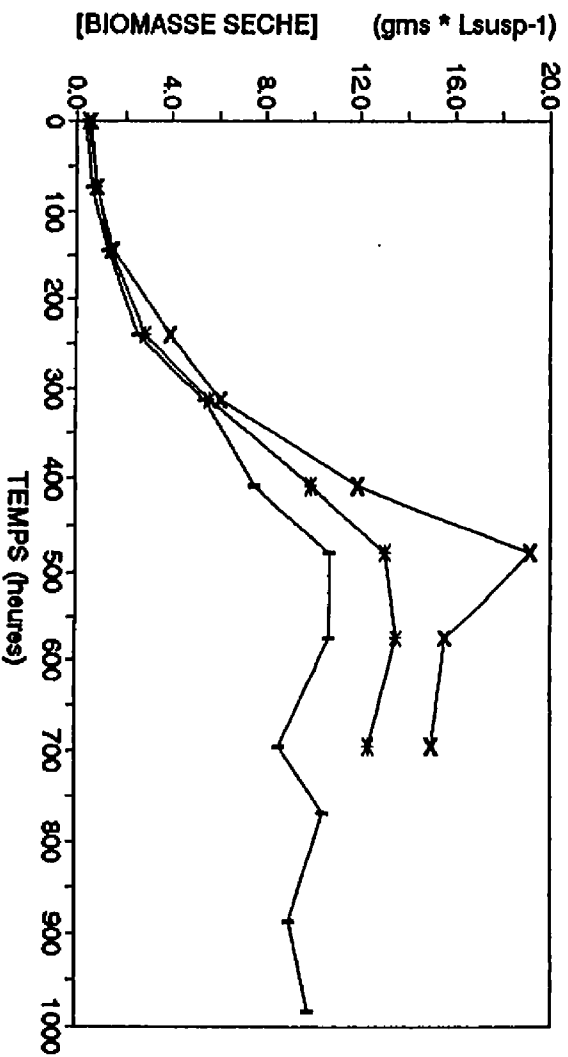


Figure I.4.4
Concentration de biomasse sèche en fonction du temps pour trois cuvettes de la série I

Bioréacteur (I, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) : |
Témoin (T20, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) : *
Contrôle (T23, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

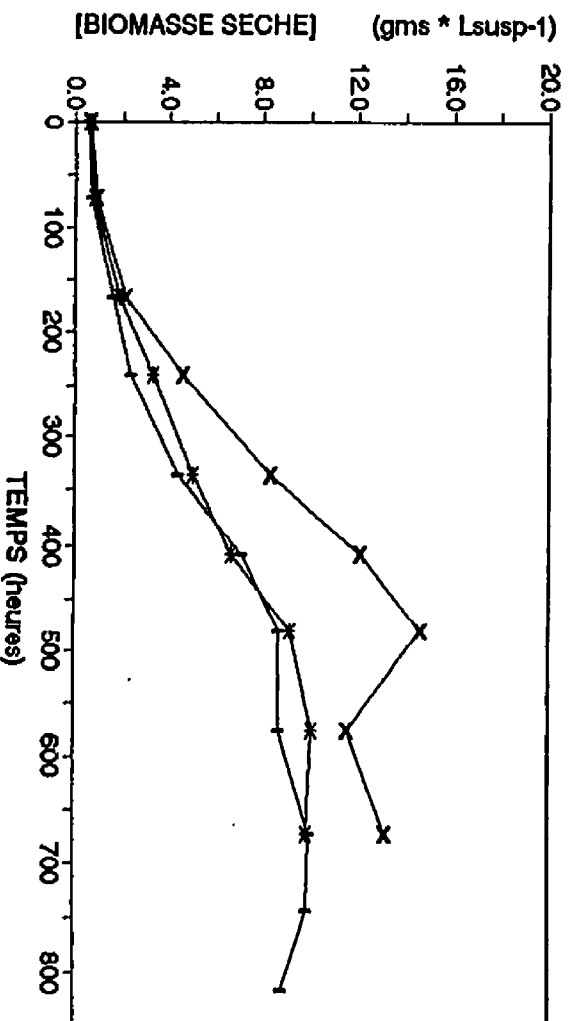


Figure I.4.5
Concentration de biomasse sèche en fonction du temps pour trois cuvettes de la série L

Bioréacteur (L, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) : |
Témoin (T34, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) : *
Contrôle (T36, $[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) : x

I.5 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.9-(A)

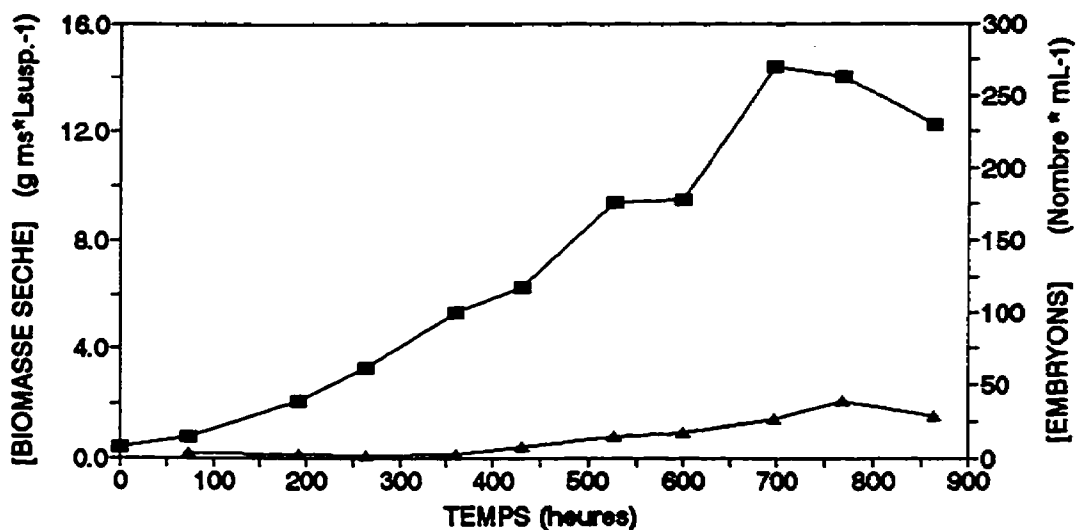


Figure I.5.1
Concentrations de biomasse sèche et d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons] : ▲ [biomasse sèche] : ■

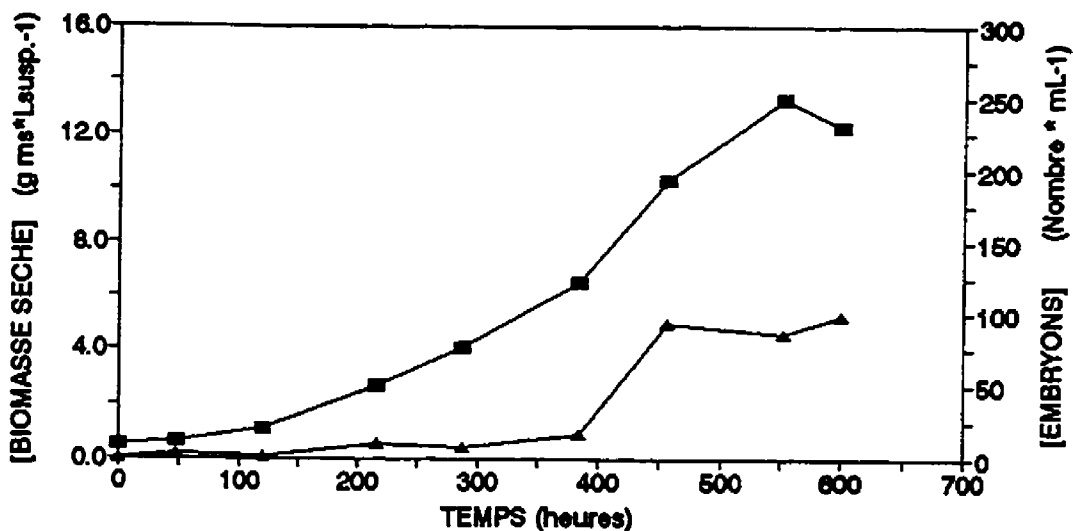


Figure I.5.2
Concentrations de biomasse sèche et d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons] : ▲ [biomasse sèche] : ■

I.5 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.9-(A) (suite)

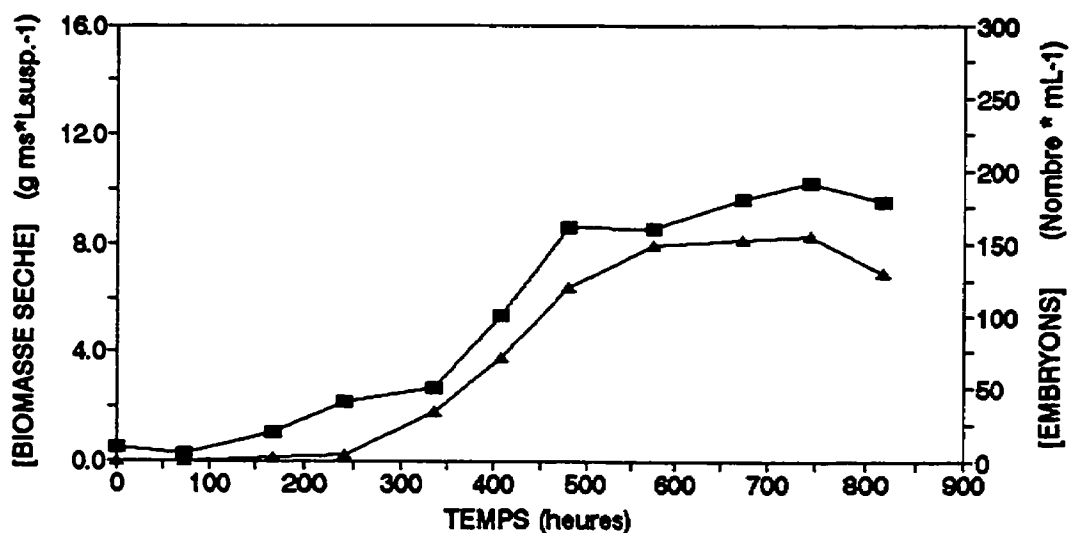


Figure I.5.3
Concentrations de biomasse sèche et d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons] : $\blacktriangle$ [biomasse sèche] : $\blacksquare$

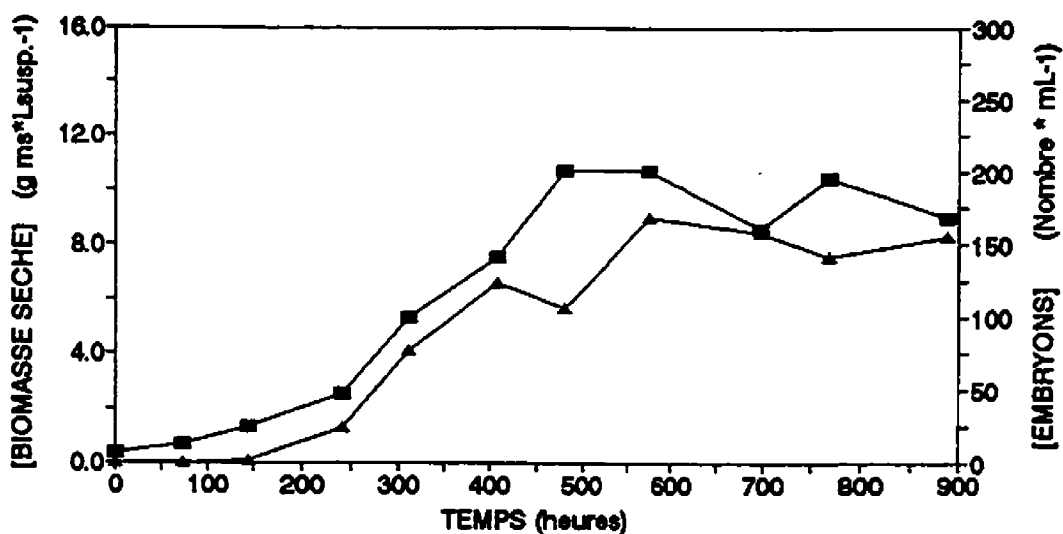


Figure I.5.4
Concentrations de biomasse sèche et d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons] : $\blacktriangle$ [biomasse sèche] : $\blacksquare$

I.5 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.9-(A) (suite)

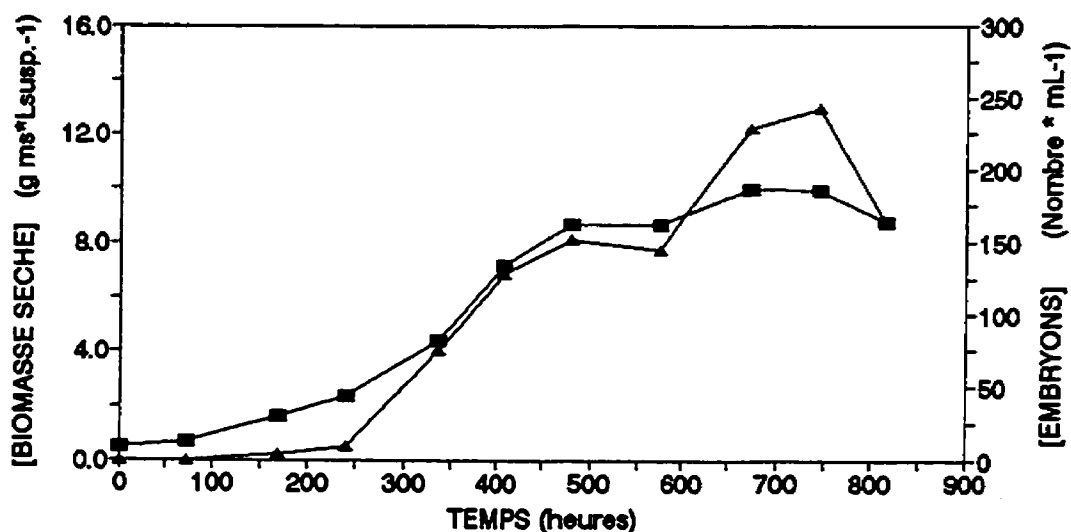


Figure I.5.5
Concentrations de biomasse sèche et d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons] : Δ [biomasse sèche] : $\blacksquare$

I.6 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.10

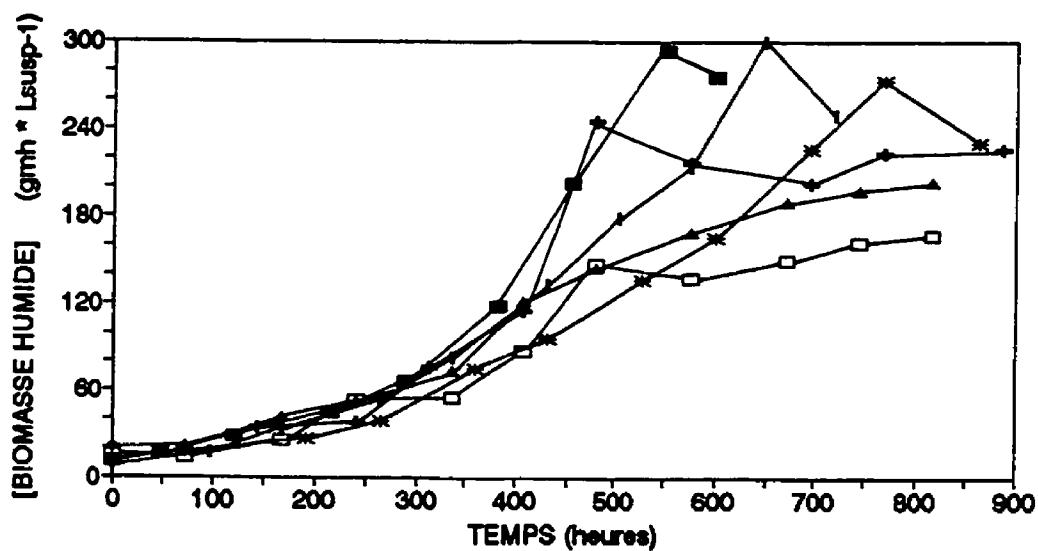


Figure I.6.1
Concentration de biomasse humide en fonction du temps pour les six cuvées en bioréacteur 2-L

G (0 mM NH_4^+) : *	E (2 mM NH_4^+) : $\blacksquare$	K (5 mM NH_4^+) : $\square$
I (10 mM NH_4^+) : +	J (15 mM NH_4^+) :	L (20 mM NH_4^+) : $\blacktriangle$

I.7 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.11

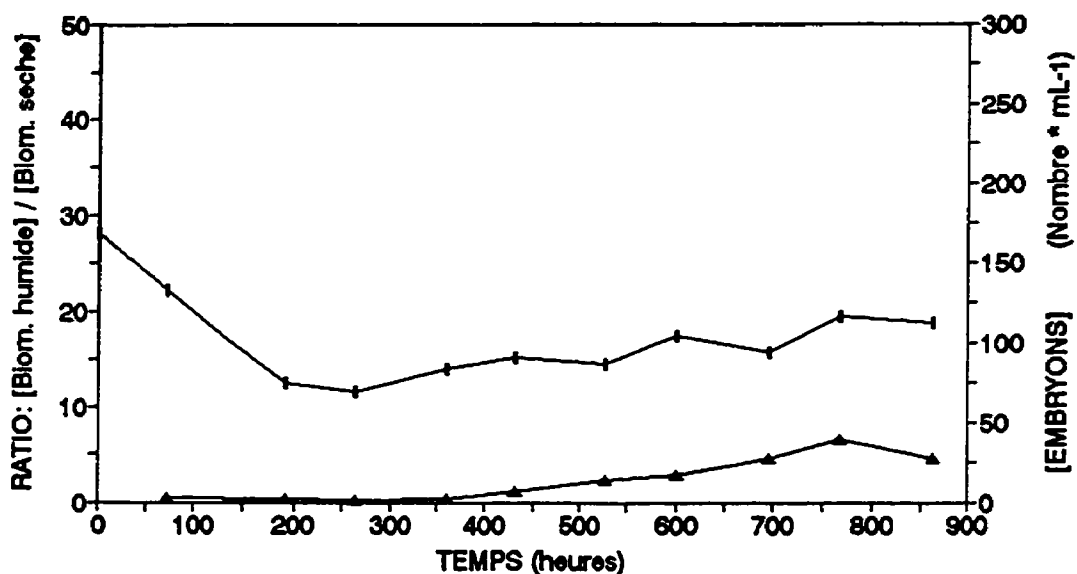


Figure I.7.1

Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) en bioréacteur

Ratio : | [embryons somatiques] : Δ

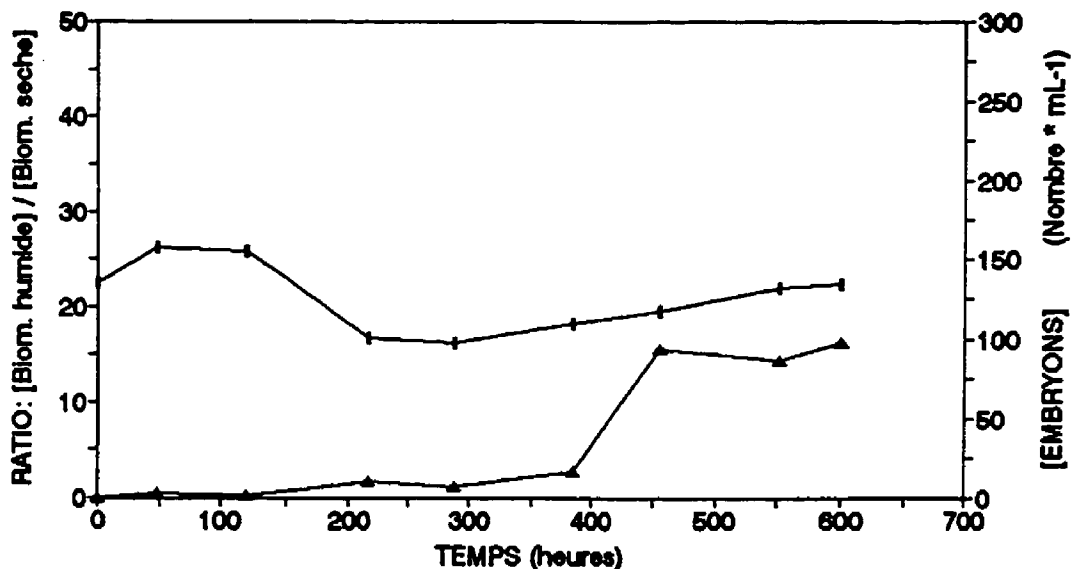


Figure I.7.2

Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur

Ratio : | [embryons somatiques] : Δ

I.7 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.11 (suite)

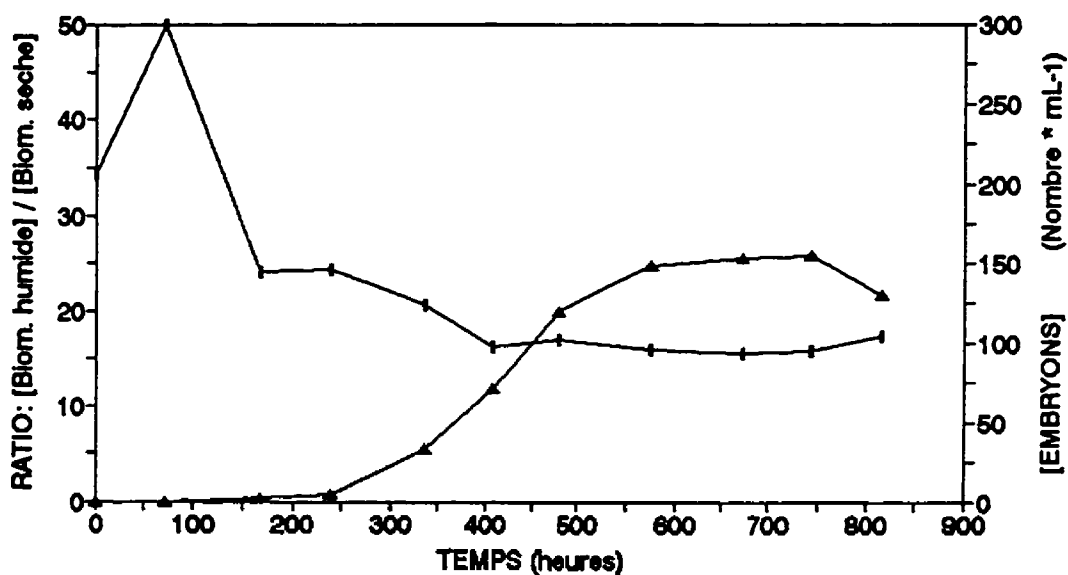


Figure I.7.3

Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons en fonction du temps pour la cuvée K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur

Ratio : | [embryons somatiques] : ▲

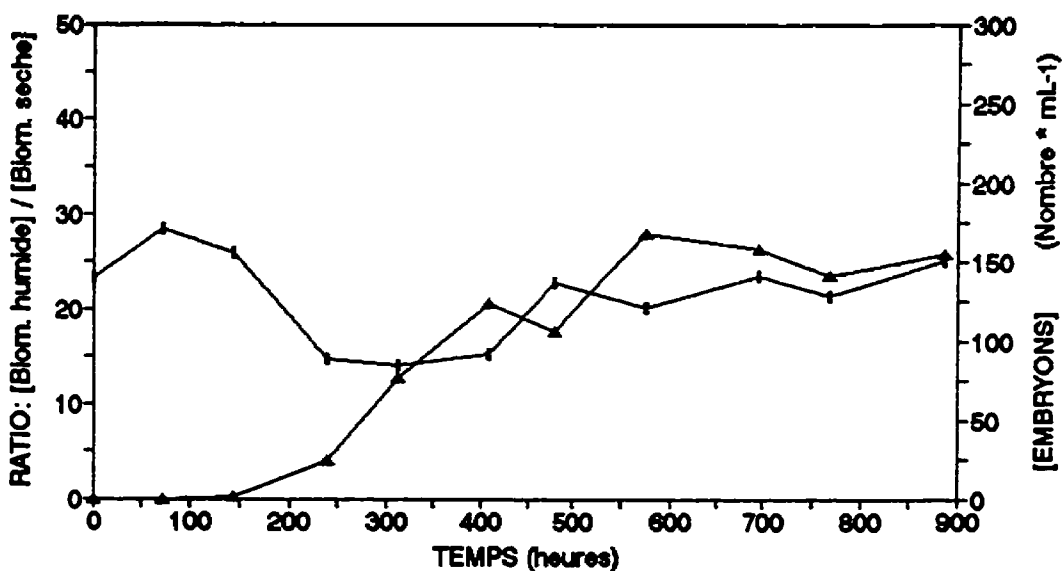


Figure I.7.4

Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) en bioréacteur

Ratio : | [embryons somatiques] : ▲

I.7 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.11 (suite)

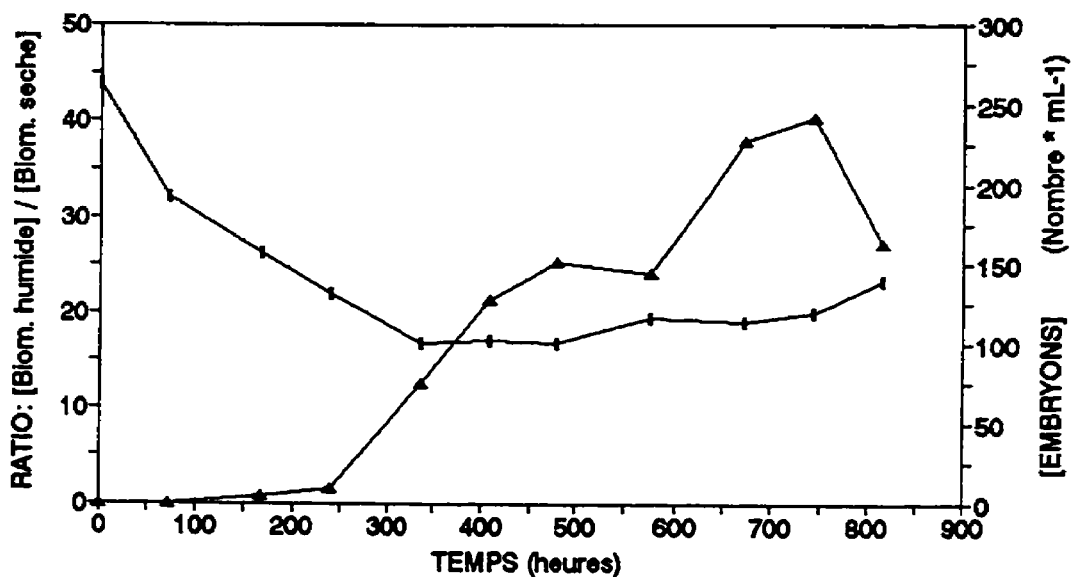


Figure I.7.5

Ratio [biomasse humide]/[biomasse sèche] et concentration d'embryons en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) en bioréacteur

Ratio : | [embryons somatiques] : ▲

I.8 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.13

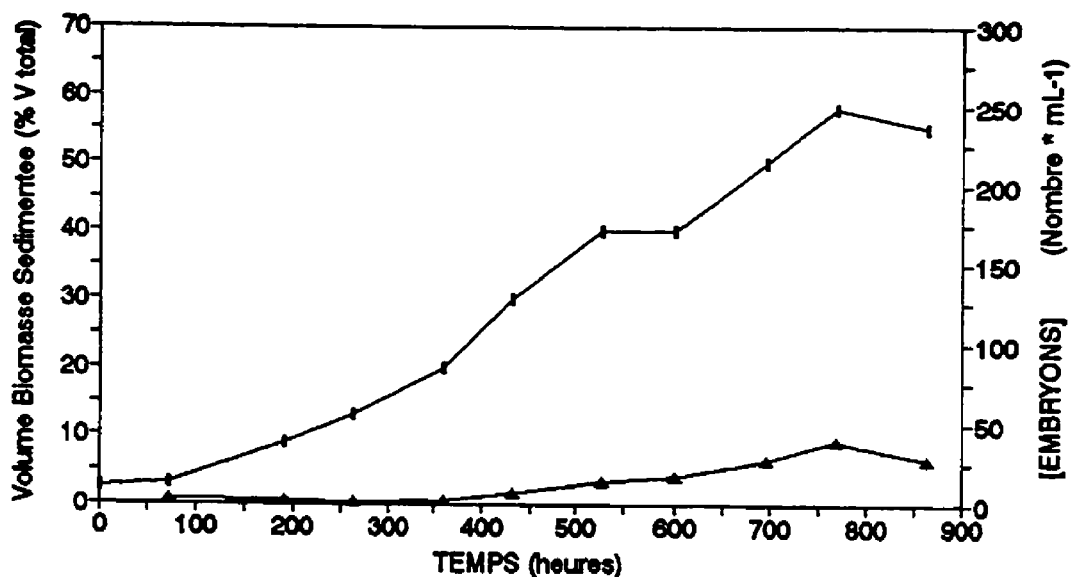


Figure I.8.1

Volume de biomasse sédimentée (VBS) et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) en bioréacteur

% VBS : | [embryons] : ▲

I.8 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.13 (suite)

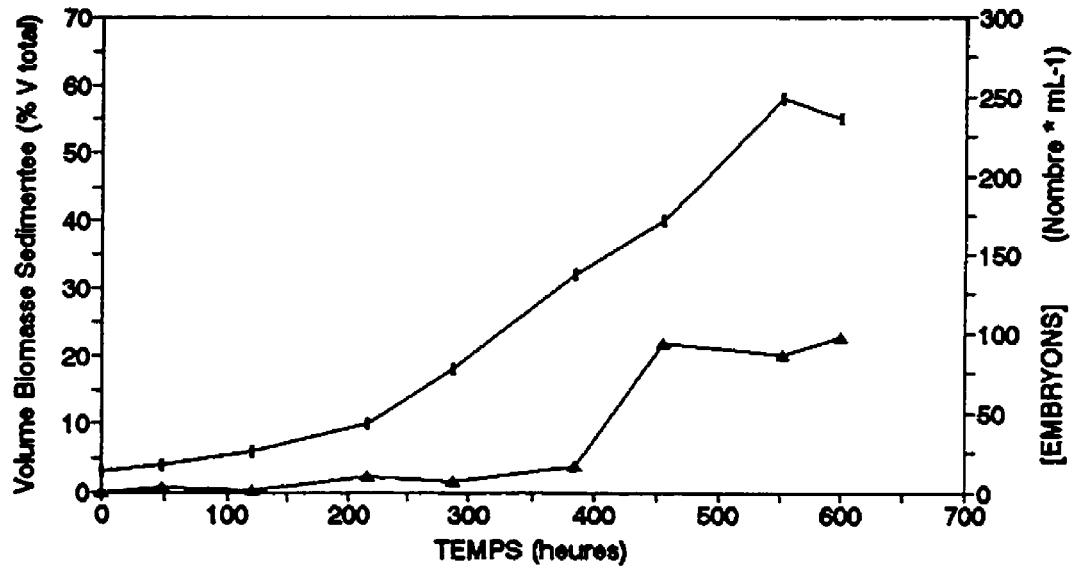


Figure I.8.2
Volume de biomasse sédimentée (VBS) et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur
% VBS : | [embryons] : ▲

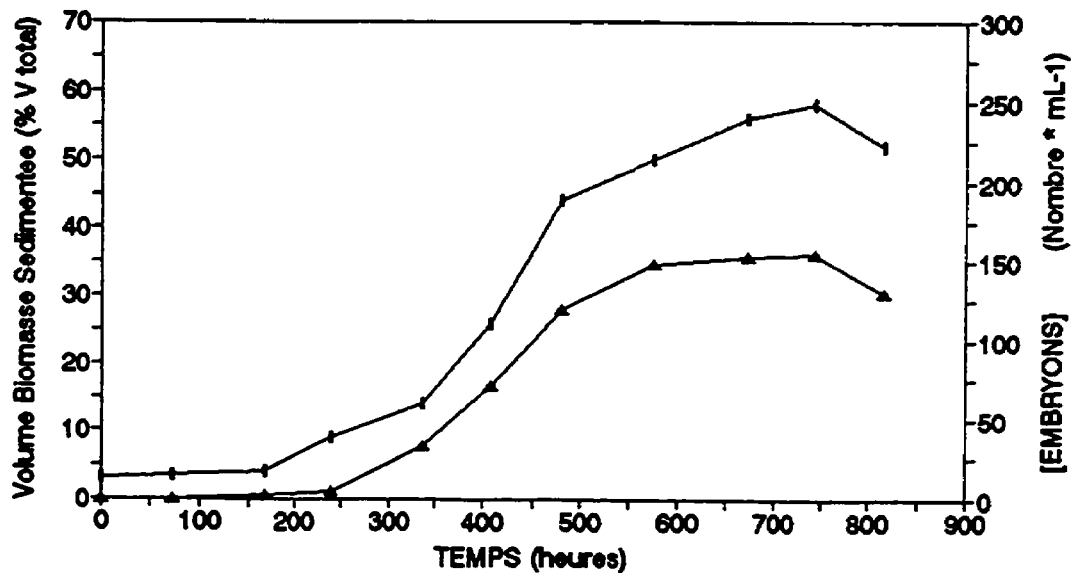


Figure I.8.3
Volume de biomasse sédimentée (VBS) et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur
% VBS : | [embryons] : ▲

I.8 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.13 (suite)

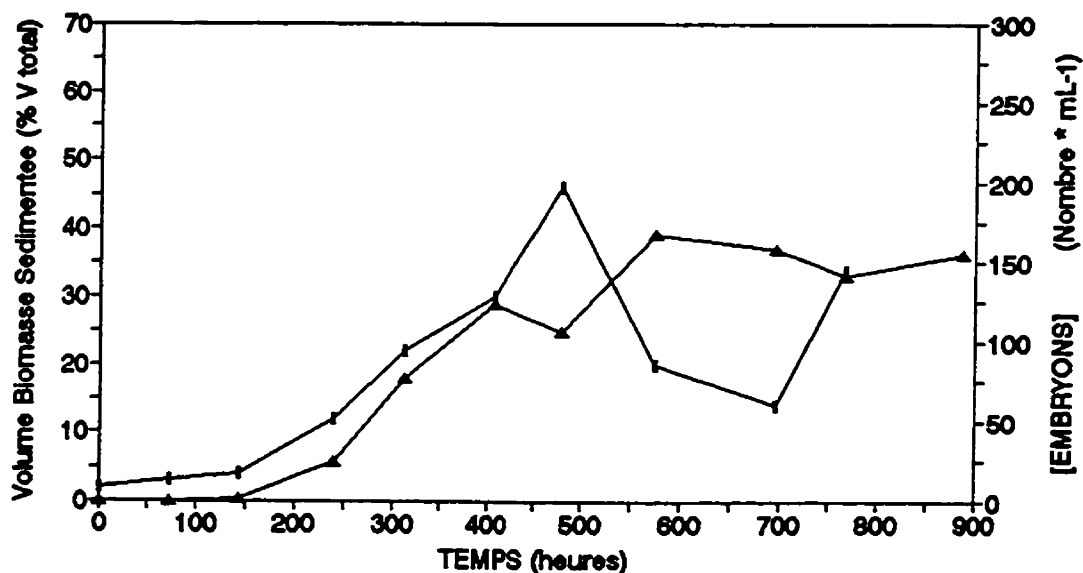


Figure I.8.4
Volume de biomasse sédimentée (VBS) et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=10 \text{ mM}$) en bioréacteur
% VBS : $\square$ [embryons] : $\triangle$

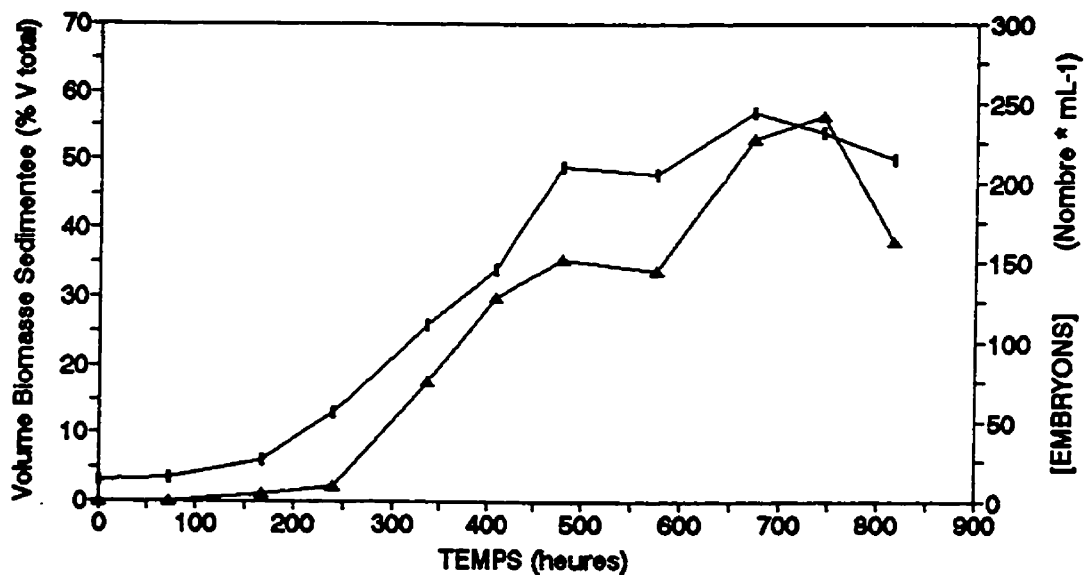


Figure I.8.5
Volume de biomasse sédimentée (VBS) et concentration d'embryons somatiques en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}}=20 \text{ mM}$) en bioréacteur
% VBS : $\square$ [embryons] : $\triangle$

I.9 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.14-(A)

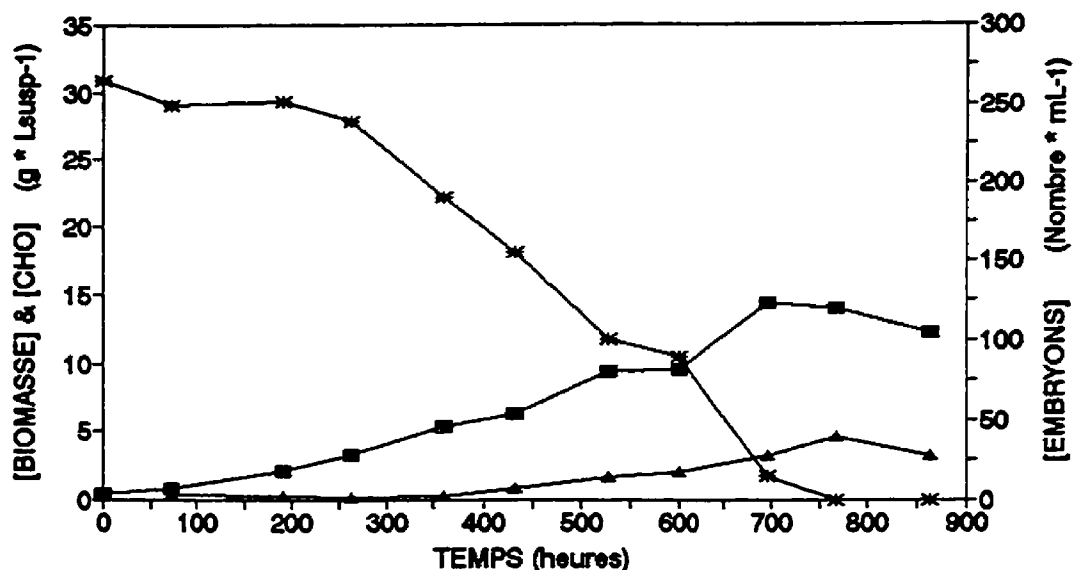


Figure I.9.1

Concentrations d'embryons somatiques de biomasse sèche et de glucides en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons] : $\blacktriangle$ [biomasse sèche] : $\blacksquare$ [glucides totaux] : $*$

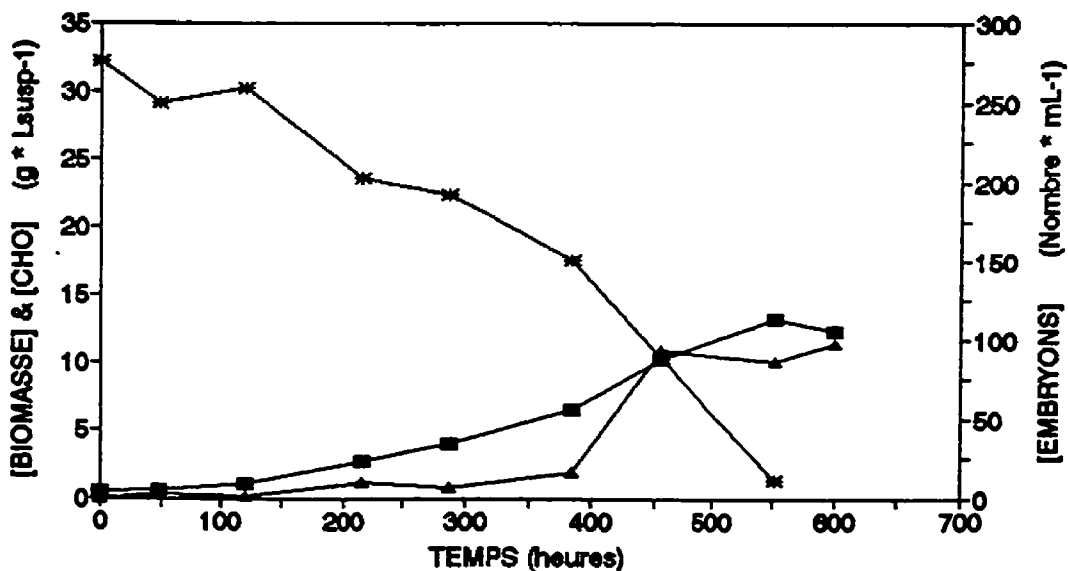


Figure I.9.2

Concentrations d'embryons somatiques de biomasse sèche et de glucides en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons] : $\blacktriangle$ [biomasse sèche] : $\blacksquare$ [glucides totaux] : $*$

I.9 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.14-(A) (suite)

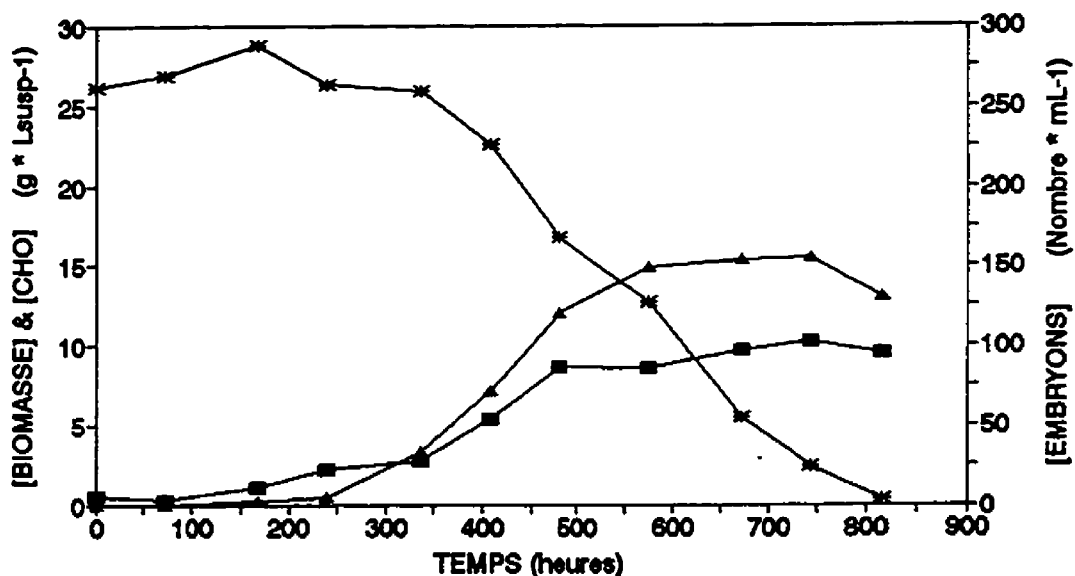


Figure I.9.3

Concentrations d'embryons somatiques de biomasse sèche et de glucides en fonction du temps pour la cuvée K ($[NH_4^+]_{INITIALE} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons] : $\blacktriangle$ [biomasse sèche] : $\blacksquare$ [glucides totaux] : $*$

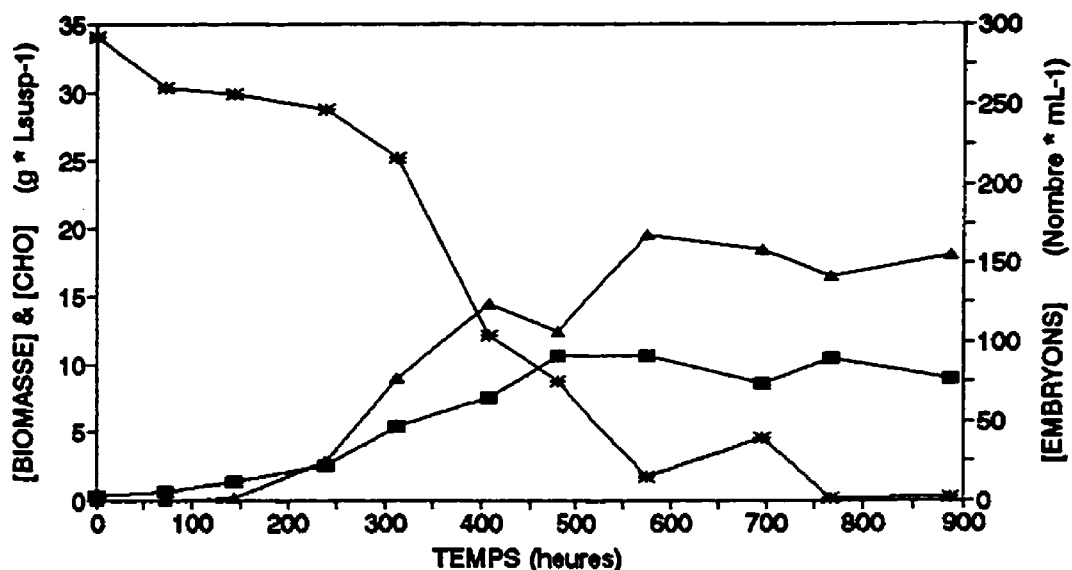


Figure I.9.4

Concentrations d'embryons somatiques de biomasse sèche et de glucides en fonction du temps pour la cuvée I ($[NH_4^+]_{INITIALE} = 10 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons] : $\blacktriangle$ [biomasse sèche] : $\blacksquare$ [glucides totaux] : $*$

I.9 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.14-(A) (suite)

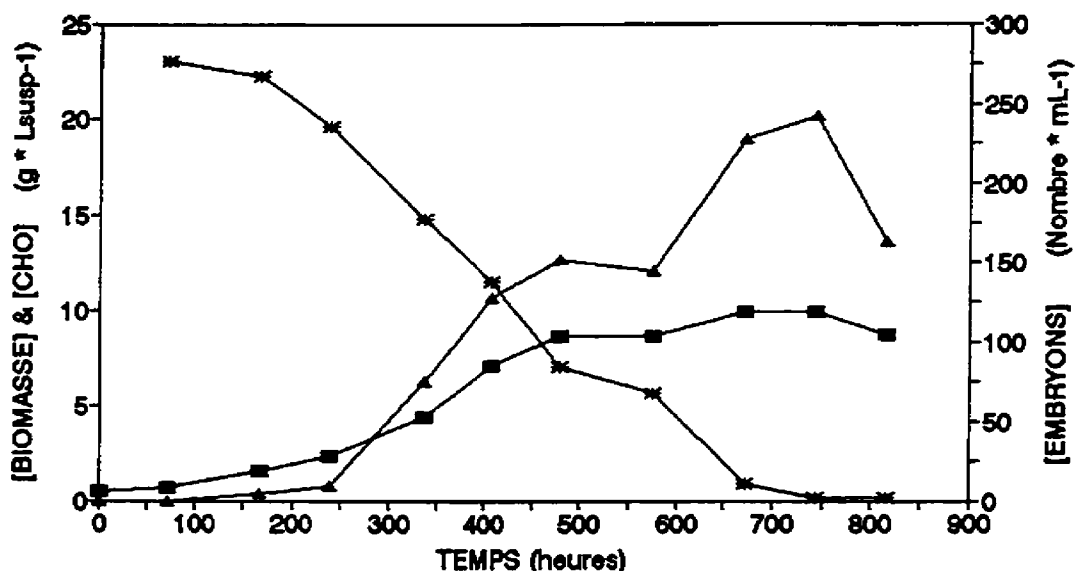


Figure I.9.5

Concentrations d'embryons somatiques de biomasse sèche et de glucides en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons] : Δ [biomasse sèche] : $\blacksquare$ [glucides totaux] : $\times$

I.10 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.15-(A)

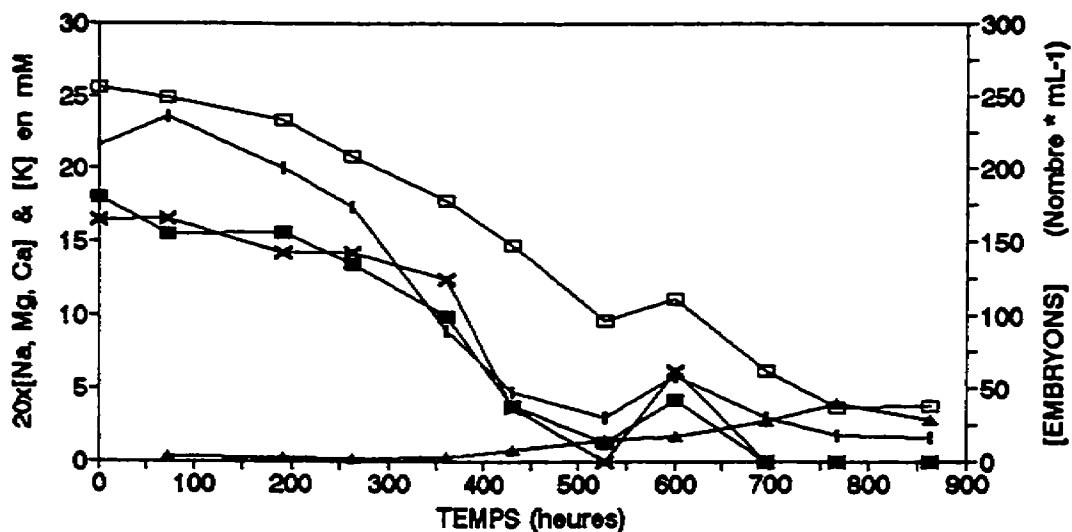


Figure I.10.1

Concentrations d'embryons somatiques et des cations calcium, magnésium, potassium et sodium en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$)

[embryons somatiques] : Δ [K] : $\square$
 [Mg] x20 : $\blacksquare$ [Na] x20 : $\times$ [Ca] x20 : $\times$

I.10 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.15-(A) (suite)

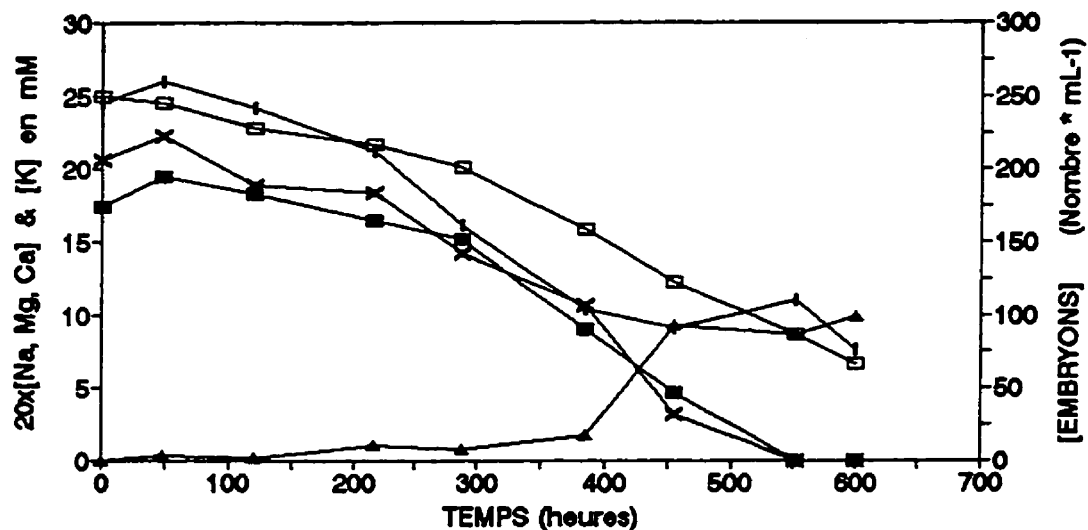


Figure I.10.2
Concentrations d'embryons somatiques et des cations calcium, magnésium, potassium et sodium en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$)
[embryons somatiques] : ▲ [K] : □
[Mg] x20 : ■ [Na] x20 : | [Ca] x20 : x

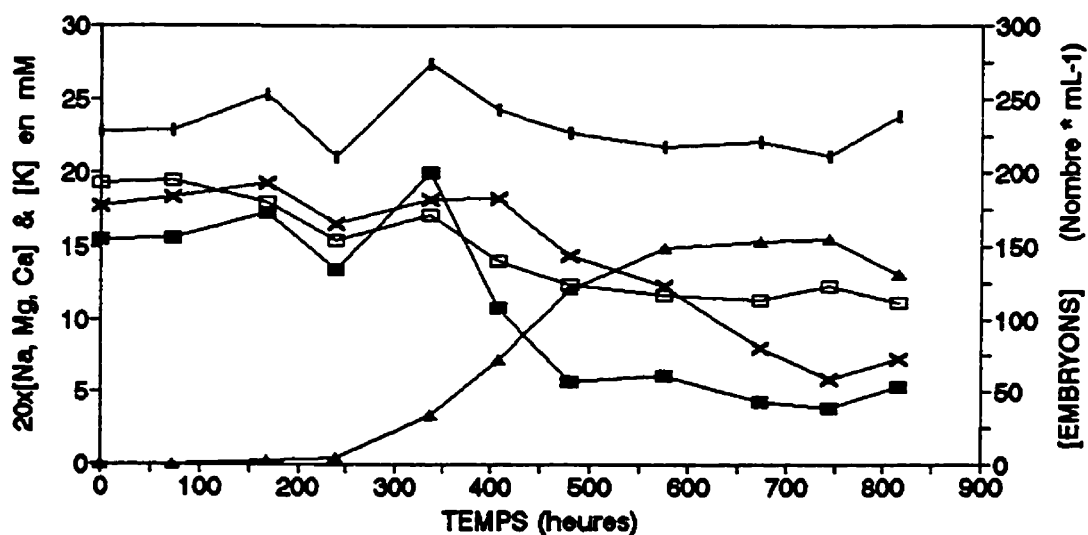


Figure I.10.3
Concentrations d'embryons somatiques et des cations calcium, magnésium, potassium et sodium en fonction du temps pour la cuvée K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$)
[embryons somatiques] : ▲ [K] : □
[Mg] x20 : ■ [Na] x20 : | [Ca] x20 : x

I.10 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.15-(A) (suite)

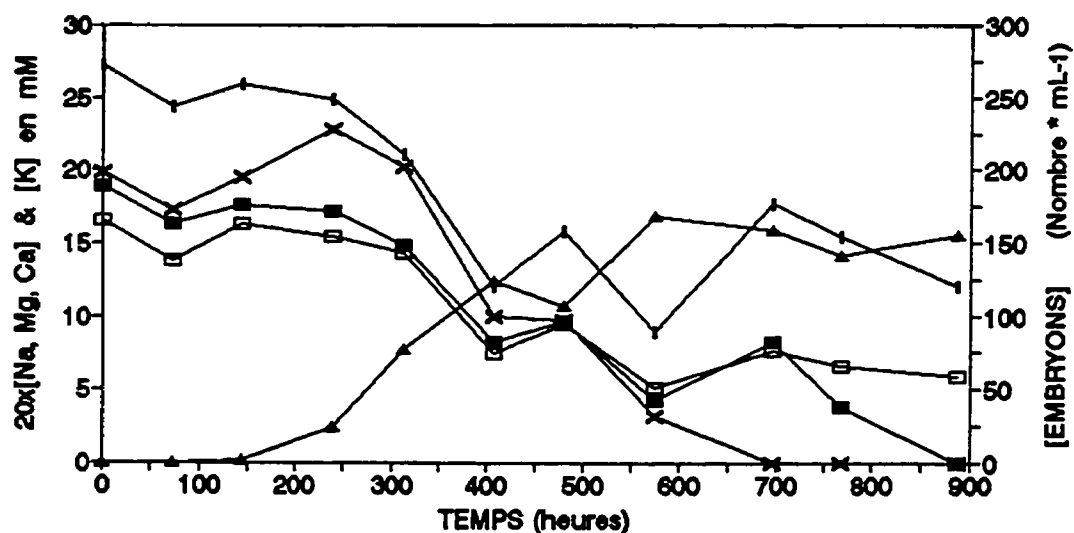


Figure I.10.4

Concentrations d'embryons somatiques et des cations calcium, magnésium, potassium et sodium en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$)

[embryons somatiques] : $\blacktriangle$ [K] : $\square$
 [Mg] $\times 20$: $\blacksquare$ [Na] $\times 20$: $|$ [Ca] $\times 20$: $\times$

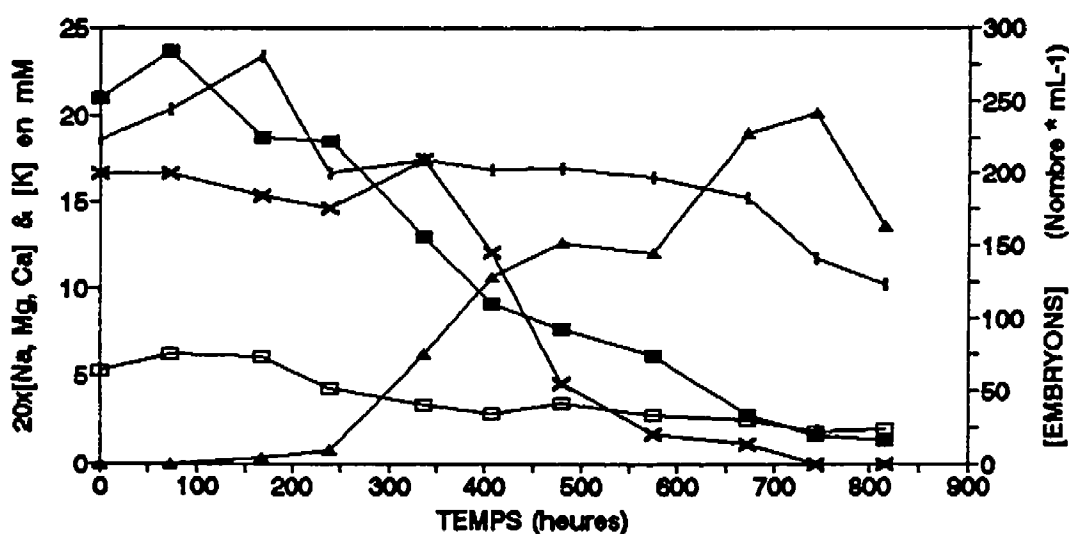


Figure I.10.5

Concentrations d'embryons somatiques et des cations calcium, magnésium, potassium et sodium en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$)

[embryons somatiques] : $\blacktriangle$ [K] : $\square$
 [Mg] $\times 20$: $\blacksquare$ [Na] $\times 20$: $|$ [Ca] $\times 20$: $\times$

I.11 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.16-(A)

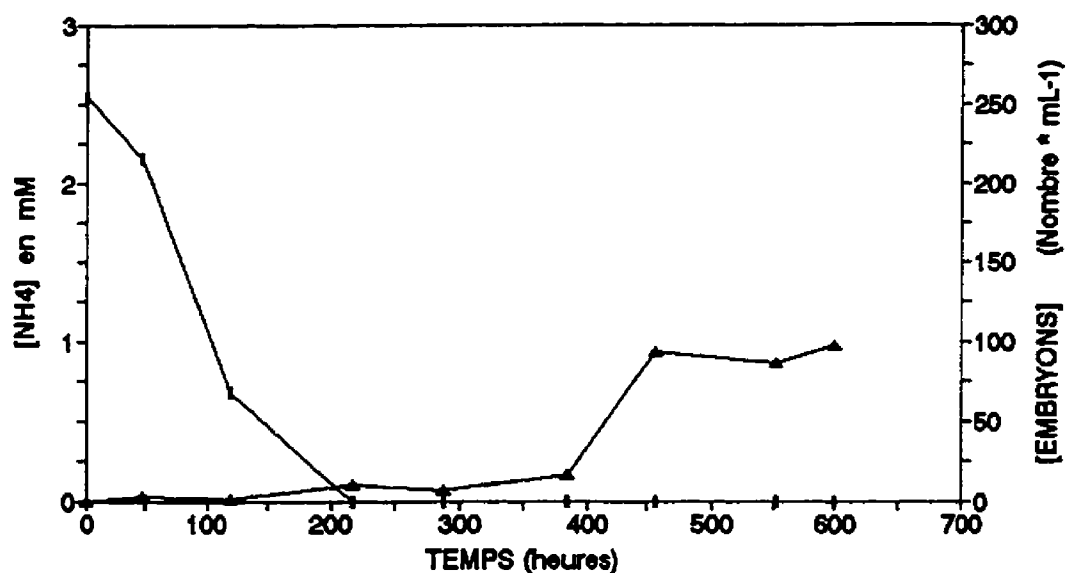


Figure I.11.1

Concentrations d'embryons somatiques et du cation ammonium en fonction du temps pour la cuvette E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons somatiques] : Δ [ammonium] : $\circ$

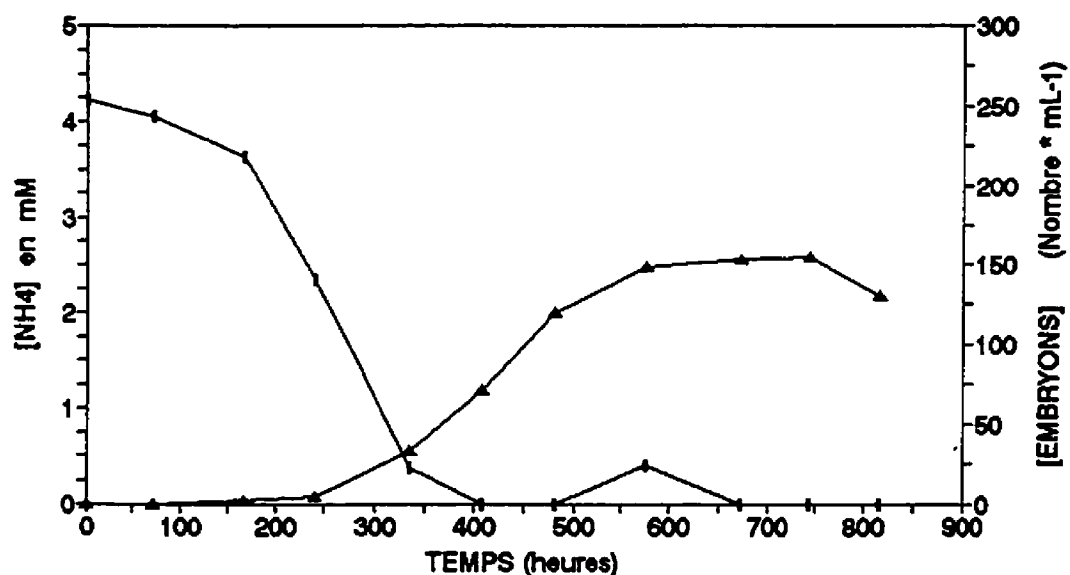


Figure I.11.2

Concentrations d'embryons somatiques et du cation ammonium en fonction du temps pour la cuvette K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons somatiques] : Δ [ammonium] : $\circ$

I.11 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.16-(A) (suite)

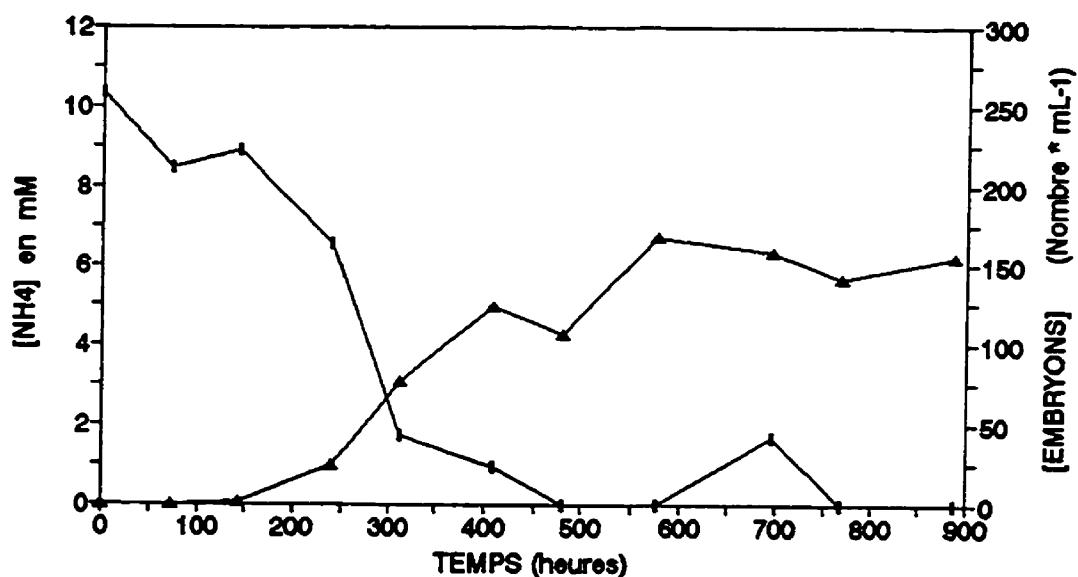


Figure I.11.3
Concentrations d'embryons somatiques et du cation ammonium en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons somatiques] : Δ [ammonium] : $\square$

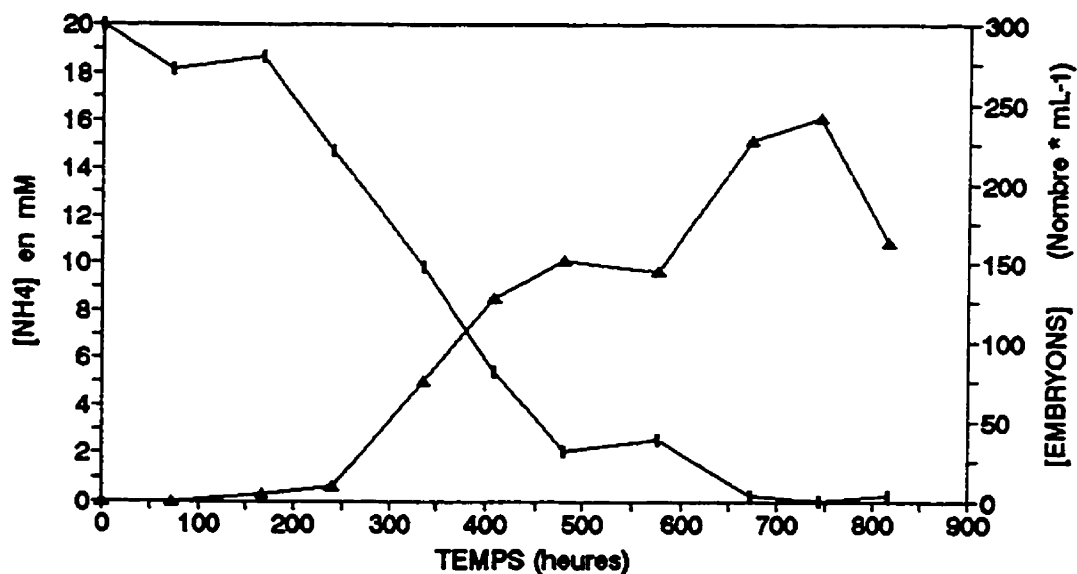


Figure I.11.4
Concentrations d'embryons somatiques et du cation ammonium en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons somatiques] : Δ [ammonium] : $\square$

I.12 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.17-(A)

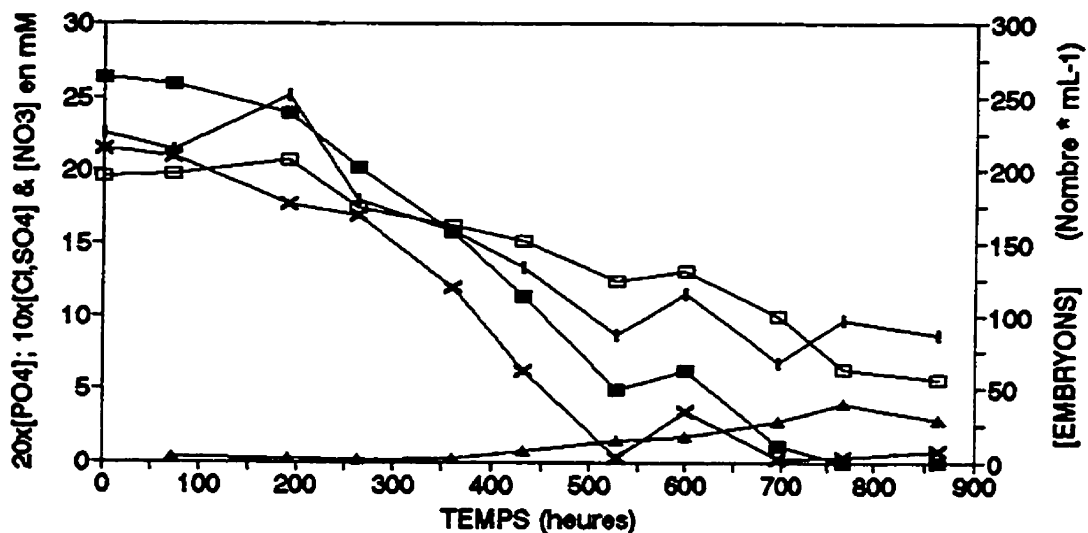


Figure I.12.1
Concentrations d'embryons somatiques et des anions phosphate, chlorure, nitrate et sulfate en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) en bioréacteur

[phosphate] x20	: x	[embryons somatiques]	: ▲
[nitrate]	: ■	[chlorure] x10	:
		[sulfate] x10	: □

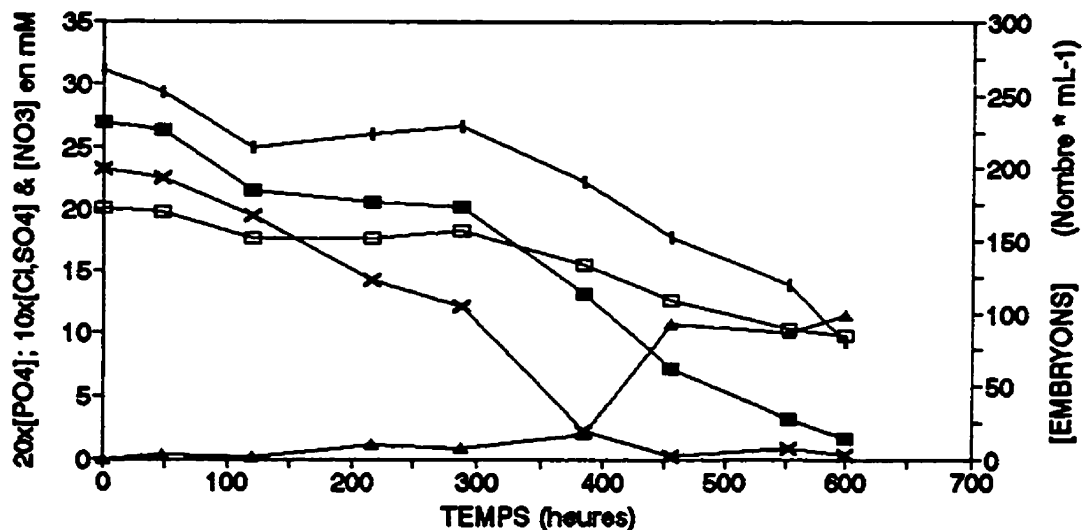


Figure I.12.2
Concentrations d'embryons somatiques et des anions phosphate, chlorure, nitrate et sulfate en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur

[phosphate] x20	: x	[embryons somatiques]	: ▲
[nitrate]	: ■	[chlorure] x10	:
		[sulfate] x10	: □

I.12 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.17-(A) (suite)

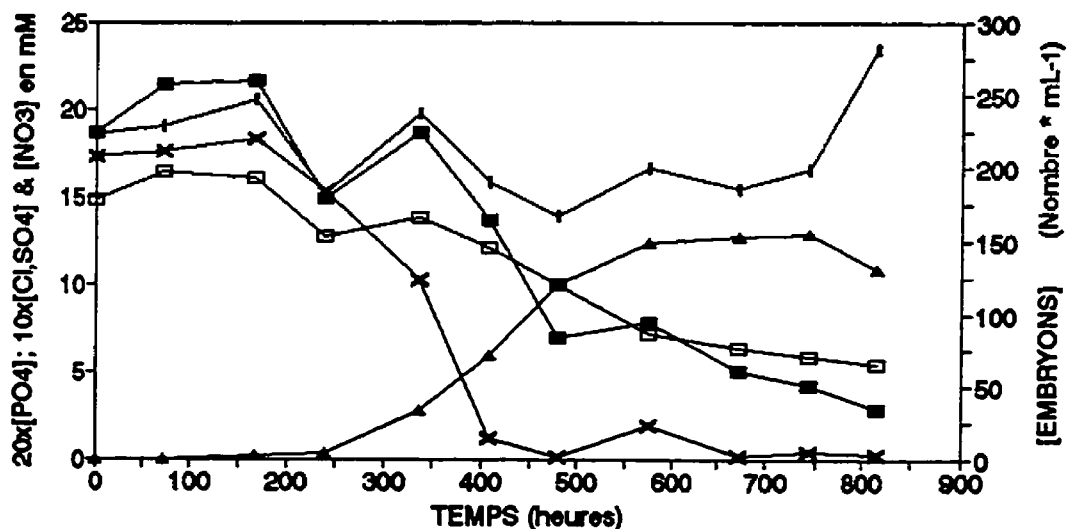


Figure I.12.3

Concentrations d'embryons somatiques et des anions phosphate, chlorure, nitrate et sulfate en fonction du temps pour la cuvée K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur

[phosphate] x20	: x	[embryons somatiques]	: ▲
[nitrate]	: ■	[chlorure] x10	:
		[sulfate] x10	: □

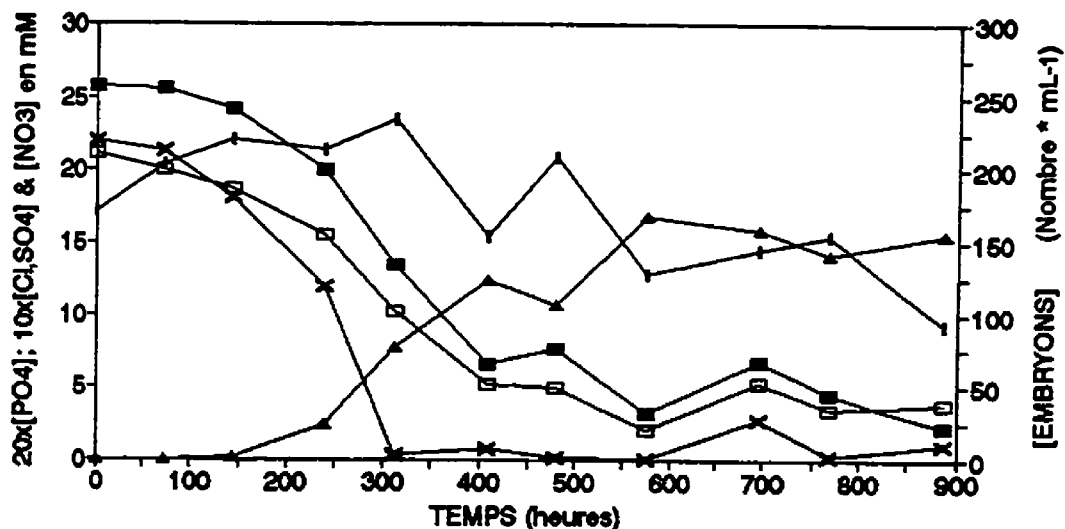


Figure I.12.4

Concentrations d'embryons somatiques et des anions phosphate, chlorure, nitrate et sulfate en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) en bioréacteur

[phosphate] x20	: x	[embryons somatiques]	: ▲
[nitrate]	: ■	[chlorure] x10	:
		[sulfate] x10	: □

I.12 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.17-(A) (suite)

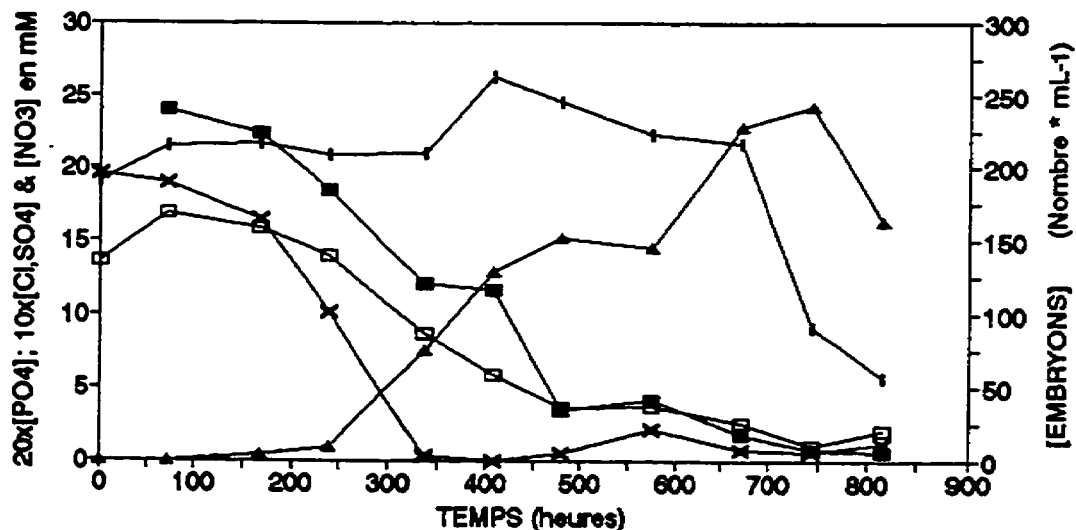


Figure I.12.5
Concentrations d'embryons somatiques et des anions phosphate, chlorure, nitrate et sulfate en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) en bioréacteur

[phosphate] x20	: X	[embryons somatiques]	: ▲
[nitrate]	: ■	[chlorure] x10	:
		[sulfate] x10	: □

I.13 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.18-(A)

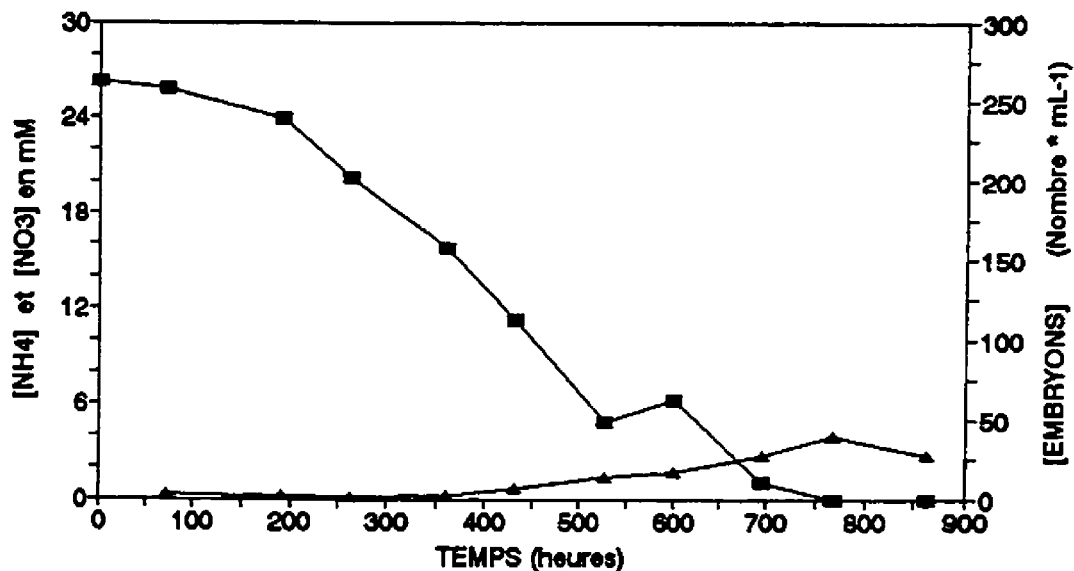


Figure I.13.1
Concentrations d'embryons somatiques et de deux ions azotés en fonction du temps pour la cuvée G ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 0 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons]	: ▲	[ammonium]	:	[nitrate]	: ■
------------	-----	------------	---	-----------	-----

I.13 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.18-(A) (suite)

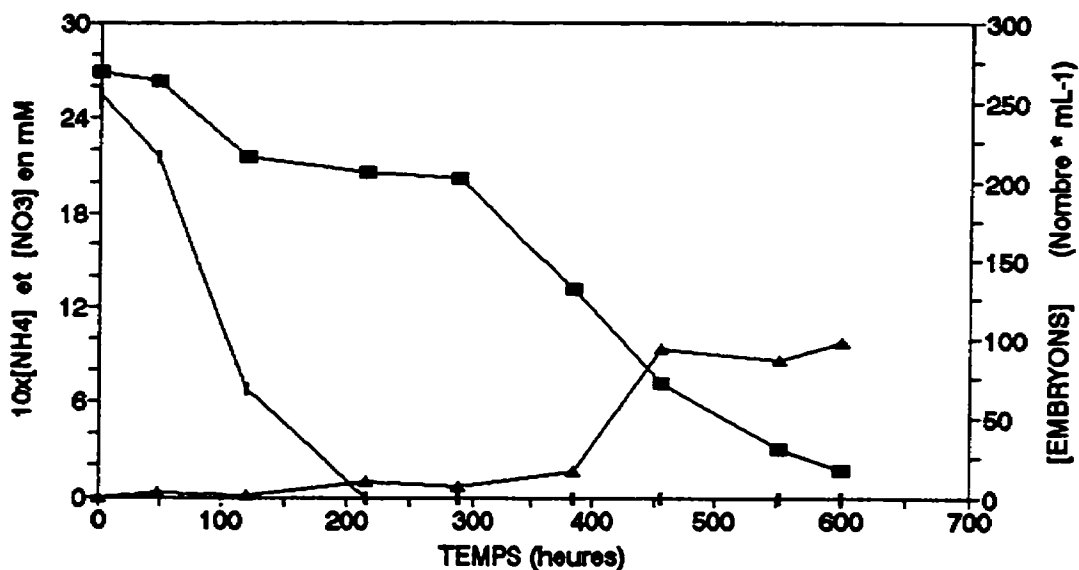


Figure I.13.2

Concentrations d'embryons somatiques et de deux ions azotés en fonction du temps pour la cuvée E ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 2 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons] : ▲ [ammonium] : | [nitrate] : ■

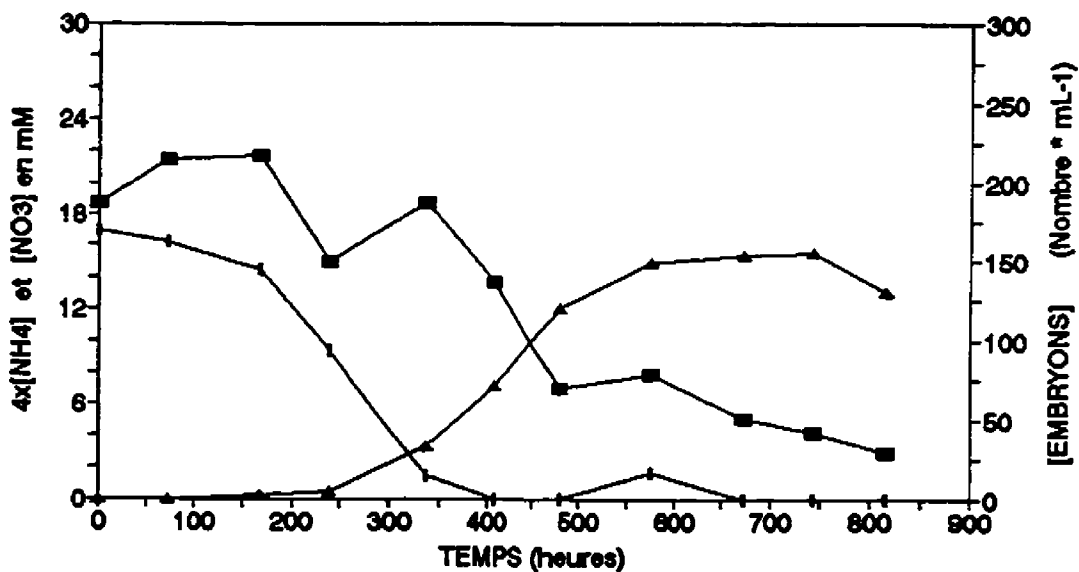


Figure I.13.3

Concentrations d'embryons somatiques et de deux ions azotés en fonction du temps pour la cuvée K ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 5 \text{ mM}$) en bioréacteur

[embryons] : ▲ [ammonium] : | [nitrate] : ■

I.13 COMPLÉMENT À LA FIGURE 5.18-(A) (suite)

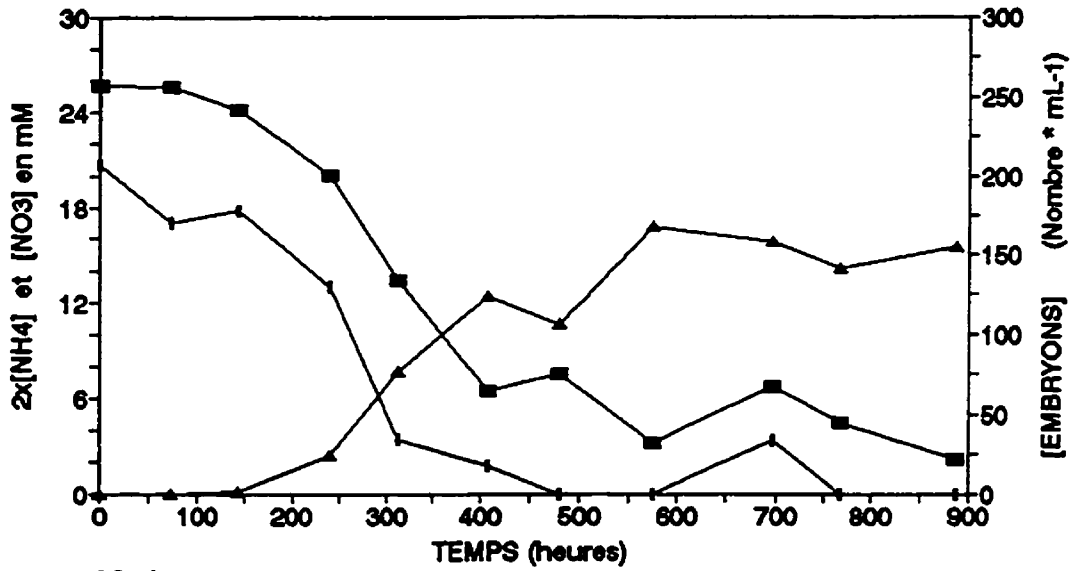


Figure I.13.4
Concentrations d'embryons somatiques et de deux ions azotés en fonction du temps pour la cuvée I ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 10 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons] : Δ [ammonium] : $\square$ [nitrate] : $\bullet$

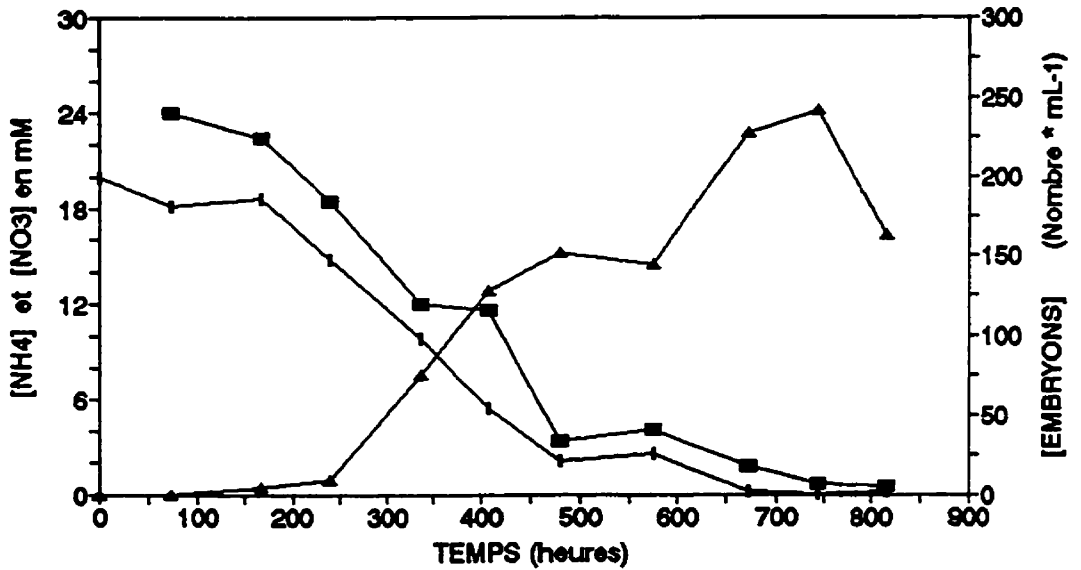
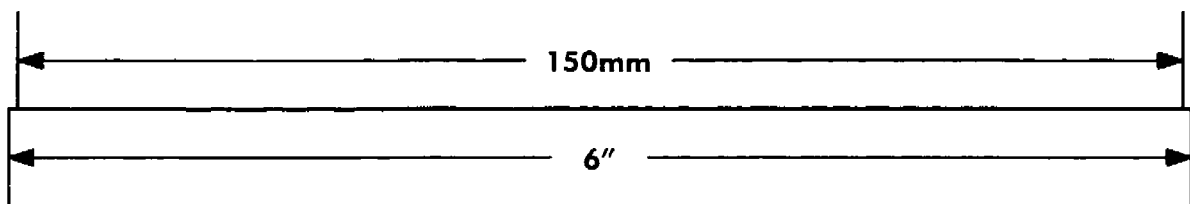
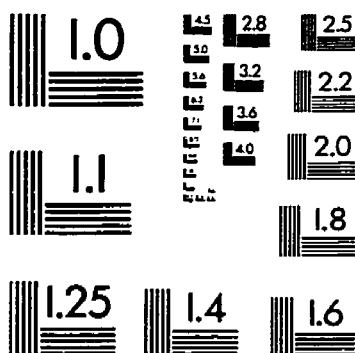
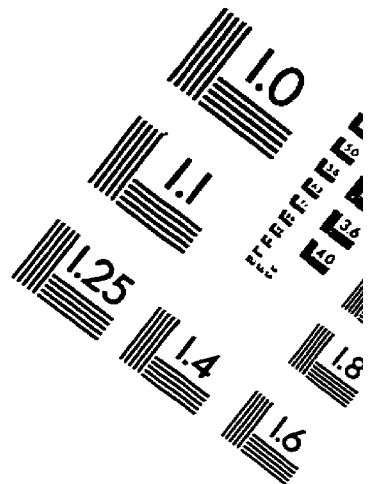
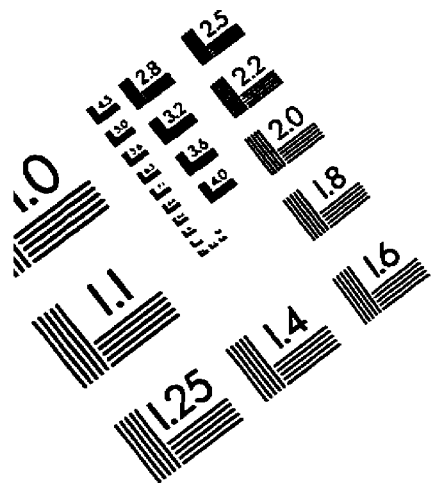


Figure I.13.5
Concentrations d'embryons somatiques et de deux ions azotés en fonction du temps pour la cuvée L ($[\text{NH}_4^+]_{\text{INITIALE}} = 20 \text{ mM}$) en bioréacteur
[embryons] : Δ [ammonium] : $\square$ [nitrate] : $\bullet$

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

