Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOTECHNOLOGIE

Étude de la cinétique d'isolement et de fusion de protoplastes de Festuca arundinacea (L.) Schreb.

CEREGHETTI, Michel

Award date:
1987

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

1987

FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D.DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDE DE LA CINETIQUE D'ISOLEMENT ET DE FUSION DE PROTOPLASTES DE *Festuca arundinacea* (L.) Schreb

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques par

Michel CEREGHETTI

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR
Tél. 081-22.90.61 Télex 59222 facnam Téléfax 081-23.03.91

Etude de la cinétique d'isolement et de fusions de protoplastes de *Festuca arundinacea* (L.) Shreb.

CEREGHETTI Michel

Résumé.

Dans un premier temps, la cinétique de développement de suspensions cellulaires de *Festuca arundinacea* est étudiée par la mesure de paramètres cellulaires et du milieu de culture . Nous distinguons trois phases classiques de la croissance : une multiplication intense, une phase stationnaire et une phase de sénescence .

La cinétique d'isolements de protoplastes est ensuite décrite en fonction de l'âge et de la taille des amas cellulaires utilisés.

Enfin, des expériences de comptage des noyaux montrent que la diminution du nombre de protoplastes au cours de l'isolement est due, au moins en partie, à des fusions spontanées survenant dans le mélange enzymatique .

Abstract.

Firstly, the *Festuca arundinacea* cell suspensions growth is followed by mesuring cells or medium parameters . One can distinguish 3 classical steps : high multiplication , stationnary and senescence stages .

One describs the protoplasts isolation cinetics in relation to the age of cells and size of cells aggregates .

Finally, nuclei counting experiments lead us to conclude that the protoplats number decrease is due (partially) to spontaneous fusions in the enzyme mixture .

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1987
Laboratoire de Biotechnologie Théorique
Promoteur : P. VAN CUTSEM

J'adresse mes plus vifs remerciements à P. Van Cutsem pour l'accueil dans son laboratoire et pour l'aide immense qu'il m'a apportée tout au long de la réalisation de ce travail .

Je tiens à remercier particulièrement Albert Charlier, Pierre Cambier ainsi que tous les membres du département de Biologie Végétale pour leur collaboration efficace et dévouée .

J'adresse une reconnaissance toute spéciale à Béatrice et Michel Doucet qui se sont chargés de la dactylographie .

Je m'en voudrais d'oublier ma famille et mes amis pour leur soutien moral et matériel sans lesquels je ne me serais pas acquitté de cette tâche .

Liste des abréviations

MS / CSM = Murashige et Skoog / Cell Suspension Medium

MS salts = Sels de Murashige et Skoog

2,4-D = Acide 2,4 - dichlorophénoxyacétique

GOD = Glucose oxydase

OD = Ortho-dianisidine dihydrochlorite

POD = Peroxydase

EDTA = Acide éthylènediaminetetraacétique

BAP = Benzylaminopurine

TTC = Chlorure de 2,3,5-triphényltetrazolium

MS/PS = Murashige et Skoog / Protoplastes

Table des matières

INTRODUCTION 2

Intérêt des protoplastes vegétaux 5

Démarche de travail 8

CULTURES DE CELLULES 9

I.Matériel et méthode 10

A.Protocole général 10

B.Détail des techniques utilisées 11

II.Résultats et discussion 15

Conclusion 22

ISOLEMENT DE PROTOPLASTES

I.Matériel et méthode 23

a)Composition du milieu de culture pour protoplastes ...23

b)Protocole d'isolement 23

c)Détermination de la cinétique d'isolement 24

d)Mesure de la cinétique de fusion 27

e)Etude de la distribution de tailles des colonies 27

II.Résultats et discussion 28

a)Méthode spectrophotométrique 28

b)Comptage après coloration au calcofluor 28

c)Cinétique de fusion des protoplastes 32

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION 34

BIBLIOGRAPHIE

I N T R O D U C T I O N

La culture in vitro de tissus végétaux n'est pas une technique aussi récente qu'on pourrait le croire à première vue. Le concept, apparu fin du 19 ème siècle, fut expérimenté pour la première fois en 1902 par le célèbre physiologiste allemand Haberlandt[1]. Pour différentes raisons, ses tentatives échouèrent. Ce n'est vraiment qu'en 1939, après la découverte de l'auxine, que Gautheret[2] , en France, fut capable de conserver et de faire croître in vitro des fragments isolés de tissus de réserve, dont la racine de carotte.

Dès les années 1950, des applications pratiques ont été envisagées dont certaines sont aujourd'hui d'utilisation courante en agriculture et horticulture.
Par exemple, la micropropagation de pommes de terre et d'arbres fruitiers ainsi que l'éradication de virus par culture et micropropagation de méristèmes[1]. Le tissu méristèmatique est incubé stérilement in vitro sur un milieu adéquat. A partir d'un certain stade de développement, ce tissu est fragmenté et chaque partie est recultivée individuellement.
Ces opérations répétées permettent un taux de propagation énorme (1 million de plantes par an à partir d'une source unique, sur une surface et avec des moyens réduits).
La culture in vitro permet donc une sélection et une propagation des individus intéressants beaucoup plus rapides que par les méthodes traditionnelles.

Il est actuellement possible, pour un nombre croissant d'espèces, de régénérer une plante entière à partir de n'importe quel tissu vivant, prélevé sur une plante mère: mésophylle foliaire, tige, racine, méristème, organe de réserve, pollen, tumeur, cellules en suspension,...
Le développement en est assuré par mitoses (pas de méïoses) et est basé sur la totipotence des cellules végétales. Ces cellules sont toutes capables en principe, de se dédifférencier et de reformer un organisme complet. Ceci se réalise en plusieurs étapes, chacune liée à un milieu de culture spécifique

1) Prélèvement et stérilisation éventuelle de l'explant.
2) Callogénèse, c'est-à-dire la prolifération d'une masse de cellules de type parenchymateux où une différenciation cellulaire peut se produire de deux façons différentes.
3) l' organogénèse qui consiste en la formation de racines ou de parties aériennes à partir d'un amas de cellules, ou l' embryogénèse somatique qui implique la formation d'un embryon à partir d'une seule cellule somatique.

Un facteur déterminant pour la réussite tant de la micropropagation que de la callogénèse, de l'organogénèse ou de l'embryogénèse est la composition des milieux de culture successifs. Sa mise au point est jusqu'à présent essentiellement empirique et varie en fonction de l'espèce végétale utilisée. Néanmoins, quelques principes généraux ont pu être dégagés, tel le rapport hormonal cytokinine/auxine qui, lorsqu'il est élevé induit la croissance de parties aériennes et lorsqu'il est abaissé, de parties souterraines, ainsi que l'importance dans le milieu de culture de la vitamine B1 (thiamine).

En résumé, les avantages de la culture de tissus sont principalement:

- la rapidité
- la nécessité d'une faible surface de travail (5000 plants/m^2)
- le peu de matériel végétal nécessaire au départ
- la possibilité, bien souvent, de stockage au froid à long terme de génotypes intéressants
- le travail en conditions constantes : grâce à un environnement standardisé, les variations entre individus sont dues essentiellement à des différences génétiques ou épigénétiques.

Il s'agit donc d'un outil déjà précieux pour l'agriculture et l'horticulture et actuellement en plein développement.

D'autres domaines de recherche liés à la culture in vitro en sont encore à des stades plus expérimentaux. Les techniques se rapportant aux protoplastes en font partie.

Un protoplaste est une cellule dépourvue de sa paroi et dont le plasmalemme est donc en contact direct avec le milieu extérieur.
Historiquement, deux techniques ont été utilisées pour isoler des protoplastes.

La première en date est la méthode dite mécanique : les cellules sont plasmolysées et le tissu végétal est ensuite découpé mécaniquement.
Des protoplastes sont libérés dans un milieu de pression osmotique adéquate. C'est ainsi que les premiers protoplastes furent isolés vers 1890, mais toujours avec un faible rendement.
La seconde méthode, la seule encore utilisée, consiste à digérer enzymatiquement la paroi cellulaire grâce à un mélange adéquat de cellulases, pectinases, hémicellulases. C'est le développement de cette méthode vers les années 1960 qui permit l'isolement de grandes quantités de protoplastes et qui fut à la base de leur utilisation en physiologie et pour l'amélioration végétale.

Des protoplastes peuvent être isolés à partir de diverses sources telles :
- organes de plantes (tiges, feuilles, racines)
- suspensions cellulaires
- organes de stockage(coléoptile, pétales, tumeurs)
- pollen (après destruction de la sporopollénine par un oxydant)[3]

L'isolement, la transformation et la régénération de plantes cultivées à partir de protoplastes posent encore de nombreux problèmes.Ceci est surtout vrai en ce qui concerne la régénération d'espèces dites récalcitrantes dont l'énorme majorité des espèces monocotylées (parmi lesquelles les céréales !).
Notons toutefois qu'on vient récemment de réussir à régénérer des organismes entiers au départ de protoplastes de riz,Oriza sativa (Demarly, 1987).
Dans le paragraphe suivant, nous allons voir que les techniques de la biologie moléculaire appliquées à la culture in vitro ouvrent des voies de recherche prometteuses.

INTERET DES PROTOPLASTES VEGETAUX

En physiologie végétale, les protoplastes sont utilisés pour des études de synthèse de DNA, RNA et protéines par la mesure de l'incorporation de précurseurs marqués (bases, uridine, acides aminés) ainsi que des études de régénération de la paroi cellulaire.

Il est possible d'isoler des subprotoplastes, c'est-à-dire des protoplastes sans noyaux ou à l'inverse, des nucléoplastes (protoplaste pratiquement dépourvus de cytoplasme) intéressants entre autre pour l'étude des caractères cytoplasmiques.

Le fait d'ôter la paroi cellulaire permet de réaliser un fractionnement cellulaire, similaire à celui des cellules animales, en utilisant un choc osmotique doux. Il est alors possible de récupérer des préparations de plasmalemme, mitochondries, chloroplastes, vacuoles...

Par un mécanisme semblable à l'endocytose, les protoplastes sont aussi capables d'incorporer diverses choses : noyaux, chloroplastes, mitochondries, bactéries, virus, algues bleues, DNA, liposomes, chromosomes, billes de polystyrène...[3]

Mais les études les plus populaires actuellement portent sur l'amélioration végétale par l'introduction de gènes dans une plante.
Différents procédés sont utilisés, le plus connu étant la transformation par Agrobactérium. Cette bactérie peut induire le développement de tumeurs chez la plupart des dicotylées grâce à un transfert de matériel génétique depuis le microorganisme vers l'hôte. Un grand plasmide (plasmide Ti ou Ri) est intégré dans le génome de la cellule végétale et les gènes qu'il porte sont exprimés[4,5]. De nombreuses recherches ont été menées sur le sujet et actuellement on dispose d'un plasmide non pathogène, possédant toujours la capacité de s'intégrer dans le génome[6]. Ce vecteur permet d'introduire du DNA étranger chez la plupart des dicotylées[7,8]. Pour ce qui est des monocotylées, quelques rares succès ont été obtenus sur des liliacées (chlorophytum) et amaryllidacées (narcisse) mais jamais sur des graminées[9].

La transformation se fait en général par coculture d'Agrobactérium et de protoplastes mais l'innoculation peut être aussi réalisée par blessure, sur des disques de tissus en culture et sur des cals.

Cette méthode est limitée par le spectre d'hôtes d'Agrobactérium bien que des tentatives intéressantes soient faites pour élargir celui-çi (maïs, asperge...).

On a également essayé de transformer des protoplastes par microinjection de DNA dans le noyau[10]. Cette technique est assez fastidieuse (maximum 100 cellules injectées/jour) et ne présente pas jusqu'à présent d'avantages décisifs par rapport aux autres méthodes.

Comme vu précédemment, du DNA "nu" peut être incorporé par un protoplaste sans l'aide d'autres substances ou de microorganismes. Le rendement de cette transformation directe peut être significativement augmentée par différents facteurs tels : l'addition de polyethylèneglycol (PEG), phosphate de calcium, choc thermique,...[11]

Un pas décisif a été franchi dans ce sens par l'utilisation d'une brève impulsion électrique qui, en induisant l'apparition de petits pores dans la membrane du protoplaste, facilite grandement l'entrée du DNA exogène[12,13]. Cette méthode appelée électroporation était déjà bien connue chez les cellules animales. Elle atteint à l'heure actuelle pour les protoplastes végétaux des taux de transformation supérieurs à ceux obtenus par la méthode "Agrobactérium", tout en étant plus simple d'utilisation.

Enfin, l'hybridation somatique par fusion de protoplastes reste la technique de choix lorsqu'il s'agit de transférer un caractère dont le gène est inconnu ou lorsque le phénotype intéressant est dû à une famille multigénique.
Un autre avantage de la fusion de protoplastes est qu'elle permet un mélange de deux cytoplasmes, avec des recombinaisons possibles entre mitochondries (jamais entre chloroplastes). Des caractères cytoplasmiques intéressants peuvent dès lors être acquis par l'hybride.

Il existe déjà des applications de transferts limités de gènes par fusion de protoplastes d'espèces non hybridables par croisement classique.

Exemple :
- sainfoin, luzerne, lotier, trèfle pour la production de tannins en vue d'empêcher les problèmes de ballonnement du bétail lors de la mise en pâture[14]
- pomme de terre : production d'une source alternative de stéroïde (solasodine), résistance à une infection fongique...[15]
- tabac : résistance au feu bactérien, à un champignon...[16]
- riz : stérilité mâle cytoplasmique, résistance à la salinité...[17]
- etc...

En pratique, la fusion peut être réalisée de deux manières :
- par fusion chimique en additionnant du PEG et en utilisant une concentration en Ca^{2+} et un pH élevés avec une température ajustée. Cela permet de diminuer la densité de charges et donc les répulsions électrostatiques entre protoplastes (chargés négativement)
- par électrofusion. L'application d'un champ éléctrique alternatif a pour conséquence un accolement en chaîne des protoplastes par attraction de dipôles induits. Une fois en contact, une brève impulsion de courant permet de fusionner les protoplastes par un processus d'élargissement de pores[18].

En général, le génome d'un des deux partenaires de fusion est rapidement éliminé. Si l'on veut réaliser un transfert limité de gènes, on irradie préalablement un des deux génotypes, ce qui permet d'obtenir une fréquence élevée de recombinaisons avec le génotype non irradié[19].

L'étape de fusion est inévitablement suivie d'une sélection des protoplastes hybrides. Il existe différents moyens inspirés pour la plupart des techniques classiques de génétique :

- la résistance aux antibiotiques.
- l'étude électrophorétique chez les descendants d'une enzyme complexe pour laquelle le polymorphisme est assez important.
- la sélection optique, manuelle ou automatique, suivant la couleur (anthocyane + ou -, présence ou absence de chloroplastes, marquage aux fluorochromes...)
- la complémentation biochimique. Un exemple bien connu est celui des mutants NR^- déficients en nitrate réductase qu'on sélectionne parce qu'ils ne réduisent pas le chlorate en chlorite toxique et survivent donc en présence de chlorate et d'ammonium. Si en plus, ces mutants NR^- sont SR^+, c'est-à-dire résistants à la streptomycine, la complémentation avec un protoplaste NR^+-SR^- permettra aux hybrides de survivre dans un milieu dépourvu d'ammonium mais contenant de la streptomycine[20].

Les rendements finaux de toutes ces opérations sont encore très faibles et il n'existe à l'heure actuelle qu'un nombre extrêmement limité d'espèces végétales recombinées et aptes à la commercialisation.

Les protocoles de transformation ou de fusion de protoplastes par exemple, sont actuellement réalisés de manière totalement empirique sur un matériel végétal dont on ne décrit jamais que les méthodes d'obtention. Une meilleure caractérisation des cellules utilisées et des protoplastes obtenus devrait permettre ultérieurement d'optimiser plus efficacement les méthodes de recombinaison génétique in vitro. C'est l'objectif que nous nous sommes assignés dans le cadre de ce travail et dont nous développons les résultats dans les chapitres suivants.

DEMARCHE DE TRAVAIL

Nous avons choisi de travailler sur une espèce monocotylée Festuca arundinacea (L.) Schreb vu l'importance des monocotylées dans l'alimentation humaine et parce que ces espèces sont précisément récalcitrantes. Ce qui signifie en d'autres termes qu'un protoplaste, même doté d'un génotype supérieur par recombinaison in vitro, est d'utilité nulle aussi longtemps qu'il ne régénère pas un organisme entier capable de multiplication ultérieure.

Nous avons voulu ensuite travailler sur des cellules en suspension pour des raisons techniques mais aussi parce que l'avenir de la micropropagation industrielle passe par la production de cellules végétales en fermenteurs.

Avant toute chose, il était primordial de caractériser le matériel de départ utilisé pour l'isolement des protoplastes. Nous avons ainsi mesuré plusieurs paramètres de développement des cultures de cellules dont la distribution de taille des amas de cellules présents.

Parallèlement à ce travail, nous avons réalisé des isolements de protoplastes et recherché la méthode la plus précise pour déterminer la cinétique d'isolement.
Cette cinétique a été étudiée principalement en fonction de l'âge et de la taille des cellules de départ.

Nous avons finalement mesuré la cinétique de fusion spontanée des protoplastes dans le mélange enzymatique et tenté d'en discerner l'origine : homofusion par élargissement de plasmodesmes entre cellules contiguës ou hétérofusion entre cellules indépendantes.

CULTURES DE CELLULES

Les suspensions cellulaires ont été obtenues à partir de la graminée Festuca arundinacea et font partie d'une lignée appelée B13. Cette lignée a été isolée en 1984 au départ d'embryons matures par S. Dalton au Tissue culture laboratory du Welsh Plant Breeding Station d'Aberystwyth (Dalton, in prep.).
Ces cellules sont cultivées in vitro dans un milieu liquide de Murashige et Skoog[21] dont la composition est reprise ci-dessous:

Milieu de culture

Ce milieu est appelé MS/CSM (Murashige et Skoog / Cell Suspension Medium) et est composé de :

- saccharose (Fluka) 30 g/l
- 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, Sigma) 2 mg/l
- MS salts (sels de Murashige et Skoog) 4,7 g/l

Composition des sels de Murashige et Skoog (en mg/l) :

$CaCl_2 . 2H_2O$	440,00	mg/l
$CoCl_2 . 6H_2O$	0,025	
$CuSO_4 . 5H_2O$	0,025	
FeNaEDTA (acide éthylènediaminetétraacétique)	36,70	
H_3BO_3	6,20	
KH_2PO_4	170,0	
KI	0,83	
KNO_3	1900	
$MgSO_4 . 7H_2O$	370,0	
$MnSO_4 . 4H_2O$	22,30	
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0,25	
NH_4NO_3	1650	
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8,60	
Inositol	100,0	
Acide nicotinique	0,50	
Thiamine HCl	0,10	
Pyridoxine HCl	0,50	
Glycine	2,00	

Les sels de Murashige et Skoog prêts à l'emploi sont commercialisés par les laboratoires Flow et ne nécessitent que l'adjonction de sucrose et d'hormones. L'eau utilisée est désionisée grâce à un déminéralisateur Aqualab 30 (Vel) et sa résistivité est de 1,5 MOhm/cm. Le mélange est stérilisé par autoclavage 15 minutes à 121°C (1 bar).

Conditions de culture

Les cultures se font dans des erlenmeyers de 250 ml fermés par une bourre d'ouate et du papier aluminium entouré d'un film plastique pour limiter l'évaporation.
Ces erlen contiennent un volume de 50 ml de culture et sont placés sur un agitateur rotatif Bühler VKS 75 à 100 rpm, dans une chambre thermostatisée à 25°C sous illumination constante de 2000 lux.
Le repiquage s'effectue tous les 7 jours par transfert stérile de 25 ml de culture dans un cylindre gradué de 50 ml contenant 25 ml de milieu frais. Les 25 ml de culture restant dans l'erlen sont éventuellement aussi dilués par addition de 25 ml de milieu.

ETUDE DE LA CINETIQUE DE DEVELOPPEMENT DES CULTURES

I. Matériel et méthode

A. Protocole général

Les mesures sont étalées sur 25 jours et sont réalisées sur une série de 16 erlenmeyers provenant des repiquages d'un seul erlen de départ (chaque erlen est dédoublé tous les 7 jours lors du repiquage), afin de garantir une homogénéité maximale des cultures.
Les répétitions sont obtenues en mesurant les paramètres sur plusieurs séries de 16 erlen à quelques semaines d'intervalle.
Les différentes mesures réalisées sur une même série portent un même indice, par exemple : poids frais 1, résistivité 1, volume sédimenté 1...

Différents types de mesures sont effectués sur un flacon de culture de 50 ml. On détermine premièrement le volume sédimenté. Après une centrifugation à 4000 rpm (3000 G) pendant 5 minutes, on prélève 5 ml de surnageant pour effectuer, dans l'ordre suivant, les mesures de résistivité, pression osmotique et pH. On prélève également 1,5 ml de surnageant pour les mesures de concentrations en potassium, calcium et glucose. Les aliquotes de 1,5 ml sont conservés au freezer (-12° C) afin de réaliser tous les dosages simultanément en fin d'expérience.
Le reste du surnageant et les cellules sont récupérés pour la mesure du volume centrifugé.
On détermine ensuite le poids frais et finalement le poids sec.

B. Détail des techniques utilisées

1) **Mesure du volume sédimenté.** On laisse décanter 30 minutes le contenu d'un erlen de culture dans un tube gradué de 50 ml (S.Dalton, J.Webb in prep).

2) **Mesure de la résistivité.** Elle est déterminée par un impédance-mètre Hewlett-Packard 4800A dans une pièce thermostatisée à 25 +/- 0,1° C avec une cellule de conductivité YSI 3417 (Ankersmit) calibrée dans une solution de KCl 100 mN. La constante de calibration K = 1,186 et la formule de correction est Rho = R/K (Rho = résistivité; R = résistance). Les mesures sont réalisées dans cet ordre :
- 3 mesures de l'eau désionisée
- 3 mesures du surnageant de culture
- 3 mesures de l'eau désionisée
- ...

3) **Mesure de la pression osmotique.** Elle est réalisée sur un micro-osmomètre cryoscopique Gonotec Osmomat 030 en utilisant 50 µl de surnageant. La calibration de l'appareil s'effectue avec 50 µl d'eau désionisée (0 osmole/Kg) et 50 µl d'une solution de NaCl à 9,448 g/Kg d'eau, d'une pression osmotique de 0,300 osmoles/Kg.

4) **Mesure du pH.** Le surnageant de culture est mesuré sur un pH mètre Consort P614 avec une électrode combinée Radiometer GK2321 C recalibrée avant chaque série de mesures.

5) **Mesure du volume centrifugé**[22,56]. Le contenu du tube ayant servi pour mesurer le volume sédimenté est réparti dans plusieurs tubes de 10 ml gradués (au 1/10 de ml) et centrifugé à 4000 rpm (3000 G) pendant 5 minutes (centrifugeuse Hermle ZK364). Les culots de cellules sont mesurés et les valeurs additionnées.

6) **Mesure du poids frais**[22,56]. Les contenus des tubes de 10 ml ayant servi pour la détermination du volume centrifugé sont filtrés sur buchner avec un filtre en papier durci de type Whatman 54.
Les cellules sont rincées abondamment à l'eau désionisée pendant 3 minutes pour éliminer la solution adsorbée. Elles sont ensuite récoltées à l'aide d'une spatule et pesées dans une boîte de Petri en verre.

7) **Mesure du poids sec**[22]. La boîte de Petri contenant les cellules fraîches est placée pendant 24 heures à 60° C dans une étuve ventilée avant d'être repesée.

8) **Dosages du potassium et du calcium.** Ce dosage est effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique sur un appareil Jarrel-Ash 850B. Le surnageant de culture est dilué 200 fois (100 µl de surnageant dans 19,9 ml d' HCl 1N) avant d'être mesuré à 766,5 nm avec une bande passante de 0,5 nm dans une flamme air-acétylène, pour le K^+, et à 422,7 nm avec une bande passante de 0,2 nm dans une flamme protoxyde d'azote-acétylène, pour le Ca^{2+}. Les concentrations en K^+ et Ca^{2+} des 5 standards utilisés sont comprises entre 0 et 3 ppm.

9) **Dosage du glucose[2 3].**

Principe : a) Le glucose est oxydé en acide gluconique avec production d'H_2O_2 sous l'action de la glucose oxydase (GOD)

$$\text{Glucose} + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

(O_2 est consommé)

b) L'H_2O_2 oxyde l'ortho-dianisidine (OD) qui devient alors colorée. Cette réaction est catalysée par la peroxydase (POD)

$$H_2O_2 + \text{OD réduite} \xrightarrow{\text{POD}} 2H_2O + \text{OD oxydée}$$

Dosage : réactif :

- tampon Tris 1M, pH 8	25 ml/l
- glucose oxydase (Sigma)	250 mg/l
- peroxydase (Sigma)	50 mg/l
- ortho dianisidine dihydrochlorite (Sigma)	30 mg/l

L'échantillon à doser est dilué 10 à 100 fois dans l'eau désionisée de telle manière que sa concentration finale en glucose soit inférieure à 100 mg/l. On incube 0,5 ml d'échantillon dilué avec 2,5 ml de réactif pendant 1 heure à 37° C. L'absorbance est ensuite lue directement à 420 nm sur un spectrophotomètre UV-visible Philips PU8700.

10) **Tests de viabilité des cellules.**

I. Essais de séparation des colonies en cellules isolées

Il existe une série de tests de viabilité qui consistent à utiliser l'un ou l'autre colorant spécifique des cellules mortes ou vivantes et à les dénombrer ensuite au microscope optique.
Pour que ce comptage soit possible, il est nécessaire de travailler sur des cellules isolées. Or, dans les suspensions cellulaires que nous utilisons, il y a une majorité de colonies de cellules qui rendent cette méthode inutilisable.
Pour remédier à cet inconvénient, plusieurs méthodes de séparation des colonies, utilisées habituellement sur des cellules d'espèces dicotylées, ont été testées sur Festuca arundinacea.

a) Traitement à l'acide chromique[24] : On mélange 1 ml de suspension cellulaire avec 2 ml d'une solution de CrO_3 à 8 % et on chauffe à 70° C pendant 10 à 30 minutes.
Après refroidissement, le mélange est placé pendant 15 minutes sur un agitateur Bühler KL2 animé d'un mouvement rotatif de 500 rpm.
On passe ensuite la suspension finale à travers l'aiguille d'une seringue de 10 ml.

b) Traitement à l'acide chlorhydrique[25] : On effectue le traitement à l'acide chromique comme décrit en a). La suspension est ensuite centrifugée à 100 G pendant 1 minute. Le culot de cellules est incubé avec 5 ml d'HCl 2,5% pendant 1 heure à 60° C.

c) Traitement à l'EDTA : Pour ce test, nous avons utilisé le culot de cellules provenant de la centrifugation à 100 G pendant 1 minute de 1 ml de suspension cellulaire. Les 0,5 g de cellules ainsi recueillis sont soumis à 3 traitements successifs à l'EDTA. Les cellules sont à chaque fois incubées avec 20 ml d' EDTA 10 mN 10 minutes sur un agitateur à 300 rpm. Entre chaque traitement, une centrifugation à 100 G pendant 1 minute permet de recueillir les cellules.
Ensuite on réalise un traitement à l'acide chromique suivi d'HCl comme en b).

d) Traitement enzymatique : On ajoute au culot de cellules provenant de la centrifugation de 1 ml de suspension cellulaire, 5 ml de mélange enzymatique utilisé pour l'isolement de protoplastes mais sans cellulase.
Composition du mélange enzymatique pour 50 ml :

- Mannitol	5 g
- $CaCl_2$	0,073 g
- Sucrose	1,5 g
- MS salts	0,235 g
- 2,4-D	5 µg
- BAP (Benzylaminopurine)	5 µg
- Meicelase	0,5 g
- Macerozyme	0,15 g
- Pectolyase Y23	0,05 g

Le mélange est placé sur un agitateur rotatif lent (6 rpm) à 25° C (agitateur pour protoplastes) pendant une ou deux heures.

e) Traitement enzymatique, à l'acide chromique et à l'HCl: Le traitement dans le mélange enzymatique détaillé en d) est suivi du traitement à l'acide chromique puis HCl (voir b).

f) Traitement à la pectinase[24] : Le culot de 1 ml de suspension cellulaire (centrifugation 100 G, 1 minute) est mis en présence de 5 ml de pectinase 0,5% pendant 1 à 25 heures, sur un agitateur pour protoplastes (6 rpm) à 25° C.
On effectue ensuite le traitement à l'acide chromique et HCl (voir b).

g) Traitement à l'EDTA et à la pectinase : Le traitement enzymatique à la pectinase réalisé en f) est précédé de 3 traitements avec 20 ml d'EDTA 0,1N (voir c)).

II. Mesures d'absorbances

Les cellules sont traitées avec 3 des colorants utilisés habituellement pour les dénombrements de cellules vivantes : bleu de méthylène, bleu trypan ou érythrosine. On compare ensuite les spectres d'absorption des surnageants de cellules mortes et de cellules vivantes.
Les cellules mortes sont obtenues par congélation pendant 1 heure à -20° C.

a) Bleu de méthylène . Il s'agit d'un test de viabilité utisé entre autres pour Saccharomyces[26]. Le principe en est le suivant : contrairement aux cellules mortes, les cellules vivantes possèdent un pouvoir redox suffisant pour réduire le bleu de méthylène en sa forme incolore. La réaction a lieu à l'intérieur ou en surface des cellules vivantes qui apparaissent donc incolores au microscope optique, les cellules mortes étant colorées en bleu.
On ajoute à 5 ml de suspension cellulaire 100, 200, 300 ou 500 µl d'une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 g/l.
Le mélange est incubé pendant 20 heures à 25° C sur agitateur à 6 rpm.
Le surnageant, après centrifugation à 3000 rpm (1600 G) pendant 5 minutes, est mesuré au spectrophotomètre par balayage entre 210 et 710 nm.

b) Bleu trypan (Sigma). Le principe de ce test de viabilité est semblable à celui du bleu de méthylène : les cellules vivantes ne sont pas colorées et les cellules mortes sont bleues.
Des essais ont été effectués en utilisant 1 ml de suspension cellulaire auquel on ajoute :
soit - 2 ml de bleu Trypan 0,4% en solution aqueuse
- 2 ml de bleu Trypan 0,4% en solution dans du MS/CSM
- 2 ml de bleu Trypan 0,04% en solution dans du MS/CSM
- 2 ml de bleu Trypan 0,04% en solution dans du NaCl 8,5 g/l (solution physiologique).

Les temps d'incubation vont de 10 minutes à une nuit sur l'agitateur à 6 rpm à 25° C.
On centrifuge ensuite le mélange à 3000 rpm pendant 5 minutes et le surnageant est mesuré au spectrophotomètre entre 210 et 710 nm.

c) Erythrosine : Le principe de ce test est le même que pour les 2 précédents avec comme différence une coloration rose au lieu de bleue des cellules mortes. Pour cet essai, nous avons utilisé des poids frais identiques de cellules mortes ou vivantes en aspirant le milieu de culture avec une pipette Pasteur poussée contre le fond du tube contenant la suspension cellulaire.
L'érythrosine est diluée dans une solution de NaCl 8,5 g/l à raison de 0,036 g/l.
On incube 1 ml de cette solution avec 0,07 g de cellules et 2 ml de NaCl à 8,5 g/l pendant 10 minutes à 24 heures sur un agitateur rotatif à 6 rpm. Ensuite, on centrifuge le tout à 3000 rpm pendant 5 minutes et on mesure l'absorbance du surnageant au spectrophotomètre pour des longueurs d'onde allant de 210 à 710 nm.

III. Test au chlorure de triphényltetrazolium (TTC)[24]

Il s'agit d'un dosage quantitatif qui estime la viabilité des cellules en mesurant leur pouvoir réducteur.
La réduction du TTC dans les cellules vivantes produit un précipité de formazan coloré en rouge. Ce colorant est ensuite extrait à l'éthanol et mesuré au spectrophotomètre à 485 nm.

Une solution de TTC à 8 g/l est réalisée dans un mélange de 2/3 de tampon Na phosphate 0,05 M pH=7,5 et de 1/3 de milieu de culture MS/CSM.
On incube entre 0,1 et 0,5 g de cellules fraîches avec 10 ml de cette solution pendant 24 heures à température ambiante, dans le noir.
Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation (3000 rpm, 5 minutes) et lavées avec 10 ml d'eau désionisée. On centrifuge à nouveau et on incube le culot de cellules avec 10 ml d'éthanol absolu pendant 30 minutes dans un bain à 60° C.
Après une dernière centrifugation, l'absorbance du surnageant est déterminée au spectrophotomètre à 485 nm.

B. Résultats et discussion

1) Poids frais et poids sec : Figures 1 et 2

Le poids frais des cellules après le repiquage subit probablement une phase de latence de 48 heures. Cette phase est moins nette en ce qui concerne le poids sec.
Pour les deux types de mesure, on observe ensuite une phase de croissance rapide jusqu'aux environs du 7 ème jour après le repiquage.
Les poids frais se maintiennent voire augmentent légèrement jusqu'au 15 ème jour, alors que les poids secs diminuent déjà à partir du 6ème-7ème jour et traduisent donc une vacuolisation progressive des cellules lors de la 2ème semaine de culture.
On notera incidemment que la dispersion des mesures est plus grande pour les poids secs que pour les poids frais.

On a montré sur des suspensions cellulaires de carotte (Daucus carota L.) que le poids sec, la turbidité et le nombre de cellules évoluaient de façon semblable au cours du temps, du moins pour les 10 premiers jours après repiquage[25]. Mutatis mutandis, on peut supposer dans le cas de Festuca arundinacea que l'évolution du poids sec des cellules est une bonne mesure du taux de multiplication cellulaire, à défaut d'une estimation du nombre total de cellules.

2) Volume sédimenté et volume centrifugé : Figures 3, 4 et 5

L'évolution de ces 2 paramètres est assez semblable. On observe successivement après repiquage des cultures :

- un démarrage lent de la croissance pendant les premières 48 heures
- une augmentation marquée des volumes de cellules jusqu'à la fin de la première semaine
- une phase stationnaire pendant la seconde semaine
- une diminution ultérieure du volume centrifugé. Elle n'est pas nettement visible sur le graphique du volume sédimenté (Fig. 3) mais la seule mesure réalisée après 15 heures n'est pas statistiquement significative.

Ce schéma de développement est classique pour une culture de cellules.
La meilleure corrélation qu'on puisse mettre en évidence entre les paramètres observés est celle qui existe entre les mesures de volume centrifugé et les mesures de poids frais, ainsi qu'en atteste la Figure 5. La simple centrifugation d'une suspension cellulaire permet dans ce cas-ci d'obtenir une estimation valable et rapide de la biomasse.
Des mesures de volume sédimenté ont été réalisées sur la même souche de Festuca arundinacea au Pays de Galles avec entre autres différences que les cultures étaient perpétuées dans des flacons en verre fermés hermétiquement et que le milieu MS/CSM était préparé avec de l'eau monodistillée. Les résultats montrent une évolution comparable mais avec des valeurs inférieures aux nôtres :

-150 ml/l contre 250 ml/l au temps 0
-270 ml/l contre 450 ml/l 7 jours après le repiquage.

Outre les altérations génotypiques et les modifications épigénétiques observées de longue date en culture de cellules végétales in vitro et qui ont pu se produire depuis le transfert en Belgique de la souche, on peut s'interroger quant à l'effet éventuel de l'accumulation d'éthylène dans une enceinte fermée sur le cycle de développement cellulaire. Il n'existe malheureusement pas d'informations à ce sujet dans la littérature.

3) Résistivité : Figures 6 et 7

Elle est inversement proportionnelle à la concentration totale en électrolytes dans le milieu de culture et est donc influencée par les échanges de particules chargées entre les cellules et le milieu, principalement l'absorption de sels. La mesure de conductivité du surnageant permet donc de suivre très facilement le métabolisme de cellules en suspension.
On constate sur la Figure 6 qu'après une très courte phase de latence (24 heures), l'absorption de sels est constante et soutenue jusqu'au 10 ème jour.
L'absence d'absorption d'ions entre le 10 ème et le 15 ème jour de culture contraste avec la vacuolisation progressive déduite précédemment de la diminution du poids sec et du maintien du poids frais pendant cette période.
On suppose que lors de la phase stationnaire dont l'apparition est causée par l'épuisement du milieu de culture, il se produirait une hydrolyse des nombreux grains d'amidon qu'on observe dans les cellules jusqu'à plusieurs jours après le repiquage. Cette hypothèse permettrait une absorption d'eau par augmentation de la pression osmotique à l'intérieur des cellules.
Suit alors une phase de sénescence : la diminution de la résistivité du milieu peut s' expliquer comme pour les mesures de poids et de volumes, par une oxydation des réserves cellulaires, une altération des propriétés de perméabilité membranaire et finalement une lyse des cellules avec remise en solution du matériel cytoplasmique et donc d'ions.

La très faible dispersion des données, leur reproductibilité et la simplicité des mesures de conductivité, pourraient faire de cette méthode une technique de choix pour le développement futur de fermenteurs de cellules végétales de type chémostat.
On observe en effet (Figure 7) une bonne corrélation entre les mesures de poids frais de cellules et la résistivité du surnageant de culture.

4) Pression osmotique : Figure 8

La pression osmotique, comme la résistivité, est déterminée en grande partie par la concentration en sels dans le milieu de culture. La concentration en saccharose contribue en effet pour moins de la moitié à la pression osmotique totale du milieu de culture frais. A contenu égal de 30 g/l de sucrose, une solution aqueuse a une pression osmotique de 0,097 osmoles/Kg d'eau, soit à peu près 45% de la pression osmotique du milieu de culture frais MS/CSM. On peut donc s'attendre à ce que l'augmentation de la résistivité du surnageant de culture due à l'absorption de sels (voir 3) se traduise ici par une diminution de la pression osmotique. Cette diminution, très rapide, se termine vers la fin de la première semaine qui suit

le repiquage. On observe ensuite pendant la deuxième semaine une phase stationnaire où la pression osmotique du milieu extérieur ne varie plus. D'autre part, la Figure 4 montre un maintien voire une augmentation du volume cellulaire. Cette augmentation de volume doit donc être due à une élévation de la pression osmotique interne des cellules par l'hydrolyse de macromolécules, dont certainement l'amidon. La pression osmotique augmente ensuite à partir du 15ème jour après le repiquage et ce pendant toute la troisième semaine. Pendant cette dernière période de culture, on observe une augmentation de la pression osmotique du surnageant, augmentation très probablement due au relarguage d'ions décelé par les mesures de conductivité et qu'on confirmera ultérieurement.
Il est donc normal de constater qu'il existe une relation entre la pression osmotique et la résistivité. La relation entre ces 2 paramètres, représentée à la Figure 9, n'est pas linéaire car elle ne tient pas compte de l'évolution indépendante de la teneur en sucrose.

5) Concentrations en Potassium et Calcium : Figure 10

Pour les 3 séries de mesures, on n'observe pas de tendances claires dans l'évolution de la concentration en potassium pendant les premiers jours qui suivent le repiquage. Des mesures supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'existence d'un plateau initial.
La seconde partie du graphique rappelle l'évolution des autres paramètres mesurés (poids, volumes, résistivité, pression osmotique) et s'interprète de la même manière.
On peut en effet expliquer partiellement l'augmentation de la résistivité du milieu de culture par l'absorption de K^+. Hahlbrock et ses collaborateurs[27] ont montré que les changements de conductivité d'une suspension cellulaire de soja (Glycine max L.) étaient strictement corrélés avec l'absorption de nitrates. Bien que ces auteurs n'aient pas mesuré les changements de concentrations en cations, ils supposaient que les ions NO_3^- étaient absorbés avec des ions K^+. Le milieu MS utilisé se caractérise par des teneurs élevées en K^+, NO_3^- et NH_4^+. Il est très probable que des dosages d'azote minéral montreraient une évolution similaire des concentrations au cours du temps.

Quant au calcium, sa concentration reste constante au cours du temps. Ce n'est a priori pas surprenant car l'activité du calcium dans le cytoplasme végétal étant extrêmement faible (de l'ordre de 10^{-6} M contre +/- 6.10^{-3} M dans le milieu extérieur), un doublement de la quantité de calcium cytoplasmique ne peut se détecter dans le milieu de culture. Cet ion n'aura donc pas d'influence sur les variations de la conductivité électrique du surnageant.

6) Concentration en glucose : Figures 11 et 12

On utilise traditionnellement du saccharose en culture végétale in vitro, pour la simple raison que c'est la forme de carbone organique qui permet les taux de multiplication les plus élevés.
La littérature traitant des mécanismes d'absorption du sucrose par des cellules en suspension in vitro n'est pas très abondante : on suppose généralement que les mécanismes ne diffèrent guère de ceux qui prévalent dans des tissus organisés[28].
Dans le cas du transfert de sucrose dans le phloème d'un végétal, il est à présent bien établi qu'un cotransport sucrose-proton permet de concentrer le sucrose d'un facteur 100 entre le symplasme du mésophylle foliaire et les tubes criblés (Figure 11)[29].
Dans le cas de l'absorption au départ non pas du symplasme, mais de l'apoplasme, Giaquinta[30] a pu montrer sur des racines isolées de plantules de maïs que le sucrose exogène est d'abord hydrolysé en glucose et fructose dans le milieu extérieur. Vingt pourcents de l'activité des invertases cellulaires est en effet lié à la paroi et suffit, en milieu acide (pH optimum entre 4,5 et 5,0), à hydrolyser tout le sucrose avant absorption. Par ailleurs, des protoplastes de ces mêmes racines n'accumulent que très faiblement le sucrose, ce qui suggère une absence de transporteurs spécifiques dans le plasmalemme de ces protoplastes.
Finalement, l'absorption du D-glucose n'est pas non plus passive : elle est stimulée chez des protoplastes de mésophylle de pois par un pH acide et la présence d'ATP contrairement au L-glucose auquel le plasmalemme est imperméable[31].
Le glucose, lui-aussi, est cotransporté avec le proton[32]. De plus, on sait que le glucose est absorbé par la cellule avant le fructose. C'est la raison pour laquelle, face à des contraintes de temps, nous avons choisi de ne doser que le glucose.

On peut voir sur la Figure 12 que la concentration en glucose dans le milieu diminue dès le premier jour jusqu'à atteindre un niveau constant à partir du 5ème jour.
Mais ce dosage pourrait être perturbé par des interférences dues à la présence d'autres polysaccharides excrétés ou non par les cellules.
Ceci dit, la concentration en glucose atteint un minimum après 4 jours tandis que la concentration en potassium dans le milieu reste constante pendant cette période. Ce pourrait être le résultat de 2 mécanismes concurrents : l'absorption simultanée, voire le cotransport K^+-NO_3^- et l'antiport K^+-glucose H^+.
Seules des mesures très précises de ces paramètres nous permettraient peut-être de confirmer cette hypothèse.
Après le 4ème jour, en supposant qu'aucun autre sucre que le glucose n'est plus absorbé et donc échangé contre du K^+, il ne subsisterait que le symport K^+-NO_3^-, qui se traduirait par une chute rapide de la concentration extra cellulaire en potassium.

7) Tests de viabilité des cellules

I) Essais de séparation des colonies de cellules

Aucun des traitements ne permet d'obtenir une séparation suffisante des colonies que pour compter les cellules individuellement en microscopie optique.
De plus, après le traitement enzymatique seul (d.), nous avons pu déjà observer quelques protoplastes alors que des colonies étaient toujours intactes
Nous aurions pu adopter la méthode de comptage de cellules de Weber et al[33] qui consiste à isoler et dénombrer les protoplastes issus de la digestion enzymatique des cellules étudiées. Nous verrons dans le chapitre suivant pourquoi cette méthode dans le cas des cultures en suspension ne pourra jamais donner une idée du nombre de cellules présentes. De plus, même sur un tissu différencié d'un végétal non cultivé in vitro, cette méthode interdit l'estimation du nombre de cellules mortes.

II) Tests au bleu de méthylène, bleu trypan et érythrosine

Nous avons pensé que, si le bleu de méthylène, le bleu trypan et l'érythrosine étaient réduits par les cellules vivantes, nous pourrions détecter une décoloration du surnageant, après incubation de cellules avec une solution de ces colorants. Cette méthode ne permettrait toutefois au mieux que de détecter des différences globales de viabilité.
On n'observe malheureusement pas de différences significatives entre les spectres des surnageants lorsqu'on incube des cellules mortes ou vivantes.
Pour le bleu trypan (sel tétrasodique), des contrôles ont été réalisés pour déterminer si le pH ou la concentration en sodium font varier le spectre. L'addition d'une goutte d'HCl 37% ainsi que l'utilisation de solutions de bleu trypan en présence de 0 à 20 g/l de NaCl n'ont pas d'effets importants sur le spectre d'absorption.

III) Test au chlorure de triphenyltétrazolium : Figure 13

La coloration obtenue par cette méthode est à mettre en relation avec le pouvoir réducteur des cellules, ce qui donne une certaine idée de leur viabilité.
C'est donc l'activité des réductases qui augmente dès les premiers jours après le repiquage. Les quelques mesures effectuées suggèrent un maximum d'activité au 3ème jour.
Une phase de décroissance est bien visible lors de la deuxième semaine. On note ensuite en fin de troisième semaine (21 jours) que la viabilité atteint un niveau très faible (14% de ce qu'elle était à 3 jours).
Ces résultats peuvent être mis en relation avec ceux obtenus par Hahlbrock sur la nitrate réductase dans des suspensions cellulaires de soja[27], ainsi qu'avec le pic d'absorption de L-leucine, qui se produisent aux environs du 3ème jour après repiquage des cellules en milieu frais[28] (Figure 14).
On notera la coïncidence des pics d'activités 3 jours après repiquage de cultures différentes et non synchronisées.

8) Evolution du pH : Figure 15

Ce paramètre ne montre pas de variations importantes sauf en fin de culture. Ces résultats, en accord avec ceux obtenus sur le soja, excluent donc un rôle majeur des protons dans les changements de conductivité du milieu de culture jusqu'à la phase de sénescence[34,35].
Une alcalinisation du milieu se produit en effet à partir du 15ème ou 16ème jour après le repiquage, alcalinisation qui pourrait être due à une métabolisation des acides organiques naturellement présents dans le milieu, à défaut d'autres substrats carbonés.

FIGURE 1 : Evolution du poids frais de cellules en fonction du nbr. de jours après repiquage.

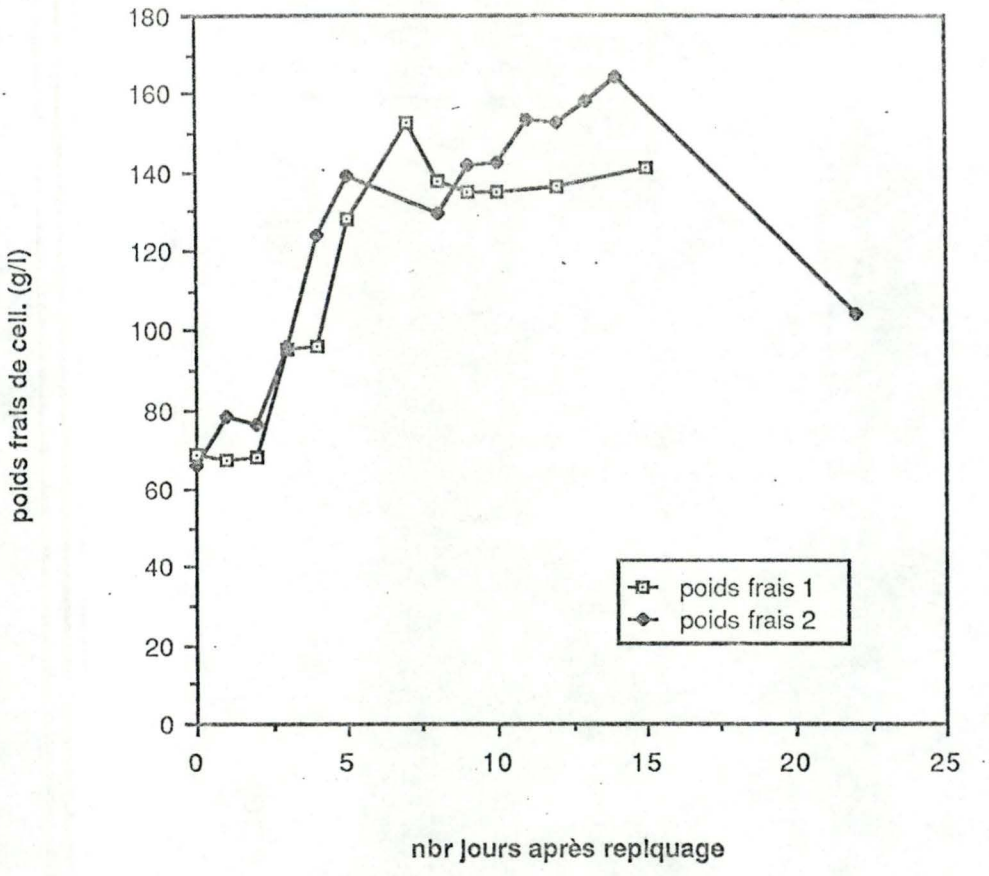


FIGURE 2 : Evolution du poids sec de cellules en fonction du nbr. de jours après repiquage.

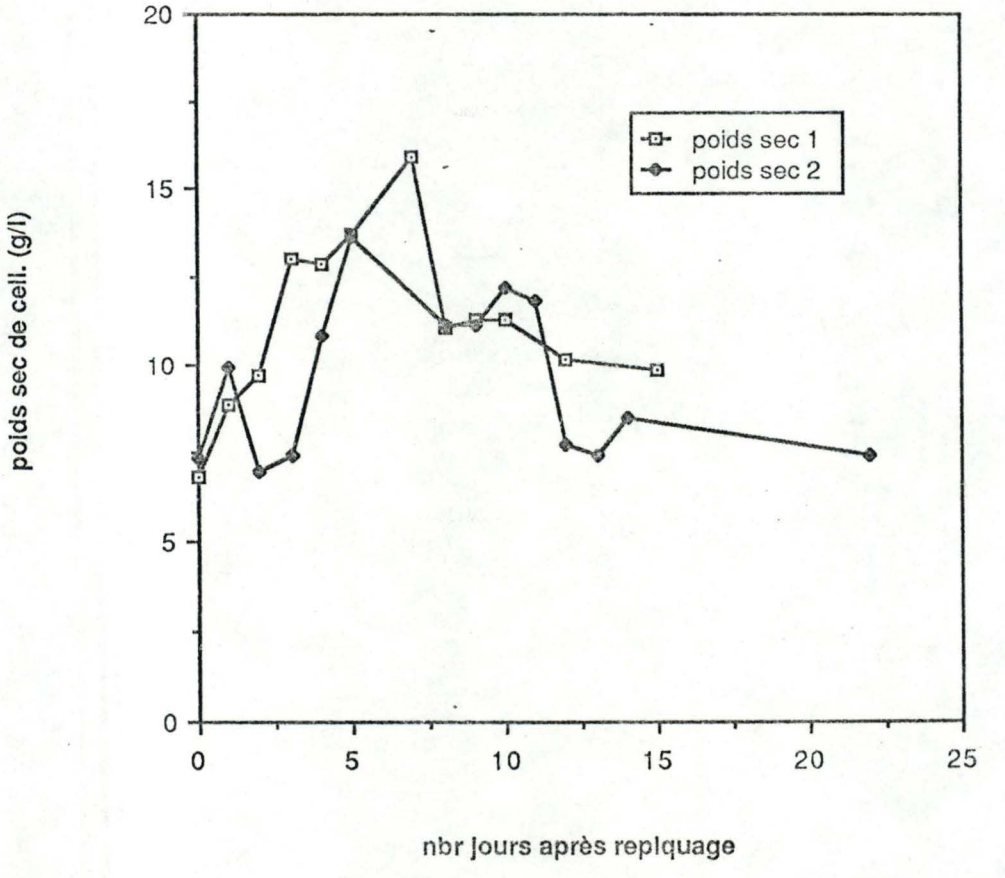


FIGURE 3 : Evolution du volume sédimenté de cellules en fonction du nbr. de jours .

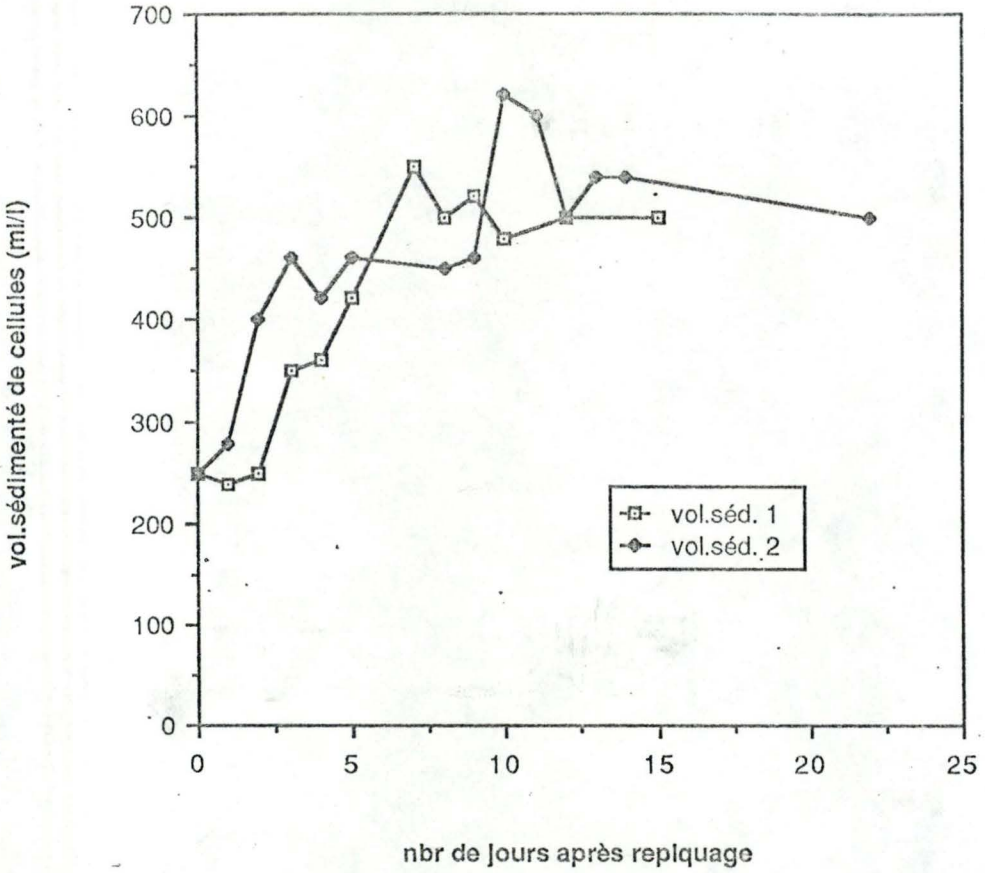


FIGURE 4 : Evolution du volume centrifugé de cellules en fonction du nbr. de jours.

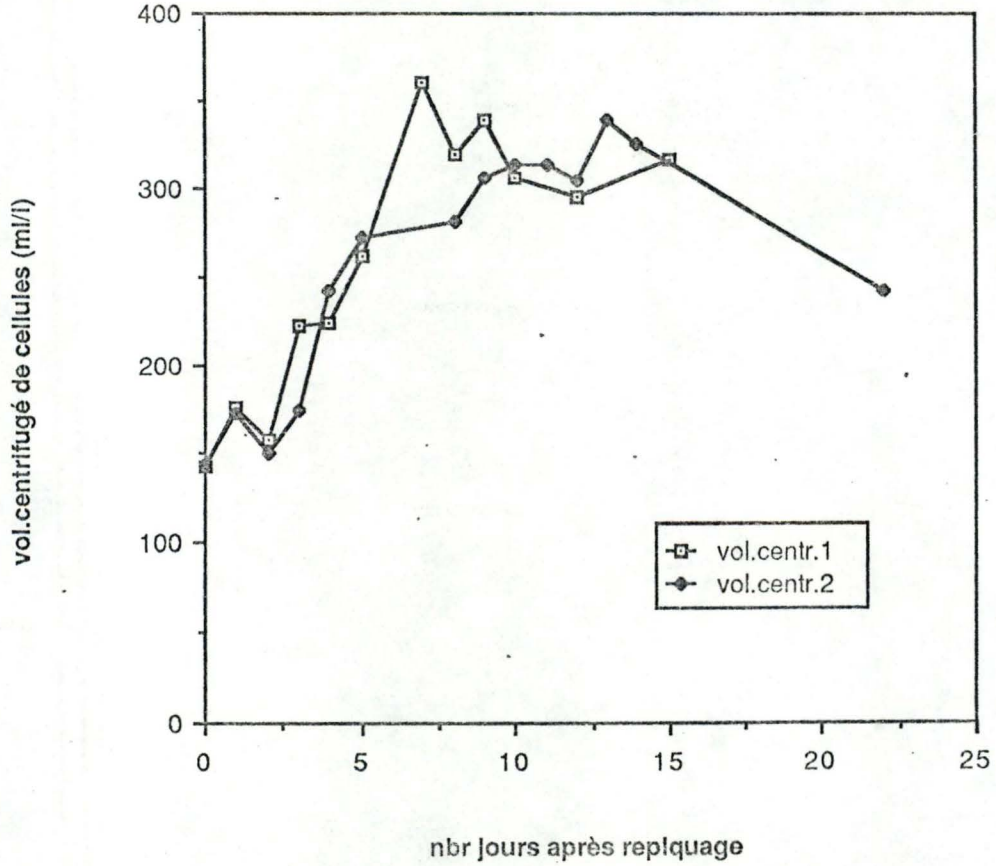


FIGURE 5 : **Relation entre le poids frais et le volume centrifugé.**

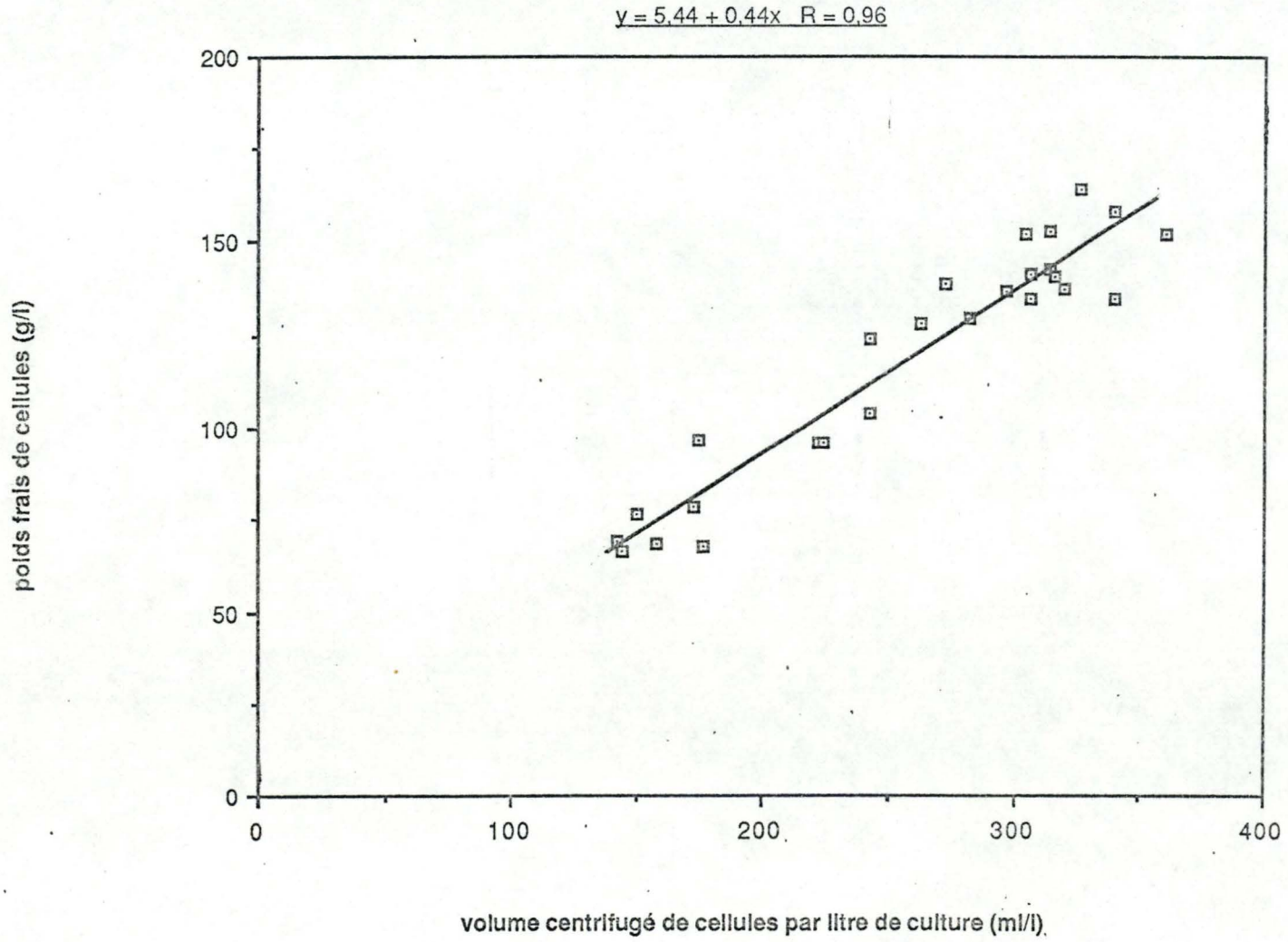


FIGURE 6 : Evolution de la résistivité en fonction du nbr de jours après repiquage.

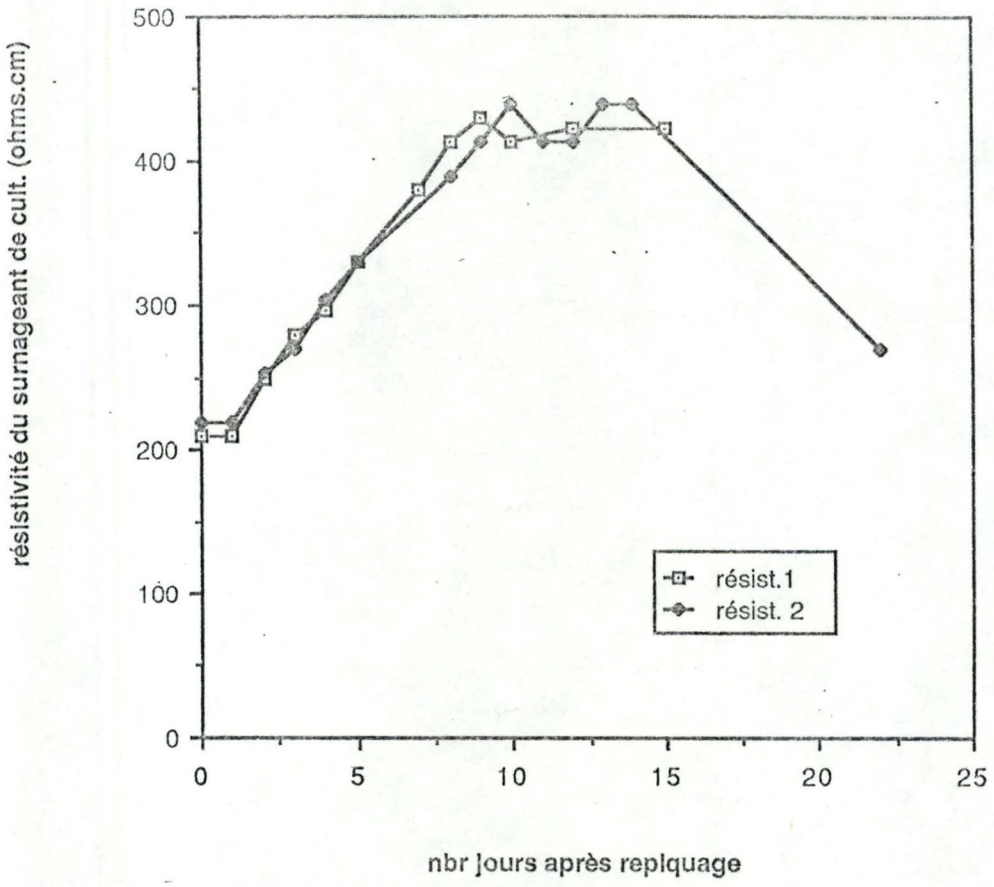


FIGURE 8 : Evolution de la pression osmotique en fonction du nbr. de jours après repiquage.

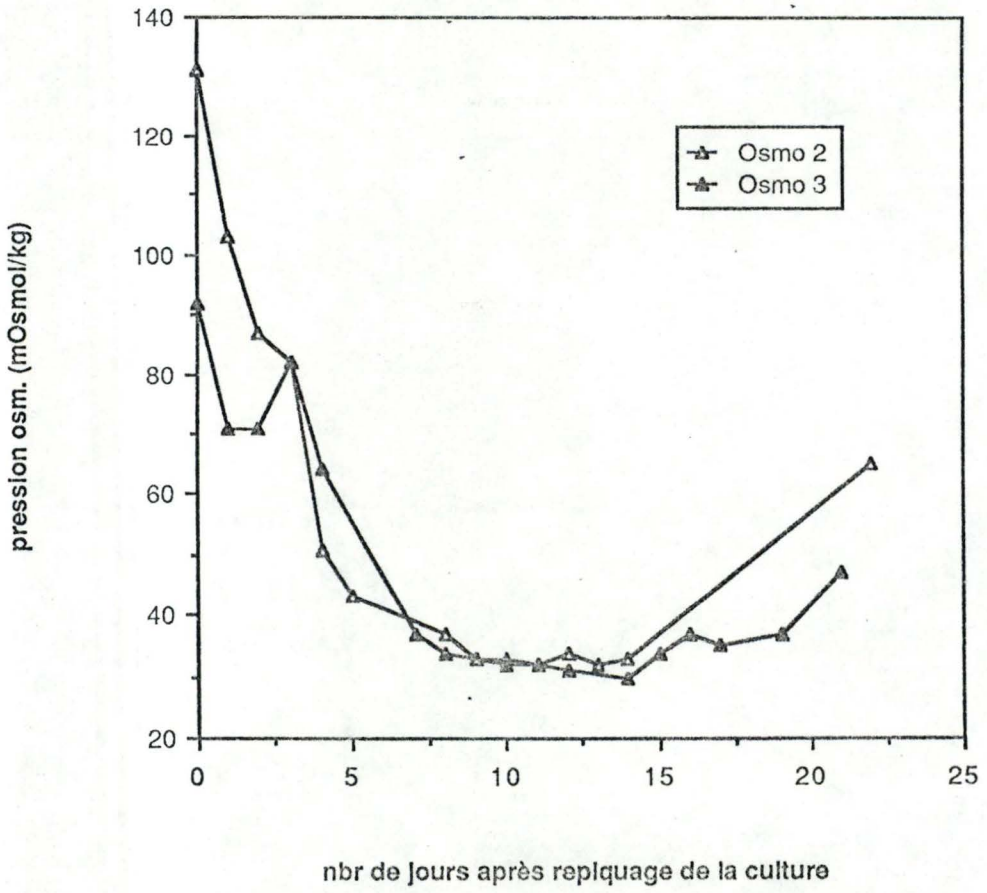


FIGURE 7 : **Relation entre le poids frais et la résistivité.**

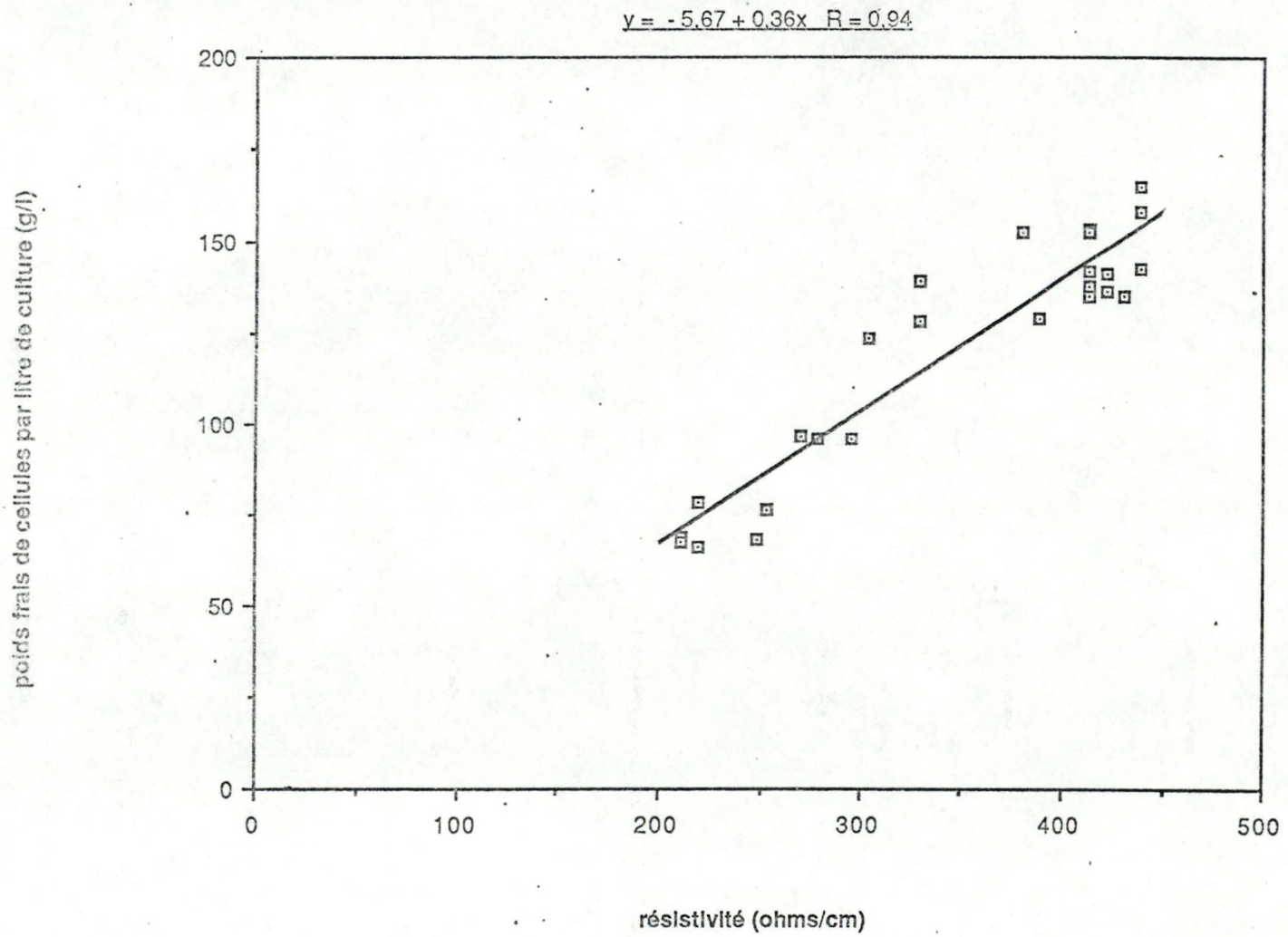


FIGURE 9 : Relation entre la pression osmotique et la résistivité.

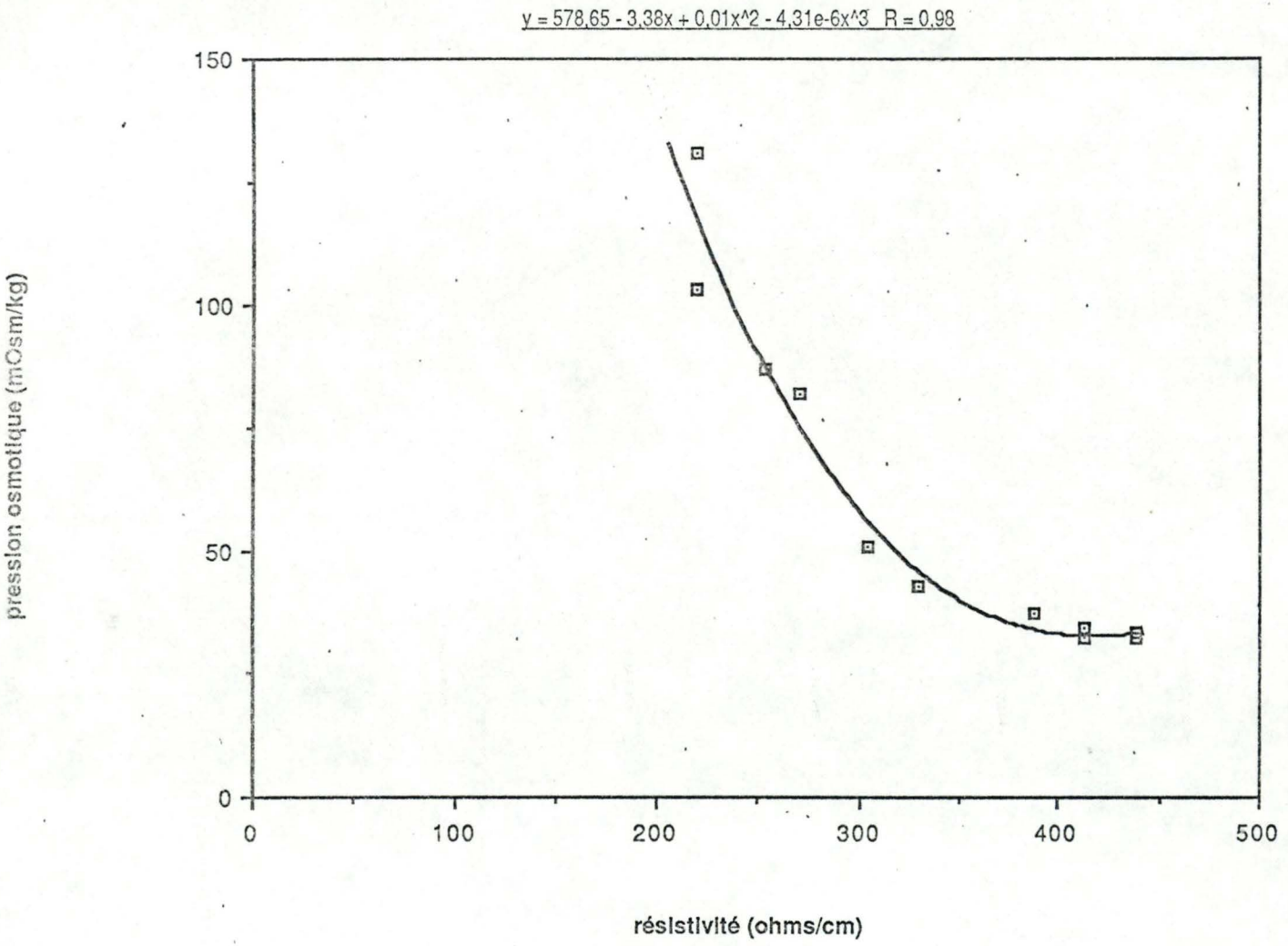
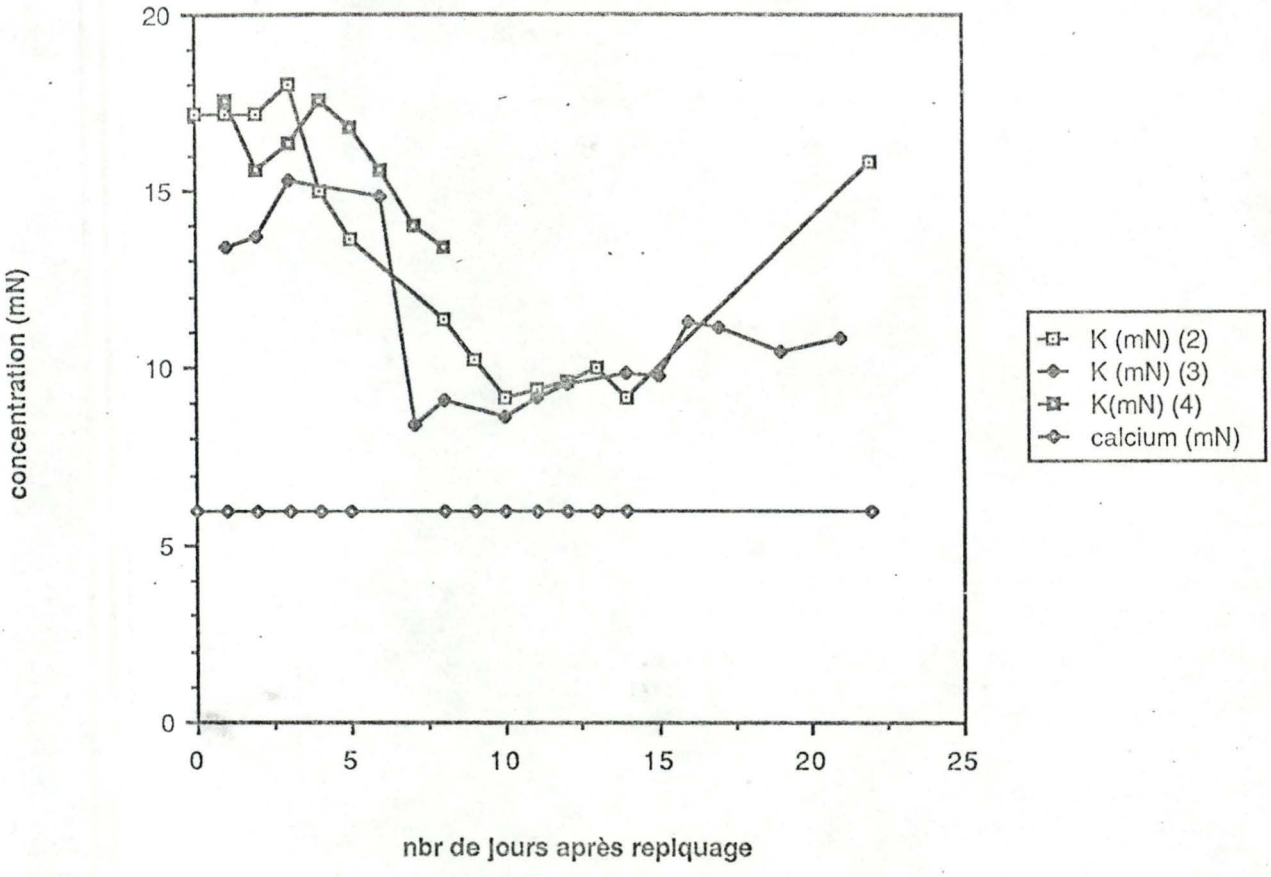


FIGURE 10 : Evolution des concentrations en calcium et potassium.



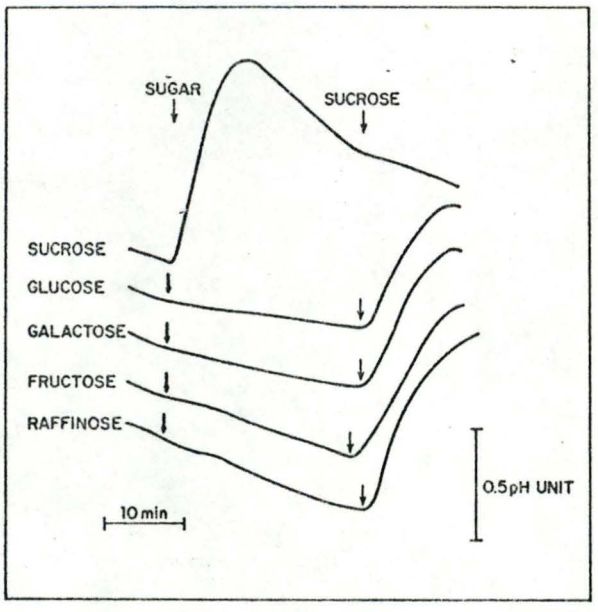


FIGURE 11 a : Evolution du pH dans le milieu de culture de feuilles de maïs en fonction du temps , après l'addition de différents sucres .

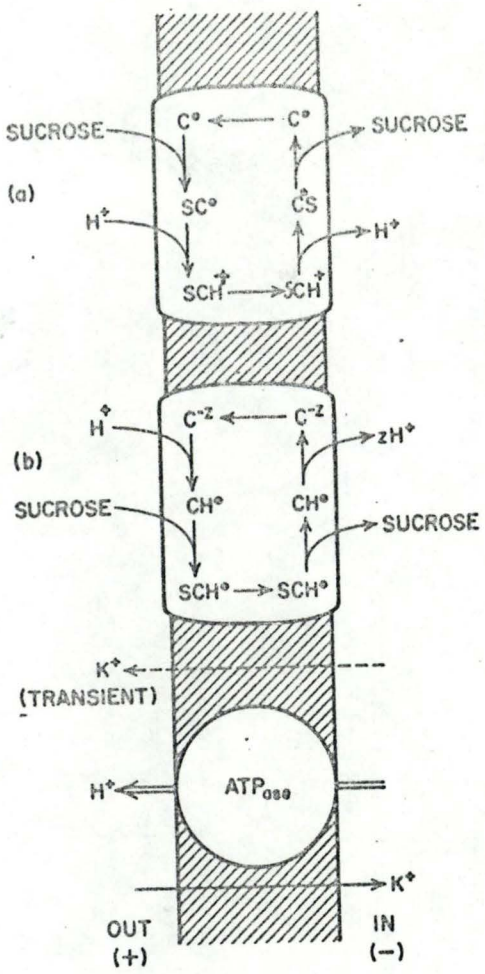


FIGURE 11 b : représentation schématique du "sucrose loading" à travers les membranes des cellules du phloème .

FIGURE 12 : Evolution de la concentration en glucose du surnageant de culture..

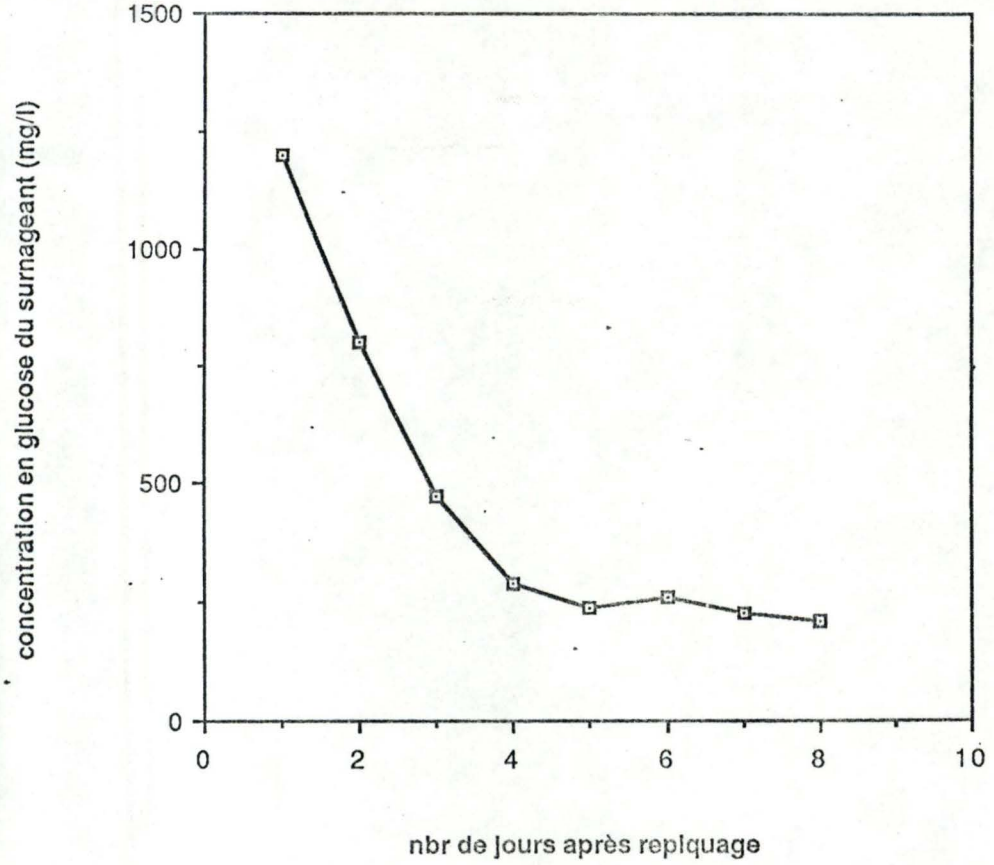
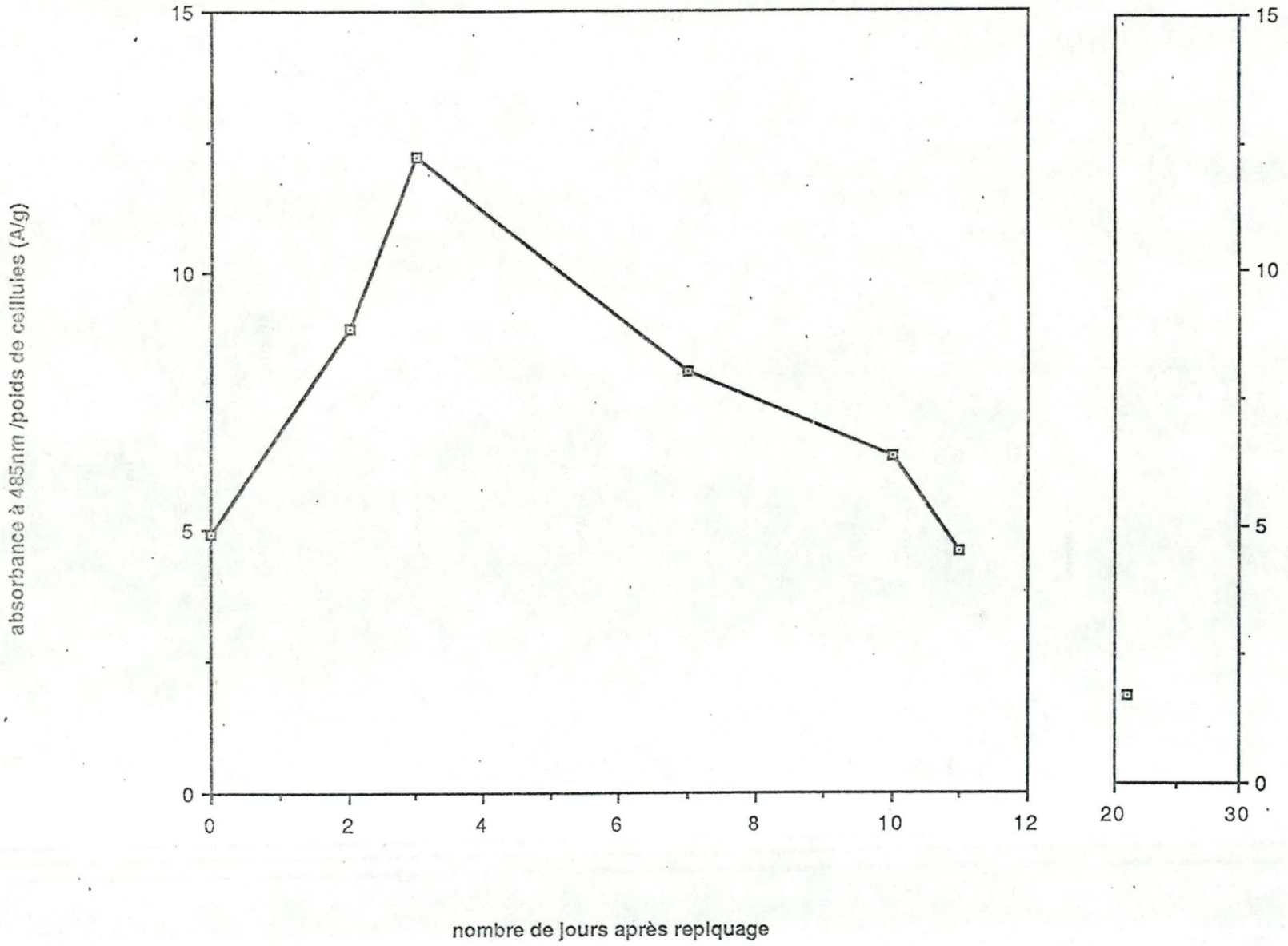


FIGURE 13 : test de viabilité au chlorure de triphenyltetrazolium .



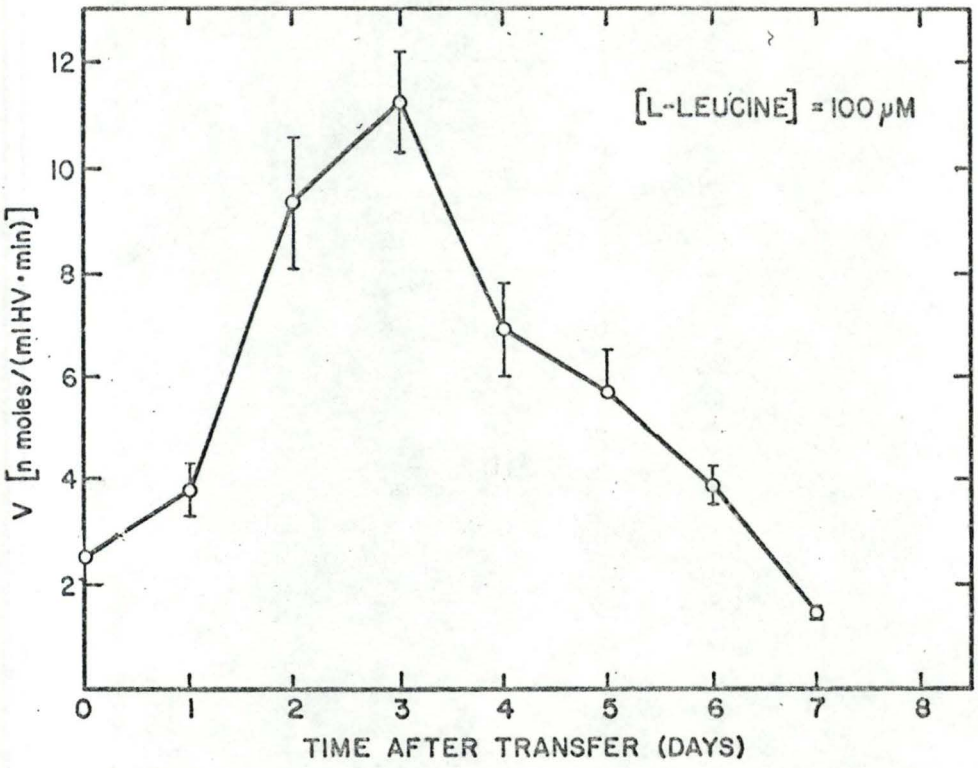
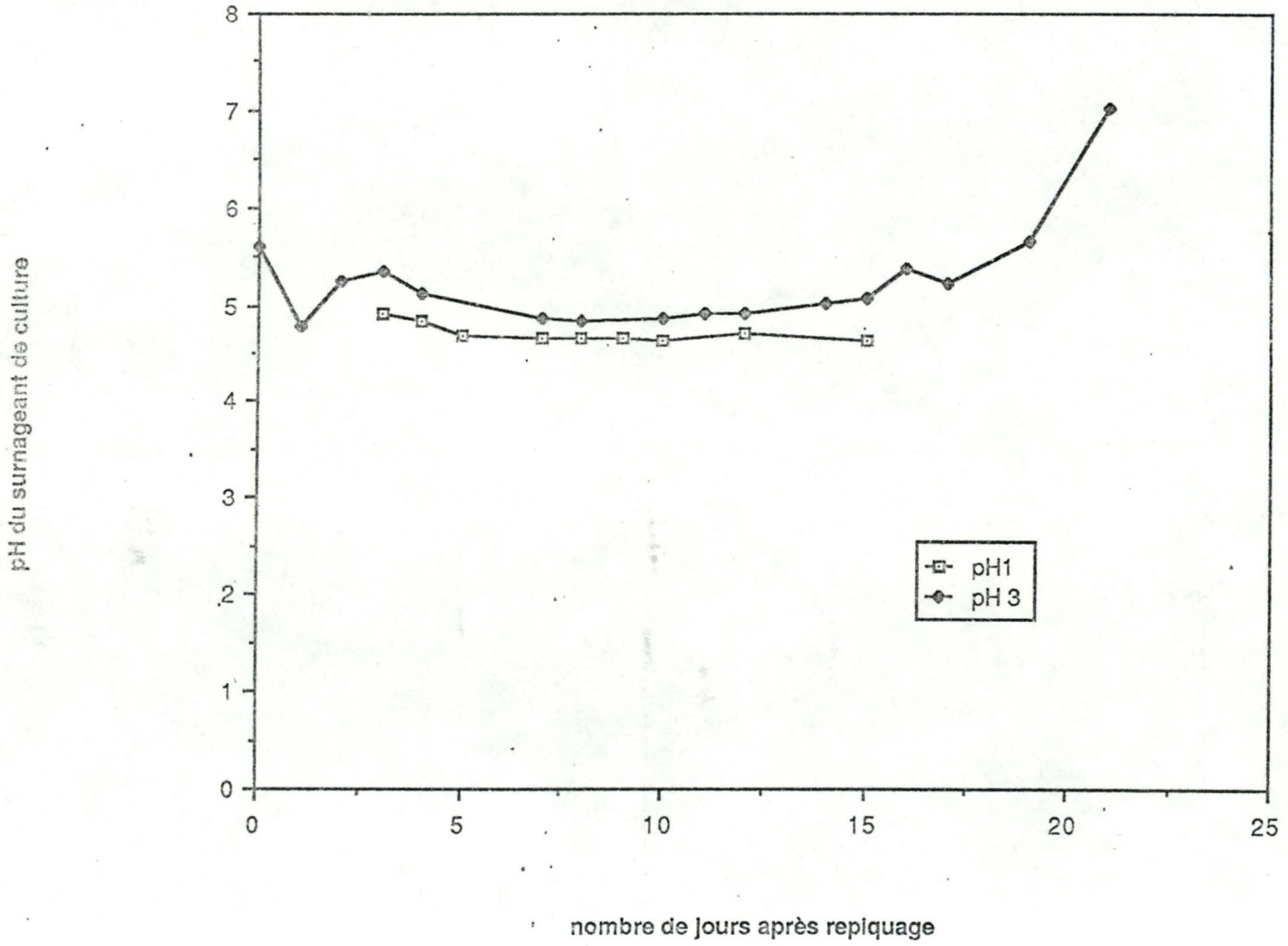


FIGURE 14 : cinétique d'incorporation de L-leucine dans des suspensions cellulaires.

FIGURE 15 : Evolution du pH en fonction du nbr. de jours après repiquage.



C O N C L U S I O N

Les mesures de poids, de volumes et d'activité de réductases cellulaires, de résistivité, de pression osmotique, de concentration en potassium et glucose du surnageant de culture, traduisent la cinétique de développement des cellules de Festuca arundinacea :

- lors de la première semaine, l'absorption rapide du carbone organique, du potassium et probablement des nitrates se traduit par une augmentation de la résistivité et une diminution de la pression osmotique du surnageant ainsi qu'une croissance des poids frais, secs et des volumes cellulaires. C'est la phase de multiplication cellulaire.

- au cours de la deuxième semaine, face à l'épuisement du milieu nutritif extérieur, se produit une hydrolyse des réserves cellulaires (essentiellement l'amidon) constituées pendant la première semaine. On constate ainsi une vacuolisation de la cellule causée par l'augmentation de la pression osmotique (hydrolyse de l'amidon) et une diminution du poids sec due à l'utilisation de ces réserves.

- une phase de sénescence débute avec la troisième semaine : l'augmentation de la conductivité et de la pression osmotique du milieu externe traduit vraisemblablement une altération des propriétés de perméabilité membranaire et finalement une lyse cellulaire.

On constate que comme le repiquage est effectué tous les 7 jours, les cellules sont constamment maintenues en phase de croissance rapide interrompue par une courte latence lors du renouvellement du milieu.
En travaillant de la sorte, on opère inconsciemment mais systématiquement une sélection des cellules se multipliant le plus rapidement[24].

I S O L E M E N T D E P R O T O P L A S T E S

I. Matériel et méthode

a) composition du milieu de culture pour protoplastes

La base du milieu de culture de protoplastes est constituée, comme pour les cultures de cellules, par le milieu de Murashige et Skoog.

Mannitol	100	g/l
MS salts	4,71	g/l
$CaCl_2$	1,47	g/l
Sucrose	30	g/l
2,4-D	0,1	mg/l
BAP	0,1	mg/l

Ce milieu est appelé MS/PS. Sa pression osmotique finale est principalement assurée par un sucre non métabolisé, le mannitol, et est d'environ 0,900 osmoles/Kg.
Le milieu de culture est autoclavé 15 minutes à 121° C (1 bar).

b) protocole d'isolement des protoplastes

Toutes les opérations suivantes sont réalisées stérilement.
On prélève un volume désiré de suspension cellulaire à l'aide d'un tube en verre de diamètre intérieur de 0,5 mm permettant d'aspirer aussi bien des cellules isolées que de grosses colonies.
Les cellules sont introduites dans un flacon Sterilin de 30 ml à fond conique. Le surnageant est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur poussée au fond du flacon.
On mesure ensuite le poids frais des cellules et on ajoute de l'ordre de 10 ml de mélange enzymatique par gramme de cellule.
Composition du mélange enzymatique : ce mélange est réalisé dans du milieu MS/PS et contient :

- 1% de cellulase Onozuka RS (Yakult Honsha Co,Ltd, Japan)
- 1% de meicelase (R.W. UNNIN and Co,Ltd, U.K.)
- 0,3% de macerozyme (Yakult Honsha Co,Ltd, Japan)
- 0,1% de pectolyase Y23 (Seishin Pharmaceutical Co,Ltd, Japan)

Il est stérilisé par filtration (filtre Sartorius 0,20 µm) et conservé au congélateur à -18° C.
Le mélange enzymes-cellules est ensuite placé sur un agitateur à mouvement circulaire de 6 rpm (agitateur pour protoplastes) dans une chambre thermostatisée à 25° C, sous éclairage continu (1700 lux).

En fin de digestion, le mélange enzymes-cellules-protoplastes est passé successivement au travers de 2 filtres nylon de 65 et 25 µm de mailles respectivement pour retenir les cellules non digérées et les plus grands débris de parois.
Les protoplastes sont recueillis par centrifugation à 100 G pendant 5 minutes dans des tubes coniques Sterilin de 13,5 ml et lavés 3 fois avec le même mélange MS/PS par resuspensions successives du culot de protoplastes, centrifugation et élimination du surnageant. Les protoplastes sont comptés à la cellule de Fush-Rosenthal (d'une profondeur de 0,2 mm) et dilués jusqu'à atteindre une concentration d'1 million de protoplastes / ml. Ils sont finalement distribués à raison de 4 ml de suspension par boîte de Petri de 50 mm de diamètre.

c) détermination de la cinétique d'isolement des protoplastes

1. méthode spectrophotométrique

C'est une méthode qui est basée d'une part sur la différence de résistance à un choc osmotique des cellules et des protoplastes et d'autre part, sur une différence d'absorbance entre des suspensions de protoplastes éclatés ou non, différence proportionnelle à la quantité de protoplastes présents. Une méthode similaire est utilisée pour étudier l'isolement de protoplastes de Saccharomyces cerevisiae[36].

i) Des prélèvements sont effectués au cours du temps de la manière suivante.
1,5 ml de mélange enzymatique (cellules et protoplastes) est prélevé à la pipette automatique avec un embout dont l'orifice recoupé a un diamètre interne de 2 mm. Le mélange est centrifugé à 100 G pendant 5 minutes.
Le culot de protoplastes et cellules est resuspendu dans 7,5 ml d'eau désionisée et est donc soumis à un choc osmotique important.
Une deuxième centrifugation est réalisée (100 G, 5 min.) et le culot de cellules et débris est resuspendu dans 7,5 ml de solution MS/PS.
Après une troisième centrifugation (100 G, 5 min.), l'absorbance du surnageant contenant les débris est mesurée au spectrophotomètre à 700 nm.
Rem : Les débris résultant de l'éclatement des protoplastes sédimentent dans l'eau mais restent en suspension dans le MS/PS plus dense, d'où la nécessité des deuxième et troisième centrifugations.

Les résultats obtenus de cette manière étaient peu reproductibles.

ii) méthode modifiée.

Les cellules sont incubées une nuit dans les enzymes. Différentes quantités de mélange enzymatique sont prélevées (1,5 et 3 ml) et subissent un traitement identique. On effectue d'abord 3 rinçages avec 5 ml de MS/PS. Le surnageant obtenu après la troisième centrifugation est mesuré au spectrophotomètre à 700 nm (première densité optique). On resuspend ensuite le culot dans 5 ml de MS/PS et on divise cette suspension de protoplastes en deux volumes de 2,5 ml qui sont traités ensuite séparément.

Le premier volume de 2,5 ml est centrifugé (100 G,5 min.), le culot est resuspendu dans 5 ml d'eau désionisée et mesuré au spectrophotomètre à 700 nm (deuxième densité optique). Après une dernière centrifugation (100 G, 5 min.), le surnageant est mesuré à 700 nm (quatrième densité optique).

Pour le deuxième volume de 2,5 ml, une centrifugation est effectuée (100 G, 5 min.), le culot est resuspendu dans 5 ml de MS/PS et mesuré au spectrophotomètre à 700 nm (troisième densité optique). La dernière centrifugation est suivie de la mesure du surnageant à 700 nm (cinquième densité optique).

La différence entre la 3ème et la 2ème densité optique devrait être directement proportionnelle au volume de mélange enzymes-cellules-protoplastes utilisé. Cette différence est de 0,036 A lorsqu'on utilise 1,5 ml de mélange et de 0,029 A lorsqu'on utilise 3 ml de mélange.

2. Méthode par comptage

Les protoplastes sont comptés directement au microscope optique à contraste de phase grâce à un hémocytomètre.
Un protoplaste se différencie d'une cellule par sa forme. En effet, lorsque la paroi cellulaire a disparu, quasi aucune contrainte mécanique ne s'exerce plus sur le protoplaste qui prend alors un volume minimum qui est celui d'une sphère. Les cellules, par contre, ont une forme généralement allongée, déterminée par leurs parois cellulaires, mais qui peut être fort variable.
Nous avons vérifié l'absence complète de paroi en utilisant un colorant spécifique de celle-ci, le calcofluor. Ce fluorochrome a une grande affinité pour la chitine et la cellulose[55]. Son pic d'absorption est à 366 nm et son émission est maximale à 450 nm. On utilise donc un filtre d'excitation BG12 et un filtre d'arrêt K510[37].

Préparation du calcofluor[22] :
On réalise une solution à 0,1% de Calcofluor White M2R (Sigma) dans le milieu MS/PS pour protoplastes.
On chauffe ensuite 5 min. à 50° C pour faciliter la dissolution.
Le mélange est centrifugé 5 min. à 3000 rpm (1600 G) pour éliminer le précipité. Le surnageant est utilisé pour la coloration.

Les protoplastes sont comptés toutes les 1/2 heures de la façon suivante :
- on prélève stérilement 1 ml de mélange enzymatique à la pipette automatique dans un tube taré et on pèse la quantité prélevée ($P_{enzymes}$)
- on centrifuge à 100 G pendant 5 min., on élimine le surnageant, et on resuspend le culot de cellules et protoplastes dans 2 ml de calcofluor
- on centrifuge de nouveau (100 G, 5 min.) et on dilue le culot dans 2 à 4 ml de MS/PS
- ce mélange final est pesé ($P_{MS/PS}$) avant de compter le nombre de protoplastes (N) à la cellule de Fush-Rosenthal sur un microscope à fluorescence transmise Reichert fluorpan, avec un grossissement total de 160 X. La distinction entre les cellules et les protoplastes s'effectue en passant de l'observation en fond clair à l'observation en fluorescence.
Le nombre de protoplastes par gramme de cellules fraîches est obtenu en réalisant le calcul suivant :

$$\frac{P_{MS/PS}}{P_{enzymes}} \times \frac{N \times 10000}{2} \times \frac{V_{enzymes}}{C}$$

avec : $P_{enzymes}$ = poids de mélange enzymatique prélevé (g)
$P_{MS/PS}$ = poids de la suspension finale de protoplastes dans le MS/PS (g)
N = nombre de protoplastes non fluorescents comptés pour 0,2 µl
$V_{enzymes}$ = volume total de mélange enzymatique utilisé pour l'isolement (ml)
C = poids total de cellules utilisé pour l'isolement (g)

d) mesure de la cinétique de fusion des protoplastes dans le mélange enzymatique

Elle est déterminée par comptage toutes les 1/2 heures du nombre de noyaux dans les protoplastes en microscopie optique. Nous avons utilisé un microscope Zeiss axioplan muni d'un objectif 40 X Phaco 2, avec un oculaire de grossissement 10 X.

On prélève stérilement à la pipette Pasteur une goutte de mélange enzymatique que l'on dépose sur une lame de verre et que l'on recouvre d'une lamelle couvre-objet.
On se place au hasard sur la coupe avant d'observer et de compter le nombre de noyaux dans des protoplastes pris aléatoirement dans le champ de vision.

e) étude de la distribution de taille des colonies de cellules dans une culture

Ceci s'est fait simplement par filtrations successives sur tamis métalliques (Cellector Bellco) à mailles de plus en plus fines et pesée des cellules récoltées à chaque étape (poids frais). Les cellules sont passées au travers de tamis de largeurs de mailles de : 1,954; 0,993; 0,543; 0,304; 0,280; 0,228; 0,203; 0,162; 0,116 mm et finalement un filtre de papier durçi Whattman 54.
Des mesures ont été réalisées sur des cultures d'âges différents, chaque série de mesures utilisant 50 ml de suspension cellulaire (un erlen de culture).

II. Résultats et discussion

a) Méthode spectrophotométrique

Cette méthode mesure la quantité de débris en suspension après l'éclatement des protoplastes dans une solution hypotonique (eau désionisée). On détermine donc de ce fait le volume global des protoplastes en suspension et non leur nombre. Or, nous avons observé que les volumes des protoplastes étaient très variables. Cette hétérogénéité provient du fait que les volumes des cellules de départ sont eux aussi assez variables mais de plus, un protoplaste provenant de la fusion de deux ou plusieurs autres congénères possède un volume nettement supérieur à celui d'un protoplaste uninucléé, non fusionné.

Un autre inconvénient provient du fait que des cellules dont la paroi n'est que partiellement digérée éclatent quand même dans l'eau et sont dès lors assimilées à de vrais protoplastes.

Aucun de nos tests n'étant concluant, nous nous sommes finalement tournés vers une méthode de comptage direct.

b) Comptage après coloration au calcofluor

1. Evolution de la cinétique d'isolement en fonction du nombre de jours après le repiquage des cellules

Des mesures ont été faites 2 jours (Figure 1), 3 jours (Figure 2, 2 répétitions), 4 jours (Figure 3, 3 répétitions), 10 jours (Figure 4), 15 jours (Figure 5) et 22 jours (Figure 6) après le repiquage des cellules.
L'allure générale des cinétiques d'isolement peut être décrite comme suit.

On observe d'abord une période pendant laquelle il n'y a aucun protoplaste dans le mélange enzymatique. Cette phase de latence correspond au temps nécessaire pour que les parois cellulaires les moins résistantes à l'attaque enzymatique soient tout de même digérées.

Ensuite, une phase exponentielle de libération de protoplastes est bien visible et très répétitive. Elle se poursuit jusqu'à ce que le nombre de protoplastes en suspension atteigne un maximum.

La phase de décroissance qui suit ce maximum se retrouve elle aussi sur tous les graphiques. Cette décroissance n'est pas constante, elle présente une série de pics de libération de protoplastes (surtout visible pour les cellules de 4 jours). Ces maxima ultérieurs, qui apparaissent après environ 4 heures, pourraient résulter d'une hétérogénéité de la population de cellules de départ. La cinétique globalement observée serait alors la somme des cinétiques des différentes populations de cellules avec un maximum pour chaque population.

D'autre part, cette période où l'on trouve de nombreux maxima est peut-être due aussi à la variabilité expérimentale inhérente au système de comptage. Pour que la méthode soit la plus précise possible, il est nécessaire que l'échantillon prélevé dans le mélange enzymatique soit représentatif du total du flacon, ce qui implique l'obtention d'une solution homogène de protoplastes et cellules. Quoique le flacon de digestion ait été agité soigneusement mais délicatement pour éviter l'éclatement des protoplastes, on ne peut garantir la représentativité de tous les échantillonnages.
De plus, pour tenter d'augmenter la précision des mesures, nous avons au fur et à mesure des expériences compté un nombre croissant de carrés dans le quadrillage de la cellule de Fush-Rosenthal. Pour les dernières mesures par exemple, nous comptions jusqu'à 144 carrés de 0,0625 mm^2 contre 32 carrés en moyenne pour les toutes premières expériences.

Enfin, lorsqu'un comptage a été effectué le lendemain du jour de l'isolement, on note que le nombre de protoplastes atteint un niveau final remarquablement bas. Cela est moins net pour les cellules de 15 jours (Figure 5) mais la seule mesure effectuée après 24 heures n'est statistiquement significative.

L'âge des cellules a donc une influence sur la cinétique d'isolement des protoplastes.

Les cinétiques pour des cellules en première semaine de culture (2, 3 et 4 jours) ne montrent pas de différences importantes. La phase de latence est à peu près d'une heure et un maximum d'environ 12 millions de protoplastes par gramme de cellule est atteint après 3,5 à 4 heures. La phase de croissance avec ses maxima successifs ainsi que le niveau final bas (2,5 millions de protoplastes par gramme de cellule) se retrouvent sur les Figures 1, 2 et 3.

Pour les cellules de 10 et 15 jours (c-à-d, dans la phase stationnaire), les cinétiques d'isolement des protoplastes sont elles auusi très semblables. La phase exponentielle se prolonge au moins jusqu'à près de 10 heures et montre, à partir de 3 ou 4 heures, une série de maxima successifs. Le nombre maximum de protoplastes atteint est inférieur à celui des cellules en première semaine de culture (8 millions de protoplastes / g de cellule).

Il est intéressant de mettre ces résultats en relation avec ceux obtenus pour les cinétiques de développement des cultures de cellules (Chapitre: "CULTURES DE CELLULES", II. Résultats et discussion , pages 15 à 20).
En effet, les cellules de 2, 3 ou 4 jours se trouvent toutes dans la phase de multiplication rapide, qui se traduit par l'accroissement des paramètres de poids, volumes, résistivité, pouvoir réducteur (viabilité), ou la diminution de la pression osmotique, concentration en potassium et glucose du surnageant. Les cellules de 10 et 15 jours se trouvent elles toutes deux dans la phase stationnaire alors qu'après 22 jours, la phase de sénescence est déjà bien avancée.

Il nous semble que 2 causes peuvent expliquer l'aptitude inférieure de cellules sénescentes à libérer des protoplastes.

- la composition en polysaccharides de la paroi cellulaire doit jouer à ce niveau un rôle important. A ce sujet, on a pu montrer sur des suspensions cellulaires de carotte que le poids moléculaire de la cellulose augmentait appréciablement au cours du temps[38] ainsi que les concentrations en polyuronides (une des fractions de la pectine) et hémicelluloses de faibles poids moléculaires[39]. La composition en sucres des pectines et hémicelluloses varie elle aussi en fonction de l'âge des cultures. Des variations similaires de la composition en polysaccharides non cellulosiques de la paroi chez la laitue ont été attribuées aux conditions de culture et aux différents stades de développement et de différenciation[40]. Enfin, des changements dans la composition en polysaccharides de la paroi de Catharanthus roseus ont été observés en fonction du stade de division sur des cultures synchronisées[41].
De telles modifications biochimiques de la paroi cellulaire peuvent engendrer une plus grande résistance de cette paroi à un mélange enzymatique composé pour des cellules en phase de multiplication rapide.

- la structure du plasmalemme détermine la résistance à l'éclatement des protoplastes. On sait que la composition en acides gras de la membrane varie en fonction du stade de différenciation des cellules[42]. De plus, des études de mobilité électrophorétique sur des protoplastes de maïs ont montré des différences dans le contenu en protéines de surface du plasmalemme lorsque l'on utilise des cellules provenant de différentes zones de la racine[43].
Ces études s'intéressent à l'effet de la différenciation cellulaire. Dans notre cas, c'est le vieillissement qui est en cause mais il est possible que des variations de la composition en acides gras et protéines du plasmalemme fragilisent les protoplastes et soient à l'origine de la diminution, par éclatements, du nombre de protoplastes comptés.

L'épaississement et la variation de la composition en polysaccharides de la paroi cellulaire ainsi que la modification de la structure du plasmalemme sont deux facteurs qui peuvent expliquer, pour l'un, le retard dans la phase exponentielle de libération de protoplastes, et pour l'autre, la diminution du nombre maximum de protoplastes libérés lorsque l'on utilise des cellules de plus en plus âgées.

La présence de maxima locaux et l'évolution des cinétiques en fonction de l'âge des cultures nous ont amenés à tester l'hypothèse d'une influence de la taille des colonies sur la vitesse de dégradation des parois cellulaires. Des cellules en amas sont en effet moins accessibles à l'attaque enzymatique que des cellules isolées (ou en chaînes) et nécessitent probablement plus de temps pour libérer des protoplastes.
Nous avons donc, dans une étape ultérieure, étudié la distribution des tailles des colonies en fonction de l'âge de la culture.

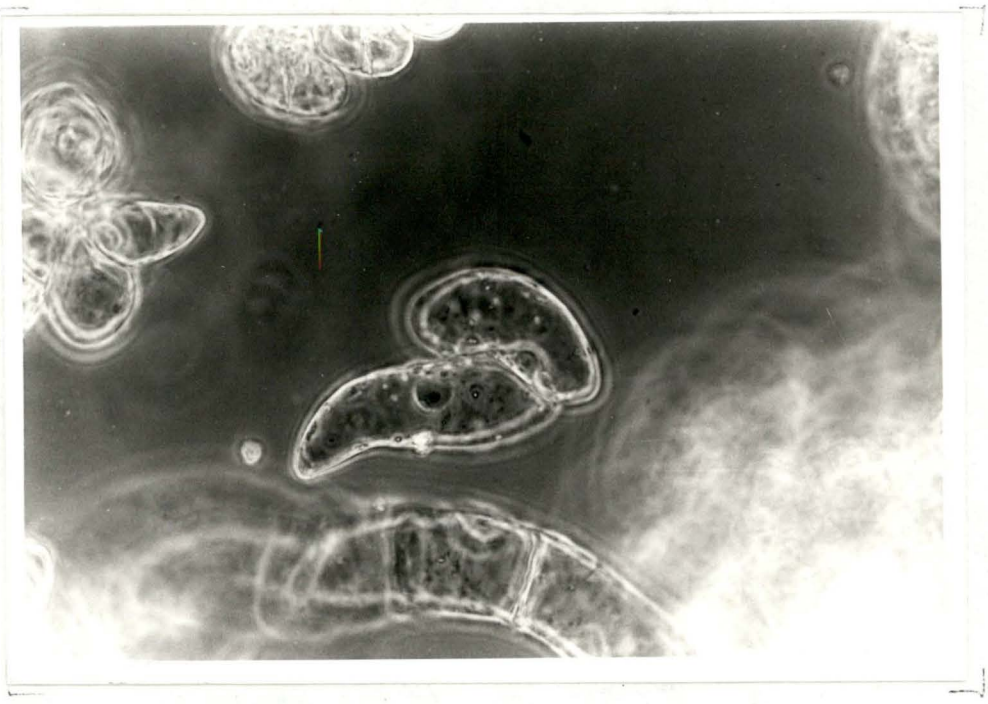


PHOTO 1 : cellules isolées de *Festuca arundinacea* cultivées en suspensions in vitro (4 jours après repiquage). Microscope à contraste de phase, grossissement 400 X .

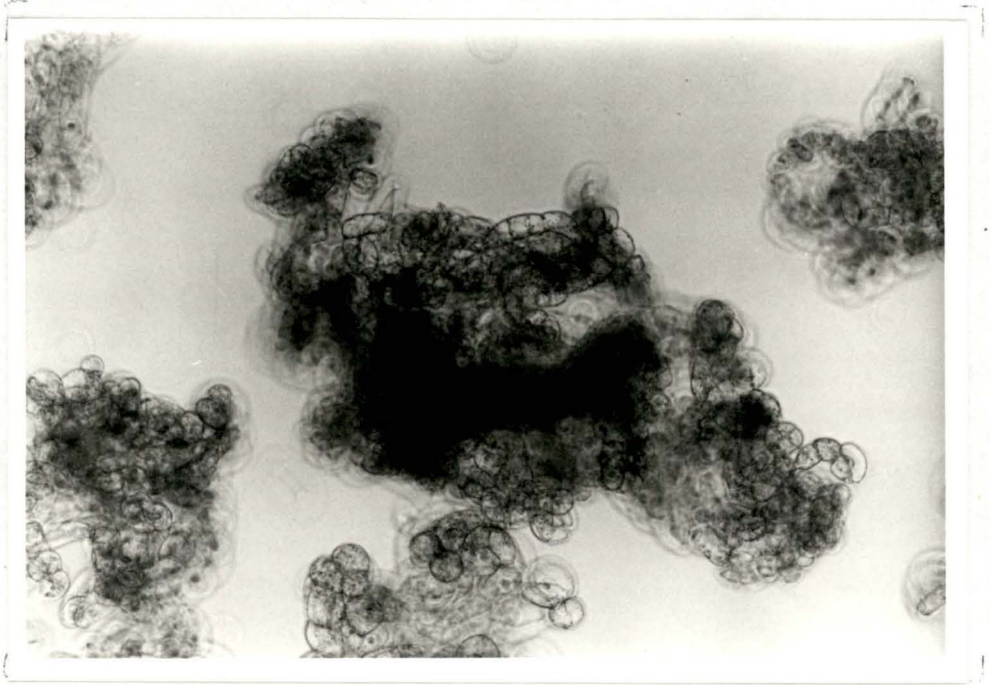


PHOTO 2 : amas de cellules dans une suspension de *Festuca arundinacea* cultivée in vitro (4 jours après repiquage). Microscope à contraste de phase, grossissement 100 X.

Il est donc clair qu'on ne peut assimiler dans ce cas-ci les grosses colonies de 4 jours à des cultures âgées, c-à-d qu'on ne peut confondre différenciation cellulaire et sénescence. Pour des cellules inférieures à 0,3 mm, le rendement maximum en protoplastes est de 20 millions / g de cellules fraîches alors que cette valeur n'est que de 13 millions / g pour des cultures non filtrées de même âge (Figures 3 et 10).

On pourrait peut-être attribuer ces rendements plus faibles à 2 causes principales. D'abord à une paroi cellulosique plus épaisse dans les grosses colonies de 4 jours ainsi qu'en atteste la fluorescence au calcofluor. A poids égal, il y aurait moins de cellules dans les colonies que dans les chaînes. Ensuite, et peut-être surtout, à une disparition plus rapide des protoplastes issus de grosses colonies, comme nous allons le voir tout de suite.

En effet, une caractéristique de toutes les cinétiques obtenues est la décroissance du nombre de protoplastes comptés au cours du temps.
A première vue deux phénomènes peuvent expliquer cette diminution : une lyse des protoplastes et/ou leur fusion.

c) Cinétique de fusion des protoplastes

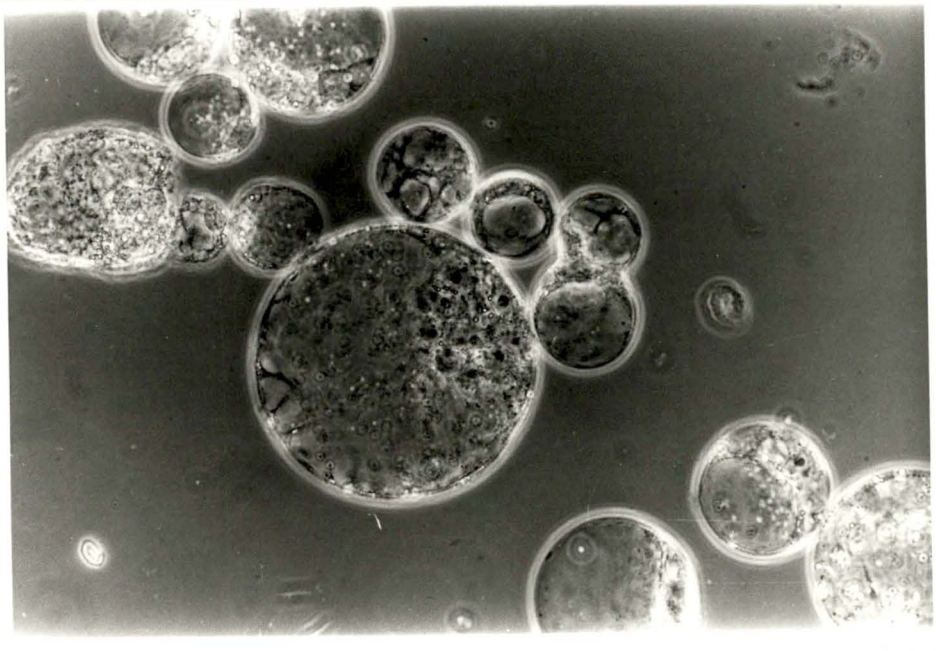
La Figure 11 nous montre l'évolution au cours du temps de la répartition des noyaux dans les différents types de protoplastes observés (uni-,bi-,tri-,tétra-,penta- et hexa-nucléés).
Les premiers protoplastes binucléés apparaissent après 2,5 heures de digestion enzymatique et à partir de ce moment, le nombre de noyaux par protoplaste ne cesse d'augmenter.

Deux mécanismes pourraient être invoqués pour expliquer l'augmentation du nombre de protoplastes multinucléés.

1) Des figures de mitose ont été observées sur des protoplastes fraîchement isolés de Vicia hajastana se trouvant toujours dans le mélange enzymatique[44]. D'autre part, il a été rapporté que la présence de matériel fluorescent au calcofluor sur des protoplastes de tabac était nécessaire pour que la cytocinèse ait lieu[45,46].
L'apparition de protoplastes multinucléés pourrait provenir, chez certaines espèces du moins, d'une caryocinèse sans cytocinèse[47].
Des études en immunofluorescence sur des protoplastes d'Hibiscus ont montré une absence de microtubules corticaux nécessaires pour la cytocinèse[48].
Dans notre cas, nous n'avons jamais observé de figures de mitoses sur des protoplastes dans le mélange enzymatique.



Figures de fusion observées dans une suspension de protoplastes dans le mélange enzymatique (cellules de 4 jours, 3h. d'isolement). Microscope à contraste de phase, grossissement 400 X .



Au centre, protoplaste multinucléé (plus de dix noyaux) observé dans le mélange enzymatique après 24h d'isolement . Microscope à contraste de phase, grossissement 400 X .

2) Il faut alors expliquer l'apparition de protoplastes multinucléés par des fusions spontanées dans le mélange enzymatique. Ce mécanisme a été souvent proposé mais est habituellement présenté comme étant le résultat de l'élargissement de plasmodesmes entre 2 protoplastes provenant de cellules contiguës dans une même colonie[44,49,50,51].
Ce point de vue est conforté par le fait qu'une plasmolyse des cellules avant l'isolement enzymatique a pour conséquence de faire diminuer le nombre de protoplastes binucléés obtenus[52].
Nous ne disposons pas de résultats qui nous permettraient d'exclure la possibilité de fusions spontanées entre des protoplastes non contigus. Nous n'avons pu trouver dans la littérature d'expériences décisives à ce sujet.
Néanmoins, la cinétique d'isolement réalisée sur la fraction fine de cellules (Figure 10) montre un plateau entre 2 et 5 heures, suivi d'une décroissance lente du nombre de protoplastes comparativement à celle observée dans les autres cinétiques. Ceci est peut-être dû au fait que des cellules isolées ou en chaînes ne sont reliées que par quelques plasmodesmes alors que pour les amas,le nombre de ces connections est nettement plus élevé. Cette observation conforte donc la théorie de l'homofusion par élargissement de plasmodesmes. Cependant, il a été montré grâce à des techniques de microscopie électronique et des mesures de résistance électrique entre cellules voisines que les cellules d'un cal cultivé in vitro comportaient très peu de connections intercellulaires[53], contrairement aux cellules de mésophylles foliaires, qui elles, ne fusionnent quasiment pas dans le mélange enzymatique.
Un autre test valable serait d'utiliser, pour un même isolement de protoplastes, deux lots de cellules traitées avec deux colorants vitaux différents et de vérifier la présence de protoplastes montrant les deux colorations.
Nous avons réalisé un essai en utilisant la scopolétine et la carboxyfluorescéine[54] (2 colorants vitaux) mais, en raison de problèmes de mise au point, les observations en microscopie optique ainsi qu'un test à l'analyseur d'image n'étaient, malheureusement, pas convaincants.

FIGURE 1 : **cinétique isolement 2J après repiquage**

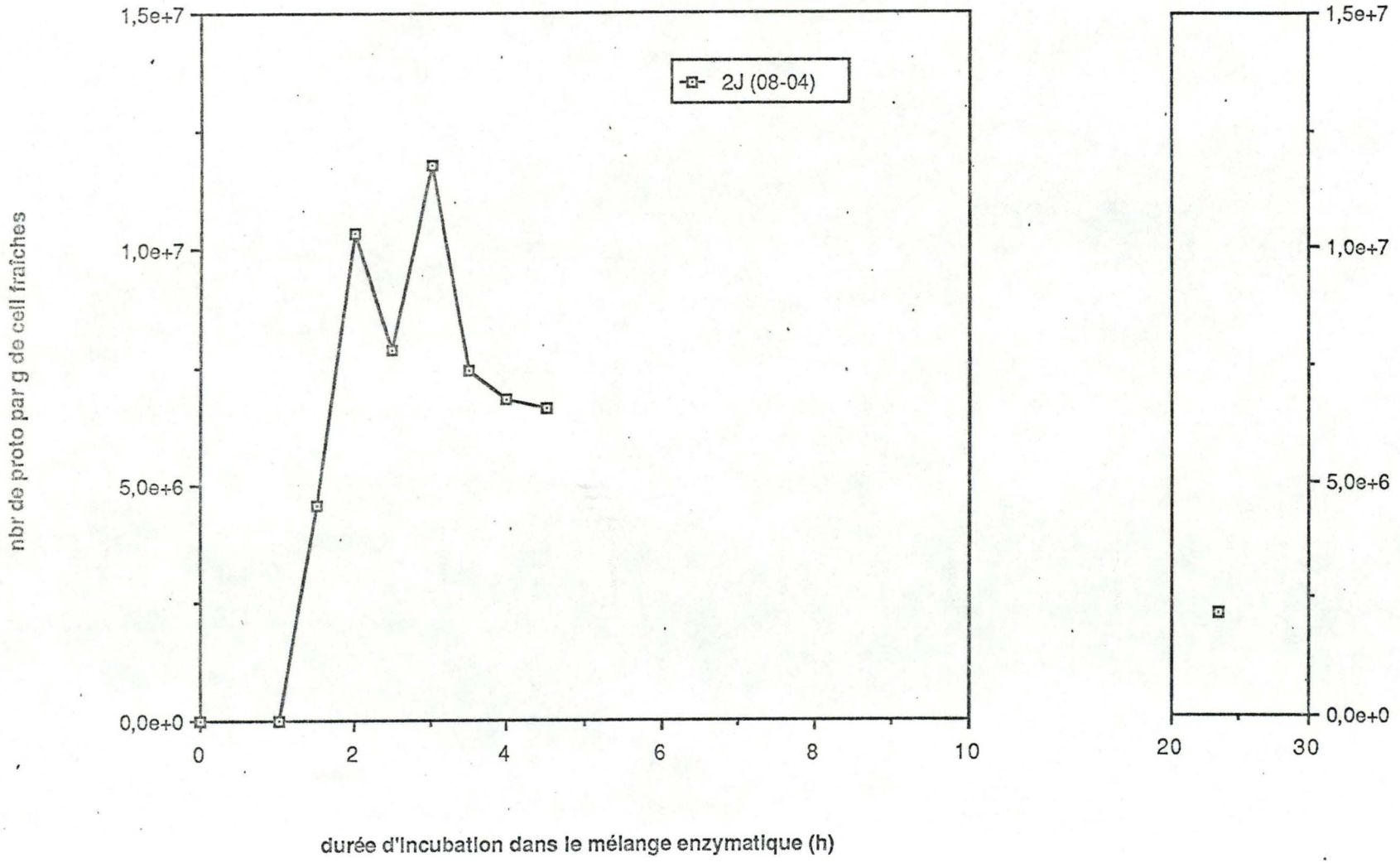


FIGURE 2 : **Cinétique d'isolement 3J après repiquage**

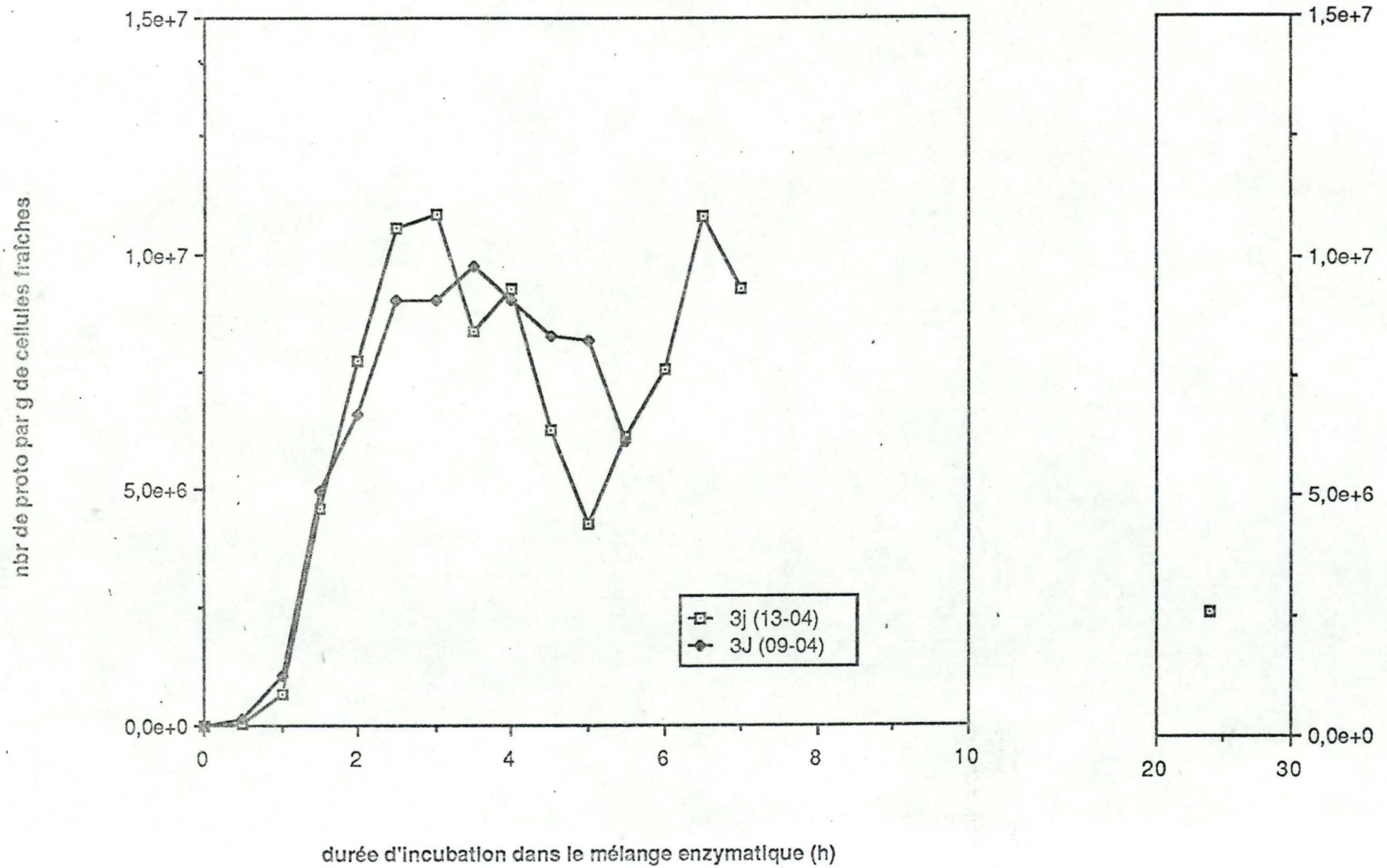


FIGURE 3 : cinétique isolement 4J après repiquage

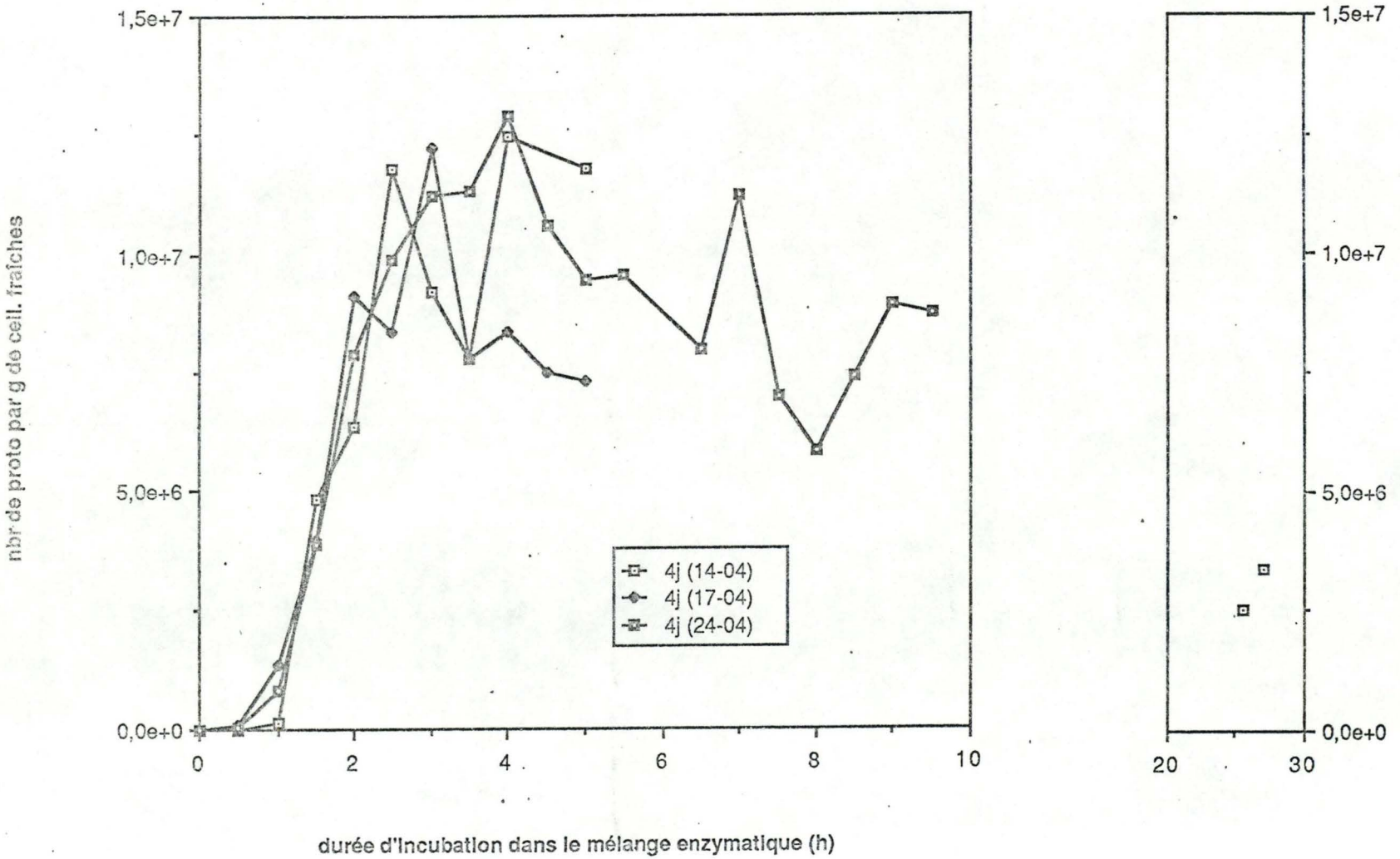


FIGURE 4 : cinétique isolement 10J après repiquage

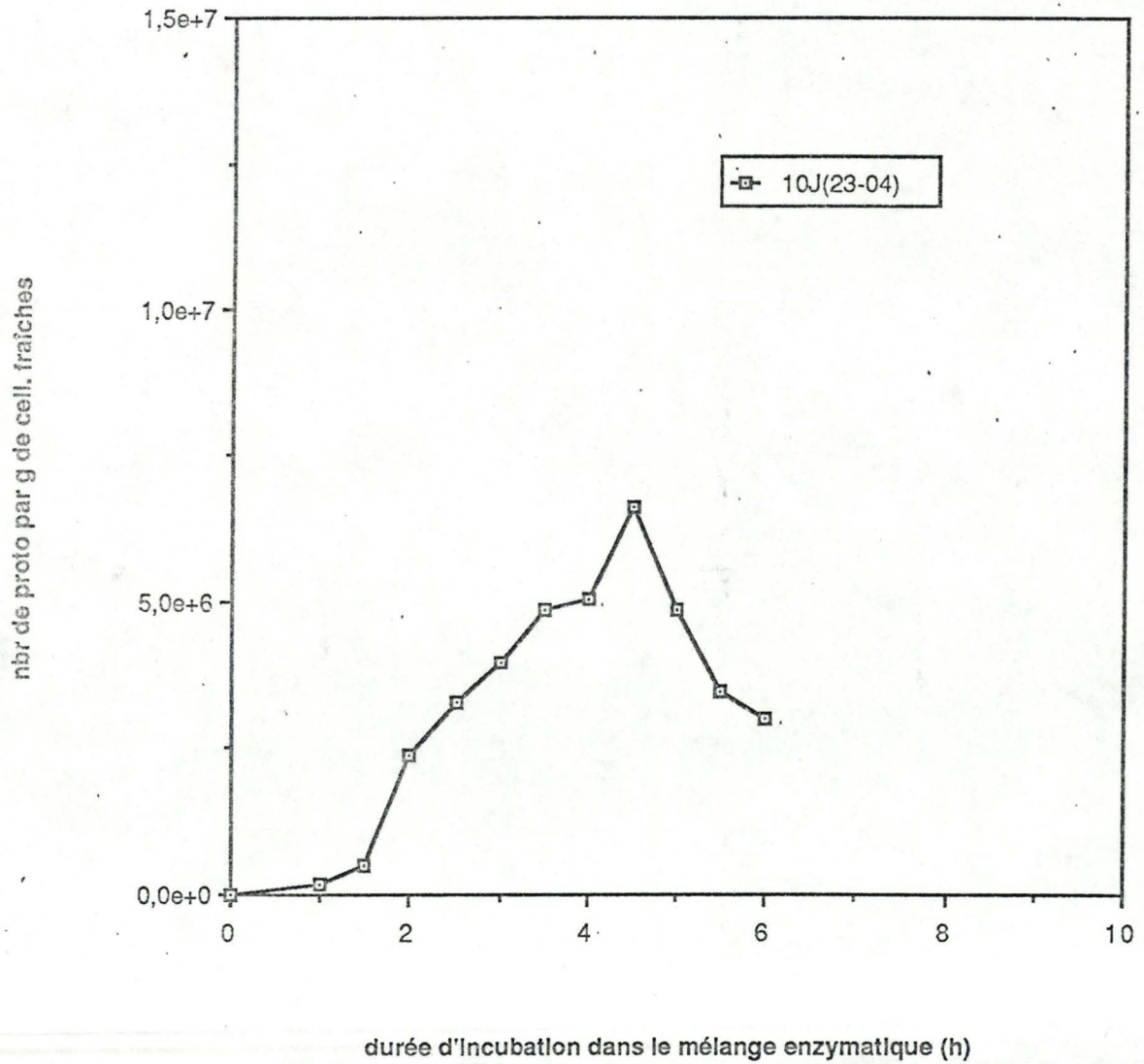


FIGURE 5 : cinétique isolement 15J après repiquage

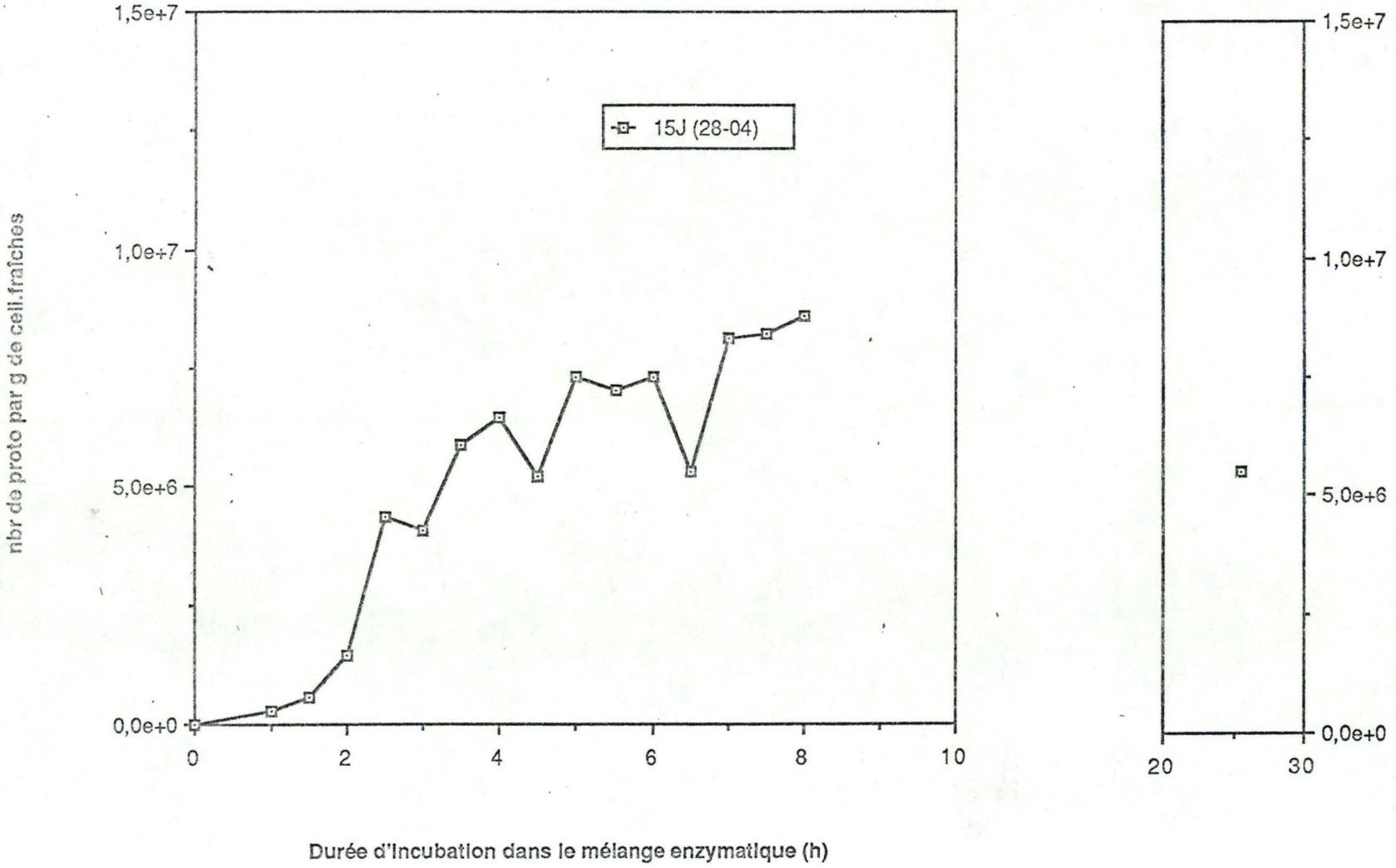
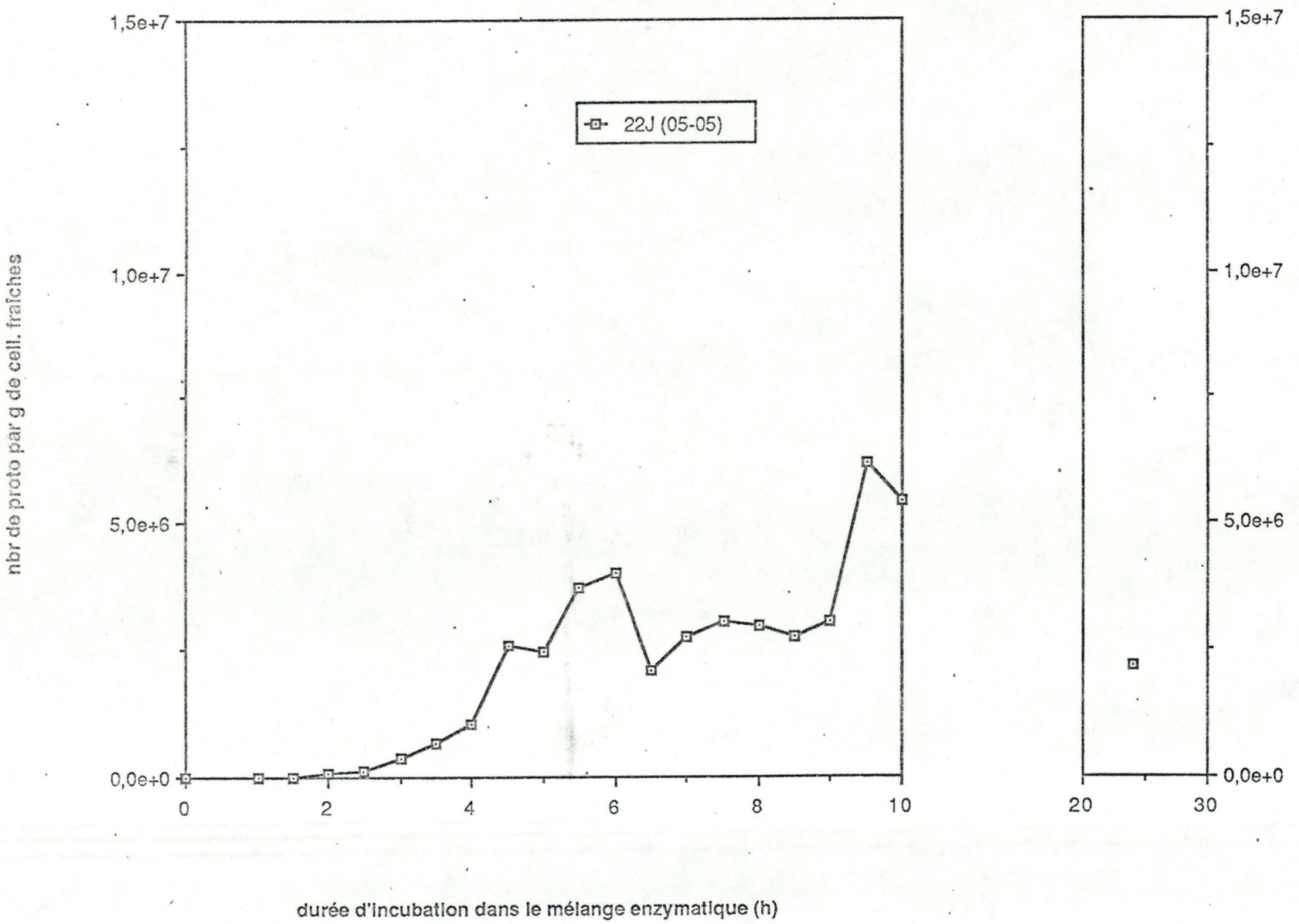


FIGURE 6 : **cinétique isolement 22J après repiquage**



cinétiques d'isolements : 4j,15j et 22j après repiquage

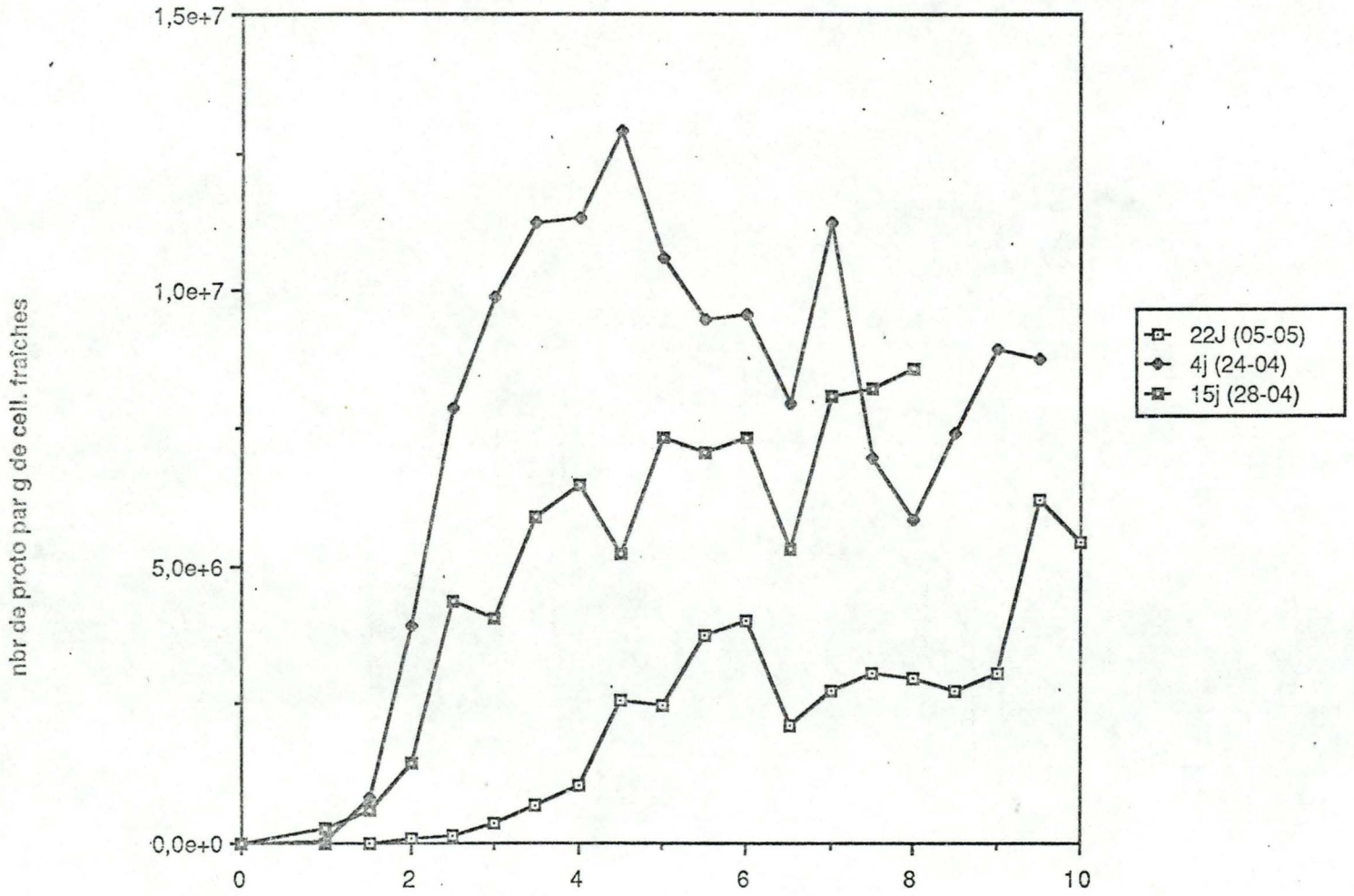


FIGURE 7 : **Distribution de taille des colonies : cellules de 4J (moyenne de 4 répétitions).**

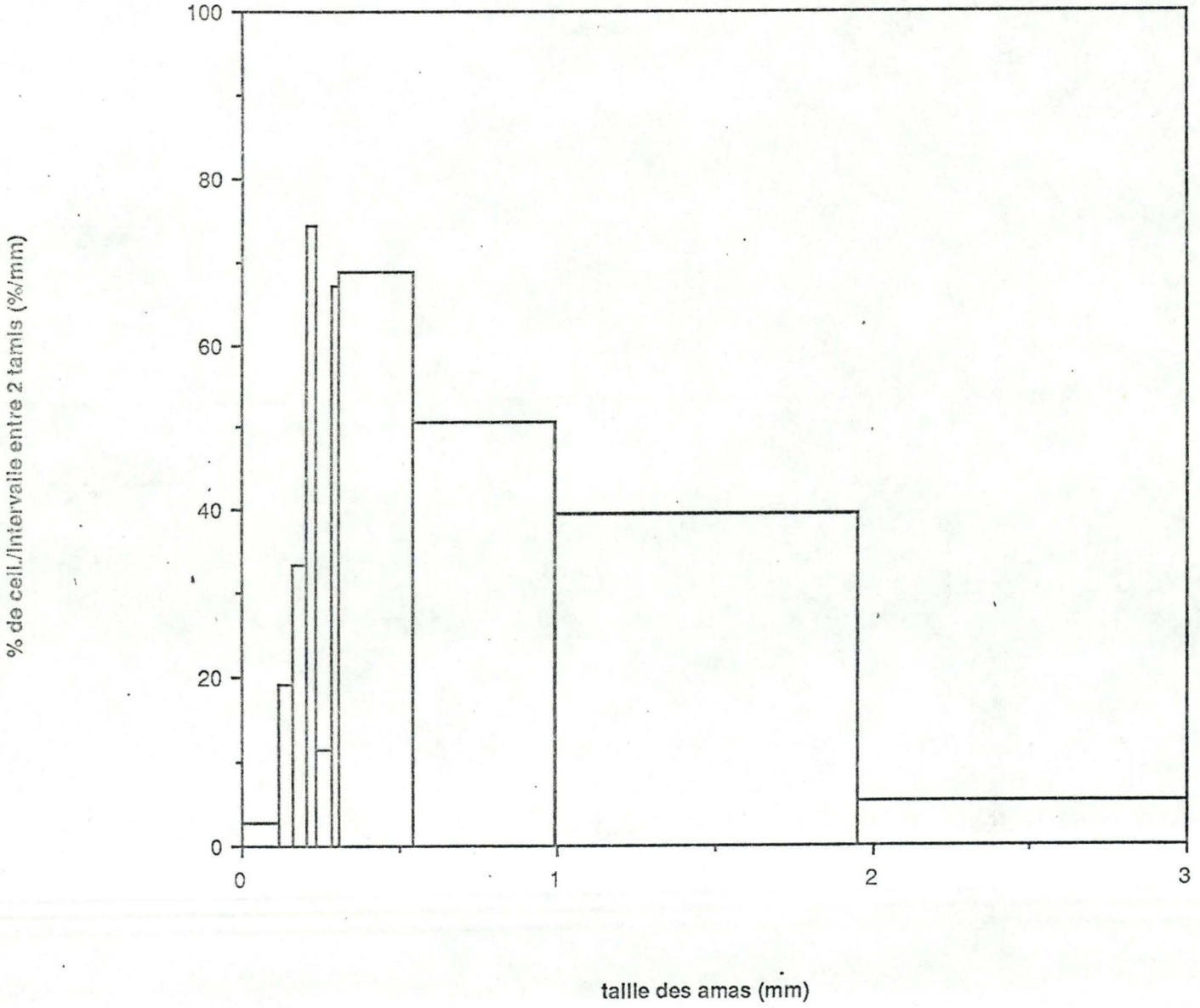


FIGURE 8 : **Distribution de taille des colonies : cellules de 10 j.**

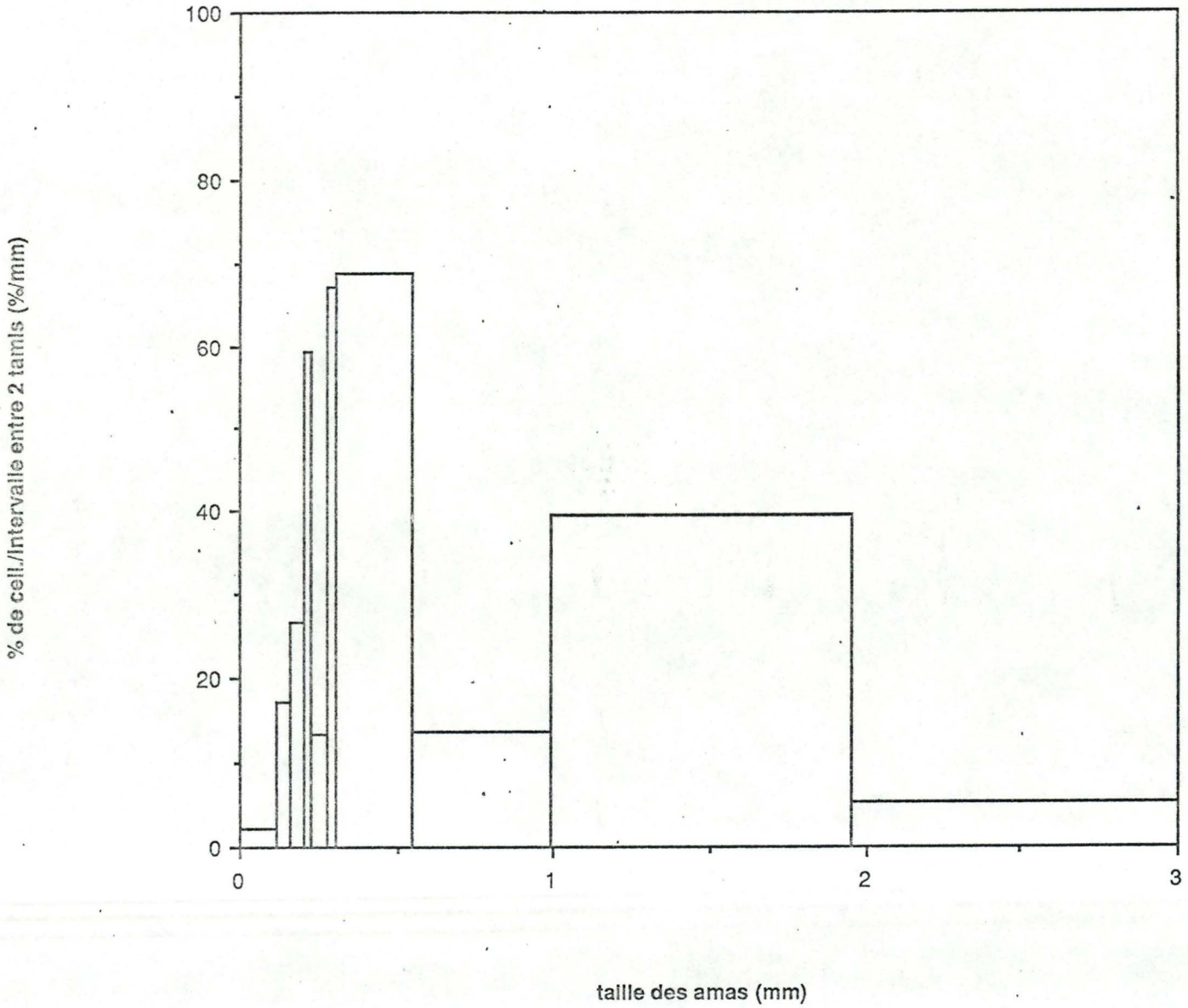


FIGURE 9 : **Distribution de taille des colonies : cellules de 14 j.**

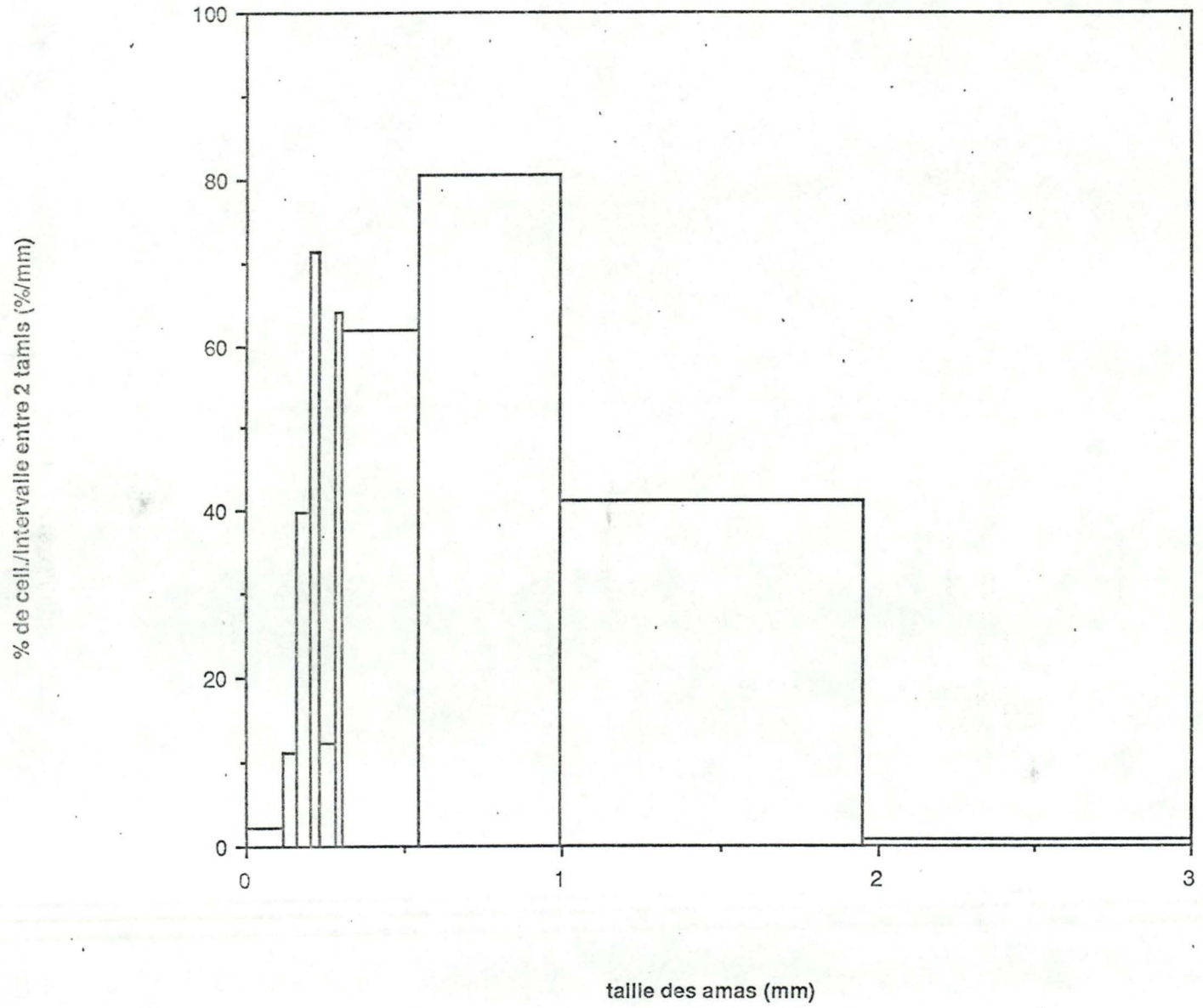


FIGURE 10 : Cinétique d'isolement de protoplastes sur cellules filtrées , 4 jours après repiquage.

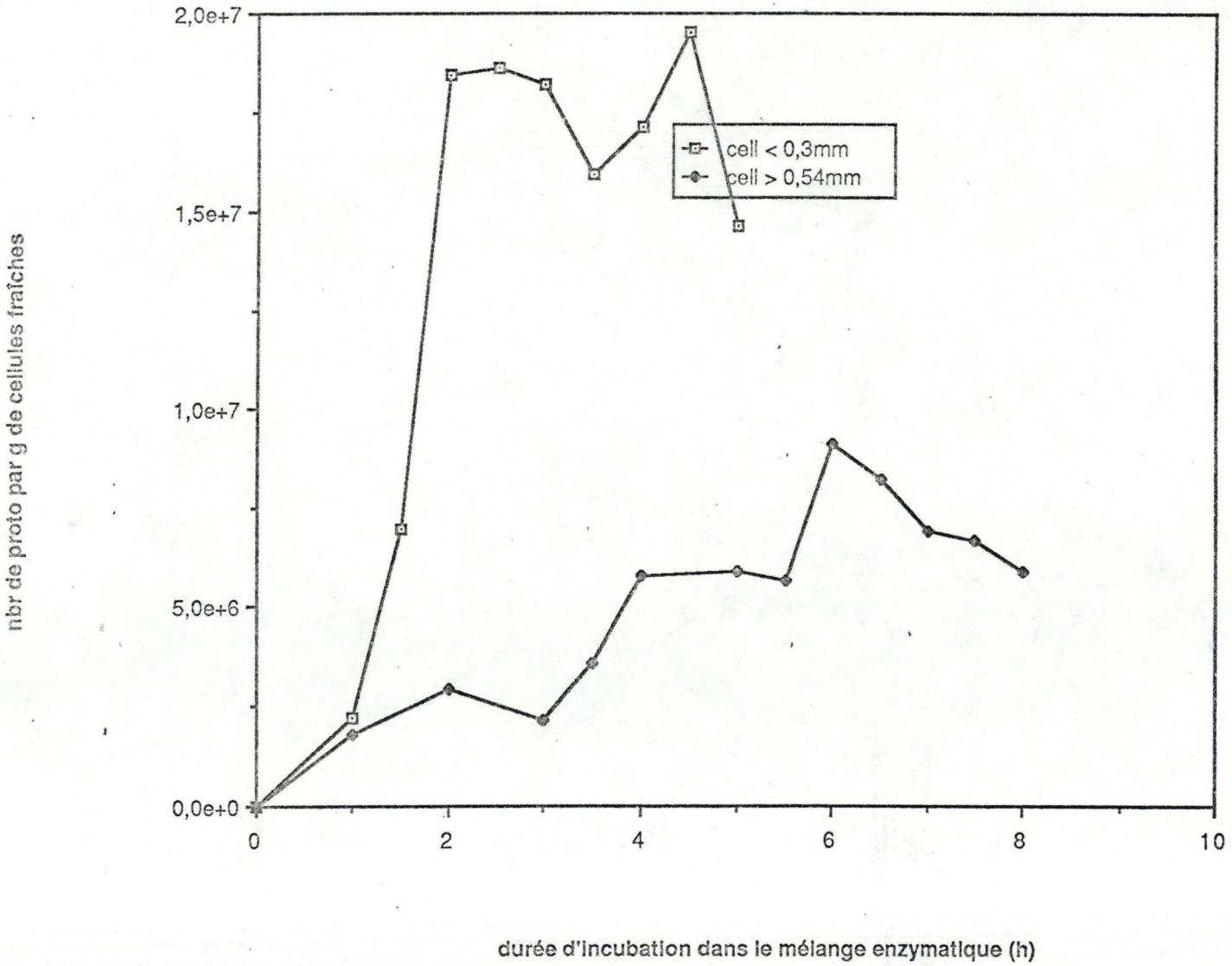
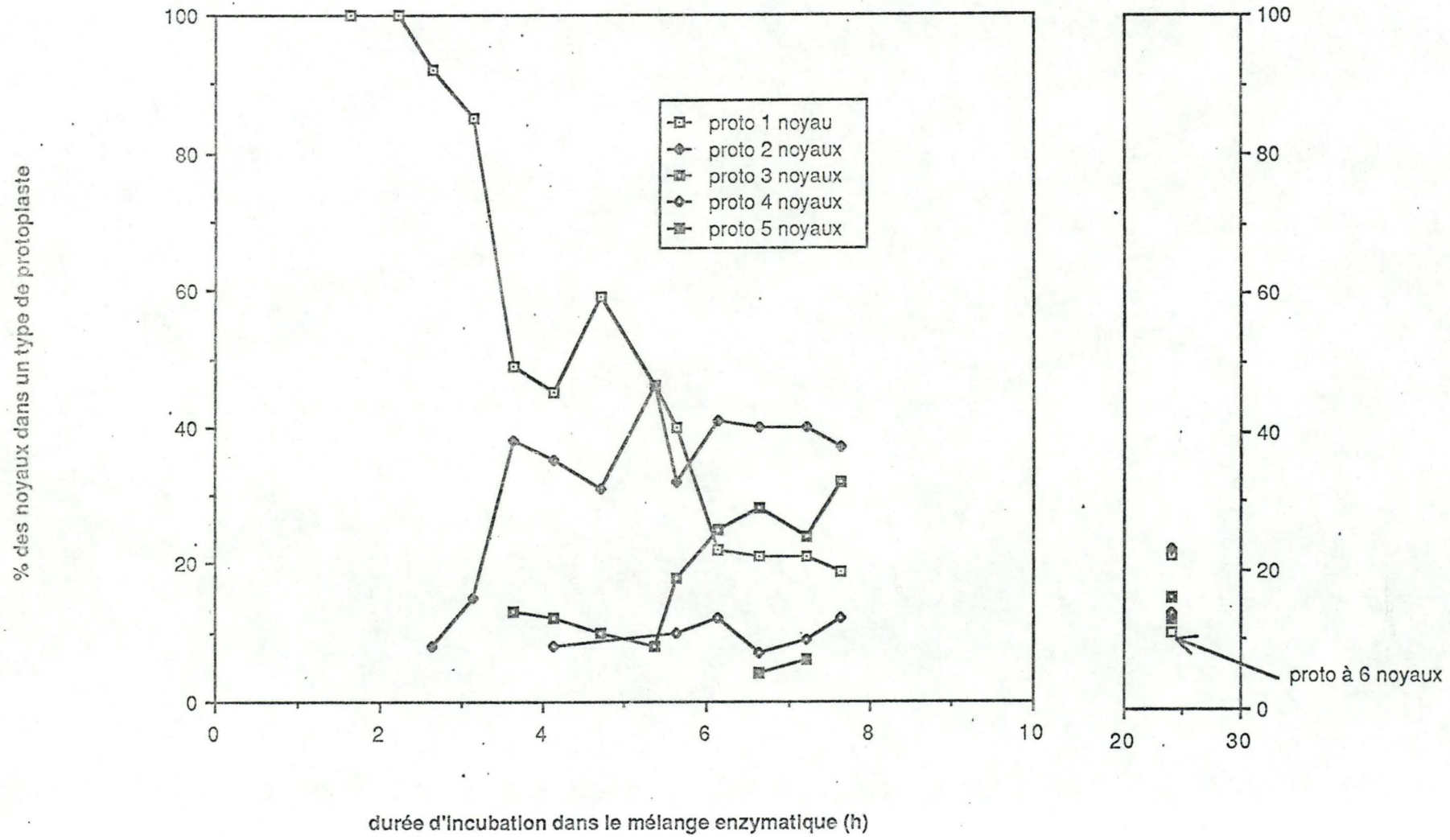


FIGURE 11: Cinétique de fusion de protoplastes : ceil. de 4J.



DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les paramètres que nous avons mesurés sur des cultures en suspension de Festuca arundinacea nous ont permis de mettre en évidence les phases successives de croissance exponentielle, stationnaire et de sénescence des cellules. Chacune de ces phases dure approximativement une semaine.

Des cinétique d'isolement de protoplastes réalisées au cours de ces différentes phases font nettement apparaître l'effet de l'âge des cultures sur le rendement et probablement la qualité des protoplastes. Des cellules vieilles de trois semaines ne libèrent que très lentement des quantités relativement faibles de protoplastes par rapport à de jeunes cultures en multiplication rapide.

Indépendamment de l'effet de la sénescence, le mode de différenciation des cellules en suspension sous forme soit de chaînes soit de grosses colonies de plus de 280 µm altère profondément les cinétiques d'isolement de protoplastes : les chaînes libèrent très rapidement deux fois plus de protoplastes.

Il est probable que ces protoplates provenant de cellules de types et d'âges différents se distinguent aussi par les propriétés de surface de leurs plasmalemmes : divers auteurs ont montré que la composition en acides gras[42] et en protéines[43] du plasmalemme varie en fonction de l'âge et du stade de différenciation des cellules d'origine des protoplastes. Il existe même une technique de sélection de protoplastes hybrides interspécifiques par électrofocalisation sur gradient de pH.

Il serait donc intéressant de mieux caractériser la structure et les propriétés des plasmalemmes des différents types de protoplastes que nous avons obtenus. Cela permettrait peut-être de lever la contradiction entre les observations de fusion en masse de protoplastes issus de colonies en suspension (souvent attribuées dans la littérature à un élargissement de plasmodesmes) et la quasi-absence de ces mêmes plasmodesmes dans les amas cellulaires en suspension.[53]

BIBLIOGRAPHIE

(1) E.C. Cocking (1986).
The tissue culture revolution,
in Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications, Eds L.A. Withers, P.G. Alderson Butterworths.

(2) R.M. Gautheret (1983).
Plant tissue culture : A history,
Bot. Mag. Tokyo, **96** : 393-410.

(3) T. Bengochea, J.H. Dodds (1986).
Plant protoplast. A biotechnological tool for plant improvement,
Chapman and Hall, Ltd London

(4) M.D. Chilton, M.H. Drummond, D.J. Merle, D. Sciaky, A.L. Montoya, M.P. Gordon, E.W. Nester (1977).
Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells : the molecular basis of crown gall tumorigenesis,
Cell, **11** : 263-271.

(5) M.F. Thomashow, R. Nutter, A.L. Montoya, M.P. Gordon E.W. Nester (1980).
Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors,
Cell, **19** : 729-739.

(6) L. Otten, H. De Greve, JP. Hernalsteens, M. Van Montagu O. Schieder, J. Straub, J. Schell (1981).
Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens,
Mol. Gen. Genet., **183** : 209-213.

(7) M.D. Block, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J. Schell, P. Zambryski (1984).
Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny,
EMBO J., **3** : 1681-1689.

(8) L. Herrera-Estrella, A. Depicker, M. Van Montagu, J. Schell (1983).
Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector,
Nature, **303** : 209-213.

(9) G.M.S. Hooykaas-Van Slogteren, P.J.J. Hooykaas, R.A. Schilperoort (1984).
Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with Agrobacterium tumefaciens,
Nature, **311** : 763-764.

(10) M. Caboche, A. Deshayes (1985).
Le transfert direct de gènes dans les cellules végétales,
Biofutur, Avril 1985 : 29-33.

(11) R.D. Shillito, M.W. Saul, J. Paszkowski, M. Müller, I. Potrykus (1985).
High efficiency direct gene transfer to plants,
Bio/Technology, 3 : 1099-1103.

(12) M. Fromm, L.P. Taylor, V. Walbot (1985).
Expression of genes transferred into monocot and dicot plants cells by electroporation,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 5824-5828.

(13) M. Fromm, L.P. Taylor, V. Walbot (1986).
Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation,
Nature, 319 : 791-793.

(14) M.R. Davey, A. Kumar (1983).
Higher plant protoplasts-retrospect and prospects,
in : "Plant Protoplast" K.L. Giles eds,
Intern. Rev. Cytology, 16 : 219-299.

(15) T.P. Kowalezyk, I.A. Mackenzie, E.C. Cocking (1983).
Plant regeneration from organ explants and protoplasts of the medicinal plant Solanum khasianum C.B. Clarke var., chatterjeeanum sengupta (Syn. Solanum viarum Dunal),
Z. Pflanzenphysiol., 111 : 55-68.

(16) G. Patnaik, E.C. Cocking, J.D. Hamill, D. Pental (1982).
A simple procedure for the manual isolation and identification of plant heterokaryons,
Plant Science Lett., 24 : 105-110.

(17) M.S. Swaminathan (1982).
Biotechnology research and third world agriculture,
Science, 218 : 967-972.

(18) J.B. Power, M.R. Davey and al (1986).
Fusion and transformation of plant protoplast,
Methods in Enzymology, 118 : 578-581.

(19) E.C. Cocking (1983).
Applications of protoplast technology to agriculture,
in : "Protoplasts 1983, Lecture Proceedings 6th Intern. Protoplast Symposium",
Experientia Supplementum, 46 : 123-126.

(20) J.D. Hamil, D. Pental, E.C. Cocking, A.J. Müller (1983).
Production of a nitrate reductase deficient streptomycin resistant mutant of Nicotiana tabacum for somatic hybridization studies,
Heredity, 50 : 197-200.

(21) T. Murashige, F. Skoog (1962).
Physiol. Plant., **15** : 473-497.

(22) J.H. Dodds, L.W. Roberts (1985).
Experiments in plant tissue culture,
Cambridge University Press, 110-200.

(23) M-T. Tollier (1979).
Les méthodes actuelles de dosages des glucides,
Anal. de la nutrition et de l'alimentation, 33.

(24) R.A. Dixon (1985).
Plant cell culture a practical approach,
IRL Press, 14-20, 127-128.

(25) Z.R. Sung (1976).
Turbidimetric measurement of plant cell culture growth,
Plant Physiol., **57** : 460-462.

(26) C. Dassargues (1986).
Etude comparative de la rétention en ion calcium, manganèse (II), cuivre (II), de deux souches de levure Saccharomyces,
Mémoire de l'UCL : 13

(27) K. Hahlbrock, J. Ebel, A. Oaks, J. Auden, M. Liersch (1974).
Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium,
Planta, **118** : 75-84.

(28) C.Mc Daniels (1983).
Chapter 22 in Handbook of Plant Cell Culture,
Eds D.A. Evans, W.R. Sharps, P.V. Ammirato, Y. Yamada
Mac Millan N-Y, 699-704.

(29) R.T. Giaquinta (1983).
Phloem loading of sucrose,
Ann. Rev. Plant Physiol., **34** : 347-387.

(30) R.T. Giaquinta, W. Lin, N.L. Sadler, V.R. Francheschi (1983).
Pathway of phloem unloading of sucrose in corn roots,
Plant Physiol., **72** : 362-367.

(31) M. Guy, L. Reinhold, G.G. Laties (1978).
Membran transport of sugars and amino acids in isolated protoplasts,
Plant Physiol., **61** : 593-596.

(32) J.A. Raven (1976).
Transport in algal cell,
in Transports in Plants II, Eds U. Lüttge, M.G. Pitman

(33) G. Weber, K.G. Lark (1979).
An efficient plating system for rapid isolation of mutants from plant cell suspensions,
Theor. Appl. Genet., **55** : 81-86.

(34) K. Hahlbrock, E. Kuhlen (1972).
Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the medium,
Planta, **108** : 271-278

(35) O.L. Gamborg, R.O. Miller, K. Ojima (1968).
Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells,
Exp. Cell Res., **50** : 151-158

(36) K. Charbel (1986).
Etude comparative de la rétension en ions cuivriques des parois cellulaires de différentes souches de levures,
Mémoire de l'UCL : I.5.

(37) T. Nagata, I. Takebe (1970).
Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts,
Planta, **92** : 301-308.

(38) T. Asamizu, K. Tanaka, I. Takebe, A. Nishi (1977).
Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall carot protoplasts,
Physiol. Plant., **40** : 215-218.

(39) T. Asamizu, N. Nakano, A. Nishi (1983).
Changes in non-cellulosic cell-wall polysaccharides during the growth of carrot cells in suspension cultures
Planta, **158** : 166-174.

(40) N. Katsu, S. Kamisaka (1983).
Quantitative and qualitative changes in cell wall polysaccharides in relation to growth and cell wall loosening in Lactuca sativa hypocotiyls,
Physiol. Plant., **58** : 33-40.

(41) S-I. Amino, Y. Takeuchi, A. Komamine (1984).
Changes in cell wall constituents during the cell cycle in a synchronous culture of Catharanthus roseus,
Physiol. Plant., **60** : 326-332.

(42) R. Goldberg, V. Thor, J-P. Dubacq, R. Prat, M. Pierron (1986).
Time course of a dedifferentiation process during isolation and culture of protoplasts: Comparison between protoplasts from young and mature regions of the mung bean hypocotyl,
Plant Science, **46** : 63-68

(43) A. Senn, P-E. Pilet (1981).
Electrophoretic mobility, zeta potential and surface charges of maize root protoplast,
Z. Pflanzenphysiol., **102** : 19-32.

(44) D.H. Simmonds, G. Setterfield (1986).
Aberrant microtubule organization can result in genetic abnormalities in protoplast cultures of Vicia hajastana Grossh,
Planta, **167** : 460-468.

(45) G. Hahne, W. Herth, F. Hoffmann (1983).
Wall formation and cell division in fluorescence-labelled plant protoplasts,
Protoplasma, **115** : 217-221.

(46) L. Schilde-Rentschler (1977).
Role of the cell wall in ability of tobacco protoplasts to form callus,
Planta, 135 : 177-181.

(47) Reinert and Hellmann (1971).
Mechanism of the formation of polynuclear...
Naturwissenschaften, **58** : 419-423.

(48) F. Hoffmann, B. Hahne, G. Hahne (1984).
Are cortical microtubules essential for cell formation and cell division by isolated callus protoplasts ?,
in Structure, Fonction and Biosynthesis of Plant Cell Walls,
W.M. Dugger and S. Bartniki-Garcia, Eds.

(49) J.B. Power, S.E. Cummins, E.C. Cocking (1970).
Fusion of isolated plant protoplasts,
Nature, **225** : 1016-1018.

(50) I.K. Vasil (1976).
The progress, problems, and prospects of plant protoplast research,
Advances in Agronomy, **28** : 119-160

(51) E.C. Cocking (1972).
Plant cell protoplast-Isolation and development,
Ann. Rev. Plant Physiol., **23** : 29-50.

(52) E.M. Frearson, J.B. Power, E.C. Cocking (1973).
The isolation, culture and regeneration of Petunia leaf protoplasts,
Dev. Biol., 33 : 130-137.

(53) J. Burgess (1985).
Hormone and the differentiation of isolated cells,
in An Introduction to Plant Cell development
Cambridge : 139-140

(54) K. Kanchanapoom, A.O. Brightman, H.D. Grimes and W.F. Boss (1985).
A novel method for monitoring protoplast fusion,
Protoplasma, **124** : 65-70.

(55) H. Maeda, N. Ishida (1967).
Specificity of binding of hexapyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener,
J. Biochem., **62** : 276-278.

(56) H.E. Street
Plant tissue and cell culture,
Chapt. 4 : "Cell (suspension) Cultures-Techniques"
H.E. Street, Eds
Blackwell Scientific Publ. Oxford.

2. Etude de la distribution des tailles des amas de cellules

Les résultats représentés sur les Figures 7, 8 et 9 montrent une distribution bimodale des pourcentages par rapport à la masse totale des cellules.

95% des cellules se retrouvent dans des amas de taille supérieure à 300 µm.

La classe de cellules dont la taille est comprise entre 230 et 280 µm est systématiquement sous-représentée.

Les quelques pourcents de cellules restants ont une taille inférieure à 230 µm.

Cette distribution est indépendante de l'âge de la culture. Morphologiquement, on observe en microscopie optique que les cellules en deçà de cette classe sont pratiquement isolées ou forment de longues chaînes (Photo 1) et qu'au delà de 280 µm, on ne trouve que des colonies (amas non linéaires, Photo 2), de tailles croissantes.
L'hétérogénéité des tailles provient de ce que l'on ne filtre jamais régulièrement à 500 µm les cultures de cellules, contrairement à ce qui se pratique habituellement.

Après vérification de cette hétérogénéité, il fallait ensuite étudier l'incidence de cette distribution des tailles des cellules sur la cinétique d'isolement de protoplastes.
Pour cela, des isolements ont été réalisés sur des cellules filtrées en utilisant tantôt la fraction fine (< 0,3 mm), tantôt la fraction grosse (> 0,54 mm). Les cinétiques de ces deux types d'isolements sont montrées à la Figure 10.

Le retard dans la phase exponentielle et la diminution du rendement en protoplastes libérés sont très bien marqués lorsque l'on passe de la fraction fine (cellules en chaînes) à la fraction grosse (colonies compactes). Un maximum de 20 millions de protoplastes / g de cellule est atteint en 2 heures au départ de cellules inférieures à 0,3 mm alors que le rendement n'est que de 9 millions de protoplastes / g et que ce maximum est atteint après 6 heures seulement au départ de colonies supérieures à 0,54 mm.

La taille des amas de cellules de départ est donc un facteur déterminant du rendement d'un isolement de protoplastes.

Il est tentant d'établir ici un parallélisme entre les cinétiques obtenues sur fractions fines et grosses d'une part, sur des cultures jeunes et vieilles d'autre part. Les résultats de ces 2 types d'expériences diffèrent cependant notablement. Si l'on compare par exemple les Figures 6 et 10, on constate que des grosses colonies, 4 jours après repiquage ont une latence moins marquée voire nulle et un maximum (9 millions de protoplastes / g) atteint beaucoup plus rapidement.