

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité:

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

présentée

par M. ENGELMANN Florent

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse:

CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS SOMATIQUES
DE PALMIER A HUILE (Elaeis guineensis Jacq.)
MISE AU POINT DES CONDITIONS
DE SURVIE ET DE REPRISE.

soutenue le 15 Décembre 1986

devant le jury composé de:

M. D.CÔME

Président

M. J.C.COURDUROUX

M. E.MIGINIAC

} Rapporteurs

M. M.OLLAGNIER

M. V.PETIARD

} Examineurs

M. J.DEREUDDRE

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte (CNRS).

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur CÔME, Directeur du Laboratoire, Monsieur SOUDAIN, Responsable de l'équipe "Organes Végétatifs" et Monsieur DEREUDDRE qui a dirigé ces recherches.

Je suis très reconnaissant à Messieurs les Professeurs COURDUROUX et MIGINIAC d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie également Messieurs OLLAGNIER et PETIARD pour leur participation au Jury.

Ces recherches ont pu être menées à leur terme grâce aux soutiens de l'Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux (IRHO), Département du Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) et du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

Les expériences de microcalorimétrie différentielle à balayage ont été effectuées au Centre de Recherche Claude Delorme, de la Société l'Air Liquide. Que les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie C. PANNETIER et Y. DUVAL pour l'aide qu'ils m'ont apportée et l'intérêt qu'ils ont toujours manifesté concernant l'évolution de mon travail.

Je remercie également le personnel du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'ORSTOM (Bondy) et mes collègues du Laboratoire pour la sympathie et l'amitié qu'ils m'ont témoignées depuis quatre ans.

Enfin, Madame DAUBINET, du POVAR et Madame VASSET de l'IRHO, ont eu la lourde tâche de dactylographier ce mémoire. Je les remercie de leur courage, de leur efficacité et de leur gentillesse.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GÉNÉRALITÉS SUR LES TECHNIQUES DE CONSERVATION</u>	3
1. <u>NÉCESSITÉ DE LA CONSERVATION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES</u>	3
2. <u>INTÉRÊTS ET INCONVÉNIENTS DE LA CULTURE DE TISSUS POUR LA CONSERVATION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES</u>	4
3. <u>LA CONSERVATION À MOYEN TERME</u>	6
4. <u>LA CONSERVATION À LONG TERME</u>	7
4.1. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	7
4.2. LES SUBSTANCES CRYOPROTECTRICES	8
4.3. APPLICATIONS ACTUELLES DES TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION	9
A) PROTOPLASTES, CELLULES, CALS	9
B) MÉRISTÈMES	10
C) EMBRYONS	11
4.4. CONFORMITÉ DU MATÉRIEL RÉGÉNÉRÉ ET DURÉE DE STOCKAGE DANS L'AZOTE LIQUIDE	13

	Pages
<u>CHAPITRE I MATÉRIEL ET TECHNIQUES</u>	15
1. <u>MATÉRIEL VÉGÉTAL</u>	15
1.1. PRÉSENTATION DE LA PLANTE	15
A) PLACE DANS LA CLASSIFICATION	15
B) ECOLOGIE DU PALMIER À HUILE	16
C) APPAREIL VÉGÉTATIF	16
D) APPAREIL REPRODUCTEUR	18
E) PRODUCTION D'HUILE	20
1.2. PROGRAMME DE SÉLECTION DE L'IRHO	21
1.3. MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE IN VITRO DU PALMIER À HUILE	23
A) HISTORIQUE	23
B) DESCRIPTION DU PROCÉDÉ ORSTOM/IHRO	25
C) VÉRIFICATION DE LA CONFORMITÉ DU MATÉRIEL CLONAL	28
D) PLACE DES TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION DANS LE CYCLE DE MULTIPLICATION IN VITRO DU PALMIER A HUILE	30
1.4. CLONES UTILISÉS EN CRYOCONSERVATION	30

2. <u>TECHNIQUES</u>	31
2.1. TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO	31
A) ENTRETIEN DES CULTURES	31
B) OBTENTION DES EMBRYONS DESTINÉS A LA CONGÉLATION	32
2.2. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS SOMATIQUES	33
A) PRÉTRAITEMENT OU PRÉCULTURE	33
a) <u>Cas des embryons en multiplication</u>	33
b) <u>Cas des structures embryogènes</u>	35
B) CONGÉLATION	35
a) <u>Refroidissement rapide</u>	35
b) <u>Refroidissement en deux étapes</u>	35
C) RÉCHAUFFEMENT	40
D) POST-TRAITEMENT	40
a) <u>Cas des embryons somatiques</u>	40
b) <u>Cas des structures embryogènes</u>	41
2.3. ÉTUDE DE LA CRISTALLISATION DANS DES MASSIFS D'EMBRYOÏDES	41
A) ANALYSE THERMIQUE SIMPLE	41
B) ANALYSE PAR MICROCALORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE A BALAYAGE (D.S.C.)	43
2.4. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES EMBRYOÏDES	43
A) VIABILITÉ	43
a) <u>Survie</u>	44
b) <u>Reprise de la prolifération</u>	45

	Pages
B) TENEUR EN SACCHAROSE	45
C) TENEUR EN EAU	46
D) CROISSANCE PONDÉRALE	47
E) ETUDE HISTOLOGIQUE	47
<u>CHAPITRE II OBTENTION DES EMBRYOÏDES DESTINÉS À LA</u> <u>CONGÉLATION</u>	50
<u>1. EFFETS DE LA COMPOSITION DU MILIEU SUR LA PRODUCTION</u> <u>D'EMBRYOÏDES</u>	50
1.1. NOMBRE D'EMBRYOÏDES UTILISABLES PAR TUBE DE CULTURE	53
1.2. NOMBRE MOYEN D'EMBRYOÏDES PAR MASSIF	55
1.3. NOMBRE MOYEN DE MASSIFS PAR TUBE DE CULTURE	55
1.4. EFFETS DES DIFFÉRENTS MILIEUX SUR LE COMPORTEMENT DES CULTURES	58
A) ASPECT DES CULTURES	58
B) POIDS DE MATIÈRE FRAÎCHE DES MASSIFS D'EMBRYOÏDES EN FONCTION DE LEUR MILIEU D'OBTENTION	58

<u>2. ETUDE COMPARÉE DE L'ÉVOLUTION D'UNE CULTURE D'EMBRYOÏDES SUR LES MILIEUX D'OBTENTION ET DE MULTIPLICATION</u>	61
2.1. EVOLUTION DU POIDS DE MATIÈRE FRAÎCHE	61
2.2. EVOLUTION DU NOMBRE DE MASSIFS UTILISABLES POUR LA CONGÉLATION	68
2.3. EVOLUTION DU NOMBRE DE POUSSÉS FEUILLÉES	68
2.4. EFFETS DU REMPLACEMENT PARTIEL DU SACCHAROSE PAR DU MANNITOL	69
2.5. EFFETS DE L'ACCROISSEMENT DE LA DURÉE DE CULTURE	69
3. <u>DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS</u>	71
<u>CHAPITRE III EFFETS DU PRÉTRAITEMENT SUR LA SURVIE ET LA REPRISE DES EMBRYOÏDES APRÈS UNE CONGÉLATION RAPIDE</u> . .	73
1. <u>EFFETS DU PRÉTRAITEMENT SUR LE TAUX DE SURVIE</u>	74
1.1. EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES AVEC LE SACCHAROSE	74
. <u>Survie des massifs témoins</u>	77
. <u>Survie des massifs congelés</u>	77

	Pages
1.2. EFFETS D'AUTRES SUBSTANCES CRYOPROTECTRICES UTILISÉES SEULES OU EN MÉLANGE	78
A) EFFETS COMPARÉS DU SACCHAROSE ET DU SORBITOL	78
. <u>Survie des massifs témoins</u>	78
. <u>Survie des massifs congelés</u>	80
B) EFFETS DU DIMÉTHYLSULFOXYDE (DMSO)	82
. <u>Survie des massifs témoins</u>	82
. <u>Survie des massifs congelés</u>	84
2. <u>EFFETS DU PRÉTRAITEMENT SUR LE TAUX DE REPRISE DES MASSIFS TÉMOINS</u>	86
2.1. EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES AVEC LE SACCHAROSE	87
2.2. EFFETS D'AUTRES SUBSTANCES CRYOPROTECTRICES	87
A) EFFETS COMPARÉS DU SACCHAROSE ET DU SORBITOL	87
B) EFFETS DU DMSO	89
3. <u>COMPORTEMENT DES EMBRYOÏDES PENDANT LE PRÉTRAITEMENT ET LE POST-TRAITEMENT</u>	91
3.1. ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN EAU	92
3.2. ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN SACCHAROSE	93
3.3. ÉVOLUTION PONDÉRALE	93
3.4. ÉTUDE HISTOLOGIQUE DES EMBRYOÏDES	96

	Pages
4. <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	99
<u>CHAPITRE IV EFFETS DU POST-TRAITEMENT SUR LA REPRISE DE LA PROLIFÉRATION DES MASSIFS D'EMBRYOÏDES APRÈS CONSERVATION DANS L'AZOTE LIQUIDE</u>	106
1. <u>OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES SUR LES STRUCTURES EMBRYOGÈNES</u>	107
2. <u>CONDITIONS D'UTILISATION DU 2,4-D</u>	112
2.1. CHOIX D'UNE CONCENTRATION ET D'UNE DURÉE D'APPLICATION	112
2.2. CHOIX DU MOMENT D'APPLICATION	121
3. <u>INFLUENCE DU 2,4-D SUR LE COMPORTEMENT ULTÉRIEUR DES MASSIFS EN FONCTION DE LA DURÉE DU PRÉTRAITEMENT</u>	124
3.1. SURVIE ET REPRISE DE LA PROLIFÉRATION	125
A) SURVIE	125
B) REPRISE DE LA PROLIFÉRATION	128
3.2. ÉVOLUTION DU POIDS DE MATIÈRE FRAÎCHE DES MASSIFS	129

	Pages
A) PRÉTRAITEMENT DE 7 JOURS	130
B) PRÉTRAITEMENT DE 0, 3 ET 5 JOURS	132
4. <u>EFFETS D'UN TRAITEMENT PROLONGÉ EN PRÉSENCE DE 2,4-D</u> .	136
5. <u>EFFETS DE LA DURÉE DE STOCKAGE DANS L'AZOTE LIQUIDE</u> . .	139
6. <u>OBTENTION DE PLANTULES</u>	139
7. <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	144
<u>CHAPITRE V EFFETS DU MODE DE CONGÉLATION SUR LA SURVIE</u> <u>ET LA REPRISE DE LA PROLIFÉRATION DES MASSIFS D'EMBRYOÏDES</u>	151
1. <u>EFFETS DE LA VITESSE DE CONGÉLATION</u>	151
1.1. SURVIE	152
1.2. REPRISE	154
1.3. COMPORTEMENT ULTÉRIEUR DES MASSIFS	155
	.../...

	Pages
2. <u>EFFETS DE LA TEMPÉRATURE DE PRÉREFROIDISSEMENT</u>	160
2.1. SURVIE	161
2.2. REPRISE	164
3. <u>ETUDE DU REFROIDISSEMENT ET DE LA CRISTALLISATION DANS LES MASSIFS D'EMBRYOÏDES</u>	165
3.1. ANALYSE THERMIQUE SIMPLE	165
3.2. ANALYSE MICROCALORIMÉTRIQUE DIFFÉRENTIELLE A BALAYAGE	170
4. <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	179
<u>DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION</u>	188
<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	196

INTRODUCTION

Le palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.) est la plante oléagineuse dont le rendement en huile est le plus élevé. La production des variétés sélectionnées en cours de diffusion peut en effet atteindre, dans des conditions écologiques favorables, 6 à 7 tonnes d'huile par hectare et par an. Le développement de la culture du palmier à huile s'est accéléré depuis 20 ans, particulièrement en raison du déficit en corps gras qui existe dans la plupart des pays en voie de développement. La production annuelle d'huile de palme est ainsi passée pendant cette période de 1,5 à 6,3 millions de tonnes, soit 15 % de l'huile végétale (NOIRET et al. , 1985).

La multiplication végétative in vitro du palmier à huile qui a été mise au point, en France, par l'ORSTOM et l'IRHO et améliorée au cours des 10 dernières années, va permettre d'augmenter la productivité des plantations en introduisant les individus d'élite obtenus grâce aux programmes de sélection.

Cette technique de micropropagation, qui utilise la voie de l'embryogenèse somatique, est en cours d'industrialisation. Ainsi, dans le laboratoire de la Station de Recherche IRHO - CIRAD de La Mé (Côte d'Ivoire) 150 clones ont déjà été créés (DURAND-GASSELIN et al. , 1986). En Malaisie et en Indonésie, d'autres laboratoires sont récemment entrés en activité qui devraient assurer la création de 100 clones par an et la production de plusieurs millions de plantules (NOIRET et al. , 1985). La création régulière de nouveaux clones pose des problèmes pratiques de gestion. En effet, l'entretien des cultures nécessite des repiquages réguliers et l'apport constant de matériel végétal in vitro implique une augmentation

de la surface des salles de culture et des coûts liés à la main d'oeuvre et au matériel. Enfin, le maintien de matériel en conditions artificielles pendant plusieurs années présente des risques pour la stabilité génétique du matériel, risques qui augmentent avec la durée de sa culture in vitro et la présence de régulateurs de croissance exogènes dans le milieu (REISCH, 1984). Cette pratique peut en effet conduire à une perte de la conformité des vitro-plants par rapport à l'individu de départ.

Cette possibilité vient d'ailleurs d'être illustrée par des résultats récents obtenus sur le palmier à huile par CORLEY et al. (1986) : le nombre d'arbres issus de matériel clonal présentant des anomalies graves de développement augmente avec la durée de son entretien en culture in vitro. Les conséquences sont d'autant plus graves que l'on a affaire à une plante pérenne cultivée industriellement.

La seule méthode susceptible d'assurer à la fois le maintien des caractéristiques des cultures, leur stockage dans un faible volume à l'abri des contaminations et un entretien réduit, est la cryoconservation, c'est-à-dire la conservation à très basse température, généralement celle de l'azote liquide (-196°C). A cette température, en effet, les divisions cellulaires sont bloquées et tous les processus métaboliques sont arrêtés (KARTHA, 1981). Le matériel végétal peut être ainsi conservé sans altérations ni modifications pendant une durée théoriquement indéfinie.

Le travail présenté dans ce mémoire rend compte des résultats concernant la mise au point d'une technique de conservation des embryons somatiques de palmier à huile à la température de l'azote liquide.

../...

GÉNÉRALITÉS SUR LES TECHNIQUES DE CONSERVATION

Si la résistance au gel des végétaux a fait l'objet de recherches depuis longtemps, ce n'est que depuis 1968 que des travaux sur la cryoconservation de cellules, de tissus ou d'organes végétaux cultivés in vitro ont été entrepris. Au moins deux arguments peuvent être avancés pour justifier de telles études : les perspectives offertes par la culture in vitro et la conservation des génotypes sauvages nécessaires à l'amélioration des plantes.

1. NÉCESSITÉ DE LA CONSERVATION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES

Les collections de ressources génétiques font partie intégrante des programmes de sélection. Les pratiques agricoles modernes et le choix de variétés très performantes ont entraîné la perte de nombreuses espèces sauvages et de cultivars primitifs qui sont à l'origine de la variabilité génétique (KING et ROBERTS, 1979). De plus, les variétés nouvelles ont souvent une base génétique réduite. Si cette approche est satisfaisante à court terme, elle a pour conséquence une réduction des potentialités d'adaptation des espèces cultivées face à des modifications de l'environnement et aux attaques d'agents pathogènes.

Pour de nombreuses espèces végétales, les graines, dites "orthodoxes", représentent le moyen de stockage habituel. Cependant, même parmi ces espèces, certaines graines, comme celles des Légumineuses, peuvent être infectées par des agents

.../...

pathogènes endogènes; d'autres sont très hétérozygotes et ne conviennent donc pas pour la conservation de ces variétés (KARTHA, 1981). Pour d'autres espèces, les semences sont dites "récalcitrantes" (ROBERTS, 1973) : elles ne supportent ni la déshydratation, ni l'abaissement de température généralement utilisés dans les techniques de conservation. Parmi ces espèces, dont les graines ont une durée de vie ne pouvant excéder quelques mois, on trouve des représentants de groupes végétaux très divers : arbres fruitiers et forestiers, plantes à composés aromatiques ou stimulants, plantes productrices d'huiles végétales, plantes à intérêt horticole ou médicinal (ROBERTS et KING, 1980). La maintenance des espèces qui sont habituellement propagées végétativement nécessite également l'entretien de collections en champ, solution qui est à la fois coûteuse et dangereuse, car le matériel reste exposé à tous les risques inhérents à la culture en conditions naturelles.

2. INTÉRÊTS ET INCONVÉNIENTS DE LA CULTURE DE TISSUS POUR LA CONSERVATION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES

L'application des techniques de cultures de tissus, dont le développement a été très important au cours des 20 dernières années, est particulièrement intéressante pour la conservation des ressources génétiques des plantes à graines récalcitrantes ou multipliées végétativement. Ces techniques permettent notamment, pour de nombreuses espèces, de produire des plantes exemptes de virus et d'obtenir des taux de multiplication élevés comme dans le cas du caféier ou du palmier à huile, qui sont susceptibles d'être multipliés par embryogénèse adventive. Le stockage des embryons peut être envisagé pour remplacer la conservation de la graine. Dans le cas de

../...

croisements incompatibles qui provoquent un avortement rapide des embryons, la culture in vitro peut également permettre la poursuite de leur développement s'ils sont prélevés suffisamment tôt dans l'ovule fécondé. Enfin, la culture de matériel haploïde (anthères, embryons polliniques) est particulièrement intéressante dans les programmes de sélection.

Cependant, la conservation du matériel in vitro en croissance continue ne permet pas de garantir le maintien à long terme de ses caractéristiques. La stabilité d'une culture dépend en effet de la composition cellulaire de l'explant qui peut être hétérogène et du procédé de culture lui-même (fréquence des repiquages, emploi de régulateurs de croissance exogènes) qui peut être à l'origine d'événements déstabilisants (SCOWCROFT, 1984 ; WITHERS, 1986) et provoquer des anomalies du caryotype (d'AMATO, 1978). Le passage, au cours du procédé de multiplication, par un stade cal, c'est-à-dire un retour à un mode de croissance non organisé, est souvent inducteur d'une perte de conformité (BAYLISS, 1980). Lorsque l'objectif est la conservation des souches, le stockage de cals ou de suspensions cellulaires peut être envisagé à condition de vérifier que les plantes régénérées à partir de ces cultures conservent leur génotype de départ. Cependant, du point de vue de la conformité, il apparaît nettement plus souhaitable de conserver des organes dans lesquels les corrélations sont maintenues. Il en est ainsi des méristèmes, des embryons somatiques et des embryons zygotiques (KARTHA, 1981).

Selon le but recherché, conservation à moyen ou à long terme des espèces végétales cultivées in vitro, deux approches différentes peuvent être envisagées : la conservation par diminution de la vitesse de croissance et la conservation par arrêt de la croissance (cryoconservation).

../...

3. LA CONSERVATION A MOYEN TERME

La réduction de la croissance du matériel cultivé in vitro est obtenue par divers moyens, qui peuvent être employés seuls ou simultanément. Parmi les procédés utilisés, on peut citer :

- La réduction de la température de culture et de l'éclairage (GALZY, 1969 ; MULLIN et SCHLEGEL, 1976 ; DALE, 1980 ; HENSHAW et al., 1980 ; STARITSKY et al., 1986 ; WANAS et al., 1986).
- L'emploi de milieux appauvris en source carbonée (KARTHA et al., 1981).
- L'induction d'un stress osmotique dans le milieu par addition de mannitol ou de glycérol (WESCOTT, 1981 a ; HUNTER, 1986 ; STARITSKY et al., 1986).
- L'utilisation d'inhibiteurs de croissance, tels que l'acide abscissique (WESCOTT, 1981 b ; MIX, 1983).
- Le maintien des cultures en hypoxie par utilisation de mélanges gazeux appauvris en oxygène (BRIDGEN et STABY, 1981) ou d'huile minérale recouvrant les cultures (CAPLIN, 1959 ; AUGEREAU, 1985).

Ces différentes méthodes permettent d'espacer les repiquages mais nécessitent encore d'importantes installations et laissent le matériel exposé aux risques de contamination. Enfin, les risques de dérive génétique ne sont pas entièrement supprimés. Ces techniques ne sont donc utilisables que pour la conservation à moyen terme.

.../...

4. LA CONSERVATION À LONG TERME.

Elle implique un arrêt total du métabolisme cellulaire qui peut être obtenu en stockant le matériel à la température de l'azote liquide (-196°C).

La cryoconservation a d'abord été appliquée pour conserver des spermatozoïdes d'espèces animales (POLGE et al. , 1949 ; LOVELOCK et BISHOP , 1959) puis des embryons de souris (WHITTINGHAM et al. , 1972 ; WILMUT , 1972). Ce dernier matériel a été utilisé ensuite comme modèle pour des études plus approfondies (RENARD et BABINET , 1984 ; RALL et al. , 1984 ; RALL et FAHY , 1985). Ces techniques ont pu être appliquées à de nombreux types cellulaires, notamment aux cellules sanguines et aux cellules de moëlle osseuse (ASHWOOD et SMITH , 1980). Les techniques mises au point ont ainsi permis de faire résister successivement des embryons de bovins (POLGE et al. , 1974 ; WILLADSEN et al. , 1978) , d'ovins (POLGE et al. , 1974 ; WILLADSEN et al. , 1976) ; de porcins (POLGE et al. , 1974) , de chevaux (CZLONKOWSKA et al. , 1985 ; SLADE et al. , 1985) , puis plus récemment, des embryons humains (TESTARD et al. , 1986). En Biologie Végétale, l'utilisation des techniques de cryoconservation est beaucoup plus récente puisque le premier résultat positif n'a été obtenu qu'en 1968 par QUATRANO avec une suspension cellulaire de lin.

4.1. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Il comporte plusieurs étapes successives pour lesquelles des conditions optimales doivent être définies.

Le prétraitement ou préculture, d'une durée d'un ou plusieurs jours, est en général effectué sur un milieu solide ou en milieu liquide, dont les pressions osmotiques ont été aug-

../...

mentées par l'addition de substances cryoprotectrices.

La congélation peut être ultra-rapide (plusieurs milliers de degrés par minute) par immersion directe des échantillons dans l'azote liquide, rapide (quelques dizaines à quelques centaines de degrés par minute) ou lente (0,1 à quelques degrés par minute).

Le refroidissement peut se faire en une seule ou plusieurs étapes : dans ce dernier cas, les échantillons sont d'abord refroidis jusqu'à une température de prérefroidissement déterminée (généralement -40°C ou -100°C), grâce à un congélateur programmable. Ils sont ensuite plongés dans l'azote liquide.

Le réchauffement, en général rapide, est réalisé en immergeant le matériel dans un bain-marie thermostaté à $37-40^{\circ}\text{C}$.

Le post-traitement consiste en une remise en culture du matériel dans des conditions favorisant la reprise de sa croissance ; elles peuvent être différentes des conditions standard de culture (addition d'hormones de croissance ou de charbon actif par exemple).

4.2. LES SUBSTANCES CRYOPROTECTRICES

Les substances cryoprotectrices utilisées sont de natures très différentes : ce sont soit des sucres (saccharose, glucose) ou des polyols (sorbitol, mannitol, glycérol), soit d'autres composés comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), le polyéthylène-glycol, ou des acides aminés (proline).

Le mode d'action de ces composés est encore mal connu. On distingue des agents cryoprotecteurs ayant un rôle "colligatif" qui ne dépend que du nombre de molécules par unité de

../...

volume, comme la pression osmotique. Ils agissent en déshydratant les cellules de l'échantillon à congeler du fait de leur concentration élevée dans le milieu cryoprotecteur. D'autres composés, comme le diméthylsulfoxyde, ont un rôle "non colligatif" : ces substances peuvent pénétrer dans les cellules ; elles élèveraient ainsi la concentration du cytoplasme et agiraient également sur la préservation de l'intégrité structurale des membranes au cours de la congélation (FINKLE et al. , 1985 a).

4.3. APPLICATIONS ACTUELLES DES TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION

Depuis les premières expériences de QUATRANO (1968), les techniques de cryoconservation ont été appliquées à de nombreux matériels végétaux.

A) PROTOPLASTES, CELLULES, CALS

Des suspensions cellulaires ou des protoplastes de plus de 40 espèces différentes ont été congelées à la température de l'azote liquide (WITHERS, 1986). Cette technique est utilisée en routine dans certains laboratoires pour le stockage de suspensions cellulaires aux caractéristiques particulières (WITHERS, 1983).

La cryoconservation de cals a également été réalisée, dans le cas du peuplier (SAKAI et SUGAWARA, 1973), de la canne à sucre (ULRICH et al. , 1979) du palmier-dattier (ULRICH et al. , 1982), de la lavande (WATANABE et al. , 1983), de l'orme (ULRICH et al. 1984 b), du riz (ULRICH et al. , 1984 a) et de la luzerne (FINKLE et al. , 1985b) .

B) MÉRISTÈMES

Les méristèmes représentent également une source de matériel fréquemment employé en cryoconservation (KARTHA, 1985 ; SAKAI, 1985 ; HENSHAW et al. , 1985). Les méristèmes sont généralement prélevés sur des plantes cultivées en serre ou en conditions naturelles. Des méristèmes prélevés sur du matériel déjà introduit in vitro n'ont été que récemment utilisés dans le cas du fraisier (KARTHA et al. , 1980), de la pomme de terre (TOWILL, 1983) et de l'oeillet (GALERNE, 1985 ; FABRE, 1986).

C) EMBRYONS

La cryoconservation des embryons somatiques, zygotiques ou polliniques n'a jusqu'à présent fait l'objet que d'un nombre limité de travaux publiés, qui sont présentés dans le tableau 1 . Ce tableau illustre la diversité de conditions à définir pour la cryoconservation des embryons.

Ainsi, si les substances cryoprotectrices les plus employées sont le DMSO, le saccharose et le glycérol, leur concentration peut varier de manière importante en fonction du matériel. Ces substances sont généralement employées en mélange binaires ou ternaires, l'utilisation de mélanges de cryoprotecteurs en faibles concentrations s'avérant parfois moins toxique et plus efficace que l'emploi d'un seul des constituants du mélange avec la même concentration totale (FINKLE et al. , 1985 a) .

De même, diverses méthodes de congélation peuvent être utilisées : immersion directe du matériel dans l'azote liquide (embryons zygotiques de Brassica napus, de Cocos nucifera), congélation rapide en paillettes (embryons zygotiques de colza), congélation lente (embryons somatiques de carotte).

Matériel	Cryoprotectant	Vitesses de congélation	Réponse	Auteurs
<u>Embryons somatiques</u>				
<i>Daucus carota</i>	5% 10% DMSO	1 → 2°C mn ⁻¹		- DOUGALL et WETHERELL, 1974
	10% DMSO + dessiccation	2°C mn ⁻¹ 5°C mn ⁻¹ 10°C mn ⁻¹ , 65°C mn ⁻¹	jusqu'à 30% de survie pro embryons → embryogenèse normale, cals ou plantes	- WITHERS, 1979
<u>Embryons polliniques (anthers)</u>				
1 <i>Arachis hypogea</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C mn ⁻¹ , rapide	29 → 38% de survie, cals, pousses feuillées	- BAJAJ, 1983 a
2 <i>Arachis villosa</i>	- - -	- -	-	" "
3 <i>Atropa belladonna</i>	5% DMSO + 10% DMSO	2°C mn ⁻¹	plantes entières haploïdes	- BAJAJ, 1976, 1977, 1978 a
4 <i>Brassica campestris</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C mn ⁻¹ , rapide	31 → 44% de survie cals, plantes	- BAJAJ, 1983 a
5 <i>Brassica napus</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	- -	-	- BAJAJ, 1983 a
6 <i>Gossypium arboreum</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C mn ⁻¹ , rapide	34% de survie de cals issus de pollen et d'anthers	- BAJAJ, 1982
7 <i>Nicotiana glauca</i>	5% DMSO ; 10% DMSO	2°C mn ⁻¹	androgenèse, plantes entières	- BAJAJ, 1977, 1978 a et b
8 <i>Oryza sativa</i>	5% DMSO	1 à 3°C mn ⁻¹	embryons cals, plantes entières haploïdes	- COULIBALY et DEMARLY, 1979
9 <i>Oryza sativa</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	rapide	cals, plantes entières haploïdes	- BAJAJ, 1980 a
10 <i>Petunia hybrida</i>	7% DMSO	2°C mn ⁻¹	cals	- BAJAJ, 1978 a
11 <i>Primula obconica</i>	7% DMSO + 7% saccharose	rapide	androgenèse, plantes entières	- BAJAJ, 1981 a
12 <i>Triticum aestivum</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C mn ⁻¹ , rapide	5 → 19% de survie cals, pousses feuillées	- BAJAJ, 1983 a
<u>Embryons nucellaires (ovules)</u>				
<i>Citrus</i> spp.	7% DMSO + saccharose 4%	ultra-rapide	pseudobulbilles et pousses feuillées	- BAJAJ, 1985 b
<u>Embryons zygotiques</u>				
1 <i>Brassica napus</i>	10% DMSO	ultra-rapide ; rapide	15% callogenèse extrême mité racinaire	- WITHERS, 1982
"	5 → 10% DMSO	rapide	26 → 70% de survie, plantes	- SAUBAULT, 1985
2 <i>Capsella bursa-pastoris</i>	30% saccharose	rapide	70% survie	- MONNIER et LEDDET, 1980
3 <i>Cocos nucifera</i>	7% DMSO + 4% saccharose	ultra-rapide	embryons : élongation fragments d'embryons : prolifération	- BAJAJ, 1985 b
4 <i>Elaeis guineensis</i>	dessiccation	ultra-rapide	plantes entières	- GROUT et al., 1983
5 <i>Gossypium arboreum</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C mn ⁻¹ , rapide	42% callogenèse	- BAJAJ, 1982
6 <i>Hordeum vulgare</i>	10% DMSO	ultra-rapide ; rapide 1°C mn ⁻¹	75 → 100% survie + plantes	- WITHERS, 1982
7 <i>Oryza sativa</i>	0	-	83% cals/pousses feuillées	- BAJAJ, 1981 b
8 <i>Phaseolus vulgaris</i>	10% PEG + 2% glucose + 10% DMSO	rapide	53% survie / croissance	- ZAVALA et SUSSEX, 1986
9 <i>Triticale</i>	10% DMSO + 4% saccharose	-	73% cals/plantes entières	- BAJAJ, 1984
10 <i>Triticum aestivum</i>	10% DMSO + 4% saccharose	rapide	70% cals/plantes entières	- BAJAJ, 1980 b
"	10% PEG + 8% glucose + 10% DMSO	rapide	70% survie / cals / plantes entières	- ZAVALA et SUSSEX, 1986
11 <i>Sea Hays</i>	5 → 15% DMSO	ultra-rapide	plantes entières	- WITHERS, 1978

Tabl. 1 : Résumé des principaux travaux effectués sur la cryoconservation des embryons végétaux.

Pour une même espèce, les conditions à utiliser peuvent être différentes selon les variétés ou selon les auteurs : pour la cryoconservation d'embryons polliniques de riz, COULIBALY et DEMARLY (1979) utilisent du DMSO et une congélation lente avec la variété Cigalon, alors que BAJAJ (1980a) emploie un mélange de DMSO, de glycérol et de saccharose et une congélation rapide pour la cryoconservation d'embryons de la variété Basmati 370.

La taille et le stade de développement des embryons peuvent également conditionner la réussite d'un processus de cryoconservation : WITHERS (1980) et HENSHAW (1982) indiquent que les embryons doivent être utilisés aux premiers stades de leur développement. Ils doivent être suffisamment petits (stades globulaire, coeur, torpille) et formés de cellules méristématiques pour résister à la congélation mais suffisamment développés pour pouvoir être cultivés in vitro : ainsi les embryons zygotiques de colza doivent avoir une taille comprise entre 100µm et 1mm (BAUBAULT, 1985, com.pers.) . Les embryons trop différenciés ne résistent que partiellement à la congélation et ne peuvent donner directement des plantes entières, sans passage par une phase de callogenèse intermédiaire (WITHERS, 1979) .

Enfin, pour résister à la congélation, les embryons doivent pouvoir supporter une déshydratation partielle préalable. C'est le cas notamment des embryons zygotiques de palmier à huile (GROUT et al. , 1983) ou d'orge (WITHERS, 1982) . WITHERS (1982) attribue principalement à une mauvaise résistance à la déshydratation les difficultés rencontrées pour la congélation d'embryons zygotiques de colza.

.../...

4.4. CONFORMITÉ DU MATÉRIEL RÉGÉNÉRÉ ET DURÉE DE STOCKAGE DANS L'AZOTE LIQUIDE

Le stockage de matériel dans l'azote liquide n'a d'intérêt que si ses caractéristiques sont conservées. Les premiers résultats concernant la conservation des capacités de régénération des cals ont été obtenus sur le palmier-dattier (ULRICH et al. , 1982) et le blé (CHEN et al. , 1985). Il en est de même pour des suspensions cellulaires de carotte et de tabac (BAJAJ, 1976). Les capacités embryogènes de cultures de cellules de carotte (NAG et STREET, 1973) sont maintenues après cryoconservation. En pharmacologie, la production d'alcaloïdes de diverses souches cellulaires de Catharanthus roseus (CHEN et al. , 1984a et b ; AUGEREAU , 1985), la synthèse de biotine par des cals de Lavandula vera (WATANABE et al. , 1983), la synthèse de stéroïdes par des cals de Dioscorea (BUTENKO et al., 1984), les capacités de biotransformations des suspensions cellulaires de Digitalis lanata (SEITZ et al. , 1983), ne paraissent pas modifiées de façon sensible par les différents traitements. Des résultats similaires ont été obtenus concernant la résistance à des analogues structuraux des acides aminés (HAUPTMANN et WIDHOLM, 1982 ; STRAUSS et al. , 1985), la synthèse d'anthocyanes (DOUGALL et WHITTEN , 1980) . La capacité à former des tubercules chez la pomme de terre est également conservée (BAJAJ, 1978c). Enfin, une suspension cellulaire de Lavandula vera soumise à des congélations et à des réchauffements répétés conserve ses capacités de synthétiser de la biotine ainsi que ses potentialités organogènes (WATANABE et al. , 1985).

Pendant la période de stockage dans l'azote liquide, le matériel végétal, qui n'évolue plus, reste cependant soumis à la radioactivité naturelle; des risques de mutation ou de diminution de la viabilité persistent donc, mais ils ne deviendraient appréciables qu'après des durées de conservation importantes, de l'ordre de plusieurs centaines d'années (ASHWOOD-SMITH et FRIEDMAN, 1979).

Les informations actuelles relatives à la conformité du matériel régénéré portent sur des durées de conservation beaucoup plus courtes et ne sont généralement que fragmentaires. Cependant, les premiers résultats obtenus sont encourageants pour l'utilisation de cette technique : ainsi, une suspension cellulaire de Digitalis lanata stockée 3 ans dans l'azote liquide (DIETRICH et al. , 1985) conserve ses potentialités de biosynthèse. KARTHA et al. (1980) ont produit des plants de fraisiers normaux à partir de méristèmes conservés 2 ans dans l'azote liquide. BAJAJ (1983b) obtient des plants d'arachide qui fructifient en donnant des graines normales après une conservation de méristèmes de 20 mois dans l'azote liquide. Enfin, BAJAJ (1985a) indique qu'aucune perte de la viabilité de méristèmes de pomme de terre et de manioc n'est observée après un stockage de 4 ans dans l'azote liquide.

Dans le cas des embryons, si seules des durées de stockage relativement courtes dans l'azote liquide ont été testées, des plantes entières ont cependant pu être régénérées après le réchauffement d'embryons somatiques de carotte (WITHERS, 1979) , d'embryons polliniques de belladone (BAJAJ, 1976), de chou (BAJAJ, 1983a), de tabac (BAJAJ, 1977), de riz (COULIBALY et DEMARLY, 1979, BAJAJ, (1980a), de primevère (BAJAJ, 1981a). Il en est de même avec des embryons zygotiques de palmier à huile (GROUT et al. , 1983), d'orge (WITHERS, 1982), de triticales (BAJAJ, 1984) et de maïs (WITHERS, 1978).

Ces résultats indiquent que la cryoconservation par elle-même ne semble pas induire de variabilité qui pourrait s'ajouter à celle apportée par la culture in vitro; ils permettent donc d'envisager la mise au point d'une technique de cryoconservation des embryoides de palmier à huile.

.../...

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1. MATÉRIEL VÉGÉTAL1.1. PRÉSENTATION DE LA PLANTEA) PLACE DANS LA CLASSIFICATION

Le palmier à huile a été décrit et dénommé par JACQUIN en 1763 sous le terme d'Elaeis guineensis Jacq. , car il est probablement originaire du Golfe de Guinée. Le palmier à huile appartient à la famille des Palmacées (Monocotylédones Spadiciflorales).

B) ÉCOLOGIE DU PALMIER À HUILE

C'est une plante héliophile qui demande au minimum 1500 heures d'ensoleillement par an. Son aire de peuplement naturel, limitée aux zones tropicales humides, indique d'importantes exigences en eau (1500 à 3000 mm par an) et en chaleur (25°C de température moyenne annuelle, SURRE et ZILLER, 1963). Les grandes exploitations industrielles sont donc réparties dans une zone qui s'étend entre les 7èmes parallèles nord et sud, et à une altitude inférieure à 400 m (Malaisie, Indonésie, Afrique équatoriale, Amérique Centrale).

C) APPAREIL VÉGÉTATIF

L'appareil végétatif comporte un stipe pouvant atteindre 30 à 35 mètres de haut, une couronne de feuilles décombantes de type composé penné et un bulbe racinaire d'où partent de nombreuses racines adventives (Fig. 1).

Le système racinaire du palmier à huile est extrêmement développé puisqu'il comprend 8 à 10 000 racines d'une longueur de 1 à 20 mètres, qui sont plusieurs fois ramifiées. Elles sont localisées pour leur plus grande partie dans les 50 premiers centimètres du sol et sont constamment renouvelées (SURRE et ZILLER 1963).

Le développement du stipe comporte 2 phases distinctes (SURRE et ZILLER, 1963). La phase de croissance transversale, qui dure de 4 à 6 ans, conduit à l'édification d'un plateau radiculaire de 25 à 60 cm de diamètre. Pendant cette période, l'apex, qui est logé dans une dépression centrale, met en place sur un plan horizontal de nombreuses feuilles qui restent pour la plupart à l'état de primordiums foliaires (HARTLEY, 1977). Elles ne se développeront qu'au cours de la seconde phase dite de croissance verticale pendant laquelle les entre-noeuds s'allongent pour former le stipe. Il peut s'accroître de 25 à 100 cm par an selon l'âge, les caractéristiques de l'arbre et les conditions du milieu. Le bourgeon terminal produit selon un rythme régulier 20 à 25 feuilles par an. Les feuilles sont disposées selon plusieurs hélices foliaires, dont le nombre (5,8,13) diffère selon les interprétations (CORLEY et GRAY, 1976).

.../...

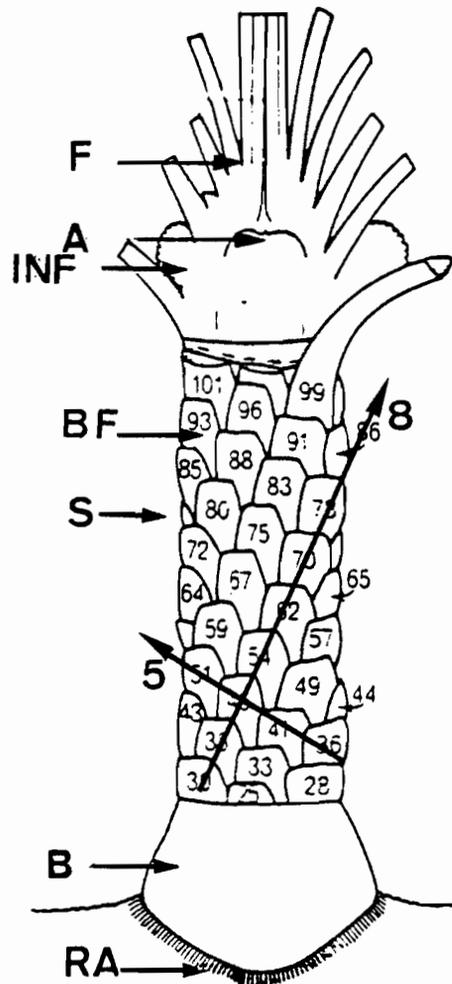


Fig. 1 : Représentation schématique d'un arbre adulte.

F : flèche; **A** : apex; **INF** : inflorescence; **BF** : base foliaire; **S** : stipe; **B** : bulbe; **RA** : racines adventives. Les bases foliaires sont numérotées par ordre chronologique de formation. 2 hélices foliaires (5 et 8) indiquées par des flèches sont tracées sur le stipe (d'après HARTLEY, 1977).

D) APPAREIL REPRODUCTEUR

Le palmier à huile est une plante monoïque et allogame. L'allogamie résulte du fait qu'un individu donné produit en alternance des séries d'inflorescences mâles et femelles. Le rapport moyen du nombre d'inflorescences femelles à celui des inflorescences mâles est d'environ $3/2$ chez un jeune palmier puis diminue pour atteindre $1/2$ à $1/3$ chez un palmier adulte (SURRE et ZILLER, 1963). Chaque inflorescence est un spadice enveloppé de 2 bractées fibreuses; les spathes sont portées par un pédoncule de 30 à 45 cm de long; les épis sont disposés en spirale autour d'un rachis central.

L'inflorescence femelle comporte plusieurs milliers de fleurs. Chacune est logée dans une cavité et protégée par une bractée florale dure et piquante (HARTLEY, 1977). Après la pollinisation, l'inflorescence femelle devient un régime (Fig. 2) dont le poids peut dépasser 60 kg (SURRE et ZILLER, 1963).

L'inflorescence mâle est constituée d'un bouquet de 100 à 300 épis digitiformes de 10 à 20 cm portant chacun entre 700 et 1500 fleurs d'une taille inférieure à celle des fleurs femelles (CORLEY et GRAY, 1976). Avant son ouverture, la fleur sessile est complètement recouverte par une bractée triangulaire. Chaque inflorescence mâle produit entre 25 et 50 g de pollen. L'émission du pollen ne dure que quelques jours (5 au maximum); sa durée de vie n'excède pas 6 jours (HARDON et CORLEY, 1976).

Les fruits du palmier sont des drupes sessiles de forme sphérique à ovoïde dont les dimensions peuvent varier de 2 à plus de 5 cm selon les variétés; leurs poids est compris entre 3 et 30 g. L'épiderme est cutinisé, lisse, luisant.

.../...



Fig. 2 : Régimes (flèches) sur arbre adulte (cliché Y. DUVAL).

Le mésocarpe ou pulpe est jaune orangé, très riche en huile et en fibres. La pulpe, dont l'épaisseur varie de 2 à 10 mm, renferme en effet 45 à 50 % de son poids frais d'huile de palme. L'endocarpe est une coque sclérifiée de 0,5 à 5 mm d'épaisseur qui protège la graine (ou amande). L'ensemble amande + coque constitue la noix de palme. La noix, d'un poids de 1 à 6 g selon les variétés, comporte 3 pores germinatifs de 2 à 3 mm de diamètre qui correspondent aux 3 loges de l'ovaire (SURRE et ZILLER, 1963).

L'amande comprend un tégument très mince et très adhérent à l'albumen cartilagineux. L'embryon est situé à la périphérie de l'albumen dans une cavité placée sous un des pores germinatifs. Il se présente comme une petite cheville cylindroconique de 3 à 5 mm de longueur pour un diamètre d'environ 1,2 mm (VALLADE, 1965).

L'épaisseur de la coque et l'importance du mésocarpe permettent de distinguer 3 variétés d'Elaeis guineensis (HARTLEY, 1977) :

- . Dura : coque de 2 à 8 mm d'épaisseur, mésocarpe peu important, pas d'anneau fibreux autour de la coque.
- . Tenera : coque de 0,5 à 4 mm d'épaisseur, mésocarpe moyennement à très important, anneau fibreux autour de la coque.
- . Pisifera : absence de coque.

E) PRODUCTION D'HUILE

La production est étalée tout au long de l'année grâce à un rythme de développement continu qui dépend essentiellement de la régularité des pluies. La durée d'exploitation

d'un palmier est de 20 à 25 ans selon la vitesse de sa croissance. La productivité maximale d'un arbre est atteinte vers sa dixième année; les arbres issus des semences sélectionnées commercialisées à l'heure actuelle par l'IRHO ont une production de 4 à 5 tonnes d'huile par ha et par an qui peut atteindre 6 à 7 tonnes par hectare et par an dans les conditions optimales (NOIRET et al. , 1985). Le fruit produit deux types d'huiles : l'huile de palme et l'huile de palmiste.

L'huile de palme est extraite de la pulpe du fruit. C'est une huile concrète composée essentiellement de triglycérides (de GRAAF, 1976) dont 50 % des acides gras sont insaturés, le plus important en quantité étant l'acide oléique (C 18 : 1). L'huile de palme brute est utilisée pour l'alimentation (margarines, biscuits, graisses végétales) et la savonnerie (savons et détergents). Elle peut être fractionnée en une partie liquide (oléine) utilisée comme huile de table et une partie concrète utilisée en margarinerie, biscuiterie et savonnerie.

L'huile de palmiste, extraite de l'amande, est particulièrement riche en acide laurique (C 12 : 0) et en acide myristique (C 14 : 0), ce qui explique son utilisation en savonnerie et en cosmétologie, en raison des propriétés moussantes de ces substances (SURRE et ZILLER, 1963).

1.2. PROGRAMME DE SÉLECTION DE L'IRHO

Mis en place par GASCON et de BERCHOUX (1964), il utilise la méthode de sélection récurrente réciproque proposée par COMSTOCK et al. (1949). Ce programme exploite un fort effet d'hétérosis sur le rendement obtenu en croisant des arbres d'origines non apparentées et à caractéristiques complémentaires (MEUNIER et GASCON, 1972). Les différentes origines de palmier à huile ont été séparées en 2 groupes :

- le premier groupe comprend des arbres provenant d'Indonésie (Deli) et d'Angola, caractérisés par un petit nombre de gros régimes.

.../...

- le second groupe est composé d'arbres originaires de Côte d'Ivoire, (La Mé, Yocoboué), du Zaïre (Yangambi, Sibiti), du Cameroun, du Nigéria (Nigar) etc... Ils sont caractérisés par la production d'un grand nombre de petits régimes.

Les croisements réalisés entre arbres des 2 groupes sont testés dans des essais comparatifs pour déterminer les aptitudes à la combinaison en raison de la faible héritabilité de certains caractères, en particulier la production d'huile.

Ce programme de sélection comporte également l'amélioration d'autres paramètres, tels que la teneur de l'huile en acides gras insaturés, la faible croissance en hauteur qui permet d'augmenter la durée d'exploitation des arbres, la résistance à la sécheresse et à diverses maladies, particulièrement la fusariose, provoquée par Fusarium oxysporum F. sp. elaeidis (RENARD, 1976).

Pour la production d'huile, les résultats obtenus après 2 cycles de sélection récurrente réciproque en Côte d'Ivoire, c'est-à-dire dans des conditions écologiques moyennes, sont les suivants (Tableau 2) :

	Tonnes d'huile/ha/an
Sélection massale	3,3
1er cycle SRR	3,9
2ème cycle SRR	4,9

Tabl. 2 : Production d'huile de palmiers hybrides après une sélection massale et 1 ou 2 cycles de sélection récurrente réciproque (SRR) (d'après NOIRET et al. , 1985).

Les variétés sélectionnées actuellement commercialisées sont des hybrides composés de 100 % de palmiers Tenera (coque mince) obtenus en croisant des palmiers Dura (coque épaisse) avec des Pisifera (fruits sans coque).

.../...

Lorsque l'on examine la répartition de la production en huile parmi la population d'arbres issus d'un croisement entre 2 individus sélectionnés, on constate pour ce caractère une très forte hétérogénéité. La production de copies conformes des meilleurs arbres présente un intérêt évident. Du fait des caractéristiques du palmier à huile (multiplication végétative impossible), l'utilisation de la culture in vitro a été envisagée très tôt dans cet objectif.

1.3. MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE IN VITRO DU PALMIER À HUILE

A) HISTORIQUE

La multiplication végétative des Palmacées par les procédés traditionnels (greffage, bouturage, utilisation de bulbes ou tubercules) est souvent difficile, voire impossible à réaliser (CHOO et al. , 1981). Si certaines espèces comme le palmier-dattier (Phoenix dactylifera) et le sagoutier (Metroxylon Sp.) produisent à la base du stipe des rejets qui peuvent être utilisés pour leur propagation, le nombre de pousses produites par individu reste souvent faible. D'autres espèces, comme le palmier à huile et le cocotier (Cocos nucifera), ne produisent aucun rejet (HENRY, 1948; DAVIS, 1980). L'importance économique de nombreuses Palmacées est telle que des recherches ont été entreprises dès les années 1970 pour mettre au point des techniques permettant leur multiplication végétative in vitro. Ainsi, pour le palmier à huile, une demande croissante en jeunes plants sélectionnés existe pour assurer le renouvellement des arbres trop âgés pour être exploitables et le peuplement des nouvelles plantations. Les besoins annuels en jeunes plants sont actuellement estimés à plus de 30 millions d'individus (JAMES, 1984); l'IRHO, par exemple, fournit annuellement 6 millions de semences sélectionnées (NOIRET et al. , 1985).

../...

La production de plantes entières en utilisant les techniques de culture in vitro est maintenant au point pour de nombreuses Palmacées. Ainsi, des plants de palmier-dattier sont produits par plusieurs équipes (AMMAR et BEN BADIS, 1977; POULAIN et al., 1979; REUVENI, 1979; TISSERAT, 1979 et 1984) en utilisant deux processus différents. L'explant primaire (apex, bourgeon axillaire, fragment de feuille, de tige, de racine) peut produire d'abord un cal sur lequel apparaissent ensuite des embryons somatiques ou des bourgeons adventifs susceptibles d'évoluer pour donner des pousses feuillées puis des plantes entières. Il est possible également d'obtenir une multiplication directe d'un bourgeon axillaire ou terminal, sans passage par le stade cal. Des résultats similaires ont été obtenus avec de nombreuses variétés de palmiers ornementaux (REYNOLDS et MURASHIGE, 1979; GABR et TISSERAT, 1985; SRINAVASAN et al., 1985). Toutes les espèces ne se prêtent pas aussi facilement à la culture in vitro. Dans le cas du cocotier, par exemple, des embryoïdes sont produits à partir de cals foliaires (PANNETIER et BUFFARD-MOREL, 1982) ou racinaires (BRANTON et BLAKE, 1983a). Cependant, jusqu'à présent, deux plantes entières seulement ont été obtenues à partir d'embryoïdes de cette espèce (BRANTON et BLAKE, 1983b).

Dans ce mémoire, le terme d'embryoïde, synonyme d'embryon somatique, correspond à la définition donnée par AHEE et al. , (1981). Chaque embryoïde , structurellement très proche d'un embryon zygotique d'Elaeis (VALLADE, 1965) possède un limbe cotylédonaire vascularisé bien individualisé; il a différencié ce qui peut être assimilé à un pôle caulinaire et un pôle radicaire.

Les travaux les plus nombreux ont concerné la mise au point de techniques de multiplication végétative in vitro du palmier à huile, étant donné l'importance économique de cette plante. Plusieurs sources d'explants ont été utilisées pour initier une micropropagation (LIORET et OLLAGNIER, 1981) :

embryons, apex, zone apicale, bases pétiolaires, rachis, inflorescences et racines. En 1970, RABECHAULT et al. obtenaient à partir d'embryons zygotiques des cals émettant des racines; STARITSKY (1970) observait l'apparition de feuilles lancéolées, de racines et de cals nodulaires sur des apex prélevés sur des plantules. Des résultats similaires ont été obtenus par RABECHAULT et al. (1972) à partir de bases pétiolaires de jeunes plants élevés en pépinière, puis par JONES (1974) avec des explants prélevés dans la zone apicale de jeunes plantules. Les racines ont également été utilisées (MARTIN et al. , 1972 ; SMITH et THOMAS, 1973 ; JONES, 1974 ; ONG, 1977). Les premières plantules de palmier à huile ayant une structure normale et ayant donné de jeunes plantes ont été obtenues par RABECHAULT et MARTIN (1976) à partir d'explants foliaires, et par CORLEY et al. (1976) à partir d'explants racinaires.

B) DESCRIPTION DU PROCÉDÉ ORSTOM/IRHO

Le procédé mis au point par l'ORSTOM/IRHO, qui a fait l'objet de brevets (MARTIN et RABECHAULT, 1978), est basé sur l'embryogenèse somatique à partir de cals foliaires. Il a été amélioré par l'équipe de recherche ORSTOM/IRHO de Bondy (AHEE et al. , 1981 ; PANNETIER et al. , 1981) et par les chercheurs de la station IRHO de La Mé (Côte d'Ivoire) (NOIRET et al. , 1985). Le procédé industriel utilisé actuellement comporte plusieurs étapes (Fig.3).

.../...

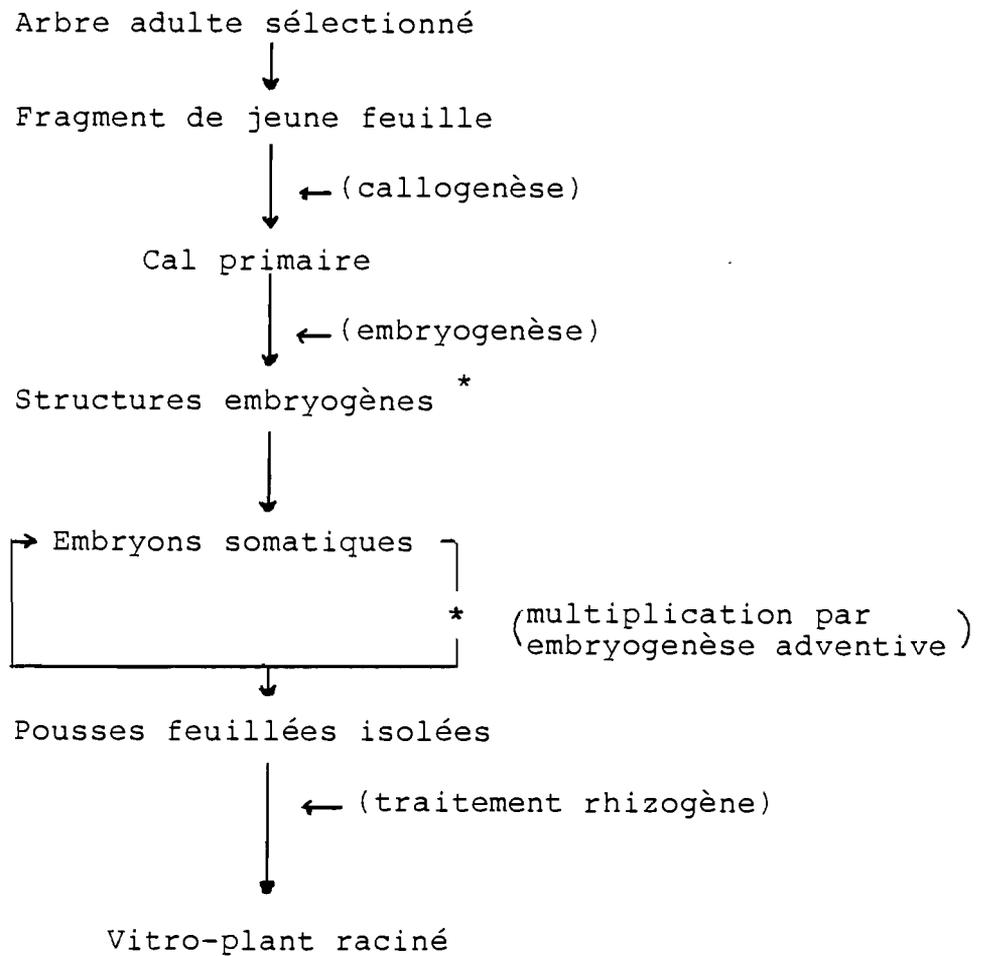


Fig. 3 : Représentation schématique du procédé utilisé pour la multiplication in vitro du palmier à huile et indication des étapes permettant une conservation à long terme (*) dans l'azote liquide.

Les explants primaires sont des fragments de jeunes feuilles non ouvertes prélevées au niveau de la flèche. La mise en culture ne nécessite pas, contrairement au cas des racines (SMITH et THOMAS, 1973), de désinfection trop poussée, toujours traumatisante. Ce prélèvement, qui épargne le méristème terminal, n'affecte pas la suivie de l'arbre et peut être renouvelé plusieurs fois. Il permet la mise en culture

d'au moins 2000 explants primaires. Les explants sont cultivés pendant 12 semaines dans des conditions de température et d'éclairage contrôlées. Pendant cette période, certaines cellules situées au niveau des nervures se divisent activement pour former des cals. La proportion des explants donnant des cals varie d'un arbre à un autre. Elle est actuellement de 20 à 80 % des explants (NOIRET et al. , 1985). Les cals obtenus sont ensuite isolés et repiqués sur un milieu organogène. Après un délai de 2 mois au moins, des structures organisées (structures embryogènes) apparaissent sur certains cals. Elles évoluent ensuite pour donner des embryons somatiques.

L'apparition des embryoïdes est encore aléatoire; seule une faible proportion des cals produit des embryons somatiques. Cependant, 70 % des arbres mis en culture ont pu donner des embryons somatiques dès le premier prélèvement (NOIRET et al. , 1985). Les embryoïdes obtenus se multiplient ensuite par embryogénèse adventive. Le taux de multiplication, qui varie selon les clones, est voisin de 3 par mois. La prolifération, qui se prolonge dans certains cas pendant des années, peut être considérée comme "indéfinie". Certains clones se multiplient ainsi depuis plus de 5 ans sur un milieu de culture dépourvu d'hormones de croissance.

Dans les cultures, les embryoïdes sont à différents stades de développement. A chaque repiquage, les embryons somatiques les plus évolués sont isolés pour la production de plantules; les plus jeunes embryons servent à assurer la multiplication du clone. Les embryoïdes différenciés, placés sur un nouveau milieu, se développent en pousses feuillées qui sont ensuite repiquées sur un milieu inducteur de la rhizogénèse. Après 4 mois, les plantules obtenues sont alors acclimatées dans des conditions précises d'hygrométrie et de température. Les plants obtenus peuvent alors être transférés en conditions naturelles. Le taux de reprise des plantules est en général supérieur à 90 % (NOIRET et al., 1985).

Le processus de multiplication végétative du palmier à huile comporte donc deux grandes phases : la création des clones (callogenèse, obtention des premiers embryoides) qui nécessite environ un an puis l'obtention et l'enracinement des plantules qui demandent 4 mois de culture in vitro supplémentaires (NOIRET et al. , 1985).

C) VÉRIFICATION DE LA CONFORMITÉ DU MATÉRIEL CLONAL

La conformité des plantes obtenues par la culture in vitro est une condition essentielle pour permettre l'application du procédé à l'échelle industrielle. En effet, il est maintenant bien établi que des modifications génétiques transmissibles aux plants régénérés peuvent se produire au cours de la culture in vitro (SCOWCROFT, 1984). Ce phénomène, appelé variation somaclonale, peut être défini comme la variabilité génétique produite pendant la culture in vitro (LARKIN et SCOWCROFT, 1981). Les risques de variation sont encore augmentés si la technique utilisée nécessite le passage par un stade cal, c'est-à-dire une dédifférenciation transitoire du matériel utilisé (BAYLISS, 1980), comme c'est le cas pour le palmier à huile.

Des études caryologiques encore peu nombreuses ont été réalisées chez le palmier à huile. SMITH et THOMAS (1973) ont ainsi mis en évidence des cellules polyploïdes et aneuploïdes dans une lignée de cals à croissance rapide, qui s'est d'ailleurs révélée non embryogène (CORLEY et al., 1979). JONES et al. (1982) ont également observé des aberrations chromosomiques analogues dans des lignées de cals à croissance normale et d'âges différents; cependant seules les cellules strictement diploïdes ($2n = 32$, TAN, 1976) paraissent susceptibles de donner des embryons somatiques (PARANJOTHY, 1984). Ces résultats ont été confirmés par des comptages chromosomiques effectués sur des cellules d'extrémités racinaires de plusieurs

../...

· vitro-plants, les cellules examinées s'étant toutes révélées diploïdes (CORLEY et al. , 1977). L'observation des premiers essais en champ réalisés par les équipes de recherche anglaises a montré une grande uniformité du matériel obtenu (CORLEY et al. , 1981) : la variabilité entre les arbres d'un même clone est nettement inférieure à celle observée entre arbres issus de semis pour les caractères considérés. Des plants anormaux ont toutefois été observés dans plusieurs clones. L'origine génétique des variations observées (morphologie foliaire aberrante, croissance lente, retard ou absence de floraison) a pu être prouvée avec certitude dans un cas. Il n'a cependant pas été possible de déterminer si les plantes obtenues étaient aneuploïdes ou polyploïdes (CHOO et al. , 1981).

Des études de conformité du matériel clonal sont également en cours de réalisation dans la station IRHO de La Mé (Côte d'Ivoire). Selon NOIRET et al. (1985), les anomalies morphologiques sur les plantes obtenues par la culture in vitro sont exceptionnelles; de plus les premières inflorescences se sont développées normalement et se sont révélées fertiles. Les essais clonaux en cours permettront d'être assuré en 1990 de la conformité du matériel obtenu in vitro.

Toutefois, malgré ces premières observations encourageantes pour la conformité du matériel clonal, la stabilité des cultures entretenues pendant des durées prolongées n'est pas garantie (SCOWCROFT, 1984) particulièrement si le procédé inclut le passage par un stage cal (REISCH, 1984) et l'emploi, même transitoire, de régulateurs de croissance tels que le 2,4-D (BAYLISS, 1980), comme c'est le cas dans le procédé de multiplication in vitro du palmier à huile. Ces causes possibles de perte de la conformité au cours de la culture in vitro justifient le recours aux techniques de cryoconservation dans l'azote liquide des embryons somatiques de palmier à huile.

../...

D) PLACE DES TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION DANS LE CYCLE DE MULTIPLICATION IN VITRO DU PALMIER À HUILE

Comme cela a été exposé précédemment, les techniques de cryoconservation peuvent être appliquées à des cals et à des embryons somatiques. Dans le cas du palmier à huile, seul un faible pourcentage des cals est embryogène (NOIRET et al. , 1985). Aussi, le choix a été fait de conserver les embryoïdes eux-mêmes (cf. Fig. 3), puisqu'ils sont susceptibles de redonner directement d'autres embryons par embryogenèse adventive. Des structures embryogènes, prélevées sur les cals primaires, ont également été utilisées. Ces structures présentent en effet l'intérêt de n'avoir été cultivées in vitro que pendant une durée réduite, ce qui diminue encore les risques de variations pouvant apparaître au cours des repiquages successifs.

1.4. CLONES UTILISÉS EN CRYOCONSERVATION

Deux clones d'embryoïdes en prolifération ont été principalement utilisés :

- . Le clone BC 068, provenant d'un jeune plant de pépinière issu du second cycle de sélection entre une variété Tenera de La Mé (L2T) et une variété Dura de Deli (D115D), ayant de bonnes capacités de production en huile. Sa mise en culture a été effectuée en France en Juillet 1980 au Laboratoire de Physiologie Végétale de Bondy.
- . Le clone BC 156, provenant d'un arbre adulte choisi dans l'hybride L 2T x D 5D planté sur la Station de Recherche de La Mé (Côte d'Ivoire).

.../...

Une expérience de congélation a également été réalisée avec chacun des deux clones suivants :

- . **LMC 079**, provenant d'un arbre adulte sélectionné dans l'hybride D 759D x L 311P. Sa mise en culture a été effectuée en Côte d'Ivoire, dans le Laboratoire CIRAD/IRHO de La Mé, en Février 1983. La congélation a été réalisée sur des structures embryogènes apparues sur des cals expédiés de Côte d'Ivoire.
- . **LMC 43**, provenant d'un arbre adulte sélectionné dans l'hybride L 10T x D 17D. Sa mise en culture a été effectuée en Côte d'Ivoire en Janvier 1982. Des massifs d'embryoïdes provenant de cultures en prolifération ont été utilisés lors de l'expérience de congélation réalisée sur ce clone.

2. TECHNIQUES

2.1. TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO

A) ENTRETIEN DES CULTURES

Les clones d'embryons proviennent de la collection du Laboratoire ORSTOM/IRHO de Bondy. Ils sont cultivés sur le milieu de base suivant qui comprend :

- . Les macro-éléments de MURASHIGE et SKOOG, modifiés selon RABECHAULT et MARTIN (1976).
- . Les micro-éléments de NITSCH (1969).
- . Les vitamines de MOREL et WETMORE (1951).
- . 100 mg.l^{-1} d'acide ascorbique sous forme d'ascorbate de sodium.
- . 500 mg.l^{-1} d'hydrolysate de caséine.

.../...

Le sucre utilisé est le saccharose; sa concentration dans le milieu standard est de 0,1M . Le milieu est solidifié par l'addition de 8g.l^{-1} d'agar .Après ajustement du pH à 5 , le milieu de culture est stérilisé à 110°C pendant 20 minutes. Les embryons en multiplication sont cultivés sur le milieu standard dans des tubes en Pyrex de 150 mm x 25 mm , contenant 20 ml de milieu, fermés par un capuchon en verre ou en matière plastique (Kap - Uts, Bellco) maintenu par un tour de Parafilm ou dans des bocaux de 750 ml (Plandorcash) avec 200 ml de même milieu.

Le rythme des repiquages est fonction du mode de culture choisi : une fois par mois lorsque les embryons sont cultivés en tubes, tous les 2,5-3 mois s'ils sont cultivés en bocaux. A chaque repiquage, les embryons ayant évolué pour donner des pousses feuillées sont éliminés; seuls sont conservés les massifs de jeunes embryoïdes en cours de prolifération. Les conditions de culture utilisées sont les mêmes pour toutes les expériences décrites dans ce mémoire. Les embryons sont cultivés dans des enceintes phytotroniques (marques L.C.A.) dont la température est maintenue à $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. L'éclairage, fourni par des tubes fluorescents Durotest type True Lite, est de 20 W.m^{-2} avec une photopériode de 12 heures sur 24. L'humidité relative à l'intérieur des enceintes de culture est maintenue en permanence entre 65 et 70 %.

B) OBTENTION DES EMBRYONS DESTINÉS À LA CONGÉLATION

Différents milieux ont été utilisés pour tenter d'augmenter le nombre de massifs d'embryons susceptibles de résister à la congélation. Les modifications apportées au milieu ont porté sur :

- . La teneur en saccharose du milieu (0,1M à 0,75M).
- . La composition du milieu minéral, la solution des macro-éléments de MURASHIGE et SKOOG modifiée étant remplacée par celle de HELLER (1953).
- . La durée de culture, 2 mois au lieu d'un mois.

.../...

2.2. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS SOMATIQUES

La méthodologie utilisée pour conserver des embryons somatiques comporte plusieurs étapes : le prétraitement ou préculture, la congélation, la conservation, le réchauffement et le post-traitement qui sont rappelés dans la Figure 4.

A) PRÉTRAITEMENT OU PRÉCULTURE

a) Cas des embryons en multiplication

Les massifs de jeunes embryoïdes sont repiqués en boîtes de Petri de 50 mm de diamètre contenant 10 ml de milieu gélosé à raison de 10 massifs par boîte.

Différents milieux de prétraitement ont été testés. Ils sont constitués du milieu de base additionné :

- . de saccharose (0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,75 et 0,9M)
- . de sorbitol (0,3 et 0,75M)
- . d'un mélange de saccharose et de sorbitol (0,3 et 0,45M)

Dans certaines expériences, le milieu de prétraitement a été complété par du DMSO (5 % V/V).

Diverses durées de prétraitement (de 1 à 15 jours) ont été utilisées. Les différents essais ont conduit à définir des conditions expérimentales de prétraitement qui ont été ensuite conservées pour l'ensemble des expériences : 7 jours de préculture des embryons sur le milieu de base contenant 0,75M de saccharose.

.../...

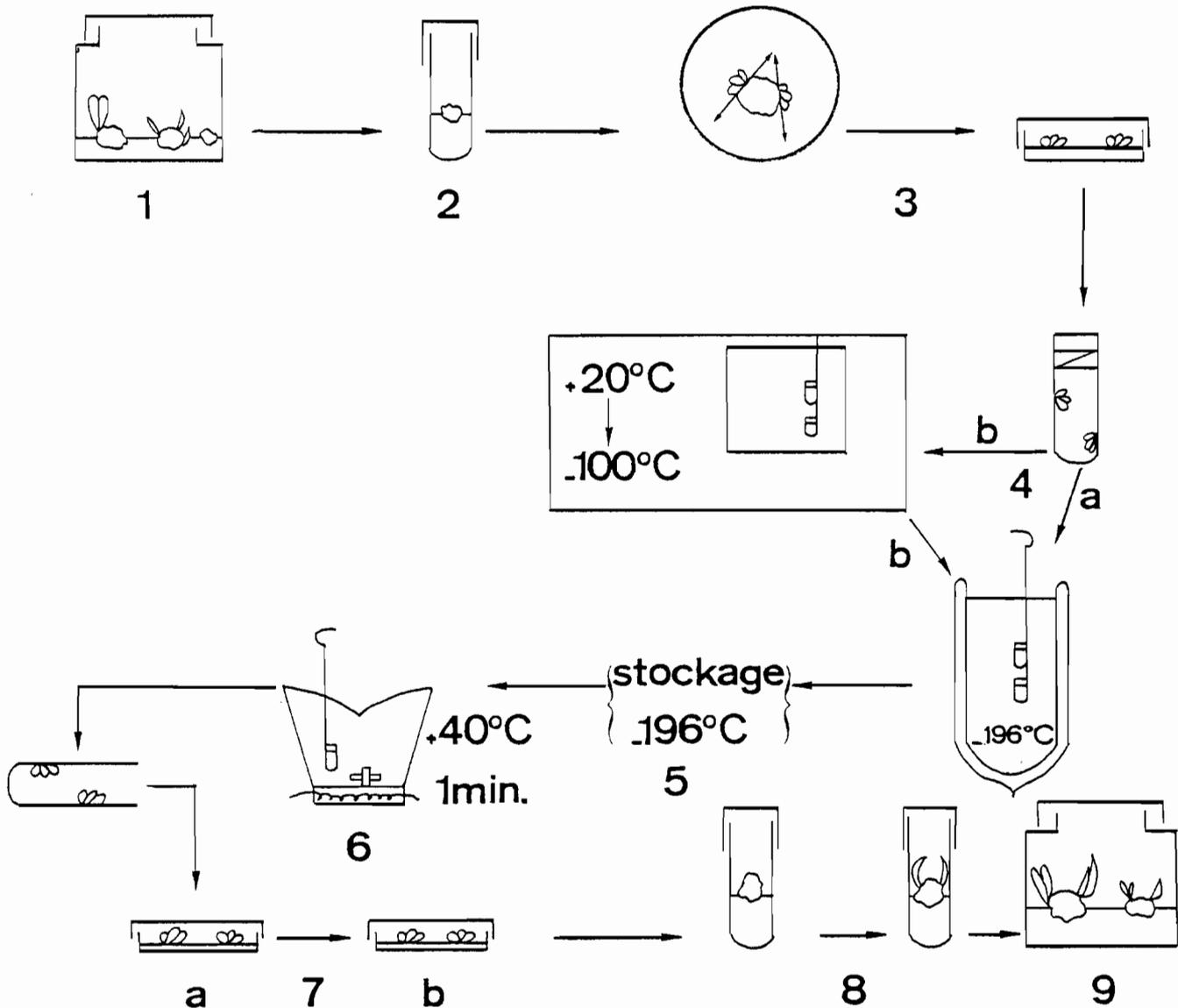


Fig. 4 : Schéma général d'un processus de cryoconservation d'embryoïdes de palmier à huile.

1. Entretien du matériel en prolifération
2. Obtention de massifs d'embryoïdes pour la congélation : 2 mois sur sacch. 0,3M
3. Dissection des massifs et prétraitement de 7 jours sur sacch. 0,75M
4. Refroidissement : a) rapide
b) programmé
5. Stockage dans l'azote liquide (-196°C)
6. Réchauffement : 1 min. à + 40°C
7. Post-traitement
a) 1 sem. sur sacch. 0,3M + 2,4-D 10^{-6} M
b) 2 sem. sur sacch. 0,1M + 2,4-D 10^{-6} M
8. Repiquages successifs sur milieu de multiplication : reprise de la prolifération.
9. Repiquage en bocal pour extension des cultures et production de pousses feuillées issues de massifs d'embryoïdes congelés.

b) Cas des structures embryogènes

Le prétraitement de structures embryogènes prélevées sur des calcs primaires a été réalisé en utilisant 3 milieux différents, dans lesquels la teneur en sucre a été portée à 0,75M :

- . Le milieu A , milieu embryogène sur lequel sont cultivés les calcs; il contient du 2,4-D et du glucose.
- . Le milieu B qui comporte du glucose et aucun régulateur de croissance.
- . Le milieu C , de multiplication des embryoïdes, qui contient du saccharose mais pas d'hormone de croissance.

B) CONGÉLATION

Quelle que soit la technique de congélation utilisée, les embryons sont placés à sec dans des tubes cryobiologiques stériles en polypropylène d'une contenance de 2 ml, à raison de 10 massifs par tube. Les massifs sont, dans la mesure du possible, répartis sur toute la paroi du tube pour obtenir un refroidissement analogue pour tous les massifs. Les tubes sont fixés sur des supports en aluminium.

a) Refroidissement rapide

Les supports en aluminium portant les tubes sont plongés directement dans un vase Dewar rempli d'azote liquide. Ils peuvent être ensuite transférés dans un récipient cryobiologique conçu pour permettre un stockage à long terme dans l'azote liquide (7 à 15 mois dans nos expériences).

b) Refroidissement en deux étapes

Il comporte deux phases, un prérefroidissement programmé puis une congélation dans l'azote liquide.

. La congélation programmée. Elle est réalisée dans un Minicool, commercialisé par l'AIR LIQUIDE; cet appareil est conçu pour la congélation de petits échantillons biologiques. Cet appareil comprend 4 sous-unités (Fig. 5) :

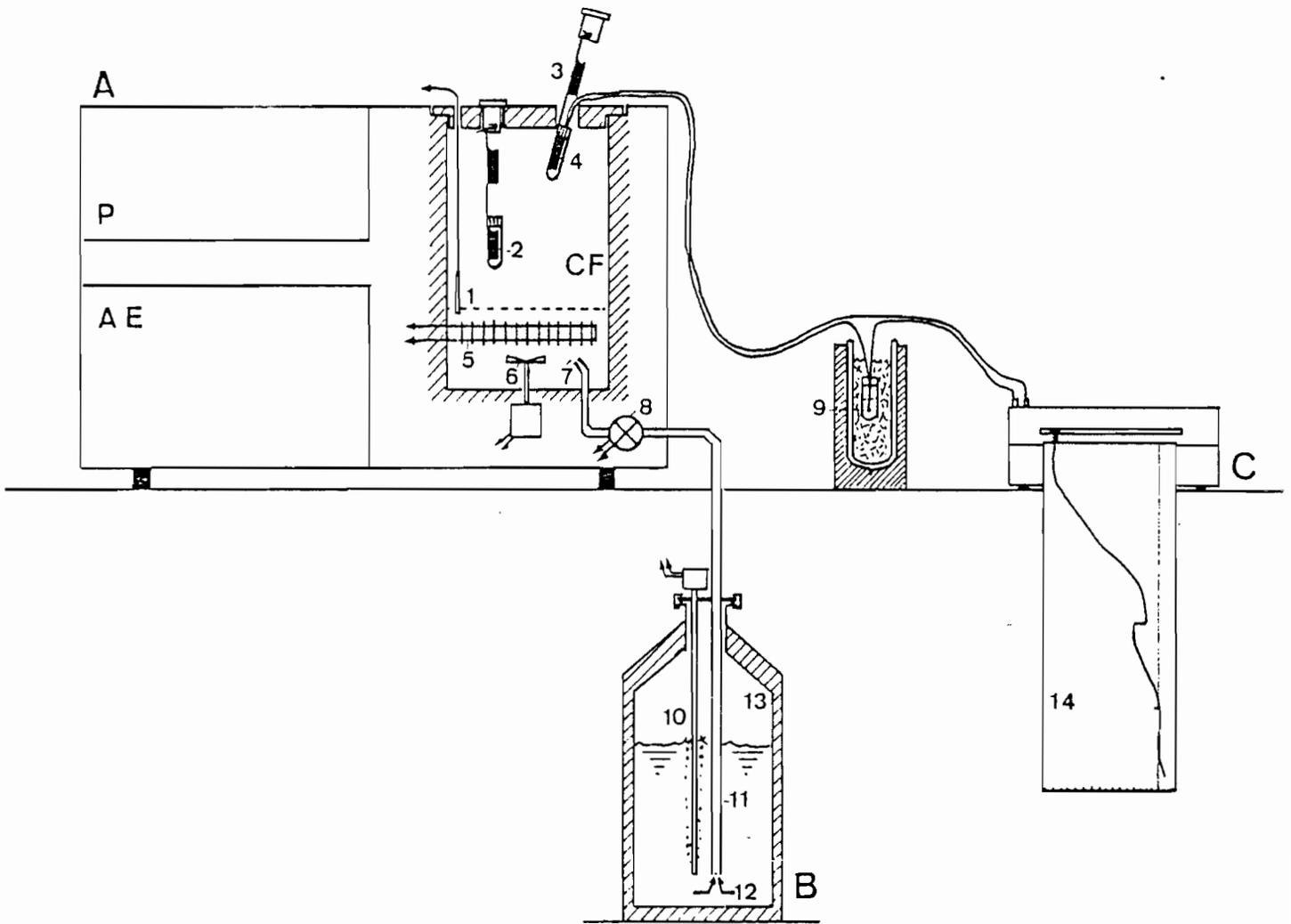


Fig. 5 : Schéma simplifié de l'appareillage utilisé pour la congélation programmée des embryoides. Il comprend un Minicool (A) avec le programmateur (P), l'alimentation électrique (AE) et la chambre de refroidissement (CF), un réservoir d'azote liquide (B) et un enregistreur potentiométrique (C). (D'après GALERNE, 1985).

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1. Sonde de température de la chambre | 8. Electrovanne |
| 2. Tube cryobiologique contenant les embryoides | 9. Sonde de référence (0°C) |
| 3. Porte-tube en aluminium | 10. Résistance de mise sous pression |
| 4. Tube de contrôle de la température avec un thermocouple placé dans un massif de référence | 11. Canne plongeuse |
| 5. Résistance chauffante | 12. Azote liquide |
| 6. Turbine d'homogénéisation | 13. Azote gazeux sous pression (0,3 kg cm ⁻²) |
| 7. Buse d'injection de l'azote liquide | 14. Courbe de refroidissement |

- . Une alimentation électrique.
- . Un tiroir électronique permettant la programmation de la congélation (4 programmes différents peuvent être en mémoire). Les vitesses de refroidissement réalisables vont de $0,1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ à $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. La température finale de congélation peut atteindre -180°C .

- . Une chambre de refroidissement qui comprend une turbine, destinée à homogénéiser l'atmosphère de l'enceinte et éviter la formation de gradients thermiques, une électrovanne permettant de régler l'apport du fluide réfrigérant, une résistance électrique chauffante et une sonde thermique de platine.

Les tubes cryobiologiques contenant les échantillons sont placés sur des supports en aluminium qu'il est facile de mettre en place ou de sortir sans avoir à enlever le couvercle de l'enceinte. Ce couvercle isolant permet le passage de huit supports, dont un est réservé au tube témoin. Celui-ci contient un massif d'embryoïdes dans lequel a été logé un thermocouple en cuivre-constantan relié à un enregistreur. Ce thermocouple permet de déterminer la température au sein d'un échantillon.

- . Un réservoir pressurisé contenant de l'azote liquide, utilisé comme fluide frigorifique.

Chaque programme de congélation se décompose en 9 séquences :

T1 - R1 - T2 - Δ W - t - R2 - T3 - R3 - T4

T1 Température de départ : température de l'enceinte de congélation régulée avant la mise en place des échantillons dans l'enceinte et stabilisée aussi longtemps que le souhaite l'utilisateur.

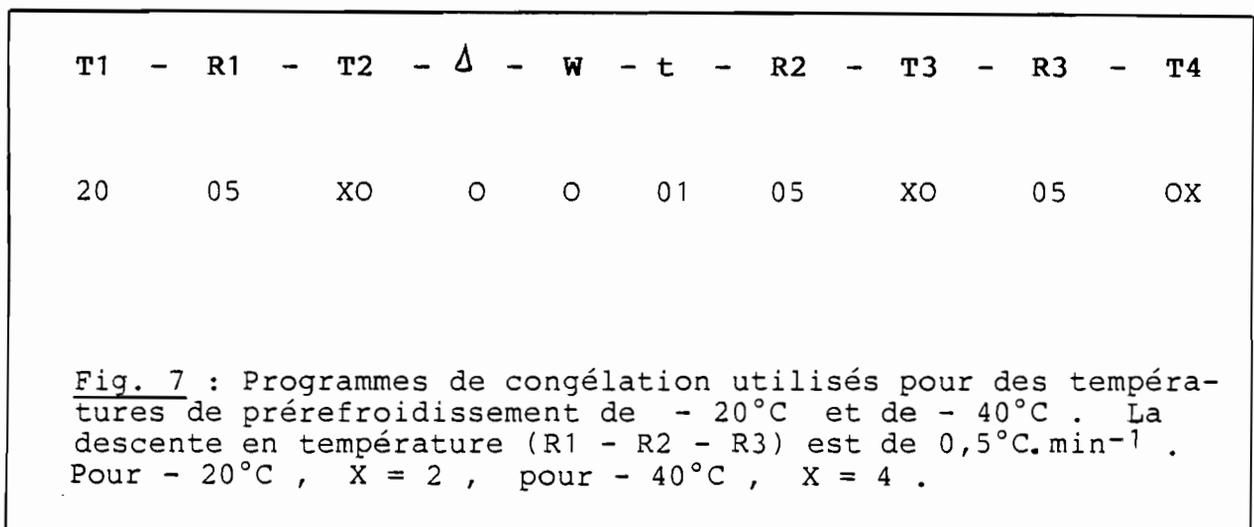
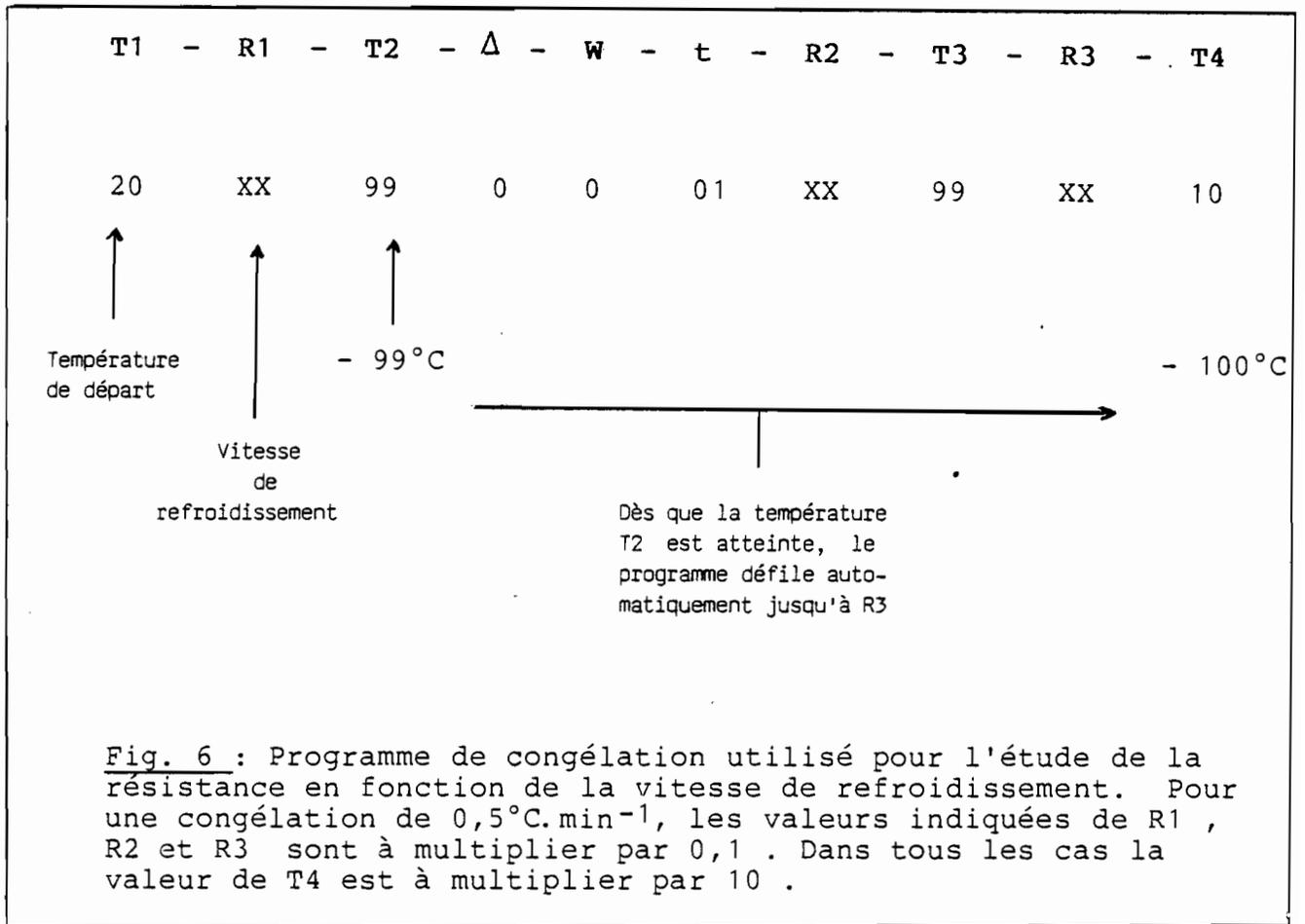
R1 Pente de refroidissement du produit en phase liquide.

T2 Température (négative) de congélation du produit (plus précisément, température du changement d'état liquide-solide). Cette température est une caractéristique physique du produit considéré, elle sera déterminée au préalable.

Δ - Exprimé en $^{\circ}\text{C}$, est l'écart de température entre le début et la fin de la cristallisation du produit.

W Puissance frigorifique nécessaire pour éliminer rapidement la chaleur latente de fusion produite lors de la cristallisation (**W** exprimé de 1 à 7, en unités arbitraires).

.../...



.../...

- t Temps affiché à la minuterie. C'est le temps d'injection de la puissance W , ce temps est lié au conditionnement des échantillons et au volume total de produit à refroidir.
- R2 Vitesse de refroidissement du produit depuis la fin du plateau de congélation jusqu'à une température intermédiaire $T3$.
- T3 Température négative à laquelle il est possible de changer de vitesse de refroidissement.
- R3 Vitesse de refroidissement de $T3$ à $T4$.
- T4 Température finale du refroidissement des échantillons dans l'enceinte avant leur stockage en azote liquide. Régulation automatique à cette température en fin de programme.

Le système électronique (Δ, W, t), qui permet une induction automatique de la cristallisation, n'a pas été utilisé, la congélation des embryões de palmier à huile étant réalisée à sec et non en milieu liquide.

Deux types de programmes ont été utilisés suivant le but recherché : observation de l'effet de la vitesse ou de la température de prérefroidissement. Dans chaque expérience, les échantillons sont maintenus pendant 10 minutes à la température choisie avant d'être plongés dans l'azote liquide. Dans le premier cas, les programmes affichés sont de la forme décrite dans la Figure 6, la température finale de prérefroidissement étant la même (-100°C).

Les valeurs de $X X$, vitesses de refroidissement utilisées, $0,5 - 1 - 5 - 10 - 20$ et $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, couvrent pratiquement la gamme des possibilités offertes par l'appareil.

L'effet de températures finales de prérefroidissement moins importantes (-20°C et -40°C au lieu de -100°C) a été étudié grâce au programme décrit dans la Figure 7, qui modifie les valeurs $T2$ et $T3$. Lorsque la température finale de prérefroidissement a été atteinte, les tubes cryobiologiques sont immergés dans l'azote liquide après un palier de 10 minutes en $T4$.

../...

C) RÉCHAUFFEMENT

Les massifs d'embryoïdes, après un séjour d'une heure au moins à -196°C , sont toujours réchauffés rapidement, comme c'est le cas pour la plupart des matériels. A cet effet, les ampoules cryobiologiques sont sorties de l'azote liquide et immergées pendant une minute dans un bain-marie thermostaté à 40°C .

D) POST-TRAITEMENT

a) Cas des embryons somatiques

Le post-traitement des embryoïdes, d'une durée de 3 semaines, peut se décomposer en deux phases :

- . Une culture d'une semaine, en boîte de Petri, sur le milieu de base contenant 0,3M de saccharose.

- . Une culture de deux semaines, en boîte de Petri, sur le milieu de base additionné de 0,1M de saccharose.

Cette méthode permet d'éviter un éventuel choc osmotique trop important après la décongélation : les membranes et plus particulièrement le plasmalemme présentent en effet des modifications structurales après l'azote liquide, qui les rendent particulièrement fragiles (WITHERS, 1983).

Pour obtenir une reprise de l'embryogenèse adventive, du 2,4-D doit être ajouté aux milieux de post-traitement. L'action de cette auxine a été envisagée de deux manières différentes permettant d'étudier :

- . L'effet de la concentration ($2,5 \cdot 10^{-7}\text{M}$ à 10^{-5}M), la durée d'application (3 semaines) restant constante.

- . L'effet de la durée du traitement (1,2 ou 3 semaines) pour une concentration constante (10^{-6}M).

.../...

b) Cas des structures embryogènes

Pour les structures embryogènes, le post-traitement a la même durée de 3 semaines et comporte également 2 phases, correspondant à un abaissement progressif de la teneur en sucre du milieu. Les structures embryogènes prétraitées sur les milieux A, B ou C (cf p. 35 et Figure 8) sont repiquées après décongélation sur des milieux analogues; seule la teneur en sucre est modifiée pendant les 3 semaines de post-traitement : 0,3M pendant la première semaine et 0,1M pendant les 2 semaines suivantes. Les structures embryogènes vivantes en fin de post-traitement sont cultivées 4 semaines supplémentaires en boîtes de Petri sur le même milieu puis repiquées en tubes sur le milieu A, B ou C suivant les cas. Lorsqu'une reprise de la prolifération est observée sur des structures cultivées sur le milieu B, elles sont alors repiquées sur le milieu standard de multiplication (milieu C). Les structures cultivées sur le milieu A sont entretenues sur ce milieu.

2.3. ÉTUDE DE LA CRISTALLISATION DANS DES MASSIFS D'EMBRYOÏDES

La cristallisation au sein des massifs d'embryoïdes a été suivie en utilisant 2 techniques : l'analyse thermique simple et l'analyse microcalorimétrique différentielle à balayage (DSC).

A) ANALYSE THERMIQUE SIMPLE : Elle permet de suivre l'évolution de la température d'un échantillon au cours d'une congélation grâce à un thermocouple (cuivre-constantan) placé dans un échantillon et relié à un enregistreur (Figure 5, p.36).

.../...

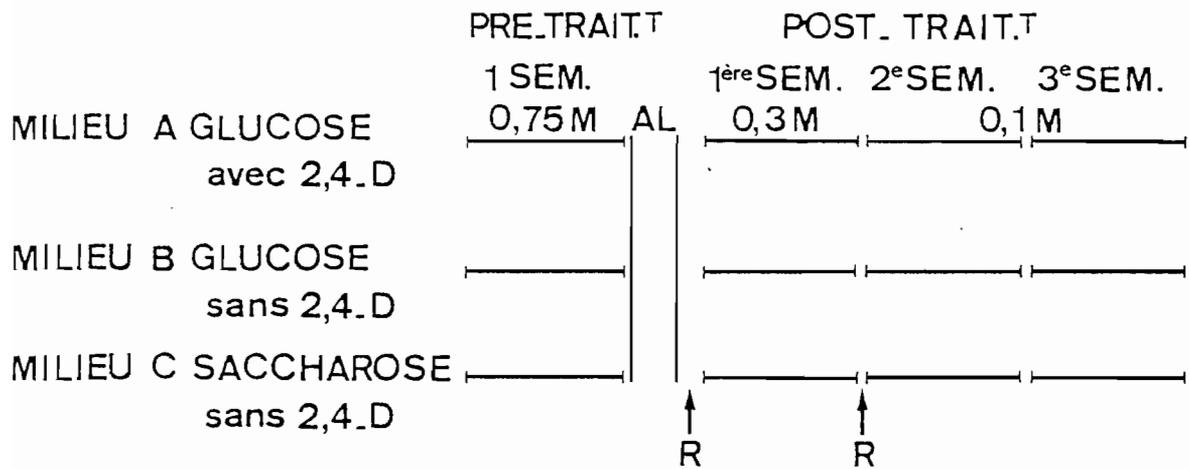


Fig. 8 : Conditions de pré et de post-traitement des structures embryogènes. La concentration en 2,4-D est de 10^{-6} M; celle des sucres de 0,1 - 0,3 ou 0,75M. **AL** : Période de conservation dans l'azote liquide. **R** : Repiquage.

B) ANALYSE PAR MICROCALORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE A BALAYAGE (DSC)

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche CLAUDE DELORME de la Société l'AIR LIQUIDE.

L'appareil utilisé est le DSC 4 fabriqué par la Société Perkin-Elmer. Il se compose de 3 éléments :

- . Un calorimètre différentiel à compensation de puissance.
- . Un contrôleur à microprocesseur permettant de programmer la descente ou la montée en température.
- . Un système informatique d'analyse des données.

Cet appareil permet de mesurer les variations d'enthalpie résultant du changement d'état d'un corps soumis à un réchauffement ou un refroidissement.

Lors de la congélation des embryões de palmier à huile, on observe une cristallisation de l'eau, qui est un phénomène exergonique. La variation d'enthalpie est mesurée par l'intégration des pics dûs à la formation de la glace. Elle peut être exprimée en calories ou en joules et les résultats sont ramenés à 1g de poids frais. Avant son utilisation, l'appareil est étalonné avec du cyclohexane, corps qui présente des changements d'état dans la plage de température utilisée.

Deux séries de courbes ont été enregistrées, correspondant à des refroidissements de + 20°C à - 50°C (cristallisation de l'eau dans les massifs d'embryoïdes) et à des réchauffements de - 50°C à + 20°C (fusion de la glace).

2.4. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES EMBRYOÏDES

A) VIABILITÉ

Pour des matériels massifs tels que les embryons de palmier à huile, une mesure de la survie utilisant des techniques de coloration (tests T.T.C. ou F.D.A.) ne peut donner que des indications sur les zones de tissus encore vivantes après la

congélation. On n'obtient donc que des résultats qualitatifs, alors que ces tests appliqués par exemple à des cellules, donnent une indication quantitative de la survie. Le seul critère quantitatif permettant de conclure à la réussite d'une expérience de congélation est la reprise de la croissance du matériel puis la reprise de l'embryogenèse adventive.

a) Survie

La première estimation du résultat d'une expérimentation est le taux de survie des massifs d'embryoïdes. Il représente la proportion de massifs encore vivants à la fin du post-traitement (trois semaines après leur décongélation). Sont pris en compte pour ce calcul tous les massifs ayant présenté une croissance visible (mesurable à la loupe binoculaire), pendant la durée du post-traitement. Cette première estimation n'est pas suffisante car tous les massifs ayant survécu jusqu'à la fin du post-traitement ne sont pas aptes à donner des embryons adventifs. Elle permet cependant une définition rapide des conditions expérimentales permettant une survie maximale.

b) Reprise de la prolifération

Le taux de reprise principal de la prolifération est égal au pourcentage de massifs congelés à -196°C pour lesquels une reprise de l'embryogenèse adventive a été observée. Il est déterminé 8 semaines après la fin du post-traitement, soit après deux cultures d'un mois sur le milieu de multiplication.

Dans quelques expérimentations, un deuxième taux de reprise (taux complémentaire) a été calculé en portant la durée du post-traitement habituel (3 semaines) à 7 ou 11 semaines.

../...

Dans ce cas, les massifs qui n'ont pas présenté de croissance visible pendant le post-traitement de 3 semaines sont maintenus sur ce milieu pendant 4 ou 8 semaines supplémentaires. Après chaque période de 4 semaines, seuls sont repiqués sur le milieu de multiplication les embryons ayant manifesté une croissance pendant cette période. La prise en compte de ces massifs ayant présenté une croissance après 7 et 11 semaines de post-traitement permet une estimation plus précise du pourcentage de reprise. De plus, l'augmentation du taux de reprise qui peut en découler est intéressante pour des clones chez lesquels le taux de reprise principal est faible.

Le taux de reprise total est donc égal à la somme des taux de reprise principal et complémentaire.

B) TENEUR EN SACCHAROSE

La teneur en saccharose des massifs d'embryons pendant les différents traitements a été déterminée en utilisant le kit de dosage enzymatique saccharose/glucose de chez Boehringer-Mannheim (Réf. 139-041). Une série d'analyses préliminaires des sucres totaux avait révélé que d'autres sucres, comme le glucose ou le fructose libres n'étaient présents qu'à l'état de traces. La technique utilisée comporte 2 phases : l'extraction des sucres puis le dosage du saccharose.

. Extraction des sucres

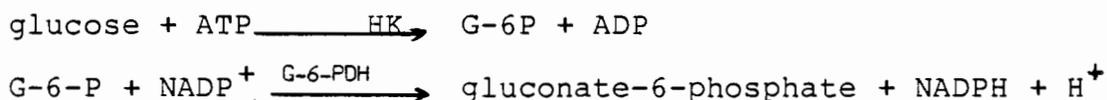
Les échantillons, d'un poids de 40 mg environ, sont rapidement rincés à l'alcool absolu pour enlever toute trace de sucre provenant du milieu gélosé. Ils sont ensuite broyés dans 5 à 10 ml d'alcool à 80° à l'aide d'un Potter électrique. Le mélange obtenu est alors filtré sur un filtre de porosité 0,2 μ m. La quantité de filtrat recueilli est alors diluée avec de l'alcool à 80° pour arriver à un volume final de 20 ml.

../...

. Dosage du saccharose

La teneur en saccharose est égale à la différence entre la teneur en glucose obtenue après hydrolyse du saccharose et celle du glucose libre avant hydrolyse.

Le glucose libre est phosphorylé en présence d'une hexokinase (HK) par l'adénosine-triphosphate (ATP). Le glucose -6-phosphate (G-6-P) ainsi produit est oxydé grâce à la glucose -6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH), par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) en gluconate -6-phosphate, selon les réactions :



La quantité de glucose est alors déterminée au spectrophotomètre (340 nm) à partir du pouvoir absorbant du NADPH produit stoechiométriquement au cours de la réaction.

L'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose est réalisée par une invertase, la β - fructosidase, selon la réaction :



La quantité de glucose après hydrolyse (glucose total) est mesurée comme précédemment. La concentration en saccharose des embryons est alors calculée par différence entre les teneurs en glucose avant et après l'hydrolyse enzymatique.

C) TENEUR EN EAU

La teneur en eau des massifs d'embryoïdes par rapport à leur poids de matière fraîche a été mesurée par dessiccation à 104°C pendant 3 jours. Elle est exprimée par rapport au poids

../...

de matière fraîche. La teneur en eau est calculée de la façon suivante :

$$t \text{ H}_2\text{O} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PF}} \times 100 \quad \text{où PF et PS représentent}$$

respectivement les poids de matière fraîche et de matière sèche des massifs d'embryons.

D) CROISSANCE PONDÉRALE

La croissance pondérale de massifs d'embryoïdes a été suivie par des pesées en conditions stériles, sous une hotte à flux lumineuse. La croissance pondérale a été mesurée pendant la semaine de prétraitement, les 3 semaines de post-traitement, et les 8 semaines suivantes de culture sur le milieu de multiplication standard.

E) ÉTUDE HISTOLOGIQUE

L'étude histologique des massifs d'embryoïdes aux stades choisis a été réalisée en utilisant la technique suivante :

- Fixation au Navaschine

- Solution A : Acide chromique 1 g
Acide acétique glacial 10 ml
Eau distillée 85 ml
- Solution B : Formol 40 % 30 ml
Alcool 95° 10 ml
Eau distillée 55 ml

Les solutions A et B sont mélangées à partie égale au moment de l'emploi. La fixation dure 24 heures et les échantillons peuvent être ensuite conservés plusieurs mois dans cette solution.

- Inclusion à la paraffine

Les échantillons sont d'abord lavés pendant une nuit à l'eau courante puis déshydratés progressivement selon le protocole suivant :

- Alcool 50° : 1 heure
- Alcool 70° : 1 heure
- Alcool 80° : 1 heure
- Alcool 90° : 1 heure
- Alcool 95° : 1 heure
- Alcool 100° : 3 fois 1 heure. Après conservation pendant une nuit dans l'alcool absolu, les échantillons sont ensuite inclus. Les étapes sont les suivantes :
 - . Alcool 100° 3 volumes, xylène, 1 volume : 1 heure
 - . Alcool 100° 1 volume, xylène, 1 volume : 1 heure
 - . Alcool 100° 1 volume, xylène, 3 volumes : 1 heure
 - . Xylène : 3 fois 1/2 heure
 - . Mélange xylène - paraplast : une nuit
 - . Paraplast pur : 3 fois 1 heure à 56°C

Les objets sont ensuite coulés dans des blocs de Paraplast pur. Les échantillons sont alors coupés au microtome en sections de 10 µm d'épaisseur, montés sur des lames porte-objets avec une solution d'albumine d'oeuf puis déparaffinés et colorés.

- Déparaffinage

- Xylène : 10 minutes
- Xylène, 1 volume, alcool 100°, 1 volume : 10 minutes
- Alcool 100° : 3 minutes
- Alcool 95° : 3 minutes
- Alcool 90° : 3 minutes
- Alcool 80° : 3 minutes
- Alcool 70° : 3 minutes
- Alcool 50° : 3 minutes

- Coloration

- Rinçage à l'eau bi-distillée
- Hématoxyline : 15 minutes
- Rinçage à l'eau courante
- Alcool 100° : 2 minutes
- Alcool 100° : 2 minutes
- Xylène : 2 minutes puis montage avec baume du Canada

L'hématoxyline utilisée est l'hématoxyline de GROAT. Elle comprend :

- | | |
|---------------------------------------|--------|
| - Alun de fer | 1 g |
| - H ₂ SO ₄ (1N) | 0,8 ml |
| - H ₂ O | 50 ml |
| - Alcool 95° | 50 ml |
| - Hématoxyline | 0,5 g |
| (Merck, Réf.4305) | |

L'alun de fer est dissout dans l'eau distillée puis l'acide sulfurique est ajouté à cette solution. La solution alcoolique d'hématoxyline est préparée séparément. Les deux solutions sont mélangées puis filtrées avant utilisation.

CHAPITRE II

OBTENTION DES EMBRYOÏDES DESTINÉS A LA CONGÉLATION

Lors d'expériences préliminaires de congélation, la survie des embryons somatiques a été examinée en utilisant le test T.T.C. (TOWILL et MAZUR, 1974), dans lequel le chlorure de tétrazolium est réduit en formazan, composé de couleur rouge, par les cellules encore vivantes. L'emploi de ce test a permis de définir les caractéristiques des embryoïdes susceptibles de résister à l'azote liquide. Seuls de très jeunes embryoïdes de couleur blanc brillant, généralement groupés en massifs (Figure 9) peuvent présenter des zones colorées en rouge, 24 heures après la décongélation. Or les cultures de palmier à huile sur milieu de multiplication (Figure 10) contiennent très peu de jeunes embryoïdes, dont la différenciation semble très rapide. Des méthodes ont donc été recherchées pour obtenir en plus grand nombre des embryoïdes susceptibles de résister à la congélation, le principe étant de bloquer les embryons somatiques néoformés au cours d'une culture au stade souhaité pour leur cryoconservation.

1. EFFETS DE LA COMPOSITION DU MILIEU SUR LA PRODUCTION D'EMBRYOÏDES

Deux approches différentes ont été choisies, l'une portant sur la modification des éléments minéraux du milieu de culture, par l'utilisation des macro-éléments de HELLER (1953), l'autre sur son enrichissement en saccharose. Dans ce cas, diverses concentrations en saccharose ont été utilisées : 0,1 - 0,3 - 0,4 - 0,5 et 0,75 M.

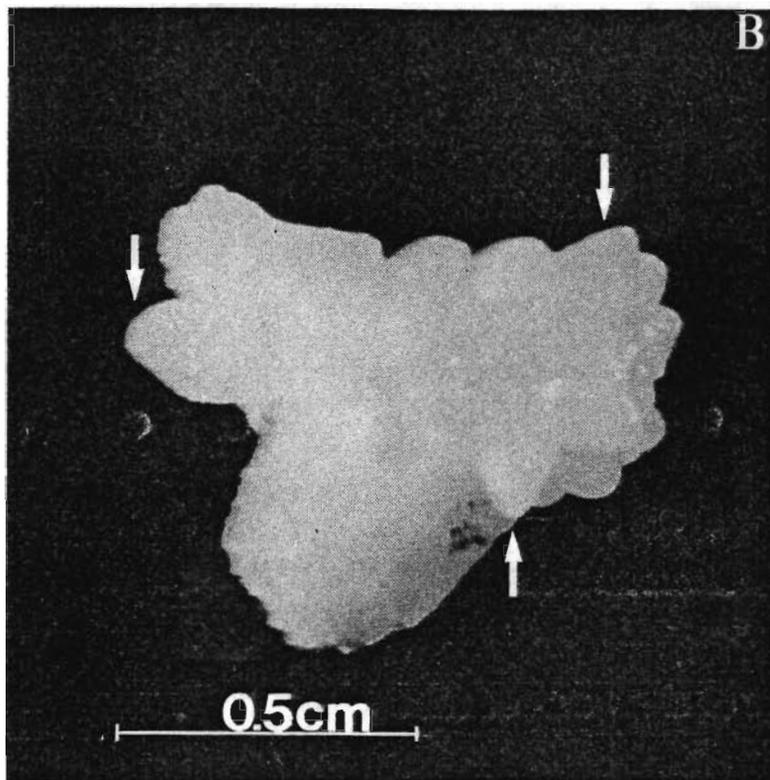
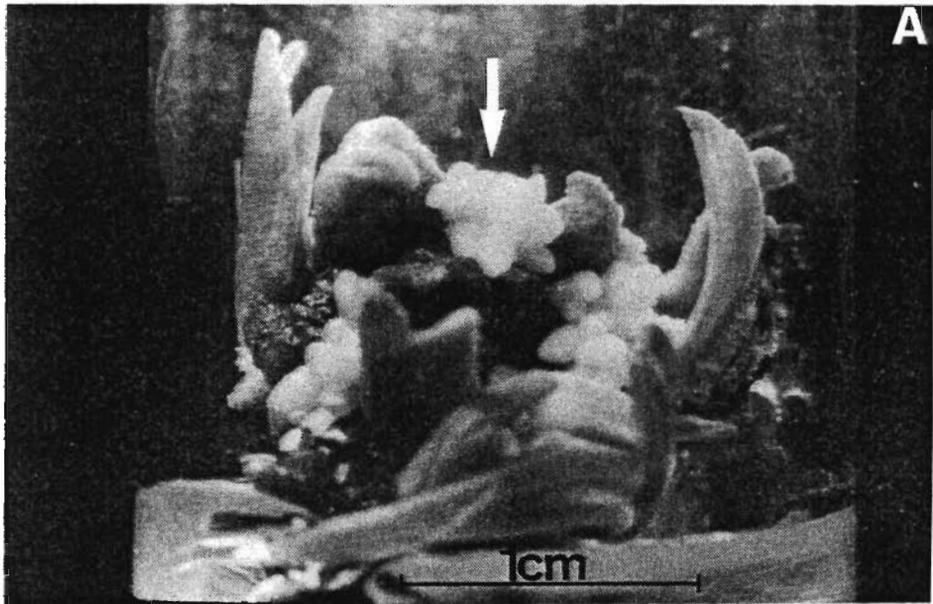


Fig. 9 : (A) massif de jeunes embryons somatiques (flèche) obtenus après 2 mois de culture sur le milieu standard contenant du saccharose 0,3M. (B), massif après dissection. Des embryoïdes individualisés sont indiqués par des flèches.

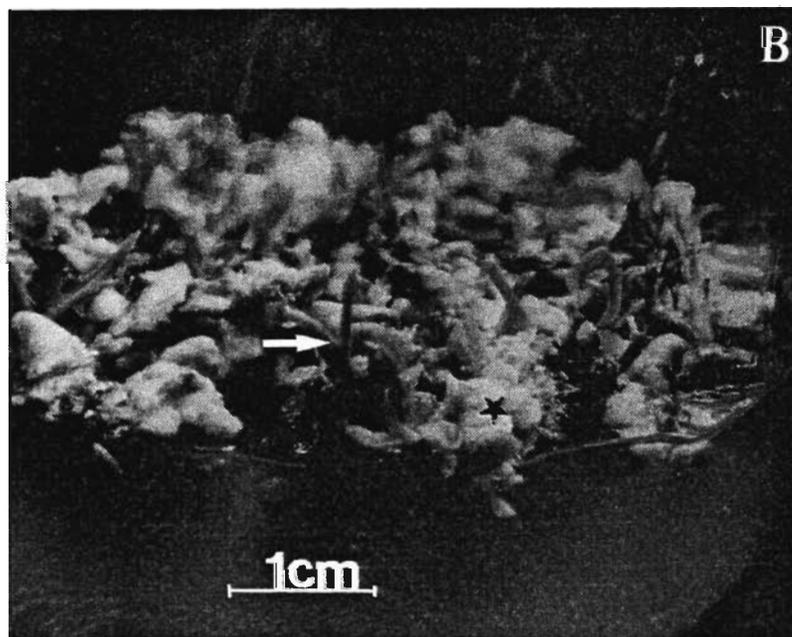
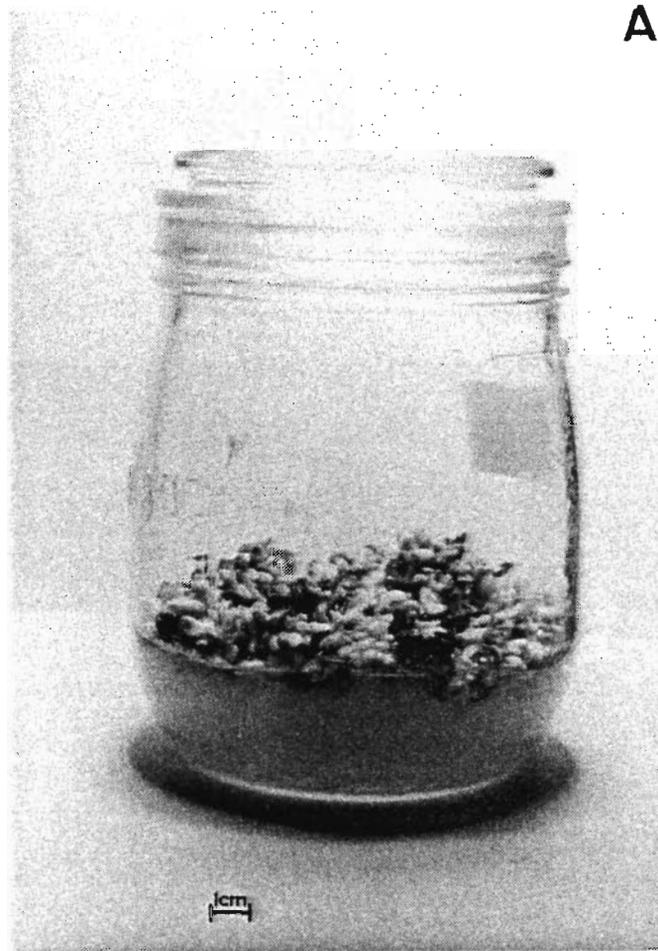


Fig. 10 : (A), culture d'embryons somatiques sur le milieu standard. (B), détail d'une culture sur le même milieu. Elle comprend des embryoïdes en prolifération (★) et des pousses feuillées (flèche).

Les effets des différentes solutions ont été comparés après 2 mois de culture, en utilisant les 3 paramètres suivants : nombre d'embryoïdes utilisables en cryoconservation par tube de culture, nombre moyen d'embryoïdes par massif, nombre moyen de massifs par tube de culture.

1.1. NOMBRE D'EMBRYOÏDES UTILISABLES PAR TUBE DE CULTURE

L'emploi des macro-éléments de HELLER (0,1 MH, Tableau 3) permet d'augmenter le nombre d'embryoïdes observés par tube de culture par rapport aux conditions standard (0,1M) . Ainsi, pour le clone BC 068, les valeurs moyennes trouvées sont respectivement de 4,5 embryoïdes par tube (macro-éléments de HELLER) et de 2,26 (milieu standard). Des résultats similaires ont été obtenus avec le clone BC 156 : 6,3 embryoïdes par tube avec les macro-éléments de HELLER; 2,7 avec le milieu standard.

Les résultats les plus satisfaisants sont obtenus avec une augmentation de la teneur en saccharose. Pour les 2 clones étudiés, le rendement optimum est atteint pour une concentration en saccharose de 0,3 M.

En comparant les 7 conditions expérimentées dans cette étude, il est possible d'établir un classement des différents milieux de culture utilisés pour la production de jeunes embryoïdes; il est identique pour les deux clones :

$$0,3 \text{ M} > 0,4 \text{ M} > 0,1 \text{ MH} > \begin{cases} 0,1 \text{ M} \\ 0,2 \text{ M} \\ 0,5 \text{ M} \end{cases} > 0,75 \text{ M}$$

Le classement ne tient pas compte des différences de comportement entre les deux clones. Ainsi, si la concentration optimale en saccharose est la même (0,3M), le nombre d'embryoïdes obtenus avec le clone BC 068 (12 en moyenne) est légèrement supérieur à celui observé chez BC 156 (9,9 en moyenne). Au contraire, l'emploi de la solution des macro-éléments de

../...

Clone	Milieu d'obtention des embryoides							
	0,1 M	0,1 MH	0,2 M	0,3 M	0,4 M	0,5 M	0,75 M	
	1,6 (72)	6,5 (48)	3,0 (48)	11,2 (48)	7,4 (24)	2,7 (24)	0,2 (24)	
Nombre	3,0 (48)	3,1 (48)		8,7 (48)	9,0 (96)	3,4 (72)		
d'embryoïdes		6,5 (24)		11,8 (24)	7,3 (24)	3,3 (72)		
BC068 par tube		1,9 (24)		9,1 (48)				
		4,4 (48)		13,7 (48)				
				12,9 (24)				
				17 (48)				

Nbre moyen								
d'embryoïdes	2,26	4,5	3,0	12,0	8,4	3,3	0,2	
par tube								
	2,7 (48)	5,9 (96)		12,8 (48)	8,3 (72)	3,2 (72)		
Nombre		7,7 (48)		7,0 (48)	5,5 (48)	4,7 (48)		
d'embryoïdes		5,5 (48)		8,1 (48)	7,2 (48)	3,5 (48)		
BC156 par tube		6,5 (48)		12,1 (72)				
				8,5 (48)				

Nbre moyen								
d'embryoïdes	2,7	6,3		9,9	7,2	3,7		
par tube								

Tabl. 3 : Nombre d'embryoïdes par tube obtenus après 2 mois de culture sur le milieu de base en fonction de la teneur en saccharose (0,1M à 0,75M) et sur un milieu contenant les macro-éléments de HELLER (0,1 MH). Les valeurs indiquées correspondent à des expériences indépendantes. Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre de tubes observés pour chaque condition. Deux clones ont été étudiés : le clone BC 068 et le clone BC 156.

HELLER semble donner de meilleurs résultats avec le clone BC 156 : 6,3 embryoides par tube au lieu de 4,5 pour le clone BC 068. Ces valeurs restent cependant nettement inférieures à celles obtenues pour une concentration en saccharose de 0,3M.

1.2. NOMBRE MOYEN D'EMBRYOÏDES PAR MASSIF

Lorsque les résultats sont exprimés en nombre d'embryons somatiques par massif (Tableau 4) et pour les 2 clones étudiés, la teneur en saccharose ne paraît pas modifier de façon significative le nombre moyen d'embryoides par massif (test d'analyse de la variance à un critère). Par contre avec les macro-éléments de HELLER, les résultats sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec la solution minérale de MURASHIGE et SKOOG modifiée habituellement employée, bien que des différences existent d'une expérience à l'autre. Cette variabilité entre les expérimentations se traduit, pour toutes les conditions, par des écarts-type importants.

1.3. NOMBRE MOYEN DE MASSIFS PAR TUBE DE CULTURE

En ce qui concerne le nombre moyen de massifs d'embryoides par tube, un dénombrement direct n'a pas été effectué systématiquement. Les valeurs indiquées (Tableau 5) sont des estimations calculées d'après les données du Tableau 3 (nombre moyen d'embryoides par tube) et du Tableau 4 (nombre moyen d'embryoides par massif). Le nombre de massifs estimé est égal au rapport du nombre moyen d'embryoides par tube au nombre moyen d'embryoides par massif. Des contrôles effectués ultérieurement ont montré une bonne concordance entre les résultats estimés et les valeurs réelles obtenues.

.../...

Clone	Milieu d'obtention des embryoïdes						
	0,1 M	0,1 MH	0,2 M	0,3 M	0,4 M	0,5 M	0,75 M
	4,8 \pm 3,0	3,6 \pm 2,0	4,5 \pm 2,6	5,3 \pm 2,8	5,5 \pm 2,5	5,6 \pm 2,7	6
Nombre	(32)	(60)	(30)	(66)	(79)	(29)	(1)
d'embryoïdes		5,5 \pm 2,8		4,6 \pm 2,8	5,0 \pm 2,9	4,3 \pm 2,5	
BC068 par massif		(10)		(56)	(176)	(40)	
				5,2 \pm 3,3	4,6 \pm 3		
				(197)	(41)		
Nbre moyen							
d'embryoïdes	4,8	3,9	4,5	5,1	5,1	4,8	6
par massif							
	4,9 \pm 2,8	3,8 \pm 2,8		5,2 \pm 3,3	4,9 \pm 2,2	4,7 \pm 2,4	
Nombre	(34)	(69)		(75)	(54)	(49)	
d'embryoïdes		4,1 \pm 2,4		5,3 \pm 2,8	6,0 \pm 3,4	6,3 \pm 3,3	
BC156 par massif		(76)		(69)	(126)	(52)	
				4,4 \pm 2,7	5,6 \pm 3,7		
				(74)	(81)		
Nbre moyen							
d'embryoïdes	4,9	4,0		5,0	5,6	5,5	
par massif							

Tabl. 4 : Nombre moyen d'embryoïdes par massif obtenus après 2 mois de culture selon la teneur en saccharose du milieu (0,1M à 0,75M) et sa composition en macro-éléments (0,1 MH). Chaque résultat, donné avec son écart-type, correspond à des expériences indépendantes. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de massifs observés dans chaque cas.

		Milieu d'obtention des embryofides						
		0,1 M	0,1 MH	0,2 M	0,3 M	0,4 M	0,5 M	0,75 M
Nbre moyen	CLONE							
de massifs	BC068	0,45 (120)	0,93 (192)	0,66 (48)	2,35 (288)	1,65 (144)	0,68 (168)	0,03 (24)
par tube	BC156	0,56 (48)	1,57 (240)		1,98 (264)	1,28 (168)	0,67 (168)	

Tabl. 5 : Estimation du nombre de massifs par tube utilisables pour la congélation, après 2 mois de culture, selon la composition du milieu d'obtention : teneur en sucre (0,1M à 0,75M) et utilisation des macro-éléments de HELLER (0,1 MH). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de tubes sur lequel l'estimation a été faite.

1.4. EFFETS DES DIFFÉRENTS MILIEUX SUR LE COMPORTEMENT DES CULTURES

A) ASPECT DES CULTURES

Les deux mois de traitement sur les différents milieux peuvent modifier l'aspect final des cultures. Si sur le milieu de HELLER les structures embryonnaires ne présentent pas de différences apparentes avec celles du milieu de multiplication, leur croissance paraît cependant moins rapide, comme l'avait observé DUVAL (1984, com. pers.). Par contre, l'augmentation de la teneur en saccharose favorise un brunissement du milieu de culture. Cette évolution se manifeste à partir d'une concentration de 0,3 M. Des concentrations plus élevées entraînent généralement une nécrose partielle (0,5 M) ou presque totale (0,75 M) (Figure 11).

L'augmentation de la teneur en saccharose modifie également, en le diminuant, le nombre de pousses feuillées produites après 2 mois de culture. Leur morphologie est également modifiée dès que la teneur en saccharose atteint 0,2 M : les pousses feuillées présentent une base nettement plus massive et des feuilles plus courtes et plus larges.

B) POIDS DE MATIÈRE FRAÎCHE DES MASSIFS D'EMBRYOÏDES EN FONCTION DE LEUR MILIEU D'OBTENTION

Le Tableau 6 donne pour les deux clones le poids de matière fraîche moyen de massifs d'embryoïdes obtenus après deux mois de culture sur différents milieux. L'analyse de la variance montre que pour les deux clones étudiés, les différences de poids des massifs en fonction de la concentration en saccharose ne sont pas significatives. Les valeurs importantes des écarts-type confirment la forte hétérogénéité des cultures.

En conclusion une teneur en saccharose de 0,3 M donne pour les deux clones étudiés le plus grand nombre de massifs utilisables en cryoconservation. C'est donc cette concentration qui a été choisie pour l'obtention du matériel expérimental.

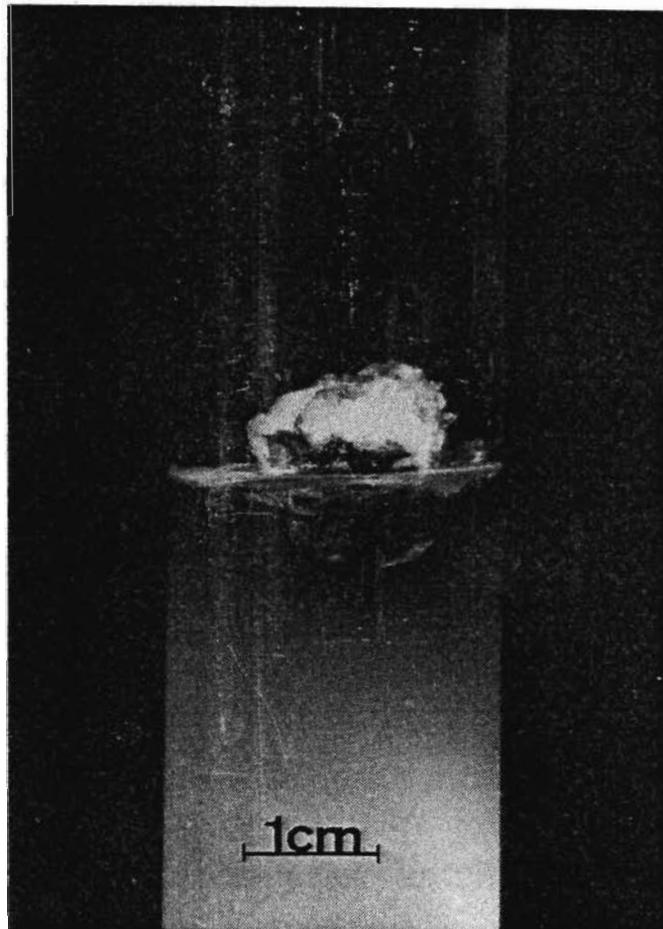


Fig.11 : Culture d'embryoïdes nécrosée après 2 mois sur un milieu contenant 0,75M de saccharose.

Teneur en saccharose du milieu de culture					
	CLONE	0,1 M	0,3 M	0,4 M	0,5 M
	BC 068	49,3 ± 24,2	54,9 ± 25,1	50,9 ± 28,1	44,9 ± 25,8
PMF moyen des massifs		(30)	(195)	(120)	(56)
	BC 156	50,0 ± 30,1	49,3 ± 25,6	44,2 ± 30,0	44,6 ± 21,2
d'embryoïdes (mg)		(44)	(233)	(100)	(80)

Tabl. 6 : Poids de matière fraîche (PMF) moyen de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 et BC 156 obtenus après deux mois de culture selon la concentration en saccharose du milieu (0,1 - 0,3 - 0,4 ou 0,5 M). Chaque résultat est donné avec son écart-type. Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre de massifs pesés par condition.

2. ÉTUDE COMPARÉE DE L'ÉVOLUTION D'UNE CULTURE D'EMBRYOÏDES SUR LES MILIEUX D'OBTENTION ET DE MULTIPLICATION

Cette étude a été réalisée avec les deux clones BC 068 et BC 156. Trois paramètres ont été utilisés :

- . Le poids de matière fraîche des explants
- . Le nombre de massifs d'embryoïdes utilisables en cryoconservation
- . Le nombre de pousses feuillées produites.

Les mesures ont été faites toutes les deux semaines pendant deux mois. 48 tubes ont été utilisés pour chaque condition. Afin de distinguer un éventuel effet spécifique du saccharose sur les 3 paramètres étudiés, des expériences complémentaires ont été réalisées avec le clone BC 156 en remplaçant une partie du saccharose (0,2 M) par 0,2 M de mannitol (C6 H14 O6).

Ce polyalcool, voisin des sucres, a été choisi car il n'empêche pas la croissance, la rhizogenèse et la formation des embryons adventifs; il n'est en général pas métabolisé par les cellules végétales. De plus, il a déjà été utilisé pour la culture d'embryons zygotiques de palmier à huile sans montrer de toxicité (RABECHAULT et al. , 1974).

2.1. ÉVOLUTION DU POIDS DE MATIÈRE FRAÎCHE

L'évolution du poids de matière fraîche des explants (Figure 12 A et B) est sensiblement la même que la teneur en saccharose du milieu, soit de 0,1 M ou de 0,3 M. A cette concentration, le saccharose n'a donc pas d'action inhibitrice ou stimulatrice sur le développement des cultures (test t). Les deux clones présentent cependant des cinétiques de croissance différentes : le clone BC 068 voit son poids initial multiplié par 10 en 2 mois de culture alors que celui du clone BC 156 n'est pas multiplié par plus de 7.

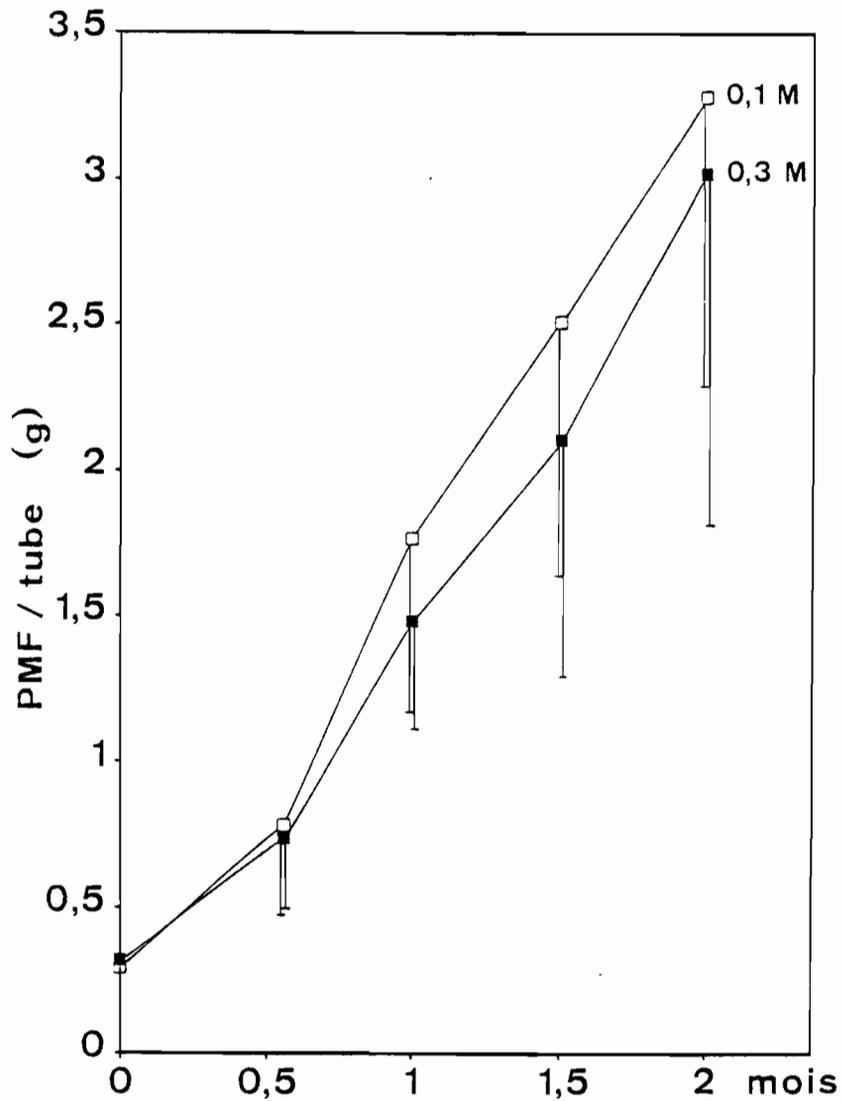


Fig. 12 A : Evolution du poids de matière fraîche (PMF) d'une culture d'embryoïdes du clone BC 068 pendant 2 mois sur des milieux contenant 0,1 M (□) ou 0,3 M de saccharose (■). Les valeurs indiquées représentent l'accroissement moyen par tube. Chaque valeur correspond à la moyenne de 48 mesures. Les traits verticaux représentent les écarts-type.

.../...

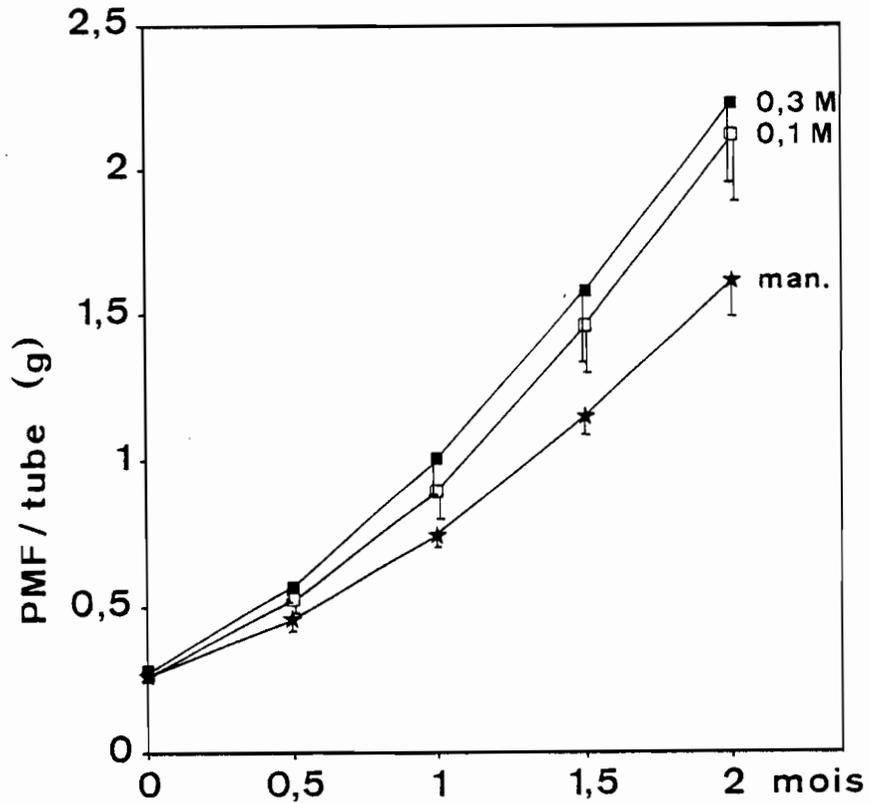


Fig. 12 B : Evolution du poids de matière fraîche (PMF) d'une culture d'embryoïdes du clone BC 156 pendant 2 mois sur des milieux contenant 0,1 (□) ou 0,3M (■) de saccharose ou 0,1M de saccharose + 0,2M de mannitol (★). Les valeurs indiquées représentent l'accroissement moyen par tube. Chaque valeur correspond à la moyenne de 48 mesures. Les traits verticaux représentent les écarts-type.

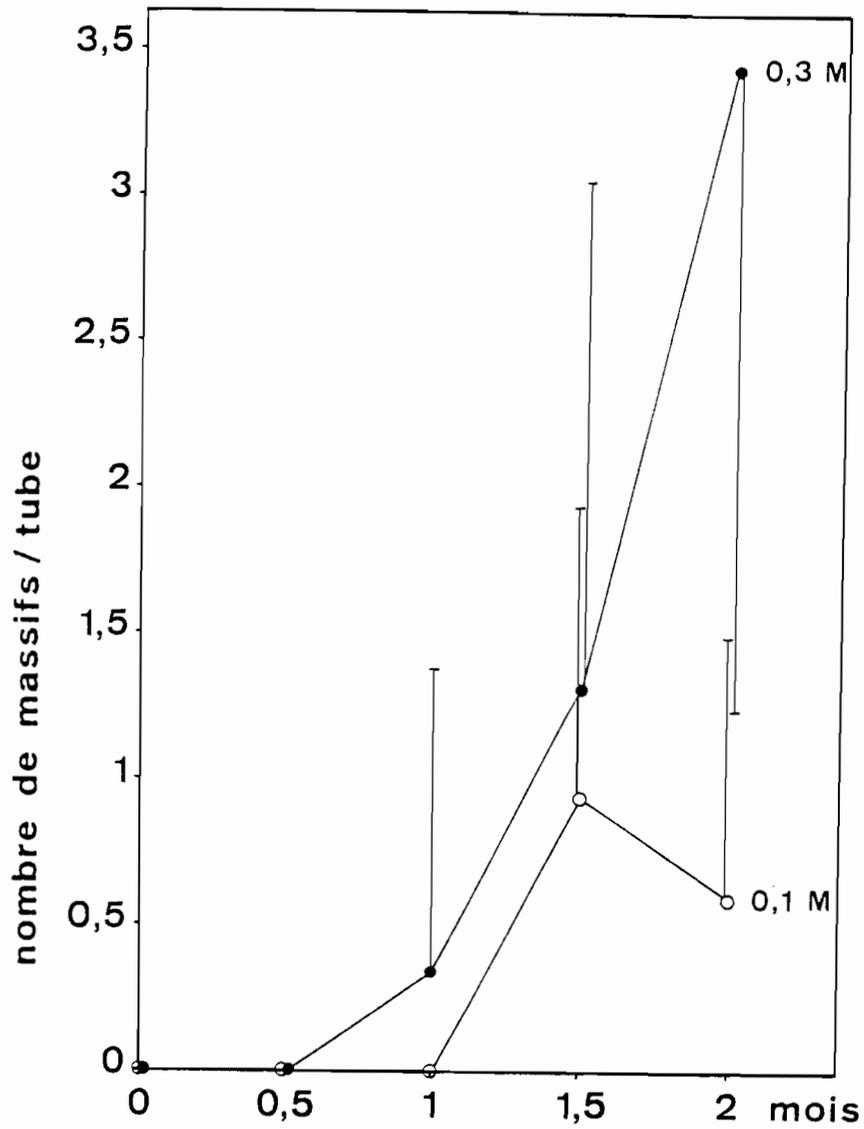


Fig. 13 A : Evolution du nombre de massifs utilisables pour la congélation d'une culture d'embryoïdes du clone BC 068 pendant 2 mois sur des milieux contenant 0,1M (○) ou 0,3M (●) de saccharose. Les valeurs indiquées représentent le nombre moyen de massifs par tube. Chaque valeur correspond à la moyenne de 48 mesures. Les traits verticaux représentent les écarts-type .

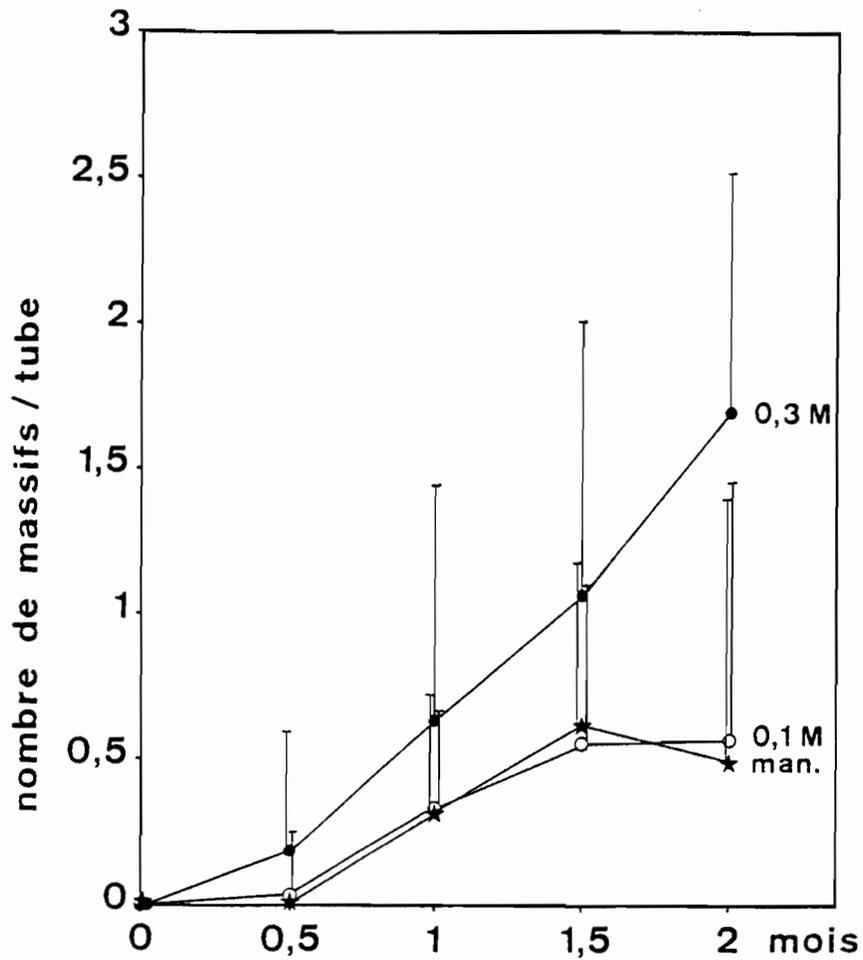


Fig. 13 B : Evolution du nombre de massifs utilisables pour la congélation d'une culture d'embryoïdes du clone BC 156 pendant 2 mois sur des milieux contenant 0,1M (○) , 0,3M (●) de saccharose ou 0,1M de saccharose + 0,2M de mannitol (★). Les valeurs indiquées représentent le nombre moyen de massifs par tube. Chaque valeur correspond à la moyenne de 48 mesures. Les traits verticaux représentent les écarts-type.

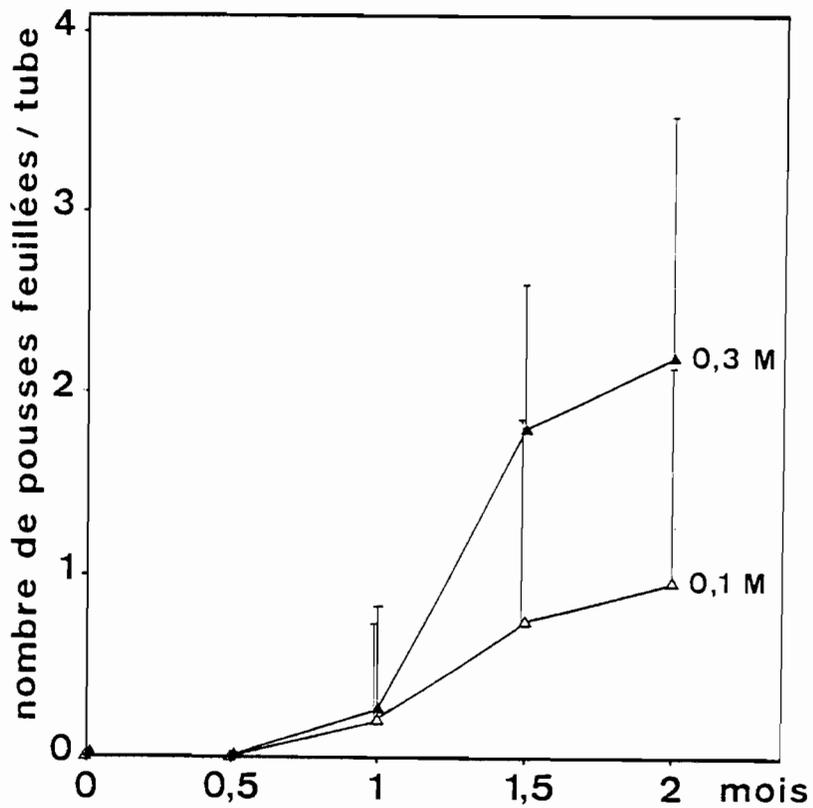


Fig. 14 A : Evolution du nombre de pousses feuillées d'une culture d'embryoïdes du clone BC 068 pendant 2 mois sur des milieux contenant 0,1M (△) ou 0,3M (▲) de saccharose. Les valeurs indiquées représentent le nombre moyen de pousses feuillées par tube. Chaque valeur correspond à la moyenne de 48 mesures. Les traits verticaux représentent les écarts-type .

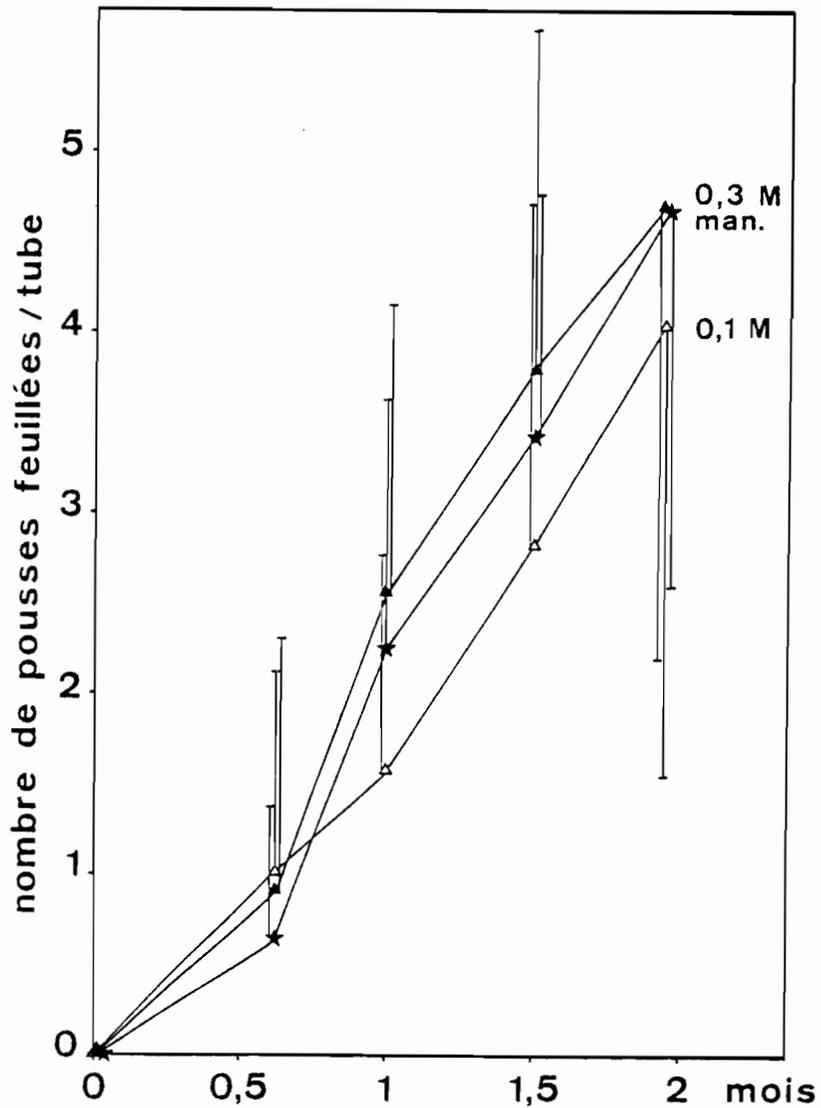


Fig. 14 B : Evolution du nombre de pousses feuillées d'une culture d'embryoïdes du clone BC 068 pendant 2 mois sur des milieux contenant 0,1M (Δ) , 0,3M (\blacktriangle) de saccharose ou 0,1M de saccharose + 0,2M de mannitol (\star). Les valeurs indiquées représentent le nombre moyen de pousses feuillées par tube. Chaque valeur correspond à la moyenne de 48 mesures. Les traits verticaux représentent les écarts-type.

2.2. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE MASSIFS UTILISABLES POUR LA CONGÉLATION

Des différences existent aussi lorsque l'on considère l'apparition de massifs de jeunes embryoïdes (Figure 13 A et B). Ces massifs apparaissent plus précocement pour le clone BC 156 qui présente une croissance plus lente que pour le clone BC 068 tant sur 0,1 que sur 0,3M de saccharose. Avec 0,1M de saccharose, le nombre de massifs d'embryons juvéniles tend à se stabiliser (clone BC 156) ou à diminuer (clone BC 068) après 6 semaines de culture, en raison d'une évolution des jeunes embryons. Au bout de 2 mois, le nombre moyen de massifs est alors sensiblement égal pour les deux clones (0,55 massif par tube en moyenne). Sur 0,3M de saccharose, au contraire, le nombre de massifs utilisables pour la cryoconservation augmente de façon continue mais inégalement suivant les clones : après 2 mois de culture le nombre moyen de massifs par tube est de 3,4 pour le clone BC 068 contre 1,8 pour le clone BC 156.

2.3. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE POUSSÉS FEUILLÉES

Le nombre de pousses feuillées (Figure 14 A et B) diffère également entre les clones. Sur le milieu standard de multiplication (0,1M), les premières pousses feuillées apparaissent dès la deuxième semaine chez le clone BC 156, au bout d'un mois seulement pour l'autre clone. A la fin de la culture, le nombre moyen de pousses feuillées produit par tube est alors de 1 (BC 068) et de 4 (BC 156). L'utilisation du milieu 0,3M accroît de façon inégale la production de pousses feuillées qui est multipliée par 2,2 chez le clone BC 068 et 1,2 chez le clone BC 156. Les valeurs finales sont alors de 2,2 en moyenne pour le clone BC 068 et de 4,7 pour le clone BC 156.

../...

2.4. EFFETS DU REMPLACEMENT PARTIEL DU SACCHAROSE PAR DU MANNITOL

Des expériences complémentaires ont été réalisées avec le clone BC 156 (Figure 12 B , 13 B et 14 B). Une partie du saccharose (0,2M sur 0,3M) est remplacée par la même quantité de mannitol (0,2M). Dans ces conditions, la croissance des explants (Figure 12 B) est sensiblement diminuée puisque le poids de matière fraîche des explants n'est multiplié que par 5,3 en deux mois au lieu de 7 avec les milieux contenant 0,1M et 0,3M de saccharose. De même, le nombre de massifs d'embryoïdes utilisables pour la congélation est abaissé (Figure 13 B) : égal à 0,5 massif par tube, il est voisin de celui obtenu avec le milieu de multiplication (0,55 massif par tube), inférieur à celui observé avec 0,3M de saccharose (1,7). L'emploi de mannitol ne semble pas agir sur la production de pousses feuillées (Figure 14 B) puisque les résultats obtenus après 2 mois de culture sont équivalents à ceux des autres conditions.

2.5. EFFETS DE L'ACCROISSEMENT DE LA DURÉE DE CULTURE

Les résultats précédents ont mis en évidence une augmentation continue du nombre de massifs d'embryoïdes utilisables pour la cryoconservation sur le milieu contenant 0,3M de saccharose. Des cultures de durée plus longue (3 et 4 mois) ont été réalisées afin de déterminer les effets d'un traitement prolongé sur ce milieu (Tableau 7). Avec le clone BC 068, qui a été choisi pour cet essai, le nombre de massifs d'embryoïdes par tube reste sensiblement constant : 3,5 après 2 mois de culture; 3,8 après 4 mois. Par contre, le nombre moyen de pousses feuillées continue de s'accroître, passant de 2,2 à 5,2 par tube. Il en est de même du poids de matière fraîche moyen des cultures qui est multiplié par 1,5 (4,6 g au lieu de 2,8 g). De plus, les brunissements du milieu augmentent avec la durée de culture et certains explants commencent à se nécroser.

../...

		Nombre moyen de massifs par tube	Nombre moyen de pousses feuillées par tube	PMF moyen d'un massif (q)
	2 mois			
	(48)	3,5 ± 2,2	2,2 ± 1,7	2,8 ± 1,3
Durée de	-----	-----	-----	-----
culture	3 mois	3,5 ± 2,5	3,1 ± 3,2	
sur	(23)			
SAC 0,3M	-----	-----	-----	-----
	4 mois	3,8 ± 2,7	5,2 ± 2,8	4,6 ± 2,4
	(16)			

Tabl. 7 : Nombre de massifs d'embryoïdes, de pousses feuillées et PMF par tube après 2 , 3 et 4 mois de culture sur milieu de base additionné de 0,3M de saccharose (clone BC 068). Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de tubes utilisés pour les mesures. Chaque résultat est présenté avec son écart-type.

3. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus reflètent la différence de comportement qui existe entre les deux clones étudiés. Le clone BC 068, qui présente une croissance pondérale plus importante que celle du clone BC 156, produit également plus de massifs de jeunes embryons mais moins de pousses feuillées. L'apparition des pousses feuillées est plus tardive avec BC 068 qu'avec le clone BC 156. Les différences sont dues au fait que la prolifération et la production de pousses feuillées sont deux phénomènes qui sont décalés dans le temps, l'apparition des pousses feuillées faisant suite à la prolifération. Dans le cas du clone BC 156, la prolifération s'arrête plus tôt que chez BC 068 et la production de pousses feuillées devient rapidement prédominante. L'augmentation de la durée de culture réalisée avec le clone BC 068 confirme cette observation : après 4 mois de culture, le nombre de pousses feuillées par tube est le même que celui obtenu en 2 mois avec le clone BC 156. Enfin, l'addition de mannitol au milieu standard diminue la croissance des explants mais le nombre d'embryoïdes congelables et le nombre de pousses feuillées obtenues en 2 mois sont les mêmes que sur le milieu de multiplication.

En conclusion, l'augmentation de la teneur en saccharose jusqu'à 0,3M dans le milieu d'obtention des embryoïdes n'inhibe pas la croissance des cultures, ni le développement des pousses feuillées qui peut même être stimulé dans le cas du clone BC 068. Ce résultat est à rapprocher du fait que les fortes teneurs en saccharose favorisent la croissance des embryons zygotiques de palmier à huile (RABECHAULT et al. , 1974). Par contre, l'emploi de cette forte teneur en sucre permet d'obtenir en grand nombre des massifs d'embryons congelables, en bloquant aux premiers stades de leur développement les embryoïdes néoformés au cours des 2 mois de culture. Cet effet des

fortes concentrations en sucre a déjà été observé sur d'autres matériels : MONNIER (1976) indique que si le développement d'embryons zygotiques de Capselle (Capsella bursa-pastoris Moench) cultivés in vitro nécessite au départ des teneurs élevées en saccharose, leur évolution ultérieure n'est possible qu'avec une diminution progressive de la concentration en sucre. Des variations similaires de la concentration en saccharose sont nécessaires pour la production puis le développement d'embryons haploïdes à partir d'anthères cultivées in vitro (MAHESHWARI et al. , 1980 ; DUNWELL, 1985).

L'expérimentation complémentaire réalisée sur le clone BC 156 (remplacement d'une partie du saccharose par du mannitol) montre que l'augmentation du nombre d'embryoïdes sur le milieu d'obtention est dûe à un effet spécifique du saccharose. Elle ne résulte pas de l'élévation de la pression osmotique : à pression osmotique égale seul le saccharose semble augmenter le nombre d'embryoïdes dont le développement est bloqué à un stade juvénile. Un phénomène analogue a été observé lors de la culture d'anthères de Solanum tuberosum (SOPORY, 1979) : si une partie du saccharose est remplacée par du mannitol, la production d'embryons polliniques diminue. Le saccharose n'a donc pas dans ces deux cas qu'un simple effet osmorégulateur.

Les conditions retenues pour l'obtention des embryons somatiques utilisés pour les expériences de congélation seront donc les suivantes : culture de 2 mois sur le milieu de base additionné de 0,3M de saccharose.

CHAPITRE III

EFFETS DU PRÉTRAITEMENT SUR LA SURVIE ET LA REPRISE

DES EMBRYOÏDES APRÈS UNE CONGÉLATION RAPIDE

Dans ce chapitre seront étudiés les effets de diverses substances cryoprotectrices, utilisées seules ou en mélange, sur la survie puis la reprise de la prolifération de massifs d'embryoïdes ayant été congelés dans l'azote liquide ou n'ayant subi que le prétraitement et le post-traitement (embryoïdes témoins). La congélation utilisée dans les différentes expériences est une congélation rapide ($200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) par immersion directe des tubes cryobiologiques dans l'azote liquide. Le réchauffement choisi est un réchauffement rapide dans un bain-marie thermostaté à 40°C . Le post-traitement, d'une durée de trois semaines, est effectué en boîtes de Petri. Il comporte une culture d'une semaine sur un milieu contenant 0,3M de saccharose suivie d'une culture de deux semaines sur le milieu standard (0,1M de saccharose). Les massifs sont ensuite transférés en tubes de culture. L'évolution de la teneur en saccharose, de la teneur en eau et du poids de matière fraîche de massifs témoins et congelés pendant le pré et le post-traitement seront ensuite étudiés.

.. / ...

1. EFFETS DU PRÉTRAITEMENT SUR LE TAUX DE SURVIE

1.1. EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES AVEC LE SACCHAROSE

Les premières survies de massifs d'embryoïdes après leur congélation ont été décelées grâce à l'emploi du Test T.T.C. (cf. p. 50); elles ont été obtenues après un prétraitement de 7 jours des embryoïdes sur un milieu fortement concentré en saccharose (0,75M). Ces conditions diffèrent sensiblement de celles préconisées par MONNIER et LEDDET (1978,1980) pour le prétraitement d'embryons zygotiques immatures de capselle (Capsella bursa-pastoris Moench) qui nécessite une préculture de 6 jours sur un milieu contenant environ 0,9M de saccharose. Des concentrations en saccharose inférieures n'ont pas d'effet cryoprotecteur et des concentrations supérieures (à partir de 1,15M) se révèlent toxiques et empêchent le développement ultérieur des embryons témoins. De plus avec ce matériel, des durées de culture inférieures à 6 jours, quelle que soit la teneur en saccharose, ne permettent pas d'assurer la survie des embryons après leur congélation.

Dans le cas du palmier à huile, afin de déterminer les conditions d'emploi du saccharose permettant d'obtenir un taux de survie maximum, deux paramètres ont été étudiés : la durée de prétraitement (0 à 15 jours) et la concentration en saccharose du milieu de culture (0,3 à 0,9M). Les résultats sont présentés dans le Tableau 8 pour le clone BC 068 et dans le Tableau 9 pour le clone BC 156. Ils ont été obtenus à partir de deux expérimentations indépendantes. Les résultats indiquent le nombre de massifs, témoins et congelés, encore vivants à la fin du post-traitement par rapport au nombre de massifs traités.

.../...

		Durée du prétraitement						
		0 J *	1 J	3 J	7 J	11 J	15 J	
Concentration en saccharose du milieu de prétraitement	Té	11/16	8/9	7/9	7/10	6/9	8/11	
	0,3 M							
	Al	4/16	0/9	1/8	2/10	0/9	4/10	
	Té		7/9	6/9	6/9	7/8	4/9	
	0,5 M							
	Al		2/9	4/9	3/10	3/8	4/8	
	Té		5/8	6/9	3/8	6/8	4/9	
	0,75 M							
	Al		0/9	1/9	0/9	1/8	2/9	
	Té		7/9	5/8	6/9	3/7	4/8	
	0,9 M							
	Al		0/9	5/9	1/10	0/8	2/9	

Tabl.8 : Survie des massifs d'embryoïdes témoins (Té) et congelés (AL) du clone BC 068 en fonction de la durée du prétraitement (en jours) et de la teneur en saccharose du milieu de préculture. Les valeurs indiquées correspondent à la somme des résultats de deux expériences indépendantes, sauf dans les colonnes signalées par un astérisque (*) pour lesquelles une seule expérimentation a été réalisée. Le premier chiffre de chaque case indique le nombre de massifs vivants, le second le nombre de massifs traités.

		Durée du prétraitement						
		0 J *	1 J*	3 J*	7 J	11 J	15 J	
Concentration en saccharose du milieu du prétraitement	Té	26/28	3/5	4/5	7/8	10/12	10/10	
	0,3 M	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	Al	5/25	0/5	0/5	2/11	4/10	6/10	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	Té		5/6	6/6	9/10	9/10	7/10	
	0,5 M	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	Al		2/6	0/5	2/11	5/11	3/12	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	Té		5/5	4/6	7/10	6/10	8/10	
	0,75 M	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	Al		0/4	1/5	2/10	5/11	4/10	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Té		5/5	4/6	9/9	9/11	9/10		
0,9 M	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Al		0/5	0/5	0/10	1/10	1/11		
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		

Tabl. 9 : Survie des massifs d'embryoïdes témoins (Té) et congelés (AL) du clone BC 156 en fonction de la durée de prétraitement (en jours) et de la teneur en saccharose du milieu de préculture. Les valeurs indiquées correspondent à la somme des résultats de deux expériences indépendantes, sauf dans les colonnes signalées par un astérisque (*) pour lesquelles une seule expérimentation a été réalisée. Le premier chiffre de chaque case indique le nombre de massifs vivants, le second le nombre de massifs traités.

. Survie des massifs témoins

Elle est estimée 3 semaines après le réchauffement à l'issue du post-traitement. Pour les deux clones étudiés, l'examen des résultats concernant la survie des massifs témoins ne permet pas de déceler un effet toxique dû au prétraitement. Ni l'allongement de la durée de préculture, ni l'augmentation de la teneur en saccharose du milieu ne semblent avoir d'effets positifs ou négatifs sur la survie des massifs, compte tenu des effectifs utilisés. Ainsi, avec le clone BC 156 (Tableau 9), après un prétraitement de 15 jours sur 0,9M de saccharose, 9 massifs sur 10 sont demeurés vivants; un résultat équivalent est obtenu après 7 jours de prétraitement sur 0,5M de saccharose.

. Survie des massifs congelés

La survie des massifs congelés à -196°C , mesurée 3 semaines après leur réchauffement, est toujours inférieure à celle des témoins; elle diffère sensiblement d'une condition expérimentale à l'autre. Ainsi, pour le clone BC 156 (Tableau 9), 4 massifs sur 10 ont résisté à l'azote après un prétraitement de 11 jours sur 0,3M de saccharose et aucun après 1 jour de prétraitement sur 0,9M. Avec le clone BC 068 (Tableau 8), des résultats identiques (aucune survie) ont été obtenus aussi bien après 1 jour de prétraitement sur 0,3M qu'après 11 jours de préculture sur 0,9M de saccharose. Pour les conditions définies au départ, soit un prétraitement de 7 jours sur 0,75M de saccharose, on n'observe aucune survie pour le clone BC 068 (0 massif sur 9 congelés) et 2 massifs vivants sur 10 congelés pour le clone BC 156.

Ces expériences préliminaires n'ayant pas permis de déceler avec certitude un effet de la durée du prétraitement et de la concentration en saccharose, les conditions choisies au départ,

../...

soit 7 jours de préculture sur 0,75M de saccharose, ont donc été conservées pour le prétraitement standard des embryoïdes. Ces conditions, qui ne sont pas forcément les meilleures, se révéleront donner des résultats reproductibles dans les expériences ultérieures.

1.2. EFFETS D'AUTRES SUBSTANCES CRYOPROTECTRICES UTILISÉES SEULES OU EN MÉLANGE

L'efficacité cryoprotectrice d'autres substances comme le sorbitol et le DMSO est comparée avec celle obtenue avec le saccharose seul aux concentrations de 0,3 et 0,75M. Les expérimentations sont réalisées sur le clone BC 156.

A) EFFETS COMPARÉS DU SACCHAROSE ET DU SORBITOL

Le sorbitol (C₆ H₁₄ O₆), polyol voisin des sucres, de plus en plus fréquemment utilisé en cryoconservation est employé en remplacement de tout ou partie du saccharose dans le milieu de prétraitement. Il est utilisé seul aux concentrations de 0,3 et 0,75M ou en mélange avec le saccharose (0,3M de saccharose + 0,45M de sorbitol). Les 0,45M de sorbitol du mélange représentent la différence entre la concentration en sucre du milieu d'obtention (0,3M) et celle du milieu de préculture standard des embryoïdes (0,75M). Deux durées de prétraitement, 2 jours et 7 jours, ont été utilisées. Le nombre de massifs employés dans cette expérimentation varie de 14 à 61 selon les conditions.

. Survie des massifs témoins (Figure 15)

Une préculture de 2 jours des massifs témoins sur un milieu contenant 0,3M de saccharose ou de sorbitol donne des taux de survie analogues (69 et 64 % respectivement). Lorsque la durée de préculture est portée à 7 jours sur les mêmes milieux,

.../...

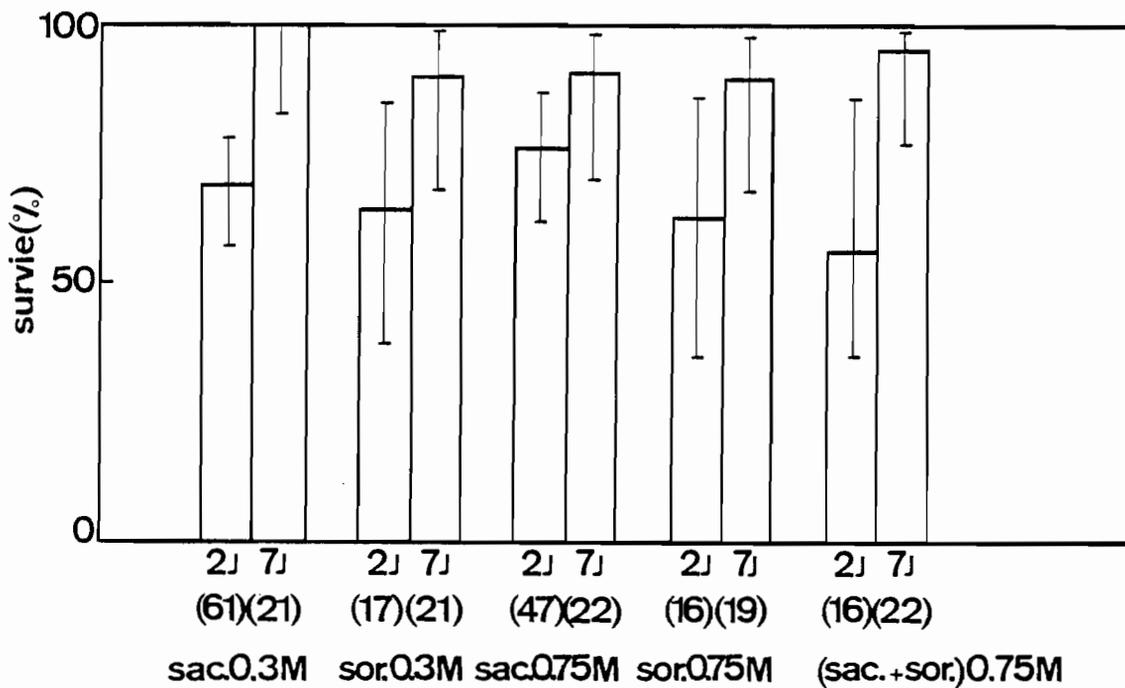


Fig. 15 : Pourcentage de survie de massifs d'embryoïdes témoins du clone BC 156 en fonction de la durée du prétraitement (2 jours ou 7 jours), de la nature des substances cryoprotectrices, saccharose (SAC), sorbitol (SOR), mélange saccharose + sorbitol (SAC + SOR) et de leur concentration dans le milieu de préculture (0,3M ou 0,75M). Le nombre de massifs traités par condition est indiqué entre parenthèses. La survie est estimée après un post-traitement de 3 semaines. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages.

les taux de survie sont sensiblement accrus : ils passent à 100 % avec le saccharose et à 90,5 % avec le sorbitol. Lorsque la concentration du milieu en cryoprotecteurs est augmentée jusqu'à 0,75M et après un prétraitement de 2 jours, les pourcentages de survie sont de 77 pour 0,75M de saccharose, de 62,5 pour 0,75M de sorbitol et de 56,3 pour le mélange saccharose + sorbitol. Pour une durée de prétraitement de 7 jours sur les mêmes milieux, les taux de survie sont sensiblement plus élevés pour les trois conditions expérimentales, par rapport à ceux observés après 2 jours seulement de prétraitement; ils sont de 89,5 % avec le sorbitol seul, de 95,5 % avec le mélange saccharose + sorbitol et de 91,4 % avec le saccharose seul.

Dans tous les cas, quelles que soient la concentration et nature des substances cryoprotectrices, l'augmentation de la durée de prétraitement permet d'accroître les pourcentages de survie des massifs.

. Survie des massifs congelés (Figure 16)

Elle est dans tous les cas inférieure à celle obtenue avec les massifs témoins. Une préculture de 2 jours des massifs sur un milieu contenant 0,3M de saccharose entraîne une survie de 9,7 %; elle est de 0 % avec du sorbitol. Avec cette concentration, une augmentation de la durée du prétraitement de 2 à 7 jours n'apporte pas d'amélioration des résultats.

Si la concentration en cryoprotectants est portée à 0,75M, une préculture de 2 jours donne des taux de survie faibles pour le saccharose et le sorbitol (4 et 7 %) ou nuls avec le mélange saccharose + sorbitol. Une durée de prétraitement de 7 jours permet d'augmenter sensiblement la survie : elle atteint alors 37 % avec le saccharose, 38 % avec le sorbitol et 18 % avec le mélange saccharose + sorbitol.

../...

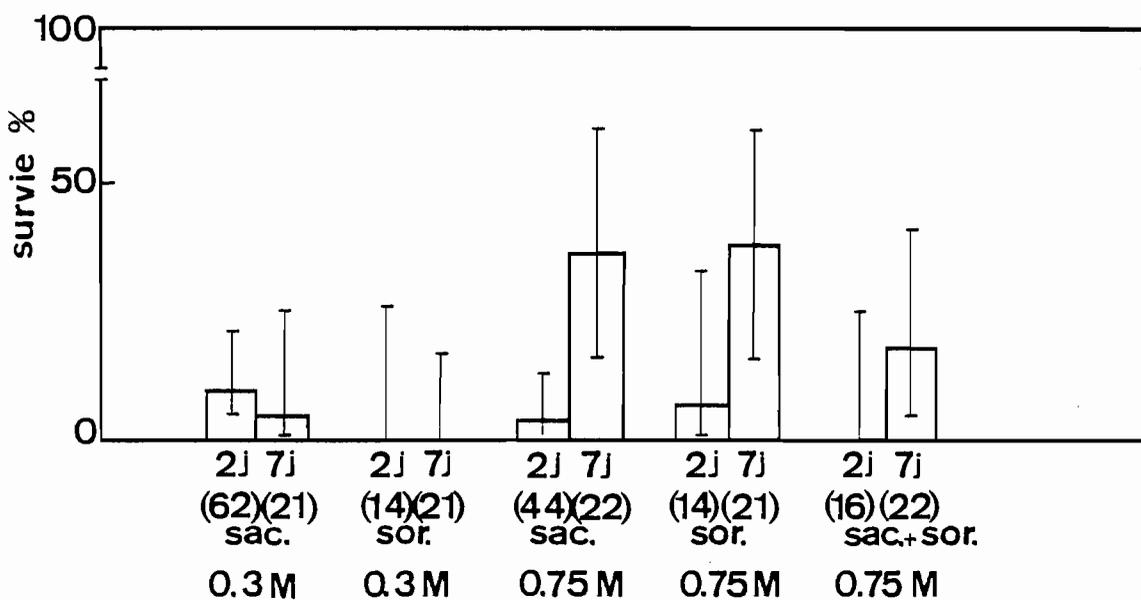


Fig. 16 : Pourcentages de survie de massifs d'embryoïdes du clone BC 156 ayant été congelés dans l'azote liquide en fonction de la durée du prétraitement (2 jours ou 7 jours), de la nature des substances cryoprotectrices, saccharose (SAC), sorbitol (SOR), mélange saccharose + sorbitol (SAC + SOR) et de leur concentration dans le milieu de préculture (0,3M ou 0,75M). Le nombre de massifs traités par condition est indiqué entre parenthèses. La survie est estimée après un post-traitement de 3 semaines. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages.

Ainsi, pour une concentration en cryoprotecteurs de 0,3M, seul le saccharose permet d'assurer une faible survie des massifs, quelle que soit la durée du prétraitement. Avec une molarité d'agents cryoprotecteurs de 0,75M une survie est obtenue quelle que soit la substance utilisée. Les meilleurs résultats sont atteints après un prétraitement de 7 jours.

B) EFFETS DU DIMÉTHYLSULFOXYDE (DMSO)

Pour chacune des conditions précédentes, une expérimentation complémentaire est réalisée en ajoutant 5 % de DMSO (soit 0,64M) au milieu de préculture. Dans le cas d'un prétraitement de 7 jours le DMSO peut être ajouté au milieu pendant toute la durée du prétraitement ou seulement pendant les deux derniers jours. Dans ce dernier cas, les massifs d'embryoïdes subissent alors un prétraitement en deux étapes : 5 jours sans DMSO (sur 0,3 ou 0,75M de saccharose, de sorbitol ou d'un mélange de ces deux constituants), puis 2 jours sur les mêmes milieux additionnés de 5 % de DMSO.

. Survie des massifs témoins (Figure 17)

Après une préculture de 2 jours sur des milieux contenant 0,3M de saccharose ou de sorbitol et 5 % de DMSO, les taux de survie sont de l'ordre de 66 %, valeur voisine de celles (69 % et 64 %) obtenues après des précultures sans DMSO (Figure 15).

La poursuite du prétraitement pendant 7 jours sur les mêmes milieux avec DMSO modifie sensiblement la survie qui peut diminuer (cas du saccharose) ou augmenter (cas du sorbitol). Pour une préculture de 7 jours, lorsque le DMSO n'est ajouté au milieu de prétraitement que pendant les 2 derniers jours, le taux de survie atteint 92 % avec le saccharose, valeur supérieure de 40 % à celle obtenue lorsque le DMSO est présent dans le milieu pendant les 7 jours de la préculture. Avec le sorbitol utilisé à la même concentration (0,3M), le taux de survie est le même que le DMSO soit présent pendant les 2 ou 7 jours de la préculture.

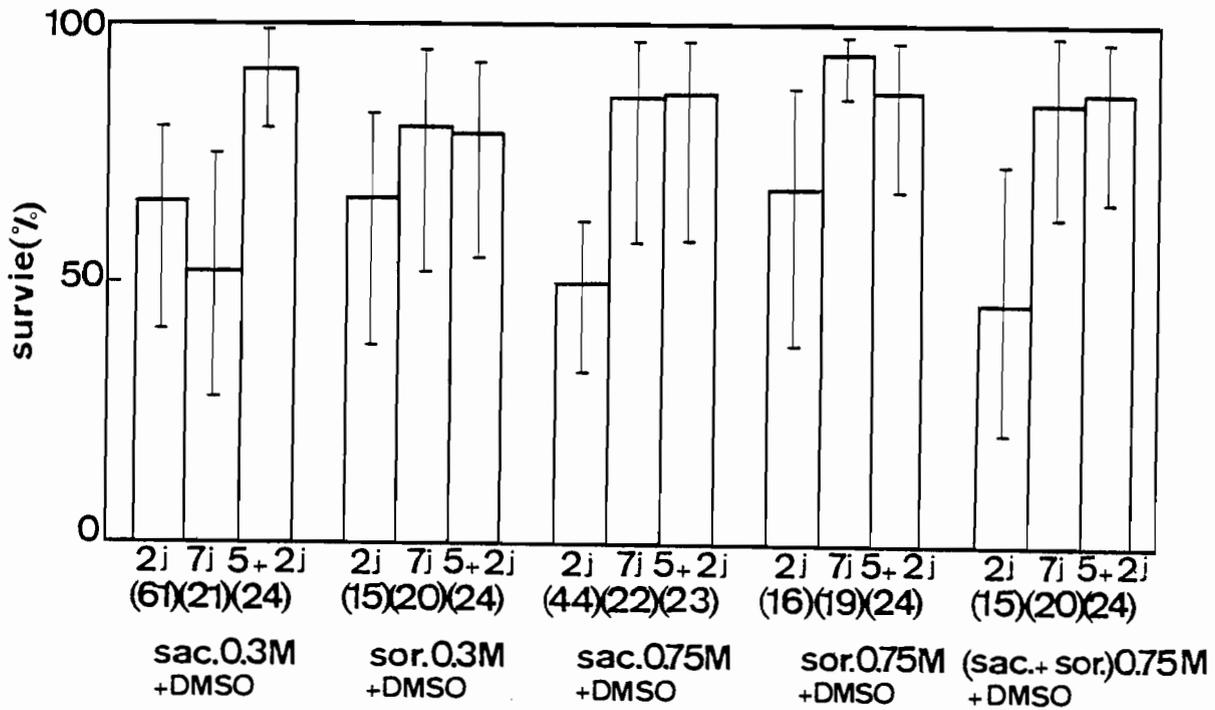


Fig. 17 : Pourcentages de survie de massifs d'embryoïdes témoins du clone BC 156 en fonction de la durée du prétraitement (2 jours ou 7 jours), de la composition des mélanges cryoprotecteurs utilisés, saccharose + DMSO (SAC + DMSO), sorbitol + DMSO (SOR + DMSO), saccharose + sorbitol + DMSO (SAC + SOR + DMSO) et de leur concentration dans le milieu de préculture (0,3M ou 0,75M pour le saccharose, le sorbitol et le mélange saccharose + sorbitol; 0,64M soit 5 % (V/V) pour le DMSO). Dans le cas d'un prétraitement de 7 jours, le DMSO est présent soit pendant tout le traitement (7 jours), soit pendant les 2 derniers jours de préculture (5 jours + 2 jours). Le nombre de massifs traités par condition est indiqué entre parenthèses. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages.

Lorsque la concentration en saccharose ou en sorbitol est de 0,75M la survie n'est plus que de 50 % avec le saccharose, 69 % avec le sorbitol et 46 % avec le mélange saccharose + sorbitol après 2 jours de préculture. Après une préculture de 7 jours, les pourcentages de survie sont plus élevés, que le DMSO soit présent dans le milieu pendant toute la durée du prétraitement ou seulement pendant les 2 derniers jours : les taux de survie, très voisins, sont alors compris entre 85 % et 95 %.

Avec les deux concentrations en saccharose et en sorbitol utilisées dans ces expériences (0,3 et 0,75M), un prétraitement de 7 jours des massifs témoins en présence de DMSO donne en général de meilleurs résultats qu'un prétraitement de 2 jours, sauf pour 0,3M de saccharose. Un apport de DMSO limité aux deux derniers jours de la préculture peut permettre d'améliorer sensiblement les taux de survie lorsqu'un effet toxique est décelé après 7 jours de préculture, comme c'est le cas avec 0,3M de saccharose.

. Survie des massifs congelés (Figure 18)

Les résultats obtenus avec les massifs congelés sont très inférieurs, quelles que soient les conditions de préculture, à ceux obtenus avec les massifs témoins.

Une préculture de 2 jours sur 0,3M de saccharose additionné de 5 % de DMSO conduit à une survie de 21 %; la survie est nulle si le saccharose est remplacé par le sorbitol. L'augmentation de la durée de prétraitement jusqu'à 7 jours sur 0,3M permet d'améliorer la survie qui atteint alors 42 % (cas du saccharose) et 24 % (cas du sorbitol). Lorsque le prétraitement est effectué en deux étapes (5 jours sans DMSO puis 2 jours avec DMSO), les taux de survie sont inférieurs pour le saccharose (24 %) ou équivalents pour le sorbitol (25 %) à ceux obtenus dans les conditions précédentes (7 jours avec DMSO).

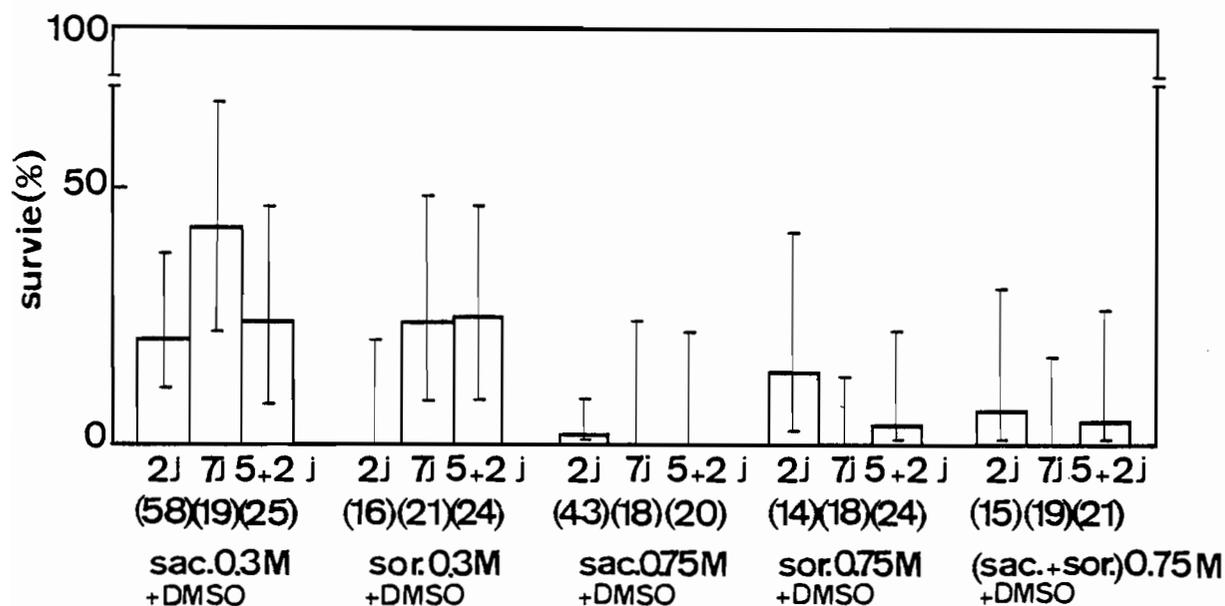


Fig. 18 : Pourcentages de survie de massifs du clone BC 156 ayant été congelés dans l'azote liquide en fonction de la durée du prétraitement (2 jours ou 7 jours), de la composition des mélanges cryoprotecteurs utilisés, saccharose + DMSO (SAC + DMSO), sorbitol + DMSO (SOR + DMSO), saccharose + sorbitol + DMSO (SAC + SOR + DMSO) et de leur concentration dans le milieu de préculture (0,3M ou 0,75M pour le saccharose, le sorbitol et le mélange saccharose + sorbitol; 0,64M, soit 5 % (V/V) pour le DMSO). Dans le cas d'un prétraitement de 7 jours, le DMSO est présent soit pendant tout le traitement (7 jours) soit pendant les 2 derniers jours de préculture (5 jours + 2 jours). Le nombre de massifs traités par condition est indiqué entre parenthèses. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages.

En présence de DMSO, lorsque la concentration en saccharose ou en sorbitol des milieux de préculture passe à 0,75M, les taux de survie diminuent. Ceci est particulièrement net avec le saccharose ou le mélange saccharose + sorbitol. Pour le sorbitol un taux de survie de 14 % est toutefois obtenu après 2 jours de préculture. L'augmentation à 7 jours de la durée de préculture en présence de DMSO annule les taux de survie. Lorsque le DMSO n'est ajouté que pendant les 2 derniers jours de la préculture, des taux de survie très faibles peuvent être obtenus.

En conclusion de cette étude, les taux de survie des massifs témoins prétraités avec ou sans DMSO sont généralement accrus par la prolongation à 7 jours de la durée du prétraitement. Dans le cas des embryoïdes congelés, les résultats diffèrent en fonction de la présence ou non du DMSO dans les milieux de préculture : sans DMSO, des taux de survie importants sont obtenus pour un prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose, de sorbitol ou du mélange saccharose + sorbitol. Avec le DMSO, les meilleurs résultats sont obtenus après des prétraitements de 7 jours sur un milieu contenant 0,3M de saccharose ou de sorbitol. Le DMSO, lorsqu'il est utilisé en présence d'une forte concentration de saccharose, de même molarité totale, a généralement un effet négatif sur la survie des embryoïdes congelés à -196°C .

2. EFFETS DU PRÉTRAITEMENT SUR LE TAUX DE REPRISE DES MASSIFS TÉMOINS

Quelles que soient les conditions du prétraitement, aucune reprise de la prolifération des massifs congelés n'a été observée au cours des expériences précédentes. Les massifs congelés considérés comme vivants à la fin du post-traitement se nécrosent en effet rapidement après leur repiquage en tubes sur milieu standard. Les résultats décrits dans ce paragraphe ne concernent donc que la reprise des massifs d'embryoïdes témoins en fonction des divers prétraitements.

.../...

2.1. EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES AVEC LE SACCHAROSE

La reprise de la prolifération des massifs témoins pré-traités pendant des durées variables sur des milieux plus ou moins concentrés en saccharose n'a pas été suivie quantitativement. Néanmoins, il apparaît que la reprise de l'embryogenèse adventive est possible chez les massifs témoins (Figure 19) pour toutes les conditions expérimentales.

2.2. EFFETS D'AUTRES SUBSTANCES CRYOPROTECTRICES

A) EFFETS COMPARÉS DU SACCHAROSE ET DU SORBITOL (FIGURE 19)

Lorsque le milieu de prétraitement contient 0,3M de saccharose ou de sorbitol, la reprise atteint respectivement 47 % et 67 % des embryoides après 2 jours de préculture. Après une durée plus longue (7 jours), le taux de reprise est de 81 % avec le saccharose, soit une augmentation de 34 % par rapport au résultat précédent; il diminue de 19 %, jusqu'à 48 % lorsque c'est le sorbitol qui est utilisé.

Avec 0,75M de cryoprotecteurs et un prétraitement de 2 jours, le taux de reprise est de près de 50 % pour le saccharose ou le mélange saccharose + sorbitol et de 62,5 % pour le sorbitol. L'allongement à 7 jours de la durée de préculture produit un accroissement du taux de reprise de 47 à 73 % lorsque le saccharose est utilisé et une diminution de 62,5 à 48 % dans le cas du sorbitol. Avec le mélange saccharose + sorbitol, l'augmentation de la durée de prétraitement ne modifie pas le taux de reprise.

Avec le saccharose, il y a donc une augmentation de la reprise en fonction de la durée du prétraitement; avec le sorbitol au contraire, un résultat inverse est obtenu. Les meilleurs taux de reprise sont atteints avec une préculture de 7 jours sur 0,3M ou 0,75M de saccharose.

../...

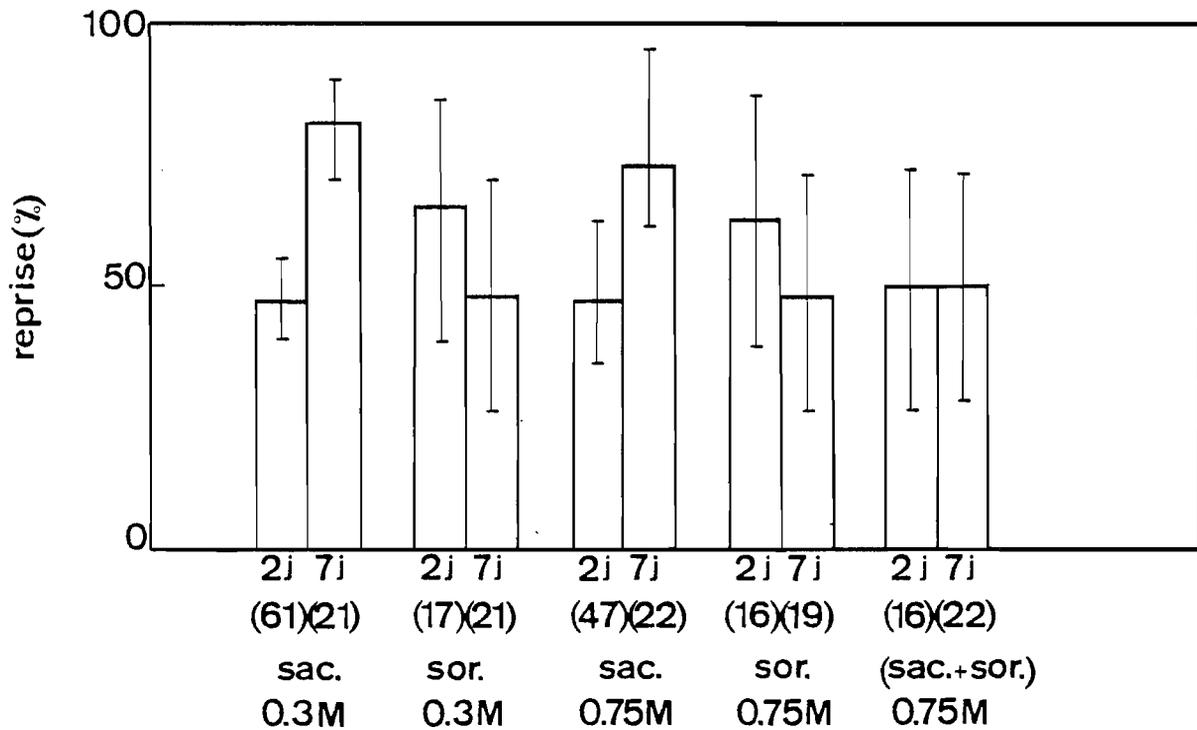


Fig. 19 : Pourcentages de reprise de la prolifération de massifs d'embryoïdes témoins du clone BC 156 en fonction de la durée du prétraitement (2 jours ou 7 jours), de la nature des substances cryoprotectrices, saccharose (SAC), sorbitol (SOR), mélange saccharose + sorbitol (SAC + SOR) et de leur concentration dans le milieu de préculture (0,3M ou 0,75M). Le nombre de massifs traités par condition est indiqué entre parenthèses. La reprise est estimée 8 semaines après la fin du post-traitement. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages.

B) EFFETS DU DMSO (FIGURE 20)

Avec des milieux de culture contenant 0,3M de saccharose ou de sorbitol, l'addition de 5 % de DMSO ne modifie pas de façon importante les taux de reprise lorsque la durée de prétraitement est de 2 jours. Si la durée de préculture est portée à 7 jours, le taux de reprise est abaissé de 17 % environ avec le saccharose et le sorbitol. Si le DMSO n'est appliqué que pendant les 2 derniers jours de préculture, le comportement des massifs diffère selon que les 5 premiers jours du prétraitement ont été réalisés en présence de saccharose ou de sorbitol. Dans le premier cas, le taux de reprise (67 %) rejoint celui des témoins. Dans le second cas, au contraire, le DMSO exerce un effet toxique important qui abaisse le taux de reprise jusqu'à 24 %.

Avec 0,75M d'agents cryoprotecteurs, les taux de reprise restent élevés (63 %) lorsque le DMSO n'est appliqué que pendant 2 jours. Ils diminuent lorsque la durée du prétraitement avec DMSO est portée à 7 jours : 27 % pour le saccharose (-37 %) et 47 % pour le sorbitol (-16 %). Si le DMSO n'est appliqué que pendant les 2 derniers jours du prétraitement, la réponse varie peu selon la composition du milieu de préculture. Ainsi, en présence de saccharose, le taux de reprise est de 42 %. Avec le sorbitol, il est de 30 % et de 40 % avec le mélange saccharose + sorbitol.

La comparaison des taux de reprise obtenus après une préculture avec (Figure 20) ou sans DMSO (Figure 19) montre que le DMSO, utilisé pendant 2 jours, n'exerce pas d'action toxique décelable. Par contre, pour des prétraitements de 7 jours, la reprise est toujours meilleure lorsque les milieux de préculture ne contiennent pas de DMSO.

En conclusion, la reprise des massifs d'embryoïdes témoins est possible, quelles que soient les durées de préculture, l'utilisation du DMSO et les concentrations en saccharose ou en sor-

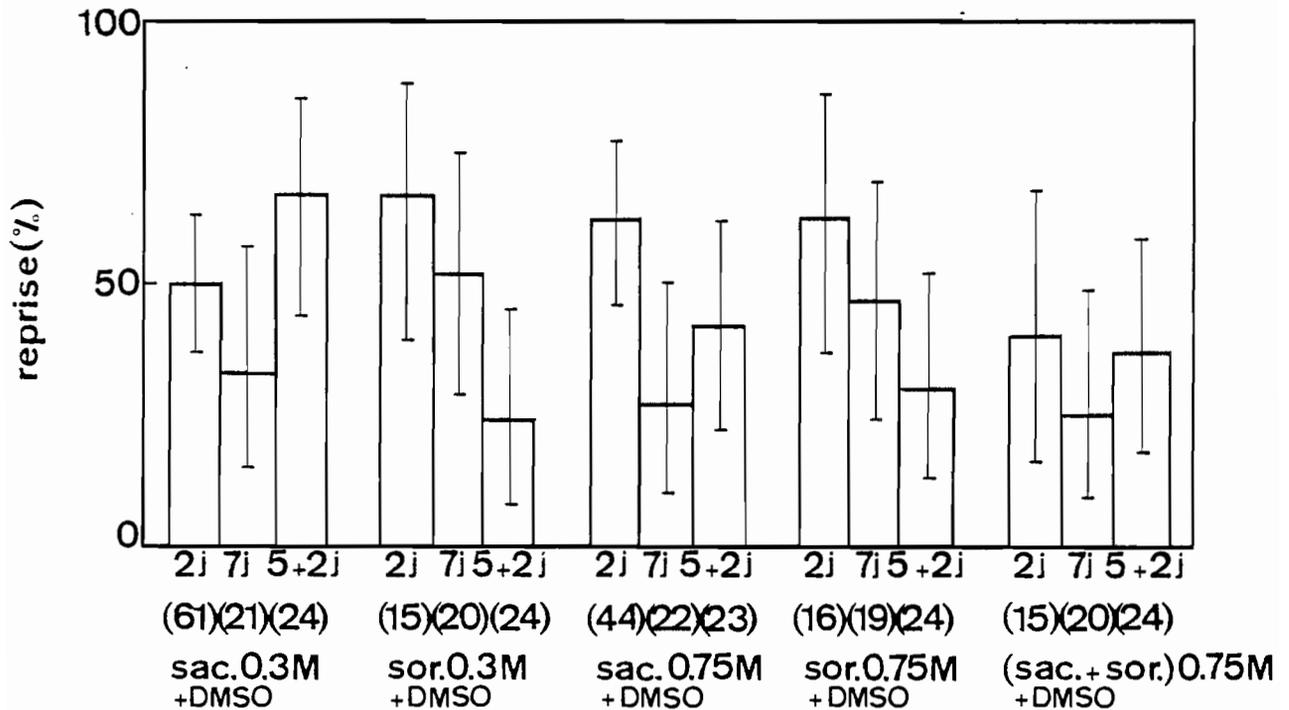


Fig. 20 : Pourcentages de reprise de la prolifération de massifs d'embryoïdes témoins du clone BC 156 en fonction de la durée du prétraitement (2 jours ou 7 jours), de la composition des mélanges cryoprotecteurs utilisés, saccharose + DMSO (SAC + DMSO), sorbitol + DMSO (SOR + DMSO), saccharose + sorbitol + DMSO (SAC + SOR + DMSO) et de leur concentration dans le milieu de préculture (0,3M ou 0,75M pour le saccharose, le sorbitol et le mélange saccharose + sorbitol; 0,64M soit 5 % (V/V) pour le DMSO). Dans le cas d'un prétraitement de 7 jours, le DMSO est présent soit pendant tout le prétraitement (7 jours), soit pendant les 2 derniers jours de préculture (5 jours + 2 jours). Le nombre de massifs traités par condition est indiqué entre parenthèses. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages.

bitol (0,3 ou 0,75M). Cependant, les pourcentages de reprise sont toujours inférieurs aux pourcentages de survie : l'effet toxique des substances cryoprotectrices employées ne se manifeste pas toujours à la fin du post-traitement mais souvent après un certain délai nécessaire à la reprise de l'embryogenèse adventive. Un effet favorable du saccharose peut être observé, quelle que soit sa concentration, lorsqu'il est utilisé seul, pendant des durées prolongées. Quant à l'action du DMSO, elle diffère selon les conditions d'utilisation : son effet toxique apparaît après des durées prolongées de prétraitement ou bien encore lorsqu'il est employé en fin de préculture en présence de sorbitol.

Si dans le cas des massifs témoins une reprise de la prolifération a pu être obtenue quelles que soient les conditions du prétraitement, aucune reprise de la prolifération des massifs congelés n'a été observée malgré le nombre élevé de massifs qui ont été congelés (612), toutes conditions confondues, alors que des taux de survie relativement importants, pouvant atteindre 42 %, ont été obtenus.

3. COMPORTEMENT DES EMBRYOÏDES PENDANT LE PRÉTRAITEMENT ET LE POST-TRAITEMENT

L'évolution de la teneur en eau, de la teneur en saccharose et du pourcentage d'augmentation du poids de matière fraîche (PMF) moyen de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 a été suivie pendant les 7 jours du prétraitement sur un milieu contenant 0,75M de saccharose et les 3 semaines de post-traitement après que les massifs aient été ou non congelés dans l'azote liquide.

.../...

3.1. EVOLUTION DE LA TENEUR EN EAU

La teneur en eau des massifs d'embryoïdes est exprimée en pourcentage de leur poids de matière fraîche. Les mesures pendant le prétraitement et le post-traitement des embryoïdes congelés ont été réalisées sur des effectifs de 15 à 24 massifs. Les valeurs indiquées pendant le post-traitement des massifs témoins représentent la moyenne de 3 mesures.

La teneur en eau des massifs prélevés sur des cultures en conditions standard (0,1M de saccharose) est de 90 %. Après une culture de 2 mois sur le milieu d'obtention des massifs utilisés pour la congélation (0,3M de saccharose), la teneur en eau des embryoïdes n'est plus que de 81 %.

Pendant le prétraitement (Figure 21), la teneur en eau des massifs d'embryoïdes passe de 81 % à 63 % en 7 jours avec une diminution rapide (12 %) pendant les premières 24 heures. Au cours du post-traitement, sur 0,3M de saccharose, la teneur en eau des massifs témoins remonte à 73 % pendant le premier jour. A la fin du post-traitement (1 semaine sur 0,3M puis 2 semaines sur 0,1M de saccharose), la teneur en eau atteint 80 %, valeur similaire à celle obtenue au début du prétraitement des massifs (81 %).

Après une congélation dans l'azote liquide, la réhydratation des massifs congelés est plus importante que celle des massifs témoins : leur teneur en eau atteint 79 % en 24 heures, contre 73 % pour les témoins, c'est-à-dire une valeur proche de celles des massifs au début de leur prétraitement. A la fin du post-traitement, la teneur en eau des massifs ayant été congelés dans l'azote atteint 84 %. Cette réhydratation plus importante des massifs congelés comparativement aux massifs témoins est certainement dûe à des différences de perméabilité cellulaire ou bien à l'existence de tissus dont les cellules ont été tuées par la congélation dans l'azote liquide : l'équilibre hydrique

.../...

entre les milieux de post-traitement et les massifs d'embryoïdes serait atteint plus rapidement lorsque certains tissus ont été lésés de façon irréversible.

3.2. EVOLUTION DE LA TENEUR EN SACCHAROSE

La quantité de saccharose présent dans les massifs a été mesurée selon la technique du dosage enzymatique (cf. Méthodes p. 45). Chaque valeur indiquée dans la Figure 22 représente la moyenne de 3 mesures correspondant au dosage du saccharose dans 3 échantillons différents.

Au cours du prétraitement, la teneur en saccharose des massifs augmente rapidement pendant le premier jour, passant de 75 à près de 200 mg par gramme de matière fraîche puis plus lentement ensuite, atteignant 234 mg. g⁻¹ en fin de prétraitement.

Pendant le post-traitement, la teneur en saccharose des massifs témoins et des massifs congelés diminue rapidement et de manière similaire, jusqu'à 100 mg. g⁻¹ pendant les premières 24 heures. Après 3 semaines de post-traitement, la teneur en saccharose, identique chez les massifs témoins et congelés, est de 25 mg. g⁻¹, valeur qui correspond à la quantité de saccharose présent dans les massifs d'embryoïdes prélevés sur le milieu standard de multiplication.

3.3. EVOLUTION PONDÉRALE

L'évolution pondérale des massifs d'embryoïdes pendant le pré et le post-traitement est exprimée en pourcentage moyen d'augmentation du poids de matière fraîche des massifs par rapport à leur PMF au moment de leur dissection (Figure 23). Seuls les massifs témoins et congelés considérés comme vivants à la fin du post-traitement ont été pris en compte dans les calculs.

.../...

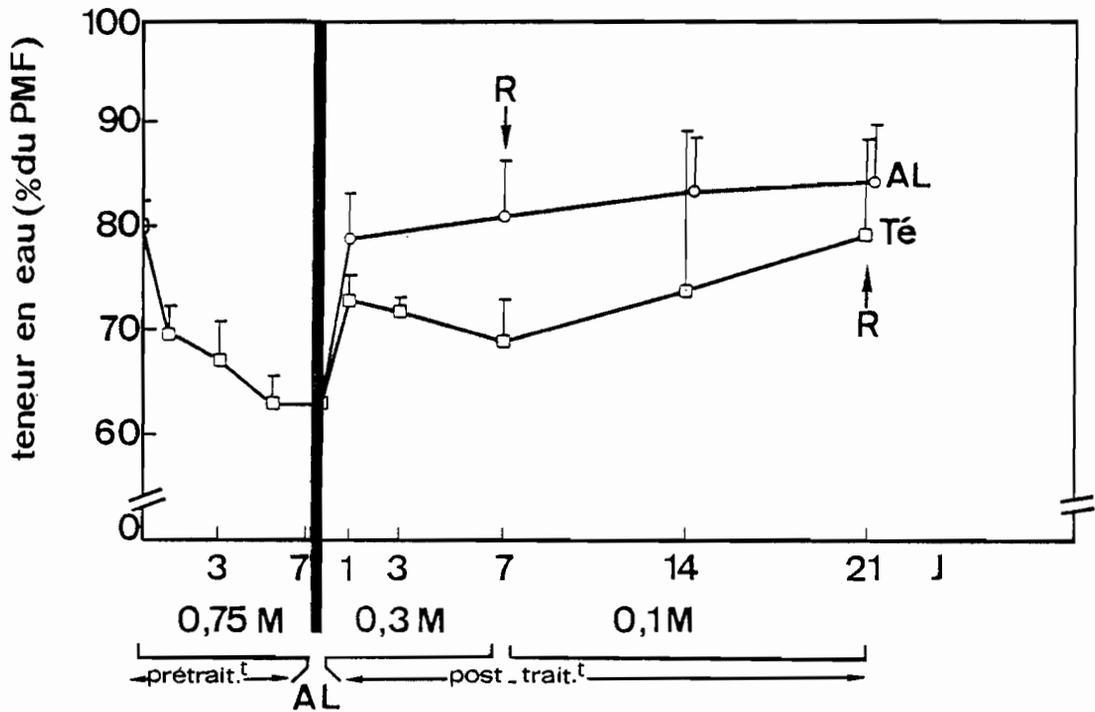


Fig. 21 : Evolution de la teneur en eau de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 pendant le prétraitement et le post-traitement (massifs témoins □ ; massifs congelés dans l'azote liquide ○). La teneur en eau des massifs est exprimée par rapport à leur poids de matière fraîche. Les traits verticaux représentent les écarts-types.

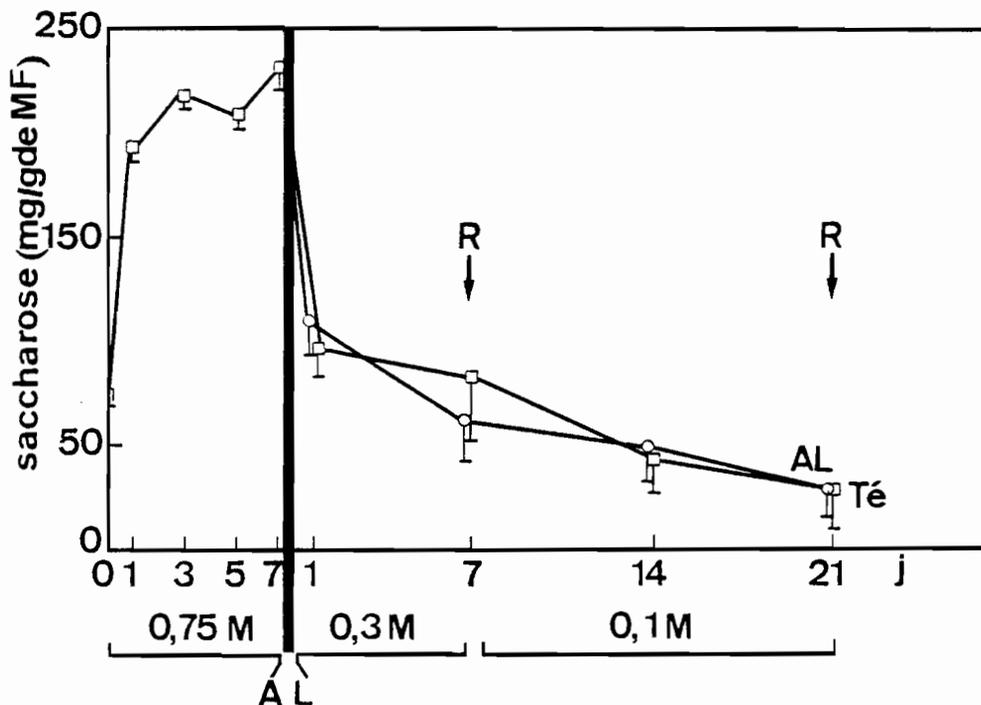


Fig. 22 : Evolution de la quantité de saccharose, exprimée en mg par g de matière fraîche, de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 pendant le prétraitement et le post-traitement (massifs témoins □ ; massifs congelés dans l'azote liquide ○). Les traits verticaux représentent les écarts-types.

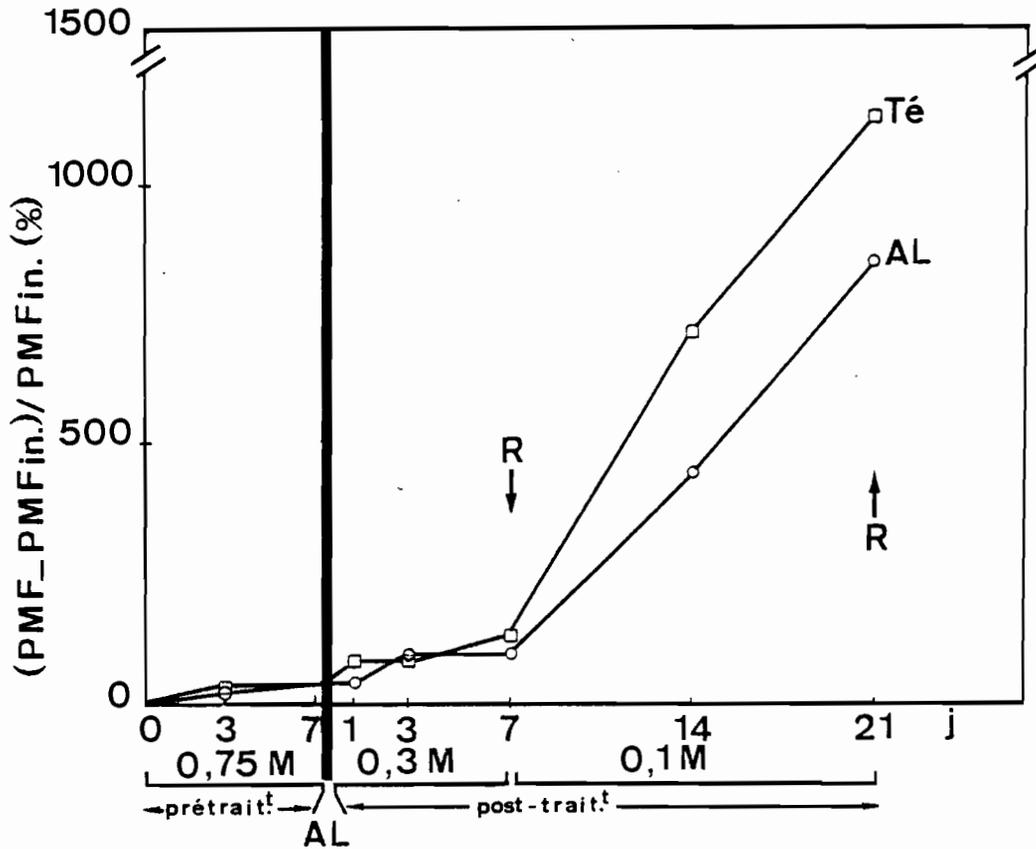


Fig. 23 : Evolution du poids de matière fraîche moyen de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 pendant le prétraitement et le post-traitement (massifs témoins □ ; massifs congelés dans l'azote liquide ○). L'évolution du PMF des massifs est exprimée en pourcentage du PMF moyen des massifs mesuré au début du prétraitement.

Pendant le prétraitement sur 0,75M de saccharose, l'augmentation du PMF est peu importante (30 %). Au cours de la première semaine du post-traitement, c'est-à-dire sur un milieu contenant 0,3M de saccharose, l'augmentation du PMF des massifs témoins et congelés est sensiblement la même (100 % environ). La croissance des massifs est considérablement accrue après leur repiquage sur un milieu contenant 0,1M de saccharose, l'augmentation du PMF des massifs témoins étant plus importante que celle des massifs ayant été congelés. L'augmentation du PMF observée dans le cas des massifs congelés pourrait être due à une simple auxèse, puisque ces massifs se nécrosent rapidement après leur repiquage en conditions standard à la fin du post-traitement. En fait (Figure 24), des mitoses ont été décelées dans des massifs 1 jour après leur réchauffement. L'absence de reprise de l'embryogenèse adventive ne serait donc pas liée à l'impossibilité des cellules à entrer en division après le réchauffement des massifs. D'autres raisons peuvent être avancées : le nombre de cellules vivantes dans les massifs congelés pourrait être insuffisant pour permettre une reprise durable de la croissance après leur décongélation.

3.4. ETUDE HISTOLOGIQUE DES EMBRYOÏDES

Les coupes effectuées dans les massifs d'embryoïdes ont été colorées à l'hématoxyline ferrique. Les structures témoins utilisées pour la congélation (Figure 25 A et B) comportent des zones méristématiques très intensément colorées qui sont parfois différenciées en méristèmes caulinaires ou racinaires, des faisceaux vasculaires et des tissus parenchymateux, moins fortement colorés, dont certains correspondent à l'haustorium (cotylédon) des embryons zygotiques. La Figure 25 C représente une coupe effectuée dans un massif, 3 jours après la décongélation. Les régions méristématiques et les faisceaux vasculaires restent très colorés, alors que l'on observe dans la partie

.../...

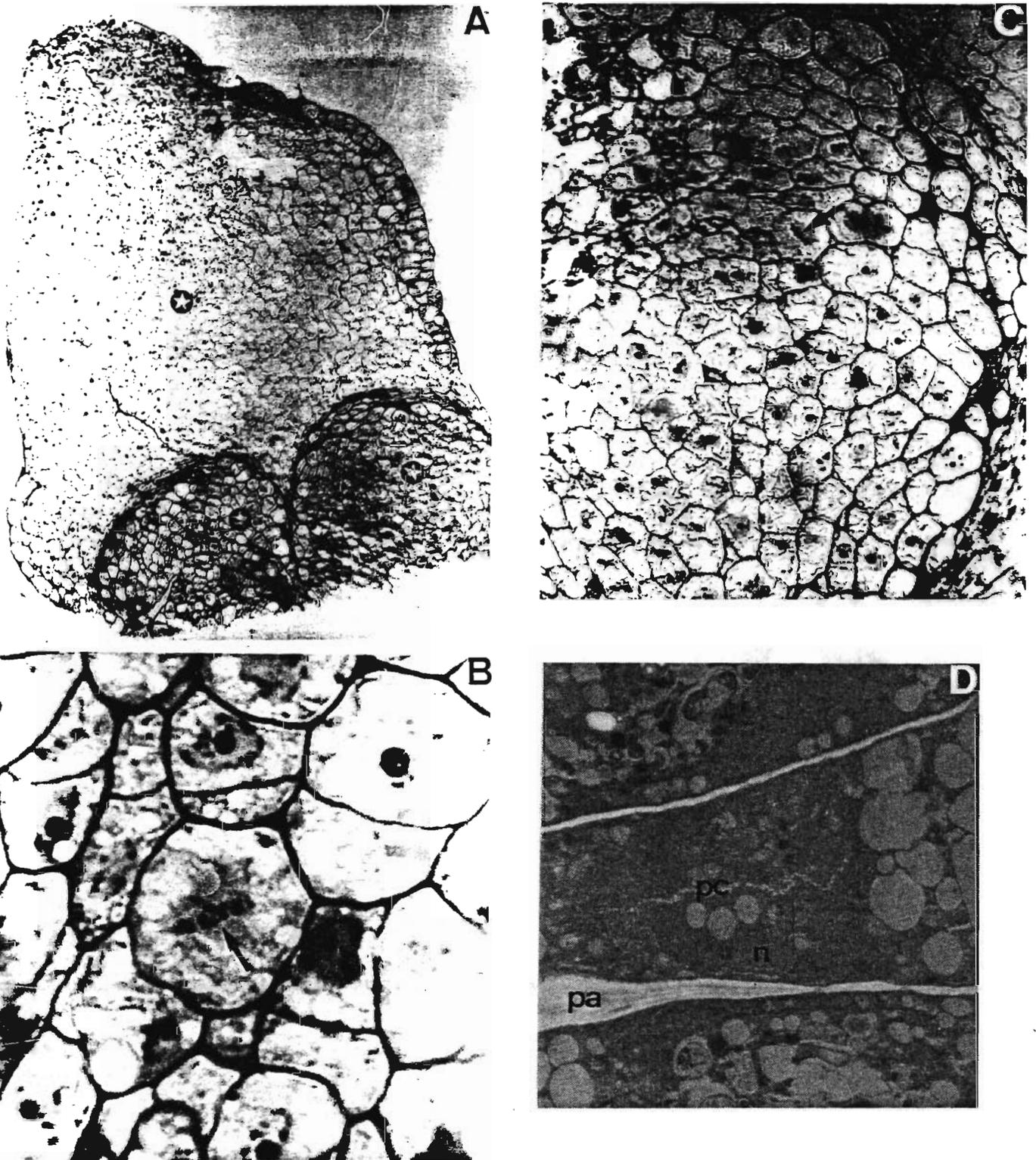


Fig.24 : Coupes semi-fines (A,B,C) et ultra-fine (D) d'embryons somatiques de palmier à huile après congélation dans l'azote liquide. A, vue générale (G x 40) montrant plusieurs embryoïdes (★) à différents stades de développement. B et C, vues partielles montrant des mitoses (flèches). B (G x 400), C (G x 130). D, télophase avec plaque cellulaire (pc), noyau (n) et paroi (pa). (G x 5700). Double fixation glutaraldéhyde et tétroxyde d'osmium; inclusion araldite - épon; coloration bleu de toluidine (A B C); contraste acétate d'uranyle et citrate de plomb (D) (clichés C. GAZEAU).

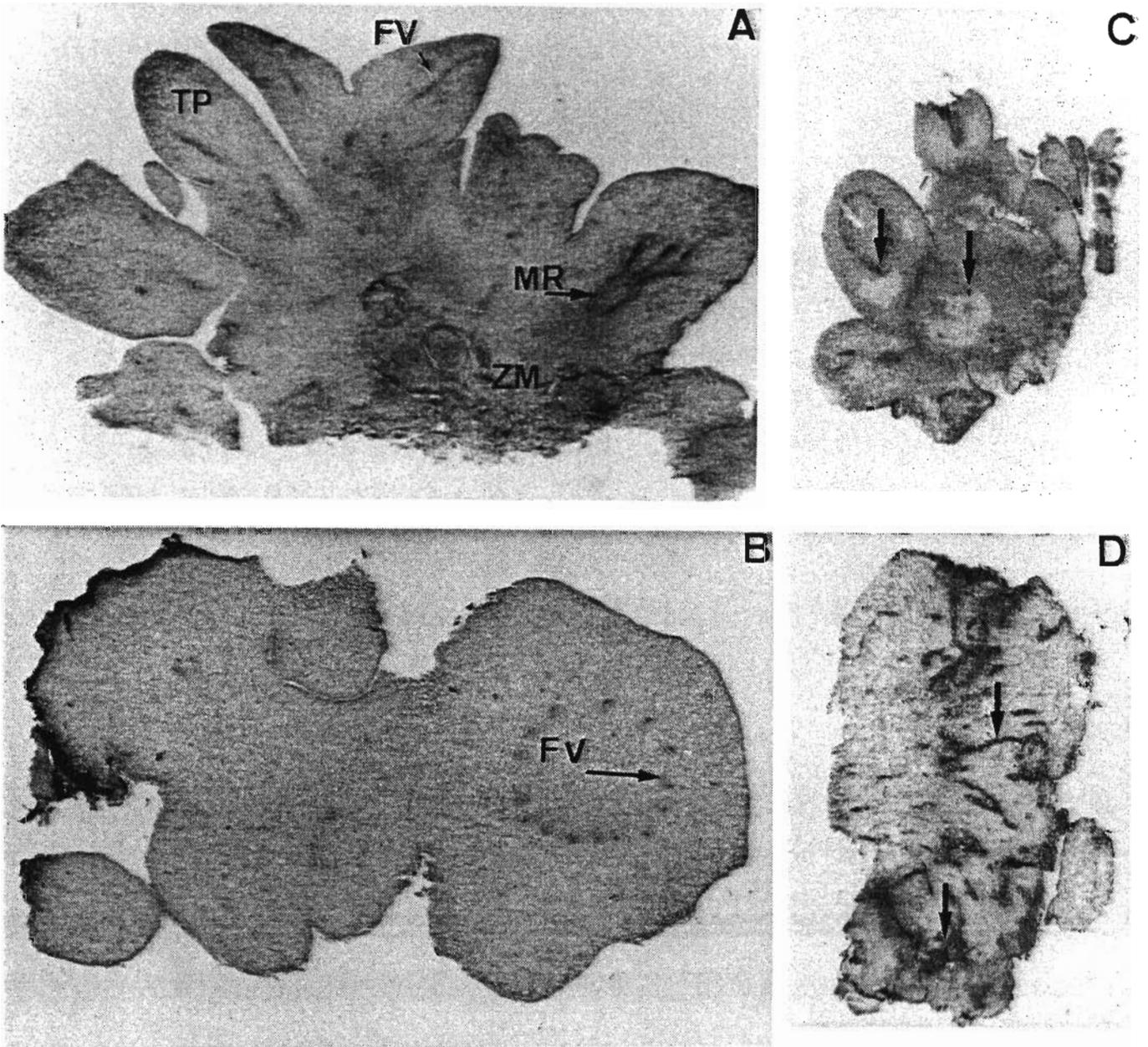


Fig. 25 : (A et B), coupes réalisées dans des massifs d'embryoïdes témoins. On distingue des zones méristématiques (ZM) qui peuvent être différenciées en méristème racinaire (MR), des faisceaux vasculaires (FV) et des tissus parenchymateux (TP). (G x 45).

(C), coupe réalisée dans un massif 3 jours après sa décongélation. Des zones de nécrose (flèches) apparaissent dans les tissus parenchymateux internes.

(D), coupe réalisée dans un massif 1 semaine après sa décongélation. Seuls les tissus méristématiques et vasculaires (flèches) sont encore vivants.

interne des zones parenchymateuses une perte de coloration due à l'éclatement des cellules. Une semaine après la décongélation (Figure 25 D), la structure histologique des massifs est profondément bouleversée. Seuls les tissus méristématiques, qui restent fortement colorés, sont constitués de cellules vivantes. Les zones parenchymateuses ne comprennent que des cellules mortes dont les parois sont désorganisées et quelques faisceaux cribro-vasculaires. Cette étude confirmerait l'hypothèse qu'une masse de cellules vivantes suffisante assurant une concentration en régulateurs de croissance endogènes assez élevée est nécessaire pour permettre la reprise de l'embryogenèse adventive.

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au cours de ces différents essais, trois substances cryoprotectrices ont été utilisées, séparément ou en mélange : le saccharose, le sorbitol et le DMSO. Ces trois composés sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés cryoprotectrices. SAKAI et YOSHIDA (1968) les classent dans la catégorie des substances assurant une haute protection contre les effets de la congélation : utilisées en solution aqueuse (0,5M), elles permettent la survie de suspensions cellulaires de chou jusqu'à -20°C. De plus, deux de ces substances, le saccharose et le sorbitol, sont impliquées dans les mécanismes de résistance au froid de certains végétaux en conditions naturelles; leur concentration augmente dans les tissus lors d'un abaissement de la température (SAKAI et YOSHIDA, 1968).

Le saccharose, employé depuis longtemps (LUYET et HODAPP, 1938) pour la congélation de microorganismes et de spermatozoïdes, a rarement été utilisé seul comme substance cryoprotectrice avec des matériels végétaux. On peut néanmoins citer

son emploi pour la congélation de suspensions cellulaires de Dioscorea deltoïdea, de Panax ginseng (BUTENKO et al., 1984), de méristèmes d'oeillet (GALERNE, 1985 ; FABRE, 1986). Le saccharose a également été utilisé par MONNIER et LEDDET (1980) pour la congélation d'embryons zygotiques de Capsella bursa-pastoris.

L'emploi de sorbitol seul est mentionné par DEREUDDRE et KARTHA (1984) pour la congélation de suspensions cellulaires de pommier, par PRITCHARD et al. (1986 a, b et c) dans le cas de cultures cellulaires d'érable et de soja, et par REUFF et REINHARD (1986) pour celles du Coleus blumei. Il a également été utilisé par FABRE (1986) lors de la congélation de méristèmes d'oeillet. L'efficacité du sorbitol n'a jamais été testée, à notre connaissance, pour assurer la cryoprotection d'embryons somatiques ou zygotiques.

Le DMSO, dont l'effet cryoprotecteur a été mis en évidence par LOVELOCK et BISHOP en 1959, est la substance la plus couramment employée pour la cryoconservation des cellules, tissus et organes végétaux (FINKLE et al. , 1985 a).

Enfin, ces trois substances ont souvent été employées en mélanges binaires ou ternaires, pour la congélation de suspensions cellulaires (LATTA, 1971 ; CHEN et al. , 1984 a et b, 1985), de méristèmes (UEMURA et SAKAI, 1980 ; KARTHA et al. , 1980, 1982 ; GALERNE, 1985 ; FABRE, 1986) , d'embryons (BAJAJ, 1980 a, 1984 et 1985 b). L'emploi de mélanges de cryoprotectants a été généralement adopté empiriquement, sans explications pour justifier la nature et la concentration des substances utilisées. Les cryoprotecteurs présents dans le mélange pourraient avoir un effet synergique; leurs actions cryoprotectrices respectives pourraient s'ajouter sans qu'il y ait addition de leur toxicité (FINKLE et al. , 1985 a).

.../...

Les mécanismes d'action cryoprotectrice de ces trois substances, saccharose, sorbitol, DMSO, sont plus ou moins bien connus. Ainsi, suivant les auteurs, le saccharose aurait un rôle purement osmotique (SAKAI et YOSHIDA, 1968 ; KRULL et LEVITT, 1972) ; il agirait seulement en provoquant une sortie d'eau des cellules avant leur congélation et resterait donc extra-cellulaire. Pour d'autres auteurs, au contraire, le saccharose pénétrerait dans les cellules au cours du prétraitement (LATTA, 1971 ; BUTENKO et al. , 1984), augmentant ainsi la pression osmotique intracellulaire. Des mécanismes de transport actif du saccharose ont également été mis en évidence chez différentes espèces comme la betterave (TURKINA et SOKOLOVA, 1972 ; BARBIER et al. , 1982 ; BRISKIN et al. , 1985) ou le Commelina benghalensis (VAN BEL et al. , 1986). Pour MONNIER et LEDDET (1980), le saccharose a plus qu'un rôle osmotique. En effet, la teneur en eau d'embryons zygotiques de capselle placés sur un milieu fortement concentré en saccharose diminue rapidement sans que cette déshydratation permette la survie des embryons à l'azote liquide. Un traitement de plusieurs jours est nécessaire pour obtenir une reprise de la croissance des embryons. Une simple plasmolyse des cellules ne peut donc expliquer ce résultat ; pour MONNIER et LEDDET (1980), une transformation profonde au niveau cellulaire survient pendant le prétraitement, qui permet la survie des embryons. Dans le cas du palmier à huile, le saccharose assure à la fois la nutrition et la cryoprotection des embryons somatiques; le saccharose pénètre donc dans les cellules où il est métabolisé. Toutefois, on ne connaît ni sa vitesse de pénétration, ni la rapidité de son utilisation par les cellules. Seule la technique du cryodécapage pourrait nous renseigner sur l'état de plasmolyse des cellules, l'observation de coupes réalisées sur du matériel en cours de traitement s'étant révélée difficile à interpréter.

.../...

La fixation nécessite en effet l'emploi de solutions dont l'osmolarité est voisine de celle des cellules pour permettre l'obtention d'une image la plus fidèle possible de leur structure, en particulier lorsqu'elles sont susceptibles d'être plasmolysées. Cette étude pourrait être complétée par l'emploi d'éléments radioactifs et l'utilisation de suspensions cellulaires.

Les propriétés du DMSO ont été très étudiées (JACOB et HERSCHLER, 1986). Il peut traverser les membranes des cellules animales et humaines (KOLB et al., 1967 ; DENKO et al., 1967) . RAMMLER et ZAFFARONI, 1967) et végétales (MYERS et STEPONKUS, 1986) de façon très rapide. D'autre part, le DMSO facilite le transport transmembranaire d'autres substances de faible poids moléculaire (KEIL, 1967 ; LEONARD, 1967). Selon KARTHA et al. (1979,1980) le DMSO, lorsqu'il est appliqué au cours du traitement cryoprotecteur, donc en milieu liquide, juste avant la congélation, aurait essentiellement un effet osmotique. Par contre, lorsqu'il est utilisé lors de la préculture, c'est-à-dire pendant 24 à 48 heures, le DMSO agirait à la fois comme agent osmotique et comme agent cryoprotecteur, sa pénétration ayant été facilitée par l'augmentation de la durée du traitement. Des durées de préculture trop longues (MANZHULIN et al., 1984) peuvent d'autre part avoir un effet défavorable sur la croissance ultérieure du matériel.

Le sorbitol est considéré, sauf exception dans le cas de certaines Rosacées (COFFIN et al., 1976 ; PUA et CHONG, 1984), comme non métabolisable. De plus, il pénètre difficilement dans les cellules. Son action cryoprotectrice serait donc de type uniquement osmotique (WEBER et al., 1983).

Ces informations sur le mode d'action des substances cryoprotectrices utilisées permettent de formuler des hypothèses différentes pour expliquer les résultats obtenus précédemment, selon que l'on considère que les cryoprotecteurs pénètrent ou ne pénètrent pas dans les cellules des embryoides de palmier à huile.

Les conditions permettant d'obtenir une survie avec les embryoïdes de palmier à huile sont très différentes de celles mises au point pour la cryoconservation de cals de palmier-dattier (TISSERAT et al. , 1981 ; ULRICH et al. , 1982 ; FINKLE et al. , 1982). Ces auteurs utilisent en effet un milieu cryoprotecteur liquide contenant un mélange de polyéthylène-glycol, de glucose et de DMSO, qui est appliqué uniquement lors du traitement cryoprotecteur, soit pendant une durée courte, environ une heure, juste avant la congélation. L'application de cette technique au palmier à huile n'a pas été envisagée en raison des résultats déjà obtenus avec le saccharose seul et de la nature différente des matériels biologiques utilisés, cals et embryons somatiques.

Pour les embryoïdes congelés, une survie importante a été observée après un prétraitement de 7 jours, soit sur 0,3M de saccharose ou de sorbitol additionnés de 5 % de DMSO, soit sur 0,75M des mêmes composés sans DMSO. Si l'on considère uniquement le rôle osmotique des cryoprotecteurs on peut penser que l'augmentation de la pression osmotique du milieu de prétraitement due aux cryoprotecteurs induite dans le premier cas par les 0,3M de saccharose et les 5 % de DMSO (0,64M), provoque une déshydratation des tissus suffisante pour assurer leur survie. Dans le second cas, lorsque 0,75M de saccharose ou de sorbitol sont déjà présents dans le milieu, l'addition de 0,64M de DMSO pourrait entraîner une déshydratation trop importante des massifs qui expliquerait les mauvais résultats observés dans ces conditions

Si l'on tient compte des effets du DMSO sur la perméabilité membranaire, on peut également formuler l'hypothèse que l'addition de DMSO provoque une pénétration accrue de saccharose ou de sorbitol dans les cellules qui pourrait se révéler toxique pour les embryoïdes.

Chez le palmier à huile, l'effet toxique des substances cryoprotectrices utilisées se manifeste essentiellement lors

de la reprise de l'embryogenèse adventive des embryoïdes, c'est-à-dire plusieurs semaines après le retour aux conditions standard de culture, ce qui indiquerait une pénétration intracellulaire des cryoprotecteurs. D'autre part, le saccharose qui pénètre dans les embryons semble rester, au moins en partie, extra-cellulaire. La teneur en saccharose dans les massifs d'embryoïdes après leur repiquage sur le milieu de post-traitement diminue en effet très rapidement pendant le premier jour, aussi bien dans le cas des massifs congelés que dans celui des massifs témoins. Cette diminution de la teneur des massifs en saccharose s'accompagne de leur réhydratation, qui pourrait correspondre à une déplasmolyse partielle des cellules.

On peut donc considérer que les substances cryoprotectrices utilisées dans le cas du prétraitement des embryons somatiques de palmier à huile ont à la fois une action osmotique, vraisemblablement par plasmolyse des cellules et une action cryoprotectrice non colligative, après leur pénétration intracellulaire.

L'étude histologique a permis de montrer que les zones de nécrose apparaissent d'abord dans les tissus parenchymateux internes. Seuls les tissus méristématiques et les faisceaux procambiaux, dont les cellules ont un cytoplasme dense, peu vacuolisé, demeurent encore vivants une semaine après la décongélation. L'importance des zones tissulaires détruites permet d'expliquer l'absence de reprise de la prolifération.

En conclusion, si une survie importante est obtenue après une préculture de 7 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose, d'autres conditions expérimentales permettent d'atteindre des taux de survie élevés, après une congélation et un réchauffement rapides. Ces autres conditions pourraient être utilisées avec certains clones, dans l'éventualité où le prétraitement défini précédemment donnerait de mauvais résultats.

../...

Toutefois, aucune reprise de l'embryogenèse adventive n'a été obtenue au cours des expériences décrites dans ce chapitre. Pour obtenir une reprise de la prolifération, nous avons donc choisi de modifier les autres étapes du protocole expérimental, c'est-à-dire le post-traitement et la vitesse de refroidissement, en conservant le prétraitement défini au départ, soit 7 jours de préculture sur un milieu contenant 0,75M de saccharose.

CHAPITRE IV

EFFETS DU POST-TRAITEMENT SUR LA REPRISE DE PROLIFÉRATION

DES MASSIFS D'EMBRYOÏDES APRÈS CONSERVATION DANS L'AZOTE LIQUIDE

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de reprise de la prolifération des embryoïdes ayant été congelés dans l'azote liquide : nombre de cellules survivantes insuffisant, déséquilibre hormonal ou altérations fonctionnelles des cellules (changement de perméabilité). Les modifications apportées aux milieux de préculture n'ont pas permis de trouver une réponse à ce problème. Il a donc été envisagé de modifier les conditions de post-traitement en soumettant transitoirement les massifs à l'action d'une hormone de synthèse, le 2,4-D , connu pour stimuler la multiplication cellulaire et comme facteur d'induction de l'embryogenèse somatique. Cette modification du protocole expérimental a été apportée en tenant compte des conditions dans lesquelles la reprise de la prolifération a été obtenue à partir de structures embryogènes prélevées directement sur cals primaires, c'est-à-dire des premières structures organisées apparaissant dans le procédé de multiplication in vitro du palmier à huile. L'effet de ce traitement par le 2,4-D sur le comportement ultérieur des embryoïdes sera étudié en comparant l'évolution de leur poids de matière fraîche pendant les trois semaines du post-traitement et les 8 semaines de culture suivantes. Cette étude sera menée en tenant compte de la durée du prétraitement des massifs. L'effet d'un stockage prolongé dans l'azote liquide sur la reprise de la prolifération des embryoïdes sera également étudié.

1. OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES SUR LES STRUCTURES EMBRYOGÈNES

Afin de réduire les risques de conserver un matériel dont la conformité pourrait avoir été altérée du fait de la durée de sa culture en conditions artificielles, une expérimentation a été réalisée avec des structures embryogènes prélevées sur calcs. Ces structures apparaissent généralement quelques mois après la mise en culture des explants primaires, à la différence des embryoides employés jusqu'à présent qui proviennent de cultures entretenues depuis plusieurs années. A cet effet, des calcs du clone LMC 079-3, présentant de nombreuses structures embryogènes ont été employés. Les échantillons destinés à la congélation, qui sont de couleur blanc brillant ou bien encore translucides (Figure 26) ont été prélevés sur les calcs. Le protocole expérimental utilisé comporte un prétraitement de 7 jours, une congélation et un réchauffement rapides, puis un post-traitement de 3 semaines. La concentration en sucre dans les milieux de pré et de post-traitement est la même que dans les expériences précédentes, soit 0,75M pour le prétraitement et 0,3 puis 0,1M pour le post-traitement.

Trois milieux de culture ont été utilisés, qui diffèrent par la nature du sucre employé, saccharose ou glucose, et la présence éventuelle de 2,4-D pendant le pré et le post-traitement :

- . Le milieu A, milieu embryogène qui contient du glucose et du 2,4-D.
- . Le milieu B, milieu intermédiaire contenant du glucose mais pas de 2,4-D.
- . Le milieu C, milieu standard de multiplication des embryoides qui comporte du saccharose mais pas de 2,4-D.

../...

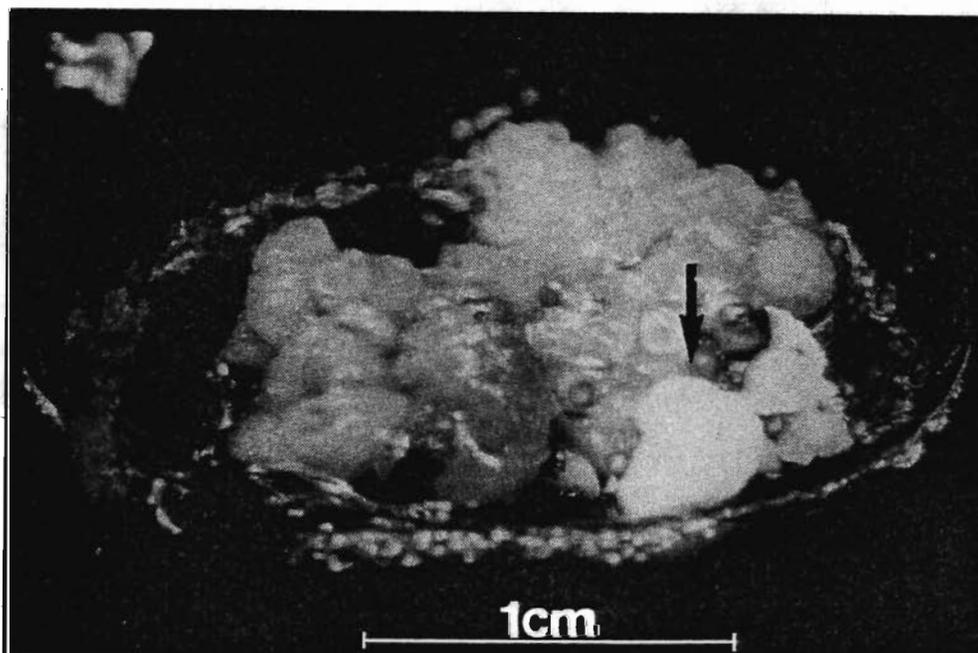


Fig. 26 : Structures embryogènes (flèche) apparues sur un cal primaire cultivé sur milieu embryogène (cliché C. PANNETIER).

Les résultats concernant la survie et la reprise des structures embryogènes congelées et témoins sont présentés dans le Tableau 10. Les témoins ont subi le prétraitement et le post-traitement mais pas la congélation.

Les taux de survie des structures embryogènes témoins sont importants, de 55,6 % (milieu C) à 96,1 % (milieu B). Ils sont comparables à ceux obtenus avec des embryoïdes prélevés sur des cultures en prolifération. Les taux de survie des structures embryogènes après congélation dans l'azote liquide sont beaucoup moins élevés puisqu'ils varient de 13 % (milieu C) à 38,5 % (milieu A). Cependant, à la différence des expériences précédentes réalisées avec des embryoïdes, une reprise de la croissance est observée dans tous les cas, que les structures aient été congelées ou non. Le type de réponse varie en fonction du milieu utilisé. Ainsi, les structures embryogènes cultivées sur milieu A (glucose + 2,4-D) ne donnent que des calcs. L'apparition de massifs d'embryoïdes en prolifération n'est observée que sur les milieux B et C qui ne contiennent pas de 2,4-D.

Le pourcentage de reprise des structures embryogènes témoins augmente ou reste stable par rapport au pourcentage de survie. Dans le cas des structures embryogènes congelées, les pourcentages de reprise sont beaucoup plus faibles et dépendent de la nature du substrat carboné : la reprise est de 20,8 % avec le milieu B (glucose), contre 4,3 % seulement avec le milieu C (saccharose). Ce résultat est certainement dû au fait qu'un stress supplémentaire, provoqué par le remplacement du glucose par le saccharose pour les structures embryogènes cultivées sur milieu C vient s'ajouter au stress dû à la congélation.

Les structures embryogènes utilisées dans ces expériences ont été prélevées sur des calcs qui sont cultivés sur le milieu A, milieu inducteur de l'embryogenèse. Ce milieu contient,

.../...

	Milieu A		Milieu B		Milieu C	
	Té	Al	Té	Al	Té	Al
Nombre de massifs traités	28	26	26	24	18	23
Survie (%)	75	38,5	96,1	25	55,6	13
Reprise (%)	78,6	34,6	96,1	20,8	83,3	4,3
Nature de la régénération	CAL	CAL	embryoïdes	embryoïdes	embryoïdes	embryoïdes

Tabl. 10 : Effets des milieux utilisés (A,B,C) pendant les pré et post-traitement sur la survie et la reprise de structures embryogènes du clone LMC 079-3 , congelées (Al) ou non congelées (Té). Les taux de survie et de reprise, exprimés en pourcentage du nombre de structures traitées, sont déterminés 3 et 11 semaines après le réchauffement. Milieu A : glucose + 2,4-D . Milieu B : glucose, sans 2,4-D . Milieu C : saccharose, sans 2,4-D . La nature de la régénération (cal ou embryoïdes) est indiquée à la dernière ligne du tableau.

contrairement au milieu standard, une hormone de croissance exogène, le 2,4-D. L'obtention d'une reprise de la prolifération à partir de matériel congelé est certainement liée à la présence de 2,4-D dans le milieu de culture des cals : les structures embryogènes doivent contenir une quantité suffisante de 2,4-D pour induire une embryogenèse adventive à partir des tissus qui ont résisté à la congélation.

Les embryoïdes en prolifération utilisés dans les premières expériences de congélation décrites dans le chapitre précédent sont cultivés sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance; ils sont donc capables de synthétiser suffisamment d'hormones endogènes pour assurer leur multiplication et leur développement. La congélation de ces massifs provoque la destruction rapide de nombreuses cellules (cf. Figure 25 p. 98). Il est donc probable que la quantité de tissus encore vivants après la décongélation n'est plus suffisante pour maintenir dans un massif d'embryoïdes une teneur en régulateur (s) de croissance endogène (s) assez élevée pour induire la reprise de l'embryogenèse adventive. Les structures embryogènes, au contraire, contiendraient assez de 2,4-D pour permettre la reprise de la prolifération même après congélation, lorsqu'elles sont transférées sur un milieu sans hormone de croissance.

Ces résultats nous ont amenés à étudier dans quelles conditions l'utilisation de 2,4-D pourrait permettre la reprise de l'embryogenèse chez les massifs d'embryoïdes issus de cultures en prolifération après leur décongélation.

../...

2. CONDITIONS D'UTILISATION DU 2,4-D

2.1. CHOIX D'UNE CONCENTRATION ET D'UNE DURÉE D'APPLICATION

Les premiers essais d'utilisation du 2,4-D ont été réalisés sur le clone BC 068. Des doses importantes de 2,4-D (1, 5 et 5.10^{-5} M) ont été appliquées aux massifs d'embryoïdes pendant 3 semaines après la décongélation, c'est-à-dire pendant toute la durée du post-traitement. Ceci a conduit chez certains massifs à la formation de cals qui, après une période de croissance de 3 à 4 mois, ont produit des embryons somatiques. Ces embryons somatiques, une fois repiqués sur le milieu standard ont donné des cultures d'embryoïdes en prolifération. Les concentrations en 2,4-D employées ont permis une reprise de la prolifération, après un retour transitoire à un stade cal. De nouveaux essais ont donc été réalisés afin de déterminer une concentration et une durée d'utilisation du 2,4-D permettant une reprise directe de l'embryogenèse adventive sans passage du matériel par un stade indifférencié. A cet effet, des massifs des deux clones, BC 068 (Tableau 11) et BC 156 (Tableau 12) ont été repiqués, après leur décongélation, pour des durées de 1 à 3 semaines, sur des milieux contenant 0 à 10^{-5} M de 2,4-D.

Les résultats présentés dans les deux tableaux montrent qu'une survie importante peut être obtenue, que le milieu de post-traitement contienne ou non du 2,4-D. Les résultats obtenus paraissent indépendants de la durée d'application de cette auxine. La reprise de l'embryogenèse adventive après congélation peut être obtenue avec des concentrations et des durées d'application de 2,4-D très différentes. Aucune condition optimale n'a pu être dégagée. Ainsi, dans le cas du clone BC 068, une reprise est observée après une semaine de culture en présence de 5.10^{-7} M de 2,4-D ou après 3 semaines de culture

.../...

	2,4 - D (M)															
	0 5 10 ⁻⁷			10 ⁻⁶			2,5 10 ⁻⁶			5 10 ⁻⁶			10 ⁻⁵			
Durée d'application du 2,4-D (semaines)																
Nombre de massifs congelés	30	9	10	9	9	10	10	9	10	11	5	6	6	5	5	6
Nombre de massifs vivants (AL + 3 semaines)	10	4	5	6	4	3	6	1	3	2	3	1	2	1	3	0
Nbre de massifs pré- sentsant une reprise de la prolifération (AL + 11 semaines)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Tabl. 12 : Nombre de massifs d'embryoïdes du clone BC 156 présentant une survie et une reprise de la prolifération après congélation dans l'azote liquide en fonction de la teneur en 2,4-D des milieux de post-traitement (0 à 10⁻⁵M) et de la durée de son utilisation (1, 2 ou 3 semaines). La survie et la reprise sont estimées respectivement 3 et 11 semaines après le réchauffement.

avec 5.10^{-6} M d'auxine. Des résultats analogues sont obtenus avec le clone BC 156, qui paraît cependant beaucoup plus sensible à la congélation que le clone BC 068. En effet, toutes conditions confondues, 3 massifs du clone BC 156 sur 120 ont proliféré contre 9 sur 138 pour le clone BC 068. L'expérimentation réalisée n'ayant pas permis de définir des concentrations et des durées d'application de 2,4-D susceptibles de donner un taux de reprise maximum, une condition a été choisie (10^{-6} M pendant 3 semaines) qui permet d'assurer la reprise de la prolifération des deux clones avec une concentration minimale de 2,4-D.

Afin de confirmer ce choix et de permettre d'observer les effets du 2,4-D sur les massifs témoins et congelés, une nouvelle expérience, portant sur des effectifs plus importants, a été réalisée avec le clone BC 156. Le 2,4-D a été utilisé pendant toute la durée du post-traitement (3 semaines) à différentes concentrations. Les résultats concernant les taux de survie et de reprise des embryoides congelés et témoins sont présentés dans les Tableaux 13 et 14.

Avec le clone BC 156, les taux de survie des massifs congelés (Tableau 13) restent faibles, inférieurs à 10 % pour des conditions extrêmes d'utilisation, soit lorsque les milieux de post-traitement ne contiennent pas de 2,4-D, soit au contraire lorsqu'ils en contiennent une concentration élevée (10^{-5} M). Les taux de survie les plus importants, de 16 à 30 %, sont obtenus avec des concentrations intermédiaires ($2,5.10^{-7}$ à 5.10^{-6} M). La reprise de la prolifération des embryoides après congélation n'est obtenue qu'en présence d'une quantité de 2,4-D supérieure ou égale à 10^{-6} M, concentration pour laquelle la meilleure reprise, 13,3 % est d'ailleurs obtenue, ce qui confirme les résultats précédents (cf. Tableau 12). Des teneurs en 2,4-D plus élevées diminuent le taux de reprise. A la concentration de 10^{-5} M, cette substance semble avoir un effet toxique à la fois sur le taux de survie (10 %) et le taux de reprise (3,3 %) des massifs d'embryoïdes.

	2,4 - D (M)						
	0	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}
Nombre de massifs congelés	30	31	30	30	34	32	30
Survie (%)	6,7	25,8	20	30	20,6	15,6	10
Reprise (%)	0	0	0	13,3	5,9	6,1	3,3

Tabl. 13 : Pourcentages de survie et de reprise de la prolifération de massifs d'embryoïdes du clone BC 156 cultivés pendant 3 semaines sur des milieux contenant différentes concentrations de 2,4-D (0 à 10^{-5} M) après leur congélation dans l'azote liquide. La survie et la reprise sont mesurées respectivement 3 et 11 semaines après le réchauffement.

	2,4 - D (M)						
	0	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}
Nombre de massifs traités	20	20	20	20	20	20	20
Survie (%)	75	100	85	80	80	70	85
Reprise (%)	70	80	80	75	60	60	65

Tabl. 14 : Pourcentages de survie et de reprise de la prolifération de massifs d'embryoïdes témoins du clone BC 156 cultivés pendant 3 semaines sur des milieux contenant différentes concentrations de 2,4-D (0 à 10^{-5} M). La survie et la reprise sont mesurées respectivement 3 et 11 semaines après le réchauffement.

Pour les embryoïdes témoins, au contraire (Tableau 14), les taux de survie et de reprise sont beaucoup plus importants : 70 à 100 % pour la survie, 60 à 80 % pour la reprise. De plus la teneur du milieu en 2,4-D n'influe ni sur le taux de survie, ni sur le taux de reprise des embryoïdes, puisque les valeurs obtenues avec ou sans 2,4-D sont similaires.

Des observations complémentaires portant sur le développement de massifs témoins après un post-traitement de 3 semaines en présence des diverses concentrations en 2,4-D employées ont été réalisées sur 10 massifs par condition, 8 semaines après la fin du post-traitement. Les résultats sont présentés dans le Tableau 15. Le nombre de tubes présentant une prolifération normale varie de 5 ($2,5 \cdot 10^{-6}$ et $5 \cdot 10^{-6}$ M de 2,4-D) à 9 ($5 \cdot 10^{-7}$ M de 2,4-D). Le nombre total de pousses feuillées obtenues varie en fonction des conditions. Il diminue avec l'augmentation de la concentration en 2,4-D pendant le post-traitement. Il passe en effet de 17 en l'absence de 2,4-D à 0 avec 10^{-5} M de 2,4-D. De plus un certain nombre de formations anormales peuvent apparaître avec les différentes concentrations en auxine : racine ($5 \cdot 10^{-7}$ et 10^{-6} M), massifs nécrosés ou hypertrophiés ($2,5 \cdot 10^{-6}$ M), pousses feuillées anormales ($2,5$ et $5 \cdot 10^{-6}$ M), cals ($5 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-5} M). La concentration en auxine agit également sur l'évolution du poids de matière fraîche des massifs : un effet inhibiteur du 2,4-D est observé dès la fin du post-traitement (Figure 27) lorsque sa concentration dans le milieu de post-traitement est supérieure ou égale à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M.

Le 2,4-D peut donc altérer le développement des massifs si sa concentration, pendant les 3 semaines du post-traitement, est supérieure ou égale à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M. On peut ainsi observer, lorsque la teneur en auxine augmente, une diminution du nombre de pousses feuillées et de la vitesse de prolifération ainsi que l'apparition de structures anormales et de cals au sein des embryoïdes en prolifération.

.../...

		2,4 D (M)					
		0	$15 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}
Comportement des cultures	Tubes présentant une reprise de la prolifération	7	9	8	5	5	7
	Tubes contenant seulement des pousses feuillées normales	3	1	2		1	
	Racines		1	1			
	Massifs nécrosés				3		
	Tubes présentant un développement anormal et na-						
	ture de l'anomalie observée						
	Pousses feuillées anormales				1	2	
	Massifs hypertrophiés				1	2	
	Cals dans massifs en prolifération						3
	Nombre de pousses feuillées obtenues au total	17	13	10	7	5	0

Tabl. 15 : Effets de la concentration en 2,4-D du milieu de post-traitement sur le développement ultérieur de massifs témoins du clone BC 156. Les observations sont effectuées sur 10 tubes par condition après 8 semaines de culture sur milieu standard sans régulateur de croissance. Les différentes anomalies de développement ainsi que le nombre de tubes dans lesquels elles sont observées sont indiqués.

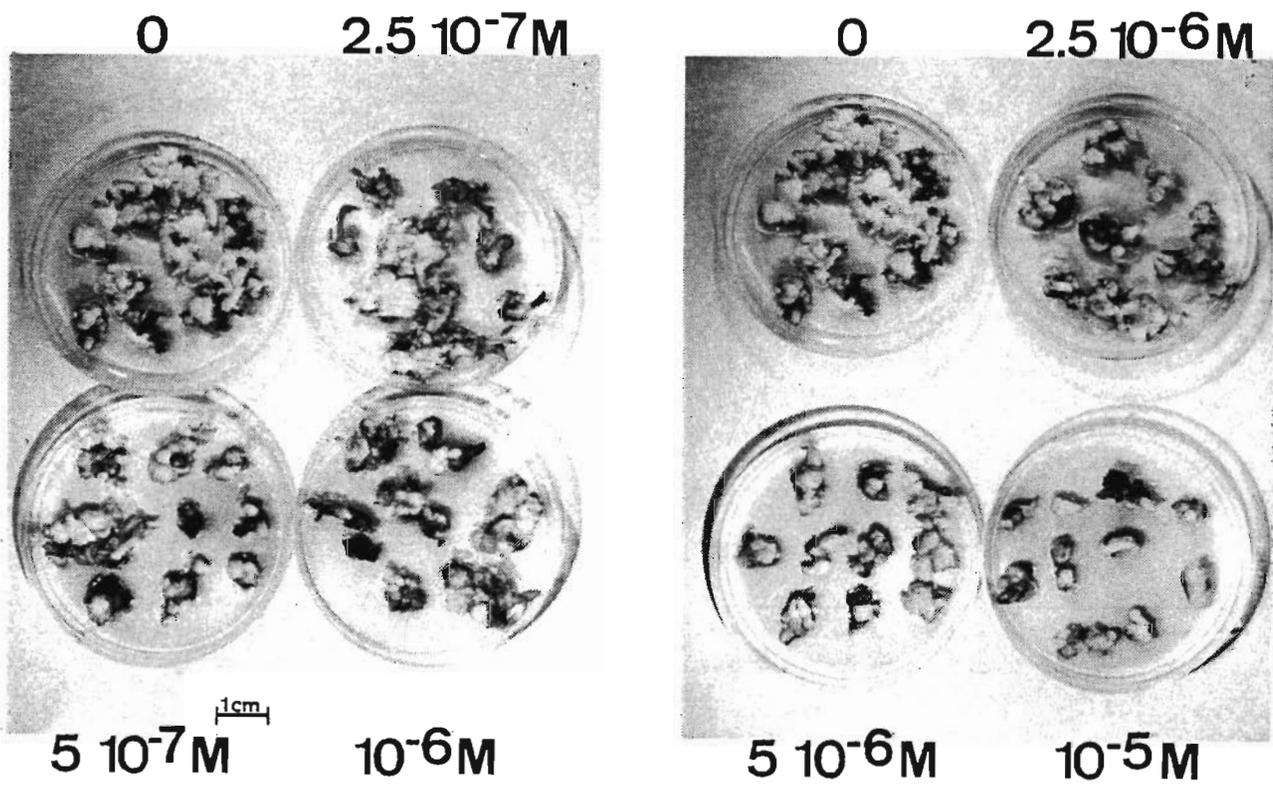


Fig. 27 : Développement de massifs d'embryoïdes témoins du clone BC 156, observé après un post-traitement de 3 semaines, en fonction de la concentration du milieu de culture en 2,4-D (0 à 10^{-5} M).

L'emploi de 10^{-6} M de 2,4-D pendant les 3 semaines du post-traitement a donc été retenu pour le post-traitement standard : avec de telles conditions, la reprise de la prolifération après congélation a en effet été obtenue avec les 2 clones. De plus, lorsque l'étude en a été faite (massifs témoins du clone BC 156) le développement des cultures n'est pas modifié par l'application du 2,4-D à cette concentration.

2.2. CHOIX DU MOMENT D'APPLICATION

Dans les expériences décrites précédemment, l'apport de 2,4-D, nécessaire à la reprise de la prolifération des embryoides congelés, a toujours été effectué après la décongélation. Il était également envisageable d'appliquer cette auxine pendant les 7 jours de prétraitement. Du 2,4-D, à la concentration de 10^{-6} M, a donc été ajouté aux milieux de pré et / ou de post-traitement selon le schéma de la Figure 28. Les résultats obtenus avec des massifs du clone BC 068 sont résumés dans le Tableau 16.

Les taux de survie obtenus varient de 24,4 % (4) à 67,4 % (2). La valeur la plus faible, 24,4 %, est observée lorsque le 2,4-D n'est apporté que pendant le prétraitement. La reprise de l'embryogenèse adventive est possible quelles que soient les conditions d'utilisation du 2,4-D. Les taux de reprise varient de 14,6 % (4) à 37,8 % (6). Les valeurs les plus faibles (inférieures à 20 %) sont obtenues lorsque le 2,4-D a été apporté pendant le prétraitement, que les embryoides aient été ou non soumis à un nouveau traitement d'une semaine par le 2,4-D (4 et 5). Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque cette auxine est ajoutée au milieu de culture soit pendant les deux premières semaines du post-traitement (30,4 %), soit pendant le prétraitement et les deux premières semaines du post-traitement (37,8 %). Un test de X^2 global ne fait pas apparaître d'effet significatif

.../...

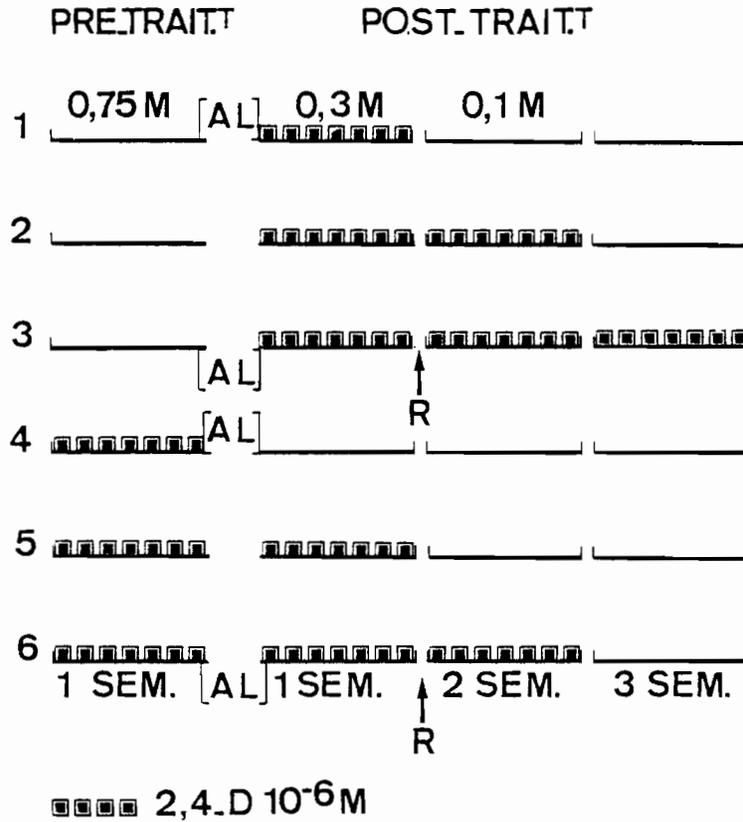


Fig. 28 : Représentation schématique des différentes modalités d'application du 2,4-D (10^{-6} M) pour la congélation de massifs d'embryoïdes du clone BC 068. Le 2,4-D a été utilisé soit uniquement pendant le post-traitement (conditions 1, 2 et 3) soit pendant le prétraitement et / ou le post-traitement (conditions 4, 5 et 6).

	CONDITION N°					
	1	2	3	4	5	6
Massifs congelés	47	46	44	41	39	37
Survie (%)	57,4	67,4	65,9	24,4	56,4	62,2
Reprise (%)	23,4	30,4	20,4	14,6	15,4	37,8

Tabl. 16 : Survie et reprise de la prolifération de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 congelés dans l'azote liquide en fonction du moment et de la durée d'application du 2,4-D. La survie et la reprise de la prolifération, exprimées en pourcentage du nombre de massifs congelés, sont mesurées respectivement 3 et 11 semaines après la décongélation des massifs. Les différentes conditions (1 à 6) correspondent à celles définies dans la Figure 28 (p.122).

de la durée et du moment d'application du 2,4-D sur le taux de reprise de l'embryogenèse. Cependant, si cette auxine est apportée pendant le prétraitement (conditions 4,5 et 6), le meilleur taux de reprise, 37,8 %, diffère significativement des deux autres valeurs (14,6 et 15,4 %). Lorsque le 2,4-D n'est présent que pendant le post-traitement (conditions 1,2 et 3), les taux de reprise ne diffèrent pas entre eux de manière significative, bien qu'une valeur optimale soit obtenue après 2 semaines de culture en présence d'auxine (condition 2 : 30,4 %).

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux obtenus lors de la congélation des structures embryogènes prélevées sur cals (p.110) : le milieu de culture de ces cals contient en effet du 2,4-D. La reprise de la prolifération après la décongélation de ces structures est possible sans apport d'auxine au cours du pré et / ou du post-traitement. Lorsque les massifs d'embryoïdes utilisés proviennent de matériel cultivé depuis plusieurs années sur un milieu ne contenant pas de régulateurs de croissance, une préculture de ces massifs sur un milieu renfermant du 2,4-D avant leur congélation permet la reprise de leur prolifération sans qu'un post-traitement en présence d'auxine soit nécessaire. Le taux de reprise observé reste toutefois faible (14,6 %) dans ces conditions.

3. INFLUENCE DU 2,4-D SUR LE COMPORTEMENT ULTÉRIEUR DES MASSIFS EN FONCTION DE LA DURÉE DU PRÉTRAITEMENT

Au cours de cette expérimentation, des massifs d'embryoïdes des clones BC 068 et BC 156 ont été prétraités pendant des durées variables (0,3, 5 et 7 jours) sur un milieu contenant 0,75M de saccharose; ils ont ensuite été congelés ou non dans l'azote liquide puis post-traités pendant trois semaines sur des milieux contenant du 2,4-D à la concentration de 10^{-6} M.

.../...

Les massifs d'embryoïdes (29 à 54 par condition) ont été suivis pendant 11 semaines après leur réchauffement. Les paramètres suivants ont été étudiés :

- . Taux de survie et de reprise de la prolifération des massifs d'embryoïdes, mesurés respectivement après 3 et 11 semaines de culture.
- . Evolution du poids de matière fraîche des massifs ayant présenté une reprise de l'embryogenèse adventive, pendant une durée de 11 semaines à partir du début du post-traitement.

3.1. SURVIE ET REPRISE DE LA PROLIFÉRATION

Les résultats obtenus pour les deux clones sont regroupés dans les Tableaux 17 à 20.

A) SURVIE

Pour les deux clones étudiés, BC 068 et BC 156, les taux de survie des embryoïdes témoins après un prétraitement de 0 à 7 jours sont compris entre 70 et 100 %, que le post-traitement ait été effectué avec ou sans 2,4-D.

Dans le cas des embryoïdes congelés, les taux de survie sont généralement inférieurs à ceux des témoins. Pour les deux clones, la survie des massifs est nulle en l'absence de prétraitement; les meilleurs résultats sont obtenus pour un prétraitement de 5 jours. D'autre part, la survie est généralement plus importante si le post-traitement a été réalisé en présence de 2,4-D. Ainsi, des embryoïdes du clone BC 068 prétraités pendant 5 jours assurent une survie de 68 % si le post-traitement

../...

		Durée du prétraitement			
		(jours)			
		0	3	5	7
SURVIE (%)	Té -	100	70	97	71
	Té +	93	70	93,5	78,4
	AL -	0	22	38	34,3
	AL +	0	48	68	32

Tabl. 17 : Pourcentages (%) de survie d'embryoïdes du clone BC 068, témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec (Té⁺, AL⁺) ou sans 2,4-D (Té⁻, AL⁻) en fonction de la durée du prétraitement (0 à 7 jours).

		Durée du prétraitement			
		(jours)			
		0	3	5	7
SURVIE (%)	Té -	78	71	97	73
	Té +	96,4	81	100	73
	AL -	0	8	42	6,7
	AL +	0	50	67	30

Tabl. 18 : Pourcentages (%) de survie d'embryoïdes du clone BC 156, témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec (Té⁺, AL⁺) ou sans 2,4-D (Té⁻, AL⁻), en fonction de la durée du prétraitement (0 à 7 jours).

	Durée du prétraitement				
	(jours)				
	0	3	5	7	
	Té -	82,8	52	85,2	60,5
		-----	-----	-----	-----
REPRISE	Té +	87,1	58	86,7	70,3
(%)		-----	-----	-----	-----
	AL -	0	5,6	12,6	11,4
		-----	-----	-----	-----
	AL +	0	26	21,9	13,9

Tabl. 19 : Reprise de la prolifération d'embryoïdes du clone BC 068, témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec (Té⁺, AL⁺) ou sans 2,4-D (Té⁻, AL⁻), en fonction de la durée du prétraitement (0 à 7 jours).

	Durée du prétraitement				
	(jours)				
	0	3	5	7	
	Té -	33,3	40,6	63,3	35,5
		-----	-----	-----	-----
REPRISE	Té +	89,3	64,5	58,1	55,2
(%)		-----	-----	-----	-----
	AL -	0	0	3,3	0
		-----	-----	-----	-----
	AL +	0	0	25,8	16,7

Tabl. 20 : Reprise de la prolifération d'embryoïdes du clone BC 156, témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec (Té⁺, AL⁺) ou sans 2,4-D (Té⁻, AL⁻), en fonction de la durée du prétraitement (0 à 7 jours).

a été réalisé avec du 2,4-D et de 38 % seulement s'il n'y a pas eu de 2,4-D pendant le post-traitement. Enfin, si les deux clones présentent des résultats équivalents lorsque le post-traitement comprend du 2,4-D, le clone BC 156 donne des taux de survie inférieurs à ceux obtenus avec le clone BC 068 si le post-traitement est effectué sans 2,4-D.

B) REPRISE DE LA PROLIFÉRATION

Les taux de reprise de la prolifération des embryoïdes témoins varient selon la durée du prétraitement : de 52 à 85 % pour le clone BC 068 et de 33 à 63 % pour le clone BC 156, lorsque le post-traitement est effectué en l'absence de 2,4-D. Après un post-traitement sur 2,4-D les résultats sont compris entre 58 et 87 % pour le clone BC 068 et entre 55 et 89 % pour le clone BC 156. La reprise de la prolifération est globalement plus importante chez le clone BC 068 que chez le clone BC 156, que le milieu de post-traitement comprenne (75,5 % en moyenne contre 66,8 %) ou non (70,1 % en moyenne contre 43,2 %) du 2,4-D. L'apport d'auxine pendant le post-traitement a un effet bénéfique pour le clone BC 156, toutes durées de prétraitement confondues, puisque le taux de reprise moyen passe de 43,2 % à 66,8 %, alors qu'il paraît sans effet dans le cas du clone BC 068. Cependant il faut noter que, pour le clone BC 156, le taux de reprise après un post-traitement sur 2,4-D baisse progressivement avec l'augmentation de la durée du traitement, passant de 89,3 (0 jour de prétraitement) à 55,2 % (7 jours de prétraitement).

Avec les embryoïdes congelés, les taux de reprise sont nettement inférieurs. Des résultats positifs sont obtenus dans un plus grand nombre de conditions avec le clone BC 068 qu'avec le clone BC 156. En effet, une reprise de la prolifération est observée pour 3, 5 et 7 jours de prétraitement dans le premier cas et pour 5 et 7 jours seulement dans le deuxième. D'autre part, pour les deux clones, les résultats sont supérieurs

.../...

lorsque le post-traitement a eu lieu en présence de 2,4-D. Sans auxine pendant le post-traitement, le meilleur résultat est de 12,8 % pour le clone BC 068, et de 3,3 % pour le clone BC 156 (soit 1 massif sur 30).

Lorsque le milieu de post-traitement contient du 2,4-D, les meilleurs taux de reprise (26 %) sont analogues pour les deux clones; ils sont obtenus pour un prétraitement de 3 jours dans le cas du clone BC 068, et de 5 jours dans le cas du clone BC 156. Les taux de reprise diminuent lorsque la durée de prétraitement augmente : pour 7 jours de prétraitement ils sont de 14,9 % seulement avec le clone BC 068 et de 17 % pour le clone BC 156.

Si une reprise de la prolifération a pu être obtenue au cours de cette expérimentation alors que les milieux de post-traitement ne contenaient pas de 2,4-D, ce résultat n'est pas reproductible et ne concerne que quelques massifs.

3.2. EVOLUTION DU POIDS DE MATIÈRE FRAÎCHE DES MASSIFS

Cette étude complète celle effectuée dans le Chapitre III sur le comportement des embryoïdes pendant le pré et le post-traitement. L'évolution pondérale des massifs d'embryoïdes des clones BC 068 et BC 156 qui ont présenté une reprise de l'embryogenèse adventive a été suivie pendant les 11 semaines qui suivent le réchauffement. A la fin du post-traitement de trois semaines, effectué en présence ou en absence de 2,4-D, les massifs ont été repiqués en tubes de culture sur milieu standard. Un autre repiquage a été effectué 4 semaines plus tard, soit 7 semaines après le réchauffement. Les mesures ont été faites après 0, 1, 3, 5, 7 et 11 semaines de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen d'augmentation du poids de matière fraîche (PMF) par rapport au PMF moyen des massifs au

../...

moment de la congélation. Les résultats obtenus sont regroupés sur les Figures 29 à 32. Chaque Figure représente l'évolution du PMF de massifs témoins et congelés, post-traités avec ou sans 2,4-D, pour une durée de prétraitement donnée.

A) PRÉTRAITEMENT DE 7 JOURS

Sur la Figure 29, qui correspond au prétraitement standard des embryoïdes (7 jours de culture sur un milieu contenant 0,75M de saccharose), l'augmentation du PMF est pratiquement nulle pendant la première semaine pour les deux clones et dans toutes les conditions (Figure 29 A et B); le milieu de culture contient alors 0,3M de saccharose. La croissance ne reprend qu'après le premier repiquage (R1) sur 0,1M de saccharose; elle est plus rapide pour le clone BC 068 (Figure 29 A) que pour le clone BC 156 (Figure 29 B). Il en est de même pendant les 2 semaines qui suivent le repiquage des massifs sur le milieu standard dépourvu de régulateurs de croissance. Des différences significatives n'apparaissent qu'après la cinquième semaine de culture. Quel que soit le clone, la croissance est améliorée après un post-traitement en présence de 2,4-D, que les embryons aient été congelés ou non dans l'azote liquide, lorsque la reprise de l'embryogenèse a été effective. Toutefois, la croissance des embryoïdes traités à -196°C reste plus lente que celle des embryoïdes témoins pour un post-traitement identique, c'est-à-dire avec ou sans 2,4-D. La différence de vigueur entre les 2 clones, décelée au cours des expériences précédentes, est confirmée par cette étude : l'accroissement du PMF des embryoïdes du clone BC 068 est supérieur à celui du clone BC 156, pour des conditions expérimentales identiques. La vitesse de la croissance augmente à partir de la 7ème semaine.

Pour le clone BC 068, après le troisième repiquage (R3), soit entre la septième et la onzième semaine après le réchauffement, l'accroissement du PMF s'accélère. Quelles que soient

..../...

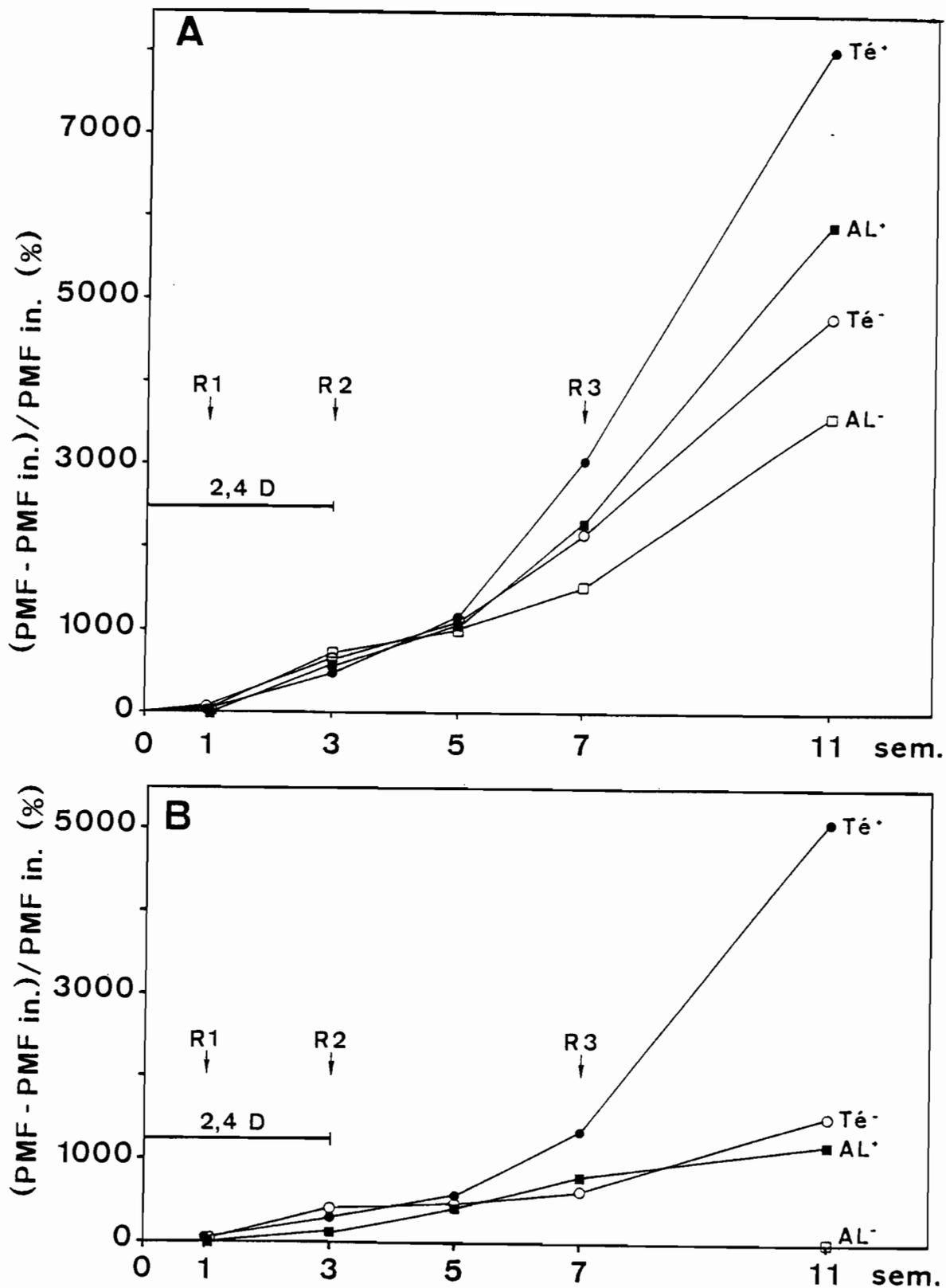


Fig. 29 : Augmentation du PMF moyen, en % du PMF moyen initial (PMF in.) de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (A) et BC 156 (B) témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec 2,4-D (Té⁺, ●; AL⁺, ■) ou sans 2,4-D (Té⁻, ○; AL⁻, □) après un prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose. Les mesures sont réalisées pendant 11 semaines à partir du début du post-traitement. Seuls sont pris en compte les massifs d'embryoïdes ayant montré une reprise de l'embryogenèse adventive. Les flèches indiquent un repiquage des massifs d'embryoïdes sur un milieu neuf. La période pendant laquelle du 2,4-D est éventuellement présent dans le milieu est indiquée par un trait horizontal. Les conditions pour lesquelles aucune réponse n'a été obtenue sont indiquées sur l'axe des abscisses : AL⁻, Figure 29 B (clone BC 156).

les conditions expérimentales, le PMF est multiplié par un facteur supérieur à 2 en quatre semaines, ce qui correspond à l'accroissement du PMF d'une culture d'embryoïdes n'ayant subi aucun traitement. Dans le cas du clone BC 156, seule l'augmentation du PMF des embryoïdes témoins post-traités en présence de 2,4-D est similaire à celle observée avec le clone BC 068 pour la même période. Pour les autres conditions, la croissance des massifs d'embryoïdes reste pratiquement linéaire. Ainsi, après un pré-traitement de sept jours, l'augmentation pondérale des massifs du clone BC 068 reste supérieure à celle des massifs du clone BC 156 pour des conditions identiques de traitement. L'addition de 2,4-D pendant le post-traitement a un effet favorable sur la croissance ultérieure des embryoïdes témoins des deux clones et des embryoïdes congelés du clone BC 068.

B) PRÉTRAITEMENTS DE 0, 3 ET 5 JOURS

Après des durées de prétraitement plus courtes, 0, 3 et 5 jours (Figures 30, 31 et 32), les résultats sont les suivants : pour les embryoïdes témoins du clone BC 068, les pourcentages d'augmentation du PMF moyen des massifs sont équivalents (5000 à 6000 %), que le post-traitement ait été réalisé ou non en présence de 2,4-D. Pour le clone BC 156, au contraire, le 2,4-D a un effet inhibiteur sur la croissance ultérieure des massifs. Cette inhibition qui est particulièrement nette après des traitements de 0 à 3 jours diminue lorsque la durée du prétraitement est portée à 5 jours. Au-delà de cette durée, le 2,4-D exerce un effet positif sur la croissance des massifs (Figure 30 B). Une relation étroite existe donc entre un prétraitement prolongé des embryoïdes par des milieux concentrés en saccharose et l'effet du 2,4-D : l'accroissement pondéral après onze semaines de culture passe ainsi de 2000 % sans prétraitement à 5000 % avec un prétraitement de 5 jours.

.../...

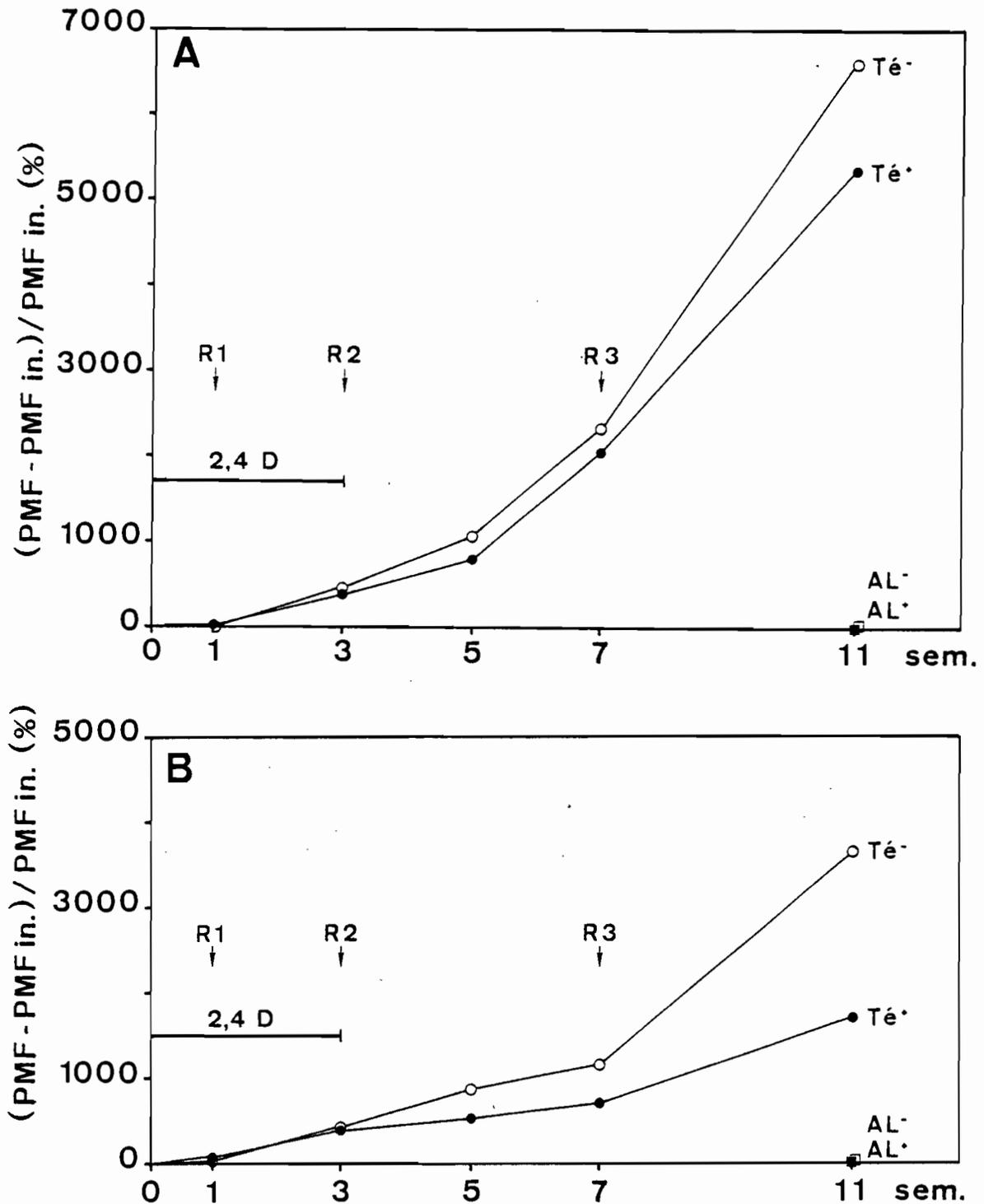


Fig. 30 : Augmentation du PMF moyen, en % du PMF moyen initial (PMF in.) de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (A) et BC 156 (B), témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec 2,4-D (Té⁺, ●; AL⁺ ◼) ou sans 2,4-D (Té⁻, ○; AL⁻, ◻) après un prétraitement de 0 jour sur un milieu contenant 0,75M de saccharose. Les mesures sont réalisées pendant 11 semaines à partir du début du post-traitement. Seuls sont pris en compte les massifs d'embryoïdes ayant montré une reprise de l'embryogenèse adventive. Les flèches indiquent un repiquage des massifs d'embryoïdes sur un milieu neuf. La période pendant laquelle du 2,4-D est éventuellement présent dans le milieu est indiquée par un trait horizontal. Les conditions pour lesquelles aucune réponse n'a été obtenue sont indiquées sur l'axe des abscisses : AL⁺, AL⁻, Figure 30 A (clone BC 068) et B (clone BC 156).

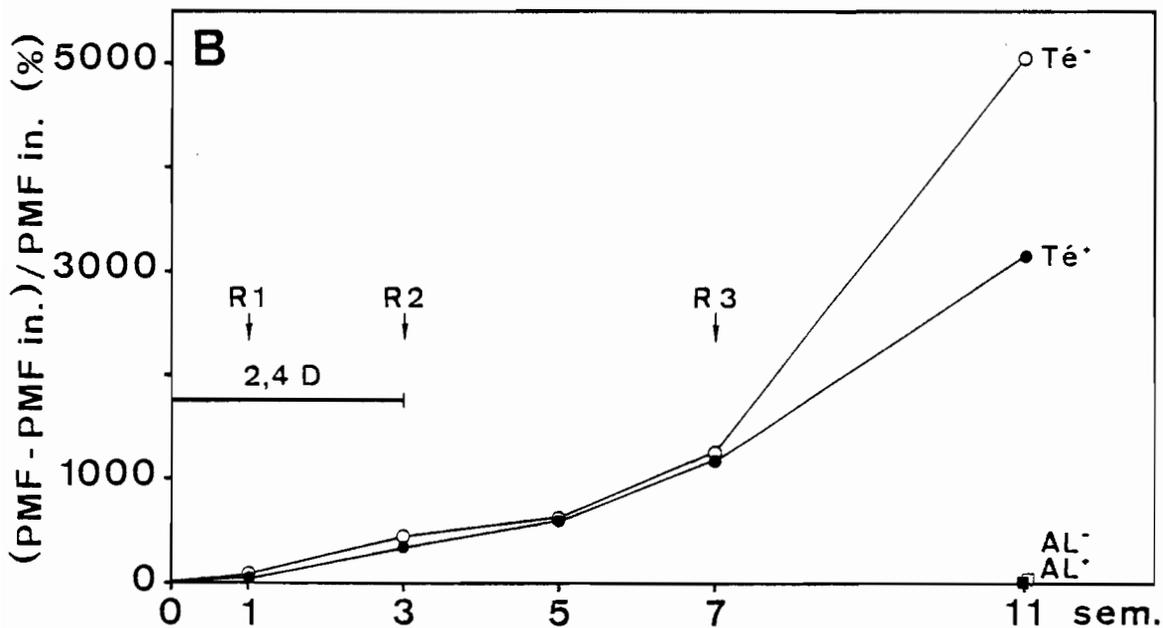
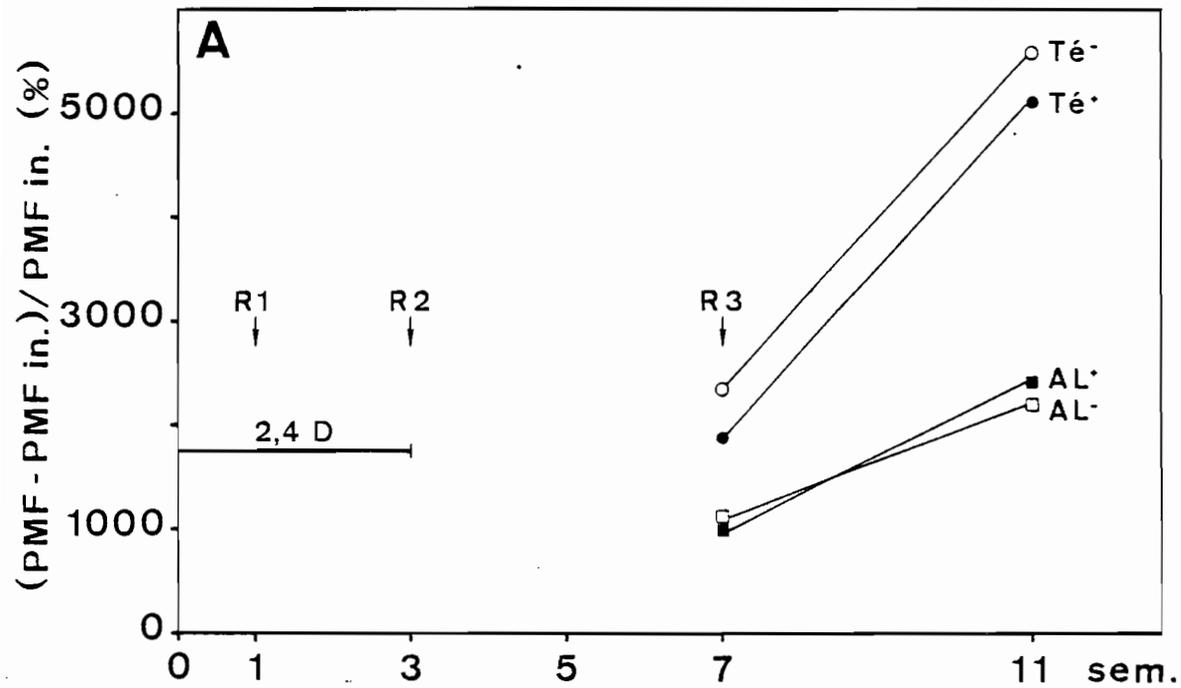


Fig. 31 : Augmentation du PMF moyen, en % du PMF moyen initial (PMF in.) de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (A) et BC 156 (B) témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec 2,4-D (Té⁺, ; AL⁺, ■) ou sans 2,4-D (Té⁻, ○ ; AL⁻, □) après un prétraitement de 3 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose. Les mesures sont réalisées pendant 11 semaines à partir du début du post-traitement. Seuls sont pris en compte les massifs d'embryoïdes ayant montré une reprise de l'embryogenèse adventive. Les flèches indiquent un repiquage des massifs d'embryoïdes sur un milieu neuf. La période pendant laquelle du 2,4-D est éventuellement présent dans le milieu est indiquée par un trait horizontal. Les conditions pour lesquelles aucune réponse n'a été obtenue sont indiquées sur l'axe des abscisses : AL⁺, AL⁻, Figure 31 B (clone BC 156).

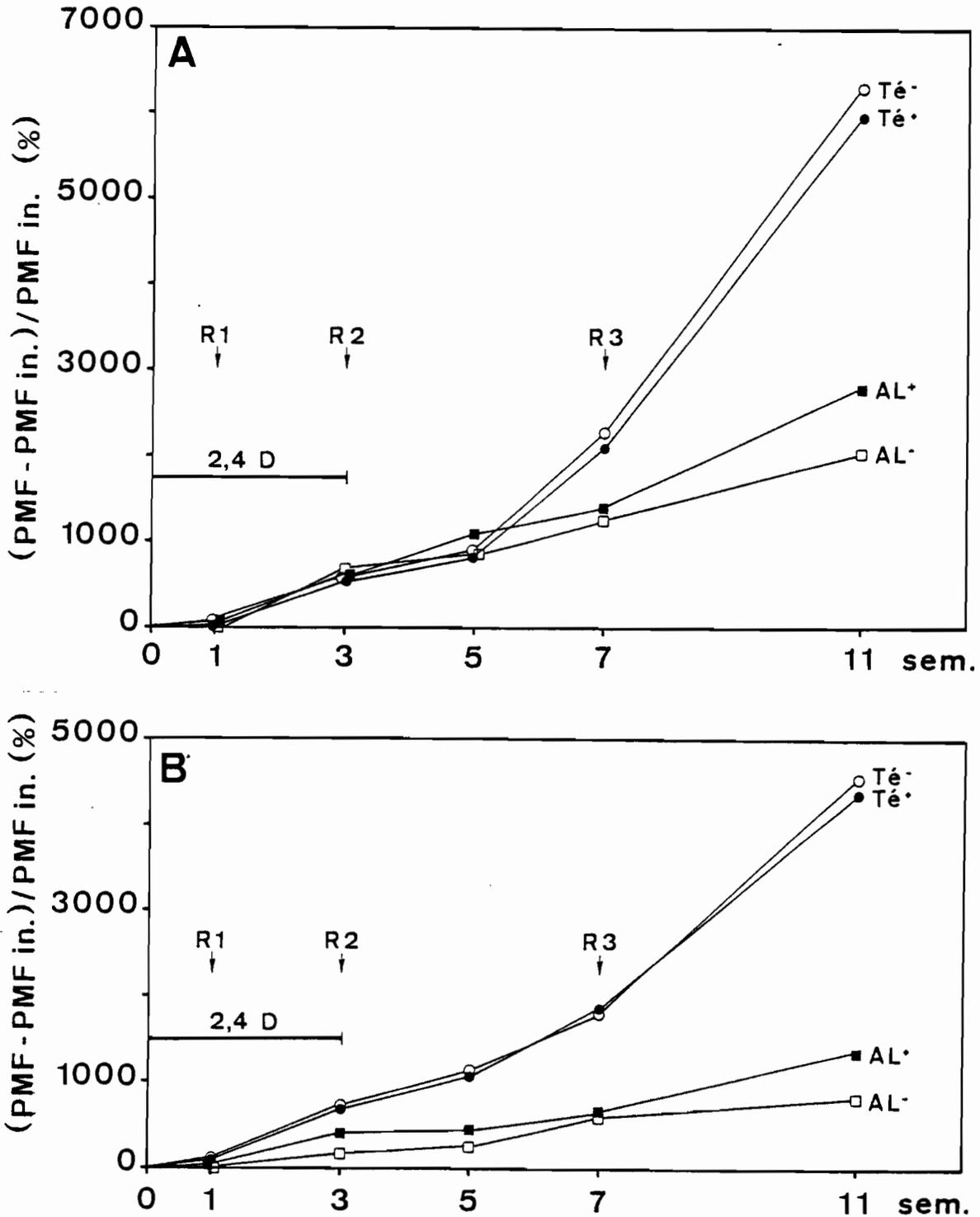


Fig. 32 : Augmentation du PMF moyen, en % du PMF moyen initial (PMF in.) de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (A) et BC 156 (B) témoins (Té) ou congelés (AL), après un post-traitement avec 2,4D (Té⁺, ●; AL⁺, ■) ou sans 2,4-D (Té⁻, ○; AL⁻, □), après un prétraitement de 5 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose. Les mesures sont réalisées pendant 11 semaines à partir du début du post-traitement. Seuls sont pris en compte les massifs d'embryoïdes ayant montré une reprise de l'embryogenèse adventive. Les flèches indiquent un repiquage des massifs d'embryoïdes sur un milieu neuf. La période pendant laquelle du 2,4-D est éventuellement présent dans le milieu est indiquée par un trait horizontal.

Dans le cas des embryoides congelés du clone BC 068, l'augmentation du PMF pour des prétraitements de 3 et 5 jours est pratiquement linéaire et inférieure de moitié par rapport à celle observée sur les embryoides témoins ou congelés après un prétraitement de 7 jours. Avec le clone BC 156, la reprise des embryoides après congélation n'est possible qu'après un prétraitement de 5 jours. L'augmentation du PMF est également linéaire et analogue à celle observée après un prétraitement de 7 jours.

Pour le clone BC 068, les meilleurs résultats sont donc atteints pour un prétraitement de 7 jours. Dans cette condition, les courbes représentant l'augmentation du PMF des massifs témoins et congelés présentent des similitudes, ce qui indique que la congélation n'induit pas de temps de latence appréciable. Pour le clone BC 156 au contraire, les courbes de croissance obtenues avec les embryons congelés restent toujours en dessous de celles des témoins. Ces résultats confirment ceux obtenus dans le chapitre concernant les différences de comportement des deux clones lorsqu'ils sont cultivés dans les mêmes conditions.

4. EFFETS D'UN TRAITEMENT PROLONGÉ EN PRÉSENCE DE 2,4-D

Dans les expériences précédentes, le taux de reprise qualifié de principal (TRP) a été déterminé 11 semaines après le réchauffement des embryoides post-traités pendant trois semaines en présence de 2,4-D. Certains clones peuvent présenter, dans ces conditions, des taux de reprise peu importants. Des essais complémentaires, visant à augmenter le taux de reprise, ont donc été réalisés en maintenant pendant 4 ou 8 semaines supplémentaires les embryoides sur le milieu de post-traitement

.../...

	CLONE		
	LMC 43-18	BC 156	BC 068
Nombre de massifs	75	32	37
TRP (%)	18,7	13,3	30
TRC (%)	8	13,3	0
TRT (%)	26,6	26,6	30

Tabl. 21 : Importance relative des taux de reprise principal (TRP) et complémentaire (TRC) dans le calcul du taux de reprise total (TRT) des massifs d'embryoïdes des clones LMC 43-18, BC 156 et BC 068 après congélation dans l'azote liquide. Les massifs subissent un post-traitement en présence de 2,4-D (10^{-6} M) pendant 3 semaines (TRP), 7 ou 11 semaines (TRC).

../...

contenant 10^{-6} M de 2,4-D avant leur repiquage sur milieu standard (cf. p. 45). Deux autres taux de reprise peuvent alors être définis : le taux de reprise complémentaire (TRC), calculé à partir du nombre de massifs d'embryoïdes maintenus après 4 et 8 semaines supplémentaires sur le même milieu de post-traitement avec 2,4-D puis repiqués pour une durée de 8 semaines sur le milieu standard. Le taux de reprise total (TRT) est égal à la somme du taux de reprise principal et du taux complémentaire. L'expérience a été réalisée avec des embryoïdes congelés des clones BC 068, BC 156 et LMC 43-18. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 21.

Les trois clones étudiés présentent des taux de reprise principaux très différents : 18,7 % pour LMC 43-18, 13,3 % pour BC 156 et 30 % pour BC 068. Une prolongation de 4 semaines du post-traitement sur 2,4-D permet d'obtenir la reprise de la prolifération de quelques massifs supplémentaires du clone LMC 43-18 (+ 8 %) et d'un nombre plus important de massifs du clone BC 156 (+ 13,3 %); ce n'est pas le cas avec le clone BC 068, pour lequel trois semaines de post-traitement avec 2,4-D suffisent pour obtenir un taux de reprise important. Il peut donc être intéressant, pour des clones présentant un faible taux de reprise après trois semaines de post-traitement, d'en augmenter la durée. Pour les clones étudiés les taux de reprise principaux sont alors voisins (26,6 à 30 %). Cependant, le développement du matériel dont la reprise a été obtenue par une prolongation du post-traitement doit être suivi. Il n'est en effet pas exclu qu'une culture prolongée en présence de 2,4-D conduise à une perte de la conformité par rapport au matériel de départ. Au cours de cette expérimentation, les massifs des clones BC 156 et LMC 43-18 obtenus après 7 semaines de post-traitement sur 2,4-D présentaient un aspect légèrement calleux lors de leur repiquage sur milieu standard, mais aucun retour à un stade cal n'a jusqu'à présent été observé dans les cultures d'embryoïdes en prolifération.

.../...

5. EFFETS DE LA DURÉE DE STOCKAGE DANS L'AZOTE LIQUIDE

Afin de vérifier que la durée de conservation dans l'azote liquide n'a pas d'influence sur la survie et la reprise des embryoides, des massifs du clone BC 068 ont été congelés puis stockés à -196°C pendant des durées différentes, 3 semaines, 7 et 15 mois. Après leur réchauffement, les massifs ont été post-traités dans les conditions définies dans le chapitre précédent (3 semaines en présence de 10^{-6}M de 2,4-D). Les résultats sont présentés dans le Tableau 22.

La durée de conservation des massifs d'embryoïdes dans l'azote liquide n'a d'influence ni sur le taux de leur survie, ni sur le taux de leur reprise (X^2 non significatif). De plus, la reprise de la prolifération du matériel stocké pendant 3 semaines, 7 et 15 mois à -196°C s'est effectuée avec les mêmes vitesse et intensité que dans les expériences décrites précédemment pour lesquelles la durée de stockage dans l'azote liquide n'était que d'une heure.

6. OBTENTION DE PLANTULES

Des pousses feuillées provenant de cultures issues de massifs d'embryoïdes congelés des clones BC 068, BC 156 et LMC 079-3 ont été enracinées et pour certaines, sevrées selon une technique communiquée par AHEE et GUENIN (1985, com. pers.). Les résultats sont donnés dans le Tableau 23.

Les pourcentages d'enracinement obtenus varient de 89 à 100 selon les clones et les expérimentations. Ces résultats correspondent aux pourcentages d'enracinement habituellement observés avec les vitro-plants. Les principales étapes de cette régénération sont illustrées dans la Figure 33.

		Nombre de massifs		
		traités	Survie (%)	Reprise (%)
	3 semaines	44	66	20,4
Durée de	-----	-----	-----	-----
stockage	7 mois	65	77	15,4
à	-----	-----	-----	-----
- 196°C	15 mois	25	76	16,4

Tabl. 22 : Effet de la durée de stockage dans l'azote liquide sur la survie et la reprise de massifs d'embryoïdes du clone BC 068. Les taux de survie et de reprise (exprimés en %) sont déterminés respectivement 3 et 11 semaines après la décongélation des massifs.

		Nombre de pousses traitées	Nombre de pousses enracinées	Enracinement (%)
		68	68*	100
C	BC 068			
L	1	31	28	90,3
O				
N		6	6*	100
E	BC 156			
		28	25	89,3
	LMC 079.3	82	81	98,8

Tabl. 23 : Pourcentages d'enracinement de pousses feuillées issues de massifs d'embryoïdes congelés dans l'azote liquide au cours de 5 expériences différentes (deux pour les clones BC 068 et BC 156, une seule pour le clone LMC 079-3). Les massifs d'embryoïdes ont été conservés dans l'azote liquide pendant une heure sauf en 1 où ils ont été stockés pendant 7 mois. Les pousses feuillées indiquées par un astérisque (*) ont été sevrées puis acclimatées en serre.

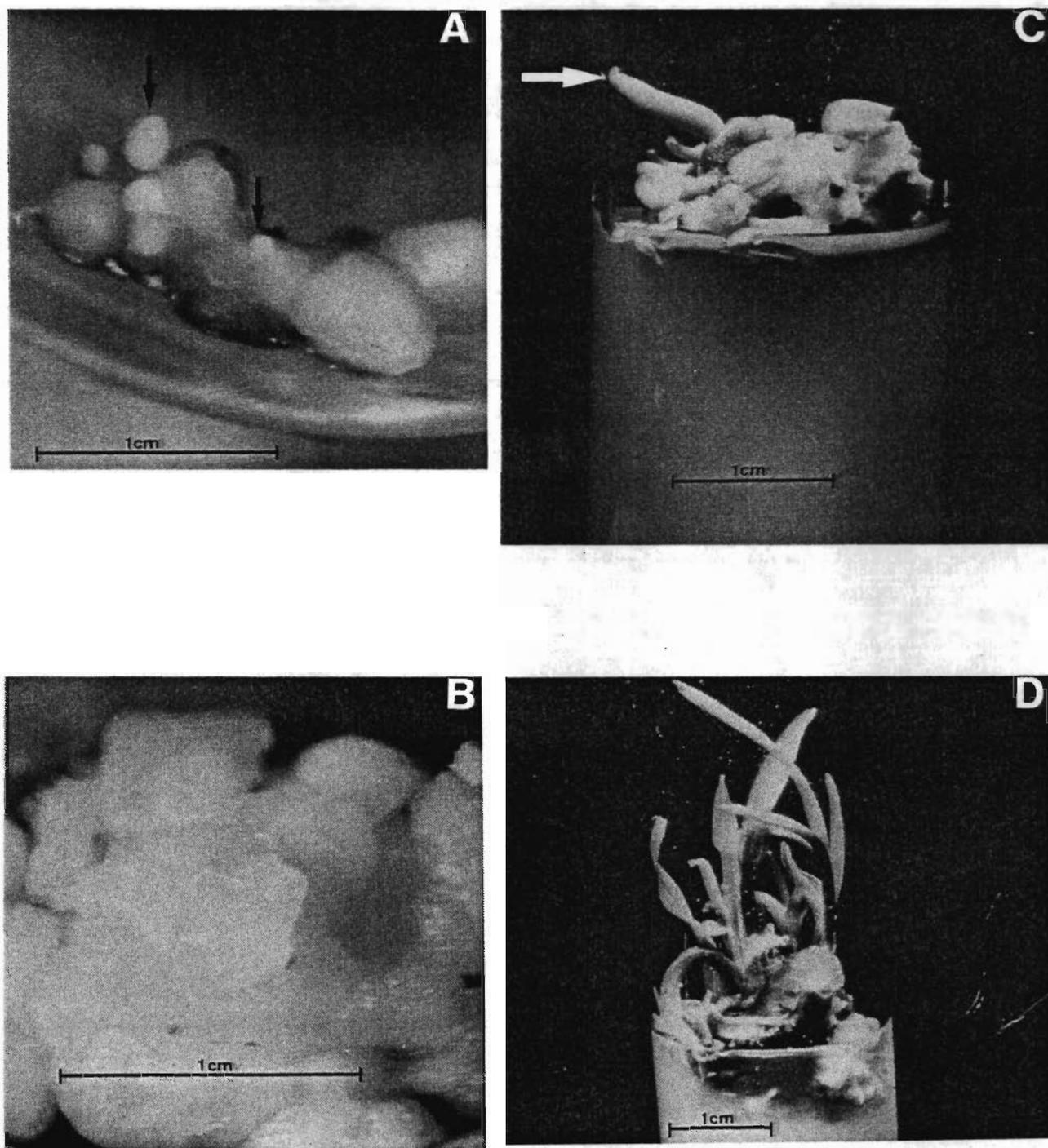


Fig. 33 : (A), apparition des premiers embryoides néoformés (flèches) sur un massif, 2 semaines après sa décongélation. (B), reprise de la prolifération d'un massif, 1 mois après sa décongélation. (C), reprise de l'embryogenèse adventive, 2 mois après la décongélation; apparition des premières pousses feuillées (flèche). (D), obtention de pousses feuillées issues d'embryons somatiques congelés dans l'azote liquide.

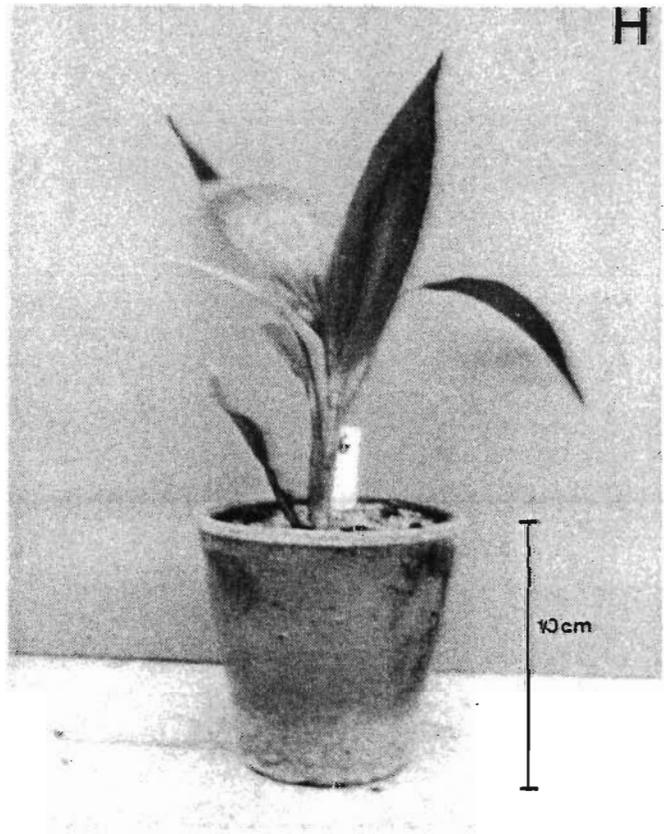
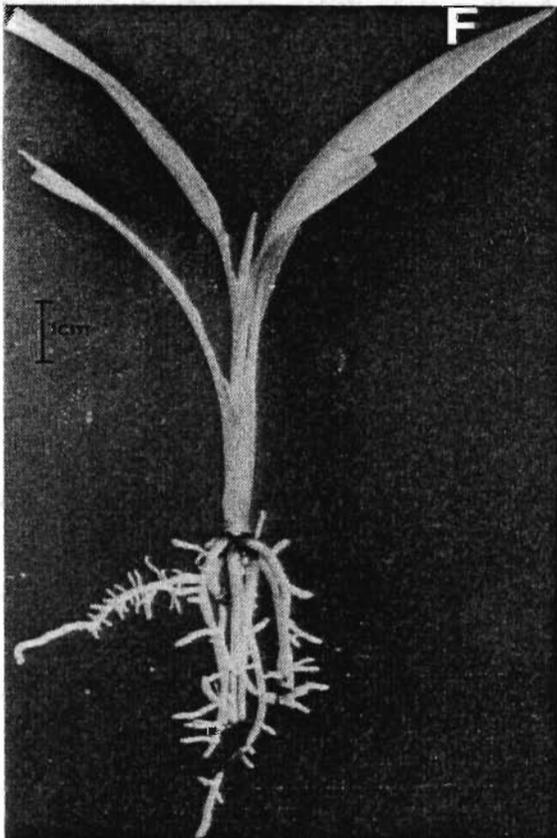
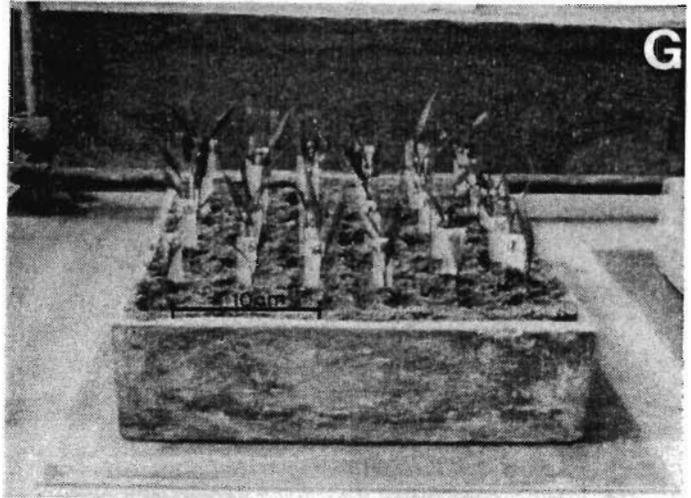
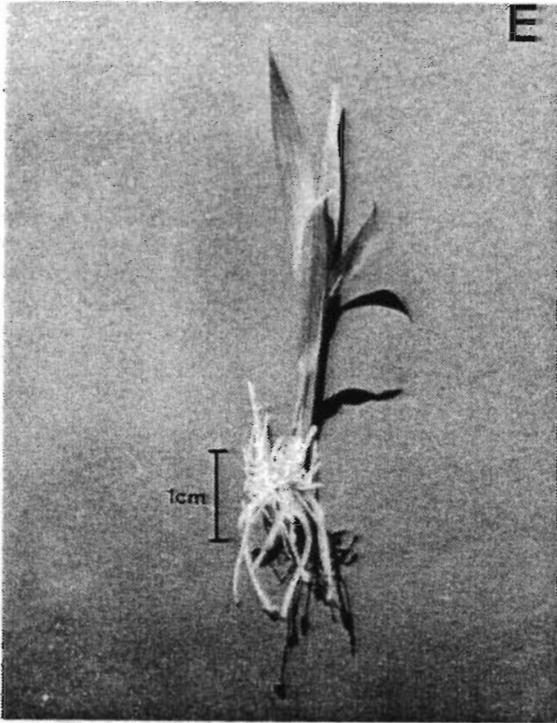


Fig. 33 (suite) : (E), plantule après traitement rhizogène. (F), plantule après 1 mois d'acclimatation en serre (G). (H), vitroplant après 3 mois et demi d'acclimatation.

7. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans ce chapitre il a été montré que la reprise de l'embryogenèse d'embryoïdes congelés est possible grâce à l'addition d'acide 2,4 -dichlorophénoxyacétique (2,4-D) au milieu de post-traitement. Selon WITHERS (1986), la modification du milieu de post-traitement peut conduire à une modification de la nature de la réponse ou à une amélioration de la reprise du matériel congelé. Ainsi, l'addition de charbon actif au milieu de post-culture (WITHERS, 1979) permet l'adsorption de substances de croissance endogènes inductrices de la callogenèse libérées par les cellules lésées. Cette propriété d'adsorption du charbon actif avait déjà été mise en évidence par FRIDBORG et al. (1978). De même, l'addition d'acide gibbérellique favorise le développement direct de méristèmes de tomate après leur congélation sans passage par un stade cal (GROUT et al., 1978). L'addition d'hormones de croissance (auxines, cytokinines, gibbérellines) peut permettre également d'obtenir ou d'augmenter la reprise du matériel congelé (WITHERS, 1986) notamment pour des méristèmes de pomme de terre (HENSHAW et al., 1980 ; TOWILL, 1981 a et b, 1983).

Dans le cas du palmier à huile, la reprise de la prolifération à partir de matériel congelé a d'abord été obtenue avec des structures embryogènes prélevées directement sur des cals cultivés sur un milieu inducteur de l'embryogenèse. Les structures embryogènes sont, dans le procédé de multiplication in vitro du palmier à huile (cf. Figure 3, p. 26) isolées puis repiquées sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance souvent appelé milieu d'expression. Elles donnent naissance à des embryoïdes en prolifération. Ce changement de milieu correspond à la phase de déclenchement de l'embryogenèse somatique classiquement décrite dans la littérature : le matériel, cal ou suspension cellulaire, est cultivé sur un milieu embryogène riche en régula-

.../...

teurs de croissance (particulièrement en auxines) dont la suppression ou la diminution, lors du passage sur le milieu d'expression, provoque la formation des embryons somatiques (AMMIRATO, 1984 ; GEORGE et SHERRINGTON, 1984). Pour SHARP et al. , (1980), l'auxine induit la détermination de zones embryogènes à partir de cellules "compétentes" (CONSTABEL, 1985) mais bloque la division de ces cellules. La division de ces cellules devient possible quand le niveau d'auxine est abaissé. Chez les Monocotylédones, l'auxine préférentiellement utilisée est le 2,4-D (AMMIRATO, 1984). C'est le cas pour les Graminées (VASIL, 1985), le palmier-dattier (TISSERAT, 1984 ; SHARMA et al., 1984) et le palmier à huile (PARANJOTHY, 1984 ; THOMAS et RAO, 1985).

Les structures embryogènes utilisées ont suivi le même processus (passage d'un milieu inducteur à un milieu d'expression de l'embryogenèse), simplement interrompu par le prétraitement et la congélation. Après la congélation, les structures embryogènes contiennent encore suffisamment de cellules vivantes, du fait de leurs caractères méristématiques et de leur teneur en 2,4-D qui est probablement suffisante pour permettre la reprise de l'embryogenèse adventive sans addition d'auxine lors du post-traitement.

Les massifs d'embryoïdes issus des clones en prolifération (BC 068 et BC 156) utilisés pour les expériences de congélation proviennent de matériel cultivé sur milieu standard, qui ne comporte pas de régulateurs de croissance; ces cultures produisent donc leurs propres facteurs de croissance endogènes, nécessaires à leur multiplication et à leur développement. Si le milieu de post-traitement ne contient pas de régulateur de croissance exogène (ici le 2,4-D), les massifs d'embryoïdes ne reprennent qu'exceptionnellement leur prolifération : après la décongélation, il n'y a plus assez de tissus vivants pour synthétiser en quantité suffisante les régulateurs de croissance endogènes responsables de la reprise de la prolifération. Lorsque l'on apporte du 2,4-D dans le milieu de pré ou de post-trai-

../...

tement, les cellules encore vivantes qui seront à l'origine de la reprise de la prolifération absorbent du 2,4-D. Le niveau d'auxine dans les tissus devient suffisant pour permettre la reprise de l'embryogenèse adventive lorsque les massifs sont repiqués sur le milieu standard dépourvu d'hormones de croissance, comme c'est le cas avec les structures embryogènes.

Les résultats concernant l'utilisation du 2,4-D ont, dans une certaine mesure, permis de préciser les conditions de son emploi. Parmi les diverses concentrations et durées d'application utilisées, aucune condition optimale n'a pu être trouvée. La reprise de la prolifération a pu être obtenue chez les deux clones, BC 068 et BC 156, avec des conditions tout à fait différentes. Ainsi, dans le cas du clone BC 068, la reprise de l'embryogenèse adventive a été observée après un post-traitement d'une semaine sur un milieu contenant 5.10^{-7} M de 2,4-D comme après 3 semaines de post-culture en présence de 5.10^{-6} M de 2,4-D. Dans le cas du clone BC 156, seule une teneur en auxine supérieure ou égale à 10^{-6} M semble permettre une reprise de la prolifération alors que, pour le clone BC 068, l'embryogenèse a pu être observée après une post-culture d'une semaine sur un milieu contenant 5.10^{-7} M de 2,4-D. Les limites supérieures de concentrations en auxine à utiliser ont également pu être précisées, notamment en observant le comportement des embryoïdes témoins du clone BC 156 cultivés pendant 3 semaines sur une gamme de concentrations en 2,4-D de 0 à 10^{-5} M. Au-delà de $2,5.10^{-6}$ M d'auxine dans le milieu, diverses anomalies ont été observées : production de pousses feuillées anormales, embryoïdes hypertrophiés, apparition de cals dans les cultures d'embryoïdes. Le 2,4-D est connu pour induire une prolifération cellulaire non organisée, donc l'apparition de cals qui peut être une source de variabilité, conduisant à une perte de la conformité (SCOWCROFT, 1984 ; CONSTABEL, 1985). De plus, il a été observé que la croissance des massifs d'embryoïdes diminue par rapport au témoin à partir d'une concentration de $2,5.10^{-6}$ M de 2,4-D : cette auxine a donc un effet inhibiteur sur le dévelop-

.../...

pement ultérieur des massifs d'embryoïdes. Le même type d'observations a été réalisé notamment par ROSE et al. (1986) lors de la culture d'anthères de sorgho, dont l'évolution est inhibée en présence d'une concentration en 2,4-D de $5.10^{-5}M$. Pour le palmier à huile, une concentration en 2,4-D de $2,5.10^{-6}M$ peut être considérée comme une concentration critique.

MINOCHA et NISSEN (1985) ont étudié l'absorption de cette auxine par les cellules de tranches de pomme de terre et de topinambour. Pour de faibles concentrations en 2,4-D (10^{-8} à $10^{-5}M$), l'augmentation de la teneur intracellulaire de cette hormone est proportionnelle à sa concentration extracellulaire; sa pénétration, rapide pendant les premières heures puis plus lente ensuite, se fait par un mécanisme de diffusion facilitée (LEGUAY et GUERN, 1977). Pour des concentrations plus élevées, de l'ordre de $10^{-4}M$ dans le cas de tranches de pomme de terre ou de topinambour, l'absorption de 2,4-D ne suit plus la même cinétique de diffusion facilitée, mais une cinétique multiphasique. La vitesse d'absorption du 2,4-D augmente de manière non proportionnelle à sa concentration externe. Pour MINOCHA et NISSEN (1985), cette augmentation de l'absorption d'auxine aux fortes concentrations serait due à une conversion rapide de cette auxine en une forme liée qui accentuerait ce phénomène dans ces conditions. Dans le cas des embryoïdes de palmier à huile, la quantité de 2,4-D absorbée par les cellules deviendrait trop importante à partir de $2,5.10^{-6}M$ puisque l'on assiste, avec son augmentation, à une altération de la morphogenèse puis à la formation de cals. Cette augmentation peut être due à une simple diffusion du 2,4-D qui s'accroît avec sa concentration, ou comme dans le cas de la pomme de terre et du topinambour, à une brusque augmentation de la vitesse d'absorption par les cellules des embryoïdes entre des concentrations externes de 10^{-6} et $2,5.10^{-6}M$, conduisant à un stockage d'une quantité de 2,4-D qui ne serait plus proportionnelle à sa concentration dans le milieu. Seul un dosage du 2,4-D dans les massifs pourra

.../...

nous apporter une réponse. Lorsque le 2,4-D est utilisé avant la congélation des massifs d'embryoïdes, l'obtention d'un pourcentage de reprise peu élevé est peut-être dûe au fait que des territoires cellulaires activés par l'adjonction de l'auxine sont détruits au cours de la congélation. Il est possible également que l'absorption du 2,4-D, compte tenu de la forte pression osmotique du milieu de prétraitement, soit plus faible que pendant le post-traitement. Il était aussi envisageable d'utiliser cette auxine après les trois semaines du post-traitement. Des essais réalisés (non décrits dans ce mémoire) n'ont pas permis d'obtenir dans ce cas de reprise de la prolifération. Les zones méristématiques n'étaient sans doute plus assez importantes pour permettre une reprise de l'embryogenèse adventive. De plus, il est possible que des composés toxiques provenant de la dégradation des tissus tués par la congélation aient un effet inhibiteur sur la croissance des massifs cellulaires demeurés vivants.

La prolongation du post-traitement pendant 4 semaines en présence de 2,4-D a permis d'augmenter sensiblement le taux de reprise des clones LMC 43-18 et BC 156, sans que l'on observe macroscopiquement de retour transitoire ou partiel à un stade indifférencié. Les cultures obtenues à partir de ces massifs dont la reprise a été plus tardive devront toutefois être suivies. Il faudra vérifier que l'augmentation du temps de contact avec le 2,4-D n'a pas induit de variations qui se répercuteraient sur la conformité du matériel.

La reprise de la croissance des massifs du clone BC 068 traités par l'azote liquide semble s'effectuer sans temps de latence appréciable. Ce résultat est à comparer avec ceux obtenus pour d'autres matériels. Ainsi, dans le cas de cellules de Catharanthus roseus, la reprise de croissance du matériel congelé est équivalente à celle du matériel non congelé (CHEN et al. , 1984 a); il en est de même pour des cals de palmier-

../...

dattier (FINKLE et al., 1982) et des méristèmes d'oeillet (GALERNE, 1985). Pour des cals de luzerne, au contraire (FINKLE et al., 1985 b), la reprise de la croissance après congélation dans l'azote liquide diffère selon les lignées. Cependant, les lignées de cals étudiées conservent leur potentiel de régénération. Les auteurs attribuent cette différence de comportement à la mort d'un nombre plus ou moins élevé de cellules selon les souches lors de la congélation. Pour que la cryoconservation d'un matériel présente les meilleures garanties quant à la conformité du matériel régénéré, il est nécessaire que la technique mise au point assure à la fois un taux de reprise suffisant et une croissance la plus rapide possible, avec un temps de latence réduit au minimum par rapport au matériel témoin. Ces conditions peuvent être considérées comme remplies dans le cas du clone BC 068. Pour le clone BC 156, il serait utile de modifier les conditions expérimentales pour diminuer le temps de latence qui existe avant l'établissement d'une croissance normale. Si des durées de prétraitement de 3 ou 5 jours peuvent parfois permettre une reprise de la prolifération, un prétraitement de 7 jours est seul susceptible d'assurer des taux de reprise satisfaisants et, pour le clone BC 068, une reprise de la croissance du matériel congelé comparable à celle du matériel non congelé.

La prolongation jusqu'à 15 mois de la durée du stockage dans l'azote liquide ne modifie ni le taux de survie ni le taux de reprise des embryoïdes du clone BC 068. De plus, les cultures obtenues continuent à se multiplier normalement 15 mois après leur réchauffement avec un taux de multiplication égal à celui des témoins non congelés. Les pousses feuillées isolées à partir de massifs conservés 7 mois dans l'azote liquide se développent sans présenter pour l'instant d'anomalies. Certaines sont actuellement en cours d'acclimatation en Côte d'Ivoire. De tels résultats n'ont été jusqu'à présent obtenus que sur quelques espèces végétales : ainsi, des plantes entières ont été produites à partir de cals de luzerne stockés 1 an dans l'azote liquide (FINKLE et al., 1985 b), de méristèmes d'arachide con-

.../...

servés 20 mois à -196°C . KARTHA (1982) a obtenu des plants de fraisier et de pois se développant normalement en conditions naturelles après plus de 2 ans de conservation. Enfin, BAJAJ (1985 a) a annoncé la production de plants de manioc et de pomme de terre qui se développent et tubérisent normalement à partir de méristèmes conservés 4 ans dans l'azote liquide. Le comportement in vitro et en serre des premiers vitro-plants de palmier à huile régénérés à partir de matériel stocké à la température de l'azote liquide pendant des durées prolongées permet de penser que les plantes obtenues sont conformes. Cependant, une réponse définitive ne pourra être donnée qu'après leur observation pendant plusieurs années en conditions naturelles.

En conclusion, la reprise de l'embryogenèse adventive de massifs d'embryoïdes après congélation et conservation dans l'azote liquide a été obtenue en modifiant les conditions du post-traitement par l'addition de 10^{-6}M de 2,4-D au milieu de culture pendant 3 semaines. Un résultat analogue, ne nécessitant pas l'emploi d'auxine, a été obtenu avec des structures embryogènes prélevées sur cals. Enfin, des plantules dont le développement est comparable à celui des témoins non traités ont été produites à partir de ces deux types de matériel, embryoïdes et structures embryogènes.

CHAPITRE V

EFFETS DU MODE DE CONGELATION SUR LASURVIE ET LA REPRISE DE LA PROLIFERATIONDES MASSIFS D'EMBRYOÏDES

Pour tenter d'augmenter les taux de reprise et donner une explication des mécanismes permettant aux massifs d'embryoïdes de résister à la congélation dans l'azote liquide, d'autres conditions du protocole de cryoconservation ont été modifiées : utilisation de vitesses de refroidissement faibles et congélation en deux étapes, après des prérefroidissements plus ou moins importants. Les expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées en ne changeant ni le prétraitement, ni le réchauffement, ni le post-traitement. L'étude de la cristallisation a été réalisée par analyse thermique simple et par microcalorimétrie différentielle à balayage.

1. EFFETS DE LA VITESSE DE CONGÉLATION

La technique de congélation rapide utilisée jusqu'à présent consiste à immerger directement les ampoules cryobiologiques contenant les massifs d'embryoïdes dans l'azote liquide; elle permet d'atteindre la température de -196°C en environ une minute. Cette méthode est comparée avec une congélation en deux étapes : la première est un refroidissement contrôlé, réalisé au moyen d'un congélateur programmable, jus-

.../...

qu'à une température de prérefroidissement déterminée; la deuxième est un refroidissement non contrôlé, effectué en immergeant les ampoules prérefroidies dans l'azote liquide. Pour le refroidissement contrôlé, différentes vitesses de congélation, couvrant pratiquement les possibilités offertes par le Minicool, ont été utilisées : 0,5; 1; 5; 10; 20 et $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Le programme utilisé est détaillé dans le chapitre "MATÉRIEL et TECHNIQUES", p.38, Figure 6. Les massifs d'embryoïdes, après un prétraitement de 7 jours sur le milieu standard additionné de 0,75M de saccharose, sont prérefroidis de $+20^{\circ}\text{C}$ à -100°C aux différentes vitesses indiquées précédemment. Après un palier de 10 minutes à cette température (-100°C), les ampoules sont immergées pendant une heure dans l'azote liquide. Après le réchauffement, les massifs d'embryoïdes sont post-traités selon la technique décrite dans le chapitre précédent, c'est-à-dire en présence de 10^{-6}M de 2,4-D pendant 3 semaines avant d'être repiqués en conditions standard. Cet essai a été réalisé avec les clones BC 068 et BC 156; le nombre de massifs traités varie de 43 à 48 selon les conditions. Dans l'expression des résultats, la congélation rapide correspond à une vitesse de refroidissement de $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les résultats concernant la survie et la reprise des embryoïdes des deux clones après congélation sont présentés dans la Figure 34.

1.1. SURVIE

Le taux de survie des embryoïdes du clone BC 068 après une congélation à -196°C varie de 58 % à 80 % environ. La congélation rapide ($200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) choisie comme référence, qui a été utilisée dans les chapitres précédents, a donné un taux de survie de 80 %. Seules quelques différences significatives (test de χ^2 , $p = 0,05$) ont été obtenues par rapport à la vitesse de congélation la plus lente ($0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Pour des refroidissements plus rapides, entre 1 et $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, les taux de survie demeurent supérieurs à 63 %.

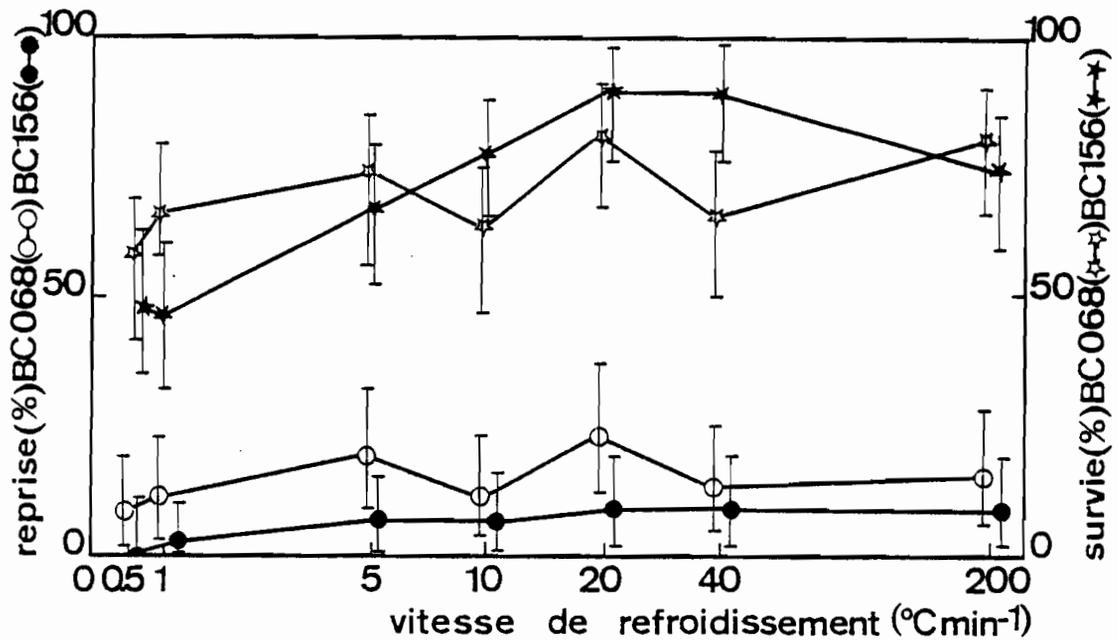


Fig. 34 : Effets de la vitesse de refroidissement ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) sur la survie (\star, \star) et la reprise de la prolifération (O, \bullet) de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (\star, O) et BC 156 (\star, \bullet). 43 à 48 massifs d'embryoïdes ont été utilisés par condition. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages de survie et de reprise.

Avec le clone BC 156, les écarts sont plus marqués entre les taux de survie obtenus pour les refroidissements lents (48 % pour $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ et 46 % pour $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) et les refroidissements les plus rapides, de 10 à $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, qui assurent des taux de survie variant de 75 à 79 %. Les différences observées entre ces deux groupes de résultats, refroidissements lents et refroidissements plus rapides, sont significatives (χ^2 , $p = 0,05$).

Pour une vitesse de refroidissement donnée, la comparaison entre clones des taux de survie obtenus ne fait apparaître aucune différence significative (test χ^2), que le refroidissement soit lent ou rapide.

1.2. REPRISE

Pour le clone BC 068, une reprise de la prolifération est obtenue dans tous les cas. Elle varie de 9,3 % après une congélation de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ à 22,9 % pour une descente en température de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les différences observées entre les résultats obtenus ne sont pas significatives (test χ^2 , $p = 0,05$). Pour cette expérience, le taux de reprise chez le clone BC 068 semble donc indépendant de la vitesse de refroidissement.

Dans le cas du clone BC 156, aucune reprise de l'embryogenèse n'est obtenue lorsque les massifs d'embryoïdes sont congelés à la vitesse de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; le pourcentage de reprise est faible pour un refroidissement de $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (2,1 %); il augmente ensuite pour se stabiliser à 8,33 % pour des vitesses de congélation de 20; 40 et $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les résultats obtenus avec les refroidissements les plus rapides, 20; 40 et $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ sont significativement différents du taux de reprise observé avec la vitesse de congélation la plus lente, soit $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

.../...

La comparaison des taux de reprise obtenus au cours de cette expérimentation fait ressortir des différences importantes entre les deux clones, BC 068 et BC 156 (15 % pour le premier clone en moyenne, toutes conditions confondues, et 6 % en moyenne pour le second). Cette différence de comportement en faveur du clone BC 068 se manifeste quelle que soit la vitesse de refroidissement.

Si l'on compare les taux de survie et les taux de reprise pour chacun des deux clones étudiés en fonction de la vitesse de congélation (Figure 34), les courbes représentant les variations des taux de survie et de reprise de chaque clone ont des tracés pratiquement parallèles : la différence entre les taux de survie et de reprise reste sensiblement constante quelle que soit la vitesse de refroidissement; elle est d'environ 55 % pour le clone BC 068 et de 62 % pour le clone BC 156. Les taux de survie étant quasiment les mêmes pour les deux clones, les taux de reprise du clone BC 156 apparaissent ainsi inférieurs à ceux obtenus avec le clone BC 068.

1.3. COMPORTEMENT ULTÉRIEUR DES MASSIFS

L'évolution des massifs congelés a été étudiée pendant les 11 semaines qui suivent le réchauffement. Deux paramètres ont été retenus pour apprécier l'intensité de la reprise de la prolifération : le nombre de tubes de culture utilisés au moment des repiquages et le nombre de massifs ayant présenté une reprise de l'embryogenèse adventive 5;7 et 11 semaines après le réchauffement. Le nombre de tubes utilisés au moment des repiquages dépend en effet de la masse de matériel régénéré à partir des massifs congelés. Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableaux 24 (clone BC 068) et 25 (clone BC 156). Dans le cas du clone BC 068 (Tableau 24), une reprise de la prolifération est observable 5 semaines après la décongélation, quelle que soit la vitesse de refroidissement. Après 11 semaines de

	Vitesse de refroidissement ($^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$)							
	0,5	1	5	10	20	40	200	
Nombre de massifs congelés	43	44	47	46	48	46	46	
	2	1	3	3	3	1	4	
	AL + 5 sem	(2T)	(1T)	(3T)	(3T)	(3T)	(1T)	(4T)
Nombre de massifs ayant proliféré et nombre de tubes utilisés en fonc- tion de la durée de culture	AL + 7 sem	(4T)	(4T)	(11T)	(4T)	(14T)	(2T)	(6T)
	AL + 11 sem	4	5	9	5	11	6	7
		(5T)	(5T)	(13T)	(7T)	(18T)	(10T)	(10T)

Tabl. 24 : Evolution du nombre de massifs du clone BC 068 ayant montré une reprise de l'embryogenèse, 5, 7 et 11 semaines après le réchauffement et de l'intensité de la reprise, représentée par le nombre T de tubes de culture (entre parenthèses) utilisés à chaque repiquage, en fonction de la vitesse de congélation.

	Vitesse de refroidissement ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)							
	0,5	1	5	10	20	40	200	
Nombre de massifs congelés	48	48	48	48	48	48	48	
					1	1	1	
AL + 5 sem	0	0	0	0	(1T)	(1T)	(1T)	
Nombre de massifs ayant proliféré et nombre de tubes utilisés en fonc- tion de la durée de culture	AL + 7 sem	0	0	0	(2T)	(3T)	(4T)	(1T)
	AL + 11 sem	0	1	3	3	4	4	3
			(1T)	(3T)	(3T)	(5T)	(6T)	(3T)

Tabl. 25 : Evolution du nombre de massifs du clone BC 156 ayant montré une reprise de l'embryogenèse, 5, 7 et 11 semaines après le réchauffement et de l'intensité de la reprise, représentée par le nombre T de tubes de culture (entre parenthèses) utilisés à chaque repiquage, en fonction de la vitesse de congélation.

culture, on observe que, par rapport au nombre de massifs qui ont proliféré, le nombre de tubes nécessaires pour le repiquage est plus élevé pour des vitesses de congélation supérieures à $1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, ce qui traduit une intensité plus grande de reprise de l'embryogenèse somatique. Ainsi, après une congélation à $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, 11 massifs sur les 48 congelés ont proliféré; le repiquage de la masse des embryoïdes néoformés à partir de ces massifs nécessite 18 tubes de culture. Par contre, après une congélation de $1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, 5 massifs ont proliféré, mais 5 tubes seulement sont nécessaires pour le repiquage des embryoïdes issus de leur prolifération. Même si le taux de reprise des massifs congelés du clone BC 068 ne varie pas de manière significative avec la vitesse de refroidissement dans cette expérimentation, l'intensité de la reprise de l'embryogenèse est différente selon les conditions et apparaît plus importante pour des vitesses de refroidissement supérieures ou égales à $5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

Pour le clone BC 156 (Tableau 25) une reprise de la prolifération n'est observée 5 semaines après le réchauffement que pour des vitesses de congélation élevées (20; 40 et $200^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$). Ce n'est que 11 semaines après la décongélation que la reprise de l'embryogenèse est visible, chaque fois qu'elle a pu être obtenue. L'intensité de la reprise est très faible, puisqu'après 11 semaines de culture, pour la meilleure condition, soit une congélation à $40^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, le repiquage des 4 massifs qui ont proliféré ne nécessite que 6 tubes de culture.

La reprise de la prolifération est donc plus rapide pour le clone BC 068 que pour le clone BC 156. De plus, l'intensité de la reprise est plus importante pour le clone BC 068 que pour le clone BC 156.

Pour les deux clones, la reprise de la prolifération se fait plus facilement si la congélation des embryoïdes a été réalisée à des vitesses supérieures ou égales à $5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$. Ce résultat pourrait être mis en rapport avec la manière dont se

		Vitesse de refroidissement ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)						
		0,5	1	5	10	20	40	200
		9,3	11,4	19,1	10,9	22,9	13,0	15,2
		(43)	(44)	(47)	(46)	(48)	(46)	(46)
	Taux de							
CLONE	reprise par	4,7	0	28,6	20,6	26,7	23,1	30,0
	expérience	(21)	(20)	(7)	(10)	(15)	(13)	(10)
BC068	%							
					11,5			19,0
					(26)			(26)
	Taux de re-	7,8	7,8	20,3	12,2	23,8	15,2	18,2
	prise moyen							
	(%)	(2-18)	(2-18)	(10-34)	(7,5-22)	(14-26)	(7-26)	(10-28)
		0	2,1	6,3	6,3	8,3	8,3	8,3
CLONE	Taux de	(48)	(48)	(48)	(48)	(48)	(48)	(48)
BC156	reprise par							
	expérience	3		9,4			9,4	7,7
	%	(33)		(32)			(32)	(39)
	Taux de re-	1,2	2,1	7,6	6,3	8,3	8,6	8,1
	prise moyen							
	(%)	(0-4)	(0-10)	(2-17)	(1-16)	(2-20)	(3-18)	(3-15)

Tabl. 26 : Pourcentages de reprise de la prolifération d'embry-
oïdes des clones BC 068 et BC 156 après congélation en fonction
de la vitesse de refroidissement. Chaque ligne correspond à une
série d'expériences différentes. Pour chaque expérience, l'effec-
tif utilisé est indiqué entre parenthèses. Le taux de reprise
moyen pour chaque vitesse de congélation est indiqué avec son
intervalle de confiance.

fait la reprise de la prolifération, et en particulier avec l'importance relative des tissus ayant résisté à la congélation. En effet, pour des vitesses de refroidissement inférieures à $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, la reprise de l'embryogenèse adventive s'effectue à partir de zones très localisées des massifs congelés. Pour des refroidissements plus rapides, au contraire, une fraction plus importante des massifs semble être à l'origine de la reprise de l'embryogenèse.

Pour certaines vitesses de congélation, les expérimentations ont été renouvelées plusieurs fois, afin de juger de la reproductibilité des résultats. Les taux de reprise obtenus avec les deux clones au cours de ces différentes expériences sont indiqués dans le Tableau 26. L'examen de ce tableau confirme les résultats précédents : avec des vitesses de refroidissement faibles ($0,5$ et $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) les taux de reprise sont inférieurs à ceux obtenus avec des vitesses de congélation égales ou supérieures à $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, aussi bien pour le clone BC 068 que pour le clone BC 156. Le clone BC 156 semble plus sensible à la congélation que le clone BC 068 qui présente des pourcentages de reprise supérieurs dans toutes les conditions expérimentales. Le taux de reprise de la prolifération des massifs d'embryoïdes des deux clones semble donc dépendre de la vitesse de congélation.

2. EFFETS DE LA TEMPÉRATURE DE PRÉREFROIDISSEMENT

Dans cette expérience, les embryoïdes des clones BC 068 et BC 156 sont refroidis de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à diverses températures, -20°C , -40°C ou -100°C . Ils sont ensuite soit congelés dans l'azote liquide, soit réchauffés directement. Le réchauffement est dans les deux cas effectué rapidement.

../...

20 à 23 massifs d'embryoïdes ont été utilisés par condition expérimentale. La Figure 35 représente les résultats concernant les taux de survie des massifs des clones BC 068 (A) et BC 156 (B), la Figure 36 les résultats relatifs aux taux de reprise des massifs des clones BC 068 (A) et BC 156 (B).

Une étude préalable, qui sera reprise dans le paragraphe suivant, a montré que la cristallisation dans les massifs d'embryoïdes se produit en général au-dessus de -20°C , bien que des températures de cristallisation inférieures aient parfois été enregistrées. Après les différents prérefroidissements utilisés dans cette expérimentation, la cristallisation a donc généralement déjà eu lieu.

2.1. SURVIE

Pour le clone BC 068 (Figure 35 A), le taux de survie des massifs prérefroidis puis réchauffés sans congélation dans l'azote liquide diminue avec la température de prérefroidissement : il est de 90,9 % pour un prérefroidissement de -20°C , de 25 et de 20 % seulement si l'on descend jusqu'à -40 et -100°C . La congélation dans l'azote liquide abaisse le pourcentage de survie des massifs prérefroidis jusqu'à -20°C à 47,6 %. Par contre, le taux de survie des massifs congelés dans l'azote après un prérefroidissement jusqu'à -100°C est de 40 %, soit deux fois plus élevé que celui de massifs prérefroidis à cette température mais non congelés dans l'azote liquide.

Dans le cas du clone BC 156 (Figure 35 B), les taux de survie des embryoïdes, qui ne dépassent pas 30,4 %, ne paraissent pas sensiblement modifiés par la congélation à -196°C . Ainsi, après un prérefroidissement jusqu'à -40°C , le taux de survie est de 4,8 % après un réchauffement direct et de 4,5 %

../...

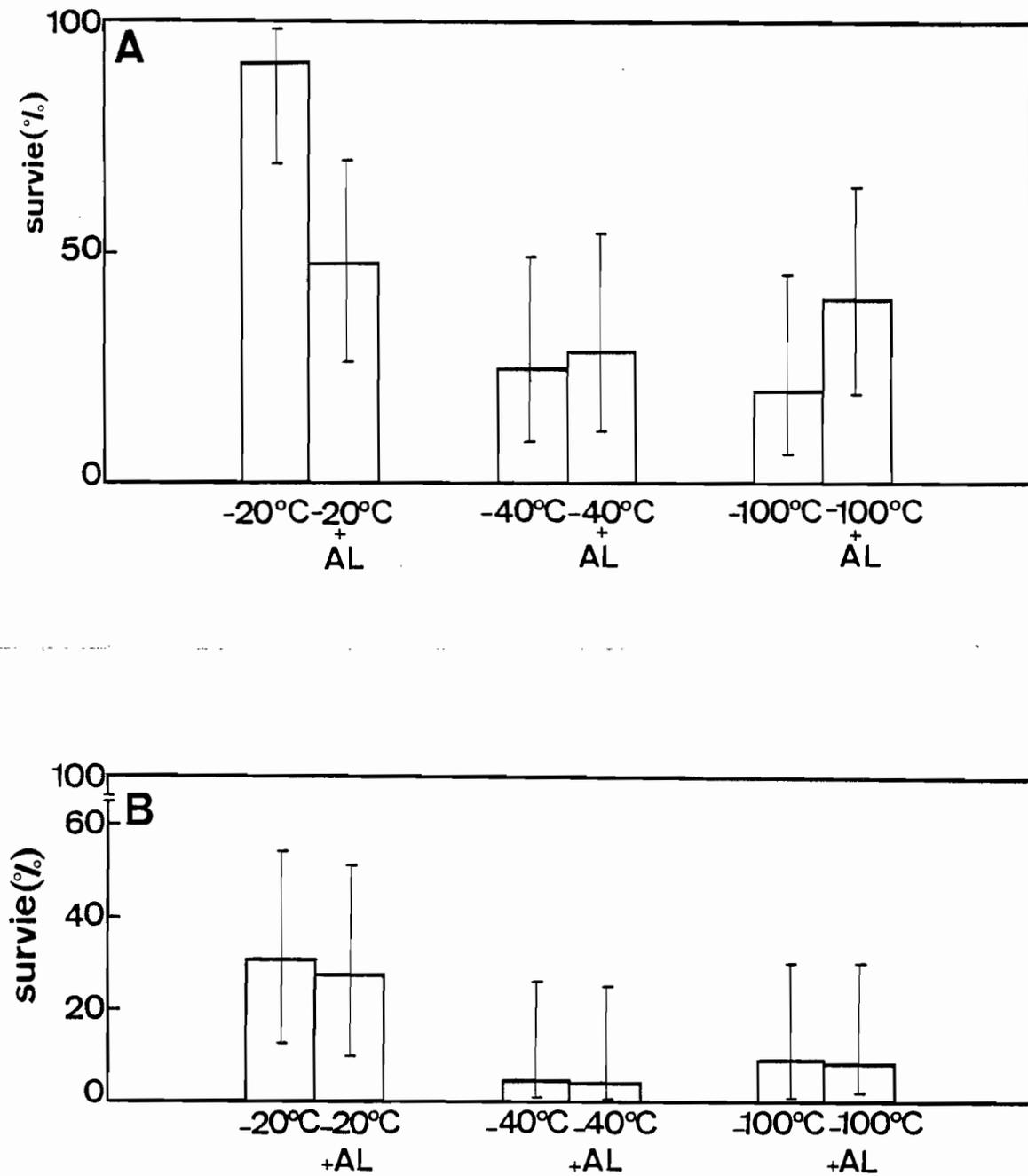


Fig. 35 : Pourcentages de survie de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (A) et BC 156 (B) refroidis à $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à différentes températures (-20°C , -40°C ou -100°C) puis congelés dans l'azote liquide (+AL) ou réchauffés directement. Les traits verticaux correspondent aux intervalles de confiance des pourcentages. 20 à 23 massifs ont été utilisés par condition.

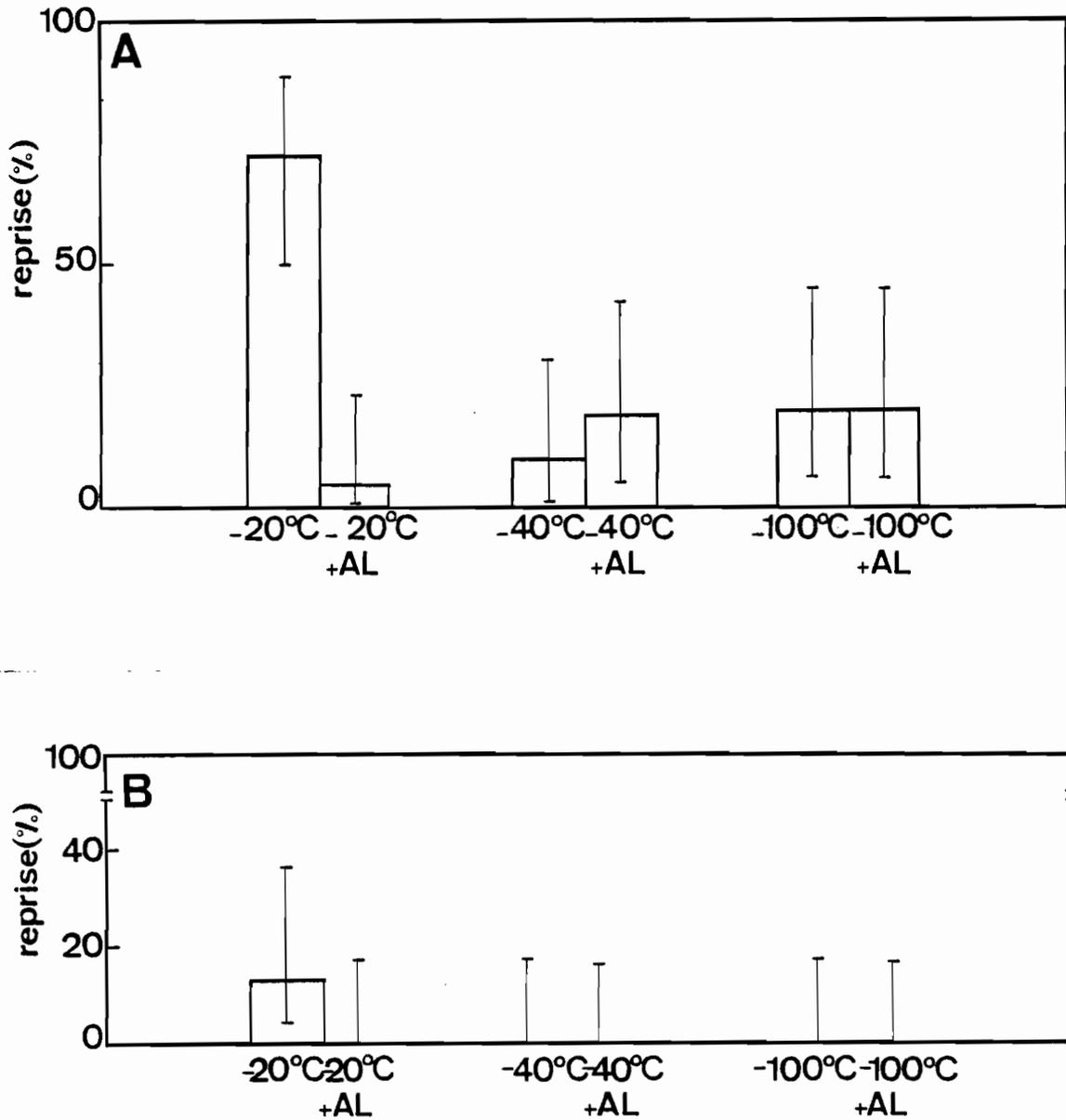


Fig. 36 : Pourcentages de reprise de la prolifération de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (A) et BC 156 (B) refroidis à $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à différentes températures (-20°C , -40°C ou -100°C) puis congelés dans l'azote liquide (+AL) ou réchauffés directement. Les traits verticaux correspondent aux intervalles de confiance des pourcentages. 20 à 23 massifs ont été utilisés par condition.

après congélation dans l'azote liquide. Pour ce clone, un abaissement de 20°C de la température de prérefroidissement (de - 20°C à - 40°C) provoque une diminution importante du taux de survie.

Les possibilités de survie des massifs du clone BC 068 sont toujours supérieures à celles des massifs du clone BC 156. Pour les deux clones, les différents prérefroidissements entraînent des nécroses qui affectent tous les massifs. Ces nécroses sont d'autant plus importantes que la température de prérefroidissement est plus basse. Enfin, la reprise de croissance des massifs au cours des trois semaines du post-traitement paraît améliorée par une congélation à - 196°C, sauf dans le cas des massifs du clone BC 068 prérefroidis jusqu'à - 20°C, pour lesquels l'azote liquide semble avoir un effet défavorable sur la croissance.

2.2. REPRISE

Dans le cas du clone BC 068 (Figure 36 A), le taux de reprise des embryoïdes refroidis puis réchauffés immédiatement diminue avec la température de prérefroidissement : égal à 72,7 % après un prérefroidissement jusqu'à - 20°C, il diminue jusqu'à 10 % ou 20 % pour des prérefroidissements jusqu'à - 40°C ou - 100°C.

Au contraire, après congélation dans l'azote liquide, le taux de reprise des embryoïdes augmente avec l'importance du prérefroidissement : égal à 4,7 % pour un prérefroidissement jusqu'à - 20°C, il atteint respectivement 19 et 20 % pour des prérefroidissements jusqu'à - 40°C et - 100°C. Les embryoïdes refroidis jusqu'à - 20°C (sans congélation dans l'azote liquide) semblent proliférer de manière beaucoup plus importante que les massifs refroidis à la même température et congelés à - 196°C. Au contraire, dans les deux autres conditions, soit des prérefroidissements jusqu'à - 40°C ou - 100°C, il paraîtrait qu'un phénomène inverse puisse être observé : les embryoïdes refroidis

puis congelés dans l'azote liquide présenteraient une prolifération plus importante que celle des massifs qui ont été seulement prérefroidis. D'autre part, il semblerait également que les embryoïdes congelés dans l'azote liquide prolifèrent autant, quelle que soit la température de leur prérefroidissement, alors que l'importance de la reprise décline avec la température de prérefroidissement chez les embryoïdes réchauffés directement.

Avec le clone BC 156 (Figure 36 B), une reprise de la prolifération n'a été obtenue qu'après un prérefroidissement jusqu'à -20°C , non suivi d'une congélation jusqu'à -196°C . Dans tous les autres cas, le taux de reprise de l'embryogenèse est nul, que les massifs aient ou non été congelés dans l'azote liquide.

La résistance à la congélation des embryoïdes du clone BC 156 est donc dans tous les cas inférieure à celle des embryoïdes du clone BC 068, pour une vitesse de prérefroidissement de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

3. ÉTUDE DU REFROIDISSEMENT ET DE LA CRISTALLISATION DANS LES MASSIFS D'EMBRYOÏDES

3.1. ANALYSE THERMIQUE SIMPLE

Les enregistrements des courbes de refroidissement des massifs d'embryoïdes à différentes vitesses sont représentés sur les figures 37, 38 et 39. Ils ont été réalisés à l'aide d'un thermocouple en cuivre-constantan d'un diamètre d'environ 0,2mm dont l'extrémité est introduite dans un massif placé dans un tube de référence (cf. MATERIEL et TECHNIQUES, Figure 5 p.36).

Lors d'une congélation rapide (Figure 37), la température passe de $+20^{\circ}\text{C}$ à -100°C en 20 secondes environ puis de -100°C

../...

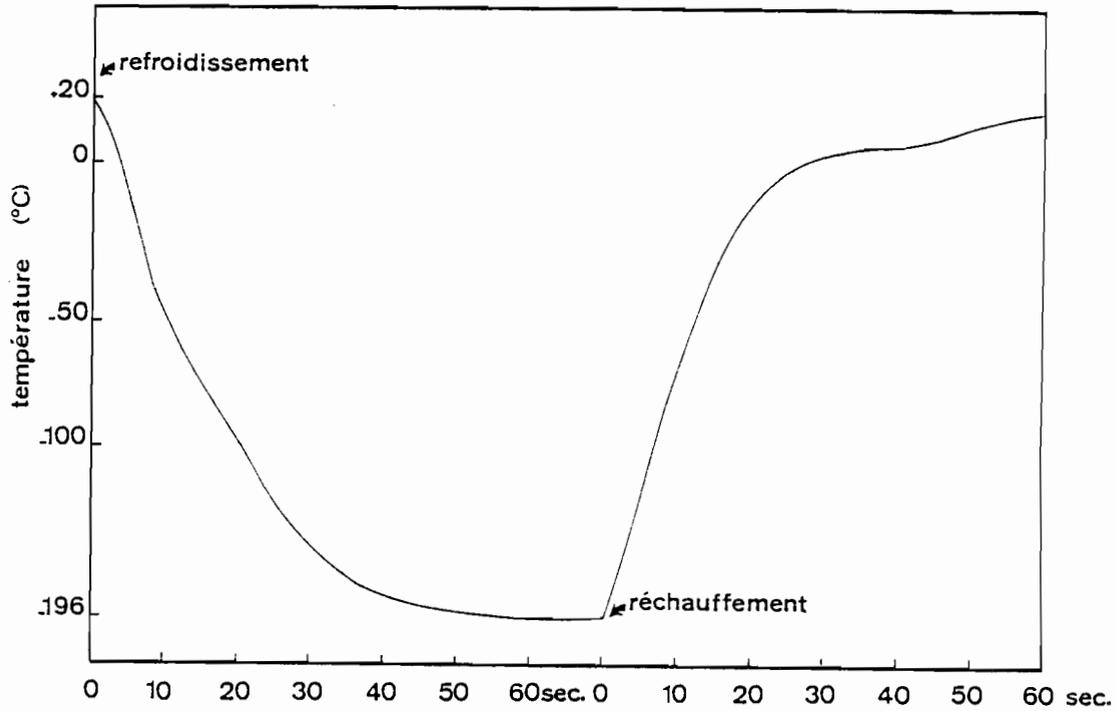


Fig. 37 : Courbe de refroidissement et de réchauffement enregistrée par analyse thermique simple d'un massif d'embryoïdes placé dans un tube cryobiologique immergé directement dans l'azote liquide (refroidissement rapide) puis dans un bain-marie thermostaté à +40°C (réchauffement rapide).

à -196°C en 40 secondes. On n'observe pas d'exotherme (pics de surfusion) ni de plateau de cristallisation en raison de la vitesse de refroidissement élevée et de la dimension réduite des massifs. Sur la figure 37, la courbe de réchauffement rapide d'un échantillon est également représentée : la température remonte de -196°C à 0°C en environ 30 secondes puis atteint 25°C après 30 secondes supplémentaires. Le temps nécessaire pour atteindre 0°C varie en fonction de la taille de l'échantillon mais au cours de tous les réchauffements enregistrés, des températures positives ont toujours été atteintes en moins d'une minute.

Pour des refroidissements plus lents, de 10 ; 20 et $40^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ jusqu'à -100°C (Figure 38), les tracés obtenus diffèrent sensiblement. Du fait de l'inertie thermique due au tube cryobiologique, au massif d'embryoïdes et à la congélation dans l'air, la température finale de prérefroidissement n'est plus atteinte au temps théorique de fin de congélation. Ainsi, le refroidissement d'un massif jusqu'à -100°C à la vitesse de $20^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ devrait prendre 6 minutes, or la température de -100°C n'est atteinte qu'au bout de 10 minutes. Pour les vitesses de refroidissement considérées, un pic de surfusion est observé, dont l'amplitude augmente avec la diminution de la vitesse de refroidissement.

Pour des vitesses de refroidissement de $0,5$; 1 et $5^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ jusqu'à -100°C (Figure 39), l'allure générale des courbes n'est pas modifiée par la cristallisation : la vitesse de refroidissement reste constante avant et après la cristallisation.

Les tableaux 27 et 28 indiquent les températures de nucléation (fin de la surfusion) et l'importance de la remontée en température produite par la cristallisation dans des massifs du clone BC 068 (Tableau 27) et BC 156 (Tableau 28) pendant des congélations effectuées à différentes vitesses.

La température de nucléation dans les massifs d'embryoïdes varie entre -12°C et -24°C . Ces variations importantes peuvent

../...

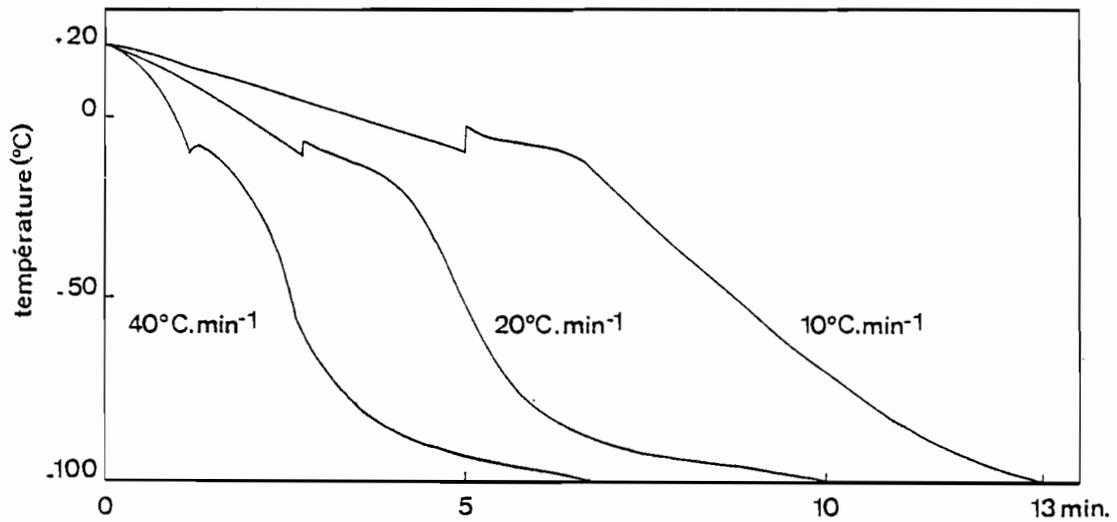


Fig. 38 : Courbes de refroidissement à 10, 20 et 40°C.min⁻¹ enregistrées par analyse thermique simple, lors de la congélation programmée de massifs d'embryoïdes de +20°C à -100°C.

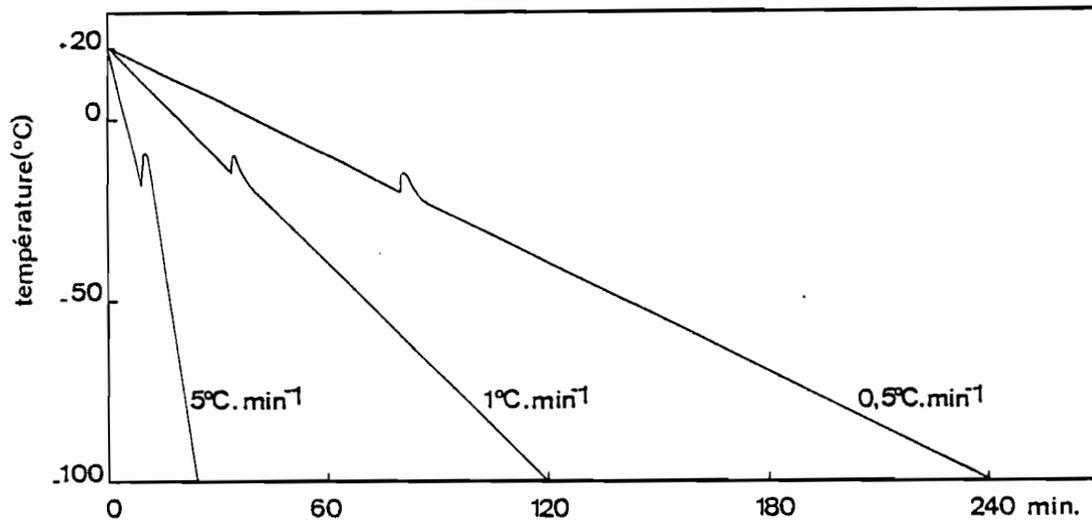


Fig. 39 : Courbes de refroidissement à 0,5, 1 et 5°C.min⁻¹ enregistrées par analyse thermique simple, lors de la congélation programmée de massifs d'embryoïdes de +20°C jusqu'à -100°C.

être dûes à différents facteurs : hétérogénéité du matériel, taille de l'échantillon, teneur en eau, place du thermocouple dans le massif, inertie du thermocouple et position du massif dans le tube de référence. D'une façon générale, l'augmentation de la vitesse de congélation provoque une nucléation à des températures élevées et diminue l'amplitude de l'exotherme. Ce dernier phénomène résulte d'un apport accru de frigories (calories négatives) et d'une accentuation des gradients thermiques internes qui se créent lorsque des vitesses de congélation élevées sont utilisées.

3.2. ANALYSE MICROCALORIMÉTRIQUE DIFFÉRENTIELLE A BALAYAGE

L'étude de la cristallisation dans les massifs d'embryoïdes au cours de leur congélation a été complétée par l'utilisation de la technique de microcalorimétrie différentielle à balayage (cf. MATERIEL et TECHNIQUES p.43). Une seule série de mesures a pu être réalisée. Les résultats décrits dans ce paragraphe correspondent donc à une étude préliminaire. Il nous a néanmoins paru important de présenter ces résultats compte-tenu des perspectives offertes par cette technique. Elle permet l'observation des profils de cristallisation de l'eau contenue dans le matériel, lorsque l'on travaille en refroidissement et celle des profils de fusion de la glace, lorsqu'on travaille en réchauffement. Les valeurs des températures de début et de fin de cristallisation ne reflètent pas forcément la réalité du phénomène observé : elles sont en effet fonction de la vitesse de descente ou de remontée de la température. Elles ne permettent de déterminer la température réelle de nucléation que pour des refroidissements très lents, c'est-à-dire ne dépassant pas $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. On peut néanmoins, pour une vitesse donnée, comparer l'énergie dégagée pendant la cristallisation de l'eau tissulaire par des massifs d'embryons ayant subi des prétraitements différents.

.../...

	Vitesse de congélation ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)						
	0,5	1	5	10	20	40	200
Température de nucléation ($^{\circ}\text{C}$)	-17	-15	-12	-18,5	-14,5	-24	
$\Delta\theta$ ($^{\circ}\text{C}$)	+ 5,5	+ 5	+ 2	+ 2,5	+ 1,5	+ 1	

Tabl. 27 : Variations de la température de nucléation (fin de la surfusion) et remontée de la température ($\Delta\theta$) enregistrées dans le massif de référence lors de la congélation de massifs d'embryoïdes du clone BC 068.

	Vitesse de congélation ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)						
	0,5	1	5	10	20	40	200
Température de nucléation ($^{\circ}\text{C}$)	-21,6	-15,5	-18,5	-13	-10,5	-13,5	
$\Delta\theta$ ($^{\circ}\text{C}$)	+ 7,1	+ 5,5	+10	+ 7,5	+ 3	+ 2	

Tabl. 28 : Variations de la température de nucléation (fin de la surfusion) et remontée de la température ($\Delta\theta$) enregistrées dans le massif de référence lors de la congélation de massifs d'embryoïdes du clone BC 156.

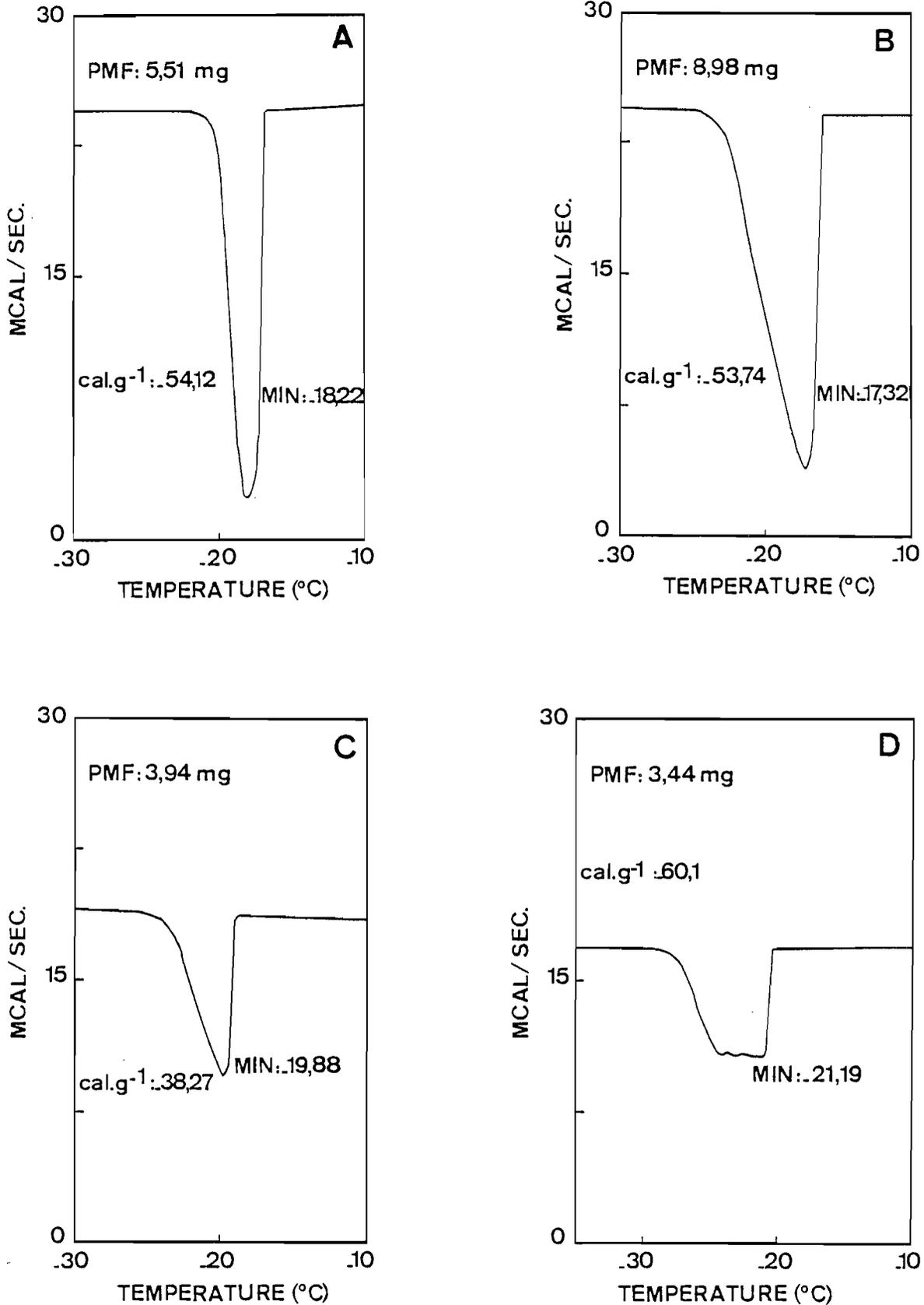


Fig. 40 : Courbes de cristallisation obtenues en microcalorimétrie différentielle à balayage lors du refroidissement à $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 en fonction de la teneur en saccharose de leur milieu de culture : A : 0,1M ; B et D : 0,3M ; C : 0,75M. Le poids des massifs (PMF), la température minimale atteinte lors de la cristallisation (MIN), ainsi que l'énergie dégagée ($\text{cal}\cdot\text{g}^{-1}$) sont indiqués sur chacune des courbes.

En effet, l'énergie dégagée ou absorbée lors d'un changement de phase ne varie pas en fonction de la vitesse de réchauffement ou de refroidissement. Cette technique permet donc des mesures quantitatives de l'énergie dégagée au moment de la cristallisation de l'eau aux températures auxquelles se produisent le ou les exothermes.

Les résultats présentés ici ont été obtenus avec des massifs d'embryoïdes du clone BC 068 prélevés après deux mois de culture sur le milieu standard (0,1M de saccharose) ou sur le milieu d'obtention des massifs destinés à la congélation (0,3M de saccharose), ou bien après 3 ou 7 jours de culture sur le milieu de prétraitement (0,75M de saccharose). La vitesse de refroidissement ou de réchauffement utilisée a été de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$. La figure 40 donne des vues partielles des courbes représentant les variations d'enthalpie pendant le refroidissement des embryoïdes de $+ 20^{\circ}\text{C}$ à $- 50^{\circ}\text{C}$. Un seul pic de cristallisation est généralement observé quelle que soit l'origine des embryoïdes : 2 mois de culture sur 0,1M (A) ou 0,3M (B) de saccharose; 7 jours de préculture sur 0,75M de saccharose (C). Certains enregistrements présentent des profils plus complexes : ainsi, sur la figure 40 (D) le pic de cristallisation est beaucoup plus étalé; il représente certainement plusieurs cristallisations successives, chacune correspondant à l'un des quatre embryons bien individualisés constituant le massif. Au moment du réchauffement (Figure 41) il se produit également un pic inversé par rapport aux précédents (endotherme), qui correspond à la fusion de la glace. Le maximum est atteint pour une température légèrement positive ($+ 4,5^{\circ}\text{C}$). Ce décalage vers les températures supérieures à 0°C est dû à la vitesse de réchauffement relativement rapide ($10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$). L'endotherme obtenu présente un profil plus complexe que celui de l'exotherme enregistré pendant la congélation : le pic principal est en effet suivi d'un pic secondaire qui apparaît sous la forme d'un épaulement (Figure 41).

.. / ...

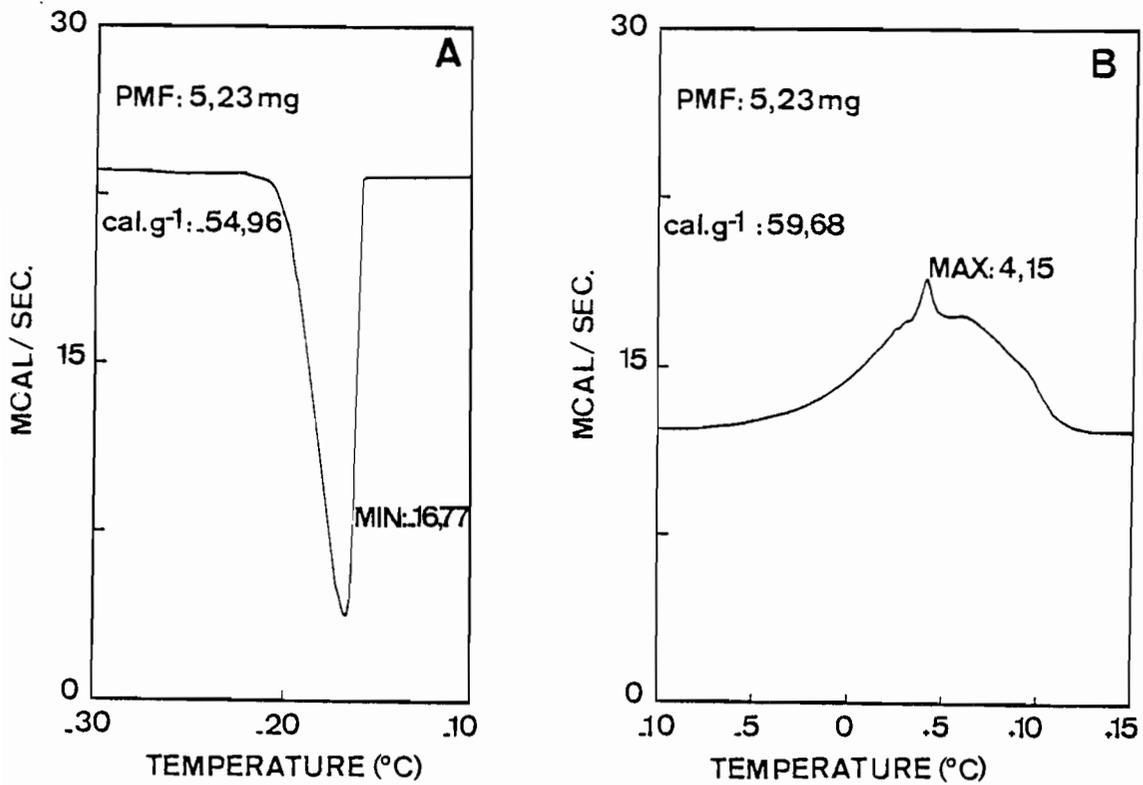


Fig. 41 : Courbe de cristallisation (A) obtenue en microcalorimétrie différentielle à balayage lors du refroidissement à $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ d'un massif d'embryoïdes du clone BC 068 prélevé sur un milieu contenant 0,3M de saccharose et courbe obtenue lors du réchauffement du même massif à $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (B). Le poids du massif (PMF), la température minimale atteinte lors de la cristallisation (MIN), la température maximale atteinte lors du réchauffement (MAX) ainsi que l'énergie dégagée ou absorbée ($\text{cal}\cdot\text{g}^{-1}$) sont indiqués sur chaque courbe.

L'intégration des pics obtenus permet de calculer l'énergie libérée ou absorbée au moment des changements d'état. Les différents résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 29. Sont indiquées les valeurs moyennes de la température du pic de cristallisation et celles de l'énergie dégagée lors du changement de phase. La teneur moyenne en eau cristallisable des massifs est estimée à partir de l'énergie libérée pendant la cristallisation ou absorbée au moment de la fusion de la glace.

La température correspondant à l'extremum du pic de cristallisation varie en fonction de l'origine des embryons : elle décroît avec l'augmentation de la teneur en saccharose dans le milieu de culture : $- 17,3^{\circ}\text{C}$ pour des embryons cultivés pendant deux mois sur un milieu contenant $0,1\text{M}$ de saccharose, à $- 21^{\circ}\text{C}$ pour des embryons en fin de prétraitement. Il en est de même pour l'énergie dégagée lors de la cristallisation de l'eau dans les massifs : 55 cal.g^{-1} en moyenne pour les massifs prélevés sur des milieux contenant $0,1\text{M}$ ou $0,3\text{M}$ de saccharose contre environ 38 cal.g^{-1} pour les massifs en cours de prétraitement sur un milieu contenant $0,75\text{M}$ de saccharose. L'énergie absorbée par la fusion de la glace a été mesurée dans le cas de massifs cultivés pendant 3 et 7 jours sur le milieu de prétraitement. Elle est sensiblement égale à l'énergie dégagée lors de la cristallisation de massifs cultivés dans les mêmes conditions.

Les résultats rendent compte de la déshydratation des massifs lorsqu'ils sont placés sur le milieu de prétraitement. A partir de ces données il est possible d'estimer la teneur en eau libre qui cristallise en divisant les différentes énergies mesurées par la chaleur spécifique de cristallisation de l'eau ($79,78 \text{ cal.g}^{-1}$). Un calcul identique peut être fait pour déterminer la quantité d'eau formée lors de la fusion de la glace, sachant que la chaleur spécifique de fusion de la glace est de $79,72 \text{ cal.g}^{-1}$. Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans la dernière colonne du tableau 29. La quantité d'eau qui cristallise diminue avec l'augmentation de la teneur en sucre dans

.../...

	Conditions de culture des massifs	Température (°C) moyenne de cristallisation	Energie moyenne dégagée par la cristallisation (cal.g ⁻¹)	Teneur moyenne des massifs en eau cristallisable (% du PMF)
Refroidissement (10°C min ⁻¹)	Saccharose 0,1 M	-17,3 ± 0,6 (4)	52,9 ± 8,9	66,3
	Saccharose 0,3 M	-18,4 ± 2,4 (8)	57,0 ± 2,0	71,3
	3 jours sac- charose 0,75M	-21,7 ± 0,6 (4)	39,8 ± 4,6	49,9
	7 jours sac- charose 0,75M	-20,7 ± 1,1 (5)	37,2 ± 1,9	46,6
	3 jours sac- charose 0,75M		36,9 ± 2,2 (2)	46,3
Réchauffement (10°C min ⁻¹)	7 jours sac- charose 0,75M		35,9 ± 0,9 (5)	45,1

Tabl. 29 : Valeurs moyennes, avec indication des écarts-types, des températures de cristallisation enregistrées avec un micro-calorimètre différentiel à balayage lors de la congélation de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 en fonction de la teneur en saccharose des milieux de culture. L'énergie dégagée (refroidissement) ou absorbée (réchauffement) lors du changement d'état de l'eau ou de la glace dans les massifs est exprimée en cal.g⁻¹. La teneur en eau cristallisable, calculée à partir de l'intégration des pics, est donnée par rapport au poids de matière fraîche des massifs. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de mesures effectuées dans chaque condition.

		Teneur en eau totale % du PMF	Teneur en eau cristallisable % de l'eau totale	Teneur en eau non cristallisable % de l'eau totale
Conditions de culture des massifs	2 mois saccharose 0,1 M	90,6	73,7	26,3
	2 mois saccharose 0,3 M	80,8	89,1	10,9
	3 jours saccharose 0,75 M	67,1	72,7	27,3
	7 jours saccharose 0,75 M	65,1	70,5	29,5

Tabl. 30 : Teneur en eau cristallisable et non cristallisable de massifs d'embryoïdes du clone BC 068 en fonction de la concentration en saccharose de leur milieu de culture (0,1M ou 0,3M) et de préculture (0,75M). Ces valeurs sont calculées à partir de la teneur en eau totale des massifs, exprimée en pourcentage de leur poids de matière fraîche, mesurée dans le chapitre III, p. 92 et des résultats du Tableau 29, p.176.

le milieu de culture : elle est respectivement de 66,3 et de 71,3 % pour des embryons cultivés deux mois sur 0,1M et 0,3M de saccharose, contre seulement environ 48 % pour des massifs d'embryons en cours de prétraitement. La similitude (au signe près) des valeurs obtenues au moment du réchauffement et de la cristallisation confirme le fait que l'eau des massifs cristallise en une seule fois. Ce résultat rejoint ceux obtenus en analyse thermique simple.

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus dans le chapitre III, qui sont repris dans le tableau 30, on constate que les valeurs données par la microcalorimétrie différentielle sont nettement inférieures à celles obtenues après étuvage des massifs à 105°C. Cette dernière technique fournit la teneur en eau totale des massifs, alors que la quantité d'eau qui cristallise mesurée par microcalorimétrie différentielle correspond à la teneur en eau libre. On peut, à partir de ces données, calculer, pour chaque condition de culture des embryoïdes, les pourcentages de l'eau totale présente dans les massifs sous forme "libre" et sous forme "liée", c'est-à-dire non cristallisable à la température à laquelle se produit l'exotherme (Tableau 30). Les valeurs obtenues pour l'eau "liée" varient entre 10,9 % et 29,5 % de l'eau totale, selon les conditions. Le résultat obtenu avec des embryoïdes prélevés sur un milieu contenant 0,3M de saccharose (10,9 %) paraît anormal; il pourrait être dû à l'hétérogénéité du matériel et au petit nombre de mesures réalisées. Les valeurs présentées dans le tableau 30 sembleraient indiquer une très légère diminution de la teneur en eau libre et une augmentation de l'eau liée en fonction de l'accroissement de la teneur en saccharose dans le milieu de culture.

.../...

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les taux de survie obtenus avec les embryoïdes des deux clones étudiés (BC 068 et BC 156) sont relativement élevés quelle que soit la vitesse de congélation, puisqu'ils varient de 58 à 81 % pour le clone BC 068 et de 46 à 79 % pour le clone BC 156. On observe cependant un effet de la vitesse de refroidissement sur le taux de survie des massifs qui diminue avec la vitesse de congélation. Entre la mesure de la survie, 3 semaines après la décongélation, et celle de la reprise de la prolifération des massifs, 11 semaines après le réchauffement, un certain nombre de massifs considérés comme vivants à la fin du post-traitement se nécrosent, dans des proportions à peu près équivalentes pour toutes les vitesses de refroidissement. SEIBERT et WETHERBEE (1977) observent le même phénomène après la congélation de méristèmes d'oeillets : 35 à 40 % des méristèmes congelés ne se développent pas pour donner des plantules, quelle que soit la vitesse à laquelle ils ont été refroidis. Il est probable que les massifs d'embryoïdes dont l'évolution reste limitée ne présentent plus assez de tissus méristématiques vivants pour assurer une reprise ultérieure de la prolifération. Ce phénomène est particulièrement net pour des congélations lentes : la reprise de la prolifération, lorsqu'elle a lieu, se produit seulement à partir de zones localisées des massifs congelés. Cette diminution entre le taux de survie et le taux de reprise est plus importante pour le clone BC 156 que pour le clone BC 068 qui présente des taux de reprise toujours plus élevés que ceux du clone BC 156. La reprise de l'embryogenèse adventive est également plus rapide pour le clone BC 068 que pour le clone BC 156. La différence de résistance à l'azote liquide qui existe entre ces deux clones est à rapprocher des observations similaires faites dans le cas d'apex de pomme de terre (TOWILL, 1984), de manioc (KARTHA et al., 1982) ou d'oeillet (GALERNE, 1985) mais aussi de suspensions cellulaires de Catharanthus roseus (KARTHA,

../...

1982 ; CHEN et al. , 1984 b ; AUGEREAU, 1985) et de cals de luzerne (FINKLE et al. , 1985 b). Si la méthode mise au point pour un clone peut convenir pour la congélation de nombreux autres clones, des adaptations de cette méthode peuvent s'avérer nécessaires pour obtenir des taux de reprise analogues dans des cas particuliers. Cette différence de résistance à la congélation entre les clones BC 068 et BC 156 reflète leur comportement différent dans les conditions standard de culture : le clone le plus résistant, BC 068, a un taux de multiplication mensuel de 4 à 5 au lieu de 2,5 à 3 seulement pour le clone BC 156. Les meilleurs résultats obtenus avec le premier pourraient être dûs à la reprise plus rapide de la multiplication des cellules et des processus de restauration des fonctions cellulaires transitoirement altérées par la congélation, comme le transport actif lié au plasmalemme (CELLA et al. , 1982).

Le résultat le plus original concernant les embryôïdes de palmier à huile est la possibilité d'obtenir une reprise de leur prolifération après des congélations à des vitesses très différentes, de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ à $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à -100°C avant immersion dans l'azote liquide ou d'environ $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ lors d'une congélation directe à -196°C . Les taux de reprise sont cependant plus faibles pour des refroidissements lents ($0,5$ et $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) que pour des refroidissements plus rapides. Il est vraisemblable que les mécanismes de formation de la glace sont fondamentalement différents pour ces deux modes de congélation : un refroidissement rapide provoque en effet la formation intracellulaire de micro-cristaux de glace qui peuvent ne pas affecter la survie des cellules. Le réchauffement des échantillons doit également être rapide, en particulier dans la zone critique de températures favorable à la croissance des cristaux de glace, c'est-à-dire entre -20°C et -50°C (LUYET, 1937). Au cours d'une congélation lente, au contraire, la formation des cristaux de glace est d'abord extracellulaire (MAZUR, 1984).

.../...

La membrane cellulaire joue le rôle de barrière physique, empêchant ainsi la formation de glace intracellulaire. Lors de la descente en température, les cellules se déshydratent progressivement par passage de l'eau interne vers le milieu extracellulaire. Au moment de la congélation dans l'azote liquide, de la glace intracellulaire se forme. Cette cristallisation intracellulaire implique également, comme après un refroidissement rapide, que le réchauffement soit réalisé dans un bain-marie à 40°C. Une recristallisation intracellulaire, qui est considérée comme l'une des causes majeures de la mort des cellules lors d'une congélation, peut ainsi être évitée.

Généralement, il existe pour tout matériel une gamme plus ou moins large de vitesses de congélation permettant d'obtenir des taux de survie élevés. Ainsi, des fragments de thalle de Gracilaria supportent des congélations de 0,2 à 32°C.min⁻¹ (VAN DER MEER, 1984). Par contre, la viabilité de cellules de Catharanthus roseus passe de 60 % pour un refroidissement de 0,5°C.min⁻¹ à moins de 10 % si on les congèle à 5°C.min⁻¹ (CHEN et al. 1984 b). La vitesse optimale de congélation de méristèmes de pois est de 0,6°C.min⁻¹ (KARTHA et al. , 1979). Elle assure 73 % de survie au lieu de 35 % pour un refroidissement à 1°C.min⁻¹. Dans le cas de méristèmes de fraisier, l'optimum est encore plus réduit : un refroidissement à 0,84°C.min⁻¹ permet une survie de 95 % qui chute à 33 % si la vitesse de congélation passe à 0,95°C.min⁻¹ (KARTHA et al. , 1980). En ce qui concerne les embryons, seule une congélation rapide a permis jusqu'à présent la survie d'embryons zygotiques de maïs (WITHERS, 1978), de blé (BAJAJ, 1980 b), de riz (BAJAJ, 1981 b), de triticales (BAJAJ, 1984) et de colza (BAUBAULT, com. pers.). Au contraire, des embryons somatiques de carotte ne survivent qu'à des refroidissements lents ou intermédiaires (WITHERS, 1979). KARTHA (1984) indique cependant que les espèces qui survivent à une congélation rapide peuvent reprendre aussi bien ou mieux après un refroidissement lent; ceci a été montré dans le cas de méristèmes d'oignon (SEIBERT, 1976 ; UEMURA et SAKAI, 1980) et de pomme

.../...

de terre (GROUT et al. , 1978 ; TOWILL, 1981 a et b, 1983) ainsi que pour des embryons zygotiques d'orge (WITHERS, 1982). Pour WITHERS (1982), ce résultat est principalement dû au fait que les embryons zygotiques d'orge supportent bien une dessiccation importante jusqu'à 70 % de leur teneur initiale en eau. L'échec d'une congélation lente d'embryons zygotiques immatures de colza (WITHERS, 1982) serait lié à une sensibilité particulière de ce matériel à la dessiccation. Les bons résultats obtenus avec les embryons somatiques de palmier à huile, quelle que soit la vitesse de refroidissement, peuvent être dûs à ce qu'ils supportent bien une déshydratation partielle importante : au cours de leur prétraitement, la teneur en eau des embryons passe de 80 à 60 % environ par rapport à leur poids de matière fraîche. De plus, TURNHAM et NORTHCOTE (1982 et 1984) indiquent qu'au début du développement des embryons somatiques de palmier à huile, deux principaux types de lipides sont synthétisés en quantités importantes; des triacylglycérols (lipides de réserve) et des lipides polaires. La présence de ces lipides polaires, constituants des membranes cellulaires, pourrait jouer un rôle important lors des phénomènes de réparation des structures membranaires lésées au cours de la congélation et contribuer ainsi à la survie importante des embryoïdes après leur réchauffement. Leur présence, ainsi que celle du saccharose, si l'on admet qu'il a pénétré en quantité importante dans les cellules, pourrait également permettre d'accroître leur résistance par une augmentation de la pression osmotique intracellulaire.

L'importance de la température de prérefroidissement dans le cas d'une congélation en 2 étapes a été mise en évidence. Dans ces conditions, seul le clone BC 068 a montré une reprise de l'embryogenèse adventive. Les résultats les meilleurs sont obtenus après un prérefroidissement jusqu'à - 40°C ou - 100°C. L'importance de la température de prérefroidissement a déjà été soulignée par de nombreux auteurs. Il existe souvent une température optimale de prérefroidissement : elle est de - 100°C pour

../...

des cellules de lavande (DIETRICH et al. , 1982), de - 40°C pour des cellules de Catharanthus (CHEN et al. , 1984 a). Dans le cas des méristèmes de pomme de terre, cet optimum varie en fonction du cultivar (TOWILL, 1983). COULIBALY et DEMARLY (1978 et 1979) indiquent que le prérefroidissement de microspores de tabac à - 20°C ou à - 70°C est obligatoire avant leur congélation dans l'azote liquide. Un arrêt du prérefroidissement à une température intermédiaire permet la formation de cristaux de glace intracellulaire qui tuent les grains de pollen avant même leur immersion dans l'azote liquide. Enfin, KARTHA et al. (1982) montrent que la température de prérefroidissement peut modifier la réponse morphogénétique des explants congelés : ainsi, des méristèmes de manioc prérefroidis à - 20°C produisent des pousses feuillées; pour une température de - 25°C, les méristèmes régénèrent à la fois des pousses feuillées et des cals. Si la température de prérefroidissement atteint - 30°C, les méristèmes survivants ne produisent plus que des cals.

La vitesse de décongélation peut avoir une grande importance pour la survie du matériel. Sauf exception (WITHERS, 1979), l'augmentation de la vitesse de réchauffement permet d'obtenir une meilleure reprise. SAKAI (1966) puis SAKAI et YOSHIDA (1967) l'avaient montré sur des couches minces de tissus corticaux de mûrier. Ceci a depuis été confirmé sur de nombreux matériels végétaux cultivés in vitro : cellules de carotte (NAG et STREET, 1975) et de liseron (LEDDET, 1976), méristèmes d'oeillet (SEIBERT et WETHERBEE, 1977), de fraisier (UEMURA et SAKAI, 1980) et de poirier (MORIGUCHI et al. , 1985). Il en est de même chez les animaux comme pour les cellules d'insectes (HEACOX et LEOPOLD, 1984) et les spermatozoïdes (FISER et al. , 1986).

On peut penser que les faibles taux de reprise enregistrés dans le cas du palmier à huile après un prérefroidissement des embryoïdes jusqu'à une température de seulement - 20°C pourraient être dûs à une déshydratation insuffisante des cellules. Cette déshydratation ne serait suffisante qu'à partir d'un prérefroidissement des embryoïdes jusqu'à - 40°C. La différence observée

.../...

entre le taux de survie et le taux de reprise des embryoïdes réchauffés sans congélation pourrait résulter de vitesses de réchauffement différentes entre ces deux conditions. La vitesse de réchauffement des embryoïdes est sans doute proportionnellement plus rapide entre -196°C et $+40^{\circ}\text{C}$, température du bain thermostaté, qu'entre -40°C et $+40^{\circ}\text{C}$. Ceci est particulièrement important lors du passage dans les zones critiques de températures, pendant lequel une recristallisation, dommageable pour l'intégrité cellulaire, peut se produire (MAZUR, 1984).

Les courbes de refroidissement obtenues avec les différentes vitesses de congélation présentent un pic de cristallisation dont l'amplitude diminue quand la vitesse de refroidissement augmente; il disparaît dans le cas d'une congélation directe dans l'azote liquide. L'inertie du thermocouple utilisé, d'un diamètre de $0,2\text{mm}$, étant très faible, ce phénomène est à mettre en rapport avec le nombre de frigories (calories négatives) accumulées dans l'enceinte dont la température décroît plus rapidement que celle des massifs d'embryoïdes. Cet excès de frigories permet de réduire l'élévation de la température due à la cristallisation. Même pour des vitesses de congélation lentes ($0,5$ et $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) le plateau de cristallisation est réduit ou absent, contrairement à ce qui est obtenu pour d'autres matériels (GALERNE, 1985). Ceci est à mettre en rapport avec les dimensions réduites des massifs d'embryoïdes de palmier à huile et le type de congélation, qui est réalisé à sec, sans milieu cryoprotecteur, dont la prise en glace progressive est à l'origine d'un plateau de cristallisation important (ROWE, 1966 ; MERYMAN et WILLIAMS, 1985). L'existence d'un plateau de cristallisation important ne semble pas indispensable à la survie du matériel. Ainsi, la congélation de méristèmes de manioc (KARTHA et al. , 1982) ou de pomme de terre (TOWILL, 1984) est réalisée dans des micro-gouttes de milieu liquide qui ont pour effet de réduire l'importance de ce plateau de cristallisation. Dans le même but, WITHERS (1979) a congelé des embryoïdes de carotte à sec dans un papier d'aluminium (méthode dite du "dry

freezing") après un traitement cryoprotecteur en milieu liquide.

L'étude de la cristallisation, réalisée par microcalorimétrie différentielle à balayage, a mis en évidence l'apparition, pour les embryoïdes de palmier à huile, d'un seul pic de cristallisation dont la température d'initiation est abaissée par le prétraitement. Les phénomènes de cristallisation de l'eau dans les tissus et organes végétaux ont généralement été étudiés au moyen de techniques d'analyse thermique différentielle et de résonance magnétique nucléaire (GEORGE et BURKE, 1977). Les observations réalisées révèlent deux modes de cristallisation, suivant l'origine, ligneuse ou herbacée, de l'espèce. Pour les bourgeons de conifères, dont la structure est complexe, on observe plusieurs pics successifs de cristallisation correspondant à la cristallisation dans des tissus ou des organes différents (DEREUDDRE, 1978 ; SAKAI, 1979) : écailles, parenchyme cortical de la tige, apex méristématique. Des études plus précises, réalisées en microcalorimétrie différentielle à balayage sur du xylème de plusieurs espèces ligneuses (HONG et SUCOFF, 1980) ont permis de décomposer certains des exothermes en une succession d'évènements élémentaires. Chaque pic correspond à la prise en glace indépendante d'un groupe de cellules appartenant à un même rayon ligneux. Un phénomène analogue a été également observé par CHAW et RUBINSKI (1985), pendant la congélation d'épiderme d'oignon. Dans le cas des espèces ligneuses, le refroidissement progressif des organes, de quelques degrés par jour, produit une diminution du nombre, de la température et l'amplitude des exothermes secondaires; ils peuvent disparaître en raison des mouvements d'eau des tissus non encore congelés vers les tissus superficiels déjà pris en glace, comme l'ont montré notamment DEREUDDRE (1978) dans le cas de bourgeons végétatifs d'épicéa puis ISHIKAWA et SAKAI (1981) dans le cas de bourgeons floraux de rhododendron. Ces mécanismes permettent d'augmenter la résistance au froid des organes considérés.

.../...

Dans le cas d'un refroidissement d'organes ou de fragments d'organes de type herbacé, on n'observe généralement plus qu'un seul pic de congélation (RAJASHEKAR et al. , 1979). Ces différences de comportement sont à mettre en rapport avec la structure plus ou moins complexe des échantillons que l'on congèle et la compartimentation des organes en unités qui peuvent geler indépendamment les unes des autres.

Les embryons de palmier à huile, qui présentent une structure complexe, comprenant différents types de cellules, méristématiques, parenchymateuses et vasculaires, ont un comportement analogue à celui d'une plante herbacée : la cristallisation d'un massif se produit en effet en une seule fois et ne donne qu'un seul exotherme. Ce fait ne peut résulter de mouvements d'eau de l'intérieur de l'échantillon vers l'extérieur, comme cela a été décrit précédemment dans le cas de bourgeons de ligneux car les vitesses de refroidissement utilisées, même les plus lentes ($0,5$ à $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), sont beaucoup plus rapides que celles (quelques $^{\circ}\text{C}$ par jour) permettant d'obtenir des transferts d'eau d'un organe à l'autre (cristallisation extra-organe).

Enfin, l'utilisation du microcalorimètre différentiel à balayage a permis de distinguer, au sein d'un massif d'embryoïdes, l'eau cristallisable de l'eau non cristallisable en utilisant la méthode proposée par BETTELHEIM et al. (1986). La teneur en eau non cristallisable dans les massifs, au moment du pic de cristallisation qui se produit vers -20°C , varie, selon la teneur en saccharose du milieu de culture des embryoïdes, de $26,3$ à $29,5$ % de l'eau totale. Cette légère augmentation de l'eau non cristallisable entre des massifs cultivés sur $0,1$ et $0,75\text{M}$ de saccharose, si elle était confirmée, pourrait être mise en rapport avec l'augmentation de la concentration en saccharose intra ou extracellulaire, le saccharose pouvant fixer un certain nombre de molécules d'eau grâce à des liaisons hydrogène . D'autre part, ces premiers résultats sont à rapprocher de ceux de DEREUDDRE (1978) qui indique qu'à -20°C , la teneur en eau non

cristallisée dans des bourgeons de rameaux d'épicéa est de 31,5 % de l'eau totale; une valeur voisine (34 %) a été trouvée par SAKAI (1979) avec ce même matériel. Une étude complémentaire pourrait être entreprise en résonance magnétique nucléaire pour vérifier si de la glace continue ou non à se former après le pic de cristallisation, lorsque la température diminue, comme c'est le cas notamment avec des fragments de feuilles de blé (RAJASHEKAR et al. , 1979). L'emploi de la technique de cryodécapage pourrait également permettre de localiser avec précision les cristaux de glace en fonction du type de refroidissement, lent ou rapide.

En conclusion, les embryoïdes de palmier à huile représentent, dans le domaine de la cryoconservation des tissus et organes végétaux, un matériel original par l'étendue de la gamme des vitesses de congélation qui permettent d'assurer la reprise de l'embryogenèse ($0,5$ à $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). On observe cependant une reprise plus importante et plus intense pour des vitesses de congélation supérieures ou égales à $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, ce qui correspond peut-être à une vitesse charnière entre les deux mécanismes de formation de la glace au cours d'une congélation : glace extracellulaire ou micro-cristaux intracellulaires. De plus, une différence de résistance à la congélation a été mise en évidence entre les deux clones étudiés, le clone BC 156 donne des pourcentages de reprise moins importants que le clone BC 068 et une reprise de l'embryogenèse plus lente à se manifester. Sur le plan pratique, la répétition de certaines expériences de congélation a conduit à l'obtention de résultats voisins, ce qui permet de conclure à une bonne reproductibilité des résultats. D'autre part, l'étendue importante des vitesses de congélation utilisables doit permettre de trouver un régime de refroidissement adapté à chaque clone. Enfin, si l'utilisation d'un congélateur programmable permet seule d'obtenir des vitesses de refroidissement parfaitement reproductibles, la congélation des massifs d'embryoïdes par immersion directe des ampoules cryobiologiques dans l'azote liquide a donné de bons résultats avec les clones étudiés. Le stockage de clones d'embryoïdes de palmier à huile est donc également réalisable sans appareillage sophistiqué.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Cette étude a permis la mise au point d'une méthode de cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile. Elle comporte cinq étapes. 20 semaines sont nécessaires pour obtenir des embryoides aptes à résister à l'azote liquide et assurer la reprise de l'embryogenèse adventive. Les différentes phases du procédé sont les suivantes :

1. Obtention des massifs d'embryoïdes susceptibles de résister à la congélation (2 mois de culture sur un milieu contenant 0,3M de saccharose).
2. Prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose.
3. Congélation rapide ($200^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) par immersion directe dans l'azote liquide des ampoules cryobiologiques contenant les embryoides. La congélation peut également être réalisée en 2 étapes : un prérefroidissement programmé de $+20^{\circ}\text{C}$ à -100°C , à différentes vitesses (5 à $40^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$), suivi d'une immersion des ampoules dans l'azote liquide.
4. Réchauffement rapide par immersion pendant 1 minute des ampoules cryobiologiques dans un bain-marie thermostaté à $+40^{\circ}\text{C}$.
5. Post-traitement de 3 semaines en présence de 2,4-D (10^{-6}M); il comporte une culture d'une semaine sur un milieu contenant 0,3M de saccharose puis de 2 semaines sur le même milieu avec 0,1M de saccharose. Les massifs d'embryoïdes considérés comme vivants sont ensuite repiqués en tubes sur le milieu standard de multiplication. La reprise de l'embryogenèse adventive, mesurée 11 semaines après le réchauffement du matériel, varie, selon les

.../...

expérimentations, de 15 à 30 % des massifs pour le clone BC 068 et de 8 à 26 % pour le clone BC 156 . Ces variations sont certainement dûes à la très grande hétérogénéité des massifs congelés, qui diffèrent notamment entre eux par la taille, le poids, le nombre d'embryoïdes, la structure histologique. La technique a également été appliquée au clone LMC 43-18 (26,6 % de reprise) et aux structures embryogènes du clone LMC 079-3 (21 % de reprise). De plus, une augmentation de la durée de stockage de massifs d'embryoïdes jusqu'à 7 et 15 mois ne modifie ni le taux de reprise, ni le développement ultérieur des plantules. Il est donc probable que la méthode mise au point est d'application générale pour le palmier à huile.

Si, pour les structures embryogènes prélevées sur cal primaire l'utilisation de 2,4-D n'est pas nécessaire pour la reprise de l'embryogénèse, il en est différemment des embryoïdes en cours de prolifération, pour lesquels l'emploi de cette auxine est obligatoire afin d'obtenir de manière reproductible une reprise de l'embryogénèse adventive du matériel congelé. Cette utilisation du 2,4-D équivaut à un retour à l'étape précédente dans le schéma de l'embryogénèse adventive. En effet, après congélation, le développement d'embryoïdes adventifs n'est généralement obtenu qu'après une culture du matériel sur un milieu d'induction qui contient du 2,4-D.

Le post-traitement de 3 semaines correspondrait à une induction de nouvelles zones embryogènes qui évoluent ensuite pour donner des embryoïdes lorsque les massifs sont repiqués sur le milieu de multiplication dépourvu d'hormones de croissance. Dans le cas de structures embryogènes prélevées sur des cals, la présence de 2,4-D dans le milieu n'est pas nécessaire pour obtenir une reprise de la prolifération après le réchauffement du matériel. Ces structures embryogènes, apparues sur

../...

un milieu d'induction qui comporte du 2,4-D, en contiennent elles-mêmes certainement une quantité suffisante pour assurer la reprise de leur prolifération. L'intérêt de la conservation des clones au stade structures embryogènes réside dans le fait que la congélation ne fait ici qu'interrompre le procédé habituel de la production d'embryoïdes adventifs. Pour des massifs d'embryoïdes, au contraire, le processus de l'embryogenèse adventive doit être "ré - enclenché" par l'emploi transitoire de 2,4-D.

Le dosage du 2,4-D, par utilisation de molécules marquées, semble intéressant à réaliser avec les massifs d'embryoïdes et les structures embryogènes. Dans le cas des massifs d'embryoïdes, en effet, si la concentration utilisée (10^{-6} M) au cours du post-traitement assure la reprise dans des proportions satisfaisantes, il n'a pas été possible de déterminer une concentration et une durée d'utilisation de 2,4-D qui soient optimales. L'évolution de la teneur en 2,4-D des massifs d'embryoïdes devrait donc être suivie au cours du post-traitement en fonction de sa concentration dans les milieux et après le repiquage en conditions standard : en effet, des structures anormales peuvent apparaître plusieurs semaines après le repiquage sur le milieu dépourvu d'auxine, dans le cas où le 2,4-D a été utilisé à une forte concentration pendant le post-traitement.

Le dosage du 2,4-D devrait également être effectué dans les structures embryogènes. On peut en effet se demander pendant combien de temps une structure embryogène isolée du cal, placée avant congélation sur un milieu sans auxine, peut proliférer après sa conservation dans l'azote liquide sans qu'un apport de 2,4-D exogène soit nécessaire. Cette expérimentation nous permettrait peut être de déterminer une concentration seuil en 2,4-D applicable aux massifs d'embryoïdes en prolifération.

L'étude histologique des massifs d'embryoïdes a permis de montrer que la congélation conduit à une destruction rapide des tissus parenchymateux différenciés. Seules les zones méristématiques sont encore vivantes une semaine après la décongélation. L'intégrité des massifs n'est donc pas nécessaire pour obtenir une reprise de la prolifération. Une étude complémentaire effectuée pendant toute la durée du post-traitement pourrait permettre de localiser avec précision les zones à partir desquelles est initiée l'embryogenèse adventive. Ce travail devrait être étendu au cas des structures embryogènes.

L'utilisation du 2,4-D pour obtenir une reprise de la prolifération pose deux problèmes : celui du risque d'apparition de formes anormales dans les cultures, comme cela a été observé sur des massifs témoins du clone BC 156 traités pendant 3 semaines par différentes concentrations d'auxine et celui de la perte de la conformité des plantes régénérées, comme cela a été récemment observée par CORLEY et al. (1986) sur des palmiers à huile issus de culture in vitro. Il serait donc important de pouvoir obtenir une reprise de l'embryogenèse adventive à partir des massifs congelés sans avoir recours à cette auxine. Le 2,4-D a notamment pour effet de provoquer des divisions cellulaires dans les zones embryogènes à partir desquelles se différencient les embryoïdes lors du transfert du matériel sur un milieu appauvri ou dépourvu d'auxine. Des observations effectuées sur de nombreux matériels végétaux font état d'une production d'éthylène, variable selon l'espèce considérée (GEORGE et SHERRINGTON, 1984) dont l'intensité dépend de la quantité d'auxine dans le milieu. Ainsi, dans le cas d'une suspension cellulaire de poire (BALAGUE et PECH, 1985), la suppression du 2,4-D dans le milieu de culture entraîne une chute brutale de la production d'éthylène qui est corrélée avec une diminution de la concentration intracellulaire d'ACC (acide 1 - aminocyclopropane - 1 - carboxylique), précurseur de ce gaz et de l'activité de l'EFE ("ethylene - forming enzyme"), enzyme assurant la transformation de l'ACC en éthylène. Ce phénomène est réversible : la production d'éthylène, la concentration en ACC et

l'activité de l'EFE retrouvent un niveau normal si du 2,4-D est ajouté dans le milieu. GRIERSON et al. (1982) observent que la pulvérisation de 2,4-D sur des germinations de haricot entraîne, au niveau des nucléoles de l'axe hypocotylé, une augmentation de la synthèse d'ARN, qui est précédée par une importante production d'éthylène. La même stimulation de la synthèse d'ARN peut être provoquée par l'application d'éthéphon (acide 2-chloroéthane phosphonique), composé générateur d'éthylène, ou en plaçant les plantules dans une atmosphère contrôlée contenant de l'éthylène. Enfin, BRADLEY et al. (1984) indiquent que la suppression de 2,4-D, qui provoque une diminution de la synthèse éthylénique, permet l'apparition d'embryons somatiques au stade globulaire dans une suspension cellulaire de carotte. Quel que soit le niveau d'intervention réel de l'éthylène dans les processus d'organogenèse, les résultats obtenus avec le palmier à huile indiquent qu'il serait intéressant de modifier la composition du milieu de post-traitement en ajoutant des composés qui interviennent, de manière plus ou moins directe, dans la régulation de la chaîne métabolique de la production d'éthylène. Il serait ainsi possible d'envisager une reprise de l'embryogenèse adventive à partir des massifs d'embryoïdes congelés, sans utilisation de 2,4-D.

Les essais comparatifs effectués avec diverses substances cryoprotectrices montrent que des taux de survie satisfaisants peuvent être obtenus avec diverses concentrations de saccharose, de sorbitol et de DMSO. Il est donc possible d'utiliser ces conditions pour la cryoprotection de clones pour lesquels le prétraitement standard de 7 jours en présence de 0,75M de saccharose n'assurerait pas une survie ou une reprise suffisantes. L'emploi d'autres substances cryoprotectrices comme le glucose qui pourrait pénétrer plus facilement dans les cellules, est également à envisager.

Le matériel utilisé ne permet pas, du fait de sa structure, de donner des indications directes sur le mécanisme d'action des

cryoprotecteurs ; les résultats obtenus semblent indiquer que les substances cryoprotectrices ont, dans le cas du palmier à huile, à la fois un effet osmotique conduisant à une plasmolyse des cellules et un effet de protection spécifique sur les constituants cellulaires, principalement membranaires, du fait de leur pénétration à l'intérieur des cellules. Seule l'utilisation de la technique du cryodécapage pourrait nous renseigner sur l'état exact de plasmolyse des cellules. L'étude de la pénétration des substances cryoprotectrices pourrait être faite sur des suspensions de cellules ou de protoplastes. De plus, compte tenu des dimensions relativement importantes des échantillons et de leur hétérogénéité, la cryoprotection des massifs est incomplète : si les tissus méristématiques internes et externes résistent à la congélation, seules les zones parenchymateuses périphériques restent vivantes quelques jours après la congélation. Les nécroses internes pourraient être dues à l'existence de gradients thermiques importants au moment de la congélation et du réchauffement. Il serait intéressant d'utiliser des structures plus petites et plus homogènes mais restant capables d'assurer une reprise de la prolifération après le réchauffement.

La reprise de l'embryogenèse après diverses vitesses de refroidissement (5 à $200^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) permet d'envisager des adaptations de la méthode en fonction des clones à conserver. Il pourrait être intéressant d'augmenter encore les vitesses de refroidissement et de réchauffement en utilisant par exemple des ampoules cryobiologiques en verre, matériau meilleur conducteur que le polypropylène. L'emploi de vitesses de refroidissement plus lentes ($0,5$ et $1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) ne devrait pas être retenu compte tenu des résultats peu satisfaisants qui ont été obtenus.

La détermination du taux de survie des massifs par observation visuelle à la fin du post-traitement s'est révélée relativement imprécise : des massifs considérés comme vivants se nécrosent après leur remise en culture en conditions standard.

../...

Inversement, certains massifs considérés comme morts peuvent donner ultérieurement des embryons adventifs. Cette imprécision explique les différences entre les taux de survie et de reprise. D'autres tests de survie, comme le test TTC, existent ; ils sont destructifs et donc non utilisables. La mesure des productions d'éthylène et d'éthane par un matériel végétal après son réchauffement semblerait donner une indication à la fois rapide, sensible et sûre de l'intensité des dégâts dûs à la congélation dans l'azote liquide des échantillons (BENSON et al. , 1986). Des travaux récents (HARBER et FUCHIGAMI, 1986) portant sur la congélation de disques foliaires de rhododendron ont en effet montré que les premiers dommages subis par les tissus s'accompagnent d'une émission d'éthylène alors que la mort des tissus provoque la production d'éthane. La production d'éthylène serait ainsi un indicateur d'un stress cellulaire dû à la congélation et la production d'éthane un marqueur de la mort des tissus. L'utilisation de ce test avec les embryoïdes de palmier à huile, s'il pouvait être corrélé avec la reprise ultérieure des massifs, permettrait de détecter très rapidement ceux qui sont susceptibles de reprendre leur prolifération.

En conclusion, le stockage dans l'azote liquide de clones de palmier à huile est maintenant possible. Il peut être réalisé en utilisant des massifs de jeunes embryoïdes pour les clones en prolifération ou des structures embryogènes pour les clones en cours d'établissement. Des expériences sont actuellement en cours sur une quinzaine de clones afin de vérifier la fiabilité de la technique mise au point puis la conformité du matériel. D'autres problèmes se posent qui concernent la gestion d'une banque d'embryoïdes : devra-t-on, pour chaque clone, stocker un nombre important de massifs ou pourra-t-on, après le réchauffement du petit nombre d'embryoïdes stockés, produire à nouveau des massifs d'embryoïdes que l'on recongèlera ? Une expérimentation en cours, portant sur la congélation d'embryoïdes issus de matériel déjà cryoconservé, apportera un élément de réflexion à cette question.

Enfin, les résultats présentés dans ce mémoire permettent d'envisager dans un avenir proche l'adaptation du protocole expérimental à la conservation d'autres matériels : embryons somatiques d'autres espèces, embryons zygotiques de palmier à huile et de cocotier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AHEE J., ARTHUIS P., CAS J., DUVAL Y., GUENIN G., HANOVER J., HANOVER P., LIEVOUX D., LIORET C., MALAURIE B., PANNETIER C., RAILLOT D., VARECHON C. ET ZUCKERMAN L. (1981) - La multiplication végétative in vitro du palmier à huile par embryogenèse somatique. *Oléagineux*, 36, 113-118.

D'AMATO F., (1978) - Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In "Frontiers of plant tissue culture". THORPE T.A. ed., I.A.P.T.C., Calgary University Press, 287-297.

AMMAR S. ET BENBADIS A. (1977) - Multiplication végétative du palmier-dattier (Phoenix dactylifera L.) par la culture de tissus de jeunes plants issus de semis. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 284, Série D, 1789-1792.

AMMIRATO P.V. (1984) - Embryogenesis. In "Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, Techniques for Propagation and Breeding", EVANS D.A., SHARP W.R., AMMIRATO P.V. et YAMADA A. eds, Macmillan, New-York, 82-123.

ASHWOOD M.J. ET SMITH J.F. (1980) - Eds, "Low temperature preservation in medicine and biology". University Park Press, Baltimore.

.../...

ASHWOOD-SMITH M.J. ET FRIEDMANN G.B. (1979) - Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196°C in dimethylsulfoxide. *Cryobiology*, 16, 132-140.

AUGEREAU J.M. (1985) - Etude de l'efficacité et des conséquences métaboliques de trois méthodes de conservation à long terme de souches de tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse de troisième cycle, Université F. RABELAIS, Tours, 128 p.

BAJAJ Y.P.S. (1976) - Gene preservation through freeze-storage of plant cell, tissue, and organ culture. *Acta. Hortic*, 63, 75-84.

BAJAJ Y.P.S. (1977) - Survival of Atropa and Nicotiana pollen-embryos at -196°C . *Curr. Sci.*, 46, 305-307.

BAJAJ Y.P.S. (1978 a) - Effect of super-low temperature on excised anthers and pollen-embryos of Atropa, Nicotiana and Petunia. *Phytomorphol.*, 28, 171-176.

BAJAJ Y.P.S. (1978 b) - Regeneration of plants from pollen-embryos frozen at ultra-low temperatures - a method for the preservation of haploids. 4th Int. Palynol. Cong., Lucknow, India, 1, 343-346.

BAJAJ Y.P.S. (1978 c) - Tuberization in potato plants regenerated from freeze-preserved meristems. *Crop Improv.*, 5, 137-141.

BAJAJ Y.P.S. (1980 a) - Induction of androgenesis in rice anthers frozen at -196°C . Cereal Res. Commun., 8 , 365-369.

BAJAJ Y.P.S. (1980 b) - Freeze-preservation of plant cells - a novel approach to the conservation of germplasm. In "Genetics and Wheat Improvement", GUPTA A.K. ed., Oxford and IBH Publ., New-Delhi, 141-149.

BAJAJ Y.P.S. (1981 a) - Regeneration of plants from ultra-low frozen anthers of Primula obconica. Sci. Hortic., 14, 93-95.

BAJAJ Y.P.S. (1981 b) - Growth and morphogenesis in frozen (-196°C) endosperm and embryos of rice. Curr. Sci., 50, 947-948.

BAJAJ Y.P.S. (1982) - Survival of anther - and ovule - derived cotton callus frozen in liquid nitrogen. Curr. Sci, 51, 139-140.

BAJAJ Y.P.S. (1983 a) - Regeneration of plants from pollen-embryos of Arachis, Brassica and Triticum spp. cryopreserved for one year. Curr. Sci., 52, 484-486.

BAJAJ Y.P.S. (1983 b) - Cassava plants from meristems cultures freeze-preserved for three years. Field Crops Res., 7, 161-167.

BAJAJ Y.P.S. (1984) - Technology of cryopreservation of germplasm of cereals. In Proc. Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto, sous presse.

BAJAJ Y.P.S. (1985 a) - Cryopreservation of germplasm of potato (Solanum tuberosum L.) and Cassava (Manihot esculanta Crantz) : viability of excised meristems cryopreserved up to four years. Indian J. Exp. Biol., 23, 285-287.

BAJAJ Y.P.S. (1985 b) - Cryopreservation of embryos. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs", KARTHA K.K. ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 227-242.

BALAGUE C. ET PECH J.C. (1985) - Relationship between the activity of the ethylene-forming enzyme and the level of intracellular 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid in pear cell cultures in vitro. J. Plant Growth Regul., 4, 81-89.

BARBIER H., NALIN F. ET GUERN J. (1982) - Freezing injury in sugar beet root cells, sucrose leakage and modifications of tonoplast properties. Plant Sci. Letters, 26, 75-81.

BAYLISS M.W. (1980) - Chromosomal variation in plant tissues in culture. Int.Rev. Cytol., Suppl. 11 A, 113-144.

BENSON E.E. ET WITHERS L.A. (1986) - Assessments of stability in cryopreserved cultures. In Abstr. Vith. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, SOMERS D.A. , GENGENBACH B.G. , BIESBOER D.D. , HACKETT W.P. et GREEN C.E. eds., Minneapolis, 425.

.../...

BETTELHEIM F.A. , ALI S. , WHITE O. ET CHYLAK L.T.JR. (1986) - Freezable and nonfreezable water content of cataractous human lenses. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 27, 122-125.

BRADLEY P.M. , EL-FIKI F. ET GILES K.L. (1984) - Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of Daucus carota. Plant Sci. Letters, 34, 397-401.

BRANTON R.L. ET BLAKE J. (1983 a) - Development of organized structures in callus derived from explants of Cocos nucifera L. Ann. Bot., 52, 673-678.

BRANTON R.L. ET BLAKE J. (1983 b) - A lovely clone of coconuts. New Scientist, 26, 554-557.

BRIDGEN M.P. ET STABY G.L. (1981) - Low pressure and low oxygen storage of Nicotiana tabacum and Chrysanthemum X Morifolium tissue cultures. Plant Sci. Letters, 22, 177-186.

BRISKIN D.P. , THORNLEY W.R. ET WYSE R.E. (1985) - Membrane transport in isolated vesicles from sugarbeet taproot. II. Evidence for a sucrose / H⁺ - antiport. Plant Physiol., 78, 871-875.

BUTENKO R.G., POPOV A.S., VOLKOVA L.A., CHERNYAK N.D. ET NOSOV A.M. (1984) - Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of Dioscorea deltoidea and Panax ginseng cells in liquid nitrogen. Plant Sci. Letters, 33, 285-292.

CAPLIN S.M. (1959) - Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. Am. J. Bot., 46, 324-329.

CELLA R., COLOMBO R., GALLI M.G., NIELSEN E., ROLLO F. ET SALA F. (1982) - Freeze-preservation of rice cells : a physiological study of freeze-thawed cells. Physiol. Plant., 55, 279-284.

CHAW M. W. ET RUBINSKI B. (1985) - Cryomicroscopic observations on directional solidification in onion cells . Cryobiology, 22, 392-399.

CHEN T.H.H., KARTHA K.K. ET GUSTA L.V. (1985) - Cryopreservation of wheat suspension culture and regenerable callus. Plant Cell Tissue Organ Culture, 4, 101-109.

CHEN T.H.H., KARTHA K.K., LEUNG N.L. KURZ W.G.W., CHATSON K.B. ET CONSTABEL F. (1984 a) - Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of periwinkle (Catharanthus roseus). Plant Physiol., 75, 726-731.

CHEN T.H.H., KARTHA K.K. , CONSTABEL F. ET GUSTA L.V. (1984 b) - Freezing characteristics of cultured Catharanthus roseus (L.) G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. Plant Physiol., 75, 720-725.

../...

CHOO W.K., YEW W.C. ET CORLEY R.H.V. (1981) - Tissue culture of palms - a review . In Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants, Singapore, RAO A.N. ed., 138-144.

COFFIN R., TAPER C.D. ET CHONG C. (1976) - Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. Can. J. Bot., 54, 547-551.

COMSTOCK R.E. , ROBINSON H.F. ET HARVEY P.H. (1949) - A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. Agron. J., 41, 360-367.

CONSTABEL F. (1985) - Plant Cell Culture. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs", KARTHA K.K. ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-12.

CORLEY R.H.V. ET GRAY B.S. (1976) - Growth and morphology. In "Oil Palm Research", Developments in Crop Science (1), CORLEY R.H.V., HARDON J.J. et WOOD B.J. eds, Elsevier Publ. Co., 7-22.

CORLEY R.H.V. , BARRETT J.N. ET JONES L.H. (1976) - Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. In Proc. Malaysian Intl. Agric. Oil Palm Conf., Kuala Lumpur, 2-7.

.../...

CORLEY R.H.V., BARRETT J.N. ET JONES L.H. (1977) - Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. Oil Palm News, 22, 2-7.

CORLEY R.H.V. , WOOL K.C. ET WONG C.Y. (1979) - Progress with vegetative propagation of oil palm. Planter, 55, 377-380.

CORLEY R.H.V., LEE C.H., LAW I.H. ET WONG C.Y. (1986) - Abnormal flower development in oil palm clones. Planter, Kuala Lumpur, 62, 233-240.

CORLEY R.H.V., WONG C.Y., WOOL K.C. ET JONES L.H. (1981) - Early results from the first oil palm clone trials. In "The Oil Palm in Agriculture in the Eighties", Vol. 1, Inc. Soc. Planters, Kuala Lumpur, Malaysia, 173-196.

COULIBALY Y. ET DEMARLY Y. (1978) - Sur les conditions de survie des microspores de Nicotiana tabacum et d'Oryza sativa soumises à la température de l'azote liquide (-196°C). C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 286, 1065-1068.

COULIBALY Y. ET DEMARLY Y. (1979) - Androgenèse in vitro chez Oryza sativa Var. Cigalon à partir d'anthères conservées dans l'azote liquide. Agro. Trop., XXXIV, 74-79.

CZLONKOWSKA M., BOYLE M.S. ET ALLEN W.R. (1985) - Deep freezing of horse embryos. J. Reprod. Fert., 75, 485-490.

DALE P.J. (1980) - A method for in vitro storage of Lolium multiflorum lam. Ann. Bot., 45, 497-502.

- DAVIS T.A. (1980) - Double reversal of spadices in an african oil palm. *Planter*, 56, 212-216.
- DENKÓ C.W., GOODMAN R.M., MILLER R. ET DONOVAN T. (1967) - Distribution of dimethylsulfoxide-35S in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 77-84.
- DEREUDDRE J. (1978) - Effets de divers types de refroidissement sur la teneur en eau et sur la résistance au gel des bourgeons de rameaux d'épicéa en vie ralentie. *Physiol. Vég.*, 16, 469-489.
- DEREUDDRE J. ET KARTHA K.K. (1984) - Cryopreservation of apple cell suspensions. 1st plant genetic engineering workshop, *Canad. Sect. of I.A.P.T.C.*, Saskatoon, 46.
- DIETRICH B., HAACK U., POPOV A.S., BUTENKO R.G. ET LUCKNER M. (1985) - Long-term storage in liquid nitrogen of an embryogenic strain of *Digitalis lanata*. *Biochem. und Physiol. der Pflanzen*, 180, 33-43.
- DIETRICH B., POPOV A.S., PFEIFFER B., NEUMANN D., BUTENKO R. ET LUCKNER M. (1982) - Cryopreservation of *Digitalis lanata* cell cultures. *Med. Plant Res.*, 46, 82-87.
- DOUGALL D.K. ET WETHERELL D.F. (1974) - Storage of wild carrot cultures in the frozen state. *Cryobiology*, 11, 410-415.
- DOUGALL D.K. ET WHITTEN G.H. (1980) - The ability of wild carrot cell cultures to retain their capacity for anthocyanin synthesis after storage at -140°C. *Planta Medica*, suppl., 129-135.

DUNWELL J.M. (1985) - Anther and ovary culture. In "Cereal Tissue and Cell Culture", BRIGHT S.W.J. et JONES M.G.K. Eds, The Hague, Martinus Nijhoff, 1-44.

DURAND-GASSELIN T., KONAN K., DUVAL Y. ET PANNETIER C., (1986) - Development of micropropagation of oil palm through somatic embryogenesis. Abstr. 6th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, SOMERS D.A., GENGENBACH B.G., BIESBOER D.D., HACKETT W.P. et GREEN C.E. eds, Minneapolis, 400.

FABRE J. (1986) - Effets du prétraitement sur la résistance à la congélation dans l'azote liquide (-196°C) des méristèmes terminaux et axillaires d'oeillets (Dianthus caryophyllus L.) cultivés in vitro. Mémoire de D.E.A., Université P. et M. CURIE, Paris VI, 92 p.

FINKLE B.J. , ULRICH J.M. ET TISSERAT B. (1982) - Responses of several lines of rice and date palm callus to freezing at -196°C. In "Plant Cold Hardiness and Freezing Stress", LI P.H. et SAKAI A. eds., Acad. Press, 643-660.

FINKLE B.J. ZAVALA M.A. ET ULRICH J.M. (1985 a) - Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs", KARTHA K.K. ed., CRC Press , Boca Raton, Florida, 75-113.

FINKLE B.J. , ULRICH J.M. , RAINS D.W. ET STAVAREK S.J. (1985 b) - Growth and regeneration of alfalfa callus lines after freezing in liquid nitrogen. Plant Science, 42, 133-140.

.../...

- FISER P.S. , FAIRFULL R.W. ET MARCUS G.J. (1986) -
The effect of thawing velocity on survival and acrosomal
integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal
rates in straws. *Cryobiology*, 23, 141-149.
- FRIDBORG G. , PEDERSEN M. , LANDSTRON L.E. ET ERIKSSON T.
(1978) - The effect of activated charcoal on tissue cultures :
adsorption of metabolite inhibiting morphogenesis. *Physiol.
Plant.*, 64, 162-164.
- GABR M.F. ET TISSERAT B. (1985) - Propagating palms in vitro
with special emphasis on the date palm (Phoenix dactylifera L.).
Scientia Hort., 25,, 255-262.
- GALERNE M. (1985) - Effets du saccharose sur la résistance à
la congélation dans l'azote liquide (-196°C) des méristèmes
d'oeillets (Dianthus caryophyllus L.) cultivés in vitro.
Mémoire de D.E.A., Université P. et M. CURIE Paris VI, 74 p.
- GALZY R. (1969) - Recherches sur la croissance de Vitis rupe-
tris Scheele sain et court noué cultivé in vitro à différentes
températures. *Ann. Phytopathol.*, 1, 149-166.
- GASCON J.P. ET DE BERCHOUX C. (1964) - Caractéristiques de
la production d'Elaeis guineensis Jacq. de diverses origines
et de leurs croisements. Application à la sélection du palmier
à huile. *Oléagineux*, 19, 75-84.

..../...

GEORGE M.F. ET BURKE M.J. (1977) - Cold hardiness and deep supercooling in xylem of shagbark. *Plant Physiol.*, 59, 319-325.

GEORGE E.F. ET SHERRINGTON P.D.(1984) - Eds., "Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook of Directory and Commercial Laboratories", Exegetics Ltd., 709 p.

DE GRAAF J. (1976) - Composition, quality and uses of palm oil. In "Oil Palm Research" ; Developments in Crop Science (1) , CORLEY R.H.V. , HARDON J.J. et WOOD B.J. eds., Elsevier Publ. Co., 493-504.

GRIERSON D., KEAR R.J., THOMPSON J.R. ET GARCIA-MORA R. (1982) - Stimulation of in vitro RNA synthesis by pretreating plants with auxins is due to auxin-induced ethylene production. *Z. Pflanzenphysiol.*, 107, 419-426.

GROUT B.W.W., SHELTON K. ET PRITCHARD H.W. (1983) - Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann. Bot.*, 52, 381-384.

GROUT B.W.W., WESCOTT R.J. ET HENSHAW G.G. (1978) - Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 15, 478-483.

HARBER R.M. ET FUCHIGAMI L.H. (1986) - The relationship of ethylene and ethane production to tissue damage in frozen rhododendron leaf disks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111, 434-436.

HARDON J.J. ET CORLEY R.H.V. (1976) - Natural pollination. In "Oil Palm Research", Developments in Crop Science (1), CORLEY R.H.V. , HARDON J.J. et WOOD B.J. eds, Elsevier Publ. Co., 299-306.

HARTLEY C.W. S. (1977) - "The Oil Palm (Elaeis guineensis, Jacq.)", Tropical Agriculture Series, Longman, London, 806 p.

HAUPTMANN R.M. ET WIDHOLM J.M. (1982) - Cryostorage of cloned amino acid analog-resistant carrot and tobacco suspension cultures. Plant Physiol., 70, 30-34.

HEACOX A. ET LEOPOLD R.A. (1984) - Optimizing conditions for cryopreservation of an insect cell line. Cryobiology, 21, 435-442.

HELLER R. (1953) - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég., 14, 1-223.

HENRY P. (1948) - Un Elaeis remarquable : le palmier à huile vivipare. Rev. Intle. de Bot. Appliquée et d'Agric. Tropicale, 28, 311.

HENSHAW G.G. (1982) - Tissue culture methods and germplasm storage. In Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, FUJIWARA A. ed., Tokyo, 789-792.

HENSHAW G.G. , O'HARA J.F. ET STAMP J.A. (1985) - Cryopreservation of potato meristems. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs", KARTHA K.K. ed., C R C Press, Boca Raton, Florida, 159-170.

HENSHAW G. G. , STAMP J. A. ET WESTCOTT R.J. (1980) - Tissue culture and germplasm storage. In "Development in Plant Biology", Vol. 5, "Plant Cell Culture : Results and Perspectives". SALA F., PARISI R. et GIFURI O. eds., Elsevier, Amsterdam, 277-282.

HONG S.G. ET SUCOFF E. (1980) - Units of freezing of deep super-cooled water in woody xylem. *Plant Physiol.*, 66, 40-45.

HUNTER C.S. (1986) - In vitro propagation and germplasm storage of Cinchona. In "Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications", WITHERS L.A. et ALDERSON P.G. eds., Butterworths, 291-302.

ISHIKAWA M. ET SAKAI A. (1981) - Freezing avoidance mechanisms by supercooling in some Rhododendron flower buds with reference to water relation. *Plant Cell Physiol.*, 22, 953-967.

JACOB S.W. ET HERSCHLER R. (1986) - Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*, 23, 28-37.

JAMES A.T. (1984) - Plant tissue culture : achievements and prospects. *Proc. of the Royal Soc. London, B., (Biological Sciences)* , 222, 135-145.

../...

JONES L.H. (1974) - Propagation of clonal oil palms by tissue culture. Oil Palm News, 17, 1-8.

JONES L.H., BARFIELD D., BARRETT J., FLOOK A., POLLOCK K. ET ROBINSON P. (1982) - Cytology of oil palm cultures and regenerant plants. Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, FUJIWARA A. ed., Tokyo, 727-728.

KARTHA K.K. (1981) - Genepool conservation through tissue culture. Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants, Singapore, RAO A.N. ed. , 213-218.

KARTHA K.K. (1982) - Cryopreservation of plant meristems : a novel approach for the preservation of germplasm in a disease-free condition. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, FUJIWARA A. ed., Tokyo, 795-796.

KARTHA K.K. (1984) - Freeze preservation of meristems : In "Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants" , vol. 1 , Acad. Press, 621-628.

KARTHA K.K. (1985) - Meristem culture and germplasm preservation. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs", KARTHA K.K. ed., C R C Press, Boca Raton, Florida, 115-134.

KARTHA K.K. , LEUNG N. L. ET GAMBORG O.L. (1979) - Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. Plant Sci. Letters, 15, 7-16.

.../...

- KARTHA K.K. , LEUNG N.L. ET MROGINSKI L.A. (1982) - In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of Cassava (Manihot esculenta Crantz). Z. Pflanzenphysiol., 107, 133-140.
- KARTHA K.K. , LEUNG N.L. ET PAHL K. (1980) - Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 105, 481-484.
- KARTHA K.K. , MROGINSKI L.A., PAHL K. ET LEUNG N.L. (1981) - Germplasm preservation of coffee (Coffea arabica L.) by in vitro culture of shoot apical meristems. Plant Sci. Letters, 22, 301-307.
- KEIL H.L. (1967) - Enhanced bacterial spot control on peach when dimethylsulfoxide is combined with sprays of oxytetracycline. Ann. N.Y. Acad. Sci., 141, 131-138.
- KING M. W. ET ROBERTS E.H. (1979) - The storage of recalcitrant seeds - Achievements and possible approaches. IBPGR Report, AGP : IBPGR/79/44. Rome : IBPGR Secretariat. 96 p.
- KOLB K. H. , JANICKE G. , KRAMER M. , SCHULZE P.E. ET RASPE G. (1967) - Absorption, distribution and elimination of labeled dimethylsulfoxide in man and animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. , 141, 85-95.
- KRULL E. ET LEVITT J. (1972) - Reversal by mercaptoethanol of protective effect of solutes against frost injury of red cabbage. Physiol. Plant., 27, 259-261.

LARKIN P.M. ET SCOWCROFT W.R. (1981) - Somaclonal variation - a novel of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60, 197-214.

LATTA R. (1971) - Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. Can. J. Bot. , 49, 1253-1254.

LEDDET C. (1976) - Sur les conditions de survie des cellules dissociées de parenchyme foliaire de Calystegia sepium soumises à la température de l'azote liquide. C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 282, 2083-2086.

LEGUAY J.J. ET GUERN J. (1977) - Quantitative effects of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured Acer pseudoplatanus cells. II. Influence of 2,4 -D metabolism and intracellular pH on the control of cell division by intracellular 2,4-D concentration. Plant Physiol., 60, 265-270.

LEONARD C.D. (1967) - Use of dimethylsulfoxide as a carrier for iron in nutritional foliar sprays applied to citrus. Ann. N.Y. Acad. Sci., 141, 148-158.

LIORET C. ET OLLAGNIER M. (1981) - La culture in vitro de tissus chez le palmier à huile. Oléagineux, 36, 111-112.

LOVELOCK J.E. ET BISHOP M.W.H. (1959) - Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulfoxide. Nature, 183, 1394-1395.

LUYET B.J. (1937) - The vitrification of organic colloïds and of protoplasms. *Biodynamica*, 1, 1-14.

LUYET B.J. ET HODAPP E.L. (1938)- Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 39, 433-434.

MAESHWARI S.C. , TYAGI A.K. , MALHOTRA K. ET SOPORY S.K. (1980) - Induction of haploïdy from pollen grain in Angiosperms - the current status. *Theor. Appl. Genet.* , 58, 193-206.

MANZHULIN A.V. , BUTENKO R.G. ET POPOV A.S. (1984) - Effect of preliminary preparation of potato apices on their viability after deep freezing. *Soviet Plant Physiol.*, 30, 910-914.

MARTIN J.P. ET RABECHault H. (1978) - Procédé de multiplication végétative de végétaux et plants ainsi obtenus. Brevet d'invention N° 76, 28361, Institut National de la Propriété Industrielle, Paris.

MARTIN J.P. , CAS S. ET RABECHault H. (1972) - Note préliminaire sur la culture in vitro de palmier à huile. *Oléagineux*, 27, 303-305.

MAZUR P. (1984) - Freezing of living cells : mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247, C125-142.

../...

MERYMAN H.T. ET WILLIAMS R.J. (1985) - Basic principles of freezing injury to plant cells ; natural tolerance and approaches to cryopreservation. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs", KARTHA K.K. ed, C R C Press, Boca Raton, Florida, 13-48.

MEUNIER J. ET GASCON J.P. (1972) - Le schéma général d'amélioration du palmier à huile à l'IRHO. *Oléagineux*, 27, 1-12.

MINOCHA S.C. ET NISSEN P. (1985) - Uptake of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid and indoleacetic acid in tuber slices of Jerusalem artichoke and potato. *J. Plant Physiol.*, 120, 351-362.

MIX G. (1983) - In vitro preservation of potato material. *Plant Genet. Res. Newsl.* , 51, 6-8.

MONNIER M. (1976) - Culture in vitro de l'embryon immature de Capsella bursa-pastoris Moench. *Rev. Cyt. Biol. Vegét.* , 39, 1-120.

MONNIER M. ET LEDDET C. (1978) - Sur l'acquisition de la résistance au froid des embryons immatures de Capsella bursa-pastoris. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 287, Série D, 615-618.

MONNIER M. ET LEDDET C. (1980) - Action du saccharose sur la résistance au gel des embryons immatures de capselle. *Bull. Soc. Bot. Fr.* , 127, 71-77.

MOREL G. ET WETMORE R.M. (1951) - Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.* , 38, 141-143.

- MORIGUSHI T. , AKIHAMA T. ET KOZAKI I. (1985) - Freeze-preservation of dormant pear shoot apices. *Japan J. Breed.*, 35, 196-199.
- MULLIN R.H. ET SCHLEGEL D.E. (1976) - Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *HortScience*, 11, 100-101.
- MYERS S.P. ET STEPONKUS P.L. (1986) - Permeation of dimethylsulfoxide into rye protoplasts during freezing of the suspending medium. *Cryo-letters*, 7, 41-54.
- NAG K.K. ET STREET H.E. (1973) - Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature*, 245, 270-272.
- NAG K.K. ET STREET H.E. (1975) - Freeze-preservation of cultured plant cells, II : The freezing and thawing phases. *Physiol. Plant.* , 34, 261-265.
- NITSCH J.P. (1969) - Experimental androgenesis in Nicotiana. *Phytomorphol.*, 19, 389-404.
- NOIRET J.M. , GASCON J.P. ET PANNETIER C. (1985) - La production de palmier à huile par culture in vitro. *Oléagineux*, 40, 365-372.
- ONG H.T. (1977) - Studies into tissue culture of oil palm. In *Intl. Dev. Oil Palm* , EARP D.A. et NEWALL W. eds., Kuala Lumpur, 9-15.

- PANNETIER C. ET BUFFARD-MOREL J. (1982) - Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotier, Cocos nucifera L. Oléagineux, 37, 349-354.
- PANNETIER C. , ARTHUIS P. ET LIEVOUX D. (1981) - Néoformation de jeunes plantes d'Elaeis guineensis à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. Oléagineux, 36, 119-122.
- PARANJOTHY K. (1984) - Oil Palm. In "Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 3 : Crop Species", AMMIRATO P.V., EVANS D.E., SHARP W.R. et YAMADA Y. eds., Macmillan, New-York, 591-605.
- POLGE C., SMITH A.U. ET PARKES A.S. (1949) - Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 666.
- POLGE E.J.C., WILMUT I. ET ROWSON L.E.A. (1974) - The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. Cryobiology, 11, 560.
- POULAIN C., RHISS A. ET BEAUCHESNE G. (1979) - Multiplication végétative en culture in vitro du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.). C.R. Séances Acad. Agric. Fr. , 65, 1151-1154.
- PRITCHARD H.W., GROUT B.W.W. ET SHORT K.C. (1986 a) - Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 1. Growth and ultrastructure of sycamore and soybean cell suspensions. Ann. Bot. , 57, 41-48.

PRITCHARD H.W. , GROUT B.W.W. ET SHORT K.C. (1986 b) - Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 2. Water relations and metabolic state of sycamore and soybean cell suspensions. Ann. Bot. , 57, 371-378.

PRITCHARD H.W. , GROUT B.W.W. ET SHORT K.C. (1986 c) - Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 3. Cryobiology of sycamore and soybean cell suspensions. Ann. Bot. , 57, 379-387.

PUA E.C. ET CHONG C. (1984) - Requirements for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for in vitro propagation of Malus robusta No. 5. Can. J. Bot. , 62, 1545-1549.

QUATRANO R.S. (1968) - Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethylsulfoxide. Plant Physiol. , 43, 2057-2061.

RABECHAULT H. ET MARTIN J.P. (1976) - Multiplication végétative du palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 283, 1735-1737.

RABECHAULT H., AHEE J. ET GUENIN G. (1970) - Colonies cellulaires et formes embryoïdes obtenues in vitro à partir de cultures d'embryons de palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq. var. Dura Becc.) . C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 270, 3067-3070.

RABECHAULT H. , AHEE J. ET GUENIN G. (1972) - Recherches sur la culture in vitro des embryons de palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq. var. Dura Becc.) . VIII. Action du lait de coco autoclavé en présence ou non de gélose et de lumière et en raison de l'âge des graines. Oléagineux, 27, 249-254.

.../...

RABECHAULT H. , BUFFARD-MOREL J. ET VARECHON C. (1974) - Recherches sur la culture in vitro des embryons de palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.). XI. Effets de la pression osmotique sur la croissance et le développement et sur l'absorption des sucres. Oléagineux, 29, 351-356.

RAJASHEKAR C. , GUSTA L.V. ET BURKE M.J. (1979) - Membrane structural transitions : probable relation to frost damage in hardy herbaceous species. In "Low Temperature Stress in Crop Plants , the Role of the Membrane", LYONS J.M. , GRAHAM D. et RAISON J.K. eds, Acad. Press, 255-274.

RALL W.F. ET FAHY G.M. (1985) - Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature , 313 , 573-575.

RALL W.F. , CZLONKOWSKA M. , BARTON S.C. ET POLGE C. (1984) - Cryoprotection of day-4 mouse embryos by methanol. J. Reprod. Fert. , 70, 293-300.

RAMMLER D.H. ET ZAFFARONI A. (1967) - Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. Ann. N.Y. Acad. Sci. , 141, 13-23.

.../...

REISCH B. (1984) - Genetic variability in regenerated plants. In "Hand book of Plant Cell Culture, Vol. 1, Techniques for Propagation and Breeding", EVANS D.A., SHARP W.R., AMMIRATO P.V. et YAMADA Y. eds., Macmillan Publish. Co., New-York, 748-769.

RENARD J.L. (1976) - Diseases in Africa and South America. In "Oil Palm Research" , Developments in Crop Science (1), CORLEY R.H.V., HARDON J.J. et WOOD B.J. eds., Elsevier Publ. Co., 447-466.

RENARD J.P. ET BABINET C. (1984) - High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. J. Exp. Zool. , 230, 443-448.

REUFF I. ET REINHARD E. (1986) - Long term storage of Coleus blumei suspension cultures and cryopreservation of callus. Abstr. 34th Annual Cong. on Medicinal Plant Research, Hamburg, Sept. 1986, 1.

REUVENI O. (1979) - Embryogenesis and plantlet growth of date palm (Phoenix dactylifera L.) derived from callus tissue. Hort. Sci. , 14, 457-458.

.../...

REYNOLDS J.F. ET MURASHIGE T. (1979) - Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In Vitro*, 15, 383-387.

ROBERTS E.H. (1973) - Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. and Tech.*, 1, 499-514.

ROBERTS E.H. ET KING M.W. (1980) - Storage of recalcitrant seeds . In "Crop Genetic Resources - The Conservation of Difficult Material", WITHERS L.A. et WILLIAMS J.T. eds. *Int. Union Biol. Sci. Ser. B42*, IUBS, Paris, 39-48.

ROSE J.B. , DUNWELL J.M. ET SUNDERLAND N. (1986) - Anther culture of Sorghum bicolor (L.) Moench. 1. Effect of panicle pretreatment, anther incubation temperature and 2,4-D concentration. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6, 15-22.

ROWE A.W. (1966) - Biochemical aspects of protective agents in freezing and thawing. *Cryobiology*, 3, 12-18.

SAKAI A. (1966) - Survival of plant tissue at superlow temperature. IV. Cell survival and rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol.*, 41, 1050-

SAKAI A. (1979) - Freezing avoidance mechanism of primordial shoots of conifer buds. *Plant Cell Physiol.*, 20, 1381-1390.

SAKAI A. (1985) - Cryopreservation of shoot-tips of fruit trees and herbaceous plants. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs". KARTHA K.K. ed. , CRC Press, Boca Raton, Florida, 135-158.

- SAKAI A. ET SUGAWARA Y. (1973) - Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant Cell Physiol.*, 14, 1201-1204.
- SAKAI A. ET YOSHIDA S. (1967) - Survival of plant tissue at super-low temperature. VI. Effects of cooling and warming rates on survival. *Plant Physiol.*, 42, 1695-
- SAKAI A. ET YOSHIDA S. (1968) - The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology*, 5, 160-174.
- SCOWCROFT W.R. (1984) - Genetic variability in tissue culture : impact on germplasm conservation and utilization. IBPGR Report AGPG : IBPGR/84/152, Rome, 41 p.
- SEIBERT M. (1976) - Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C . *Science*, 191, 1178-1179.
- SEIBERT M. ET WETHERBEE P.J. (1977) - Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. *Plant Physiol.*, 59, 1043-1046.
- SEITZ U., ALFERMANN A.W. ET REINHARD E. (1983) - Stability of biotransformation capacity in *Digitalis lanata* cell cultures after cryogenic storage. *Plant Cell Reports*, 2, 273-276.
- SHARMA D.R., DAWRA S. ET CHOWDURY J.B. (1984) - Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) C.V. "Khadravi" through tissue culture. *Indian J. Exp. Biol.*, 22, 596-598.

- SHARP W.R., SONDAHL M.R., CALDAS L.S. ET MARAFFA S.B. (1980) - The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Hort. Rev., 2, 268-310.
- SLADE N.P., TAKEDA T. ET SQUIRES E.L. (1985) - Cryopreservation of the equine embryo. Equine Vet. J., Suppl. 3, Abstr.40.
- SMITH W.K. ET THOMAS J.A. (1973) - The isolation and in vitro cultivation of cells of Elaeis guineensis. Oléagineux, 28, 123-127.
- SOPORY S.K. , (1979) - Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid Solanum tuberosum. Can. J. Bot. , 57, 2691-2694.
- SRINAVASAN C., LITZ R.E., BARKER J. ET NORSTOG K. (1985) - Somatic embryogenesis and plantlet formation from Christmas palm callus. Hortsci., 20, 278-280.
- STARITSKY G. (1970) - Tissue culture of the oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) as tool for its vegetative propagation. Euphytica, 19, 288-292.
- STARITSKY G., DEKKERS A.J. , LOUWAARS N.P. ET ZANDVOORT E.A. (1986) - In vitro conservation of aroid germplasm at reduced temperatures and under osmotic stress. In "Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications". WITHERS L.A. et ALDERSON P.G. eds., Butterworths, 277-283.

- STRAUSS A., FANKHAUSER H., ET KING P.J. (1985) - Isolation and cryopreservation of O-methylthreonine-resistant Rosa cell lines altered in the feedback sensitivity of L-threonine deaminase. *Planta*, 163, 554-562.
- SURRE C. ET ZILLER R. (1963) - "Le palmier à huile". Maisonneuve et Larose, eds. Paris, 243 p.
- TAN G.Y. (1976) - Cytology and Cytogenetics. In "Oil Palm Research", Development in Crop Science (1), CORLEY R.H.V., HARDON J.J. et WOOD B.J. eds, Elsevier Publ. Co.,- 145-154.
- TESTARD J., LASSALLE B., BELAISCH-ALLART J., FORMAN R. ET FRYDMAN R. (1986) - Cryopreservation does not affect future of human fertilized eggs. *The Lancet*, sept. 6, 569.
- THOMAS V. ET RAO P.S. (1985) - In vitro propagation of oil palm (Elaeis guineensis Jacq. var. Tenera) through somatic embryogenesis in leaf-derived callus. *Current Sci.* , 54, 184-185.
- TISSERAT B. (1979) - Propagation of date palm (Phoenix dactylifera L.) in vitro. *J. Exp. Bot.*, 30, 1275-1283.
- TISSERAT B., ULRICH J.M. ET FINKLE B.J. (1981) - Cryogenic preservation and regeneration of date palm tissue. *Hortsci.*, 16, 47-48.
- TISSERAT B. (1984) - Propagation of date palms by shoot-tip cultures. *Hortsci.*, 19, 230-231.

TOWILL L.E. (1981a) - Survival at low temperature of shoot tips from cultivars of Solanum tuberosum group tuberosum. Cryo-letters 2, 373-382.

TOWILL L.E. (1981 b) - Solanum etuberosum : a model system for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing Solanum species. Plant Sci. Letters, 20, 315-324.

TOWILL L.E. (1983) - Improved survival after cryogenic exposure of shoot-tips derived from in vitro plantlets cultures of potato. Cryobiology, 20, 567-573.

TOWILL L.E. (1984) - Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from Solanum tuberosum groups. Andigena, Sterrotomum, Tuberosum, and other tuber-bearing solanum species. Cryo-letters, 5, 319-326.

TOWILL L.E. ET MAZUR P. (1974) - Studies on the reduction of 2, 3, 5- triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can. J. Bot., 53, 1097-1102.

TURKINA M.V. ET SOKOLOVA S.V. (1972) - Membrane transport of sucrose in plant tissue. Soviet. Plant Physiol., 19, 773-779.

TURNHAM E. ET NORTHCOTE D.H. (1982) - The use of acetyl- Co A carboxylase activity and changes in wall composition as measures of embryogenesis in tissue cultures of oil palm (Elaeis guineensis). Biochem. J. , 208, 323-332.

TURNHAM E. ET NORTHCOTE D.H. (1984) - The incorporation of (1 - ¹⁴ C) acetate into lipids during embryogenesis in oil palm tissue cultures. *Phytochem.*, 23, 35-39.

UEMURA M. ET SAKAI A. (1980) - Survival of carnation (Dianthus caryophyllus L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. *Plant and Cell Physiol.*, 21, 85-94.

ULRICH J.M. , FINKLE B.J. , MOORE P.H. ET GINOZA H. (1979) - Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen on survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology*, 16, 550-556.

ULRICH J.M. , FINKLE B.J. ET TISSERAT B.H. (1982) - Effects of cryogenic treatment on plantlet production from frozen and unfrozen date palm callus. *Plant Physiol.*, 69, 624-627.

ULRICH J.M. , FINKLE B.J. , MAC KEY B.E. , SCHAEFFER G.W. ET SHARPE F. (1984 a) - Responses of six rice callus cultures to deep-frozen temperatures. *Crop Science*, 24, 82-85.

ULRICH J.M. , MICKLER R.A. , FINKLE B.J. ET KARNOSKY D.F. (1984b) - Survival and regeneration of american elm cultures after beeing frozen in liquid nitrogen. *Can. J. For. Res.* , 14, 750-753.

VALLADE J. (1965) - Recherches morphologiques et cytologiques sur l'embryon d'Elaeis guineensis Jacq. quiescent et en cours de germination. Mémoire d'Etudes Supérieures, Université de Dijon, 71 p.

- VAN BEL A.J.E. , MOL F. ET AMMERLAAN A. (1986) - Comparison of the uptake kinetics of valine and sucrose and their light-reactivity in mesophyll cells of Commelina benghalensis. J. Plant Physiol., 123, 37-44.
- VAN DER MEER J.P. ET SIMPSON F.J. (1984) - Cryopreservation of Gracilaria tikvahiae (Rodophyta) and other macrophytic marine algae. Phycologica, 23, 195-202.
- VASIL I.K. (1985) - Somatic embryogenesis and its consequences in the gramineae. In "Tissue Culture in Forestry and Agriculture", HENKE R.R., HUGHES K.W. , CONSTANTIN M.P. et HOLLAENDER A. , Plenum Publ. Corp., 31-47.
- WANAS W.H. ET CALLOW J.A. (1986) - Growth limitation for the conservation of pear genotypes. In " Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications". WITHERS L.A. et ALDERSON P.G. eds, Butterworths, 285-290.
- WATANABE K. , MITSUDA H. ET YAMADA Y. (1983) - Retention of metabolic and differentiation potentials of green Lavandula vera callus after freeze-preservation. Plant and Cell Physiol., 24, 119-122.
- WATANABE K., YAMADA Y., UENO S. ET MITSUDA H. (1985) - Change of freezing resistance and retention of metabolic and differentiation potentials in cultured green Lavandula vera cells. which survived repeated freeze-thaw procedures. Agr. Biol. Chem. Tokyo , 49, 1727-1731.

WEBER G. , ROTH E.J. ET SCHWEIGER H.G. (1983) - Storage of cell suspensions and protoplasts of Glycine max (L.) Merr, Brassica napus (L.) Datura innoxia (Mill.) and Daucus carota (L.) by freezing. Z. Pflanzenphysiol. , 109, 29-39.

WESCOTT R.J. (1981 a) - Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. Potato Res. , 24, 331-342.

WESCOTT R.J. (1981 b) - Tissue culture storage of potato germplasm. 2. Use of growth retardants. Potato Res. , 24, 343-352.

WHITTINGHAM D.G. , LEIBO S.P. ET MAZUR P. (1972) - Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science, 178, 411-414.

WILLADSEN S.M. , POLGE C. , ROWSON L.E.A. ET MOOR R.M. (1976) - Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fert. , 46, 151-154.

WILMUT I. (1972) - The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agents and stage of development on survival of mouse embryos freezing and thawing. Life Sci. , 11, 1071-1079.

WITHERS L.A. (1978) - Freeze-preservation of cultured cells and tissues. In "Frontiers of Plant Tissue Culture", THORPE T.A. ed., Calgary, IAPTC , 297-306.

WITHERS L.A. (1979) - Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (Daucus carota). Plant Physiol., 63, 460-467.

WITHERS L.A. (1980) - Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR, Technical Report, AGP : IBPGR/80/8, Rome : IBPGR Secretariat, 91 p.

WITHERS L.A. (1982) - The development of cryopreservation techniques for plant cell, tissue and organ culture. In Proc. 5th Intl. Congr. Plant Cell Tissue Culture, FUJIWARA A. ed., Tokyo, 793-794.

WITHERS L.A. (1983) - Germplasm storage in plant biotechnology. In "Plant Biotechnology". MANTELL S.H. et SMITH H. eds. , Society for Experimental Biology Seminar Series 18, Cambridge University Press, 187-218.

WITHERS L.A. (1986) - In vitro approaches to the conservation of plant genetic resources. In "Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications", WITHERS L.A. et ALDERSON P.G. eds., Butterworths, 261-276.

ZAVALA M.E. ET SUSSEX I.M. (1986) - Survival of developing wheat embryos and bean axes following cryoprotection and freezing in liquid nitrogen. J. Plant Physiol., 122, 193-197.

Réalisé avec le concours du Service Imprimerie de la 5ème Circonscription

1,Place Aristide-Briand-92190 Meudon-Tél.45 34 75 50-Télex 204135

RÉSUMÉ

Cette étude concerne la mise au point d'une méthode de cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile.

Les massifs d'embryoïdes susceptibles de résister à la congélation sont obtenus après 2 mois de culture sur un milieu contenant 0,3M de saccharose. Ils subissent un prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose. La congélation est réalisée soit par immersion directe des ampoules cryobiologiques dans l'azote liquide, soit après un refroidissement progressif programmé jusqu'à -100°C. Après un réchauffement rapide, les massifs d'embryoïdes sont post-traités pendant 3 semaines sur des milieux contenant 10^{-6} M de 2,4-D, pour assurer la reprise ultérieure de la prolifération. L'emploi de cette auxine pendant le post-traitement n'est plus nécessaire si l'on congèle des structures embryogènes prélevées sur cal primaire. Les taux de reprise varient de 8 à 30 % selon les clones et en fonction de certains paramètres expérimentaux : durée du prétraitement, vitesse de congélation. Une durée de conservation de 15 mois dans l'azote liquide ne modifie pas le taux de reprise. Les plantules issues de matériel cryoconservé qui ont été enracinées puis acclimatées en serre présentent un développement comparable à celui des témoins non congelés.

La méthode proposée est susceptible d'être utilisée pour la création de banques d'embryons somatiques de palmier à huile. Elle devrait aussi pouvoir être adaptée à la conservation d'embryons zygotiques de palmier à huile et de cocotier et à celle d'embryons d'autres espèces d'intérêt économique.

MOTS-CLEFS : Cryoconservation - Elaeis guineensis Jacq. - Embryons somatiques - Acides 2,4-dichlorophénoxyacétique.

SUMMARY

This work concerns the perfecting of a method of cryopreservation of oil palm somatic embryos.

The clumps of embryoïds likely to survive freezing are obtained after a 2 month culture on a medium containing sucrose 0.3M. They undergo a pretreatment of 7 days on a medium containing sucrose 0.75M. Freezing is carried out either by direct immersion of the cryobiologic ampoules in liquid nitrogen or after a progressive programmed cooling until -100°C. After a rapid thawing, the clumps of embryoïds are post-treated for 3 weeks on media containing 2,4-D 10^{-6} M, in order to ensure the later recovery of adventive embryogenesis. The use of this auxin during the post-treatment can be avoided if embryogenic structures cutt off directly on primary calluses are frozen instead of somatic embryos. The recovery rates vary from 8 to 30 % according to the clone and as a function of various parameters : duration of the pretreatment, cooling rate. A 15 month storage duration in liquid nitrogen does not modify the recovery rate. The plantlets originating from frozen material, which have been rooted and acclimatized in a greenhouse develop as well as plantlets originating from unfrozen material.

This method is likely to be used for setting up banks of oil palm embryoïds. It could be adapted in order to conserve zygotic embryos of oil palm and coconut and embryos of other economically important species.

KEYWORDS : Cryopreservation - Elaeis guineensis Jacq. - Somatic embryos - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.