

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR 3ème CYCLE

par

Fatima Zohra WALI ALAMI-FATHI



PREPARATION ET CULTURE DE PROTOPLASTES DE *CICHORIUM INTYBUS* L. VAR. WITLOOF : AMELIORATION DES RENDEMENTS

Exemplaire corrigé après avis du jury

Soutenue le 10 Juillet 1987 devant la Commission d'Examen.

Président :
Rapporteur :
Examineur :

R. BOURIQUET,
J. DUBOIS,
J. VASSEUR,

Professeur Université Lille 1
Maître de Conférences Lille 1
Maître de Conférence Lille 1

A MON MARI

A MES PARENTS, en témoignage de profonde affection

A TOUTE MA FAMILLE ET MES AMIS

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Lille I. Nous remercions vivement Monsieur le Professeur R. BOURIQUET de son accueil et d'avoir bien voulu accepter la Présidence du Jury de cette Thèse.

Ma profonde reconnaissance va à Monsieur J. DUBOIS, Maître de Conférences, pour m'avoir fait bénéficier de sa compétence. Ses conseils ont largement contribué à la réalisation de ce travail.

Nous remercions aussi Monsieur J. VASSEUR, Maître de Conférences, pour sa collaboration constante; nous lui en sommes profondément reconnaissants.

Nos remerciements vont également à Mademoiselle SAKSI Nassima qui s'est acquittée avec compétence et bonne humeur de la mise en forme de cette thèse.

Que tout le personnel du laboratoire soit assuré de mes remerciements pour l'aide qu'il m'a apportée à un moment ou à un autre.

SOMMAIRE

	Page
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
CHAPITRE II HISTORIQUE	3
1 Origine des protoplastes	3
2 Enzymes et conditions d'isolement	5
3 Purification des protoplastes	6
4 Culture des protoplastes	8
4.1 La plante mère	9
4.2 La préparation des protoplastes	9
4.3 Le milieu de culture	9
4.3.1 Le protecteur osmotique	10
4.3.2 La source de carbone	10
4.3.3 Les régulateurs de croissance	11
4.3.4 Les méthodes de culture	11
CHAPITRE III MATERIEL ET METHODES	14
1 Matériel végétal	14
2 Aseptisation et ensemencement des akènes	14
3 Développement des plantules	15
4 Isolement des protoplastes	15
4.1 Mélanges enzymatiques	15
4.2 Préparation des feuilles et conditions de macération	16
4.3 Obtention et lavage des protoplastes	16
5 Culture des protoplastes	17
5.1 Définition des différentes phases	17
5.2 Composition des milieux de culture	18
6 Critères d'évaluation de la viabilité des protoplastes	21
7 Estimation des résultats correspondant à la première phase de culture	21
8 Détermination du rendement en minicals en deuxième phase de culture	21

CHAPITRE IV	RESULTATS EXPERIMENTAUX	22
1 Facteurs contrôlant l'obtention des protoplastes		22
1.1 Condition d'isolement des protoplastes		22
1.1.1 Nature des enzymes utilisées		22
1.1.2 Effet du pH du milieu de macération sur la libération des protoplastes		26
1.1.3 Etude de la variation de la nature du protecteur osmotique dans le milieu de macération		27
1.1.4 Action de l'addition des substances de croissance au milieu de macération		28
1.1.5 Effet d'un prétraitement des plantules sur la libération des protoplastes		29
1.2 Influence de la nature des feuilles et de l'âge des plantules sur la libération des protoplastes		30
1.3 Influence des conditions de développement des plantules sur la libération des protoplastes		33
1.3.1 Effet des substances de croissance présentes dans le milieu de culture des plantules		33
1.3.2 Effet de la température et de l'éclairement au cours du développement des plantules		34
2 Récupération et lavage des protoplastes		36
2.1 Caractérisation de deux fractions de protoplastes		36
2.2 Mise au point d'une méthode de lavage de la suspension de protoplastes		38
2.3 Récupération des protoplastes purifiés du culot		40
3 Facteurs contrôlant la viabilité des protoplastes et les divisions des cellules qui en dérivent		43
3.1 Aspect cytologique et expression des résultats		43
3.2 Action de la nature de la préparation enzymatique		44
3.3 Effet de la nature des protoplastes		45
3.4 Effet de la purification de la suspension de protoplastes du culot		47
3.5 Effet de l'âge des cultures et de la nature des feuilles donatrices		47
3.6 Effet de la concentration des substances de croissance dans le milieu Mcl		49

3.6.1	Influence de la concentration en ANA	49
3.6.2	Influence de la concentration en BAP	51
3.6.3	Action de la nature de la cytokinine	53
3.7	Effet de la nature du protecteur osmotique	54
3.8	Influence des conditions de culture	55
3.8.1	Facteurs d'environnement	55
3.8.2	Méthodes de culture	60
3.9	Amélioration du rendement de la première phase de culture bilan	62
4	Facteurs contrôlant l'obtention des minicals	66
4.1	Influence de l'origine des protoplastes et de la dilution du milieu Mc1	66
4.2	Action de la nature la gélose dans le milieu Mc2	68
4.3	Influence de l'incorporation des cellules dans la gélose	69
4.4	Effet de la culture en double couche superposée	70
4.5	Effet de la nature du protecteur osmotique	71
4.6	Influence de la concentration en substances de croissance sur l'obtention des minicals	72
4.6.1	Action de l'ANA	73
4.6.2	Action de la BAP	74
4.7	Effet du lavage des cellules et de la densité initiale des cultures transférées	75
4.8	Influence de la réduction de la concentration en substances de croissance dans le milieu Mc2	76
5	Prolifération des cals et induction des bourgeons	80
5.1	Action de la variation des composés azotés sur la prolifération des cals	80
5.2	Action de la variation des composés azotés sur l'induction des bourgeons	81
6	Développement des bourgeons	83
CHAPITRE V	DISCUSSION ET CONCLUSION	84
CHAPITRE VI	BIBLIOGRAPHIE	91

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les protoplastes sont des cellules végétales momentanément débarrassées de leurs parois, ils sont sphériques limités uniquement par le plasmalemme.

Tout en conservant les potentialités des cellules végétales entières et en particulier leur capacité à régénérer des plantes, les protoplastes se prêtent à des manipulations d'ordre génétique pouvant contribuer à l'amélioration des espèces agricoles.

L'intérêt porté aux protoplastes ne se justifie que si les cellules qui en dérivent sont capables de régénérer des individus entiers, condition qui ne se trouve remplie que pour quelques espèces végétales appartenant pour la plupart à la famille des Solanacées.

Cependant peu de recherches ont été effectuées jusqu'à présent chez les Astéracées. Des plantes ont été obtenues à partir des protoplastes de Gaillardia grandiflora, Helianthus annuus, Senecio jacobaea, S. silvaticus, S. viscosus (BINDING et al., 1981), S. vulgaris (BINDING et NEHLS, 1980) et Lactuca sativa (BERRY et al., 1982).

A l'heure actuelle des modifications de la technique et des milieux de culture ont permis la régénération des plantes à partir des protoplastes de plusieurs génotypes de Cichorium (CREPY et al., 1982).

Dans notre laboratoire, SAKSI et ses collaborateurs (1986) sont parvenus à régénérer des plantes à partir des protoplastes issus de l'hybride 'Zoom'.

La Chicorée Witloof est une culture spécifique du Nord de la France. L'un des problèmes lié à la culture de la Chicorée est la recherche de plantes résistantes à des désherbants sélectifs. La culture des cellules isolées ou de protoplastes pourrait permettre la sélection de lignées cellulaires résistantes à des herbicides déjà commercialisés. Une autre forme de sélection qui intéresse plus particulièrement les producteurs de semences est la stérilité mâle cytoplasmique. La fusion des protoplastes pourrait se révéler une technique favorable pour agir au niveau du cytoplasme des cellules. Cependant, avant d'aborder ce problème il est nécessaire d'augmenter les rendements des cultures de protoplastes de Chicorée Witloof.

Au cours de notre travail nous avons exploité les connaissances déjà acquises sur le comportement des protoplastes foliaires de Cichorium

intybus L. var. Witloof par CREPY et ses collaborateurs (1982) et par SAKSI et ses collaborateurs (1986) pour tenter de déterminer les conditions optimales des principales phases de culture.

Notre expérimentation comportera plusieurs parties :

- la préparation de protoplastes foliaires,
- la purification de différentes fractions de protoplastes,
- l'induction des premières divisions conduisant à la formation de microcals,
- la croissance des microcals jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille critique permettant l'induction des bourgeons,
- le développement des bourgeons et des jeunes plantes ayant fait l'objet de recherches antérieures et ne présentant pas de difficultés particulières, ils ne seront abordés que pour vérifier les potentialités des cals produits dans les conditions de culture que nous avons définies.

CHAPITRE II

HISTORIQUE

Les techniques d'isolement et de culture des protoplastes dont le développement ultérieur conduit à l'obtention des colonies multicellulaires ont été établies chez de nombreuses espèces notamment celles appartenant à des familles d'intérêt économique important comme Brassicacées, Poacées, Fabacées, et Solanacées (VASIL et VASIL, 1980a).

Cependant la régénération des plantes à partir des protoplastes ne concerne actuellement que certaines espèces voire quelques variétés. Ces travaux ont abouti à déterminer avec exactitude les différents facteurs affectant leur préparation ou leur culture.

1 Origine des protoplastes

Les protoplastes sont généralement isolés à partir du mésophylle foliaire qui permet une libération assez facile et une grande disponibilité du matériel.

De même il a été possible d'isoler des protoplastes à partir de différents tissus de la plante (WAKASSA, 1973) mais le rendement et la qualité des protoplastes restent inférieurs à ceux du mésophylle foliaire.

Ainsi des protoplastes ont été obtenus à partir des cotylédons (LU et al., 1982; PATEL et al., 1984; ARCIONI et al., 1985) de l'épiderme (DAVEY et al., 1974 ; FITZSIMONS et al., 1983 ; MULLER et al., 1983) de la tige et de l'hypocotyle (BHARAL et RASHID, 1980) du péricarpe (SKENE, 1974), des grains de pollen (DUHOUX, 1980 ; RADENBAUGH et al., 1982), des racines (XU et al., 1981; BERRY et al., 1982) et des pétales (FLICK et EVANS, 1983).

Généralement seules la concentration ou la nature du protecteur osmotique, la concentration enzymatique ou la durée d'incubation doivent varier pour isoler des protoplastes de ces différents tissus.

Par ailleurs des protoplastes ont été également isolés à partir des cals (SIMMONDS et al., 1979; COULIBALY et DEMARLY, 1986) et des suspensions cellulaires (HAKMAN et VON ARNOLD, 1983; CHOUREY et SHARPE, 1985).

L'importance du génotype des tissus donneurs a été signalée dans de nombreux travaux. Des études récentes (MORGAN et COCKING, 1982) montrent que sur 14 cultivars de Lycopersicon esculentum un seul peut être régénéré. De même dans cette population certains se sont révélés moins efficaces que d'autres lors de l'isolement et de la culture de protoplastes.

Un rendement très différent est également obtenu dans le cas de treize variétés de Pois (CROWDER et al., 1979).

Ces phénomènes de variabilité ont mis l'accent sur l'importance de l'optimisation des conditions de développement des plantes donatrices.

Ainsi, CONSTABEL et ses collaborateurs (1973); BINDING (1975) rapportent que la réussite de l'isolement des protoplastes est étroitement liée aux conditions de développement des plantes ou des tissus donneurs. Il n'est cependant pas possible de déterminer une méthode générale de culture compte tenu des exigences propres à chaque espèce.

Toutefois plusieurs facteurs semblent être importants et doivent être contrôlés.

En effet des travaux sur les protoplastes de Tabac (WATTS et al., 1974), de Luzerne (KAO et MICHALUYK, 1980) et d'Aubergine (BHATT et FASSULIOTIS, 1981) montrent la nécessité d'une intensité d'éclairement de 7500 à 20000 lux et d'une photopériode de 12 à 16 heures pour réussir l'isolement des protoplastes. Alors que dans le cas de la Pomme de terre (SHEPARD et TOTTEN, 1977) une photopériode plus courte (6 heures par jours) et un éclairage plus faible sont suggérés.

D'autre part des plantes de Brassica napus L. cultivées à une température élevée (26°C) et sous une humidité relative de 70% donnent très peu de protoplastes qui finissent par mourir (KARTHA et al., 1974). Tandis qu'une forte humidité et une température basse sont recommandées pour les plantules de Tomate (TAL et WATTS, 1979).

L'importance de la composition du milieu de développement des plantes a été également signalée. En effet WALLIN et ses collaborateurs (1977) ainsi que DOUGLAS et ses collaborateurs (1981) rapportent que le taux de libération de protoplastes est amélioré par un apport d'ammonium dans le milieu de culture.

Par ailleurs pour libérer des protoplastes en quantité suffisante les plantes sont plus couramment utilisées à un stade où la croissance est active. Ainsi l'âge des feuilles affecte la libération des protoplastes de Vigne (WRIGHT, 1985) puisque le maximum

de protoplastes est libéré à partir des feuilles de taille moyenne; des feuilles plus grandes ou plus petites ne sont pas recommandées.

De même PRAKASH et ses collaborateurs (1985) suggèrent l'utilisation des plantes de Pomme de terre âgées de 40 à 60 jours et des feuilles en quatrième ou septième position par rapport à l'apex. Tandis que SZABADOS et ROCA (1986) recommandent l'utilisation des feuilles bien étalées prélevées sur des plantes âgées de deux mois.

L'attention est portée également sur le préconditionnement des feuilles avant le traitement enzymatique. En effet PRAKASH et ses collaborateurs (1985) rapportent qu'une culture préalable des feuilles de Pommes de terre dans un milieu contenant du saccharose et sous une température de 4°C contribue à faciliter la libération des protoplastes. De même une préincubation à basse température pendant 24 heures augmente la viabilité des protoplastes de Cyanopsis tetragonoloba et donc améliore les probabilités de régénération (SAXENA et al., 1982).

Par contre très peu de protoplastes sont isolés à partir des feuilles de Vigne qui n'ont pas subi une incubation complète à l'obscurité pendant 24 heures (WRIGHT, 1985).

Dans certains cas un prétraitement aux phytohormones a été aussi signalé : des cotylédons cultivés sur un milieu additionné de BAP et d'ANA augmente le rendement en protoplastes (EDWARDS et al., 1979).

La cystéine favorise quant à elle la digestion enzymatique de la paroi chez Zea mays (SENN et PILET, 1980), tandis que la kinitine et la cycloheximide (KAUR-SAWHNEY et al., 1977) permettent chez Avena sativa une diminution de la lyse des protoplastes et une augmentation de la synthèse des protéines.

2 Enzymes et conditions d'isolement

Plusieurs préparations enzymatiques sont utilisables pour l'isolement des protoplastes.

Les plus courantes sont la Cellulase "Onozuka" R-10 et la Driselase riche en cellulases, puis la Macerozyme R-10, Pectinase, Hemicellulase riches en pectinases et hemicellulases (EVANS et BRAVO, 1983).

Les enzymes peuvent être utilisées en mélange pour dégrader les trois composantes de la paroi cellulaire : cellulose, hémicellulose et pectine. Le pourcentage de ces trois constituants varie d'une espèce à l'autre : par exemple SETTERFIELD et BAYLEY (1961) révèlent que la cellulose correspond à 25% de la

paroi des cellules de coleoptile d'Avoine et 50% de la paroi des cellules des jeunes poils du Coton.

La plupart des préparations enzymatiques commerciales contiennent des substances toxiques (nucléases, protéases,...) et d'autres impuretés qui peuvent endommager les protoplastes (SCHILDE - RENTSCHLER, 1977).

Certains chercheurs préconisent alors une purification supplémentaire de ces enzymes. Ainsi PATNAIK et ses collaborateurs (1981) dessalent la meicelase par passage sur gel de filtration. De la même façon SHEKHAWAT et GALSTON (1983) purifient la Driselase ce qui améliore le rendement des protoplastes issus du mésophylle foliaire de Vigna aconitifolia.

Cependant d'autres travaux (SCHENK et HILDEBRANDT, 1969) ont montré qu'une purification poussée des enzymes est moins efficace pour l'isolement des protoplastes qu'une purification partielle. Cela suggère que la cellulase seule est insuffisante pour la dégradation de la paroi.

D'autre part CASSELLS et BARLASS (1976) rapportent que le dessalement et la lyophilisation accentue les facteurs toxiques et donc diminue le rendement en protoplastes.

D'autres auteurs ont porté leur attention sur l'importance de la présence des régulateurs de croissance dans le milieu de macération.

Ainsi WRIGHT (1985) suggère que l'addition de l'ANA et de la BAP dans le milieu de macération améliore le rendement en protoplastes de Vitis vinifera.

FAN et MACLACHLAN (1966) et MASUDA (1968) révèlent que les auxines augmentent la plasticité de la paroi cellulaire donc indirectement l'activité cellulaire.

L'effet favorable des régulateurs de croissance est également démontré pour les protoplastes de Nicotiana (CHUPEAU et al., 1974), de Brassica oleracea (BIDNEY et al., 1983) et d'Oryza sativa (COULIBALY et DEMARLY, 1986).

De même l'inclusion des polyamides (GALSTON et al., 1978) augmente la libération et la viabilité des protoplastes, celle de CaCl₂ et MgSO₄ (SIMMONDS et al., 1979) diminue la lyse des protoplastes du Lilium.

Les protoplastes sont souvent isolés à l'obscurité (GILL et al., 1981) ou sous une faible intensité lumineuse (CHELLAPPAN et al., 1980).

Le pH du milieu de macération est généralement entre 5,4 et 6,2; cependant des valeurs élevées ont été suggérées par PELCHER et ses collaborateurs (1974). De même CHIN et SCOTT (1979) rapportent que même si les protoplastes de Céréales sont isolés à pH très faible ils sont moins viables que ceux obtenus à pH élevé.

La température durant l'isolement des protoplastes varie d'une espèce à une autre. Ainsi VASIL et VASIL (1980b) recommandent 14°C pour les protoplastes de Maïs; cependant 27°C est recommandé pour les protoplastes de Tomate (MORGAN et COCKING, 1982). Des valeurs extrêmes, par exemple 2°C (DE LAROCHE et al., 1977) et 36°C (OTHMAN et PARANJOTHY, 1980) ont permis également la libération des protoplastes en quantité suffisante.

La durée de macération peut varier de 30 minutes (NAGATA et ISHII, 1979) à 24 heures (KAO et al., 1974); elle dépend de l'origine des protoplastes, des enzymes, du pH et de la température d'incubation.

Il a été cependant établi que certains tissus ne tolèrent pas une longue durée de traitement enzymatique. Ainsi certains auteurs (PEZZOTI et al., 1984; VASIL, 1976; EVANS et COCKING, 1977) notent qu'une longue durée de macération contribue à la détérioration des protoplastes libérés.

Pour conserver l'intégrité des protoplastes, la pression osmotique est maintenue grâce à l'apport d'un protecteur osmotique. Il s'agit généralement du mannitol, du sorbitol ou du saccharose; leur concentration peut aller selon les espèces de 0,2M à 0,9M (EVANS et BRAVO, 1983). Le glucose est rarement utilisé (KAO et MICHAYLUK, 1974).

Le mannitol à 13% est nécessaire pour les protoplastes d'Alnus incana (TREMBLAY et al., 1985); mais SCHMIDT et POOLE (1980) rapportent que le mannitol entraîne une réduction du rendement des protoplastes de Betterave rouge.

Le saccharose est utilisé avec succès à une concentration faible 0,2M dans le cas du Tabac et 0,3M pour les protoplastes de Pomme de terre (SHEPARD et TOTTE, 1975, 1977). Au contraire, LANDGREN (1976) rapporte que les protoplastes de Pois plamolysent en présence du saccharose.

Certains auteurs suggèrent la nécessité d'associer le mannitol et le sorbitol dans la préparation des protoplastes de Brassica napus (KARTHA et al., 1974) et d'Oryza sativa (COULIBALY et DEMARLY, 1986). D'autres travaux révèlent que le rendement maximum en protoplastes est obtenu quand du KCl (0,3M)

est utilisé comme stabilisateur osmotique à la place du mannitol (0,3M) (SIMMONDS et al., 1979); une augmentation identique du rendement des protoplastes dans un milieu salin est obtenue par MEYER (1974).

3 Purification des protoplastes

Après digestion enzymatique les protoplastes doivent être lavés pour éliminer les enzymes, les débris cellulaires et les produits toxiques résultant de la digestion des différents tissus.

Dans la plupart des cas un passage à travers un filtre en inox ou en nylon puis une centrifugation à faible vitesse (HOWLAND et al., 1975) permet d'obtenir une préparation non "contaminée" par les débris.

Mais GAMBORG et ses collaborateurs (1981) préconisent une purification basée sur la flottaison des protoplastes, ils suggèrent une densité plus faible de ceux-ci par rapport aux différents organites ou fragments cellulaires.

De même d'autres auteurs envisagent de laver des protoplastes par flottaison sur une solution concentrée comme le mannitol (GATENBY et COCKING, 1977; IVERSEN et al., 1983), le ficoll (LARKIN, 1976; LIN, 1980) ou le plus souvent le saccharose (BOYES et al., 1980; RAZDAN et al., 1980; WHITE et BHOJWANI, 1981; ESTAHBANATI et DEMARLY, 1985).

La concentration en saccharose varie de 0,3M (SHEPARD et TOTTEEN, 1977) à 0,6M (DAY et al., 1981) et la centrifugation au cours de la purification peut aller de 40 et 80 g (ZAPATA et al., 1981) à 350 g (WILSON et al., 1980).

L'élimination des débris a été également réalisée par une technique de séparation à 2 phases (KANAI et EDWARDS, 1973; ALBERTSSON, 1978; PIOWARCZYK, 1979; SLABAS et al., 1980) ou par une liaison avec un conjugué d'anti-galactansépharose (KELLER et STONE, 1978).

4 Culture des protoplastes

Différents facteurs influencent la viabilité et les divisions des cellules qui dérivent des protoplastes. Les auteurs accordent une attention particulière au génotype et à l'état physiologique des plantes donatrices, à la technique utilisée au cours de l'isolement et à la composition des milieux ainsi qu'aux conditions environnementales établies au cours de la maintenance des cultures.

4.1 La plante mère

Le génotype des plantes est généralement un critère très important, ainsi JIA (1982) révèle que sur les cinq variétés de Pois testées, une seule peut donner des protoplastes qui ont une capacité de se diviser élevée. De même parmi les six espèces de Tabac étudiées les divisions cellulaires ne sont observées que pour trois et la régénération n'a été possible que pour une espèce (GLEDDIE et al., 1985).

D'autres auteurs ont porté leur attention sur l'importance des conditions physiologiques au cours du développement des plantes donatrices, ainsi chez le Pois (GAMBORG et al., 1975 ; VON ARNOLD et ERIKSSON, 1976) et la Pomme de terre (SHEPARD et TOTTEN, 1977). Ces auteurs suggèrent que les conditions les plus favorables au développement des plantes donatrices mènent à des divisions satisfaisantes des cellules dérivées des protoplastes.

Ainsi, dans le cas d'une culture d'Aubergine, une intensité d'éclairement élevée (7500 lux) et une photopériode longue (16 heures) sont nécessaires au maintien de la viabilité et des divisions des protoplastes (BHATT et FASSULIOTIS, 1981). D'autre part les divisions des cellules et la formation des colonies sont plus importantes lorsque ces plantes donatrices sont transférées six jours avant l'isolement des protoplastes sous une photopériode courte de huit heures.

L'âge des plantes est également un critère important pour les divisions cellulaires (VON ARNOLD et ERIKSSON, 1976; JIA, 1982).

Une grande variabilité du nombre de divisions cellulaires est en effet obtenue pour les protoplastes de Luzerne à différents stades physiologiques; les protoplastes provenant de feuilles jeunes (feuille n°1) se divisent fréquemment alors que ceux issus des feuilles âgées (feuille n°3) ne se divisent pas (KAO et MICHAYLUK, 1980).

4.2 La préparation des protoplastes

Certains auteurs n'obtiennent des divisions cellulaires qu'en utilisant des enzymes purifiés pour l'isolement des protoplastes, c'est le cas de Petunia parodii (PATNAIK et al., 1981) et de Vigna aconitifolia (SHEKHAWAT et GALSTON, 1983).

4.3 Le milieu de culture

La composition du milieu de culture varie selon les espèces végétales. Tous les milieux ont une composition de base qui renferme un protecteur osmotique, une source de carbone qui peut également servir d'agent osmotique, des éléments minéraux, des vitamines et des régulateurs de croissance.

4.3.1 Le protecteur osmotique

Le même protecteur osmotique que celui utilisé au cours de l'isolement des protoplastes est généralement retenu pour le milieu de culture : saccharose, glucose, mannitol et sorbitol sont les plus couramment utilisés.

La nature et la concentration du protecteur osmotique influencent considérablement les divisions cellulaires.

Ainsi certains auteurs indiquent que le remplacement du mannitol par le glucose augmente l'activité mitotique des protoplastes du Lycopersicon peruvianum (VON ARNOLD et ERIKSSON, 1977) et d'Alnus incana (TREMBLAY et al., 1985). Cette substitution empêche par contre la reconstitution de la paroi chez les protoplastes de Lilium (SIMMONDS et al., 1979). De même le glucose ne convient pas pour les protoplastes de Nicotiana (VAN SLOGTEREN et al., 1980) et de Solanum khasianum (KOWALCZYK et al., 1983). Chez ces espèces les divisions ne sont obtenues qu'avec une concentration faible de saccharose ou de mannitol. Ces protecteurs osmotiques sont également les plus favorables à l'induction des divisions cellulaires chez le Pois (LANDGREN, 1976).

D'autres travaux montrent que l'association de stabilisateurs osmotiques métaboliquement actifs (glucose, sorbitol et saccharose) à des stabilisateurs osmotiques inertes (mannitol) peut être avantageuse dans la mesure où les sucres sont graduellement absorbés par les protoplastes au cours des phases initiales de culture, la pression osmotique étant ainsi peu à peu réduite (VASIL et VASIL, 1980a).

En effet JHA et ROY (1980) révèlent qu'une diminution de la pression osmotique après une division initiale des cellules augmente le rendement en colonies cellulaires dérivées des protoplastes de Vigne. Une réduction graduelle de l'osmolarité de 510 Mosmoles à 420 Mosmoles est également essentielle pour obtenir une fréquence élevée de divisions cellulaires chez le Pois (JIA, 1982).

4.3.2 La source de carbone

La source de carbone semble jouer un rôle déterminant, elle pourrait être responsable de la régénération de la paroi et des divisions cellulaires. UCHIMIYA et MURASHIGE (1976) révèlent que les protoplastes de Tabac peuvent se diviser avec succès en présence de saccharose, cellulose ou glucose.

Cependant seul le saccharose est favorable pour la régénération de la paroi et pour les divisions des protoplastes de Bromus (KAO et MICHAYLUK, 1975). De même des protoplastes de Fois cultivés dans un milieu dépourvu de saccharose reforment une paroi très mince ne permettant pas la division cellulaire (VON ARNOLD et ERIKSSON, 1977).

4.3.3 Les régulateurs de croissance

En général chaque espèce a des exigences particulières en régulateurs de croissance, une grande variabilité hormonale est retenue dans les cultures de protoplastes.

L'acide 2,4 - dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est le plus couramment utilisé. Toutefois UCHIMIYA et MURASHIGE (1976) obtiennent des résultats plus satisfaisants quand l'ANA est substituée au 2,4-D ou à l'AIA.

De plus chez la Tabac ces auteurs trouvent que les cytokinines ne sont pas nécessaires à la régénération de la paroi et à l'initiation des divisions cellulaires. VON ARNOLD et ERIKSSON (1977) rapportent cependant l'exigence d'une association de 2,4-D et de 2iF pour provoquer les divisions des cellules de Fois.

De même chez une autre espèce de Fois, de l'AIA seul ne produit pas de divisions cellulaires il doit être associé à une cytokinine (LANDGREN, 1976).

D'autres travaux sur Solanum tuberosum (OPATRYN et al., 1980) rapportent que la taille et la forme des protoplastes et des cellules régénérées sont influencées par la composition hormonale du milieu de culture.

4.3.4 Les méthodes de culture

Les protoplastes sont généralement mis en suspension dans le milieu de culture et étalés en couche mince dans des boîtes de Pétri (CHUPEAU et al., 1974) dans des conditions statiques ou sous une légère agitation (KAO et al., 1971).

Une méthode de culture en gouttes pendantes a été utilisée aussi avec succès (GAMBORG et WETTER,

1975), mais les protoplastes s'agglutinent au centre de chaque goutte ce qui entrainera l'accumulation des substances phénoliques.

Dans certains cas les divisions cellulaires ne sont obtenues que dans un milieu solide (GILL et al., 1979). Les protoplastes sont alors mélangés à l'agar chaud avant (CELLA et GALUN, 1980) ou après (COUTTS et WOOD, 1977) la régénération de la paroi. Un volume très faible (1 à 2 ml) du mélange est coulé dans des boîtes, les protoplastes sont alors figés "en une seule position", ainsi séparés les uns des autres l'effet inhibiteur des polyphénols libérés au cours de la culture est atténué.

L'inconvénient de cette méthode est la détérioration des protoplastes lorsqu'ils sont mélangés avec l'agar chaud.

Une autre technique réside dans le transfert des cultures d'un milieu liquide sur un milieu gélosé après une courte période de culture (LI et al., 1980).

En effet en milieu liquide le développement des protoplastes du Trifolium arvense est très faible. Par contre, si après quatre jours de culture les cellules sont lavées et placées en couche mince dans l'agar à densité plus faible, elles continuent à se diviser et développent des calcs (WHITE et BHOJWANI, 1981).

Parfois plusieurs dilutions avec du milieu neuf avant transfert sont nécessaires pour les divisions des cellules et le développement des minicals qui dérivent des protoplastes, c'est le cas chez Stylosanthes guianensis (SZABADOS et ROCA, 1986).

Le type de gélose utilisé peut jouer un rôle important, en effet l'agar ne semble pas convenir aux protoplastes de nombreuses espèces. Il s'est avéré toxique pour les protoplastes d'Alnus incana (TREMBLAY et al., 1985) et inhibe les divisions des protoplastes de Hyoscyamus muticus (SHILLITO et al., 1983).

L'agarose par contre, permet une augmentation de la fréquence des divisions cellulaires et de la formation des minicals. De même SZABADOS et al. (1986) démontrent que ce gélifiant donne des résultats en microcalcs plus satisfaisants que d'autres. L'effet stimulant de l'agarose est démontré chez les protoplastes de Nicotiana tabacum (SHILLITO et al., 1983).

La régénération de la paroi et l'induction de l'activité mitotique semblent être influencées par certains facteurs d'environnement.

La température est un paramètre essentiel. Les protoplastes issus du mésophylle sont généralement cultivés à une température de 25°C.

HUBER et EDWARDS (1975) ont après plusieurs essais, déterminé la température optimale (30°C) pour Digitaria sanguinalis et pour Triticum aestivum (22°C). Aucune variation de température n'est tolérée par les protoplastes de ces espèces.

D'autre part chez Lycopersicon l'initiation et le maintien des divisions cellulaires sont étroitement liés à la température (ZAPATA et al., 1977). Un optimum de 27°C est déterminé pour les protoplastes de L. esculentum et de 29°C pour L. peruvianum.

En ce qui concerne les conditions de l'éclairement DOS SANTOS et ses collaborateurs (1980) rapportent que pour Medicago sativa seuls les protoplastes cultivés à l'obscurité forment des colonies. De même la lumière continue inhibe la survie des protoplastes de Lilium (SIMMONDS et al., 1979).

HESS et LEIPOLDT (1979) montrent un optimum de divisions de protoplastes de Nemesia strumosa sous 8000 lux; DURAND (1979) montre quant à lui que 5000 lux est l'intensité de l'éclairement la plus favorable pour les protoplastes de Nicotiana.

Les cals visibles obtenus par ces différentes méthodes de culture sont alors transférés sur un milieu de régénération.

Pour de nombreuses espèces seules les cytokinines sont utilisées comme régulateurs de croissance (SCHIEDER, 1977; EVANS, 1979). Une intensité lumineuse plus importante est suggérée pour la formation des bourgeons. On peut ainsi régénérer des plantes d'origine unicellulaire le plus souvent par organogénèse (BOURGIN et al., 1979; SHEPARD, 1980) mais aussi par embryogénèse chez quelques espèces (DORION et al., 1975).

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

1 MATERIEL VEGETAL

L'endive (Cichorium intybus L. var. Witloof) provient de la sélection d'une plante sauvage (Cichorium intybus L.) appartenant à la famille des Astéracées.

La Chicorée Witloof peut bourgeonner, après arrachage et forçage des racines, des feuilles charnues imbriquées et étiolées qui constituent l'endive appelée chicon dans le Nord de la France.

L'expérimentation est réalisée en particulier sur un hybride F1 commercialisé sous l'appellation de 'Zoom' qui résulte d'un croisement entre deux lignées A et B obtenues par sélection généalogique (BANNEROT et DE CONNINCK, 1970).

Les semences commercialisées sous le nom d'hybride "Zoom" comportent un mélange d'akènes noirs provenant du croisement AxB et d'akènes clairs résultant du croisement réciproque BxA. Seuls les akènes noirs ont été semés pour produire les plantules utilisées dans ce travail.

C.i. désignera dans le texte Cichorium intybus L. et sauf indication contraire, il s'agira de l'hybride F1 'Zoom' de la Chicorée Witloof.

2 ASEPTISATION ET ENSEMENCEMENT DES AKENES

Les protoplastes sont isolés à partir des feuilles prélevées sur des plantules cultivées "in vitro", ce qui implique une aseptisation préalable des akènes et la réalisation des cultures à l'abri des contaminations.

Les akènes sont désinfectés par trempage dans une solution de chlorure mercurique à 1% pendant 20 minutes. Pour éliminer le chlorure mercurique on pratique trois rinçages successifs dans de l'eau distillée stérile (durée respective 5-10-15 minutes), puis on laisse les akènes s'imbiber pendant 60 minutes dans de l'eau stérile pour favoriser la germination.

Les akènes sont alors récupérés sur un filtre en inox (diamètre des pores 1 mm).

L'ensemencement est réalisé dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) contenant environ 25 ml de milieu de germination qui renferme :

- les macroéléments et les microéléments de la solution de HELLER (1953).
- le fer de la solution de MURASHIGE et SKOOG (1962) diluée de moitié.
- du saccharose : 20 g.l.
- de l'agar Difco : 6 g.l.

Le pH est ajusté à 5,6 avant passage à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes.

Les boîtes de Pétri sont ensuite placées sur les étagères d'une chambre climatique, la durée journalière de l'éclairage est de 16 heures (16 : 8), la température moyenne est de 24 ± 2°C le jour et de 20 ± 2°C la nuit (24 : 20°C). Les boîtes de Pétri reçoivent un éclairage d'environ 250 lux.

3 DEVELOPPEMENT DES PLANTULES

Après 7 jours de culture les germinations aseptiques (stade 2 cotylédons chlorophylliens visibles) sont repiquées dans des tubes de 22x160 mm contenant le même milieu gélosé que celui utilisé pour la germination. Les tubes sont fermés par un bouchon de cellulose pressée puis placés pendant 21 jours dans la même chambre climatique (16:8 ; 24:20°C) recevant un éclairage de 2000 lux.

4 ISOLEMENT DES PROTOPLASTES

4.1 Mélanges enzymatiques

Nous avons utilisé comme source de cellulase et de pectinase, différentes préparations enzymatiques

- solution enzymatique qui renferme les caylases* (EI) et plus particulièrement :

- Caylase-345 : produite par fermentation d'un mutant de Trichoderma sp. Elle a de fortes activités polysaccharolytiques : cellulases, hémicellulases, 1-3 glucanases, etc... Elle est caractérisée par l'absence d'activités protéasiques et nucléasiques.

- Caylase-M2 : pectinases produites par une souche sélectionnée de Penicillium occitanis.

Les 2 enzymes sont utilisées en association dans des proportions qui seront déterminées dans les

résultats. Elles sont dissoutes dans le milieu Po préconisé par SAKSI et ses collaborateurs (1986) (cf 5-2). Ce mélange constitue le milieu de macération standard dans lequel seront effectuées des modifications indiquées ultérieurement. Une centrifugation du milieu de macération est réalisée dans une centrifugeuse type SORVAL à 12000 g pendant 15 minutes. Le culot renfermant des substances contaminantes insolubles est éliminé et le surnageant est stérilisé sur une membrane filtrante millipore (Minisart NHL, 0,22 µm).

• une autre solution enzymatique (EII) préalablement utilisée pour préparer des protoplastes de C.i. par SAKSI et ses collaborateurs (1986) qui comporte 3 enzymes :

- Cellulase Onozuka R-10^{xx} : produite par Trichoderma viride; elle renferme essentiellement des composés de type cellulase.

- Driselase^{xxx} : produite par des Basidiomycètes, elle a une activité pectinasique, cellulasique, amylasique, etc..

- Macérozyme R-10^{xxx} : produite par Aspergillus nigeri, elle hydrolyse les composés pectiques qui constituent le ciment intercellulaire.

Ces enzymes sont préparées dans le milieu Po, comme précédemment, et stérilisées sans centrifugation préalable.

4.2 Préparation des feuilles et conditions de macération

Pour favoriser la pénétration des enzymes dans le mésophylle on a lacéré le limbe en le découpant en bandes d'environ 1 mm.

Le matériel ainsi préparé est placé dans des boîtes de Pétri en verre (de 55 mm de diamètre) contenant environ 12 ml de la solution enzymatique, puis scellées avec un ruban de parafilm.

La macération est réalisée à l'obscurité. La température et la durée du traitement enzymatique influant sur le rendement et la viabilité des protoplastes seront déterminées plus loin (Cf résultats).

4.3 Obtention et lavage des protoplastes

Les boîtes sont reprises et agitées doucement afin de permettre le détachement des protoplastes et leur mise en suspension.

Après une observation sous microscope pour vérifier l'efficacité du traitement enzymatique et l'état correct des protoplastes, la préparation est filtrée à travers un tamis en acier inoxydable (vide de mailles 80 μ m). La solution de macération contenant les protoplastes est alors récupérée dans des tubes (10x120 mm) puis centrifugée (à environ 100 g) pendant 10 minutes dans une centrifugeuse HETTICH type Universal II qui présente l'avantage de démarrer très lentement ce qui évite la détérioration des protoplastes.

Après élimination des enzymes, les protoplastes sont soumis à une purification. Une mise au point de la technique de séparation des débris contaminant les protoplastes sera développée plus loin (Cf résultats).

5 CULTURE DES PROTOPLASTES

La densité des protoplastes par millilitre est déterminée par dénombrement des protoplastes vivants sur une cellule de Nageotte (les comptages sont effectués sous microscope; grossissement : 100 fois). Des dilutions appropriées sont ensuite réalisées afin d'obtenir une concentration comprise entre 20000 et 24000 protoplastes par millilitre de milieu de culture.

La culture comprend plusieurs phases définies par SAKSI et ses collaborateurs (1986), chaque phase est caractérisée par :

- la nature du milieu nutritif
- les conditions d'environnement des cultures

Cette méthode, légèrement modifiée à la suite d'observations non publiées, a été suivie au début de notre travail. Nous rappelons ci-dessous les conditions de la culture afin de dégager les améliorations apportées à la technique.

5.1 Définition des différentes phases

La régénération des plantes de C.i. à partir des protoplastes foliaires est réalisée en 5 phases (Fig.3) :

- phase 1 : Multiplication cellulaire initiale
La suspension des protoplastes est mise en

culture dans un milieu liquide (Mc1) à raison de 2,5 ml dans des boîtes de Pétri (\varnothing :55mm) à une densité initiale déterminée. Ces boîtes sont scellées par un ruban de parafilm et placées pendant 7 jours à l'obscurité dans une pièce de culture à la température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

- phase 2 : Multiplication cellulaire

Les microcals dérivés des protoplastes sont prélevés à l'aide d'une pipette pasteur puis étalés à la surface d'un milieu gélosé (Mc2). Les boîtes hermétiquement fermées sont placées pendant 4 à 6 semaines dans une pièce climatique (16 : 8; 250 lux). La température est de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ le jour et de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ la nuit.

- phase 2' : Prolifération des cals

Les minicals (issus de la phase 2) de 1 à 3 mm de diamètre sont récupérés puis transférés sur le milieu de prolifération des cals (Pc). Les boîtes sont placées dans les mêmes conditions de culture que lors de la phase 2 pendant 4 à 6 semaines.

- phase 3 : Induction des bourgeons

Les minicals d'une taille supérieure à 3 mm provenant directement de la phase 2 et ceux issus de la phase de prolifération 2' sont transférés sur un milieu d'initiation de bourgeons. Ces cultures placées dans la même pièce climatique reçoivent davantage de lumière que lors de la phase précédente (environ 1000 lux).

- phase 4 : Elongation et Enracinement des bourgeons

Les bourgeons déjà formés sont séparés du cal initial et placés pendant trois ou quatre semaines dans un milieu permettant leur allongement et leur enracinement (E/R). Les conditions de culture sont les mêmes que celles décrites en phase 3.

- phase 5 : Acclimatation des plantes régénérées

Les jeunes plantes obtenues "in vitro" subissent une phase d'acclimatation en miniserre pendant 3 à 4 semaines.

5.2 Composition des milieux de culture

La composition des différents milieux de culture utilisés au cours de ces phases est précisée dans le tableau I.

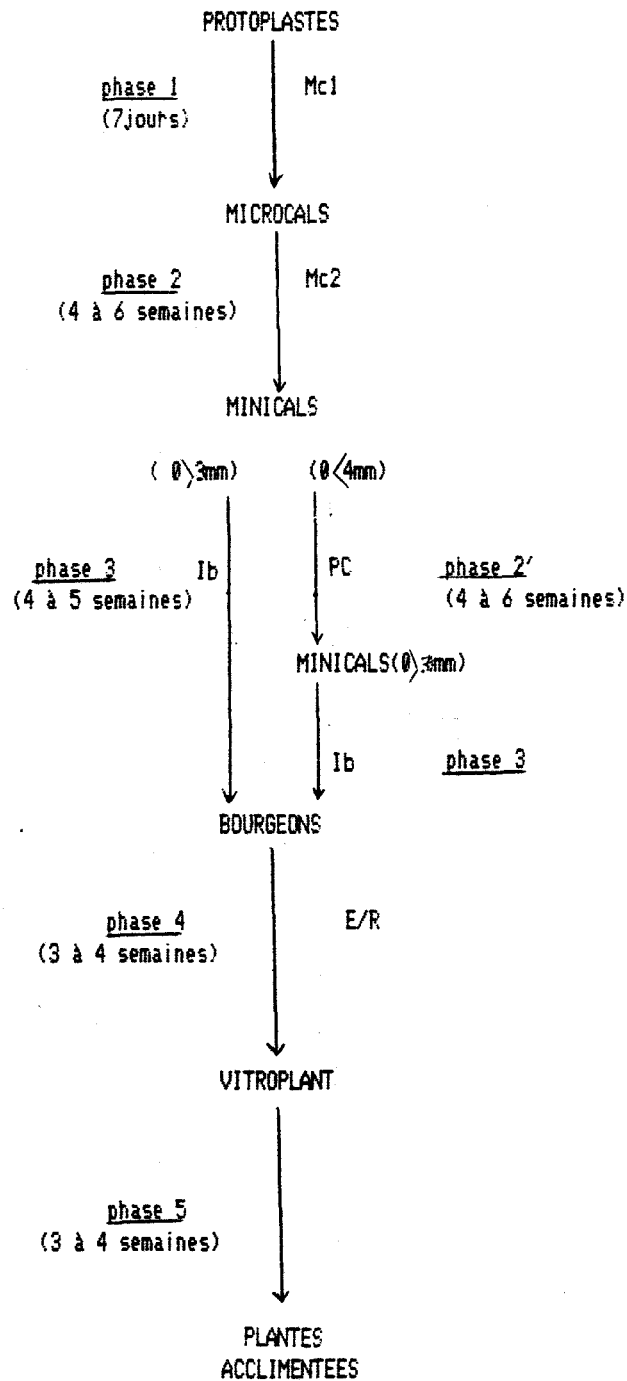


Figure 1 : Schéma général des différentes étapes de culture conduisant à la régénération des plantes à partir des protoplastes foliaires de *C.j.* d'après SAKSI et ses collaborateurs (1986), modifié.

Mc1 : Milieu de multiplication cellulaire initiale

Mc2 : Milieu de multiplication cellulaire

Pc : Milieu de prolifération des cals

Ib : Milieu d'induction de bourgeons

E/R : Milieu d'élongation et d'enracinement de bourgeons

Composition des milieux (mg.l ⁻¹)	Po	Mc1	Mc2	Pc	Ib	E/R
Macroéléments						
KCl	-	750	750	750	750	-
Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	440	440	440	440	440	440
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	185	185	185	185	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85	85	85	85	85
KNO ₃	950	-	-	-	-	950
NH ₄ NO ₃	825	-	-	-	-	825
Microéléments						
FeSO ₄ , 7H ₂ O (b)	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
Na ₂ -EDTA	-	-	-	-	-	-
Zn SO ₄	1	1	1	1	1	1
H ₃ BO ₃	1	1	1	1	1	1
Mg SO ₄ , 4H ₂ O	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
AlCl ₃	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
KI	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Vitamines						
Inositol	100	100	100	100	100	100
Pantothenate de Ca	1	1	1	1	1	1
Thiamine	1	1	1	1	1	1
Ac. nicotinique	1	1	1	1	1	1
Pyridoxine	1	1	1	1	1	1
Biotine	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Saccharose	5.10 ³	5.10 ³	5.10 ³	5.10 ³	5.10 ³	10 ⁴
Mannitol	80.10 ³	80.10 ³	60.10 ³	0	0	0
Glutamine	-	750	750	750	750	0
Substances de croissance						
Acide naphtalène acétique (ANA)	-	1	1	1	0,05	0
6-Benzylaminopurine (6-BAP)	-	1	1	1	0,5	0
Bacto Agar (Difco)	-	-	3.10 ³	5.10 ³	6.10 ³	6.10 ³

Tableau I : Composition des milieux d'obtention et de culture des protoplastes de *Cichorium intybus* L. D'après SAKSI et al., 1986.

- Po : Milieu de macération (sauf enzymes Cf. 4.1) et milieu de lavage des protoplastes.
 Mc1 : Milieu de multiplication cellulaire initiale
 Mc2 : Milieu de multiplication cellulaire
 Pc : Milieu de prolifération des cals
 Ib : Milieu d'induction des bourgeons
 E/R : Milieu d'élongation et d'enracinement des bourgeons

Le pH est ajusté à 5.6 avant passage à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes



6 CRITERES D'EVALUATION DE LA VIABILITE DES PROTOPLASTES

Les protoplastes vivants sont déterminés par observation directe sous microscope (grossissement:100), ils sont repérés par :

- leur forme parfaitement sphérique,
- l'absence de tout reste de paroi cellulaire,
- un cytoplasme clair et réfringent.

Notons qu'une observation prolongée à un grossissement suffisant (au moins 400 fois) permet de suivre le mouvement de cyclose dans les protoplastes que nous appelons "vivants" ou "viables" (RAY et HERR, 1971; PELCHER et al., 1974).

A côté de ceux-ci, on rencontre des protoplastes "non viables"; ce sont des cellules nues, sphériques ou déformées dont les constituants ont été plus ou moins endommagés au cours de la préparation ou de la purification et qui ne sont pas aptes à se diviser.

7 ESTIMATION DES RESULTATS CORRESPONDANT A LA PREMIERE PHASE DE CULTURE

L'efficacité des différents milieux de culture utilisés est estimée par la détermination du nombre de protoplastes vivants et de divisions cellulaires.

Dans une fraction aliquote de chacune des cultures le dénombrement de protoplastes ou de cellules est effectué sur une cellule de Nageotte. 10 comptages sont réalisés par boîte, ils sont répétés sur 3 boîtes.

On calcule alors un nombre moyen de protoplastes par ml de milieu de culture. Les résultats sont présentés en pourcentage moyen de cellules vivantes ou divisées par rapport à la densitéensemencée.

8 DETERMINATION DU RENDEMENT EN MINICALS EN DEUXIEME PHASE DE CULTURE

Le dénombrement des minicals formés à la fin de la deuxième phase est réalisé sous une loupe binoculaire. Le nombre de cals est exprimé en pourcentage par rapport au nombre de protoplastes initialement mis en culture ou par rapport au nombre de cellules divisées au septième jour (fin de la première phase).

CHAPITRE IV

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 FACTEURS CONTROLANT L'OBTENTION DES PROTOPLASTES

1.1 Condition d'isolement des protoplastes

1.1.1 Nature des enzymes utilisées

Une première série d'essais a été effectuée avec des enzymes commercialisées en France depuis 1986 par la société CAYLA et dénommées caylase-345 et caylase-M2.

D'après des renseignements communiqués par la société CAYLA, la concentration active de la cellulase "caylase-345" est de l'ordre de 5 à 30 mg/ml lorsque les protoplastes doivent être obtenus en 1 à 3 heures et de 5 mg/ml pour des temps plus longs. La concentration active de la pectinase "caylase-M2" utilisée en association avec la caylase-345 est de 0,1 à 1 mg/ml.

Nous avons essayé de déterminer expérimentalement la concentration de la solution enzymatique et la durée de macération permettant d'obtenir un maximum de protoplastes vivants à partir de feuilles de plantules aseptiques de C.j.

La dégradation enzymatique est réalisée dans le milieu de macération standard. L'incubation a lieu à l'obscurité dans une étuve à 30°C.

Le dénombrement des protoplastes est effectué après 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 heures de macération. L'action du traitement enzymatique est déterminée par le nombre de protoplastes libérés par mg de feuilles fraîches (pesées après la lacération).

* Variation de la concentration en cellulase

Pour cette étude nous avons fait varier la concentration de caylase-345 de 5 à 20 mg/ml, la concentration de pectinase "caylase-M2" étant maintenue à 0,5 mg/ml.

Les résultats rapportés sur la figure 2a montrent que pour chaque concentration le nombre de protoplastes libérés augmente en fonction du temps,

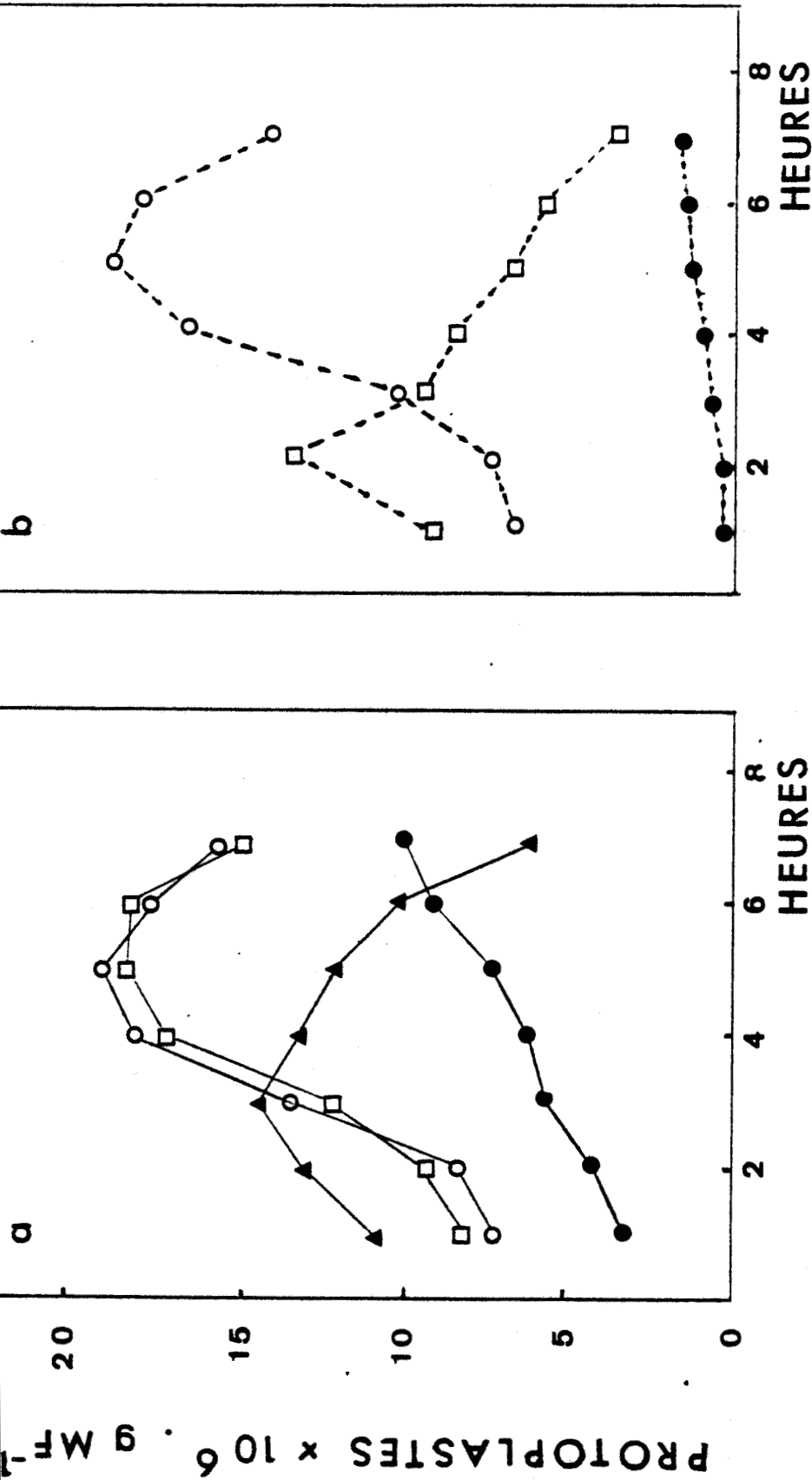


Figure 2 : Effet de la concentration en caylases et de la durée de macération sur la libération des protoplastes vivants.



a) Variation de la concentration en caylase-345 (la concentration en caylase-M2 est de 0,5 mg/ml)

b) Variation de la concentration en caylase-M2 (la concentration en caylase-345 est de 10 mg/ml)

- caylase-345 à 5 mg/ml
- " " 10 " "
- " " 15 " "
- ▲ " " 20 " "
- caylase-M2 à 0,1 mg/ml
- " " 0,5 " "
- " " 1,0 " "

passer par une valeur optimale puis diminue si on prolonge le traitement.

Avec une concentration de 10 mg/ml on obtient jusqu'à environ 19000 protoplastes par mg de feuilles en 5 heures puis le nombre de protoplastes vivants diminue assez rapidement. On observe un résultat comparable avec une concentration de 15 mg/ml.

Une concentration inférieure à 10 mg/ml est insuffisante ; la digestion de la paroi est incomplète et le rendement est faible.

Pour une concentration de 20 mg/ml la toxicité se révèle au bout de 4 heures par une diminution de protoplastes vivants : on observe à la fois des protoplastes nécrosés et de nombreux chloroplastes isolés dans le milieu.

* Variation de la concentration en pectinase

La concentration de caylase-345 conduisant au meilleur rendement a été utilisée en l'associant à différentes concentrations en caylase-M2 (0,1; 0,5 et 1 mg/ml).

Les meilleurs résultats sont observés avec une concentration correspondant à 0,5 mg/ml de caylase-M2 après 5 heures de macération (Fig 2b).

Une concentration de 0,1 mg/ml est très insuffisante même après 7 heures de traitement. Il y a très peu de protoplastes sphériques, on voit surtout des cellules dont le plasmalemme est plus ou moins décollé de la paroi qui n'est pas totalement dégradée.

La concentration de 1 mg/ml présente une toxicité qui se manifeste très rapidement (après 2 heures de macération) par la présence de nombreux protoplastes endommagés et par un jaunissement du milieu de macération.

Remarque :

Ces observations semblent indiquer que la caylase-M2 est un mélange d'enzyme et qu'elle renferme des substances toxiques pour les cellules de C.i.

En effet à côté des pectinases elle contient certainement des enzymes (cellulases, hemicellulases, glucanases...) nécessaires à la dégradation complète des parois primaires des cellules de C.i. : il faut en effet au moins 0,5 mg/ml de caylase-M2 pour obtenir ce résultat. Elle contient aussi des substances toxiques notamment des protéases qui détériorent les cellules quand la concentration de la caylase-M2 dépasse 0,5 mg/ml .

* Comparaison de quelques préparations enzymatiques

L'efficacité du mélange enzymatique caylase -345 et caylase-M2 a été comparée à celle d'un mélange d'enzymes utilisé au cours d'un précédent travail sur C.i. (SAKSI et al., 1986) et à celle des préparations lyophilisées de caylases-345 et M2 (Tableau II).

Préparations enzymatiques	Conditions d'incubation			Nombre total de protoplastes par mg de feuilles	Nombre de protoplastes vivants par mg de feuilles	Pourcentage de protoplastes vivants
	concentration (mg/ml)	température (°C)	durée (heures)			
EI { Caylase-345 + Caylase-M2	10	30	5	30700 ± 4139	20287 ± 2329	66,1 %
	0,5					
Caylase-345 lyophilisée + Caylase-M2 lyophilisée	10	30	5	37190 ± 4098	11325 ± 3110	30,4 %
	0,5					
EII { Cellulase Onozuka + Driselase + Macerozyme	1	22	15	28089 ± 1309	9032 ± 1064	32,1 %
	0,5					
Cellulase Onozuka + Driselase + Macerozyme	10	30	5	16930 ± 3387	1416 ± 1169	8,3 %
	0,4					

Tableau II : Effet des différentes préparations enzymatiques et des conditions de macération sur le rendement en protoplastes.



La nature du mélange enzymatique agit aussi bien sur le nombre de protoplastes libérés que sur le pourcentage en protoplastes vivants.

Une préparation de caylase lyophilisée semble être plus toxique que EI : le rendement en protoplastes vivants est plus faible et les déchets sont en quantité très importante avec beaucoup de chloroplastes isolés provenant de la lésion des protoplastes.

Une digestion enzymatique réalisée avec la solution enzymatique EII ne permet pas un rendement aussi important qu'avec la solution EI. Dans ce cas la digestion de la paroi d'un grand nombre de protoplastes n'est pas terminée. Une augmentation de la concentration des enzymes EII et/ou de la température de macération ne permet pas une amélioration. A 30°C après 5 heures de macération, la présence d'amas cellulaires indique que la digestion enzymatique reste incomplète, par contre un grand nombre de protoplastes présentent un brunissement à une concentration plus élevée, ce qui indique le faible pourcentage en protoplastes vivants (8,5%) obtenu dans ce cas.

Pour la suite de notre travail nous avons donc utilisé la solution enzymatique EI : caylase-345 et caylase-M2 non lyophilisées aux concentrations respectives de 10 et 0,5 mg/ml; l'incubation est réalisée à l'étuve à 30°C à l'obscurité pendant 5 heures.

1.1.2 Effet du pH du milieu de macération.

Pour cette étude 4 valeurs de pH ont été établies: 5, 5,6, 6,2 et 6,8. Le pH est ajusté avec KOH ou HCl avant filtration de la solution de macération sur membrane millipore.

Le pH 5,6 est le plus favorable (Tableau III), on observe à la fois un plus grand nombre de protoplastes libérés et le plus fort pourcentage de protoplastes viables.

Aux autres valeurs de pH, le nombre de protoplastes libérés diminue fortement mais le pourcentage de protoplastes viables ne change pas beaucoup. Ce phénomène signifie que le pH du milieu joue un rôle important sur l'activation et affecte peu l'état physiologique des cellules ou des protoplastes tout au moins quand ils se situent dans des limites physiologiques $\gg 5$ et $\ll 6,8$.

pH	: Nombre total : de protoplastes : par mg de feuilles	: Nombre de protoplastes : vivants : par mg de feuilles	: Pourcentage de : protoplastes : vivants
5.0	: 14346 ± 1725	: 9142 ± 1976	: 63,7 %
5.6	: 30349 ± 4291	: 19605 ± 3365	: 64,6 %
6.2	: 26380 ± 3240	: 13874 ± 2531	: 52,6 %
6.8	: 20680 ± 2544	: 12293 ± 3128	: 59,4 %

Tableau III : Effet de la valeur du pH du milieu de macération sur le rendement en protoplastes.

1.1.3 Etude de la variation de la nature du protecteur osmotique dans le milieu de macération.

Deux protecteurs osmotiques, le mannitol et le sorbitol ont été essayés, seul ou en mélange.

Dans les 3 conditions expérimentales réalisées, la pression osmotique est la même. Elle correspond à celle développée par une solution 0,44 M, valeur qui a été déterminée comme étant la meilleure pour les protoplastes de *D.i.* (SAKSI, 1985)

Les résultats (Tableau IV) montrent que dans le milieu renfermant 0,44M de mannitol, le nombre de protoplastes vivants est le plus faible. En associant le sorbitol au mannitol le rendement reste sensiblement le même.

En revanche le rendement est plus important lorsqu'on utilise 0,44M de sorbitol. On obtient le plus

grand nombre de protoplastes vivants et une quantité très faible de débris cellulaires.

Protecteur osmotique	Nombre total de protoplastes par mg de feuilles	Nombre de protoplastes vivants par mg de feuilles	Pourcentage de protoplastes vivants
Mannitol 0,44M	29651 ± 6043	18226 ± 2427	61,5 %
Mannitol 0,22M + Sorbitol 0,22M	28613 ± 2307	19314 ± 2315	67,5 %
Sorbitol 0,44M	27567 ± 2822	22427 ± 3135	81,3 %

Tableau IV : Effet de la nature du protecteur osmotique incorporé dans le milieu de macération sur le rendement en protoplastes.

1.1.4 Action de l'addition des substances de croissance au milieu de macération.

L'ANA et la BAP sont utilisées en raison de leur présence dans le milieu de culture des protoplastes de *C. i.* (SAKSI et al., 1986). Ces substances de croissance sont ajoutées au milieu de macération standard à une concentration de 1 mg.l⁻¹.

Les résultats (Tableau V) montrent que la BAP ne provoque qu'une légère augmentation du nombre de protoplastes vivants libérés; ce nombre est nettement plus élevé en présence de l'ANA mais le pourcentage de protoplastes vivants varie peu.

Les résultats suggèrent que ces régulateurs de croissance, notamment l'ANA, pourraient intervenir sur la structure de la paroi des cellules ou directement sur l'activité des enzymes.

Substances de croissance (mg.T ⁻¹)		Nombre total de protoplastes par mg de feuilles	Nombre de protoplastes vivants par mg de feuilles	Pourcentage de protoplastes vivants
ANA	BAP			
0	0	29667 ± 1328	19138 ± 1815	64,5 %
1	0	35196 ± 5473	23259 ± 2928	66,1 %
0	1	31441 ± 2856	20652 ± 3412	66,9 %
1	1	35342 ± 2307	23817 ± 3128	67,3 %

Tableau V : Effet des substances de croissance présentes dans le milieu de macération sur le rendement en protoplastes.

1.1.5 Effet du prétraitement des plantules sur la libération des protoplastes.

Des plantules de 21 jours ont été soumises à différentes températures (4, 16 ou 22°C) et à l'obscurité pendant un temps variable (8 ou 15 heures) avant d'être utilisées pour la préparation des protoplastes.

Les résultats du prétraitement sont fournis par le tableau VI.

A la température de 22°C (qui est la température à laquelle sont cultivées les plantules), un allongement de la période d'obscurité (15 heures au lieu de 8 heures) augmente le nombre de protoplastes vivants

libérés.

Pour une même période d'obscurité la diminution de la température favorise encore d'avantage la libération de protoplastes vivants. Les résultats les meilleurs sont obtenus par un prétraitement à 4°C pendant 15 heures.

Température (°C)	Obscurité (heures)	Nombre total de protoplastes par mg de feuilles	Nombre de protoplastes vivants par mg de feuilles	Pourcentage de protoplastes vivants
22	8	27777 ± 2444	18484 ± 3022	66,6 %
	15	30011 ± 4291	20814 ± 3615	69,4 %
15	15	29224 ± 1464	22225 ± 2148	76,0 %
4	15	27961 ± 2413	24292 ± 3212	86,8 %

Tableau VI : Effet du prétraitement des plantules sur le rendement en protoplastes.

1.2 Influence de la nature des feuilles et de l'âge des plantules sur la libération de protoplastes

Les essais ont porté sur des feuilles de nature différente à des stades de développement variables (Fig 3).

- cotylédons provenant de la germination des akènes en boîtes de Pétri (Fig 3a).

- feuilles cotylédonaires et premières paires de feuilles prélevées sur des plantules âgées de 15, 21 ou 28 jours depuis le repiquage des akènes germés dans les tubes de culture (Fig 3b).

- Après avoir utilisé la première paire de feuilles au 21ème jour, le collet comportant les deux feuilles cotylédonaires, est débarrassé du chevelu racinaire puis repiqué sur un milieu neuf (Figure 3c).

On obtient alors le développement d'une deuxième paire de feuilles que l'on prélève 15, 21 ou 28 jours après le repiquage du collet; les feuilles cotylédonaire sont utilisées simultanément (Tableau VII).

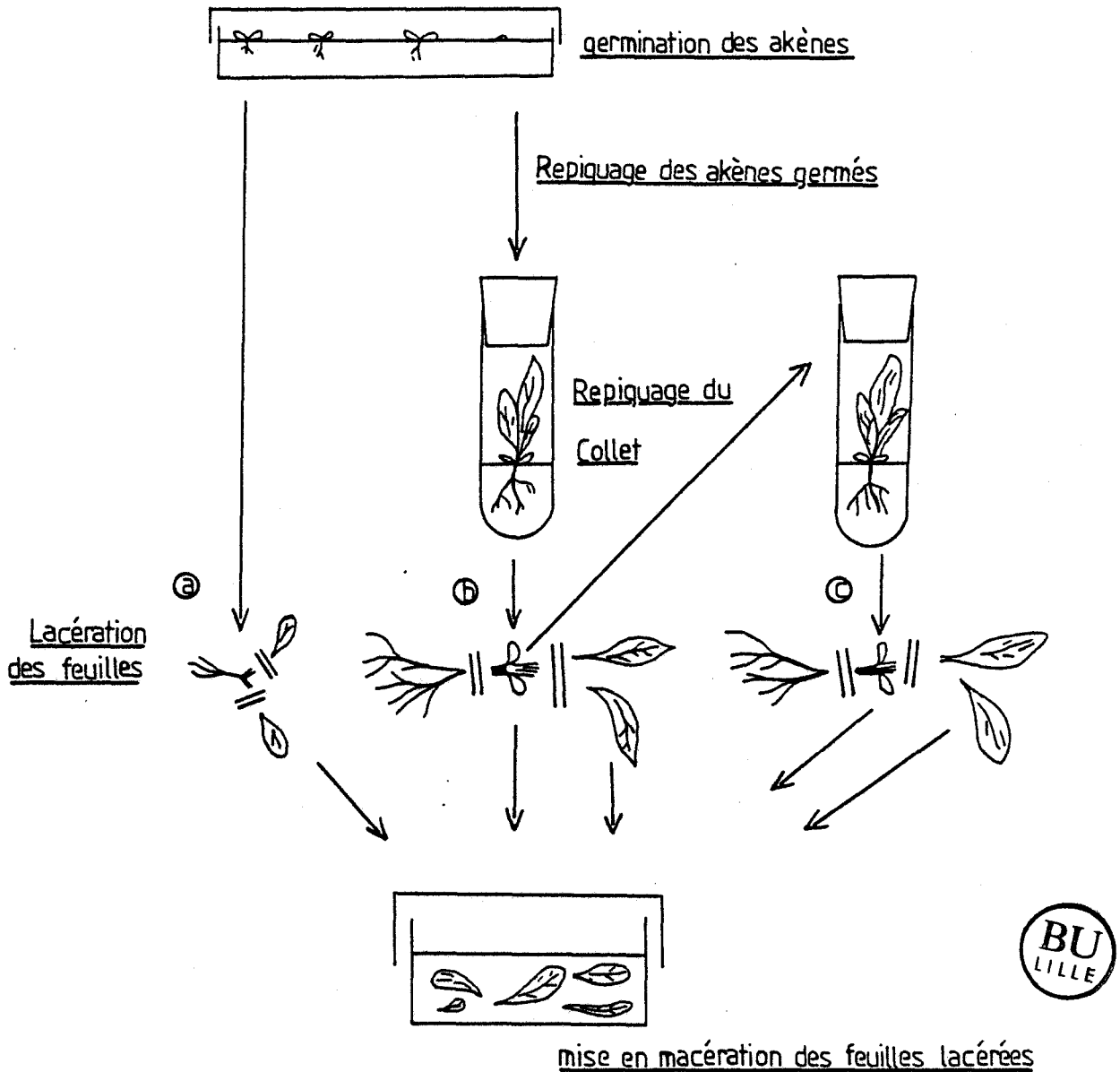


Fig 3 : Obtention de protoplastes à partir des feuilles de *C. i.* de natures différentes.

- a- Cotylédons provenant de la germination des akènes en boîte de Pétri
- b- Feuilles cotylédonaire et première paire de feuilles prélevées sur des plantules provenant d'akènes germés puis repiqués dans des tubes
- c- Feuilles cotylédonaire et deuxième paires de feuilles prélevées sur des plantules provenant du collet, repiqué au 21ème jour après prélèvement de la première paire de feuilles et suppression des racines.

Les résultats (Tableau VII) montrent que pour chaque type de feuille le nombre de protoplastes libérés dans le milieu de macération diminue avec l'âge. C'est la première paire de feuilles, prélevée sur des plantules âgées de 15 jours, qui montre le meilleur résultat. La deuxième paire de feuilles ne semble pas convenir, le nombre de protoplastes vivants est faible et les débris sont en quantité très importante.

Par ailleurs si les protoplastes issus de feuilles cotylédonaire constituent une population plus homogène et plus riche en chlorophylle, le rendement est beaucoup plus faible par rapport aux feuilles.

Néanmoins des essais d'isolement des protoplastes à partir de cotylédons plus jeunes au septième jour de germination des akènes (Fig 3a) montrent un nombre de protoplastes deux fois plus important (résultats non présentés) par rapport aux feuilles cotylédonaire prélevées sur des plantules 15 jours après le repiquage des germinations dans les tubes.

Nature des feuilles	Age des Plantules : (a) + (b)	Nombre total de protoplastes par mg de feuilles	Nombre de protoplastes vivants par mg de feuilles	Pourcentage de protoplastes vivants
Feuilles cotylédonaire	: 15	: 17915 ± 1968	: 10174 ± 2395	: 56,8 %
	: 21	: 23120 ± 1280	: 8106 ± 1115	: 35,0 %
	: 28	: 26501 ± 1748	: 5325 ± 1023	: 20,0 %
	: 21 + 15	: 20348 ± 1615	: 8374 ± 1290	: 41,1 %
	: 21 + 21	: 18865 ± 3971	: 5618 ± 1000	: 29,8 %
	: 21 + 28	: 22099 ± 1721	: 4002 ± 838	: 18,0 %
1ère paire de feuilles	: 15	: 28354 ± 3826	: 23208 ± 2129	: 81,8 %
	: 21	: 31703 ± 1150	: 19218 ± 1516	: 60,6 %
	: 28	: 45998 ± 1167	: 12649 ± 2126	: 27,5 %
2ème paire de feuilles	: 21 + 15	: 20653 ± 1461	: 11315 ± 2184	: 54,7 %
	: 21 + 21	: 21359 ± 1120	: 9927 ± 1215	: 46,4 %
	: 21 + 28	: 19603 ± 1170	: 5096 ± 965	: 26,0 %

Tableau VII : Rendement en protoplastes en fonction de la nature des feuilles et de l'âge des plantules.



(a) : Nombre de jours depuis le transfert des akènes germés en tube, sur un milieu de HELLER.

(b) : Nombre de jours après repiquage sur milieu neuf des plantules dont la première paire de feuilles a été coupée le 21ème jour

1.3 Influence des conditions de développement des plantules sur la libération des protoplastes

1.3.1 Effet des substances de croissance présentes dans le milieu de culture des plantules

Nous avons indiqué précédemment (1.1.5) que la présence de régulateurs de croissance dans le milieu de macération affecte la libération de protoplastes.

Dans cette expérience nous avons analysé l'effet des facteurs de croissance incorporés dans le milieu nutritif, utilisé pour le développement des plantules, sur le nombre de protoplastes libérés.

Les différentes substances (ANA, BAP, AG3) ont été ajoutées aux milieux préalablement passés à l'autoclave, par filtration à travers une membrane millipore ($\phi:0,22 \mu$) à la concentration de 1 mg.l^{-1} .

Les résultats (Tableau VIII) montrent qu'un traitement avec l'ANA ou l'AG3 semble présenter des effets favorables sur la libération des protoplastes viables issus des feuilles.

Quand les protoplastes proviennent des feuilles cotylédonaires, le meilleur rendement est obtenu en présence de la BAP. Cependant, dans ce cas les plantules présentent une racine très courte et épaisse de plus un développement de feuilles (première paire) fut impossible à obtenir.

Substances de croissance:	: Nombre de protoplastes vivants		: Pourcentage de protoplastes vivants	
	par mg de feuilles			
de :	:-----		:-----	
croissance:	feuilles cotylé-	lère paire de	feuilles cotylé-	lère paire de
:	donaires	: feuilles	: donaires	: feuilles
0	: 8184 ± 1218	: 18000 ± 3215	: 40,3 %	: 64,7 %
ANA	: 10590 ± 2354	: 20518 ± 2324	: 46,7 %	: 65,1 %
BAP	: 12851 ± 2315	: -	: 51,0 %	: -
AG3	: 11264 ± 2185	: 21712 ± 2212	: 40,9 %	: 63,9 %

Tableau VIII : Effet des substances de croissance ajoutées au milieu de culture des plantules sur le rendement en protoplastes.

1.3.2 Effet de la température et de l'éclairement au cours du développement des plantules.

Dans une première expérience nous avons fait varier la durée journalière de l'éclairement. Trois conditions ont été comparées :

- Lumière continue 24 : $\bar{0}$
- Jours longs 16 : $\bar{8}$
- Jours courts 12 : $\bar{12}$

En lumière continue, la température est de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ou de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Dans les autres conditions, la température est de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ le jour et de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ la nuit. Les plantules sont exposées à une intensité de l'éclairement de 2000 lux.

Les résultats sont reportés dans le tableau IX.

Conditions expérimentales:		Nombre total	:	Nombre de	:	Pourcentage de
		: de protoplastes	:	protoplastes	:	protoplastes
		: par mg	:	vivants par mg	:	vivants
Photopériode:	Température:	de feuilles	:	de feuilles	:	
16 : $\bar{8}$	24 - $\bar{22}^\circ\text{C}$	30214 ± 3726	:	19649 ± 3227	:	65,0 %
12 : $\bar{12}$	24 - $\bar{22}^\circ\text{C}$	30911 ± 2640	:	16115 ± 2615	:	52,1 %
24 : $\bar{0}$	25°C	31174 ± 4898	:	13324 ± 3123	:	42,7 %
24 : $\bar{0}$	28°C	29019 ± 5170	:	10128 ± 2315	:	34,9 %

Tableau IX : Effet de la photopériode et de la température au cours de la culture des plantules sur le rendement en protoplastes. L'intensité de l'éclairement est de 2000 lux.

Le nombre de protoplastes libérés varie en fonction des conditions de culture des plantules sur lesquelles on prélève les feuilles donatrices. L'éclairement joue un rôle très important: le rendement en protoplastes viables est plus élevé en éclairement photopériodique qu'en lumière continue et les jours longs (16:8) sont plus favorables que des jours courts (12:12).

Lorsque les plantules sont éclairées 12 heures par jour on observe beaucoup de protoplastes de grande taille, peu chlorophylliens, paraissant fragiles et de nombreux protoplastes endommagés ainsi que beaucoup de débris cellulaires présents dans le milieu de macération.

L'effet de la température n'a pas été établi de façon systématique, il semble qu'une température supérieure à 23°C soit défavorable.

Dans une seconde expérience on a fait varier l'intensité de l'éclairement, la photopériode étant maintenue à 16:8. La température journalière moyenne est de 24°C, celle de la nuit de 22°C.

Avec une intensité de l'éclairement de 4000 lux on obtient plus de 22000 protoplastes vivants par mg de feuilles fraîches (Tableau X).

En réduisant l'intensité de l'éclairement, le pourcentage de protoplastes vivants diminue assez rapidement.

D'autre part, à 250 lux les plantules se développent très lentement et la taille des feuilles reste très réduite ce qui implique la nécessité d'utiliser un nombre plus important de plantules pour produire la même quantité de matière fraîche.

Intensité de l'éclairement (lux)	Nombre total de protoplastes par mg de feuilles	Nombre de protoplastes vivants par mg de feuilles	Pourcentage de protoplastes vivants
250	26669 ± 1509	12718 ± 1200	47,6 %
2000	30649 ± 3215	19311 ± 3484	63,0 %
4000	28500 ± 2048	22442 ± 2512	78,8 %

Tableau X : Effet de l'intensité de l'éclairement au cours de la culture des plantules sur le rendement en protoplastes. La photopériode est de 16:8 ; la température de 24:22°C

2 RECUPERATION ET LAVAGE DES PROTOPLASTES

2.1 Caractérisation de deux fractions de protoplastes

Après digestion enzymatique et élimination des débris par passage sur un filtre en inox, le filtrat est centrifugé à 100 g pendant 10 minutes.

Cette centrifugation révèle l'existence de deux populations de protoplastes : l'une de densité élevée qui sédimente et forme un "culot" assez important, l'autre plus légère qui flotte et forme ainsi un "anneau".

Les deux fractions renferment des protoplastes chlorophylliens et des protoplastes dépourvus de chloroplastes mais chacune présente des caractéristiques particulières.

La population des protoplastes de l'anneau est constituée de 30% environ de protoplastes chlorophylliens dont la taille varie de 20 à 70 μm (Fig 3a). Tandis que les protoplastes non chlorophylliens sont plus grands, la plupart mesurant de 60 à 80 μm de diamètre (Fig 3b).

À l'inverse, les protoplastes du culot sont plus homogènes et de taille plus réduite (Fig 3c et 3d), notamment les non chlorophylliens qui ne représentent dans cette fraction que 20%. Le culot contient également une quantité plus importante de débris : fragments de trachéïdes et de vaisseaux, cellules mortes, cellules dont la digestion enzymatique est incomplète, chloroplastes isolés, débris de paroi,...

Les protoplastes de la fraction "anneau" peuvent être séparés facilement des enzymes et des débris cellulaires par une série de centrifugations dans le milieu de lavage Po (2.2). On obtient alors une suspension de protoplastes très propres (Planche I, Photo 1) avec une récupération des protolastes quantitativement suffisante.

Si on applique la même méthodologie pour les protoplastes de la fraction "culot", on sépare très difficilement les déchets car ils sédimentent au fond du tube en mélange avec les protoplastes (Planche I, Photo 2).

Nous avons alors progressivement mis au point une méthode permettant de recueillir un maximum de protoplastes viables à partir du culot, tout en éliminant la plus grande partie des débris cellulaires.

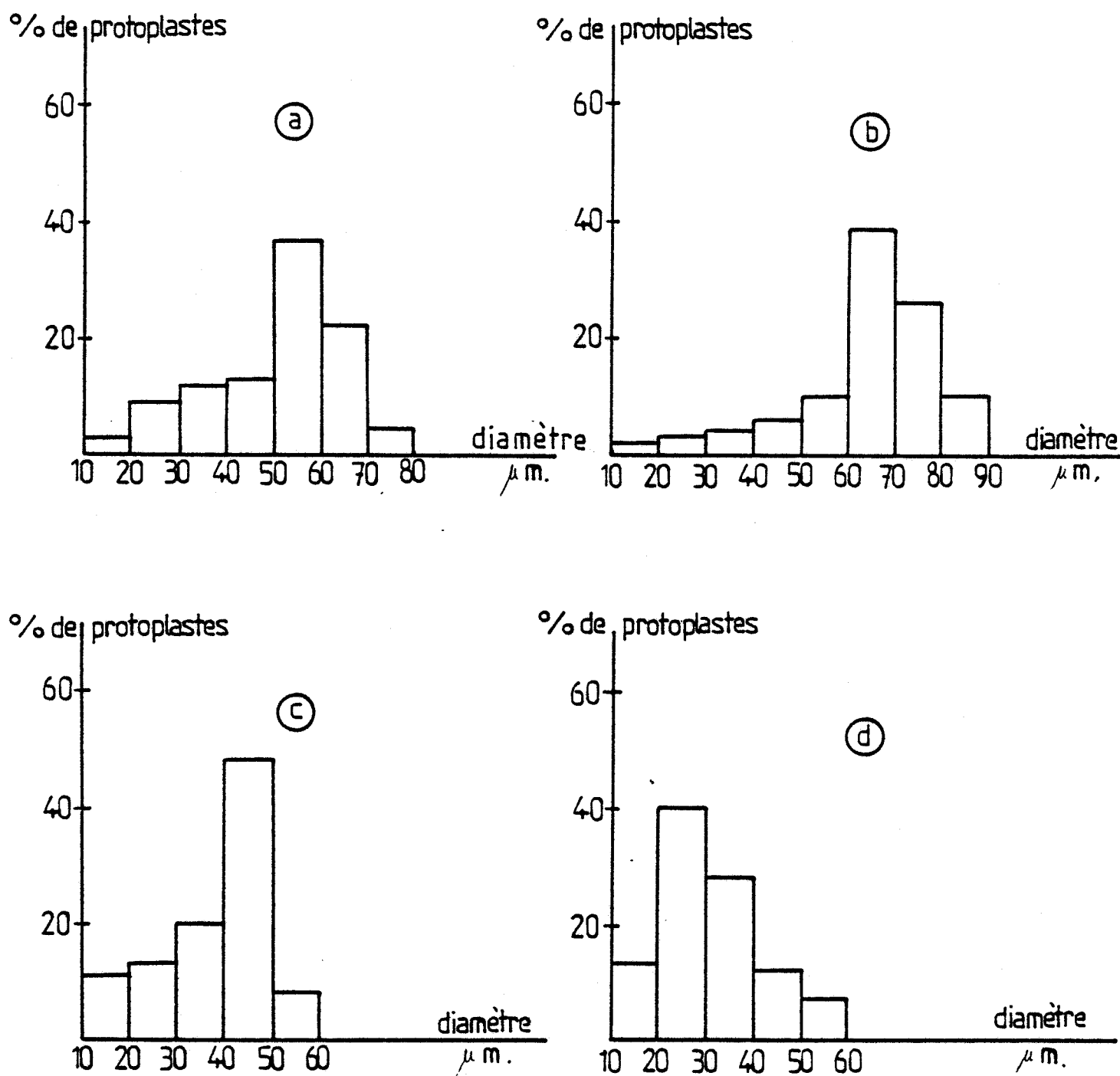


Figure 4 : Répartition des protoplastes de la fraction légère ("anneau") et de la fraction lourde ("culot") en fonction de leur taille. Des classes d'intervalle de $10\mu\text{m}$ ont été choisies arbitrairement.

- a = protoplastes chlorophylliens de l'anneau
- b = protoplastes non chlorophylliens de l'anneau
- c = protoplastes chlorophylliens du culot
- d = protoplastes non chlorophylliens du culot

2.2 Mise au point d'une méthode de lavage de la suspension de protoplastes

Après digestion enzymatique des fragments de feuilles, la solution enzymatique renfermant les protoplastes est filtrée sur un tamis (porosité $80\mu\text{m}$). Les protoplastes sont recueillis dans le filtrat ainsi que les petits débris. On procède alors à une première centrifugation à 100 g pendant 10 minutes (Fig 5) qui permet de séparer deux fractions de protoplastes, celle de l'anneau et celle du culot.

- Lavage des protoplastes de l'anneau

Les protoplastes de l'anneau sont prélevés à l'aide d'une pipette pasteur stérile munie d'une propipette et recueillis dans un tube contenant le milieu Po (Fig 5, 1b). Une centrifugation est réalisée ensuite à 100 g pendant 10 minutes (Fig 5, 2b). La faible densité des protoplastes de cette fraction permet de les récupérer au niveau d'un anneau (Fig 5, 3b). Après avoir éliminé la solution enzymatique les protoplastes sont repris dans le milieu Po puis centrifugés; l'opération étant répétée trois fois. Les protoplastes sont alors mis en suspension dans le milieu de culture.

- Lavage des protoplastes du culot

Après avoir récupéré les protoplastes de l'anneau, on élimine la solution de macération et on recueille un volume de 3 à 3,5 ml du culot que l'on dépose à la surface de 5 ml d'une solution concentrée de saccharose (Fig 4, 1a). Cette solution correspond au milieu de lavage Po utilisé précédemment et dans lequel le mannitol est remplacé par le saccharose. Le saccharose est utilisé à différentes concentrations (10, 12,5 et 15%). Une deuxième centrifugation (Fig 5, 2a) est alors réalisée dans les mêmes conditions que la première, mais pendant 20 minutes au lieu de 10 minutes.

Les tubes sont ensuite placés sur un support de façon à favoriser la décantation des débris qui se rassemblent dans le fond tandis que les protoplastes "propres" forment un disque vert en surface (Fig 5, 3a).

Les protoplastes débarassés des débris sont mis en suspension dans le milieu de lavage Po (Fig 5, 4a), puis centrifugés pendant 10 minutes. Après élimination du milieu Po, ils sont repris dans le même milieu afin d'effectuer une deuxième centrifugation. Le

culot est enfin mis en suspension dans le milieu de culture.

Pour chaque concentration de saccharose, le nombre de protoplastes est évalué avant et après purification. Les protoplastes récupérés en surface dans le disque vert sont comptés sur une cellule de Nageotte.

Deux valeurs sont prises en compte : le nombre de protoplastes vivants parfaitement sphériques et le nombre total incluant aussi les protoplastes endommagés.

Ces comptages permettent de déterminer l'efficacité de la purification estimée par le pourcentage de protoplastes vivants dans la suspension après purification (Tableau XI).

Le rendement de la purification est indiqué par le pourcentage des protoplastes recueillis par rapport à leur nombre avant purification (Tableau XII).

	: Avant : purification	:Après purification sur coussin de saccharose à : 10 %	: 12,5 %	: 15 %
Nombre total de protoplastes par mg de feuilles	: : 27714 ± 3143 :	: : 7549 ± 1954 :	: : 15077 ± 1537 :	: : 14703 ± 2758 :
Nombre de protoplastes vivants par mg de feuilles	: : 17142 ± 2285 :	: : 5406 ± 1055 :	: : 12084 ± 1377 :	: : 9307 ± 1923 :
Pourcentage de protoplastes vivants	: : 51,8 % :	: : 71,6 % :	: : 80,1 % :	: : 63,3 % :

Tableau XI : Effet de la concentration en saccharose sur l'efficacité de la purification : pourcentage de protoplastes vivants avant et après purification de la suspension

Les résultats (Tableau XI) montrent qu'une concentration en saccharose de 12,5% permet d'obtenir une suspension comprenant environ 80% de protoplastes vivants alors qu'avant purification elle en comprenait environ 50%. Une concentration en saccharose de 10% est insuffisante : une grande quantité de protoplastes sédimente en culot avec les débris. En revanche une concentration plus élevée de 15% ne permet pas une séparation nette entre le culot renfermant les débris

et les protoplastes situés dans le disque.

D'après le tableau XII on s'aperçoit que la récupération des protoplastes est également meilleure pour une concentration de 12,5% en saccharose (70,5%) alors que pour une concentration de 10% le rendement diminue de moitié et que pour une concentration de 15% il n'est que de 54,3%.

Avant purification	: Après purification sur coussin de saccharose à 10 %	: 12,5 %	: 15 %
17142 ± 2285	5406 ± 1055	12084 ± 1377	9307 ± 1923
100 %	31,5 %	70,5 %	54,3 %

Tableau XII : Effet de la concentration en saccharose sur le rendement de la purification : pourcentage de protoplastes vivants recueillis par rapport à leur nombre avant purification (= 100%).

2.3 Récupération des protoplastes purifiés du culot

La présence du mannitol dans le milieu utilisé lors des deux derniers lavages suivant la purification sur coussin de saccharose tend à empêcher la sédimentation des protoplastes : un grand nombre de protoplastes restent en suspension dans le milieu de lavage et la récupération du culot est assez difficile. Ce qui nous a amené à remplacer dans le milieu de lavage Po le mannitol par une solution saline aqueuse renfermant du KCl à 2,5% et du CaCl₂ à 0,5%.

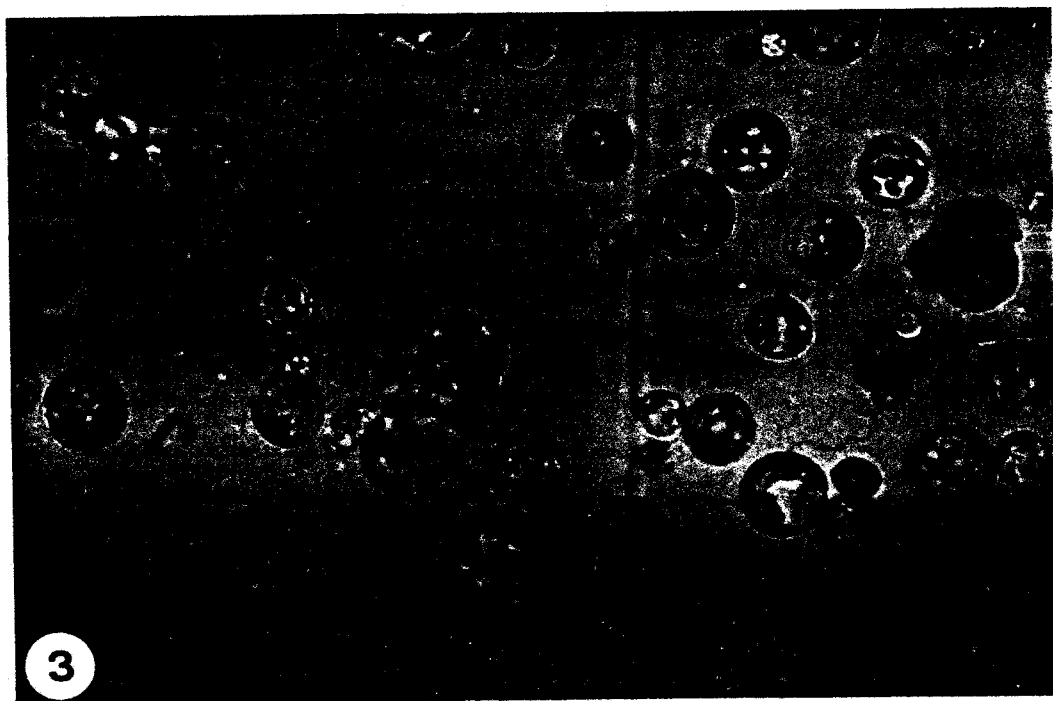
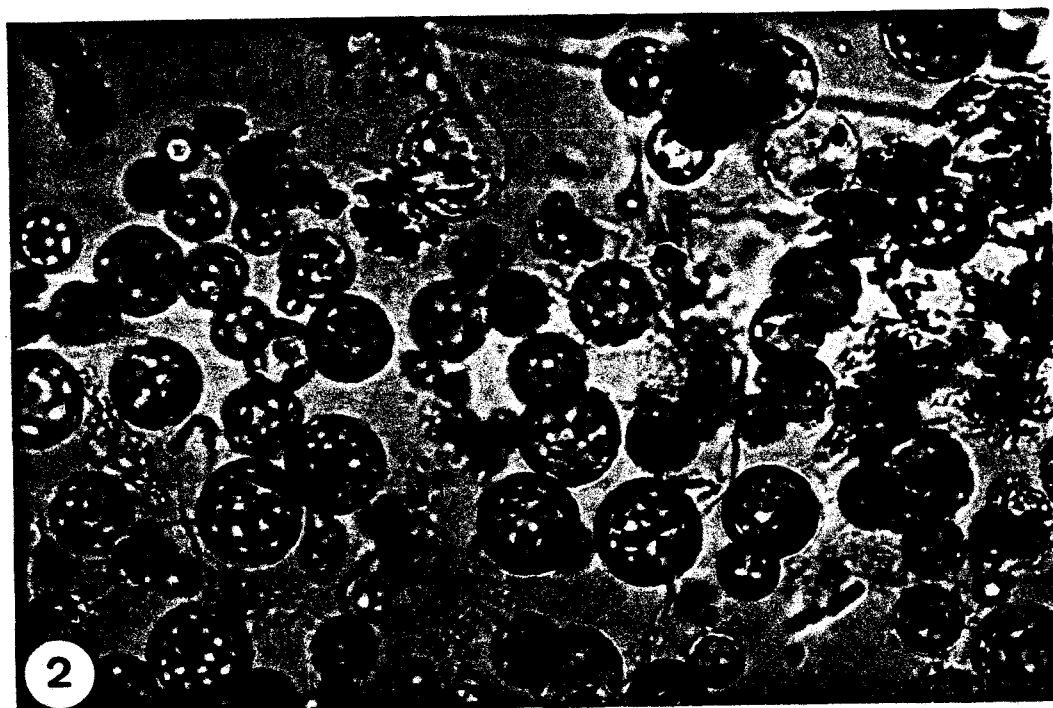
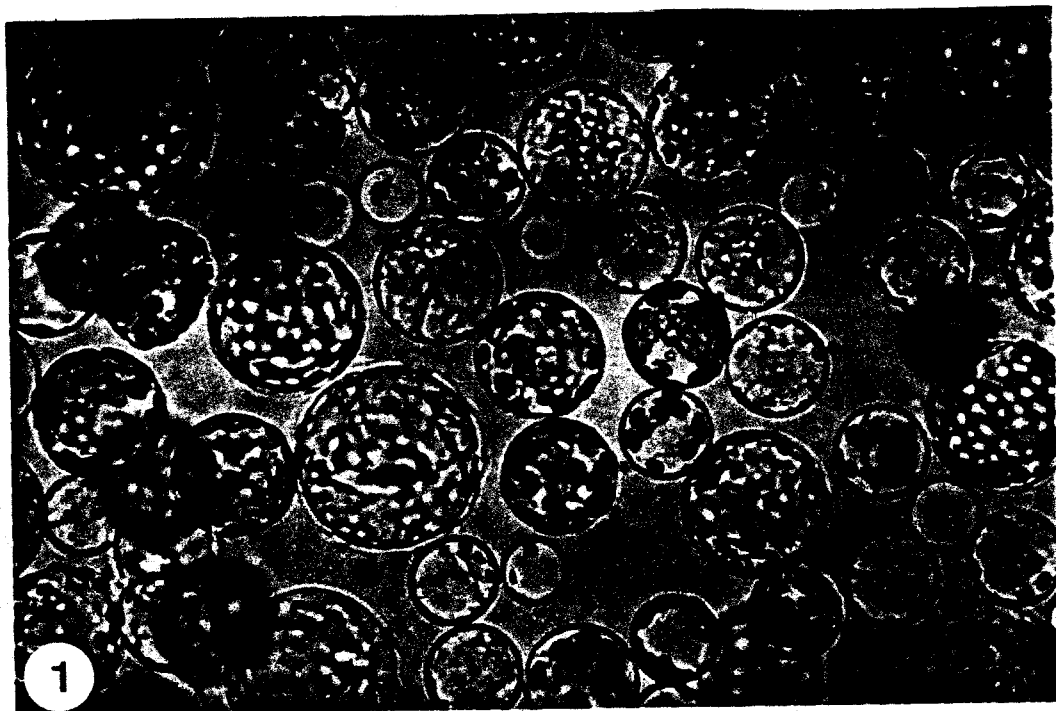
Avant purification	:Après purification sur coussin de saccharose	: + Lavage dans Po	: + Lavage dans la solution saline
15897 ± 2649	6114 ± 1529	9859 ± 1146	
100 %	38,5 %	62,0 %	

Tableau XIII : Effet de l'incorporation de la solution saline au milieu de lavage Po sur le pourcentage en protoplastes vivants recueillis par rapport à leur nombre avant purification (100 %).

L'optimisation de cette méthode a permis d'atteindre un rendement de 62% quand la solution saline est incorporée dans le milieu de lavage (Tableau XIII), alors que ce pourcentage n'est que de 38,5% en présence du mannitol.

L'efficacité de la technique de lavage se révèle satisfaisante, aussi bien en ce qui concerne la pureté de la fraction de protoplastes après passage sur coussin de saccharose qu'en ce qui concerne leur récupération après lavage dans la solution saline (Planche I, Photo 3).





BU
LILLE

3 FACTEURS CONTROLANT LA VIABILITE DES PROTOPLASTES ET LES DIVISIONS DES CELLULES QUI EN DERIVENT.

3.1 Aspect cytologique et expression des résultats

De nombreux essais ont été effectués afin d'optimiser le rendement en cellules vivantes et le pourcentage de cellules qui se divisent au cours de la première phase de culture.

La viabilité des protoplastes est déterminée par rapport aux protoplastes vivants initialement présents dans la culture; elle est exprimée en pourcentage.

Les cellules se divisent selon deux modes différents et il est essentiel d'en tenir compte dans les évaluations des rendements car les cellules issues de ces divisions auront un devenir très différent.

En effet certaines divisions cellulaires comportent un plan de division très apparent : ce sont des mitoses symétriques (Fig 5.1) ou asymétriques (Fig 5.2) lorsque les deux cellules filles ont une taille très différente. Chaque cellule présente un noyau et se divisera à son tour selon un plan généralement perpendiculaire au premier.

D'autres cellules émettent un bourgeon de taille variable qui peut comporter un noyau ou en être dépourvu (Fig 5.3). Ce bourgeon peut se détacher et se diviser (Fig 5.4) ou rester attaché à la cellule qui l'a produit. Dans ce cas, s'il se divise, il se forme une sorte de chaînette dont les différents éléments (Fig 5.5) sont souvent de plus en plus petits. Ce type de divisions ressemble au bourgeonnement des Levures.

Les divisions par mitose et par bourgeonnement sont comptées dans une fraction aliquote sur une cellule de Nageotte et exprimées en pourcentage par rapport au nombre de protoplastes initialement présents dans la culture.

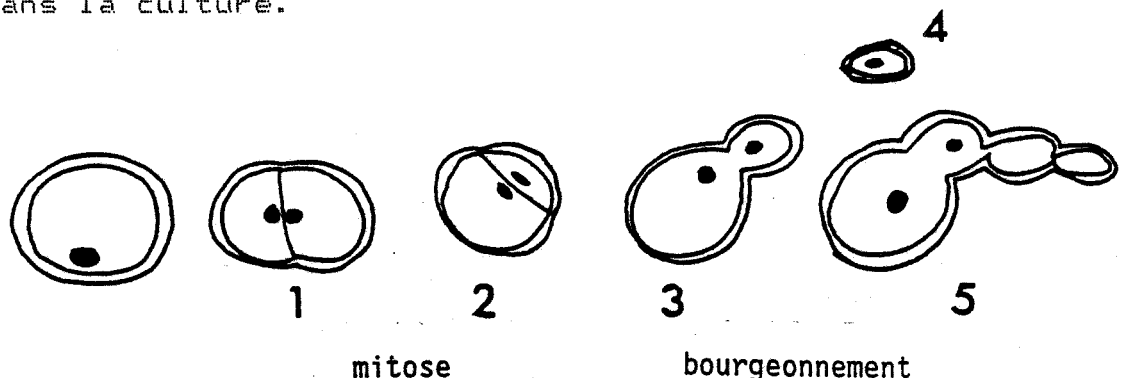


Figure 6 : Modes de division des cellules issues des protoplastes foliaires de C.i.

* Il s'agit en réalité de cellules car la paroi est partiellement reconstituée et beaucoup de cellules sont déjà formées

3.2 Action de la nature de la préparation enzymatique

Une digestion enzymatique réalisée avec la solution enzymatique EI (1.1.1) a permis le meilleur rendement en protoplastes vivants par rapport à celle effectuée avec d'autres préparations enzymatiques.

Nous avons voulu vérifier les effets des différentes préparations enzymatiques sur la viabilité et la division des cellules dérivées des protoplastes. Pour cela les protoplastes sont isolés en présence des enzymes EI (pendant 5 heures à 30°C) ou en présence de la solution enzymatique EII (pendant 15 heures à 22°C) puis cultivés dans le milieu Mcl.

Préparations enzymatiques		Viabilité (%)	Divisions		
nature	concentration (mg/ml)		mitose (%)	bourgeoisement (%)	
EI	Caylase-345	10,0	70,6 ± 3,7	31,0 ± 5,5	23,0 ± 3,4
	+ Caylase-M2	0,5			
EII	Cellulase Onozuka	1,0	52,3 ± 2,9	22,2 ± 2,9	25,2 ± 5,7
	+ Driselase	0,5			
	+ Macerozyme	0,2			

Tableau XIV : Effet des préparations enzymatiques sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules dérivées des protoplastes.

Les observations (Tableau XIV) montrent, que deux jours après la mise en culture 50% environ des protoplastesensemencés sont morts quand le milieu de macération renferme la préparation enzymatique EII; par contre la préparation EI permet un taux de viabilité plus important (environ 70%) et un pourcentage de divi-

sions par mitose plus élevé (31,0% au lieu de 22,2%). Cependant, le pourcentage de cellules qui émettent des bourgeons reste sensiblement identique dans les deux cas.

On remarque que la préparation enzymatique EI (caylase) qui est la plus efficace pour la libération des protoplastes est aussi celle qui permet d'obtenir les meilleurs résultats en phase 1 de culture.

3.3 Effet de la nature des protoplastes

Après la première centrifugation du milieu de macération, on a observé la répartition en deux "fractions" de protoplastes libérés :

- ceux qui sédimentent au fond du tube : "culot"
- ceux qui flottent à la surface de la solution enzymatique : "anneau"

Nous avons analysé le comportement de ces deux fractions, (viabilité des protoplastes et aptitude à la division) au cours de la première phase de culture.

Après trois lavages par centrifugation dans du milieu Po pour éliminer totalement les enzymes, les protoplastes issus des deux fractions sont mis en culture dans des milieux Mcl renfermant respectivement 8% et 10% de mannitol.

A une concentration de 8% de mannitol le meilleur pourcentage de divisions est obtenu avec les protoplastes chlorophylliens du culot (26,6%) (Tableau XV). Les protoplastes non chlorophylliens et ceux issus de l'anneau, deux jours après la mise en culture, présentent un renflement indiquant leur éclatement ce qui implique la diminution rapide de la viabilité qui peut atteindre 10,4%. Nous n'avons pas pu dans ce cas observer des mitoses cellulaires, mais seulement un pourcentage faible (9,2%) de cellules qui bourgeonnent constituant des formations en chaînettes qui finissent par dégénérer.

En augmentant la concentration en mannitol jusqu'à 10%, le pourcentage de viabilité et de divisions augmente très peu dans le cas des protoplastes de l'anneau (4,8% de divisions par mitose au lieu de 0,4%).

Ces différences de comportement entre les protoplastes avec ou sans chloroplastes nous ont amené à l'étude de l'état physiologique des deux populations notamment en ce qui concerne le métabolisme azoté. En effet un dosage de l'activité nitrate réductase a révélé une activité de 1,2 mMoles de nitrites formés

$1/h/10^6$ protoplastes de l'anneau tandis que celle obtenu au niveau des protoplastes du culot n'est que de 60μ Moles $1/h/10^6$ protoplastes.

Nos conditions de culture et les milieux utilisés ne doivent pas être optimums pour les divisions des protoplastes de cette fraction "anneau".

Nous avons donc évité l'utilisation de ce type de protoplastes. Ainsi après la première centrifugation du filtrat seuls les protoplastes du culot sont retenus pour la suite de notre travail.

Nature des protoplastes		Concentration	Viabilité	Divisions	
Fraction	Type	en mannitol (%)	(%)	mitose (%)	bourgeonnement (%)
Culot	avec chloroplastes	8	$60,4 \pm 7,1$	$26,6 \pm 3,2$	$24,1 \pm 3,1$
	plastes	10	$56,3 \pm 0,8$	$24,9 \pm 3,9$	$25,4 \pm 1,0$
	sans chloroplastes	8	$15,9 \pm 3,2$	$1,4 \pm 1,2$	$5,5 \pm 2,9$
	plastes	10	$26,9 \pm 4,3$	$0,9 \pm 0,3$	$11,6 \pm 2,9$
	avec chloroplastes	8	$20,4 \pm 3,2$	$0,4 \pm 0,1$	$15,9 \pm 1,9$
	plastes	10	$30,5 \pm 3,9$	$4,8 \pm 3,6$	$10,6 \pm 1,0$
Anneau	sans chloroplaste	8	$10,4 \pm 2,6$	0	$9,2 \pm 0,5$
	plaste	10	$20,8 \pm 2,3$	$2,4 \pm 1,6$	$10,8 \pm 1,4$

Tableau X V : Effet de la nature des protoplastes sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules qui en dérivent.



3.4 Effet de la purification de la suspension de protoplastes du culot.

Les protoplastes de C.i. présentent une sensibilité importante vis à vis des concentrations élevées de saccharose (SAKSI, 1985). Pour cette étude, nous avons voulu vérifier, si la concentration de saccharose (12,5%) utilisée au cours de la purification n'influe pas sur le comportement des protoplastes ultérieurement mis en culture.

Après purification des protoplastes du "culot" sur un coussin de saccharose à 12,5% et lavage avec une solution saline, les protoplastes sont cultivés dans le milieu Mcl.

Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions en utilisant le culot de protoplastes après 3 lavages par centrifugation dans le milieu Po (sans purification préalable sur un coussin de saccharose).

Quand les protoplastes sont purifiés sur un coussin de saccharose les divisions cellulaires au septième jour sont légèrement améliorées. Un séjour plus long en phase 1 (11 jours) montre un état nécrotique (jaunissement du milieu) moins intense par rapport au culot non purifié. Ceci proviendrait sans doute de la quantité importante de débris cellulaires recueillie dans ce dernier cas.

Pour la suite de nos expériences nous avons donc adopté l'utilisation du coussin de saccharose à 12,5% suivi d'un lavage dans une solution saline.

3.5 Effet de l'âge des cultures et de la nature des feuilles donatrices.

Nous avons vu précédemment (1.2) que le rendement en protoplastes vivants à l'issue de la macération des feuilles dans la solution enzymatique dépend de l'âge des plantules et de la nature des feuilles.

Nous allons maintenant étudier le comportement des différentes catégories de feuilles au cours de la première phase de culture.

Pour cela, nous avons utilisé des feuilles cotylédonaire et les premières paires de feuilles prélevées sur un même lot de plantules repiquées depuis 15, 21 et 28 jours.

Les deuxièmes paires de feuilles prélevées 15 et 21 jours, après le repiquage du collet des plantules dont la première paire de feuilles a été utilisée à 21 jours, ont été également utilisées ainsi que les cotylédons prélevés sur des akènes mis en germination depuis 7, 11 et 15 jours.

Pour les protoplastes issus des feuilles provenant des plantules âgées de 15 jours après le repiquage dans le tube (Tableau XVI), il apparaît que le pourcentage de viabilité des cellules (78%) et le pourcentage de divisions cellulaires (62,2%) sont les meilleurs, avec un pourcentage très faible de cellules qui bourgeonnent (9,7%).

Cependant avec les feuilles cotylédonaire provenant des mêmes plantules, la viabilité est plus faible (52%) et les divisions diminuent de moitié (30%). Un résultat semblable est obtenu avec les feuilles provenant des plantules dont le collet a été repiqué.

La mise en culture de protoplastes provenant des cotylédons âgés de 7, 11 et 15 jours après l'ensemencement des akènes permet une augmentation remarquable du taux de viabilité et des divisions des protoplastes cotylédonaire. Ce pourcentage est nettement meilleur quand les cotylédons sont âgés de 11 jours.

Origine des protoplastes :		Viabilité :	Divisions	
Nature des feuilles :	Age des cultures (jours) :	(%) :	mitose (%) :	bourgeonnement (%) :
Cotylédons	7 (a)	74,6 ± 3,8	42,0 ± 1,3	7,1 ± 0,8
	11 (a)	77,6 ± 1,7	57,7 ± 1,3	5,4 ± 1,2
	15 (a)	59 ± 1,5	33,8 ± 3,3	14,1 ± 1,1
Feuilles cotylédonaire	15 (b)	52 ± 2,9	30,3 ± 4,3	10,2 ± 1,5
	21 (b)	38,5 ± 0,9	20,0 ± 2,2	10,6 ± 1,8
	28 (b)	26,2 ± 1,9	14,9 ± 2,3	9,2 ± 1,5
1ère paire de feuilles	15 (b)	78 ± 2,0	62,2 ± 2,7	9,7 ± 1,3
	21 (b)	62,1 ± 2,8	40,9 ± 4,0	18,5 ± 2,6
	28 (b)	41,6 ± 0,7	20,2 ± 4,2	15,9 ± 3,0
2ème paire de feuilles	25 (c)	57,8 ± 2,1	30,0 ± 1,7	25,2 ± 1,5
	21 (c)	40,2 ± 2,4	20,4 ± 0,3	17,8 ± 1,1

Tableau XVI : Effet de l'origine des protoplastes sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour des cellules qui en dérivent).

- (a) à partir de l'ensemencement des akènes.
 (b) à partir du transfert des germinations en tube.
 (c) à partir du transfert du collet des plantules de 21 jours dont la première paire de feuilles et les racines ont été coupées.

3.6 Effet de la concentration des substances de croissance dans le milieu Mcl

La présence des hormones (notamment l'ANA) dans le milieu de germination des plantules ou dans le milieu de macération améliore le rendement en protoplastes viables (1-3-1).

Par ailleurs des observations nous ont permis de constater une légère augmentation de la viabilité des cellules dérivées de protoplastes dont la macération est réalisée en présence d'ANA.

Les effets des régulateurs de croissance sur la viabilité et les divisions des cellules dérivées des protoplastes ont donc été étudiées dans la première phase de culture.

3.6.1 Influence de la concentration en ANA.

Les protoplastes sont cultivés dans des milieux Mcl de composition identique mais renfermant des concentrations différentes en ANA (0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 et 10 mg.l⁻¹). La BAP est maintenue à 1mg.l⁻¹.

A une concentration de 0,5 mg par litre de milieu, seulement 13,6% de cellules sont vivantes après 2 jours de culture (tableau XVII). A cette concentration nous n'avons pas observé des divisions par mitose mais quelques cellules bourgeonnent, avec un brunissement qui apparaît très vite dans le cytoplasme.

De même un excès en ANA (10 mg.l⁻¹) diminue la viabilité. Dans ce cas 20% des protoplastes ensemencés commencent à se diviser 3 jours après la mise en culture puis une nécrose apparaît très rapidement et le nombre des cellules divisées diminue (13,3%) après 7 jours de culture.

La dose optimale en ANA semble être celle apportée à une concentration de 7,5 mg.l⁻¹; les cellules sont en bon état et se divisent plus rapidement. Environ 40% des cellules se divisent au moins une fois au troisième jour (ce pourcentage est nettement supérieur à celui des cellules qui émettent des bourgeons et ne semblent pas donner des microcals). Au septième jour, environ 70% des protoplastes mis en culture se sont divisés et beaucoup de microcals comportent 4 cellules ou plus.

Remarque :

Si on considère le pourcentage de minicals formés à l'issue de la deuxième phase de culture, on remarque que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le milieu de culture renferme un peu moins

d'ANA : 5 mg.l semble être la meilleure valeur.

ANA (mg.l ⁻¹)	Viabilité (%)	Divisions					
		mitose (%)			bourgeonnement (%)		
		3j	5j	7j	3j	5j	7j
0,5	13,6 ± 2,6	0	0	0	7,0±0,9	1,6 ±0,8	1,4 ±0,6
1	60,7 ± 7,5	10,1±2,7	26,1±4,2	31,5±2,6	18,3±1,3	17,0 ±2,2	15,3 ±1,3
2,5	69,6 ± 6,1	28,1±4,8	46,6±3,7	57,1±2,3	11,9±1,0	9,9 ±2,0	7,5 ±3,2
5	74,4 ± 3,9	32,2±2,8	47,8±1,3	63,2±8,2	6,5±1,8	6,5 ±1,6	8,4 ±1,2
7,5	78,4 ± 2,8	39,3±2,1	51,3±4,7	71,6±4,0	5,3 ±0,6	4,5 ±0,6	4,2 ±0,4
10	23,5 ± 1,2	20,1±1,2	16,7±1,6	13,3±1,8	3,6 ±0,6	3,8 ±0,3	3,4 ±0,3

Tableau XVII : Effet de la concentration en ANA dans le milieu de culture (Mcl) sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 3ème, 5ème et 7ème jours) des cellules dérivées des protoplastes.
La concentration en BAP est de 1 mg.l⁻¹.



3.6.2 Influence de la concentration en BAP

Nous avons choisi quatre concentrations de BAP : 1 mg.l⁻¹ (qui est celle de la cytokinine dans le milieu de culture Mcl), 0,5, 2,5 et 5 mg.l⁻¹. L'ANA a été ajouté à ces milieux soit à 1 mg.l⁻¹ (concentration dans le milieu Mcl) soit à 5 mg.l⁻¹ (concentration donnant les meilleurs résultats pour la production de minicals à l'issue de la phase 2 de la culture).

On retrouve dans cette expérience l'effet favorable de l'augmentation de la concentration de l'ANA de 1 à 5 mg.l⁻¹ (Tableau XVIII). Ce tableau fait clairement apparaître qu'une modification de la concentration en BAP par rapport à celle du milieu Mcl n'apporte pas d'amélioration : une concentration plus faible (0,5 mg.l⁻¹) ou plus élevée (2,5 ou 5 mg.l⁻¹) que la dose habituelle n'est pas favorable car le pourcentage de cellules vivantes ou divisées par mitose diminue tandis que le pourcentage de cellules qui bourgeonnent augmente.

Ces expériences montrent que les teneurs en ANA et en BAP dans le milieu jouent un rôle important sur le mode de division des cellules et sur la fréquence de divisions. C'est en présence de 5 mg.l⁻¹ d'ANA plus 1 mg.l⁻¹ de BAP que l'on observe les meilleurs résultats : plus de 50% de cellules en division au septième jour, la plupart d'entre elles ayant déjà engendré des microcals comportant quatre cellules ou plus.

BAP mg.l ⁻¹	ANA mg.l ⁻¹	Viabilité (%)	Divisions					
			mitose (%)			bourgeonnement (%)		
			3j	5j	7j	3j	5j	7j
0,5	1	17,3 ±2,0	6,5±1,0	3,1±1,2	3,4±0,3	8,0±1,6	7,5 ±0,3	4,3 ±1,6
	5	24,7 ±3,9	8,6±1,1	9,9±1,5	12,6±3,0	14,5±3,0	9,9 ±1,2	10,1 ±0,7
1	1	60,2 ±5,5	13 ±1,8	20,5±3,2	31,2±2,0	11,2±2,2	21,1 ±3,9	23,9 ±3,5
	5	71,5 ±2,5	30,6±2,9	45,4±7,3	60 ±4,6	9,1±1,3	10,3 ±0,6	8,3 ±0,3
2,5	1	50,7 ±1,7	17,8±4,3	22,8±2,8	30,7±4,2	9,9 ±1,1	10,8 ±1,2	10,5 ±0,9
	5	54,1 ±2,9	12,9±1,7	25,2±3,3	41,6±4,5	8,9 ±1,2	10,4 ±1,8	10,3 ±0,9
5	1	41,5 ±1,8	15,3±1,7	22,3±1,7	29,0±3,3	8,9±1,9	9,4 ±1,7	10,8 ±1,8
	5	28,0 ±2,9	7,1 ±0,8	9,0±1,1	11,8±1,5	6,1±1,1	7,7 ±1,7	8,4 ±1,3

Tableau XVIII : Effet de la concentration en BAP et en ANA dans le milieu de culture (Mcl) sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 3ème, 5ème et 7ème jours) des cellules dérivées des protoplastes.

3.6.3 Action de la nature de la cytokinine

Les modifications de la concentration de la BAP n'ayant pas permis d'augmenter le pourcentage de cellules en division, nous avons recherché si une autre cytokinine ne serait pas plus favorable.

Dans le milieu M1, les différentes cytokinines (Zéatine, 2iP, Kinétine) sont incorporées à une concentration identique à celle de la BAP (1 mg.l⁻¹), la concentration en ANA étant maintenue à 5 mg.l⁻¹.

Cytokinine 1 mg.l ⁻¹	Viabilité (%)	Divisions	
		mitose (%)	bourgeonnement (%)
BAP	76,1 ± 2,3	68,1 ± 2,7	5,6 ± 1,1
Kinétine	67 ± 3,4	34,1 ± 2,9	27 ± 3,2
Zéatine	73,3 ± 3,4	63,4 ± 2,0	8,4 ± 1,7
2iP	73,8 ± 3,4	48,4 ± 2,6	14,9 ± 3,4

Tableau XIX : Effet de la nature de la cytokinine dans le milieu de culture (M1) sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules dérivées des protoplastes.
La concentration en ANA est de 5mg.l⁻¹.

Les résultats (Tableau XIX) montrent que les divisions cellulaires dépendent de la nature de la cytokinine utilisée. Avec la kinétine et la 2iP un faible pourcentage de cellules se divisent par mitose et beaucoup de cellules émettent des bourgeons (notamment en présence de la kinétine) qui finissent par

dégénérer.

La zéatine permet d'augmenter le taux de divisions par mitose et de réduire le bourgeonnement, mais elle n'est pas plus favorable que le BAP; compte tenu du coût beaucoup plus élevé de la zéatine, nous continuerons donc à utiliser la BAP.

3.7 Effet de la nature du protecteur osmotique

Les résultats expérimentaux établis lors de la phase de macération montrent que l'utilisation du sorbitol au lieu du mannitol permet d'obtenir un rendement plus important en protoplastes vivants.

Le but de cette manipulation est de vérifier si l'apport du sorbitol au lieu du mannitol influe sur la viabilité et les divisions cellulaires au cours de la première phase de la culture.

Le même protocole expérimental est repris, la pression osmotique est donc assurée avec le mannitol à 8%, le sorbitol à 8% ou les deux (mannitol 4% + sorbitol 4%).

Cette étude est réalisée dans un milieu de culture Mcl où l'équilibre hormonal est de 5 mg.l^{-1} d'ANA et de 1 mg.l^{-1} de BAP.

Protecteur osmotique	Viabilité (%)	Divisions					
		mitose (%)			bourgeonnement (%)		
		3j	5j	7j	3j	5j	7j
Mannitol 0,44	70,7 ± 5,5	31,9 ± 1,5	44,6 ± 3,5	62,0 ± 1,8	9,1 ± 1,8	10,9 ± 0,6	7,2 ± 2,3
Mannitol 0,22M + Sorbitol 0,22M	78,9 ± 1,1	40,1 ± 4,7	50,2 ± 2,9	66,2 ± 3,6	13,3 ± 2,3	10,0 ± 1,8	8,0 ± 1,5
Sorbitol 0,44M	83,8 ± 1,5	42,0 ± 2,9	61,5 ± 1,5	75,2 ± 2,6	4,3 ± 0,9	6,3 ± 0,6	6,3 ± 1,3

Tableau XX : Effet de la nature du protecteur osmotique dans le milieu de culture (Mcl) sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 3ème, 5ème et 7ème jours) des cellules dérivées des protoplastes.

L'équilibre hormonal est de 5 mg.l^{-1} d'ANA et 1 mg.l^{-1} de BAP.

En utilisant un mélange de mannitol et de sorbitol à la place du mannitol seul, le pourcentage de cellules vivantes est plus important ainsi que celui de divisions par mitose (Tableau XX).

Avec le sorbitol on obtient jusqu'à 83,8% de cellules vivantes et 75,2% de divisions cellulaires par mitose.

Le pourcentage de cellules qui émettent des bourgeons reste faible dans tous les cas.

Bien que nous ne puissions affirmer que le milieu Mcl avec un équilibre hormonal de 5 mg.l⁻¹ d'ANA et de 1 mg.l de BAF, en présence du sorbitol à 8% soit optimal c'est ce milieu que nous retiendrons pour la suite du travail.

3.8 Influence des conditions de culture.

3.8.1 Facteurs d'environnement.

Notre étude portera sur les effets de l'éclairage et de la température

- 1) pendant la culture des plantules donatrices
- 2) au cours de la première phase de culture des protoplastes

*** Variation des différents facteurs au cours du développement des plantules**

Les protoplastes issus des feuilles dont le développement des plantules a eu lieu à différentes températures, photopériodes et intensités de l'éclairage (1.3.2) ont été mis en culture afin d'analyser l'effet de ces facteurs sur la viabilité et la division des cellules.

Pour des plantules cultivées sous une photopériode de 16:8 et une température de 24:22°C le pourcentage de cellules divisées par mitose est d'autant plus fort que l'intensité de l'éclairage durant le développement des plantules est élevée (Tableau XXI).

Une intensité de l'éclairage de 4000 lux semble la plus appropriée à la culture des plantules : pourcentage de mitoses élevé (79,1%) et bourgeonnement presque nul (1%). Par ailleurs une intensité de l'éclairage de 250 lux donne un taux de division beaucoup plus réduit.

En faisant varier la photopériode et/ou la température, les cellules se divisent moins rapidement avec un taux de survie moins important. En éclairage périodique (12:12) de nombreuses cellules présentent

des déformations du cytoplasme au septième jour de la culture, elles pourraient indiquer la régénération de la paroi. Par contre en lumière continue les protoplastes restent parfaitement sphériques.

On remarque que les facteurs physiques étudiés au cours du développement des plantules influent de la même manière sur le rendement des protoplastes au cours de la macération (1.3.2) et sur leur viabilité et la division des cellules au cours de la première phase de culture.

Cependant des essais de mise en culture des protoplastes isolés à partir des plantules ayant subi un prétraitement (1.1.5) donnent des résultats de survie et de divisions cellulaires sensiblement identiques à ceux observés lorsque les plantules ne sont pas soumises au traitement. Dans ce cas nous retiendrons principalement le rendement important obtenu après un traitement à 4°C pendant 15 heures.

Conditions expérimentales			Viabilité	Divisions	
Photopériode	Température	Intensité de l'éclairement	(%)	mitose (%)	bourgeonnement (%)
		250 lux	67,5 ± 3,7	27,6 ± 2,8	10,2 ± 2,8
16 - $\bar{8}$	24 - $\bar{22}^{\circ}\text{C}$	2000 lux	81,0 ± 3,2	71 ± 1,2	6,1 ± 0,4
		4000 lux	85,8 ± 3,6	79,1 ± 1,4	1,0 ± 0,2
12 - $\bar{12}$	24 - $\bar{22}^{\circ}\text{C}$	2000 lux	77,4 ± 2,4	36,2 ± 3,0	12,6 ± 2,4
24 - $\bar{0}$	$\bar{25}^{\circ}\text{C}$	2000 lux	76,7 ± 4,6	29,7 ± 1,0	8,8 ± 1,9
24 - $\bar{0}$	$\bar{28}^{\circ}\text{C}$	2000 lux	77,2 ± 5,8	32,3 ± 3,4	10,6 ± 1,7

Tableau XXI : Effet de la photopériode, de la température et de l'intensité de l'éclairement au cours du développement des plantules sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules dérivées des protoplastes.

* Variation des différents facteurs au cours de la première phase de culture

- Influence d'un choc thermique

Le traitement préalable des plantules à basse température avant l'isolement des protoplastes n'étant pas efficace sur les divisions cellulaires, nous avons donc procédé à un traitement des protoplastes après la mise en culture.

Pour cela une série de boîtes est d'abord mise à 4°C (Tableau XXII) puis transférée à 26°C alors qu'une autre série est laissée dans les conditions habituelles (26°C) pendant toute la durée de la première phase (7 jours).

Traitement à 4°C	Viabilité (%)	Divisions	
		mitose (%)	bourgeonnement (%)
0	79,7 ± 4,9	66,6 ± 3,7	8,4 ± 1,7
1 nuit	78,8 ± 4,2	71,2 ± 3,7	6,5 ± 2,9
4 jours	41,4 ± 2,6	11,1 ± 1,4	22,8 ± 3,6

Tableau XXII : Effet du traitement à 4°C des cultures de la première phase sur la viabilité (au 4ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules dérivées des protoplastes.

Un traitement au froid favorise légèrement les divisions par mitose (71,2% au lieu de 66,6%). Mais la viabilité cellulaire ne semble pas être modifiée.

Un passage à 4°C pendant 4 jours entraîne par contre la mort d'environ 60% de protoplastes ensemencés. Le pourcentage de divisions par mitose diminue très rapidement et la plupart des cellules bourgeonnent : elles émettent un ou plusieurs renfle-

ments donnant naissance à des structures en chaînettes qui dégénèrent rapidement.

- Influence de la période d'éclairement.

Toutes les boîtes ensemencées sont placées dans une chambre climatique à 26°C. Un premier lot est éclairé (250 lux, 24:0), un second lot est maintenu à l'obscurité pendant sept jours, un troisième lot est laissé à l'obscurité pendant deux jours puis transféré à la lumière et reçoit le même éclairement que le premier.

Les meilleures conditions de survie et de division des cellules sont celles où la période d'obscurité est la plus longue (Tableau XXIII).

Pour une période d'éclairement de 7 jours, le taux de divisions cellulaires diminue, un jaunissement apparaît dès le troisième jour de culture. Le pourcentage de cellules mortes augmente alors pour atteindre plus de 70% après le septième jour de culture. Tandis qu'une période d'obscurité de deux jours permet de retarder nettement la nécrose des cellules et d'augmenter le taux de division par mitose.

Durée d'obscurité (jours)	Viabilité (%)	Divisions	
		mitose (%)	bourgeonnement (%)
0	29,1 ± 2,9	13,6 ± 1,6	9,9 ± 1,2
2	55,1 ± 2,9	41,1 ± 2,9	9,5 ± 1,8
7	74,2 ± 3,9	69,2 ± 3,6	3,2 ± 1,8

Tableau XXIII : Effet de la durée de l'obscurité au cours de la première phase de culture sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules dérivées des protoplastes.

- Influence de la température

Les boîtes ensemencées sont soumises à différentes températures pendant 7 jours à l'obscurité.

Température (°C)	Viabilité (%)	Divisions		
		mitose (%)		bourgeonnement (%)
		3 jours	7 jours	7 jours
15 ± 1	-	0	0	0
22 ± 1	57,9 ± 4,3	0	10,2 ± 2,2	18,2 ± 2,2
25 ± 1	77,1 ± 2,0	51,2 ± 1,3	70,8 ± 1,8	5,0 ± 1,2
30 ± 1	84,1 ± 5,6	59,0 ± 6,3	79,9 ± 3,3	2,1 ± 0,6

Tableau XXIV : Effet de la variation de la température au cours de la première phase de culture sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 3ème et au 7ème jours) des cellules dérivées des protoplastes.

Les résultats (Tableau XXIV) montrent qu'une température de 15°C n'est pas adaptée à la culture des protoplastes de *C. i.*. L'observation régulière des cultures pendant les sept premiers jours n'a pas permis de constater des divisions cellulaires. Les protoplastes se rassemblent et dans la plupart des cas forment de nombreux amas de plusieurs cellules. De plus ces agglutinations rendent les comptages très difficiles et non fiables et la détermination des pourcentages impossible.

Si les cultures sont soumises à une température de 22°C les divisions cellulaires ne commencent à apparaître qu'après cinq à six jours. Alors qu'à 30°C trois jours suffisent pour que 60% environ de cellules

se divisent par mitose. On remarque également que dans ce cas le pourcentage de cellules qui bourgeonnent est très faible.

3.8.2 Méthodes de culture.

* Influence des échanges gazeux.

Pour cette expérience une série de boîtes est scellée avec du parafilm. Un autre lot non scellé est placé dans des bocaux préalablement stérilisés. Les bocaux contenant les boîtes ouvertes sont alors scellés avec un ruban de parafilm et placés dans les mêmes conditions expérimentales que les précédentes. Cet essai est réalisé à l'obscurité à 30°C et 22°C.

Conditionnement des cultures	Température (°C)	Viabilité (%)	Divisions	
			mitose (%)	bourgeonnement (%)
Boîtes de Pétri scellées avec du parafilm	30 ± 1	78 ± 4,0	70,3 ± 2,4	5,2 ± 0,8
	22 ± 1	54,3 ± 4,8	16,2 ± 3,0	26,1 ± 3,3
Boîtes de Pétri placées dans des bocaux	30 ± 1	40,5 ± 3,1	30,8 ± 5,1	4,2 ± 1,5
scellés avec du parafilm	22 ± 1	41,2 ± 3,4	12,6 ± 1,8	32,2 ± 2,9

Tableau XXV : Effet des échanges gazeux (à 30 et à 22°C) au cours de la première phase de culture sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules dérivées des protoplastes.

On remarque (Tableau XXV) que la viabilité et les divisions des cellules par mitose sont plus importantes quand les cultures sont réalisées dans des boîtes scellées avec du parafilm et que les différences sont plus nettes à 30°C. Il est possible que dans ces conditions l'évaporation du milieu soit plus importante et donc la pression osmotique dans le milieu augmente progressivement.

Lorsque la température est plus faible la viabilité des cellules diminue et on constate qu'un plus grand pourcentage de cellules bourgeonnent dans les deux cas.

*** Influence du volume des cultures et du type de boîtes de Pétri.**

Nous avons utilisé deux types de boîtes de Pétri en matière plastique d'un diamètre de 55 mm.

Dans les boîtes de culture "polystyrène cristal" il n'est pas possible de répartir de façon uniforme dans le fond de la boîte moins de 2,5 ml de milieu de culture.

Par contre dans les boîtes de culture "LUXLON" la tension superficielle est différente et on peut facilement étaler un volume de milieu de culture ne dépassant pas 1,5 ml.

Volume des cultures et Nature du plastique		Viabilité (%)	Divisions	
			mitose (%)	bourgeonnement (%)
1,5	P	-	-	-
	L	90,1 ± 1,2	82,0 ± 2,9	2,0 ± 1,1
2,5	P	73,5 ± 4,8	65,1 ± 4,1	4,2 ± 1,1
	L	79,5 ± 2,0	69,2 ± 1,7	2,5 ± 0,8
3,5	P	40,1 ± 6,3	41,2 ± 4,4	3,1 ± 0,5
	L	47,2 ± 2,5	38,3 ± 2,6	6,4 ± 0,8
4,5	P	35,6 ± 3,4	28,7 ± 1,6	4,3 ± 1,4
	L	-	-	-

Tableau XXVI : Effet du volume mis en culture et de la nature du plastique constituant les boîtes de Pétri sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules dérivées des protoplastes.

P : Boîtes de culture "Polystyrène cristal"
 L : Boîtes de culture "LUXLON"
 (-) : Culture non réalisée.

Les résultats (Tableau XXVI) montrent qu'indépendamment de la nature du plastique constituant les boîtes de Pétri la viabilité et les divisions cellulaires sont d'autant plus importantes que le volume mis en culture est faible. Si en utilisant les boîtes de culture "LUXLON" on n'observe pas d'amélioration, par contre ces conditions permettent la mise en culture d'un volume beaucoup moins important. Dans ce cas le pourcentage de cellules vivantes atteint jusqu'à 90%. Cette diminution de la mortalité peut éviter l'apparition de produits phénoliques et favoriser le maintien du bon état des cellules entrant en divisions.

3.9 Amélioration du rendement de la première phase de culture : bilan.

Au terme de cette première partie de notre travail, il nous a semblé utile de faire une expérience où tous les paramètres étudiés sont portés à leur optimum, les résultats doivent nous permettre d'apprécier les améliorations apportées à la culture des protoplastes de C.i.

SAKSI et ses collaborateurs (1986) ont montré que la concentration en saccharose joue un rôle important au cours de la phase initiale de culture. Afin de vérifier au préalable les effets de ce facteur dans les conditions que nous avons mises au point, nous avons réalisé l'expérience avec trois milieux renfermant respectivement: 1,25; 2,5 et 5 g.l⁻¹

Saccharose (g.l ⁻¹)	Viabilité (%)	Divisions	
		mitose (%)	bourgeonnement (%)
1,25	75,8 ± 3,0	65,9 ± 3,3	7,7 ± 1,8
2,5	89,1 ± 3,3	83,4 ± 1,4	1,4 ± 0,6
5	76,1 ± 2,3	68,1 ± 2,7	5,6 ± 1,1

Tableau XXVII : Effet de la concentration en saccharose dans le milieu Mcl sur la viabilité (au 2ème jour) et les divisions (au 7ème jour) des cellules.
L'équilibre hormonal est de 5 mg.l⁻¹ d'ANA et 1 mg.l⁻¹ de BAP ; le protecteur osmotique est le sorbitol à 8 %.

A une concentration de $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ de saccharose, le pourcentage de division par mitose est supérieur à celui observé lors de l'utilisation d'une concentration deux fois plus importante ou deux fois plus faible (Tableau XXVII). Cependant la viabilité cellulaire au deuxième jour de culture est très peu affectée avec une légère amélioration à $2,5 \text{ g.l}^{-1}$.

Par ailleurs des observations des cultures en phase 1 au delà du dixième jour montrent un brunissement de l'ensemble des cellules divisées ou non et un jaunissement du milieu Mcl. Ceci est d'autant plus important que la concentration est plus élevée. Une concentration de $1,25 \text{ g.l}^{-1}$ permet de retarder nettement cette nécrose.

A partir de l'ensemble des résultats expérimentaux rapportés jusqu'ici :

- culture des plantules
- préparation et purification des protoplastes
- division des cellules qui en sont issues

et en reprenant les conditions optimales pour chaque paramètre, nous avons réalisé des cultures dont les protocoles sont présentés dans le tableau XXVIII.

	Tissus donneurs	Prétraitement des plantules	Macération	Purification	Culture (phase 1)
AGE	: lère paire de : feuilles 15 j. : après le repi- : quage des akè- : nes germés : dans les tubes	:	:	:	:
MILIEUX	: (Cf. Matériel : et Méthodes)	:	: Po avec : Sorbitol 8% : (au lieu du : mannitol 8% : + : ANA : 1 mg.l^{-1} : BAP : 1 mg.l^{-1} : + : Caylase-345 : : 10 mg/ml : + : Caylase-M2 : : 0,5 mg/ml	: a) Coussin de : saccharose : Po avec : saccharose : 12,5 % : (au lieu du : mannitol 8%) : b) Solution : saline : Po avec KCl : et CaCl : (au lieu du : mannitol 8%)	: Mcl : Sorbitol 8% : (au lieu de : mannitol 8%) : ANA : 5 mg.l^{-1} : BAP : 1 mg.l^{-1} : Saccharose : : $2,5 \text{ g.l}^{-1}$
CONDITIONS	: (16-8, 24:22°C : 4000 lux)	: Obscurité : pendant 15 h : à 4°C	: Obscurité : pendant 5 h : à 30°C	: a) (100g, 20mn) : b) (100g, 10mn)	: 1,5 ml de la : suspension de : protoplastes : Boîte de : culture : "LUXLON" : 7 jours : d'obscurité : 1 nuit à 4°C : puis à 30°C

Tableau XXVIII : Conditions optimales de milieu et d'environnement de préparation et de culture des protoplastes foliaires de C.i.

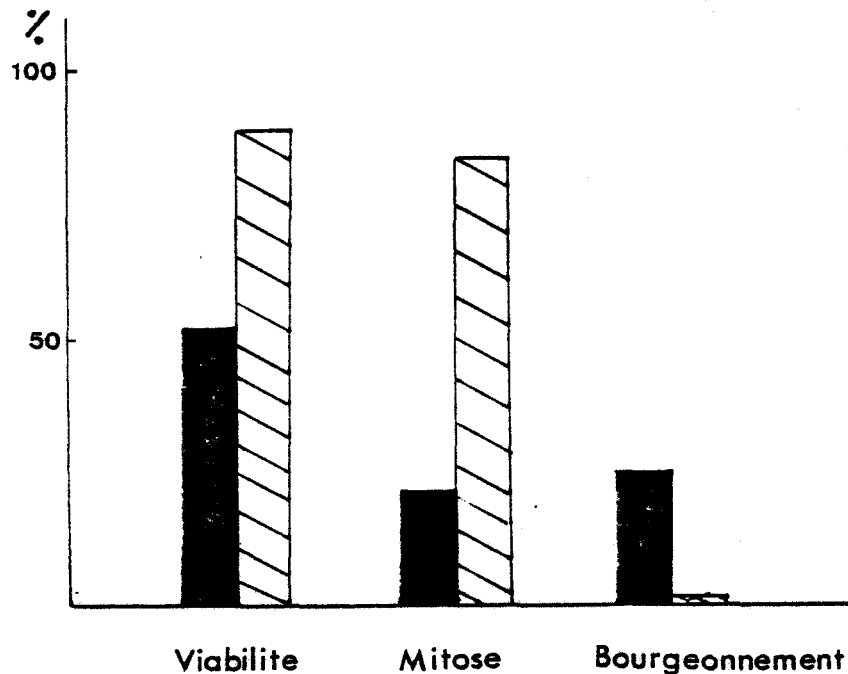


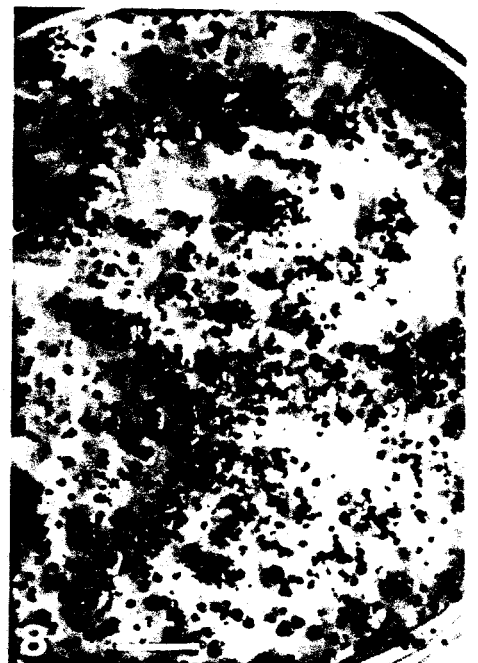
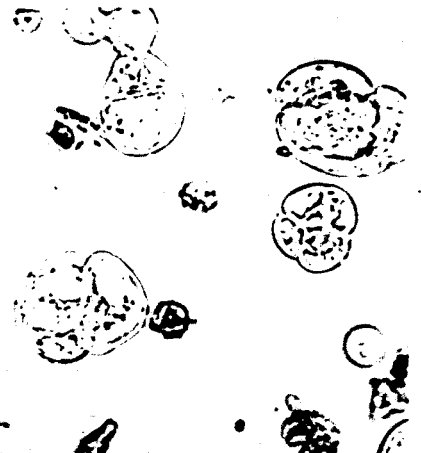
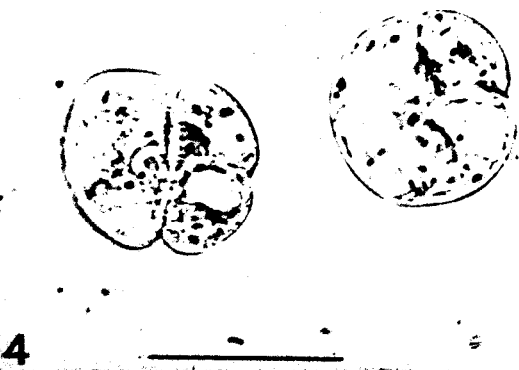
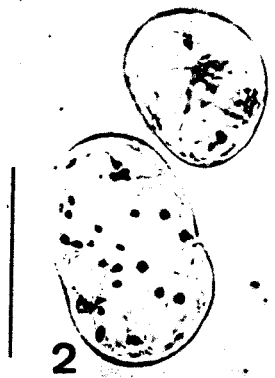
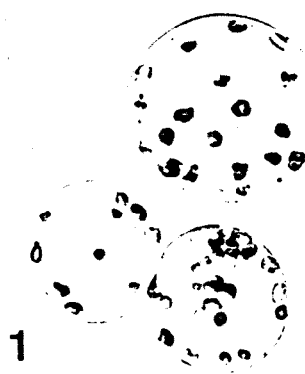
Figure 7 : Evaluation (en % par rapport aux protoplastes mis en culture) de la viabilité des protoplastes au deuxième jour et des divisions par mitose et par bourgeoisement au septième jour de culture.



■ Conditions initiales
 ▨ Conditions optimales

Dans ces conditions les cellules se divisent très rapidement. Les premières mitoses apparaissent dès le deuxième jour de culture (Planche II, Photo 1). Environ 50% de cellules se divisent au moins une fois au cinquième jour et beaucoup de microcals comportent 4 cellules ou plus (Planche II, Photo 4, 5). Au septième jour 80% de protoplastes mis en culture se sont divisés, la plupart des microcals formés comportent 8 à 12 cellules (Planche II, Photo 6, 7).

En comparant avec les conditions initiales (Figure 7), on s'aperçoit que le pourcentage de protoplastes vivants au deuxième jour de culture est multiplié par 1,4. Le pourcentage de cellules divisées par mitose au septième jour est multiplié par 4, simultanément le pourcentage de cellules qui bourgeoisent est 17 fois plus faible.



4 FACTEURS CONTROLANT L'OBTENTION DES MINICALS

Nous nous sommes proposés d'étudier dans cette partie, le devenir des cellules divisées au cours de la première phase de culture, de manière à analyser les effets des différents facteurs étudiés sur la croissance des minicals.

Parallèlement nous avons essayé d'améliorer le milieu et l'environnement des cultures au cours de la seconde phase.

Le rendement en minicals sera déterminé en valeurs relatives (%) par rapport aux protoplastes mis en culture et/ou par rapport aux cellules divisées au septième jour (fin de la première phase).

4.1 Influence de l'origine des protoplastes et de la dilution du milieu Mc1.

Les protoplastes provenant de différentes origines (cotylédons, feuilles cotylédonaires, première et deuxième paires de feuilles; Fig.3) sont transférés après 7 jours de culture en prélevant une partie aliquote de 1 ml que l'on étale à la surface du milieu Mc2.

D'autre part afin d'essayer d'éviter la détérioration des microcals par les produits phénoliques libérés par les cellules nécrosées dans le milieu Mc1, nous avons procédé à une dilution de ce milieu, avant transfert.

Cette dilution est réalisée avec un milieu qui ne diffère du milieu Mc1 que par la concentration du mannitol réduite de moitié (40 g.l^{-1} au lieu de 80 g.l^{-1}), un volume de ce milieu étant ajouté à un égal volume du milieu renfermant les protoplastes, au septième jour de culture.

Pour les feuilles cotylédonaires et la première paire de feuilles prélevées sur des plantules âgées de 15, 21 et 28 jours depuis le repiquage des akènes germés, le rendement en minicals est d'autant plus élevé que les plantules utilisées sont plus jeunes. Le meilleur résultat (1,9%) est observé avec les premières paires de feuilles de 15 jours.

On remarque cependant que les cotylédons issus directement des semences, ne sont favorables qu'après 11 jours de germination. Des cotylédons très jeunes ou âgés montrent un pourcentage plus faible en minicals.

L'effet bénéfique des plantules jeunes est observé également au niveau du collet repiqué (Tableau

XXIX) : le pourcentage augmente quand les secondes paires de feuilles utilisées sont prélevées sur des plantules 15 jours après le repiquage du collet. On note également que ce pourcentage est supérieur à celui obtenu avec la première paire de feuilles prélevées sur des plantules, 28 jours après le repiquage des akènes germés dans les tubes.

Mises à part les différences de pourcentage de minicals entre les feuilles de différente nature, les observations montrent que dans le cas des cotylédons et des feuilles cotylédonaires le diamètre des minicals à la cinquième semaine après transfert varie très peu (4 mm en moyenne). Quant aux minicals dérivés des protoplastes foliaires (1 et 2 paires), ils présentent une hétérogénéité importante au niveau de leur taille (diamètre variant de 1 à 3 mm).

Origine des protoplastes		Rendement en minicals par rapport au nombre de protoplastes vivants mis en culture (%)	
Nature des feuilles	Age des cultures (jours)	Transfert sans dilution de Mcl	Transfert après dilution de Mcl
Cotylédons	7	1,6	1,8
	11	2,3	2
	15	1,3	1,3
Feuilles cotylédonaires	15	0,7	1,2
	21	0,5	0,6
	28	0,3	0
1ère paire de feuilles	15	1,9	1,7
	21	1,3	1,5
	28	0,4	0,5
2ème paire de feuilles	21 + 15	0,9	0,9
	21 + 21	0,4	0,6

Tableau XXIX : Effet de l'origine des protoplastes et de la dilution du milieu de culture (Mcl) sur le rendement en minicals à la fin de la phase 2.

L'âge des "cotylédons" en jours depuis le semis des akènes ; celui des feuilles en jours à partir du repiquage des germinations aseptiques, soit 7 jours après le semis.

La dilution du milieu au septième jour de la culture n'améliore pas le pourcentage de minicals quelle que soit leur origine.

Nous retrouverons donc en phase 2 les différences de comportement entre les protoplastes de différentes origines. En particulier, il apparaît que la nature des premières divisions détermine le devenir des microcals en formation. Un meilleur pourcentage de mitose entraîne toujours un meilleur rendement en minicals et inversement lorsque le pourcentage de cellules se divisant par bourgeonnement augmente, le nombre de minicals diminue très fortement.

4.2 Action de la nature de la gélose dans le milieu Mc2

Les cultures de cellules sont étalées à raison de 1 ml à la surface des milieux Mc2 de même composition mais différant par la nature de la gélose.

Les agents gélifiants suivants sont utilisés:

1. Bacto-Agar (Difco), présent dans le milieu Mc2.

2. Agar Noble (Difco)

3. Agarose Powder (Bio-Rad)

Afin de conserver la même dureté, le Bacto-Agar et l'Agar Noble sont utilisés à 3% tandis qu'une concentration supérieure de 4% est nécessaire dans le cas de l'Agarose Powder.

Parallèlement le transfert est aussi réalisé dans le milieu Mc2 liquide. La culture des cellules est alors diluée cinq fois puis un volume de 4 à 5 ml du mélange est versé dans des boîtes de Pétri.

Agent gélifiant	Rendement en minicals	
	: par rapport au nombre de : : protoplastes vivants mis : : en culture (%)	: par rapport au nombre de : : cellules en division au : : 7ème jour (%)
3 % Bacto-Agar	2,1	2,5
3 % Agar-Noble	3,0	3,6
4 % Agarose-Powder	3,8	4,5
0 (milieu liquide)	0	0

Tableau XXX

: Effet de la nature de la gélose dans le milieu de culture Mc2 sur le rendement en minicals à la fin de la phase 2.

En milieu liquide les cellules divisées ou non jaunissent progressivement; deux semaines après le transfert elles sont toutes nécrosées. Il est probable que dans ces conditions de culture l'oxygénation est insuffisante pour assurer leur survie.

En milieu solide le pourcentage de minicals est d'autant plus élevé que la gélose est pure (Tableau XXX). C'est avec l'Agarose Powder que l'on obtient le meilleur résultat.

4.3 Influence de l'incorporation des cellules dans la gélose

A la fin de la première phase de culture, les cellules sont transférées sur le milieu Mc2 selon deux méthodes :

- Etalement des cultures à la surface du milieu gélosé selon la méthode décrite précédemment

- Incorporation d'un volume de culture dans du milieu Mc2 gélosé : après autoclavage et lorsque la température du milieu Mc2 (contenant 3% de Bacto-Agar) est redescendue de façon à éviter la détérioration des cellules et la solidification du milieu, on ajoute à ce milieu 20% du milieu de culture Mc1 renfermant les cellules. L'ensemble est agité doucement puis un volume de 10 ml est coulé dans les boîtes de Pétri.

Méthode de Transfert	Rendement en minicals	
	par rapport au nombre de protoplastes vivants mis en culture (%)	par rapport au nombre de cellules en division au 7ème jour (%)
Etalement des cellules à la surface du milieu Mc2 gélosé	3,6	4,0
Incorporation des cellules dans le milieu Mc2 gélosé	1,8	2,3

Tableau XXXI : Effet de l'incorporation de protoplastes dans le milieu MC2 gélosé sur le rendement en minicals à la fin de la phase 2.

En comparant avec l'étalement des cultures à la surface du milieu Mc2 gélosé (Tableau XXXI), l'incorporation de ces dernières dans la gélose avant sa solidification diminue le taux de survie des minicals. La croissance est interrompue puis la plupart des minicals ultérieurs brunissent et se nécrosent après un mois.

L'augmentation de la quantité de milieu Mc1 renfermant les cellules (40%) ou la diminution (10%) ne permettent pas d'améliorer le taux de survie ni le développement des minicals.

4.4 Effet de la culture en double couche superposée.

Lors de l'essai précédent, le brunissement des minicals était peut-être dû à leur incorporation dans une couche d'épaisseur trop importante. De plus, le Bacto-Agar pourrait avoir un effet toxique sur les cellules ainsi incorporées. Nous avons donc envisagé l'essai de l'Agar Noble et de l'Agarose Powder, et nous avons incorporé les cellules dans une couche plus mince en réalisant des cultures en double couche superposée.

Une couche inférieure de 10 ml environ constituée du milieu Mc2 gélosé à 6% (Bacto-Agar) est adaptée afin d'éviter le contact des cellules avec le fond de la boîte. Cette couche sert de support à la couche supérieure plus mince (2 à 3 mm), renfermant des milieux Mc2 de même composition mais différant par le type de gélose (Tableau XXXII). C'est dans cette couche que nous incorporons les cellules selon la méthode décrite ci-dessus (4.3).

Cette technique semble peu intervenir sur le rendement malgré une légère augmentation du pourcentage de minicals par rapport à un étalement des cellules à la surface. Dans ces conditions, le pourcentage le plus important est également obtenu avec l'Agarose Powder.

Pour la suite de notre travail et pour des raisons de commodité, nous avons renoncé à l'utilisation de cette technique et préféré un étalement des cultures à la surface du milieu Mc2 gélosé.

Technique de culture	Gélose	Rendement en minicals	
		par rapport au nombre de protoplastes vivants mis en culture (%)	par rapport au nombre de cellules en division au 7ème jour (%)
Culture en une seule couche (étalement des protoplastes à la surface)	3% Bacto-Agar	1,6	2,1
	3% Agar-Noble	2,2	2,8
	4% Agarose-Powder	3,0	4,1
Culture en double couche superposées (incorporation des protoplastes dans la couche supérieure)	3% Bacto-Agar	1,9	2,4
	3% Agar-Noble	2,3	2,8
	4% Agarose-Powder	3,4	4,4

Tableau XXXII : Effet de la technique de culture et du type de la gélose sur le rendement en minicals à la fin de la phase 2.

4.5 Effet de la nature du protecteur osmotique.

Comme en première phase de la culture (3.6) les essais en deuxième phase ont concerné deux protecteurs osmotiques (mannitol et sorbitol) utilisés séparément ou en mélange dans le milieu Mc2 (Tableau XXXIII). Dans les trois conditions expérimentales réalisées, la pression osmotique est la même elle correspond à celle développée par une solution de 60 g.l, soit 0,32M.

Les cultures contenues dans le milieu Mc1 en présence de différents protecteurs osmotiques sont transférées sur des milieux Mc2 renfermant les mêmes protecteurs osmotiques.

Le pourcentage de minicals le plus important est obtenu avec le sorbitol (Tableau XXXIII). L'augmentation du rendement en minicals résulte :

- de la meilleure qualité des divisions initiales et d'un pourcentage plus élevée de microcals en présence du sorbitol dans le milieu Mc1.

- du meilleur développement des microcals au cours de la seconde phase puisque leur pourcentage rapporté au nombre de cellules en division au septième jour est environ 2 fois plus important en présence du sorbitol.

Protecteur osmotique	Rendement en minicals	
	par rapport au nombre de protoplastes vivants mis en culture.	par rapport au nombre de cellules en division au 7ème jour.
Mannitol : 0,32 M	1,8	2,5
Mannitol : 0,16M + Sorbitol : 0,16M	2,3	3,0
Sorbitol : 0,32M	3,2	4,1

Tableau XXXIII : Effet de la nature du protecteur osmotique dans le milieu Mc2 sur le rendement en minicals à la fin de la phase 2.

4.6 Influence de la concentration en substances de croissance sur l'obtention des minicals.

Nous avons montré dans une expérience antérieure (3-7) que le pourcentage de cellules qui se divisent dans le milieu de culture Mc1, dépend de la concentration des substances de croissance. Nous avons voulu vérifier les effets de leur concentration au

cours de la seconde phase de la culture sur l'obtention des minicals.

4.6.1 Action de l'ANA

Les protoplastes obtenus en fin de la phase 1 (3.7.1) dans des milieux Mc1 de composition identique mais dont la concentration en ANA est différente (1, 2,5, 5, 7,5 et 10 mg.l⁻¹) sont étalés à la surface des milieux Mc2 gélosés, renfermant des doses variables d'ANA (Tableau XXXIV) et une concentration de 1 mg.l⁻¹ de BAP.

ANA (mg.l ⁻¹) Milieu de culture Mc1	ANA (mg.l ⁻¹) Milieu de culture Mc2				
	1	2,5	5	7,5	10
1	0,9 %	-	-	-	-
2,5	2,2 %	1,1 %	-	-	-
5	3,6 %	1,9 %	0,9 %	-	-
7,5	2,1 %	1,0 %	0,5 %	0,2 %	-
10	0,3 %	0,2 %	0,1 %	0 %	0 %

Tableau XXXIV : Effet de la concentration en ANA dans les milieux de culture Mc1 et Mc2 sur le rendement en minicals par rapport au nombre de protoplastes vivants mis en culture.
La concentration en BAP est de 1 mg.l⁻¹.

(-) Transfert non réalisé.

Quelles que soient les doses d'ANA contenues dans le milieu de culture préalable Mc1, le pourcentage de minicals obtenu est faible, lorsque les cellules sont transférées sur un milieu Mc2 en présence de concentrations élevées d'ANA

Le rendement est meilleur lorsque les pro-

toplastes sont cultivés d'abord dans un milieu renfermant 5 mg.l^{-1} d'ANA puis sur un milieu en présence d'une concentration réduite de 1 mg.l^{-1} .

Le faible rendement en minicals observé avec les protoplastes provenant d'un milieu Mc1 renfermant de faibles concentrations d'ANA ($1, 2,5 \text{ mg.l}^{-1}$) est peut-être lié au pourcentage moins important de cellules entrant en division (3-4-1). Il convient de remarquer qu'une dose de $7,5 \text{ mg.l}^{-1}$ conduisant au meilleur pourcentage de divisions en phase 1 ne semble pas être favorable pour l'obtention ultérieure de minicals.

Les pourcentages les plus faibles sont obtenus lorsque la concentration en ANA dans le milieu Mc1 est de 10 mg.l^{-1} . Dans ce cas on n'observe pas de minicals quand le transfert est réalisé sur un milieu Mc2 contenant $7,5$ ou 10 mg.l^{-1} d'ANA.

4.6.2 Action de la B.A.P.

La concentration de 1 mg.l^{-1} d'ANA dans le milieu Mc2 ayant conduit au meilleur rendement dans l'expérience précédente, est reprise en l'associant à différentes concentrations de B.A.P..

Les cellules provenant des cultures en milieu Mc1 renfermant des doses variables de BAP ($1, 2,5, 5 \text{ mg.l}^{-1}$) et d'ANA ($1, 5 \text{ mg.l}^{-1}$) sont étalées à la surface des milieux gélosés renfermant 1 mg.l^{-1} d'ANA et différentes concentrations de BAP ($1, 2,5, 5 \text{ mg.l}^{-1}$) selon le tableau XXXV.

Les résultats, (Tableau XXXV) montrent que les conditions qui favorisent l'obtention des minicals dans la deuxième phase de culture sont :

- Une faible concentration en BAP au cours de la phase initiale : 1 ou $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$
- Une forte concentration en ANA au cours de la première phase : 5 mg.l^{-1}
- Une faible concentration en BAP et en ANA (1 mg.l^{-1}) au cours de la phase 2

Milieu de culture Mc1		Milieu de culture Mc2	
BAP (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)	BAP (mg.l ⁻¹)	
		1	2,5 : 5
1	1	0,4 %	-
	5	3 %	-
2,5	1	0,5 %	0,1 %
	5	2,6 %	1,7 %
5	1	0,9 %	0,5 % : 0,2 %
	5	0,3 %	0,1 % : 0 %

Tableau XXXV : Effet de la concentration en substance de croissances dans les milieux de culture Mc1 et Mc2 sur le rendement en minicals par rapport au nombre de protoplastes vivants mis en culture. La concentration en ANA dans le milieu Mc2 est de 1 mg.l⁻¹.

(-) Transfert non réalisé.

4.7 Effet du lavage des cellules et de la densité initiale des cultures transférées.

La nécessité de fortes concentrations en ANA pour les divisions cellulaires en phase 1, et d'une faible dose en phase 2 pour la formation des minicals, nous a incité à effectuer un lavage des protoplastes au septième jour de culture afin d'éliminer l'ANA en excès.

Des cultures de cellules réalisées dans un milieu Mc1 contenant un équilibre hormonal de 5 mg.l⁻¹ d'ANA et de 1mg.l⁻¹ de BAP par litre, sont récupérées dans des tubes (120x10 mm) et centrifugés pendant 5 mn à 100 g. Après décantation du culot, on élimine le milieu de culture que l'on remplace par un milieu de composition identique mais dont la concentration en ANA est plus faible : 1 mg.l⁻¹ au lieu de 5 mg.l⁻¹. On procède ensuite à un dénombrement des cellules, puis on dépose 1 ml de la suspension à la surface d'un milieu gélosé Mc2 en présence d'un équilibre hormonal de 1 mg d'ANA

et de BAP par litre.

Lavage des cellules au 7ème jour	Densité initiale de culture au début de la phase 2	Rendement en minicals	
		par rapport au nom- bre de protoplastes vivants mis en cultu- re (%)	par rapport au nom- bre de cellules en division au 7ème jour (%)
oui	5.000	5,6	9,4
oui	10.000	6,7	11,2
non	18.500	3,5	6,2
oui	20.000	4,4	9
oui	30.000	1,5	2,5

Tableau XXXVI : Effet du lavage des cellules et de la densité initiale des cultures sur le développement des minicals à la fin de la phase 2.

Les résultats (Tableau XXXVI) montrent que la réalisation du lavage n'est favorable que dans le cas où les cellules sont repiquées à une densité assez faible. Le meilleur taux de minicals se situe à une concentration de 10000/ml (Planche II, Photo B).

A très faible densité (5000/ml) le rendement diminue légèrement. Cependant une concentration élevée n'est pas favorable, le rendement est moins important et la presque totalité des minicals demeurent de taille très réduite.

4.8 Influence de la réduction de la concentration en substances de croissance dans le milieu Mc2.

Le lavage s'étant avéré favorable, nous nous

sommes alors proposés d'étudier si des doses en substances de croissance plus faibles dans le milieu de culture Mc2 contribueront à améliorer le rendement en minicals.

Pour cela on étale 1 ml de la suspension cellulaire, préalablement lavée; à une densité de 10000 cellules/ml à la surface des milieux de culture Mc2 différant par leur concentration en régulateurs de croissance (Tableau XXXVII).

BAP (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)		
	0,1	0,5	1
0,1	1,6 %	1 %	0,8 %
0,5	7,1 %	6,6 %	6,3 %
1	6,4 %	5,9 %	6,0 %

Tableau XXXVII : Effet de la concentration en substances de croissance dans le milieu de culture (Mc2) sur le rendement en minicals par rapport au nombre de protoplastes vivants mis en culture.
L'équilibre hormonal dans le milieu de culture (Mc1) est de 5mg.l⁻¹ d'ANA et 1mg.l⁻¹ de BAP.

Les résultats (Tableau XXXVII) montrent qu'une dose 0,1 mg.l⁻¹ de BAP entraîne une diminution importante du rendement en minicals, quelle que soit la dose d'ANA utilisée. Il y a peu de différences entre les résultats obtenus avec 0,5 et 1 mg.l⁻¹ de BAP.

Entre 0,1 et 1 mg.l⁻¹, la concentration en ANA

ne modifie pas sensiblement les rendements en minicals.

C'est en associant l'ANA à 0,1 mg et la BAP à 0,5 mg par litre qu'on observe le meilleur rendement : 7,1%. Les minicals commencent à être visibles deux semaines après le transfert et on note l'apparition de nodules chlorophylliens sur les minicals après six semaines.

D'après ces observations, nous avons donc essayé dans une deuxième expérience d'induire la formation des bourgeons à partir des minicals, en diminuant davantage la concentration en ANA (0,05 mg.l⁻¹). La concentration en BAP étant maintenue à 0,5 mg.l⁻¹.

ANA, (mg.l ⁻¹)	Rendement en minicals	
	: par rapport au nombre de : protoplastes vivants mis : en culture (%)	: par rapport au nombre de : cellules en division au : 7ème jour (%)
0,1	7,9	10,5
0,05	0,9	1,3

Tableau XXXVIII : Effet de la concentration en ANA dans le milieu de culture Mc2 sur le rendement en minicals à la fin de la phase 2. La concentration en BAP est de 0,5 mg.l⁻¹.

Les résultats (Tableau XXXVIII) montrent qu'une combinaison de l'ANA à 0,05 mg.l⁻¹ à la BAP 0,5 mg.l⁻¹ est défavorable. La croissance des cals est faible; la totalité se nécrose environ trois semaines après le transfert.

Le maintient de l'équilibre hormonal : 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA et 0,5 mg.l⁻¹ de BAP favorise par contre la croissance des minicals et le rendement est beaucoup plus important.

Il n'est donc pas possible d'induire le bourgeonnement en deuxième phase de culture. Une phase préalable de prolifération des cals est nécessaire afin d'aboutir à une taille critique permettant le bourgeonnement.

5. PROLIFERATION DES CALS ET INDUCTION DES BOURGEONS

Une étude antérieure des effets de la variation des composés azotés a été effectuée dans le milieu de prolifération (Pc) puis de bourgeonnement (Ib) par SAKSI et collaborateurs (1986). Nous avons vérifié l'action de ces substances sur la croissance et l'organogénèse des cals provenant d'autres conditions de culture qui, à priori, devraient être beaucoup plus favorables.

5.1 Action de la variation des composés azotés sur la prolifération des cals

Les substances azotées minérales ou organiques ont été incorporées dans le milieu Pc de manière à garder constante la concentration en azote. Elle est égale à 144 mg.l^{-1} , c'est à dire la quantité d'azote apportée par 750 mg de glutamine dans un litre de milieu.

Les cals provenant de la phase 2 et mesurant environ 1 mm sont déposés à la surface du milieu gélosé (Pc). Après 6 semaines de culture la croissance est appréciée sur la base du pourcentage de cals vivants, par rapport au nombre de minicals repiqués, et par leur taille.

L'azote minéral fourni sous forme de KNO_3 ne permet pas la croissance : 5% des cals vivants ont une prolifération nulle (Tableau XXXIX).

Le NH_4NO_3 seul est beaucoup plus favorable que le nitrate de potassium.

Les meilleurs résultats sont obtenus quand on associe NH_4NO_3 et une faible quantité d'azote organique apporté sous forme de glutamine (respectivement 108 et 36 mg.l^{-1}).

Une quantité plus importante de glutamine, et la glutamine employée comme seule source d'azote provoque une diminution du pourcentage de cals vivants et de la croissance de ces derniers.

L'association d'ammonium sous la forme chlorure à de l'acide succinique est également favorable à la prolifération.

Composés azotés (mg.l ⁻¹)	Azote (mg.l ⁻¹)	Pourcentage de cals vivants	Importance de la taille des cals
Glutamine : 750	144	77	+
NH ₄ NO ₃ : 0	0		
Glutamine : 375	72	75	+
NH ₄ NO ₃ : 206	72		
Glutamine : 187	36	90	+++
NH ₄ NO ₃ : 206	108		
Glutamine : 0	0	80	++
NH ₄ NO ₃ : 309	144		
Glutamine : 0	0	5	-
KNO ₃ : 1040	144		
Glutamine : 0	0		
NH ₄ Cl : 548	144	85	+++
Acide succinique : 590			

: Effet de la nature et de la concentration des composés azotés sur la viabilité et la croissance des cals après 6 semaines de culture dans le milieu Pc.
40 cals sont ensemencés par condition.

- (-) croissance nulle.
- (+) croissance faible.
- (++) croissance moyenne.
- (+++) croissance importante



5.2 Action de la variation des composés azotés sur l'induction des bourgeons

Dans cette expérience nous avons étudié l'effet de la concentration de KNO₃ sur l'induction des

bourgeons et l'effet de l'adjonction de faibles quantités d'azote organique, apporté sous forme de glutamine, dans des milieux renfermant déjà du KNO_3 .

La composition des différents milieux (n° 1 à 10) est donnée dans le tableau XXXX. Le milieu de base renferme les éléments minéraux de la solution de Murashige et Skoog à la concentration normale ($\text{MS} \times 1$), ou réduite de moitié ($\text{MS} \times 1/2$), ou diluée six fois ($\text{MS} \times 1/6$).

Le milieu 10 renferme une seule source azotée : 750 mg de glutamine ce qui correspond à la quantité d'azote du milieu $\text{MS} \times 1/6$.

Les résultats (Tableau XXXXI) montrent que l'azote nitrique seul n'est pas favorable à la croissance des cals et n'induit des bourgeons que lorsqu'il est utilisé à faible dose (316 mg.l^{-1}).

L'addition de 100 ou 200 mg de glutamine favorise la croissance des cals et augmente le pourcentage de cals organogènes. Le pourcentage passe respectivement de 0 à 71% quand le milieu renferme 1900 mg.l^{-1} de KNO_3 , de 0 à 75% quand il en renferme 950 mg.l^{-1} et de 50 à 100% quand le milieu ne contient que 316 mg.l^{-1} de KNO_3 .

Dans les meilleures conditions, le nombre moyen de bourgeons par cal est de 24,4, mais on observe fréquemment un nombre de 6 à 10 bourgeons par cal.

Composés azotés par litre	Milieu Ib									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kNO ₃	M.Sx1	M.Sx1	M.Sx1	M.Sx $\frac{1}{2}$	M.Sx $\frac{1}{2}$	M.Sx $\frac{1}{2}$	M.Sx $\frac{1}{6}$	M.Sx $\frac{1}{6}$	M.Sx $\frac{1}{6}$	0
Glutamine:	0	100 mg	200 mg	0	100 mg	200 mg	0	100 mg	200 mg	750 mg

Tableau XXXX : Présentation des composés azotés dans le milieu Ib

Milieu Ib	Pourcentage de calcs vivants	Pourcentage de calcs organogènes :		Nombre moyen de bourgeons par calcs
		par rapport au nombre de calcs ensemencés	par rapport au nombre de calcs vivants	
1	2	0	0	0
2	17	5	29	9
3	60	42	71	13
4	7	0	0	0
5	48	21	42	10
6	40	30	75	10
7	5	2	50	7
8	13	13	100	24
9	28	21	73	9
10	0	0	0	0



Tableau XXXXI : Effet de la nature et de la concentration des composés azotés sur la viabilité des calcs et la formation des bourgeons après 6 semaines de culture dans le milieu Ib. 40 calcs sont ensemencés par condition.

6. DEVELOPPEMENT DES BOURGEONS

Les bourgeons déjà formés (environ 5 mm) sont séparés du cal initial et repiqués individuellement dans des tubes (22x160 mm) contenant le milieu E/R et placés dans les mêmes conditions de culture que lors de l'induction.

Rappelons que le milieu E/R sans substances de croissance comporte entre autre la solution minérale de M.Sx1/2, additionnée de 10 g.l⁻¹ de saccharose.

Cette phase permet l'allongement des bourgeons et leur enracinement. Après 4 semaines, on obtient alors des plantules semblables à celles issues de germinations aseptiques.

Les travaux antérieurs (SAKSI et al., 1985) ont montré qu'après acclimatation en miniserre, la reprise est excellente : toutes les plantules se développent et les plantes obtenues sont vigoureuses et de morphologie conforme au phénotype de la plante-mère.

Ainsi les améliorations que nous avons apportées ont permis une optimisation de chacune des phases de culture des protoplastes de C.i., tout en conservant la capacité de régénération des plantes.

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'isolement et la culture des protoplastes ont été d'abord établis chez Nicotiana tabacum (TAKEBE et al., 1971). A l'heure actuelle les résultats les plus performants ne concernent que les espèces végétales appartenant aux genres Nicotiana, Solanum, Petunia et Datura.

Chez les Chicorées plusieurs auteurs sont parvenus à régénérer des plantes mais seulement pour certaines espèces et quelques génotypes, avec des rendements très faibles (BINDING, 1980; CREPY et al., 1982). Grâce à une étude approfondie des milieux de culture et notamment des sources carbonées, SAKSI et ses collaborateurs (1986) ont obtenu la régénération de plantes issues de protoplastes préparés à partir des plantules de Cichorium intybus var. Witloof cv. Zoom.

En modifiant les conditions de culture, les milieux et la méthode utilisés par ces auteurs, nous avons déterminé les paramètres permettant d'améliorer le rendement des cultures tout en conservant la capacité organogène des cals dérivés des protoplastes de cet hybride.

L'utilisation d'une préparation enzymatique de "caylase" au lieu des enzymes préconisées par SAKSI et ses collaborateurs (1986) a permis de doubler le rendement en protoplastes vivants tout en diminuant la durée de macération de 15 à 5 heures. La diminution de la viabilité et des divisions des cellules observées, avec les préparations enzymatiques utilisées précédemment est probablement liée à une longue durée de macération. De telles manifestations ont déjà été observées par CHIN et SCOTT (1979) lors de la culture des protoplastes de Céréales. Ces auteurs ont montré que les protoplastes laissés pendant 10 heures dans la solution enzymatique accusent une diminution importante de la quantité de polysomes et d'ARN ainsi qu'une réduction de la synthèse des protéines. Afin de surmonter cette difficulté STRAUSS et POTRYKUS (1980) procèdent à un raccourcissement de la durée de macération des protoplastes de Rosa "Paul's Scarlet". Dans notre cas, ces enzymes ne sont efficaces qu'après 15 heures de traitement; une augmentation de la température est restée sans effet et l'augmentation des concentrations s'est révélée toxique.

D'autre part, les caylases lyophilisées ne

semblent pas convenir à l'isolement des protoplastes et à la division des cellules qui en dérivent. Cette toxicité a déjà été signalée au sujet d'autres enzymes par CASSELLS et BARLASS (1976). Ils supposent que la lyophilisation augmenterait la concentration des facteurs contaminants et des produits toxiques (protéases...).

Nous avons observé par ailleurs une réponse différente des protoplastes selon leur origine. L'utilisation de plantules âgées de 15 jours permet une libération facile des protoplastes avec une grande disponibilité du matériel, tandis que des plantules plus âgées donnent un rendement très faible. Des résultats comparables ont été obtenus par KAO et MICHAYLUK (1980) lors de l'isolement des protoplastes à partir de feuilles âgées de Luzerne. Ces auteurs notent qu'avec l'âge, la paroi des cellules exige des concentrations enzymatiques plus élevées et que les protoplastes libérés sont plus fragiles que ceux isolés à partir de feuille jeunes. L'âge des plantules est un facteur fondamental qui affecte également les divisions cellulaires ultérieures. Nous avons obtenu une fréquence de divisions d'autant plus élevée que les plantules sont jeunes. Ce phénomène a déjà été signalé par JIA (1982) qui a montré que la capacité de division des protoplastes de Pois diminue avec l'âge. De plus, les feuilles âgées peuvent produire des substances variables susceptibles d'inhiber le processus de division.

Le conditionnement des plantules donatrices joue un rôle très important sur la libération des protoplastes. Nous avons augmenté le rendement par un traitement des plantules à 4°C et à l'obscurité pendant 15 heures. Un résultat semblable est obtenu après un traitement des feuilles de Nicotiana debneyi (SCOWCROFT et LARKIN, 1980) et de Medicago sativa (ATANASSOVA et BROWN, 1984) à basse température et à l'obscurité. D'après SHEPARD et TOTTE (1975) l'obscurité contribue à l'abaissement de la pression osmotique interne des feuilles, ce qui facilite la libération des protoplastes.

Une technique de purification des protoplastes de C.i. a été décrite par MILLECAMPS (1985) : il s'agit d'une flottaison des protoplastes sur une solution de ficoll et de mannitol. Cette méthode a été reprise au début de notre travail, mais le rendement obtenu était faible et les fréquences de divisions cellulaires très fluctuantes.

Nous avons donc intégré au protocole de préparation des protoplastes une nouvelle technique de purification. Il s'agit d'une flottaison des protoplastes sur un coussin de saccharose. L'utilisation d'une

solution concentrée de saccharose (12,5%) a permis une meilleure séparation des débris cellulaires. La récupération des protoplastes est quantitativement suffisante quand le lavage ultérieur est réalisé dans une solution saline qui semble faciliter la sédimentation des protoplastes (CREPY, 1980). De plus une telle concentration de saccharose n'altère pas la viabilité des protoplastes de *C. j.* dont la sensibilité aux doses élevées en saccharose a pourtant été signalée (SAKSI et al., 1986). La purification des protoplastes influence favorablement les divisions des cellules qui en dérivent. Ce résultat pourrait être lié à une diminution des effets inhibiteurs par l'élimination d'un maximum de déchets cellulaires et de protoplastes abimés et/ou à la présence de KCl et de CaCl₂ dans le milieu de lavage. En effet certains auteurs notent que l'utilisation d'une solution saline ou l'addition d'ions Ca a pour effet la stabilisation de la membrane plasmique et l'augmentation de la fréquence des divisions (MEYER, 1974; VON ARNOLD et ERIKSSON, 1977).

Cette méthodologie de lavage permet également de fractionner deux types de protoplastes : avec ou sans chloroplastes que l'on pourrait comparer à ceux que FRANCESCHI et ses collaborateurs (1984) appellent chez le Soja "mesophyll" et "paraveinal mesophyll protoplasts". Ces auteurs rapportent que les seconds, pauvres en chloroplastes doivent provenir de cellules spécialisées dans le transfert des composés azotés. Dans notre cas, quelques expériences préliminaires ont montré dans les protoplastes dépourvus de chloroplastes une activité nitrate réductase NADH dépendante deux fois plus importante que celle mise en évidence dans les chlorophylliens. On a supposé au départ que ces protoplastes non chlorophylliens pourraient provenir des cellules de nervures. Cependant l'hypothèse d'un métabolisme azoté particulier à ce niveau n'est pas vérifié puisque le dosage de la nitrate réductase dans les nervures des vitroplantes ou des plantes en serre ne révèle pas d'activité.

Par ailleurs ces protoplastes non chlorophylliens mis en culture ne montrent que quelques divisions par bourgeonnement et finissent par dégénérer. A ce propos RAMBOUR (communication personnelle) rapporte que les cellules de Silène et d'Endive qui ont une croissance ralentie ou inhibée ont une activité nitrate réductase élevée. Il suggère une utilisation importante de la NADH pour la réduction de nitrate. CREPY et ses collaborateurs (1982) révèlent cependant que l'utilisation de l'azote minéral (NH₄NO₃ + KNO₃ de la solution de MSx1/2) ne suffit pas à prolonger la survie des protoplastes issus de l'hybride "Zoom". Ils suggèrent l'absence ou l'inhibition de la nitrate réductase.

Nos résultats nous conduisent donc à for-

muler d'autres hypothèses pour la nutrition azotée. Il faudrait orienter les futures expériences vers l'étude du devenir de l'activité nitrate réductase lors des différentes étapes de préparation et de mise en culture des protoplastes. Il conviendrait également de déterminer l'origine de ces protoplastes dépourvus de chloroplastes par des techniques cytologiques ou appropriées.

Après la mise en culture des protoplastes nous avons constaté que plusieurs facteurs affectent leur viabilité, leur fréquence et mode de division. En effet, on peut citer la substitution du mannitol par le sorbitol. L'augmentation de l'activité mitotique obtenue suggère que le sorbitol pourrait être plus favorable pour la régénération de la paroi et l'induction de l'activité mitotique. De plus ce protecteur osmotique, qui pourrait être métaboliquement utilisé par les protoplastes au cours des premiers jours de culture, n'exclut pas l'hypothèse d'une diminution graduelle de la pression osmotique du milieu.

Un certain nombre d'auteurs ont en effet déjà signalé l'importance d'une réduction de la pression osmotique du milieu au cours des premiers jours de culture. Ainsi JIA (1982) remarque qu'après deux jours de culture des protoplastes de Pois, la pression osmotique augmente légèrement à cause de l'évaporation du milieu et la fréquence des divisions cellulaires diminue fortement. Il surmonte ce problème en ajoutant progressivement du milieu neuf. Nous avons également obtenu des diminutions des divisions par mitose lorsque l'on a réalisé des cultures à 30°C dans des boîtes de Pétri non scellées. On suppose dans ce cas qu'une évaporation accentuée du milieu de culture entraîne une augmentation de la concentration du protecteur osmotique.

Les différents facteurs évoqués ci-dessus sont évidemment d'une grande importance dans la culture des protoplastes de C.j. mais le plus déterminant semble être l'équilibre hormonal dans le milieu de culture.

La viabilité et la division des cellules dérivées des protoplastes sont étroitement liées aux variations de la concentration en substances de croissance. On a obtenu les meilleurs résultats avec un équilibre de 5 mg.l⁻¹ d'ANA et 1 mg.l⁻¹ de BAP. Des exigences élevées en auxine ont été également signalées par DAVID et DAVID (1979) qui recommandent une concentration de 6 mg.l⁻¹ d'ANA pour la culture des protoplastes de Pinus pinaster. Dans notre cas si cette concentration élevée d'ANA semble être favorable pour les divisions cellulaires, il n'en est pas de même pour

le rendement en minicals dans la phase suivante, la concentration la plus efficace est beaucoup plus faible (0,5 mg.l). Cela suggère que l'ANA est surtout nécessaire au début de la culture, il pourrait intervenir dans les mécanismes conduisant à la néoformation de la paroi et au déclenchement de la mitose.

On a observé que le rendement en minicals augmente lorsqu'on lave les cultures avant de les transférer sur milieu solide. Ceci pourrait être lié à l'élimination de l'excès d'ANA. Il conviendrait alors d'envisager des lavages successifs au cours des premiers jours de culture (du 3^e au 5^e jour) avec du milieu neuf renfermant des substances de croissance de moins en moins concentrées.

La croissance des cals, au cours de la seconde phase de la culture est affectée par la concentration initiale des cultures au moment du transfert. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour une densité de 10000 microcals comportant chacun en moyenne 2 à 4 cellules par ml. L'inhibition du développement des minicals observée avec des concentrations initiales plus élevées résulte probablement d'une accumulation plus importante des composés phénoliques libérés par les cellules mortes.

Les facteurs d'environnement jouent un rôle important au cours de toutes les phases de la culture. Il est nécessaire de l'optimiser pour chacune d'elles. Ainsi l'éclairement des plantules aseptiques utilisées comme source de protoplastes et la température à laquelle elles sont soumises ont des répercussions non seulement sur la libération des protoplastes mais aussi sur le pourcentage des protoplastes qui entrent en division. Une intensité de l'éclairement de 4000 lux et une photopériode de 16 heures sont les plus favorables. Des observations semblables ont été signalées par OKUNO et FURUSAWA (1976), ils suggèrent que ces effets pourraient être en relation avec les réserves accumulées dans les feuilles des plantes donatrices. Par contre au cours de la première phase de la culture des protoplastes, c'est à l'obscurité que l'on obtient les meilleurs résultats aussi bien en ce qui concerne la viabilité que les divisions par mitose. Plusieurs auteurs (NAGATA et TAKEBE, 1970; EVANS et al., 1972) ont signalé qu'un éclairement trop intense est néfaste et que l'obscurité augmente la stabilité des protoplastes.

La température est un facteur très important. A 30°C la plupart des cellules issues des protoplastes se divisent par mitose alors qu'à une température plus faible on observe d'avantage de cellules qui émettent des bourgeons. Un optimum de 30°C est également obtenu chez les protoplastes de Digitaria

sanguinalis par HUBER et EDWARDS (1975) qui signalent qu'aucune variation de température n'est tolérée pour les protoplastes de cette espèce.

Le conditionnement des cultures doit également être approprié à chacune des phases. Ainsi nous avons observé qu'une diminution de l'épaisseur du milieu liquide (phase 1) favorise la survie et les divisions de protoplastes. L'utilisation de boîtes de Pétri en "LUXLON" permet de réduire le volume de milieu.

Pour éviter le dessèchement des microcals cultivés à la surface de la gélose nous avons essayé d'incorporer les cellules et les microcals dans le milieu gélosé avant qu'il ne se solidifie. Les résultats ne sont pas satisfaisants, ceci est peut être dû à l'épaisseur ou à la qualité de la gélose. Afin de surmonter ce problème, certains auteurs utilisent une technique combinant la méthode d'incorporation des protoplastes dans des blocs de gélose et la culture en milieu liquide agité (SHILLITO et al., 1983). Il serait intéressant d'utiliser cette méthode pour la culture des protoplastes de C.i., le milieu liquide pourrait ainsi diluer les substances inhibitrices, et une diminution graduelle du protecteur osmotique et/ou des substances de croissance pourrait être envisagée par son renouvellement.

La gélose s'est également révélée un facteur important influant sur le rendement en minicals. Nous avons observé avec l'Agarose des résultats notablement supérieurs à ceux obtenus avec le Bacto-Agar ou l'Agar Noble. L'effet stimulant de l'Agarose pourrait être lié à sa faible toxicité. Des résultats similaires ont été signalés par LÖRZ et ses collaborateurs (1983) chez plusieurs espèces végétales.

Les différents facteurs étudiés sont d'une grande importance dans l'amélioration des cultures de protoplastes de C.i.. Cependant des observations suggèrent que le protocole expérimental établi pour la culture de protoplastes de l'hybride F1 pourrait se révéler inefficace pour d'autres génotypes. Ainsi au cours de notre travail nous avons observé que les résultats n'étaient pas toujours reproductibles. L'une des raisons de cette variabilité est sans doute l'origine des akènes utilisés. En effet, tous les akènes n'ont pas forcément atteint leur complète maturité, et des différences entre akènes du centre et akènes du pourtour des capitules peuvent être sources de variabilité. On peut également souligner à ce propos les réponses différentes obtenues à partir des protoplastes issus de la Chicorée à café (RAMBAUD communication personnelle).

Aussi, faudrait-il alors envisager une étude

fondamentale ou au moins quelques essais concernant les principaux facteurs nutritionnels et d'environnement (concentrations du saccharose, nature et concentrations des composés azotés et des régulateurs de croissance) chaque fois que l'on s'adresse à des génotypes différents.

L'intérêt des protoplastes de la Chicorée Witloof est de pouvoir constituer une technique supplémentaire pour l'amélioration de cette plante. La fusion somatique pourrait permettre la sélection des cultivars résistants à certaines maladies et à des herbicides spécifiques.

Les résultats que nous avons obtenus sont encourageants, particulièrement l'augmentation des rendements en minéraux au cours de la deuxième phase de culture. Ces observations permettent d'envisager l'insertion des protoplastes dans les programmes d'amélioration de la Chicorée Witloof.

CHAPITRE VI

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTSSON P., 1978. - Partitioning between polymer phases.
J. Chromatogr., 159, 111-122.
- ARCIONI S., MARIOTTI D. et PEZZOTTI M., 1985. - Hedysarum coronarium L. In vitro conditions for plant regeneration from protoplasts and callus of various explants.
J. Plant Physiol., 121, 141-148.
- ATANASSOVA A. et BROWN D.C.W., 1984. - Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of Medicago sativa L.
Plant Cell Tissue and Organ Culture, 3, 149-162.
- BANNEROT H. et DE CONINCK B., 1970. - L'utilisation des hybrides F1, nouvelle méthode d'amélioration de la Chicorée de Bruxelles.
Eucarpia meeting "Chicory", Gembloux, 99-118.
- BERRY S.F., LU D.Y., PENTAL D., et COCKING E.C., 1982. Regeneration of plants from protoplasts of Lactuca sativa L.
Z. Pflanzenphysiol., 108, 31-38.
- BHARAL S. et RASHID A., 1980. - Isolation of protoplasts from stem and hypocotyl of the legume Vigna sinensis and some factors affecting their regeneration.
Protoplasma, 102, 307-313.
- BHATT D.P. et FASSULIOTIS G., 1981. - Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Eggplant.
Z. Pflanzenphysiol., 104, 81-89.
- BIDNEY D.L., SHEPARD J.F. et KALEIKAU E., 1983. - Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of Brassica oleracea.
Protoplasma, 117, 89-92.
- BINDING H., 1975. - Reproducibly high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplasts from shoot cultures of Tobacco.
Physiol. Plant., 35, 225-227.
- BINDING H. et NEHLS R., 1980. - Protoplast regeneration to plants in Senecio vulgaris L.
Z. Pflanzenphysiol., 99, 183-185.

- BINDING H., NEHLS R., KOECK R., FINGER J. et MORDHORST G., 1981. - Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the Dicotyledoneae class.
Z. Pflanzenphysiol., 101, 119-130.
- BOKELMANN G.S. et ROEST S., 1983. - Plant regeneration from protoplasts of Potato (Solanum tuberosum cv. Bintje).
Z. Pflanzenphysiol., 109, 259-265.
- BOURGIN J.P., CHUPEAU V. et MISSONIER C., 1979. - Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several Nicotiana species.
Physiol. Plant., 45, 288-292.
- BOYES C.J., ZAPATA F.J. et SINK K.C., 1980. - Isolation, culture and regeneration to plants of callus protoplasts of Salpiglossis sinuata L.
Z. Pflanzenphysiol., 99, 471-474.
- CASSELLS A.C. et BARLASS M., 1976. - Environmentally induced changes in the cell walls of Tomato leaves in relation to cell and protoplast release.
Physiol. Plant., 37, 239-246.
- CELLA R. et GALUN E., 1980. - Utilization of irradiated carrot cell suspensions as feeder layer of cultured Nicotiana cells and protoplasts.
Plant Sci. Lett., 19, 243-252.
- CHIN J.C. et SCOTT K.J., 1979. - A large-scale isolation procedure for Cereal mesophyll protoplasts.
Ann. Bot., 43, 23-32.
- CHOUREY P.S. et SHARPE D.Z., 1985. - Callus formation from protoplasts of Sorghum cell suspension cultures.
Plant Sci. Lett., 39, 171-175.
- CHUPEAU M.M., BOURGIN J.P., MISSONIER C., DORION N. et MOREL G., 1974. - Préparation et culture de protoplastes de divers Nicotiana.
C.R. Acad. Sci. Paris, 278, 1565-1567.
- CONSTABEL F., KIRKPATRICK J.W. et GAMBORG O.L., 1973. - Callus formation from mesophyll protoplasts of Pisum sativum.
Can. J. Bot., 51, 2105-2107.

- COULIBALY M.Y. et DEMARLY Y., 1986. - Regeneration of plantlets from protoplasts of Rice, Oryza sativa L.
Z. Pflanzenzüchtg., 96, 79-81.
- CREPY L., CHUPEAU M.C. et CHUPEAU Y., 1982. - The isolation and culture of leaf protoplasts of Cichorium intybus and their regeneration into plants.
Z. Pflanzenphysiol., 107, 123-131.
- CROWDER A.J., LANDGREN C.R. et ROCKWOOD L.L., 1979. - Cultivar differences in starch content and protoplast yields from root cortical explants of Pisum sativum.
Physiol. Plant., 46, 85-88.
- DAVEY M.R., BUSH E. et POWER J.B., 1974. - Cultural studies of a dividing legume leaf protoplast system.
Plant Sci. Lett., 3, 127-133.
- DAVID A. et DAVID H., 1979. - Isolation and callus formation from cotyledon protoplasts of Pine (Pinus pinaster).
Z. Pflanzenphysiol., 94, 173-177.
- DE LA ROCHE A.I., KELLER W.A., SINGH J. et SIMINOVITCH D., 1977. - Isolation of protoplasts from unhardened and hardened tissues of winter Rye and Wheat.
Can. J. Bot., 55, 1181-1185.
- DORION N., CHUPEAU Y. et BOURGIN J.P., 1975. - Isolation, culture and regeneration into plants of Ranunculus sceleratus L. leaf protoplasts.
Plant Sci. Lett., 5, 325-331.
- DOS SANTOS A.V.P., OUTKA D.E., COCKING E.C. et DAVEY M.R., 1980. - Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of Medicago sativa.
Z. Pflanzenphysiol., 99, 261-270.
- DOUGLAS G.C., KELLER W.A. et SETTERFIELD G., 1981a. - Somatic hybridization between Nicotiana rustica and N. tabacum. I. Isolation and culture of protoplasts and regeneration of plants from cell cultures of wild-type and chlorophyll-deficient strains.
Can. J. Bot., 59, 208-219.

- DUHOUX E., 1980. - protoplast isolation of Gymnosperm pollen.
Z. Pflanzenphysiol., 99, 207-214.
- DURAND J., 1979. - High and reproducible plating efficiencies of protoplasts isolated from in vitro grown haploid Nicotiana sylvestris Spegaz. and Comes.
Z. Pflanzenphysiol., 93, 283-295.
- EDWARDS G.E., LILLEY R.C., CRAIG S. et HATCH M.D., 1979. - Isolation of intact and functional chloroplasts from mesophyll and bundle sheath protoplasts of the C4 plant Panicum miliaceum.
J. Plant Physiol., 63, 821-827.
- EVANS P.K., KEATES A.G. et COCKING E.C., 1972. - Isolation of protoplasts from Cereal leaves.
Planta, 107, 178-181.
- EVANS P.K., et COCKING E.C., 1977. - Isolated plant protoplasts. In He Street ed. Plant Tissue and Cell Culture.
Ed.2 vol.II. Black well. Oxford pp. 103-117.
- EVANS D.A., 1979. - Chromosome stability of plants regenerated from mesophyll protoplasts of Nicotiana species.
Z. Pflanzenphysiol., 95, 459-463.
- EVANS D.A. et BRAVO J.E., 1983. - Plant protoplast isolation and culture.
Int. Rev. Cytol., Suppl. 16, 33-53.
- FAN D.F. et MACLACHLAN G.A., 1966. - Control of cellulase activity by indoleacetic acid.
Can. J. Bot., 44, 1025-1034.
- FITZSIMONS P.J. et WEYERS J.D.B., 1983. - Separation and purification of protoplast types from Commelina communis L. leaf epidermis.
J. Exp. Bot., 34, 55-66.
- FLICK C.E. et EVANS D.A., 1983. - Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts isolated from flower petals of ornamental Nicotiana species.
Z. Pflanzenphysiol., 109, 379-383.

- FRANCESCHI V.R., KU M.S.B. et WITTENBACH V.A., 1984. - Isolation of mesophyll and paraveinal mesophyll protoplasts from Soybean leaves. *Plant Sci. Lett.*, 36, 181-186.
- GALSTON A.W., ALTMAN A. et KAUR-SAWHNEY R. 1978. - Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat leaf protoplasts. *Plant Sci. Lett.*, 11, 69-79.
- GAMBORG O.L., SHYLUK J. et KARTHA K.K., 1975. - Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from the shoot apices of *Pisum sativum* L. *Plant Sci. Lett.*, 4, 285-292.
- GAMBORG O.L. et WETTER L.R., 1975. - *Plant Tissue Culture Methods.* National Research Council of Canada. Ottawa. 109 p.
- GAMBORG O.L., SHYLUK J.P. et SHAHIN E.A., 1981. - Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In: *Plant tissue culture-methods and applications in agriculture.* THORPE. T.A. ed. Academic Press. New York, pp. 115-154.
- GATENBY A.A. et COCKING E.C., 1977. - Callus formation from protoplasts of marrow stem kale. *Plant Sci. Lett.*, 8, 275-280.
- GILL R., RASHID A. et MAHESHWARI S.C., 1979. - Isolation of mesophyll protoplasts of *Nicotiana rustica* and their regeneration into flowering in vitro plants. *Physiol. Plant.*, 47, 7-10.
- GILL R., RASHID A. et MAHESHWARI S.C., 1981. - Dark requirement for cell regeneration and colony formation by mesophyll protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. *Protoplasma*, 106, 351-354.
- GLEDDIE S., KELLER W.A. et SETTERFIELD G., 1985. - Plant regeneration from tissue, cell and protoplast cultures of several wild *Solanum* species. *J. Plant Physiol.*, 119, 405-418.

- HAKMAN I.C. et VON ARNOLD S., 1983. - Isolation and growth of protoplasts from cell suspensions of Pinus contorta Dougl ex Loud. Plant Cell Rep., 2, 92-96.
- HASSANPOUR-ESTAHBANATI A. et DEMARLY Y., 1985. - Plant regeneration from protoplasts of Solanum pennelli : Effect of photoperiod applied to donor plants. J. Plant Physiol., 121, 171-174.
- HELLER R., 1953. - Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro". Ann. Sci. Nat. Biol. Vég., 14, 1-223.
- HESS D. et LEIPOLDT G., 1979. - Regeneration of shoots and roots from isolated mesophyll protoplasts of Nemesia strumosa. Biochem. Physiol. Pflanzen., 174, 411-417.
- HOWLAND G.P., 1975. - Dark-repair of ultraviolet-induced pyrimidine dimers in the DNA of wild Carrot protoplasts. Nature, 254, 160-1.
- HUBER S.C. et EDWARDS G.E., 1975. - An evaluation of some parameters required for the enzymatic isolation of cells and protoplasts with CO₂ fixation capacity from C₃ and C₄ grasses. Physiol. Plant., 35, 2039.
- IVERSEN T.H., JOHNSON A. et BAGGERUD. C., 1983. - Effect of light and abscisic acid on leaf cell protoplasts. Z. Pflanzenphysiol., 110, 293-300.
- JHA T.B. et ROY S.C., 1980. - Rapid callus formation at low mannitol level from protoplasts of Vigna sinensis. Ind. J. Exp. Biol., 18, 87-89.
- JIA S., 1982. - Factors affecting the division frequency of Pea mesophyll protoplasts. Can. J. Bot., 60, 2192-2196.
- KANAI R. et EDWARDS G.E., 1973. - Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from Maize leaves for photosynthetic studies. Plant Physiol., 51, 1133-1137.

- KAO K.N., GAMBORG O.L., MILLER R.A. et KELLER W.A.,
1971. - Cell division in cells regenerated
from protoplasts of Soybean and *Haplopappus*
gracilis.
Nature New Biol., 232, 124.
- KAO K.N., CONSTABEL F., MICHAYLUK M.R. et GAMBORG O.L.,
1974. - Plant protoplast fusion and growth
of intergeneric hybrid cells.
Planta, 120, 215-227.
- KAO K.N. et MICHAYLUK M.R., 1974. - A method for high
frequency intergeneric fusion of plant pro-
toplasts.
Planta, 115, 355-367.
- KAO K.N. et MICHAYLUK M.R., 1975. - Nutritional requi-
rements for growth of *Vicia hajastana* cells
and protoplasts at a very low population
density in liquid media.
Planta, 126, 106-110.
- KAO K.N. et MICHAYLUK M.R., 1980. - Plant regeneration
from mesophyll protoplasts of Alfalfa.
Z. Pflanzenphysiol., 96, 135-141.
- KARTHA K.K., MICHAYLUK M.R., KAO K.N., GAMBORG O.L. et
CONSTABEL F., 1974. - Callus formation and
plant regeneration from mesophyll proto-
plasts of rape plants (*Brassica napus* L.
cv. Zephyr).
Plant Sci. Lett., 3, 265-271.
- KAUR-SAWHNEY R., ADAMS W.R., TSANG J. et GALSTON A.W.,
1977. - Leaf pretreatment with senescence
retardants as a basic for oat protoplast
improvement.
Plant and Cell Physiol., 18, 1309-1317.
- KELLER F. et STONE B.A., 1978. - Preparation of *Lolium*
protoplasts and their purification using an
anti-galactan-sepharose conjugate.
Z. Pflanzenphysiol., 87, 167-172.
- KIRBY E.G. et CHENG T.Y., 1979. - Colony formation
from protoplasts derived from Douglas fir
cotyledons.
Plant Sci. Lett., 14, 145-154.

- KOWALCZYK T.P., MACKENZIE I.A. et COCKING E.C., 1983. - Plant regeneration from organ explants and protoplasts of the medicinal plant Solanum khasianum C.B Clarke var. chattereanum Sengupta (Syn. Solanum viarum Dunal. Z.Pflanzenphysiol., 111, 55-68.
- LANDGREN C.R., 1976. - The influence of culture conditions on mitotic activity in protoplasts derived from Pisum root cortical explants. Protoplasma, 87, 49-69.
- LARKIN P.J., 1976. - Purification and viability determination of plant protoplasts. Planta, 128, 213-216.
- LI X., YAN Q., HUANG M., SUN Y. et LI W., 1980. - Division of cells regenerated from mesophyll protoplasts of Wheat. In: Advances in protoplast research, Ferenczy L. and Farkas G.L., Pergamon Press, Oxford, 261-267.
- LIN W., 1980. - Corn root protoplasts isolation and general characterization of ion transport. Plant Physiol., 66, 550-554.
- LORZ H., LARKIN P.J., THOMSON J. et SCOWCROFT W.R., 1983. - Improved protoplast culture and agarose media. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2, 217-226.
- LU D.Y., PENTAL D. et COCKING E.C., 1982. - Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. Z. Pflanzenphysiol., 107, 59-63.
- MASUDA Y., 1968. - Role of cell wall degrading enzymes in cell-wall loosening in oat coleoptiles. Planta, 83, 171-184.
- MEYER Y., 1974. - Isolation and culture of Tobacco mesophyll protoplasts using a saline medium. Protoplasma, 81, 363-372.
- MILLECAMPS J.L., 1985. - Néof ormation de plantes à partir de protoplastes de Cichorium intybus L. : Etude critique des différentes phases de la culture. Mémoire de D.E.A., U.S.T. Lille I, 63 p.



- MORGAN A. et COCKING E.C., 1982. - Plant regeneration from protoplasts of Lycopersicon esculentum Mill.
Z. Pflanzenphysiol., 106, 97-104.
- MOTOYOSHI F., WATTS J.W. et BANCROFT J.B., 1974.- Factors influencing the infection of Tobacco protoplasts by cowpea chlorotic mottle virus.
J. Gen. Virol., 25, 245-256.
- MULLER J.F., MISSONIER C. et CABOCHE M., 1983. - Low density growth of cells derived from Nicotiana and Petunia protoplasts : Influence of the source of protoplasts and comparison of the growth-promoting activity of various auxins.
Physiol. Plant., 57, 35-41.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. - A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.
- NAGATA T. et TAKEBE I., 1970. - Cell wall regeneration and cell division in isolated Tobacco mesophyll protoplasts.
Planta, 92, 301-308.
- NAGATA T. et ISHII S., 1979. - A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts.
Can. J. Bot., 57, 1820-1823.
- OPATRYN Z., SCHUMANN U., RAKOUSKY S. et KOBIITZ H., 1980. - The role of some exogenous and endogenous factors in the isolation of protoplasts from Potato cell cultures and their recovery in cell colonies.
Biol. Plant., 22, 107-116.
- OKUNO T. et FURUSAWA I., 1976. - Effects of light and antibiotics on the multiplication of brome mosaic virus in Barley mesophyll protoplasts.
Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 42, 375-376.
- OKUNO T. et FURUSAWA I., 1977. - A Simple method for isolation of intact mesophyll protoplasts from Cereal plants.
Plant and Cell Physiol., 18, 1357-1362.
- OTHMAN R.B. et PARANJOTHY K., 1980. - Isolation of Hevea protoplasts.
J. Rubb. Res. Inst., Malaysia, 28, 61-66.



- PATEL K.R., SHEKHAWAT N.S., BERLYN G.P. et THORPE T. A., 1984. - Isolation and culture of protoplasts from cotyledons of Pinus coulteri D. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 3, 85-90.
- PATNAIK G., WILSON D. et COCKING E.C., 1981. - Importance of enzyme purification for increased plating efficiency and plant regeneration from protoplasts of Petunia parodii. Z.Pflanzenphysiol., 102, 199-205.
- PELCHER L.E., GAMBORG O.L. et KAO K.N., 1974. - Bean mesophyll protoplasts: production, culture and callus formation. Plant Sci. Lett., 3, 1071.
- PEZZOTTI M., ARCIONI S. et MARIOTTI D., 1984. - Plant regeneration from mesophyll, root and cell suspension protoplasts of Medicago sativa cv. Adriana. Genet. Agr., 38, 195-208.
- PIWOWARCZYK W., 1979. - Modified method of purification of plant protoplasts by centrifugation in a new discontinuous gradient. Biochem. Physiol. Pflanzen., 174, 318-321.
- PRAKASH J., FOXE M.J. et KANE E.J., 1985. - Requirements for the isolation and culture of leaf mesophyll protoplasts of five Potato cultivars. J. Indian Potato Asso., 12, 13-24.
- RADENBAUGH M.K., WESTFALL R.D. et KARNOSKY D.F., 1980. Protoplast isolation from Ulmus americana pollen mother cell tetrads and microspores. Can. J. For. Res., 10, 284-289.
- RAZDAN M.K., COCKING E.C. et POWER J.B., 1980. - Callus regeneration from mesophyll protoplasts of sweet Pea (Lathyrus odoratus L.). Z. Pflanzenphysiol., 96, 181-183.
- SAKSI N., 1985. - Culture et potentialités de régénération de protoplastes de feuilles de Cichorium intybus L. var. Witloof. Thèse 3^e cycle, U.S.T. Lille I, 92 p.

- SAKSI N., DUBOIS J., MILLECAMPS J.L. et VASSEUR J., 1986. - Régénération de plantes de Chicorée Witloof cv. "Zoom" à partir de protoplastes : influence de la nutrition glucidique et azotée.
C. R. Acad. Sc. Paris, 302, 165-170.
- SAXENA P.K., GILL R., RASHID A. et MAHESHWARI S.C., 1982. - Colony formation by cotyledonary protoplast of Cyamopsis tetragonoloba L.
Z. Pflanzenphysiol., 106, 277-280.
- SCHIEDER O., 1977a. - Attempts in regeneration of mesophyll protoplasts of haploid and diploid wild type lines, and those of chlorophylldeficient strains from different Solanaceae.
Z. Pflanzenphysiol., 84, 275-281.
- SCHILDE-RENTSCHLER L., 1977. - Role of the cell wall in the ability of Tobacco protoplasts to form callus.
Planta, 135, 177-171.
- SCHMIDT R. et POOLE R.J., 1980. - Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red Beet.
Plant. Physiol., 66, 25-28.
- SCOWCROFT W.R. et LARKIN P.J., 1980. - Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts of Nicotiana debneyi.
Aust. J. Plant Physiol., 7, 635-44.
- SENN A. et FILET P.E., 1980. - Isolation and some morphological properties of Maize root protoplasts.
Z. Pflanzenphysiol., 100, 299-310.
- SHEKHAWAT N.S. et GALSTON A. W., 1983. - Isolation, culture and regeneration of moth bean Vigna aconitifolia leaf protoplasts.
Plant Sci.Lett., 32, 43-51.
- SHEPARD J.F. et TOTTEN R.E., 1975. - Isolation and regeneration of Tobacco mesophyll cell protoplasts under low osmotic conditions.
Plant Physiol., 55, 689-695.
- SHEPARD J.F. et TOTTEN R.E., 1977. - Mesophyll cell protoplasts of Potato. Isolation, proliferation, and plant regeneration.
Plant Physiol., 60, 313-316.

- SHEPARD J.F., 1980. - Abscisic acid-enhanced shoot initiation in protoplast-derived calli of Potato.
Plant Sci. Lett., 18, 327-333.
- SHILLITO R.D., PASZKOWSKI J. et POTRYKUS I., 1983. - Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species.
Plant Cell Reports, 2, 244-247.
- SIMMONDS J.A., SIMMONDS D.H. et CUMMING B.G., 1979. - Isolation and cultivation of protoplasts from morphogenetic callus cultures of Lilium.
Can. J. Bot., 57, 512-516.
- SKENE K.G.M., 1974. - Culture of protoplasts from grape Vine pericarp callus.
Aust. Plant Physiol., 1, 371-376.
- SLABAS A.R., POWELL A.J. et LLOYD C.W., 1980. - An improved procedure for the isolation and purification of protoplasts from Carrot suspension culture.
Planta, 147, 283-286.
- STRAUSS A. et POTRYKUS I., 1980. - Callus formation from protoplasts of cell suspension cultures of Rosa "Paul's Scarlet".
Physiol. Plant., 48, 15-20.
- SZABADOS L. et ROCA W.M., 1986. - Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in Stylosanthes quianensis. A tropical forage legume.
Plant Cell Reports, 3, 174-177.
- TAKEBE I., OTSUKI Y. et AOKI S., 1968. - Isolation of Tobacco mesophyll cells in intact and active state.
Plant and Cell Physiol., 9, 11-124.
- TAKEBE I., LABIB G. et MELCHERS G., 1971. - Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of Tobacco.
Naturwiss., 58, 318-320.
- TAL M. et WATTS J.M., 1979. - Plant growth conditions and yield of viable protoplasts isolated from leaves of Lycopersicon esculentum and L. peruvianum.
Z. Pflanzenphysiol., 92, 207-214.

- TREMBLAY F.M., POWER J.B. et LALONDE M., 1985. - Callus regeneration from Alnus incana protoplasts isolated from cell suspensions. *Plant Science*, 41, 211-216.
- VAN SLOOTEREN G.M.S., PLANQUE K. et LEKKERKERK J., 1980. - Evaluation of parameters affecting the initiation of division of protoplasts of haploid and diploid Nicotiana sylvestris and *N. tabacum*. *Plant Sci. Lett.*, 20, 35-45.
- VASIL I.K., 1976. - The progress, problems, and prospects of plant protoplast research. *Adv. Agron.*, 28, 119-160.
- VASIL I.K. et VASIL V., 1980a. - Isolation and culture of protoplasts. *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. IIB, 1-19.
- VASIL V. et VASIL I.K., 1980b. - Isolation and culture of Cereal protoplasts. II Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of Pennisetum americanum. *Theor. Appl. Genet.*, 56, 97-99.
- VON ARNOLD S. et ERIKSSON T., 1976. - Factors influencing the growth and division of Pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.*, 36, 193-196.
- VON ARNOLD S. et ERIKSSON T., 1977. - A revised medium for growth of Pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.*, 39, 257-260.
- WAKASSA K., 1973. - Isolation of protoplasts from various plant organs. *Jpn. J. Genet.*, 48, 279-289.
- WALLIN A., GLIMELIUS K. et ERIKSSON T., 1977. - Pretreatment of cell suspensions as a method to increase the protoplast yield of Haplopappus gracilis. *Physiol. Plant.*, 40, 303-311.
- WATTS J.W., MOTOYOSHI F. et KING J.M., 1974. - Problems associated with the production of stable protoplasts of cells of Tobacco mesophyll. *Ann. Bot.*, 38, 667-671.

- WHITE D.W.R. et BHOJWANI S.S., 1981. - Callus formation from Trifolium arvense protoplast-derived cells plated at low densities. Z. Pflanzenphysiol., 102, 257-261.
- WILSON H.M., STYER D.J., CONRAD P.L., DURBIN R.D. et HELGESON J.P., 1980. - Isolation of sterile protoplasts from unsterilized leaves. Plant Sci. Lett., 18, 151-154.
- WRIGHT D.C., 1985. - Factors affecting isolation of protoplasts from leaves of grape (Vitis vinifera). Plant Cell Tissue Organ Culture, 4, 95-100.
- XU Z.H., DAVEY M.R. et COCKING E.C., 1981. - Isolation and sustained division of Phaseolus aureus (Mung bean) root protoplasts. Z. Pflanzenphysiol., 104, 289-298.
- ZAPATA F.J., EVANS P.K., POWER J.B. et COCKING E.C., 1977. - The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of Lycopersicon esculentum and Lycopersicon peruvianum. Plant Sci. Lett., 8, 119-124.
- ZAPATA F.J. et SINK K.C., 1981. - Somatic embryogenesis from Lycopersicon peruvianum leaf mesophyll protoplasts. Theor. Appl. Genet., 59, 265-268.
- ZAPATA F.J., SINK K.C. et COCKING E.C., 1981. - Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three Lycopersicon species: L. esculentum cv. Walter, L. pimpinillifolium and L. hirsutum, L. glabratum. Plant Sci. Lett., 23, 41-46.

RESUME

L'augmentation du rendement des cultures de protoplastes de Chicorée Witloof (initialement de 0,1% à 1%) représente une étape essentielle, préalable à toute insertion des protoplastes dans des programmes d'amélioration de l'espèce. A cet effet nous avons précisé l'importance d'un certain nombre de facteurs tels que le conditionnement des plantes donatrices, la nature des enzymes, la composition des milieux de culture et les conditions d'environnement.

C'est à partir de plantules âgées de 15 jours, issues d'akènes noirs (génotype AxB) et cultivées sur un milieu de HELLER sous une photopériode de 16 heures (environ 4000 lux) que l'on obtient le plus grand nombre de protoplastes vivants. Parmi les préparations enzymatiques essayées c'est le mélange caylase-345 et caylase-M2 qui s'est révélé le plus efficace.

La purification des protoplastes (coussin de saccharose à 12,5%), l'amélioration de l'efficacité des milieux de culture (utilisation du sorbitol au lieu du mannitol, modification des concentrations en substances de croissance...) et des conditions d'environnement (température, durée de la phase obscure...) permettent d'obtenir au septième jour jusqu'à 80% de microcals par rapport aux protoplastes mis en culture.

La croissance de ces microcals nécessite de remplacer le milieu liquide initial par un milieu moins riche en substances de croissance et la suspension de microcals (10000/ml) est alors étalée sur un milieu solidifié par de l'Agarose.

L'induction des bourgeons n'est possible qu'après une phase de prolifération leur permettant d'atteindre un diamètre supérieur à 3 mm.

En exploitant ces différents résultats nous obtenons un rendement de 5 à 6% en minicals ce qui représente une nette amélioration par rapport aux résultats antérieurs.

Mots clés : Protoplastes: isolement et culture - Régénération - Cichorium intybus L. - Substances de croissance.

