

Chapitre 4. Culture d'embryons

4.1. Culture d'embryons immatures *in vitro*

1. Généralités

Les embryons sont prélevés quelques jours après la fécondation et non à maturité de la graine (Elle permet d'éviter la phase de maturation de la graine). La survie et le développement de ce dernier ne sont alors possibles que par prélèvement et repiquage sur un milieu de culture approprié (**Branchard, 1984**).

Un très jeune embryon risque d'avoir une croissance perturbée et plus lente, contrairement à un embryon plus développé qui est par ailleurs plus facile à prélever.

Selon les espèces, les embryons sont prélevés plus ou moins tôt après la fécondation. En effet, un très jeune embryon risque d'avoir une croissance perturbée et plus lente, contrairement à un embryon plus développé qui est par ailleurs plus facile à prélever. Les embryons sont ensuite mis en culture pour régénérer une plante entière (**Figure 23**).

Veen en (1963) a montré que les cytokinines et les auxines sont susceptibles d'augmenter la survie des embryons en culture. Il est observé que le taux de survie des embryons cultivés *in ovulo* est toujours supérieure à celui des embryons isolés, bien qu'il ne soit pas possible de cultiver des embryons isolés de 25 μ m, ces embryons survivent toujours dans des ovules cultivés *in vitro*.

2. Application de la culture d'embryons immatures du tournesol (**Figure 23**)

- Cette technique est très pratiquée chez le tournesol (dormance sont forts).
- Les jeunes graines sont prélevées 8 à 15 jours après la fécondation, selon le génotype.
- Elles sont désinfectées et disséquées.
- Les embryons ainsi isolés sont mis en culture en boîte de pétri.
- Au bout de 3 à 5 jours, on observe la formation de cotylédons chlorophylliens.
- Ils sont alors transférés en milieu d'enracinement,
- Les plantules obtenues sont mises en acclimatation puis repiquées sur terreau.

NB : Toutes les étapes de l'extraction des graines du capitule jusqu'au repiquage sur terreau sont réalisées en conditions non stériles.

- Les embryons immatures sont placés directement sur papier filtre imbibé d'une solution nutritive, jusqu'au développement des cotylédons.
- Lorsque des embryons de différentes longueurs sont excisés et déposés sur un milieu nutritif, on peut constater que la survie des embryons augmente avec leur taille.
- Les embryons doivent disposer d'une source de sucre (généralement le saccharose).
NB : La concentration de saccharose doit être plus élevée que la concentration que l'on emploie ordinairement dans les milieux utilisés pour la culture des tissus.
- L'embryon croît à l'intérieur de la graine par assimilation de l'endosperme.

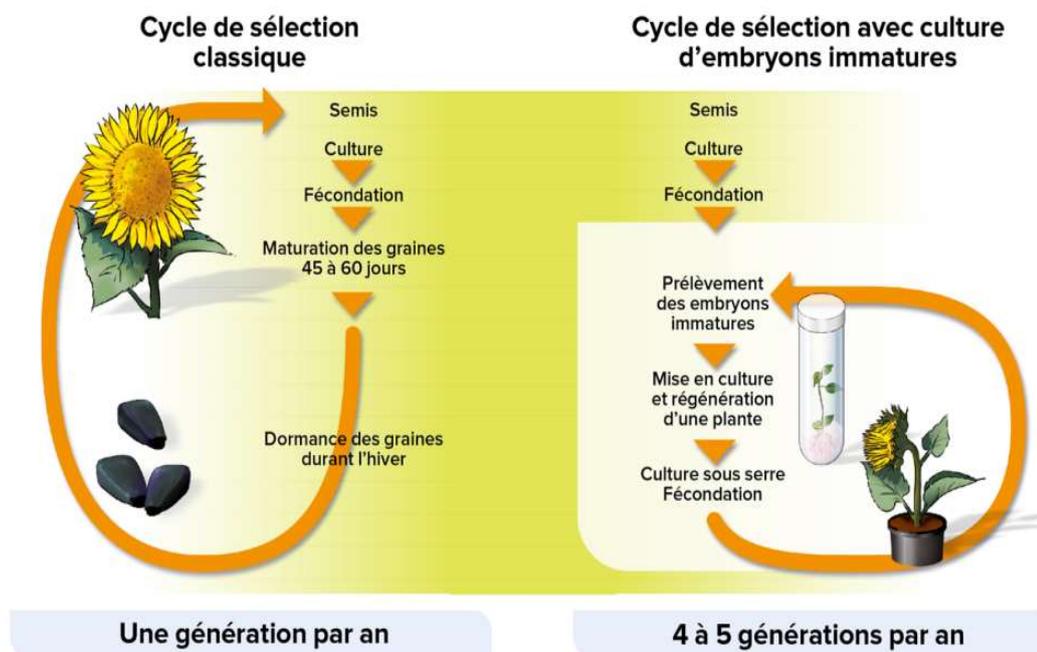


Figure 23. Culture d'embryons immatures *in vitro* du tournesol

3. Avantages de la culture d'embryons immatures

- Réduire fortement la dormance des graines fraîchement récoltées, et ainsi d'assurer un développement homogène des embryons.
- Permet un gain de temps, par réduction de la durée entre deux générations.
- On peut cultiver plusieurs générations par an et accélérer les procédures classiques de sélection : la fixation et la conversion de lignées, car plusieurs cycles d'autofécondations ou de rétrocroisements successifs peuvent être réalisés chaque année.
- Cette technique est très utilisée chez le tournesol et dans une moindre mesure chez le maïs.
- Permet d'éviter la phase de maturation et à la levée de dormance des graines.

4.2. Sauvetage d'embryons interspécifiques

1. Introduction

Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique après fécondation un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif.

L'avortement d'embryons issus de croisements interspécifiques est attribué à un développement retardé de l'albumen, par incompatibilité entre les tissus embryonnaires et maternels.

La récupération de l'embryon doit être effectuée avant son avortement, entre 4 et 16 jours après la fécondation, selon les espèces. Il est souvent nécessaire de réaliser ce prélèvement sous une loupe binoculaire.

2. Technique de sauvetage d'embryons interspécifiques chez la tomate (Figure24)

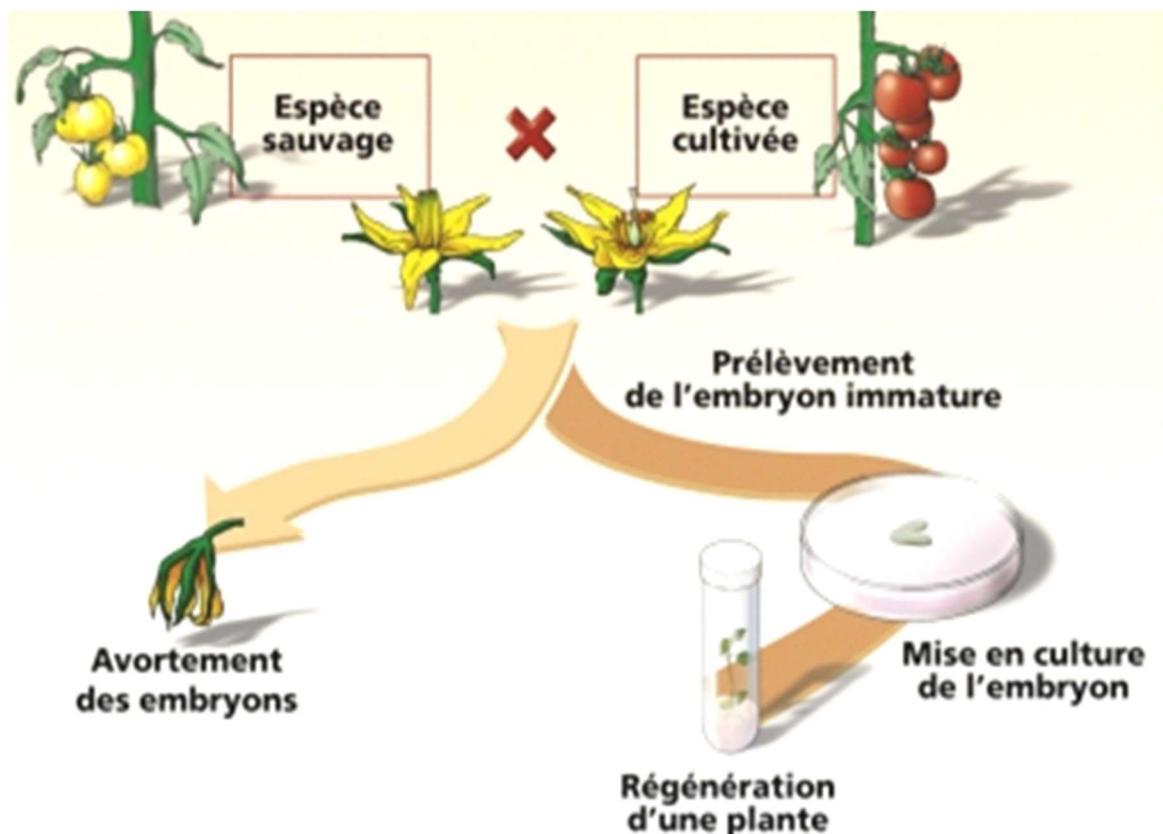


Figure 24. Sauvetage d'embryons interspécifiques chez la tomate

- La tomate cultivée, *Lycopersicon esculentum*, du fait de son autogamie, possède une variabilité génétique faible.
- En revanche, les tomates sauvages possèdent de nombreux gènes de résistance aux maladies notamment l'espèce *Lycopersicon peruvianum*.
- Les barrières d'incompatibilité avec les espèces sauvages génétiquement les plus éloignées de la tomate cultivée sont éliminés avec le sauvetage d'embryons.
- L'embryon est prélevé et cultivé sur un milieu artificiel riche en sucre, permettant la régénération d'une plante nouvelle.
- Les graines immatures sont désinfectées en surface et après dissection, après deux semaines, les embryons ont généralement atteint le stade cotylédonaire.
- Le transfert sur un milieu riche en hormones de croissance permet la production de plantes.

4.3. Embryogenèse somatique

1. Principe de l'embryogenèse somatique

L'embryogénèse somatique est l'une des principales méthodes de la culture *in vitro*, elle a pour but la régénération d'une plante entière à partir de fragment de plantes sous conditions contrôlées en passant par la formation d'embryons somatique.

Le développement de l'embryogénèse somatique se base principalement sur la capacité de totipotences des cellules végétales.

En effet l'initiation de l'embryogénèse somatique se fait à partir de cellules dites somatique qui a leur tour sous certaines conditions peuvent revenir à l'état de totipotence et initier un programme de régénération à partir du développement d'embryons somatiques (**Clabaut, 2009**), c'est ce qu'on appelle une reprogrammation cellulaire et/ou Transdifférenciation.

L'embryogenèse somatique est la Génération d'embryons à partir d'un méristème, d'une cal ou de suspensions, ce qui rend possible une production en fermenteur et réduit considérablement le coût de production. Ainsi les taux de multiplication sont généralement importants et chez certaines espèces.

Ces embryons peuvent se développer à partir des cellules à $2n$ chromosomes issues de tissus, organes ou cellules isolées.

Le développement de l'embryon ressemble étroitement à celui de l'embryon zygotique à la fois morphologiquement et physiologiquement avec : l'existence d'un axe polarisé terminé par un méristème de tige et un méristème de racine (**Figure 25**).

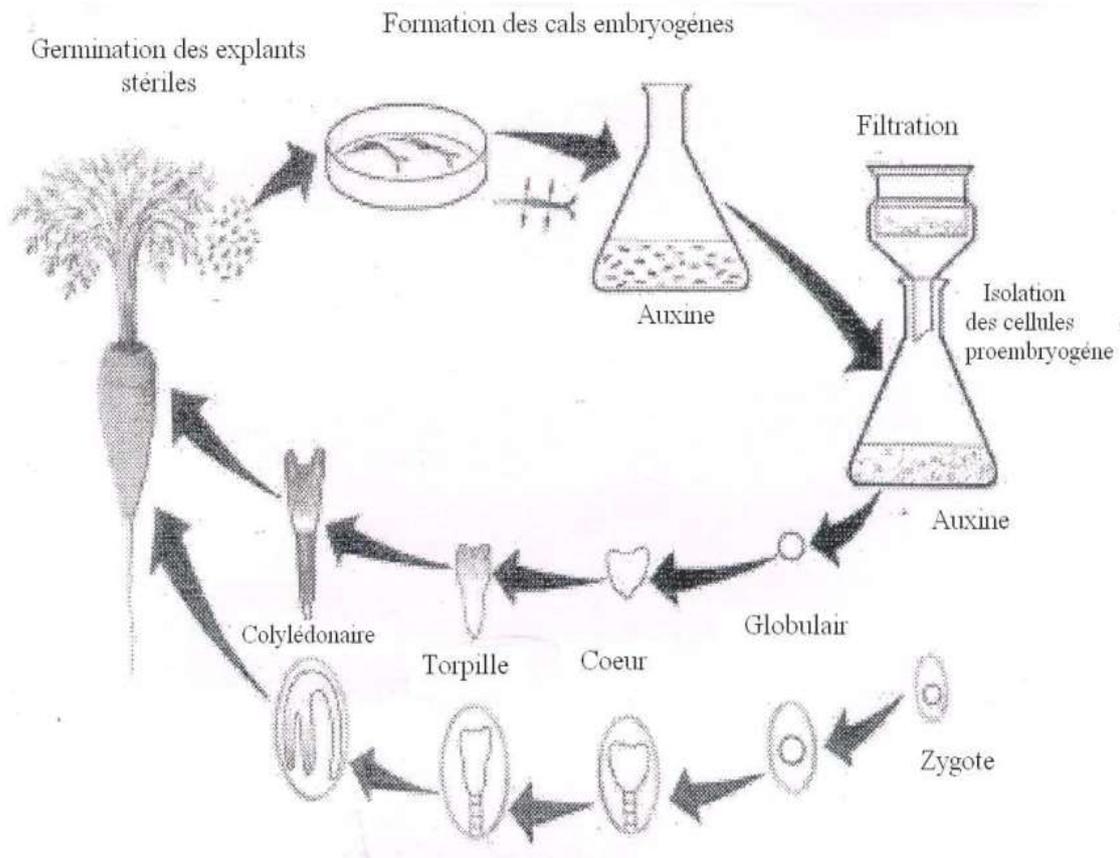


Figure 25. Embryogenèse somatique et zygotique chez la carotte (Steward et al., 1958).

Son développement s'effectue selon une séquence de stades définis dont les principaux sont : le *stade globulaire, cordiforme, torpille, et cotylédonaire* (Figure 26).

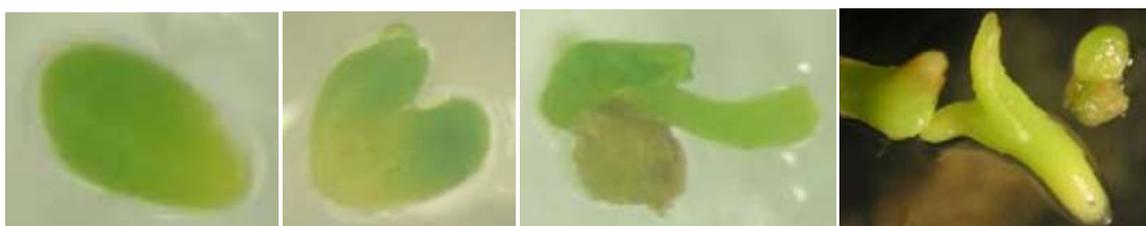


Figure 26. Stades de développement successifs au cours de l'embryogenèse (de gauche à droite) : Globulaire, cordiforme, torpille, cotylédonaire

Les proembryons globulaires pourraient provenir d'une cellule somatique unique à la suite de divisions successives. Une bonne démonstration de l'aptitude à l'embryogenèse des cellules séparées est la production d'embryoïdes à partir de cellules provenant de protoplastes (Grambow et al., 1972). Mais le devenir des agrégats cellulaires provenant

de cellules séparées n'est pas nécessairement uniforme. **Homès et Guillaume (1967)** constatent que les très jeunes embryons somatiques sont constitués de petites cellules contenant de l'amidon, tandis que beaucoup d'agrégats cellulaires produits dans les conditions expérimentales de **Steward (1958)** sont surtout formés de grandes cellules.

Halperin (1966) observe le développement d'embryoïdes à partir de cellules superficielles d'agrégats cellulaires. Ceux-ci joueraient le rôle de nourrice apportant aux cellules superficielles qui évoluent en embryoïdes, les substances trophiques et les régulateurs de croissance nécessaires. A partir du stade globulaire, les embryoïdes seraient aptes à réaliser leur développement d'une manière indépendante et pourraient alors se séparer de l'agrégat originel.

L'embryogenèse somatique n'exige pas nécessairement, pour préalable, la culture de cellules séparées en milieu liquide agité. Elle a été assez souvent observée sur milieu gélosé à partir de calcs plus ou moins dissociés.

Il est important de citer que l'initiation du programme d'embryogenèse somatique est contrôlée par le génotype et la nature de l'explant, et le choix du stimulant externe se fait suivant ces derniers.

2. Principales étapes de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est un processus de régénération qui, d'après **Von arnold et al. (2008)** se déroule en 5 étapes essentielles qui sont :

- Initiation des cultures embryogènes par culture de l'explant initial sur un milieu contenant des régulateurs de croissance surtout l'auxine avec souvent des cytokinines. Cette transition de la cellule somatique à l'état embryogène est un processus complexe comprenant la dédifférenciation, la réactivation des divisions cellulaires et une reprogrammation du développement (Féher et al., 2003). L'initiation de la voie de l'embryogenèse est limitée à certaines cellules de l'explant qui subissent un ensemble de modifications et se transforment en cellules dédifférenciées compétentes pour l'embryogenèse.
- Prolifération des cultures embryogènes sur milieu solide ou liquide contenant une composition en régulateurs de croissance similaire à celle de l'étape précédente. Pour la propagation à grande échelle, il est souvent préférable d'établir des suspensions cellulaires (**Von Arnold et al., 2002**).

- Prématuration des embryons somatiques sur milieu généralement dépourvu de régulateurs de croissance ce qui inhibe la prolifération cellulaire mais stimule la formation des embryons et le début du développement (**Von Arnold et al., 2002**). L'élimination ou la réduction de l'auxine dans le milieu de culture est en général préconisée durant cette phase.

Avec cette réduction, le blocage de l'expression des gènes nécessaires au passage au stade cordiforme est levé (**Zimmerman, 1993**).

- Maturation des embryons somatiques par culture sur un milieu contenant l'ABA et/ou un faible potentiel osmotique.
- Développement de plants sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance.

3. Induction de l'embryogenèse somatique

La phase de l'induction de l'embryogénèse nécessite un stimulant externe tels que des régulateurs de croissance spécifiques ou bien l'application de différents stress. Sous ces conditions les cellules compétentes deviennent déterminées à former un embryon, d'où l'appellation de cellules embryogènes.

Ces dernières ont réussi et fini le passage de l'état somatique à l'état embryogène, cependant sur le même amas cellulaire, on peut trouver des cellules compétentes qui n'ont pas encore acquis la capacité embryogène. Dans ce cas, l'addition de stimulant externe est encore nécessaire. La formation d'embryons somatiques est assurée par l'initiation d'un nouveau programme de différenciation.

L'explant dans un premier temps placé dans un milieu primaire contenant de l'auxine pour la différenciation (former des amas globulaires ou amas proembryogène). (Cellules de ces amas sont caractérisées par un cytoplasme dense et une taille réduite).

Après cette période d'initiation embryonnaire, le transfert dans un milieu secondaire sans auxine permettra le développement des embryons somatiques. Ces structures sont hautement organisées et consistent soit en primordia racinaires soit en tissus méristématiques capables de régénérer des pousses feuillées et des racines (**Figure 25**).

- Malgré l'abondance des embryons au stade globulaire et cordiforme, rare sont ceux qui atteignent les stades supérieurs.
- Les populations d'embryons ne sont pas uniformes, les embryons somatiques peuvent être transformés en semences artificielles. Ils sont enrobés par un gel composé d'alginate

avec les éléments nutritifs nécessaires à la germination de l'embryon. Des plantes complètes sont obtenues directement suite au processus de germination.

- L'ensemble est protégé de dessiccation par un film de résine soluble dans l'eau (polyox).
- La durée de conservation est actuellement faible mais pourrait s'allonger par l'induction de la dormance. Actuellement les graines artificielles ne peuvent être conservées, à l'état humide et au froid, qu'une huitaine de jours. Il reste donc de nombreux problèmes à résoudre.

4. Transition de cellules somatiques en cellules embryogènes :

Lors du changement d'état, plusieurs événements caractéristiques peuvent être observés comme le remodelage de la chromatine. Ces événements semblent être influencés par la position cellulaire mais aussi par l'action d'inducteurs comme les hormones.

i. Le remodelage de la Chromatine :

La dédifférenciation cellulaire chez les plantes comme chez les animaux est caractérisée par un changement d'expression de gènes, qui est gouverné par une partie du génome qui est transcrit (Euchromatine) et une autre partie qui est réprimée (Hétérochromatine). Lors de la reprogrammation cellulaire cette balance est modifiée, et contrôlée par différents importants facteurs et de complexes protéiques.

ii. La position cellulaire :

L'information apportée par la position d'une cellule semble un facteur important lors de la programmation mais aussi lors de reprogrammation cellulaire et l'organisation de la chromatine. Des modifications dans la position cellulaire sont accompagnées par un changement d'état cellulaire et un changement rapide de l'accessibilité d'une région du génome.

iii. L'action des hormones :

Plusieurs études ont réalisé pour identifier les gènes clés qui gouvernent l'embryogénèse somatique en réponse à l'induction du signal. Les agents utilisés

pour induire l'embryogénèse *in vitro* sont multiples. L'utilisation du 2,4-D (Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique). Est la plus couramment utilisée. Les cellules cultivées *in vitro* acquièrent leur compétence à former des embryons.

3. Modèles de l'embryogénèse somatique :

1. Embryogénèse somatique directe

L'embryogénèse somatique peut être directe ou bien indirecte ; quand les embryons somatiques sont obtenus à partir de cellules somatiques qui ont subi une dédifférenciation puis une redifférenciation au sein du tissu dont elle est issue sans le passage par la phase de la callogénèse, on parle alors d'une embryogénèse somatique directe (**Figure 27**).

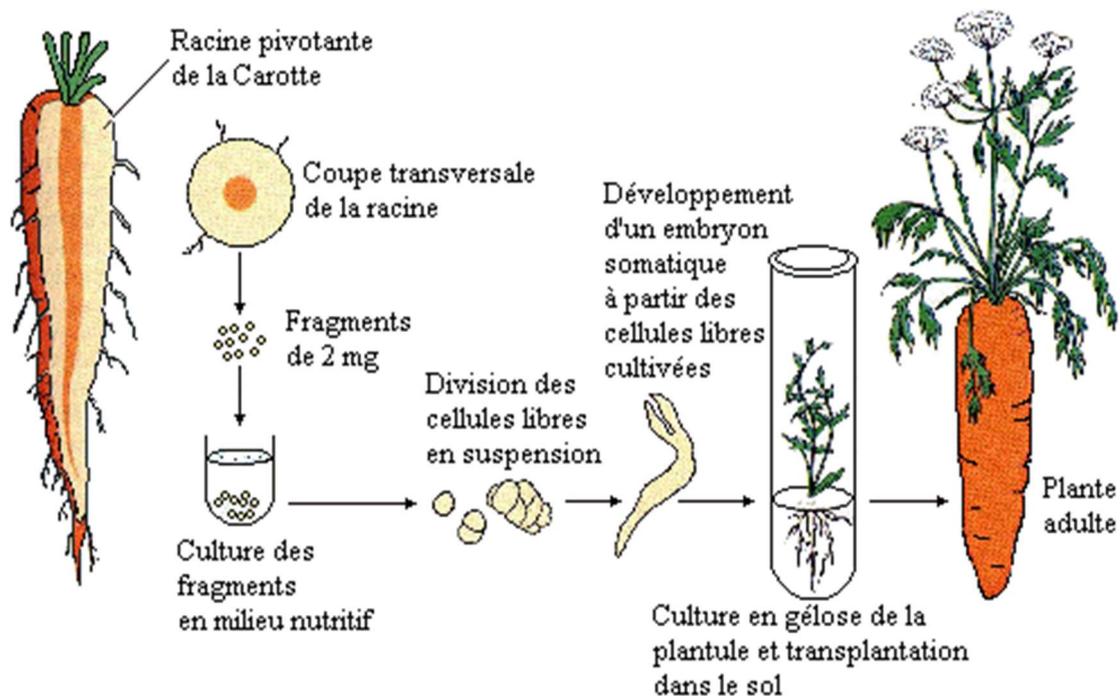


Figure 27. Induction de l'embryogénèse somatique directe

- L'embryon apparaît directement sur l'explant mis en culture.
- Les embryons sont issus de cellules déjà prédéterminées.
- L'environnement *in vitro* sert uniquement à déclencher le processus de divisions organisées menant à l'embryogénèse.
- L'embryon peut se former au sein d'une masse qui peut être assimilée à un cal.

- Sur le plan histologique cette masse est formée presque entièrement de proembryons.
- Ce cas est généralement considéré comme faisant partie de l'embryogenèse directe.

2. Embryogenèse somatique indirecte

L'embryogenèse somatique indirecte nécessite le passage par l'état cal qui est caractérisé par un ensemble d'amas cellulaire indifférencié dont certains vont se développer en embryons somatiques. C'est le cas de notre étude sur le développement de l'embryogenèse somatique à partir d'embryon mature du blé dur.

- Dans ce cas, une phase intermédiaire de callogenèse est nécessaire à l'embryogenèse (Figure 28).

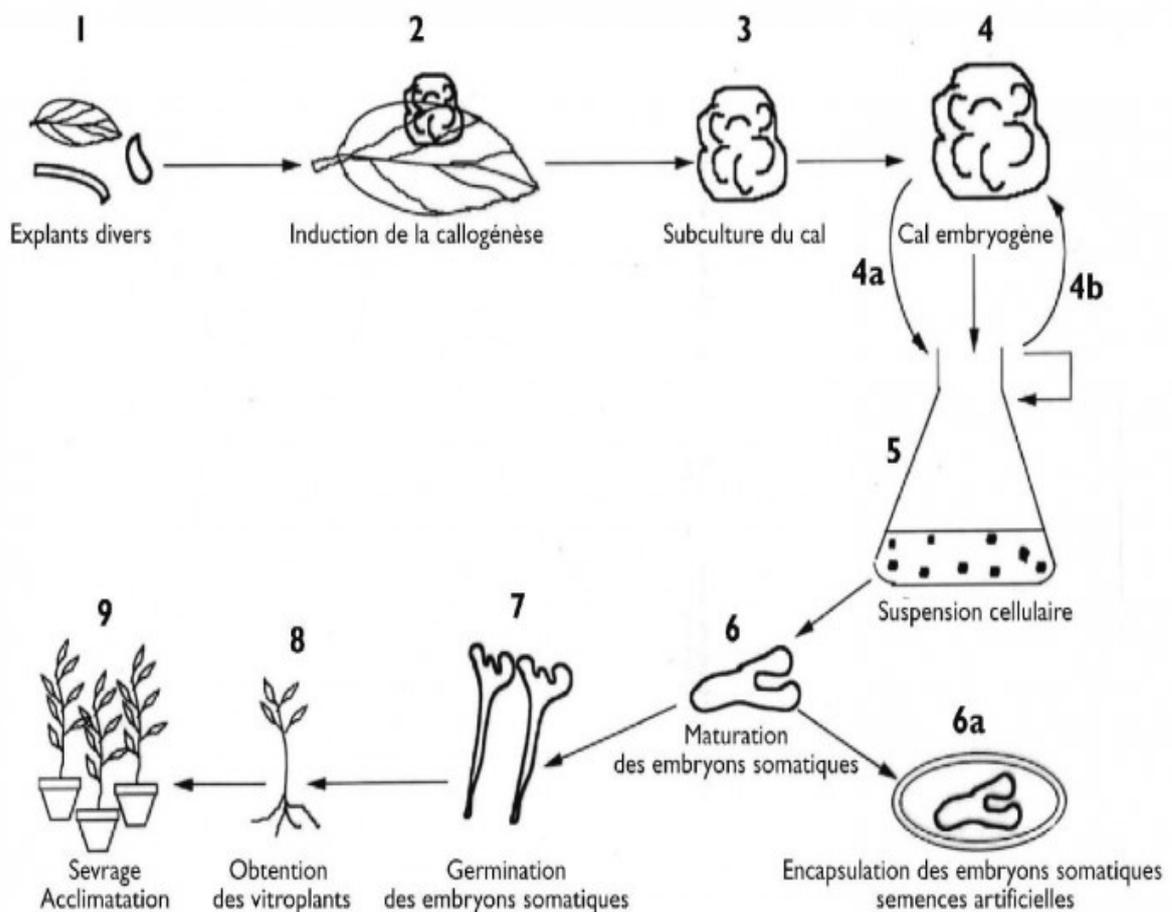


Figure 28. Induction de l'embryogenèse somatique indirecte

6. Avantage de l'embryogenèse somatique

- Les embryons somatiques présentent certains avantages pour la multiplication des plantes. Ils proviennent en principe d'une seule cellule ou un ensemble de cellules et ils

devraient donner des plantes génétiquement uniformes contrairement à celles produites par callogenèse.

- Production industrielle (culture en bioréacteur), car les embryons peuvent être induits à partir de cellules cultivées en suspension. Donc une technique de multiplication s'adapte à l'automatisation, ce qui permet de réduire les coûts de production.
- Le rendement en plantes produites est très élevé.
- Les embryons obtenus sont d'origine unicellulaire, il n'y a pas de problème de chimères.
- Bon moyen pour produire des clones d'individus élites chez les ligneux.
- Souvent utilisée pour le clonage surtout pour les espèces (microbouturage difficile).
- Technique très productive surtout en suspensions cellulaires, Obtention rapide de semences « d'élite » pour des espèces ligneuses.
- Manipulations simples par rapport à la micropropagation qui nécessite plusieurs milieux différents pour le développement des tiges et des racines et l'obtention de plantules.
- Les embryons peuvent être transformés en semences artificielles (ex: pommes de terre, bananier...).
- Conservation d'espèces tropicales dont les semences récalcitrantes à la déshydratation.
- Possibilité de cultures en réacteurs : production de semences artificielles à grande échelle (gymnospermes).
- Les embryons somatiques présentent dès le début de leur formation une structure bipolaire. Ils possèdent déjà les deux méristèmes nécessaires pour produire une plante. Ils constituent donc l'élément type adapté à la régénération d'une plante. Les cultures embryogènes produisent plusieurs millions de structures embryogènes par litre de culture, c'est donc beaucoup plus que des cultures callogènes de type classique. L'utilisation d'un milieu liquide agité sépare naturellement les embryons les uns des autres. Il est donc parfaitement envisageable d'automatiser entièrement et à des coûts raisonnables une production de masse en bioréacteur.
- L'embryogenèse somatique apparaît donc comme une alternative intéressante pour la production de plantes.
- Ceci permettrait :
 - de multiplier des espèces ayant un coût élevé de production à l'unité, {Camélia, Rhododendron, Cyclamen, Gerbera, Impatiens),

- et de produire des individus particulièrement performants provenant des cultures in vitro (haploïdes, produits de fusion somatique) ou de plantes transformées qu'il pourrait être difficile de manipuler par voie sexuée (stérilité totale ou partielle).

- On peut également envisager d'améliorer la production d'espèces qui pour diverses raisons ne produisent pas de semences ou alors des semences inutilisables comme l'igname, le bananier, la pomme de terre, etc. (Zryd, 1988).

7. Inconvénients de l'embryogenèse somatique

- L'induction du potentiel embryogène et la régénération restent souvent difficiles. Plusieurs difficultés subsistent en embryogenèse somatique : L'induction du potentiel embryogène et la régénération restent souvent difficiles. Les cultures de cals, et plus encore les cultures de cellules isolées, sont propices à l'apparition de mutations géniques pouvant être responsable d'une variabilité des plantes issues de la culture. Toutefois, dès que cette variabilité sera maîtrisée, l'embryogenèse somatique permettra de produire des quantités très élevées de plantes à faible coût. Certaines espèces, telles que le palmier dattier ou certains conifères font déjà l'objet d'une production industrielle par embryogenèse somatique.
- Le passage par cal peut amener des risques de dérive génétique.
- Mains d'œuvre qualifiée.
- Coût élevé.

