



HAL
open science

**Etude de la cryoconservation d'apex en vue d'une
conservation à long terme de collections de ressources
génétiques végétales : compréhension des phénomènes
mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel
régénéré sur le modèle pelargonium**

Anthony Gallard

► **To cite this version:**

Anthony Gallard. Etude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de collections de ressources génétiques végétales : compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle pelargonium. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2008. Français. NNT : . tel-00448693v2

HAL Id: tel-00448693

<https://theses.hal.science/tel-00448693v2>

Submitted on 21 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ETUDE DE LA CRYOCONSERVATION D'APEX EN VUE D'UNE CONSERVATION A
LONG TERME DE COLLECTIONS DE RESSOURCES GENETIQUES VEGETALES :
COMPREHENSION DES PHENOMENES MIS EN JEU ET EVALUATION DE LA
QUALITE DU MATERIEL REGENERE SUR LE MODELE *PELARGONIUM***

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie cellulaire

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 octobre 2008

A AGROCAMPUS-OUEST, CENTRE D'ANGERS

Par ANTHONY GALLARD

Devant le jury ci-dessous :

Florent ENGELMANN, Rapporteur, Chargé de recherche 1, IRD Montpellier
Jean-Luc VERDEIL, Rapporteur, Cadre , responsable PHIV, CIRAD Montpellier
Samantha VERNHETTES, Examinatrice, Chargée de recherche, INRA, Versailles
Bart PANIS, Examineur, Chercheur, Université Catholique de Louvain (KUL), Belgique
Noëlle DORION, Directrice de thèse, Professeur à AGROCAMPUS-OUEST , Angers
Agnès GRAPIN, Encadrante, Maître de conférences à AGROCAMPUS-OUEST , Angers

Laboratoire d'accueil : UMR GenHort (INRA, AGROCAMPUS-OUEST, Université d'Angers), département STPH d'AGROCAMPUS-OUEST, Centre d'Angers

Remerciements

Ce mémoire représente 3 ans de recherche réalisée à AGROCAMPUS-OUEST, centre d'Angers dans l'unité mixte de recherche GenHort. Je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à sa réalisation :

Agnès Grapin, de m'avoir encadré tout au long de la thèse. Je la remercie tout particulièrement de m'avoir fait confiance, notamment dans le choix des axes de recherche.

Noëlle Dorion, ma directrice de thèse de m'avoir accueilli dans son équipe. Merci de son soutien permanent et d'avoir toujours été présente pour répondre à mes questions.

Bart Panis et toute son équipe de l'Université Catholique de Louvain (KUL) en Belgique à qui je dois d'avoir appris tous les rudiments de la cryoconservation par « droplet-vitrification ».

Jean-Luc Verdeil de l'équipe PHIV de Montpellier RIO Imaging qui m'a accueilli dans son laboratoire ainsi que pour les encouragements qu'il m'a fournis lors de mes passages sur Montpellier. Jacques Escoute pour son aide dans l'utilisation des différents systèmes microscopiques, sans lui ce travail n'aurait pas été possible.

Robert Filmon du SCIAM d'Angers pour les conseils avisés qu'il m'a prodigués lors des travaux de virologie. Merci d'avoir mis à ma disposition les microscopes à chaque fois que j'en ai eu besoin. Sonia Georgeault, Romain Mallet pour le soutien technique et leur bonne humeur.

Michel Chevalier et Marie Tellier du laboratoire d'histologie de l'INRA d'Angers. Votre enthousiasme et l'intérêt que vous avez portés à mon travail ont été d'un grand soutien.

Anne Préveaux, Nadia Audin et Timothée Chaumier, pour les nombreuses heures passées à prélever des apex ou à découper des blocs de résine.

Stéphane Dussert pour l'aide et les conseils qu'il m'a apportés, ainsi que pour sa participation à mon comité de thèse. Merci pour son amitié.

Olivier Leprince d'avoir été membre de mon comité de thèse.

Toute ma reconnaissance va aux membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe STPH en particulier aux deux Anita ainsi qu'à toutes les personnes d'AGROCAMPUS-OUEST, centre d'Angers pour avoir travaillé dans une ambiance agréable pendant ces trois années et demie.

Je remercie profondément ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur soutien indéfectible, pour avoir supporté mes sauts d'humeurs au cours des derniers mois.

Enfin, merci à mes amis fidèles depuis des années, pour leur soutien et le temps passé à rire ensemble.

Liste des abréviations

AC1	Anticorps 1
AIA	Acide indole acétique
AIB	Acide indole butyrique
AIMV	<i>Alstroemeria</i> mosaic potyvirus
ANA	Acide naphthalène acétique
BAP	Benzyle aminopurine
BRG	Bureau des ressources génétiques
CIE	Commission internationale de l'énergie
CIRAD	Centre international pour la recherche agronomique et développement
CLSM	Confocale laser scanning microscopy
CMV	Cucumber mosaic virus
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CT	Control
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DV	Droplet-vitrification
ED	Encapsulation-déshydratation
EG	Ethylène glycol
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFP	Green fluorescent protein
GVA	Grapevine virus
HSP	Heat shock protein
IC	Immunocapture
KUL	Katholieke universiteit Leuven
LEA	Late embryogenesis protein
LPV	Laboratoire de pathologie végétale
LS	Loading Solution
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
MO	Microscopie optique
MPM	Multiphoton microscopy
MRI	Montpellier RIO Imaging
MS	Murashige et Skoog
ONIIV	Objet non identifié intra vacuolaire
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polychain reaction
PFBV	Pelargonium flower break virus
PMMoV	Pepper mild mottle virus
PPV	Poty pox virus
PVS2	Plant vitrification solution 2
RAPD	Ramdon amplified polymorphic DNA
RBDV	Raspberry dwarf virus
RS	Recovery solution
RTM	Real time microscopy
YFP	Yellow fluorescent protein

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : CONTEXTE DE LA THESE ET QUESTIONNEMENT SCIENTIFIQUE	
1.1. La conservation des ressources génétiques	3
1.1.1. La conservation <i>in situ</i>	3
1.1.2. La conservation <i>ex situ</i>	3
<i>1.1.2.1. Les collections de plantes entières</i>	4
<i>1.1.2.2. La conservation <i>in vitro</i></i>	4
<i>1.1.2.3. Les banques de graines</i>	4
<i>1.1.2.4. La conservation de pollen et les banques d'ADN</i>	5
<i>1.1.2.5. Les core collections</i>	5
1.1.3. Cas des plantes à semences semi-orthodoxes, récalcitrantes et/ou à multiplication végétative	5
1.2. La cryoconservation	6
1.2.1. Principe de la cryoconservation	6
1.2.2. Les événements biologiques et physiques lors d'une exposition au froid intense	6
<i>1.2.2.1. Les altérations dues à la congélation de l'eau contenue dans les tissus et les cellules</i>	6
<i>1.2.2.2. Les altérations dues à l'action du froid sur les membranes</i>	8
<i>1.2.2.3. Les altérations dues à la production de formes actives de l'oxygène (ROS) : stress oxydatif</i>	9
1.2.3. Les différentes méthodes de cryoconservation	10
<i>1.2.3.1. Les méthodes avec cristallisation extracellulaire</i>	11
<i>1.2.3.2. Les méthodes sans cristallisation extracellulaire</i>	12
<i>1.2.3.2.1. L'encapsulation-déshydratation</i>	12
<i>1.2.3.2.2. La vitrification</i>	13
<i>1.2.3.2.3. L'encapsulation-vitrification</i>	14
<i>1.2.3.2.4. La « droplet-vitrification »</i>	14
<i>1.2.3.2.5. Les autres méthodes de cryoconservation par vitrification</i>	15

1.2.4. Les limites de la cryoconservation	15
1.2.4.1. <i>Le contexte socio-économique</i>	15
1.2.4.2. <i>Les facteurs biologiques</i>	15
1.3. L'estimation de la conformité	16
1.4. La cryothérapie	18
1.5. Description du Genre <i>Pelargonium</i>	19
1.5.1. Histoire et taxonomie	19
1.5.2. Origine et multiplication des cultivars utilisés en horticulture	20
1.5.2.1. <i>Origine des cultivars</i>	20
1.5.2.2. <i>Création et multiplication des cultivars</i>	21
1.5.3. Importance économique	21
1.5.4. <i>Pelargonium</i> et cryoconservation	21
CHAPITRE 2 : MISE AU POINT DE LA CRYOCONSERVATION CHEZ <i>PELARGONIUM</i>	
2.1. Introduction	23
2.2. Matériel et Méthode	25
2.2.1. Matériel Végétal	25
2.2.2. Méthodes	25
2.2.2.1. <i>Désinfection et prélèvement des apex</i>	25
2.2.2.2. <i>Cryoconservation par encapsulation-déshydratation (ED)</i>	26
2.2.2.3. <i>Cryoconservation par « droplet-vitrification » (DV)</i>	27
2.2.2.4. <i>Adaptation de la « droplet-vitrification » (DV) aux apex de <i>Pelargonium</i> (expérience « Cryoletters »)</i>	28
2.2.2.5. <i>Régénération in vitro</i>	29
2.2.2.6. <i>Effets de différents facteurs sur la survie et la régénération (expérience A)</i>	30
2.2.2.7. <i>Application de la « droplet-vitrification » sur différentes Espèces et cultivars de <i>Pélargonium</i> (expérience B)</i>	30
2.2.2.8. <i>Estimation des taux de survie et des taux de régénération des apex après la cryoconservation (DV et ED)</i>	31
2.2.2.9. <i>Analyses statistiques</i>	32

2.3. Résultats	32
2.3.1. Essais de cryoconservation par l'encapsulation-déshydratation	32
2.3.2. Mise en place de la cryoconservation d'apex de <i>Pelargonium</i> par « droplet-vitrification »	32
2.3.2.1. <i>Effet de la durée du traitement dans la solution de charge LS (Loading Solution)</i>	33
2.3.2.2. <i>Effet de la durée du traitement dans la solution de cryoprotection PVS2 (Plant Vitrification Solution 2)</i>	33
2.3.2.3. <i>Application de la méthode de cryoconservation par « droplet-vitrification » sur huit cultivars de <i>Pelargonium</i> (cf. article annexe 2-5)</i>	35
2.3.3. Choix des milieux de culture	35
2.3.4. Rôle des différents facteurs sur la survie et la régénération	38
2.3.4.1. <i>Effet du facteur « méthode »</i>	38
2.3.4.2. <i>Effet du facteur « génotype »</i>	39
2.3.4.3. <i>Effet des facteurs « milieu de culture » et « répétition »</i>	39
2.3.4.4. <i>Recherche d'interactions entre le facteur « méthode » et le facteur « milieu »</i>	40
2.3.4.5. <i>Effet des facteurs « méthode », « milieu de culture » et « répétition » sur la survie et la régénération des apex pour les quatre cultivars considérés</i>	40
2.3.5. Application de la méthode de cryoconservation par « droplet-vitrification » sur différentes espèces et cultivars de <i>Pelargonium</i>	42
2.4. Discussion	45
CHAPITRE 3 : ETUDE MICROSCOPIQUE DU COMPORTEMENT DES CELLULES ET DES APEX LORS DE LA CRYOCONSERVATION	
3.1. Introduction	50
3.1.1. Principe de la RTM et application	51
3.1.2. Principe de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM), de la microscopie multiphoton à balayage laser (MPMP) et de leurs applications	51
3.1.2.1. <i>Rappel sur la fluorescence</i>	51
3.1.2.2. <i>Cas de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM)</i>	52
3.1.2.3. <i>Cas de la microscopie multiphotonique à balayage laser MPMP)</i>	53

3.2. Matériel et Méthodes	55
3.2.1. Matériel végétal	55
3.2.2. Méthodes	55
3.2.2.1. <i>Microscopie optique</i>	55
3.2.2.2. <i>La microscopie en temps réel (RTM)</i>	55
3.2.2.3. <i>La microscopie multiphotonique</i>	58
3.2.2.4. <i>Traitements des images</i>	59
3.3. Résultats	61
3.3.1. Description histo-cytologique d'apex de <i>Pelargonium</i> au cours de l'encapsulation-déshydratation et de la « droplet-vitrification »	61
3.3.1.1. <i>Structure interne d'un apex avant la cryoconservation</i>	61
3.3.1.2. <i>Evolution des apex au cours de l'encapsulation- déshydratation</i>	63
3.3.1.3. <i>Evolution des apex au cours de la « droplet-vitrification »</i>	63
3.3.2. Etude de l'impact de LS et PVS2 sur les apex en microscopie en temps réel (RTM)	64
3.3.2.1. <i>Observation de coupes d'apex avant la cryoconservation</i>	64
3.3.2.2. <i>Observation de coupes d'apex lors du traitement avec LS</i>	65
3.3.2.3. <i>Observation de coupes d'apex lors du traitement avec PVS2 sans traitement avec LS au préalable.</i>	67
3.3.2.4. <i>Observation de coupes d'apex lors du traitement avec PVS2 suivant un traitement avec LS.</i>	68
3.3.3. Etude de l'impact de LS et PVS2 sur les apex par microscopie confocale à balayage laser (CLSM)	70
3.3.3.1. <i>Remarques sur le marquage des membranes et sur le signal émis lors de l'acquisition des images</i>	70
3.3.3.2. <i>Observation d'apex avant la cryoconservation</i>	70
3.3.3.3. <i>Observation d'un apex suite au traitement avec LS et PVS2</i>	71
3.3.3.4. <i>Observation d'un apex suite au traitement avec uniquement PVS2</i>	71
3.3.4. Effet de la « droplet-vitrification » sur la reprise de croissance des apex	73
3.3.4.1. <i>Reprise de croissance pour les apex non cryoconservés (témoins)</i>	73
3.3.4.2. <i>Reprise de croissance pour les apex cryoconservés</i>	75
3.3.4.3. <i>Cas d'un apex n'ayant pas survécu</i>	75

3.3.5. Suivie de la reprise de croissance des apex par microscopie biphoton à balayage laser	76
3.3.5.1. <i>Reprise de croissance d'un apex non cryoconservé</i>	76
3.3.5.2. Reprise de croissance d'un apex cryoconservé	76
3.4. Discussion	77
3.4.1. Comparaison histo-cytologique durant les procédés de cryoconservation par encapsulation-déshydratation et «droplet-vitrification »	77
3.4.2. Etude par RTM et CLSM lors des étapes clefs de l'immersion dans LS et PVS2 au cours du procédé par « droplet-vitrification »	79
3.4.3. Etude de la régénération <i>in vitro</i> d'apex non cryoconservés et d'apex cryoconservés	82
 CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA QUALITE DES PLANTES REGENEREES	
4.1. Introduction	84
4.2. Matériel et méthodes	86
4.2.1. Matériel végétal	86
4.2.2. Méthodes	86
4.2.2.1. <i>Caractérisation des chimères</i>	86
4.2.2.2. <i>Mesure de paramètres foliaires</i>	87
4.2.2.3. <i>Mesure de la couleur des fleurs</i>	87
4.2.2.4. <i>Mesure de la quantité d'ADN dans les cellules</i>	88
4.2.2.5. <i>Choix des cultivars virosés</i>	89
4.2.2.6. <i>Immunolocalisation</i>	89
4.2.2.7. <i>Analyses statistiques</i>	90
4.3. Résultats	90
4.3.1. Conformité du phénotype des feuilles de variétés panachées	90
4.3.1.1. <i>Caractérisation des chimères</i>	90
4.3.1.1.1. <i>Cas des cultivars A Happy Thought et Panaché Sud</i>	91
4.3.1.1.2. <i>Cas du cultivar Panaché</i>	92
4.3.1.2. <i>Variations possibles du phénotype chez les cultivars panachés</i>	93
4.3.1.3. <i>Proportion de variants chez les plantes régénérées des cultivars A Happy Thought, Balcon Lilas, Panaché, et Renard bleu</i>	94

4.3.2. Contrôle du maintien de caractères phénotypiques et de la quantité d'A.D.N. dans les cellules	96
4.3.2.1. <i>Mesure des caractères morphologiques des feuilles</i>	96
4.3.2.2. <i>Estimation de la couleur des fleurs</i>	97
4.3.2.3. <i>Estimation de la quantité d'ADN dans les cellules</i>	99
4.3.3. Evolution du profil sérologique des cultivars	101
4.3.3.1. <i>Choix des cultivars virosés</i>	101
4.3.3.2. <i>Immunolocalisations des virus dans les apex</i>	101
4.3.3.2.1. <i>Exemples d'une coupe témoin sans anticorps et d'une coupe témoin avec uniquement l'anticorps secondaire</i>	101
4.3.3.2.2. <i>Cas du cultivar témoin P. x hortorum 'Berg Palais'</i>	102
4.3.3.2.3. <i>Localisation du PFBV et du PLPV dans les apex avant la cryoconservation</i>	103
4.3.3.2.4. <i>Localisation du PFBV et du PLPV dans les apex après la cryoconservation</i>	103
4.3.3.2.5. <i>Détection de la présence du PFBV et du PLPV dans des pousses in vitro</i>	103
4.4. Discussion	104
4.4.1. Conformité des caractères morphologiques et de la quantité d'ADN des cellules	104
4.4.2. Rôle de la cryoconservation sur l'assainissement viral : cryothérapie	110
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

INTRODUCTION GENERALE

La sauvegarde de la biodiversité est un défi majeur pour nos sociétés, si l'on veut que dans l'avenir les futures générations puissent jouir des mêmes conditions de développement que nous. Une part importante de la diversité génétique (végétale et animale) est indispensable à l'homme pour l'agriculture, l'industrie et la médecine ; il s'agit en fait de véritables ressources dans lesquelles il puise pour répondre à ses besoins présents et futurs (Charte des ressources génétiques, MINAG, 1999). Les risques d'une disparition massive de la biodiversité végétale par l'augmentation constante des pressions anthropiques sur les écosystèmes et les agrosystèmes sont de plus en plus importants (déforestation, extension des zones urbaines, exploitation minière...) (Brison *et al.*, 1995). De plus l'érosion génétique liée à l'utilisation intensive d'un nombre restreint d'espèces végétales « élites » mais fragiles au détriment de variétés rustiques fait peser un risque important sur l'homme pour son approvisionnement alimentaire. Devant ce constat, des règles et des méthodes de conservation des ressources génétiques végétales, qui concernent à la fois les espèces sauvages, les variétés anciennes et modernes, ont été développées au cours des dernières décennies. La conservation des ressources génétiques repose toujours sur le principe de maintenir le maximum de diversité génétique. Le moyen de conservation le plus couramment employé pour le règne végétal est la constitution de banques de semences. Or cette méthode n'est pas applicable pour les espèces et variétés à multiplication végétative ou à semences récalcitrantes (non tolérantes à la déshydratation). Pour ces espèces, il est le plus souvent envisagé la création de collections comme c'est le cas pour *Pelargonium*. Ces collections bien que très utiles du fait de la disponibilité permanente du matériel végétal pose un problème de pérennité sur le long terme. Afin d'assurer le maintien de la diversité génétique de ces espèces, il est nécessaire de développer des méthodes de conservation combinant une mise en œuvre simple, une conservation à long terme minimisant les frais de gestion, les risques de perte et de contamination. Face à ces contraintes, la cryoconservation est un système de conservation statique, *ex situ*, qui peut répondre à l'objectif.

Depuis l'introduction du *Pelargonium* au cours du 17^{ème} siècle, en Europe, de nombreux cultivars ornementaux ont été créés. Actuellement, l'Europe et l'Amérique du Nord représentent les deux principaux marchés avec une estimation totale des ventes de 700 millions de dollars en 2001 (Mithila *et al.*, 2001). La production annuelle est d'environ 500 millions de plantes en Europe pour les trois principales espèces ornementales utilisées (*Pelargonium x peltatum*, *Pelargonium x hortorum* et *Pelargonium x domesticum*) (Vidalie, 2004).

L'UMR GenHort (INRA, AGROCAMPUS-OUEST, Université d'Angers) à travers AGROCAMPUS-OUEST est chargée par le BRG (Bureau des ressources génétiques) de la gestion d'une importante collection de *Pelargonium* avec environ 500 cultivars et espèces différents. Cette collection est maintenue en serre avec un renouvellement des pieds mères par bouturage tous les trois ans environ. En raison de l'importance économique de la culture du *Pelargonium* en Europe et de son utilisation comme modèle expérimental dans les programmes de recherche et de création variétale de l'UMR GenHort (étude de la résistance au stress hydrique, Hassanein, 2005 ; étude la production d'hybrides somatiques, Nassour, 2003), il est important d'assurer le maintien de la collection située à AGROCAMPUS-OUEST. Dans cette optique, des études préliminaires portant sur la cryoconservation du *Pelargonium* ont été effectuées à partir de 1999. Au cours de ces travaux de recherche le choix de l'explant s'est porté sur les apex pour principalement deux raisons. D'une part les apex sont facilement prélevables chez *Pelargonium* et d'autre part la régénération *in vitro* à partir de méristème réduirait l'apparition de variations somaclonales. Ainsi, une méthode de cryoconservation par encapsulation-déshydratation d'apex a été établie dont les résultats ont fait

l'objet de plusieurs publications (Dumet *et al.*, 2002, Grapin *et al.* 2001 et 2003). A notre connaissance ce sont les seuls travaux à ce jour qui ont été réalisés sur la cryoconservation d'apex de *Pelargonium*.

Le présent travail de thèse s'inscrit dans la continuité des précédentes études. Il a pour but d'améliorer la cryoconservation du *Pelargonium*, d'accroître les connaissances sur le comportement de l'apex et des cellules méristématiques lors de la cryoconservation, ainsi que de vérifier la conformité et l'état sanitaire des plantes régénérées *in vitro* après la cryoconservation. Pour ce faire, il a été divisé en quatre chapitres.

Le premier chapitre regroupe en cinq parties le contexte et le questionnement scientifique. La première partie est consacrée aux différentes méthodes de conservation des ressources génétiques végétales. La deuxième traite de la cryoconservation avec notamment un inventaire des principales techniques utilisées. La troisième partie concerne l'évaluation de la qualité des plantes régénérées. Enfin la dernière partie est consacrée au genre *Pelargonium* et à la justification de son emploi comme plante modèle pour la thèse.

Le deuxième chapitre traite plus particulièrement de l'amélioration de la cryoconservation du *Pelargonium* en terme de faisabilité, de taux de survie et de taux de régénération. Pour cela le chapitre a été divisé en cinq parties. La première traite de l'utilisation de l'encapsulation-déshydratation. La deuxième concerne la mise au point de la méthode de cryoconservation par « droplet-vitrification » suite au choix de cette méthode fait sur la base de l'étude bibliographique réalisée au chapitre 1. La troisième est consacrée à l'étude de la régénération *in vitro*. La quatrième partie traite de l'influence de différents facteurs sur la survie et la régénération. Pour finir, dans la dernière partie, la « droplet-vitrification » mise en place et le nouveau système de régénération ont été appliqués à 28 cultivars et espèces.

Suite à l'adaptation de la « droplet-vitrification », le troisième chapitre a porté sur l'étude de l'impact de la cryoconservation sur les apex et les cellules méristématiques. Pour cela les expériences menées se sont basées sur plusieurs techniques de microscopie dont certaines n'avaient jamais été utilisées sur du matériel végétal ou dans le cadre de la cryoconservation. Ainsi le chapitre se divise en trois parties. La première partie concerne une étude comparative des modifications des cellules apicales au cours des différentes étapes de l'encapsulation-déshydratation et de la « droplet-vitrification ». La deuxième porte sur l'étude dynamique de l'impact des solutions de cryoprotection sur les cellules apicales et les apex entiers. La dernière partie est consacrée à l'effet de la « droplet-vitrification » sur la reprise de croissance des apex.

Pour qu'un système de cryoconservation soit retenu ou considéré comme efficace ; il est absolument nécessaire que les plantes issues de cryoconservation soient conformes aux plantes d'origine. Au cours du quatrième chapitre, l'évaluation du matériel végétal régénéré après cryoconservation est abordée. Trois parties composent ce chapitre. La première traite du comportement au cours de la cryoconservation de variétés chimériques au feuillage panaché. La deuxième est consacrée à l'étude du maintien de caractères phénotypiques et génomiques. Enfin la troisième partie concerne l'impact de la cryoconservation sur l'assainissement viral.

Pour finir, il est présenté dans une conclusion générale une synthèse des résultats ainsi que des perspectives pour le développement de futures thématiques de recherche.

CHAPITRE N°1

Contexte de la thèse et questionnement scientifique

1.1. La conservation des ressources génétiques

L'extraordinaire biodiversité qui compose notre biosphère est le résultat d'une lente mais continuelle évolution des formes vivantes au cours des différentes ères géologiques. Depuis l'apparition des premiers hominidés, l'évolution a permis à l'homme de passer du statut d'espèce soumise à la sélection naturelle au même titre que toute autre espèce vivante, à celui d'espèce dominante. Cette domination s'est traduite par un fait essentiel, la domestication des espèces végétales et animales pour son profit, afin de garantir sa survie et son épanouissement.

La domestication a eu de nombreuses conséquences sur la biodiversité planétaire dont la plus importante est la réduction de la diversité génétique. La sélection et l'utilisation intensive de quelques espèces « élites » végétales ont façonné le paysage de certaines régions. L'impact de l'homme sur son environnement est tel que certains chercheurs estiment que la planète est entrée dans une nouvelle ère, l'anthropocène (Crutzen et Steffen, 2003). A terme si aucune mesure de gestion durable des ressources et de protection des espaces naturels n'est prise, l'homme fait peser sur lui-même un risque important pour sa survie dans les millénaires à venir (OCDE, 2008).

C'est pourquoi depuis plusieurs décennies des politiques de conservation des ressources génétiques (CGR) ont été mises en place tant au niveau national qu'au niveau international. Partant de cet objectif toutes les stratégies de gestion des ressources génétiques ont pour soucis de mettre en place des techniques de conservation, qui soient économiquement supportables et techniquement applicables par les institutions chargées de la conservation (Koo et Smale, 2003). Afin de garantir la diversité du monde végétal plusieurs stratégies de conservations ont été proposées en fonction de la nature des ressources génétiques à préserver. Elles sont de deux types : la conservation *in situ* (dans le milieu naturel) et la conservation *ex situ* (en dehors du milieu d'origine). L'une et l'autre n'étant pas exclusives, elles participent souvent de manière complémentaire à la gestion de la biodiversité (Frankel *et al.*, 1995, Jarvis et Hodgkin, 2000).

1.1.1. La conservation *in situ*

Elle concerne surtout les ressources génétiques sauvages dont la seule possibilité de conservation est la protection de leurs écosystèmes par la sanctuarisation d'espaces et de territoires (Maxted *et al.*, 1997). On parle alors de conservation dynamique puisque ces ressources génétiques sont soumises au processus naturel d'évolution qui peut au fil du temps faire disparaître ou apparaître des espèces. En France, les parcs nationaux comme le parc national des Ecrins entrent dans cette catégorie.

En dehors de cette sanctuarisation, la conservation *in situ* concerne aussi toutes les ressources génétiques utilisées dans les cultures traditionnelles (Landraces). Les cultures vivrières développées par les populations locales offrent l'avantage d'être parfaitement adaptées au milieu naturel qui les entoure. Cet équilibre entre une exploitation du milieu et une faible anthropisation des espaces naturels garantit à la fois le maintien de la biodiversité et la structure sociétale des populations concernées. C'est pourquoi toutes les stratégies de conservation *in situ* doivent passer par le consentement et la participation des populations locales (Mac Neely et Ness, 1996).

1.1.2. La conservation *ex situ*

Contrairement à la conservation *in situ*, il s'agit ici d'extraire les ressources génétiques de leur habitat naturel, afin de les soustraire à la sélection naturelle et aux risques de disparition. On parle alors de conservation statique. L'objectif est de conserver fidèlement l'intégrité des ressources génétiques pour

que celles-ci puissent être utilisées soit directement soit dans des programmes de création variétale (Frankel *et al.*, 1995). Le type de conservation *ex situ* sera fonction de la nature de la ressource génétique à préserver, du coût de la conservation et de la facilité de mise en œuvre. Il est ainsi possible de distinguer les méthodes suivantes :

1.1.2.1. Les collections de plantes entières

La mise en collection est une solution proposée pour conserver les ressources génétiques. Il s'agit de cultiver au champ ou en serre un nombre important de taxons le plus souvent d'un même genre. Ainsi à travers la planète, il existe de nombreuses collections végétales comme par exemple celle de Jima en Ethiopie qui contient 1600 accessions de caféier (Engels et Visser, 2003) ou encore la collection d'*Hydrangea* d'AGROCAMPUS-OUEST contenant à ce jour environ 400 accessions différentes. Bien que très utile du fait de la disponibilité permanente du matériel végétal, ces collections ne garantissent pas une conservation de longue durée. Les contraintes importantes que posent les collections sont de plusieurs ordres, d'une part les risques de pertes dus aux attaques parasitaires, aux aléas climatiques et aux erreurs humaines sont élevés, d'autres part les coûts financiers d'établissement et d'entretiens sont prohibitifs sur du long terme (main d'œuvre, chauffage de serres, immobilisation de surfaces importantes, traitements phytosanitaires) (Engelmann et Engels, 2002).

1.1.2.2. La conservation *in vitro*

Une alternative au maintien des collections en serre ou au champ est la création de vitrothèque. Afin de limiter les risques d'erreurs et de contaminations lors des repiquages des stratégies basées sur le ralentissement de la croissance des explants ont été développées. Ces méthodes s'appuient sur un contrôle stricte des conditions de culture comme par exemple l'abaissement de la température (Grout, 1995), la réduction de la teneur en oxygène (Bridgen et Staby, 1981) ou des changements dans les concentrations des facteurs de croissances (Jarret et Gawel, 1991, Watt *et al.*, 2000). Ainsi des collections *in vitro* ont été mises en place, par exemple en Australie pour la préservation de 17 espèces de *Grevillea* (Sarasan *et al.*, 2006) ou encore pour la conservation de l'arbre à pain (*Artocarpus altilis*) (Murch *et al.*, 2008).

Malgré des avantages indéniables comme la multiplication rapide des explants, l'utilisation de petites surfaces, l'assainissement vis-à-vis de certains champignons et bactéries, l'efficacité du système est limitée par la possibilité d'apparition de variations somaclonales ainsi que par des coûts de main d'œuvre élevés.

1.1.2.3. Les banques de graines

Pour les nombreuses espèces végétales à semences orthodoxes (tolérantes à la déshydratation) existantes, la conservation des graines est la méthode la plus efficace et la plus facile à mettre en oeuvre. Ces graines se caractérisent par leur capacité naturelle à résister à une forte déshydratation puisque à maturité elles possèdent des teneurs en eau très faibles représentant 3% à 7% du poids de la graine mature (Engels et Visser, 2003). Cette qualité naturelle permet un stockage à basse température (-18°C) pendant plusieurs années. Bien que cette méthode relativement peu coûteuse soit largement répandue elle ne garantit pas une conservation sur de longues périodes de ces ressources génétiques. En effet, les processus de dégradation (réactions enzymatiques) ne sont pas complètement stoppés à cette température. Il en résulte la nécessité de vérifier à intervalles réguliers la viabilité des graines

stockées et le cas échéant de réintroduire de nouvelles graines pour les variétés les plus sensibles ce qui entraîne une augmentation des opérations de maintenance et des coûts de gestion plus élevés.

A côté de ce système, il est aussi à noter pour certaines variétés la possibilité de déshydrater les graines jusqu'à une teneur en eau résiduelle de 1% et de les conserver dans un endroit sec à température ambiante. Cette méthode moins coûteuse que la précédente nécessite toutefois de bien contrôler le processus de déshydratation et de vérifier la viabilité des graines pendant la durée de stockage (Walters et Engels, 1998).

Selon ce principe, il existe au Spitzberg (Norvège) depuis février 2008 la banque mondiale de graines (Svalbard Global Seed Vault) dont le but est de stocker à une température comprise entre -20°C et -30°C l'ensemble des graines des cultures vivrières de la planète.

1.1.2.4. La conservation de pollen et les banques d'ADN

A côté des stratégies citées ci-dessus, la conservation de pollen et le stockage d'ADN peuvent être considérés comme des cas particuliers, il s'agit plus de la conservation d'une information génétique que réellement une conservation de ressources génétiques.

Le stockage de pollens, le plus souvent, d'une durée limitée (en fonction de l'espèce) (Engels et Visser, 2003), peut avoir pour but de fournir en permanence du pollen viable pour la réalisation des fécondations qui ne pourraient avoir lieu en conditions naturelles (Ferreira *et al.*, 2007). La conservation de pollen a plus une vocation d'outil pour la création variétale, pour la production fruitière ou grainetière, que de réellement participer à la conservation de la biodiversité.

Le stockage d'ADN peut être considéré non pas comme une méthode de conservation des ressources génétiques mais plus comme un outil pour l'étude du génome, notamment sur les relations génétiques qui existent entre les espèces et les familles. De plus malgré une faible complexité de mise en œuvre et des coûts peu élevés, le stockage d'ADN ne permet pas la régénération de plantes entières à ce jour (Maxted *et al.*, 1997).

1.1.2.5. Les core collections

L'augmentation des connaissances liées à la génétique, à la biologie moléculaire et à l'écologie des espèces végétales a permis d'optimiser la mise en collection (plante entière, pousses *in vitro*, graines...) par la création de « core collections ». Ce type de collection a pour but de conserver un maximum de diversité génétique au sein d'un même groupe sans être obligé de conserver l'ensemble des cultivars et des espèces du groupe (Frankel *et al.*, 1995). Il en résulte de petites collections dont la gestion quotidienne est plus facile mais qui reste soumises aux mêmes risques de pertes d'accessions que celles exposées précédemment.

1.1.3. Cas des plantes à semences semi-orthodoxes, récalcitrantes et/ou à multiplication végétative

La constitution de banque de graines ne peut être réalisée que lorsque celles-ci sont tolérantes à la déshydratation. Or tous les végétaux ne produisent pas ce type de graines, par exemple le caféier (Dussert *et al.*, 2003) ou encore le cacaoyer (Chandel *et al.*, 1995). De plus pour les végétaux à multiplication végétative comme le bananier ou l'ananas, l'absence d'une production de graines notables empêche l'application de cette méthode de conservation *ex situ*. Pour ces espèces, la constitution de collections est la stratégie de conservation privilégiée malgré les inconvénients

inhérents à son utilisation. Toutefois une alternative à la mise en collection existe grâce à la cryoconservation. Cette méthode basée sur la congélation à -196°C de différents explants, applicable pour toutes les ressources génétiques végétales est particulièrement adaptée pour les espèces aux semences récalcitrantes ou à multiplication végétative.

Le travail de thèse présenté ici porte sur l'étude de cette méthode de conservation avec comme modèle de plante multipliée végétativement le *Pelargonium* (description au point 1.5). La cryoconservation fait l'objet, seule de partie suivante de ce chapitre.

1.2. La cryoconservation

1.2.1. Principe de la cryoconservation

La cryoconservation consiste à maintenir à ultra basse température (-196°C) des tissus et des cellules que l'on souhaite conserver pendant de nombreuses années, en altérant le moins possible leur potentiel vital et leur capacité à régénérer de manière conforme (pour les végétaux).

Depuis les premiers essais de conservation de cellules vivantes vers le début des années cinquante pour des cellules d'origine animale (globules rouges, Lovelock, 1953), et la fin des années soixante pour des cellules végétales (cellules de lin, Quatrano, 1968) d'importantes recherches ont permis de développer de nombreuses procédures de conservation dans l'azote liquide. Chaque année, les recherches menées à travers le monde aboutissent à de nouvelles cryobanques de matériel végétal concernant tout type d'explants (apex, cals, embryons somatiques, graines, plantules, suspensions cellulaires...), aussi bien pour des plantes tropicales que pour des plantes de milieux tempérés (Sakai et Engelmann, 2007).

La réussite de la cryoconservation est fonction de la capacité à s'affranchir des contraintes biologiques et physiques inhérentes à une exposition à un froid extrême (-196°C). Pour cela, il est impératif de connaître la nature du matériel végétal à cryoconserver ainsi que les effets du gel sur les cellules et les tissus.

1.2.2. Les événements biologiques et physiques lors d'une exposition au froid intense

Comme l'indique l'étymologie du mot cryoconservation, il s'agit d'une conservation au froid à ultra basse température, le plus souvent dans l'azote liquide à -196°C . Sans traitement préalable, l'immersion de matériel végétal vivant dans l'azote liquide entraîne de nombreuses altérations qui aboutissent obligatoirement à la mort de ce matériel.

1.2.2.1. Les altérations dues à la congélation de l'eau contenue dans les tissus et les cellules

Sachant que la teneur en eau peut atteindre 95% du poids frais chez certains végétaux, l'eau contenue dans les tissus et les cellules a un impact important sur la survie lors de l'exposition à des températures négatives.

Lors de la congélation de l'eau, la formation de cristaux en forme d'aiguilles agglomérées s'accompagne d'une augmentation de volume de 9% (Baudot *et al.*, 1998), entraînant des modifications du métabolisme cellulaire et des dommages physiques irréversibles. La cristallisation de l'eau dans les milieux extra et intracellulaires est le principal événement qui conduit à la mort des cellules.

Ainsi, lors d'un abaissement de la température jusqu'à environ -5°C , il y a d'abord surfusion (figure 1-1) des milieux intra et extracellulaires en raison de l'abaissement de la température de congélation par la présence de solutés (Hébert *et al.*, 1993).

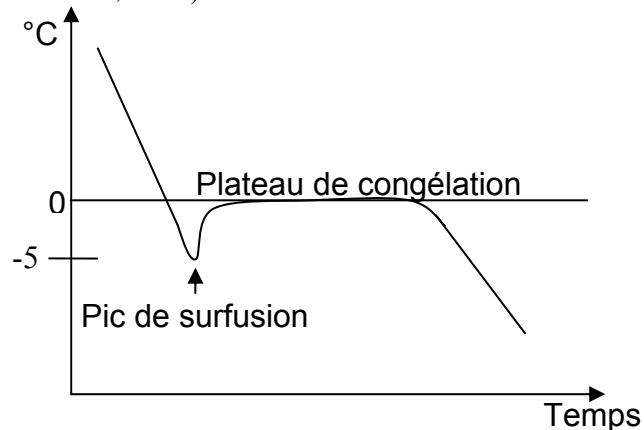


Figure 1-1. Schéma de la congélation d'une solution aqueuse lors d'un refroidissement constant. D'après Hébert *et al* (1993).

Entre -5°C et environ -15°C lors d'un refroidissement lent, l'eau aura tendance à cristalliser dans un premier temps en dehors de la cellule ce qui provoquera une augmentation de la concentration en soluté du milieu extracellulaire (Dereuddre et Gazeau, 1992). Par effet d'osmose, l'eau intracellulaire aura alors tendance à sortir de la cellule, ce phénomène est appelé l'exosmose (figure 1-2) (Mazur *et al.*, 1984). Il en résulte une forte déshydratation de la cellule et par conséquent une augmentation de la concentration du milieu intracellulaire et un changement de pH (Meryman *et al.*, 1977). Les perturbations du métabolisme cellulaire associées à la déshydratation de la cellule et aux dommages mécaniques aboutissent alors à la destruction et à la mort des cellules.

En outre, lors d'une exposition brutale à des températures négatives, il est possible d'avoir simultanément une cristallisation dans le milieu extracellulaire et dans le milieu intracellulaire. Il y aura alors perforation des membranes et des parois sous l'action mécanique de la croissance des cristaux sans passer par une phase de déshydratation des cellules (Dereuddre et Gazeau, 1992).

Le plus souvent les deux mécanismes ont lieu partiellement de manière conjointe mais dans tous les cas les cellules ne peuvent pas survivre à une formation importante de cristaux.

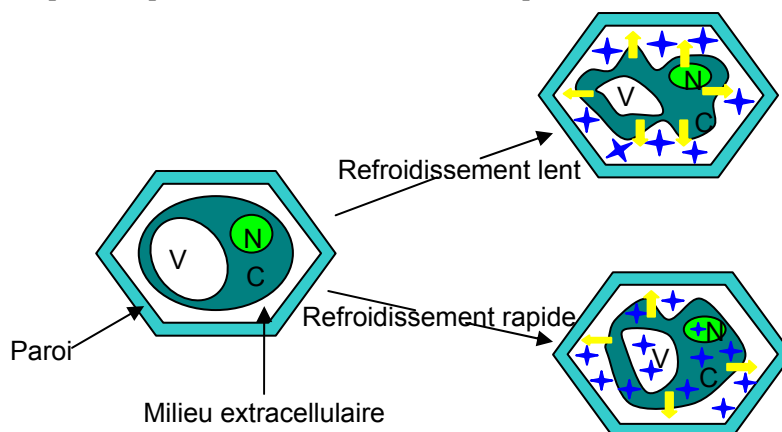


Figure 1-2. Formation de glace dans une cellule en fonction de la vitesse de refroidissement. Les flèches jaunes correspondent à la sortie de l'eau de la cellule (exosmose). Les étoiles bleues correspondent à la cristallisation de l'eau. C : cytoplasme – N : noyau – P : paroi – V : vacuole. D'après Mazur (1984).

1.2.2.2. Les altérations dues à l'action du froid sur les membranes

La membrane plasmique se compose d'une bicouche phospholipidique, de protéines et de stérols pour former une mosaïque fluide selon le concept de Singer et Nicholson (1972). C'est elle qui fait l'interface entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire par la diffusion active ou passive des molécules nécessaires au fonctionnement de la cellule (Robert et Roland, 1989).

Toutes les membranes cellulaires et principalement la membrane plasmique sont sensibles au froid et à la dessiccation (Uemura et Steponkus, 1999). Or, la survie de la cellule passe par le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. Plusieurs facteurs sont responsables de la désintégration du plasmalemmes lors d'une exposition au froid. Tout d'abord la nature même des phospholipides et des protéines qui le composent, influence fortement la résistance au froid et à la déshydratation des cellules (Steponkus *et al.*, 1993). Ainsi à température ambiante, la bicouche lipidique se trouve dans un état fluide, hydratée, de type lamellaire dénommé L_{α} .

A mesure que la température baisse (quelques degrés par heure) le phénomène d'exosmose se met en place. Le niveau d'hydratation de la membrane diminue, il y a alors perte de la fluidité de la bicouche par l'allongement et la rigidification des chaînes aliphatiques des phospholipides. Cet état L_{β} constitue ce qui a été appelé la phase gel rigide. Il est à noter que la transition de la phase L_{α} vers la phase L_{β} est réversible si les conditions de température et d'hydratation correspondent à nouveau aux critères normaux de fonctionnement de la cellule (Mazliak, 1992). (figure 1-3).

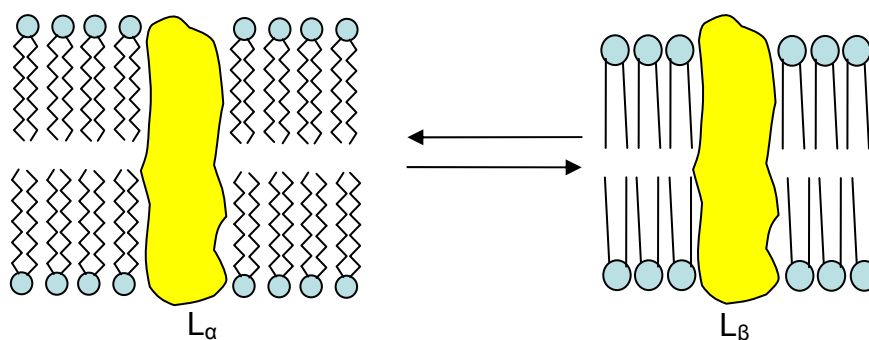


Figure 1-3. Schéma d'une membrane plasmique lors de la transition L_{α} vers L_{β} au cours d'un refroidissement lent. En jaune protéine intégrée dans la bicouche lipidique. D'après Mazliak (1992)

A l'inverse, un abaissement rapide de la température peut provoquer une forte déshydratation des cellules. La notion d'abaissement rapide est toute relative, elle est fonction de l'explant et de l'espèce végétale considérée. Les contacts sont alors plus nombreux entre les replis du plasmalemmes eux-mêmes mais aussi avec les endomembranes (surtout chloroplastiques). Les phospholipides ont alors tendance à se regrouper ensemble en fonction de leur température de fusion pour former des structures hexagonales non lamellaires H_{II} . Il en résulte une exclusion des protéines membranaires et des stérols. Cette séparation latérale et irréversible des phospholipides provoque alors la dislocation du plasmalemmes et par conséquent la mort cellulaire (Mazliak, 1992, Wolfe et Bryant, 1999) (figure 1-4).

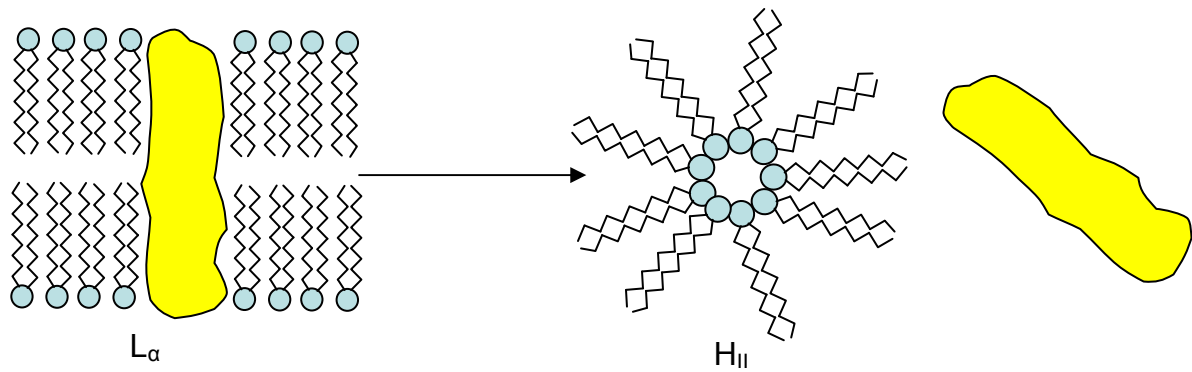


Figure 1-4. Schéma d'une membrane plasmique lors la transition L_{α} vers H_{II} au cours d'un refroidissement rapide. En jaune protéine intégrée dans la bicouche lipidique.

La résistance au froid est aussi dépendante d'autres facteurs comme la concentration en soluté du cytoplasme, la stabilité des endomembranes (Uemura *et al.*, 1995) et l'expression de certains gènes comme les gènes COR (Cold-Regulated) (Tomashow, 1999).

1.2.2.3. Les altérations dues à la production de formes actives de l'oxygène (ROS) : stress oxydatif

En condition de croissance optimale, c'est-à-dire sans stress, la production de formes actives de l'oxygène (ROS) telle que $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} ou 1O_2 lors de la photosynthèse et de la respiration est un événement normal du métabolisme cellulaire (Martinez *et al.*, 2001, Suzuki et Mittler, 2006). De récentes études ont montré que les ROS avaient un rôle prépondérant dans la signalisation de stimuli environnementaux, dans le développement, dans la croissance et dans la mort cellulaire (Bailey-Serres et Mittler, 2006, Mittler, 2006).

Lors d'un stress causé notamment par une exposition au froid ou lors d'une sécheresse, la production de ROS en grande quantité (Larkindale and Knight, 2002) n'est pas complètement compensée par leur destruction, comme c'est le cas lors du fonctionnement normal de la cellule. Ces radicaux en excès, très réactifs du fait de la présence d'électrons libres vont alors perturber le métabolisme cellulaire en s'attaquant aux différents constituants de la cellule (Benson, 2000, Apel et Hirt, 2004, Obert *et al.*, 2005).

Au niveau des membranes les formes radicales des ROS ($O_2^{\cdot-}$ et OH^{\cdot}) vont peroxyder de manière préférentielle les fonctions alcéniques (diènes) des phospholipides insaturés, il y a alors clivage des chaînes aliphatiques (Dussert *et al.*, 2003, Benson et Bremmer, 2004). Cette réaction dite de stress oxydatif de premier ordre produit des hydrocarbures volatiles, des lipides aldéhydiques toxiques (par exemple le malondialdéhyde) et de nouvelles formes de radicaux. Ces radicaux (stress oxydatif de second ordre) conjointement avec les radicaux primaires vont à leur tour attaquer d'autres phospholipides ainsi que les molécules riches en électrons comme les protéines et l'ADN (Benson et Bremmer, 2004). Il en résulte une désorganisation de la membrane plasmique et un arrêt du métabolisme qui aboutit rapidement à la mort des cellules.

Par conséquent, lors de la cryoconservation, il est absolument nécessaire de chercher à limiter la formation de cristaux dans les cellules, de maintenir la stabilité du plasmalemmes et enfin de réduire au maximum le stress causé aux cellules.

1.2.3. Les différentes méthodes de cryoconservation

Plusieurs conditions régissent la réussite de la cryoconservation de matériel végétal. Tout d'abord il faut stopper les réactions biochimiques qui pourraient altérer les qualités intrinsèques du matériel à conserver. A cet égard, la conservation dans l'azote liquide offre le plus de garantie. En effet selon la loi d'Arrhenius $k = A.e^{-\frac{E_a}{RT}}$ (k = constante de vitesse de réaction), plus la température est basse plus les vitesses de réaction sont lentes. A titre d'exemple, à -173°C la durée moyenne de réaction est estimée à 2.10^6 années (Baudot *et al.*, 1998). Dans ces conditions, il est admis qu'à la température de l'azote liquide (-196°C) toutes les réactions sont stoppées, notamment les réactions enzymatiques et les réactions d'oxydation.

Compte tenu de ce que nous avons vu précédemment, il faut s'affranchir des contraintes liées aux ultra basses températures. Ainsi, il est important de réduire autant que possible la cristallisation de l'eau dans les tissus et la déstabilisation des membranes provoquées par l'immersion dans l'azote liquide.

Bien que naturellement les végétaux puissent tolérer la présence de cristaux dans certains endroits, par exemple entre l'assise sous-épidermique et le parenchyme sous-jacent (Dereuddre et Gazeau, 1992), généralement la formation de glace surtout intracellulaire est incompatible avec la survie. C'est pourquoi, la cryoconservation repose toujours sur une déshydratation des cellules dont les modalités varient selon la méthode. Il s'agira donc de trouver le bon compromis entre le niveau de déshydratation et la survie. Une déshydratation trop forte entraînera la mort des cellules. A l'inverse une déshydratation insuffisante des cellules provoquera la cristallisation de l'eau lors de la congélation.

Hormis, la déshydratation, un phénomène purement physique est recherché pour éviter totalement la cristallisation de l'eau, il s'agit de la vitrification. Cet événement consiste à transformer un milieu liquide en « verre ». Plus exactement Vassoille et Perez (1984) ont décrit l'état vitreux comme étant un liquide ayant perdu sa capacité à s'écouler. Il en résulte un « solide » ayant l'apparence du verre mais dont les propriétés physiques se rapprochent de celles des liquides notamment par l'absence d'organisation moléculaire interne (absence de cristaux). On parle alors de solide amorphe (Fahy *et al.*, 1984). La vitrification est actuellement le seul moyen connu pour éliminer totalement la formation de cristaux dans les cellules (Sakai 2000). Pour l'eau pure, la transition entre l'état liquide et l'état vitreux nécessite un refroidissement de l'ordre de $20000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Hébert *et al.*, 1993), ce qui d'un point de vue technique est irréalisable dans des laboratoires non spécialisés. Afin de palier cette contrainte, les méthodes de cryoconservation par vitrification se basent toujours sur l'augmentation de la concentration cellulaire en soluté ou en cryoprotecteurs. En effet, plus la concentration d'une solution est élevée plus la vitesse de refroidissement peut être lente pour obtenir l'état vitreux. L'utilisation de cryoprotecteurs va alors faciliter la vitrification du cytoplasme lors de l'immersion dans l'azote liquide (Grout, 1995).

Les cryoprotecteurs sont couramment divisés en deux catégories, ceux qui ne pénètrent pas dans les cellules et ceux qui à l'inverse pénètrent à l'intérieur des cellules. Même si le sujet fait toujours débat, les cryoprotecteurs qui ne pénétreraient pas sont essentiellement des sucres (saccharose, sorbitol, maltose...). Par effet d'osmose, ils entraînent une sortie d'eau et participent à la stabilisation des membranes par la création de liaisons chimiques (Baudot *et al.*, 1998, Uemura et Steponkus, 2003). Les cryoprotecteurs pénétrants sont des molécules de faible poids moléculaire comme le DMSO (diméthylsulfoxyde), des acides aminés (proline) ou encore des dérivés d'alcool (éthylène glycol...) à l'exception du glycerol (Volk *et al.*, 2007). Ils interviennent de plusieurs façons dans la protection cellulaire. Ils rétablissent l'équilibre osmotique à l'intérieur des cellules ce qui contribue au maintien de la concentration en solutés. Au fur et à mesure qu'ils pénètrent dans les cellules leur concentration

augmente, les interactions avec les molécules d'eau sont de plus en plus nombreuses perturbant ainsi la cristallisation de l'eau (Baudot *et al.*, 1998, Wolfe *et al.*, 2002.). La température de fusion (T_m) du mélange cryoprotecteurs-eau s'abaissera alors en dessous de 0°C. Cet abaissement de la température de fusion est d'autant plus important que leur concentration est élevée (Baudot *et al.*, 1998).

De plus, avant le processus de cryoconservation proprement dit, une acclimatation au froid ou un prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose peuvent être réalisés mais ne sont pas systématiques afin d'augmenter la tolérance à la déshydratation et à la congélation (Hirsh, 1987). L'acclimatation au froid a pour but de déclencher les phénomènes physiques et physiologiques qui auraient lieu lors de l'endurcissement au froid de plantes en milieu naturel. Ainsi au cours de cette étape des changements dans la quantité et la composition en phospholipides (PL) membranaires (Uemura et Steponkus, 1994) sont observés. C'est le cas notamment de l'augmentation de la quantité en phospholipides insaturés (PI) (Nichols *et al.*, 2004). La présence d'une à plusieurs doubles liaisons chez les PI leur confèrent un encombrement stérique plus important que pour les PL saturés permettant une meilleure fluidité et une meilleure diffusion des liquides entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire (Robert et Roland, 1989). Les membranes seront alors moins rigides entraînant une diminution du risque de séparation latérale des PL (H_{II}) (Uemura et Steponkus, 1999, Uemura *et al.*, 1995).

Comme lors de l'endurcissement au froid, un prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose provoque une augmentation de la concentration en sucre dans les cellules (donc une sortie d'eau). Ces sucres vont alors protéger les cellules par un abaissement de la température de cristallisation (surfusion) (Dereuddre et Gazeau, 1992) en conditions naturelles tandis que lors de la cryoconservation, ils vont faciliter la transition vitreuse du milieu intracellulaire. De plus, ils participent à la protection de la cellule par la création avec les PL d'interactions stabilisatrices (Uemura et Steponkus, 2003).

Ainsi grâce à la capacité des végétaux à tolérer, en partie, la présence de cristaux dans le milieu extracellulaire et à la possibilité de vitrifier le milieu intracellulaire, différentes méthodes de cryoconservation ont été mises au point dont les principales sont présentées ci-dessous.

1.2.3.1. Les méthodes avec cristallisation extracellulaire

Ces techniques vont consister à réduire la teneur en eau des cellules par un refroidissement lent afin d'obtenir une cryodéshydratation des cellules par effet d'exosmose contrôlée (Verleysen, 2005).

Ainsi, des espèces ligneuses comme le pommier (Tyler *et al.*, 1988), seule une cryodéshydratation appliquée à des bourgeons dormants suffit à les rendre tolérants à un stockage dans l'azote liquide.

A côté de ce système, des protocoles associent une cryodéshydratation et un traitement avec des cryoprotecteurs. Ces techniques par « controlled freezing » ont été utilisées sur différents types de matériel végétal comme par exemple des suspensions cellulaires (Bachiri *et al.*, 1995), ou des embryons somatiques (Fang *et al.*, 2004). Le caractère différencié ou indifférencié des structures végétales joue un rôle important. En effet plus le niveau de différenciations cellulaires est élevé plus le contrôle de l'exosmose est difficile notamment à cause d'un volume vacuolaire différent entre les types cellulaires. De fait cette méthode est surtout employée pour la conservation de structures non différenciées comme des suspensions cellulaires ou des cals. Ainsi il existe actuellement une trentaine de suspensions cellulaires d'espèces végétales conservées par cette technique (Mikula, 2006). D'une manière générale, les suspensions cellulaires sont placées dans une solution de préculture contenant un ou plusieurs cryoprotecteurs à faible concentration (Grout, 1995). Cette première étape va permettre

aux cellules de ne pas subir un choc osmotique trop important lorsqu'elles sont plongées dans la solution de cryoprotection. Une fois les cellules traitées, le refroidissement se déroule en deux étapes (Two-step freezing). La première étape a pour but de favoriser l'exosmose par un refroidissement lent de l'ordre de $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à une température d'environ -40°C (selon les espèces). Les cellules ainsi cryodéshydratées sont plongées dans l'azote liquide pour y être stockées (Reinhold *et al.*, 1995), il y a alors vitrification sans cristallisation du cytoplasme. Lors du réchauffement, les suspensions sont plongées immédiatement dans une solution à une température donnée afin d'éviter la cristallisation du cytosol lors de la dévitrification (Sakai, 1995). Une étape de détoxification des suspensions pour éliminer la solution de cryoprotection est alors appliquée avant de commencer le processus de régénération.

Outre une mise en œuvre sophistiquée, ces méthodes nécessitent le plus souvent un investissement lourd avec l'achat d'un congélateur programmable. C'est pourquoi, ces méthodes sont progressivement remplacées lorsque cela est possible par les techniques de cryoconservation sans cristallisation extracellulaire.

1.2.3.2. Les méthodes sans cristallisation extracellulaire

Surtout employées depuis le début des années 90 (Uragami *et al.*, 1989, Sakai *et al.*, 1990), ces méthodes sans cristallisation extracellulaire (vitrification) ont permis d'obtenir des résultats probants sur un grand nombre d'espèces, par exemple chez l'azalée (Verleysen *et al.*, 2003), chez le fraisier (Clavero-Ramirez *et al.*, 2005) ou encore chez le taro (Sant *et al.*, 2006). Elles concernent tout type de matériel végétal notamment des apex (Ishikawa *et al.*, 1996), des suspensions cellulaires (Reinhold *et al.*, 1995), des embryons zygotiques (Gagliardi *et al.*, 2002), des cals (Hao *et al.*, 2003) etc...

Selon la façon dont est réalisée la vitrification, ces méthodes diffèrent dans leur déroulement. Il en découle sept techniques différentes (Gonzalez-Arno *et al.*, 2008) présentées ci-après.

1.2.3.2.1. L'encapsulation-déshydratation

C'est en 1990 que Fabre et Dereuddre ont été les premiers à proposer une méthode de cryoconservation par vitrification basée sur le concept de graine synthétique par l'encapsulation d'apex dans des billes d'alginate. Depuis cette date la technique a été déclinée sous de nombreuses variantes mais dont les principes initiaux demeurent les mêmes.

L'objectif de cette méthode est de réussir la vitrification du cytoplasme par une déshydratation partielle et une congélation rapide. Surtout appliquée à des apex, elle est aussi parfois utilisée sur d'autre matériel végétal comme par exemple sur des suspension cellulaires de vignes (Wang *et al.*, 2002) ou encore sur des protocormes et des graines d'orchidées (Flachsland *et al.*, 2006).

Les apex ainsi encapsulés subissent alors deux déshydratations. La première dite osmotique consiste à immerger pendant plusieurs heures les billes dans un milieu liquide riche en saccharose (Préculture) (e.g. 19 heures dans une solution à 0.8M pour le fraisier, Clavero-Ramirez *et al.*, 2005). Par effet d'osmose, une partie de l'eau sort des apex et des billes tandis qu'à l'inverse une entrée de saccharose se produit. Ce mouvement perdure jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit rétabli entre le milieu et le système apex-bille. Outre le rôle d'osmoticum, le saccharose protège l'intégrité des membranes lors de la déshydratation (Crowe *et al.*, 1997). Une deuxième déshydratation dite évaporative complète la première, elle se caractérise par une dessiccation de l'ensemble apex-bille sous un flux d'air sec (Fabre et Dereuddre, 1990) ou dans des boîtes contenant du silicagel (Dumet *et al.*, 2002). Il en résulte une

évaporation de l'eau qui a pour conséquence d'augmenter la concentration en saccharose dans l'apex, favorisant ainsi la vitrification du cytoplasme lors de la congélation dans l'azote liquide.

Block a montré, en 2003, que dans les conditions classiques d'encapsulation, il était nécessaire de déshydrater les billes d'alginate jusqu'à une teneur en eau de 0,4 g d'eau.g⁻¹de matière sèche pour obtenir la formation d'un état vitreux lors de l'immersion dans l'azote liquide. Ce résultat purement physique a montré qu'il était possible d'obtenir une vitrification des billes. En revanche il ne permet pas de conclure sur la survie des explants se trouvant à l'intérieur des billes le cas échéant et notamment de savoir s'il y aurait bien eu vitrification des explants. Il faut donc veiller systématiquement à mettre en adéquation la teneur en eau des billes pour avoir les taux de survie des plus élevés possibles. Ainsi le meilleur taux de survie d'apex de *Pelargonium* après déshydratation a été obtenu pour une teneur en eau des billes de 0.25g d'eau g⁻¹ de matière sèche (Grabin *et al.*, 2003).

Une fois les billes déshydratées et stockées dans l'azote liquide, elles sont réchauffées rapidement avant d'être déposées sur les milieux de culture pour débiter le processus de régénération. Le réchauffement toujours rapide peut varier en fonction des protocoles développés par les différentes équipes. A titre d'exemples, les apex encapsulés de *Dendranthema grandiflora* sont immergés 3 min dans de l'eau à 35°C pour être réchauffés (Martin et Gonzalez-Benito, 2005) tandis que chez le *Pelargonium*, les apex sont plongés 1 min dans la solution de préculture à température ambiante (Dumet *et al.*, 2002).

L'encapsulation-deshydratation offre l'avantage de ne pas utiliser des cryoprotecteurs plus ou moins toxiques tel que le glycérol (Volk et Walters, 2006) utilisé dans la vitrification (voir ci-dessous). Toutefois, bien que largement employée sur de nombreuses plantes, elle tend aujourd'hui à être remplacée par des méthodes moins longues et plus faciles à mettre œuvre.

1.2.3.2.2. La vitrification

Cette méthode appliquée pour la première fois sur *Citrus sinensis* est basée sur la vitrification de l'ensemble du matériel végétal (Sakai, 1990) et non pas uniquement sur celle du cytoplasme (Verleysen, 2005). Elle offre l'avantage d'éliminer totalement l'eau cristallisable et de limiter le stress causé aux cellules lors de l'exosmose dans le cas de la méthode par «controlled freezing» (Grout, 1995).

Actuellement cette méthode se base surtout sur l'utilisation d'un mélange de cryoprotecteurs décrit par Sakai en 1990. Ce mélange dénommé PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) se compose de 30% (w/v) glycérol, 15% (w/v) DMSO, et 15% (w/v) éthylène glycol et de saccharose à 0,4M. Notamment, grâce à ses propriétés physico-chimiques (transition vitreuse à -115°C, rôle cryoprotecteur), la solution PVS2 a permis la cryoconservation de nombreuses espèces végétales. En revanche, son action cryoprotectrice reste en partie inconnue. Toutefois il semblerait que chaque composant de PVS2 ait un rôle précis. Le DMSO et l'éthylène glycol en pénétrant dans les cellules empêcheraient l'augmentation de la concentration en électrolytes dans le cytoplasme (Brison *et al.*, 1995). Le DMSO stabiliserait les membranes par la formation de liaisons chimiques (Örvar *et al.*, 2000). Le glycérol participerait à la déshydratation des cellules (Verleysen, 2005). Quant au saccharose il agirait comme nous l'avons décrit auparavant. De plus, Volk et Walters (2006) ont montré que PVS2 intervient dans trois mécanismes ayant un lien avec la cryoprotection (1), elle remplace l'eau contenue dans les cellules, (2) elle change le comportement de l'eau résiduelle, (3) elle interagit avec l'eau résiduelle pour limiter les dégâts causés par une contraction excessive des cellules lors d'une déshydratation évaporative.

Outre PVS2, il existe d'autres solutions de cryoconservation notamment PVS3 (glycérol 50% et saccharose 50%) (Nishizawa *et al.*, 1993), PVS4 (35% glycérol, 20,5% saccharose et 20% éthylène

glycol) (Sakai, 2000) ou bien encore une solution contenant uniquement 10% de DMSO (Perez *et al.*, 1997, Schäfer-Menuhr et Schumacher, 1997).

Généralement, la vitrification se divise selon les étapes suivantes. Une première étape où le matériel végétal est plongé dans une solution de charge LS (Loading solution) contenant 0.4M de saccharose et 2M de glycérol (Sakai, 2000). Cette étape va permettre une déshydratation partielle des tissus et ainsi évite les dégâts liés à une trop grande différence de pressions osmotiques entre la solution de cryoprotection (souvent PVS2) et le cytoplasme. Il est à noter que plusieurs auteurs ont proposé des méthodes de cryoconservation par vitrification sans cette étape de « loading » notamment Jung *et al.*, en 2001 pour des racines adventives de *Hyoscyamus niger* ou Halmagyi *et al.* en 2004 pour des apex de chrysanthèmes. Dans ce cas, un endurcissement au froid ou un prétraitement sur un milieu enrichi en sucres (*e.g.* saccharose, Leunufna et Keller, 2003), en alcool (*e.g.* glycerol, Touchell *et al.*, 2002) ou parfois en DMSO (Winkelman *et al.*, 2004) est systématique. La seconde étape va consister à déshydrater le matériel végétal dans une solution cryoprotectrice (*e.g.* PVS2).

Avant le stockage dans l'azote liquide le matériel végétal est déposé dans des cryotubes contenant de la solution de cryoconservation fraîche. Les tubes sont alors immédiatement plongés dans l'azote liquide pour déclencher la vitrification. En sortie de stockage, les tubes sont rapidement réchauffés pour éviter la formation de cristaux. La solution de cryoconservation est alors remplacée par une solution (RS : Recovery solution) enrichie en saccharose (1.2M) afin d'éliminer les cryoprotecteurs potentiellement toxiques. Une fois le matériel végétal sorti de RS, le processus de régénération *in vitro* peut débiter.

Ainsi, la réussite de la cryoconservation par vitrification dépend de l'optimisation pour chaque espèce des étapes du protocole ainsi que de la nature et de la taille du matériel végétal utilisé.

1.2.3.2.3. L'encapsulation-vitrification

Comme son nom l'indique cette technique est une combinaison de l'encapsulation et la vitrification (Engelmann, 2000). Tannoury *et al.* en 1991 ont été les premiers à associer les deux méthodes pour cryoconserver des apex d'oeillet. Depuis, la technique a été appliquée sur différentes espèces comme chez la gentiane (Tanaka *et al.*, 2004), le framboisier (Wang *et al.*, 2005), la patate douce (Hirai et Sakai, 2003), le pommier (Paul *et al.*, 2000) ou le wasabi (Matsumoto *et al.*, 1995)...

La principale contrainte de cette méthode va être de déterminer les durées d'incubation des apex encapsulés dans les différentes solutions (LS et PVS2) intervenant dans la vitrification. La barrière physique formée par les billes d'alginate va ralentir la diffusion des produits dans la bille ce qui va obliger à augmenter les durées d'incubations pour pouvoir obtenir une bonne osmoprotection des apex lors de la cryoconservation (Matsumoto *et al.*, 2000). En revanche, elle combine les avantages d'une mise en œuvre rapide comme pour la vitrification et une manipulation facilitée des apex enrobés comme lors de l'encapsulation-déshydratation (Sakai et Engelmann, 2007).

1.2.3.2.4. La «droplet-vitrification»

Cette variante de la vitrification a été développée à partir de la méthode de « droplet-freezing » mise au point pour la cryoconservation d'apex de manioc par Kartha *et al.* en 1982 (Gonzalez-Arno *et al.*, 2008). Elle a été mise au point pour la première fois par Schäffer-Menuhr *et al.* en 1994 avec pour objectif d'augmenter la vitesse de refroidissement par la réduction du volume des liquides autour du matériel végétal. Concrètement, le matériel végétal après avoir été cryoprotégé est déposé sur des bandelettes de papier d'aluminium dans des microgouttes de cryoprotecteurs (le plus souvent PVS2)

(5 à 10 μL) avant d'être plongé directement dans l'azote liquide. Lors du réchauffement les bandelettes d'aluminium contenant les apex sont directement immergés dans la solution RS. Les apex sont alors récupérés puis étalés sur du papier filtre dans des boîtes de Petri contenant du milieu de culture pour relarguer l'excédent de RS et les cryoprotecteurs résiduels.

D'après Sakai et Engelmann (2007), cette méthode est dorénavant appliquée sur une quinzaine d'espèces comme la pomme de terre (Schäffer-Mehnur *et al.*, 1994 et 1997), le bananier (Panis *et al.*, 2005) ou l'ail (Kim *et al.*, 2006).

1.2.3.2.5. Les autres méthodes de cryoconservation par vitrification

Hormis les méthodes citées ci-dessus, il existe d'autres techniques de vitrification plus confidentielles. A cet égard nous pouvons citer la dessiccation d'embryons de graines récalcitrantes avant l'immersion dans l'azote liquide (dehydration technique) (Engelmann, 1997), la préculture d'apex sur des milieux contenant des cryoprotecteurs (pregrowth technique) (Panis, 1995) ou encore la combinaison de la préculture et la dessiccation (pregrowth-dehydration technique) sur des embryons somatiques avant le stockage dans l'azote liquide (Dumet *et al.*, 1993).

1.2.4. Les limites de la cryoconservation

Comme toutes stratégies de conservation, le maintien des ressources génétiques par la cryoconservation doit faire l'objet d'un questionnement sur l'intérêt d'utiliser cette méthode.

Plusieurs facteurs peuvent limiter son utilisation. Nous distinguerons ainsi le contexte socio-économique et les facteurs biologiques.

1.2.4.1. Le contexte socio-économique

Bien qu'il soit couramment admis que cette méthode garantisse une conservation à moindre coût, plusieurs conditions doivent être réunies avant de développer un programme de conservation des ressources génétiques par cryoconservation. La mise en place de la cryoconservation nécessite les mêmes équipements qu'un programme de culture *in vitro* classique (hottes à flux laminaire, chambres de culture, matériel de dissection, autoclave...) auxquels il faut ajouter une bonbonne spécifique pour le stockage dans l'azote liquide et du personnel de laboratoire formé aux différentes méthodes de cryoconservation. Le coût global de la création d'une cryobanque sera d'autant plus élevé que les conditions de départ seront éloignées des conditions optimales.

A titre d'exemple Verleysen en 2005 a montré que le coût d'installation d'une cryobanque d'azalées était plus élevé que l'installation d'une collection en serre. En revanche au bout de 10 ans de conservation et à la condition de bénéficier d'un laboratoire de culture *in vitro*, le coût annuel de la conservation pour un cultivar cryoconservé est de 0,45 € contre 6,2 € pour un cultivar en serre.

C'est pourquoi, une réflexion approfondie doit toujours être faite pour que la cryoconservation soit retenue comme une méthode rentable et pérenne.

1.2.4.2. Les facteurs biologiques

Les taux de survie à la sortie de l'azote liquide sont très variables entre les espèces et parfois entre les cultivars d'une même espèce (*e.g.* chez le bananier, Panis *et al.*, 2005). Ces différences sont dues aux spécificités de l'espèce considérée ou du matériel végétal utilisé. Bien que l'ensemble des mécanismes

physiques et métaboliques ne soit pas complètement connu, les différences de survie seront essentiellement provoquées par une tolérance à la déshydratation et une sensibilité au froid inégales. Les stress et dégâts observés sur le matériel végétal n'ayant pas survécu aux processus de cryoconservation seront les mêmes que ceux observés lors d'une exposition au froid ou lors d'un stress hydrique. C'est-à-dire la destruction de l'intégrité des cellules par la glace (voir point 1.2.2.1.), la déstabilisation des membranes (voir point 1.2.2.2.), l'attaque des composants cellulaires par des ROS (voir point 1.2.2.3.)

La cryoconservation étant basée sur la déshydratation des cellules et ceci quelle que soit la technique utilisée, l'acquisition de la tolérance à la déshydratation est capitale.

Or, à cet égard le seul problème insoluble, à notre connaissance, a lieu lorsqu'il y a un hiatus entre la survie des cellules et le niveau de déshydratation. C'est-à-dire lorsque la mort cellulaire intervient avant que la cellule soit suffisamment déshydratée pour empêcher la formation de cristaux létaux. Dans ce cas précis il n'y pas d'acquisition de la tolérance à la déshydratation ce qui rend impossible l'utilisation de la cryoconservation.

Outre ces événements, il a été montré que les cryoprotecteurs pouvaient s'avérer plus ou moins toxiques en fonction de leur concentration et de leur durée d'exposition avec le matériel végétal (Winkelman *et al.*, 2004 ; Volk et Walters, 2006).

Aux vues de l'ensemble de ces facteurs, il apparaît que la principale limite de la cryoconservation est son caractère non systématique. C'est-à-dire l'obligation d'adapter l'ensemble des étapes et des conditions expérimentales au matériel végétal considéré pour obtenir les taux de survie post-cryoconservation les plus élevés possibles. Cette condition est strictement nécessaire pour espérer régénérer un maximum de plantes après la cryoconservation. Il convient donc de chercher des solutions pour pouvoir utiliser la cryoconservation de manière plus systématique. Pour cela, il est impératif de mieux connaître le comportement des cellules au cours d'un processus de cryoconservation.

C'est pourquoi, la méthode par « droplet-vitrification » a été adaptée aux apex de *Pelargonium* notre plante modèle (chapitre n°2) car elle a donné de bons résultats en terme de taux de survie élevés et de facilité de mise en œuvre. Suite à ce travail, des études dynamiques ont été réalisées à l'aide de systèmes microscopiques innovants. Par ces systèmes, il est tenté de mieux comprendre l'impact des différentes solutions de cryoconservation sur l'architecture globale des apex et sur les changements structuraux engendrés au niveau des cellules apicales et méristématiques.

1.3. L'estimation de la conformité

A l'instar des autres méthodes de conservation des ressources génétiques, la cryoconservation doit assurer le maintien du matériel végétal sans en altérer les caractéristiques originelles. La cryoconservation et la culture *in vitro* comme tout phénomène n'appartenant pas au métabolisme naturel de la cellule sont des événements traumatisants qui peuvent avoir un impact sur la conformité des plantes régénérées. C'est pourquoi, plusieurs équipes ont réalisé des études pour tenter de mettre en évidence la présence ou l'absence de différences entre les végétaux à conserver et les végétaux issus de cryoconservation. Ces travaux ont notamment porté sur la comparaison de caractères morphologiques, du niveau de ploïdie, de l'indice mitotique, du taux de méthylation de séquences d'ADN, de l'expression de gènes ou encore de la production de métabolites secondaires.

Le maintien des caractères morphologiques est impératif pour valider un système de conservation en particulier pour les plantes ornementales, tel que les pélargoniums. Pour cela, des descripteurs précis ont été utilisés dans de nombreuses études pour évaluer la qualité du matériel régénéré après cryoconservation. Notamment, nous pouvons citer la mesure des entrenoeuds, de la taille des pétioles, de la surface foliaire, de la forme des feuilles, du rapport entre la longueur et la largeur des feuilles etc... La précision des résultats sera d'autant plus grande que le nombre de descripteurs sera grand et que leur choix sera judicieux par rapport à l'espèce considérée. Par exemple, 18 descripteurs ont été utilisés pour caractériser la morphologie de l'igname (Ahuja *et al.*, en 2002), 4 pour décrire le pommier (Liu *et al.*, 2001). La valeur agronomique au champ de la fraise après cryoconservation a été estimée à l'aide de 6 descripteurs (couleur interne et externe du fruit, taille de la cavité, la forme, la fermeté, la teneur en sucres solubles) (Medina *et al.*, 2007).

Hormis le cas particulier d'un cultivar chimérique de chrysanthème où des changements de couleur des fleurs ont été constatés (Fukai *et al.*, 1994), aucune différence significative de caractères morphologiques n'a été observée chez les plantes issues de cryoconservation.

Grâce à l'essor de la biologie moléculaire, de nombreux outils d'analyse du génome sont actuellement utilisés dans l'étude de la conformité de plantes issues de cryoconservation.

Ainsi, il a été montré chez la pomme de terre (Harding et Benson, 2000) et chez l'azalée (Verleysen, 2005) que la cryoconservation n'avait pas d'impact sur le niveau de ploïdie. L'absence de différence significative fût aussi mise en évidence chez *Hypericum perforatum* lors de comptages chromosomiques et de mesure de l'indice mitotique (Urbanova *et al.*, 2002 et 2006). L'utilisation de marqueurs moléculaires n'a fait apparaître aucunes différences entre les plantes d'origine et les plantes issues cryoconservation (*e.g.* RAPD, De Verno *et al.*, 1999, AFLP, Turner *et al.*, 2001a, VNTR, Urbanova *et al.*, 2006).

Néanmoins plusieurs auteurs font mention de légers changements dans le poids moléculaire de certains fragments d'ADN dus à des changements de méthylation de l'ADN chez des végétaux cultivés *in vitro* (Harding, 1994). Ces mêmes différences ont été observées chez le pommier (Hao *et al.*, 2001) ou chez l'amandier (Channuntapipat *et al.*, 2003) sur des plantes issues de cryoconservation. Ces différences seraient vraisemblablement liées aux stress subis par les végétaux lors du processus de cryoconservation (Hao *et al.*, 2002). Cet effet épigénétique, qui consiste en un transfert d'un groupe méthyle de la S-adenosine-L-méthionine vers les cytosines et les adénines, joue un rôle dans plusieurs mécanismes dont l'expression des gènes, la différenciation cellulaires, l'inactivation de la chromatine.... (Lu *et al.*, 2008). Par voie de conséquence la méthylation de l'ADN peut avoir un impact sur les caractéristiques phénotypiques du matériel végétal cryoconservé.

En outre, la comparaison de séquences d'ADN par l'utilisation d'un nombre restreint de marqueurs est sujet à caution. Martin et Gonzalez-Benito en 2005 ont montré chez *Dendranthema grandiflora* qu'il n'y avait aucune différence entre des plantes témoins et des plantes issues de cryoconservation par vitrification. Ce résultat a été obtenu par l'utilisation de 8 marqueurs RAPD qui ont généré 103 fragments d'environ 1000 paires de bases. Sachant que le génome du chrysanthème (cultivar hexaploïde) est approximativement de 18×10^9 paires de base, les auteurs ont conclu que leur analyse comparative portait sur 0,00055% du génome! L'utilisation de marqueurs moléculaires permettra de détecter s'il y a des changements importants entre les génomes mais beaucoup plus difficilement de petites différences. C'est pourquoi une analyse par marqueurs moléculaires devra toujours s'accompagner d'une étude sur d'autres critères pour valider l'emploi de la cryoconservation.

A côté de ces travaux, il existe des études plus ciblées de la conformité après la cryoconservation. Par exemple, aucune différence, entre les témoins et le matériel végétal cryoconservé, n'a été relevée concernant la stabilité du transgène de la neomycinphosphotransférase II (*npt II*) dans des lignées de peuplier (Jokipii *et al.*, 2004) ou sur l'expression du gène *sam I* chez des cellules transformées de pavot (Elleuch *et al.*, 1998).

D'autres auteurs se sont attachés à vérifier si la quantité et/ou la qualité des produits de l'expression des gènes c'est-à-dire les protéines pouvaient varier lors de la cryoconservation. Ainsi aucune différence sur les zymogrammes n'a été détectée pour neuf isozymes de *Melia azedarach* corroborant les résultats cités à propos de l'analyse du génome et de son expression (Scocchi *et al.*, 2004).

L'absence d'effet de la cryoconservation se retrouve aussi dans la production de métabolites secondaires. Cette qualité est importante notamment pour les espèces végétales employées dans l'industrie pharmaceutique. Ainsi la production de diosgénine, un stéroïde extrait de *Dioscorea floribunda* et de *Dioscorea deltoidea*, utilisé en Inde n'a pas subi de variation dans les plantes issues de la cryoconservation (Ahuja *et al.*, 2002, Dixit-Sharma *et al.*, 2005). Des résultats allant dans le même sens ont été obtenus chez *Atropa belladonna* avec toutefois un retard dans la production d'alcaloïdes au début de la régénération post-cryoconservation (Touno *et al.*, en 2006).

De plus Ryynänen et Aronen en 2005 ont mis en évidence chez *Betula pendula* que la durée de conservation dans l'azote liquide (14 mois et 70 mois) n'avait globalement pas d'incidence sur les caractéristiques des plantes régénérées.

Comme nous venons de le voir la cryoconservation peut être considérée comme une méthode fiable de conservation des ressources génétiques. L'ensemble des études liées à la conformité des plantes régénérées n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives chez les plantes cryoconservées, à l'exception parfois, de variations du niveau de méthylation de l'ADN ou de changement de phénotypes dans le cas particulier des chimères.

A partir des études précédentes, la qualité des plantes régénérées a été estimée au cours de la thèse afin de déterminer l'impact du bouturage, d'une culture d'apex simple et de la cryoconservation sur la conformité. A cet égard le genre *Pelargonium* est un modèle particulièrement intéressant, du fait de l'existence de cultivars issus d'espèces différentes aux coloris variés et de variétés chimériques au feuillage panaché. Cette variabilité a été utilisée pour tenter de comprendre quel peut être l'impact de la cryoconservation sur la conformité.

1.4. La cryothérapie

Brison *et al.* ont été les premiers en 1997 à montrer chez *Prunus* que la cryoconservation d'apex en dehors de son rôle de conservation de ressources génétiques pouvait avoir une action sur l'élimination de virus. La détection par IC-PCR du PPV (plum pox virus) a permis de montrer que la cryoconservation permettait d'avoir 50% d'élimination du PPV chez des plantes cultivées *in vitro* contre seulement 20% par des plantes issues d'une culture de méristème simple. A partir de ces travaux d'autres équipes ont travaillé sur cette thématique ainsi Helliott *et al.* en 2002 ont pu obtenir chez *Musa* spp. une élimination de l'ordre de 30% du CMV (cucumber mosaic virus) et de 90% du BSV (banana streak virus). Wang *et al.* en 2003 ont réussi à l'éliminer 97% du GVA (grapevine virus A) par la cryoconservation d'apex de vigne ou encore de 83 à 86 % d'assainissement du PLRV (potato leafroll

Geraniaceae

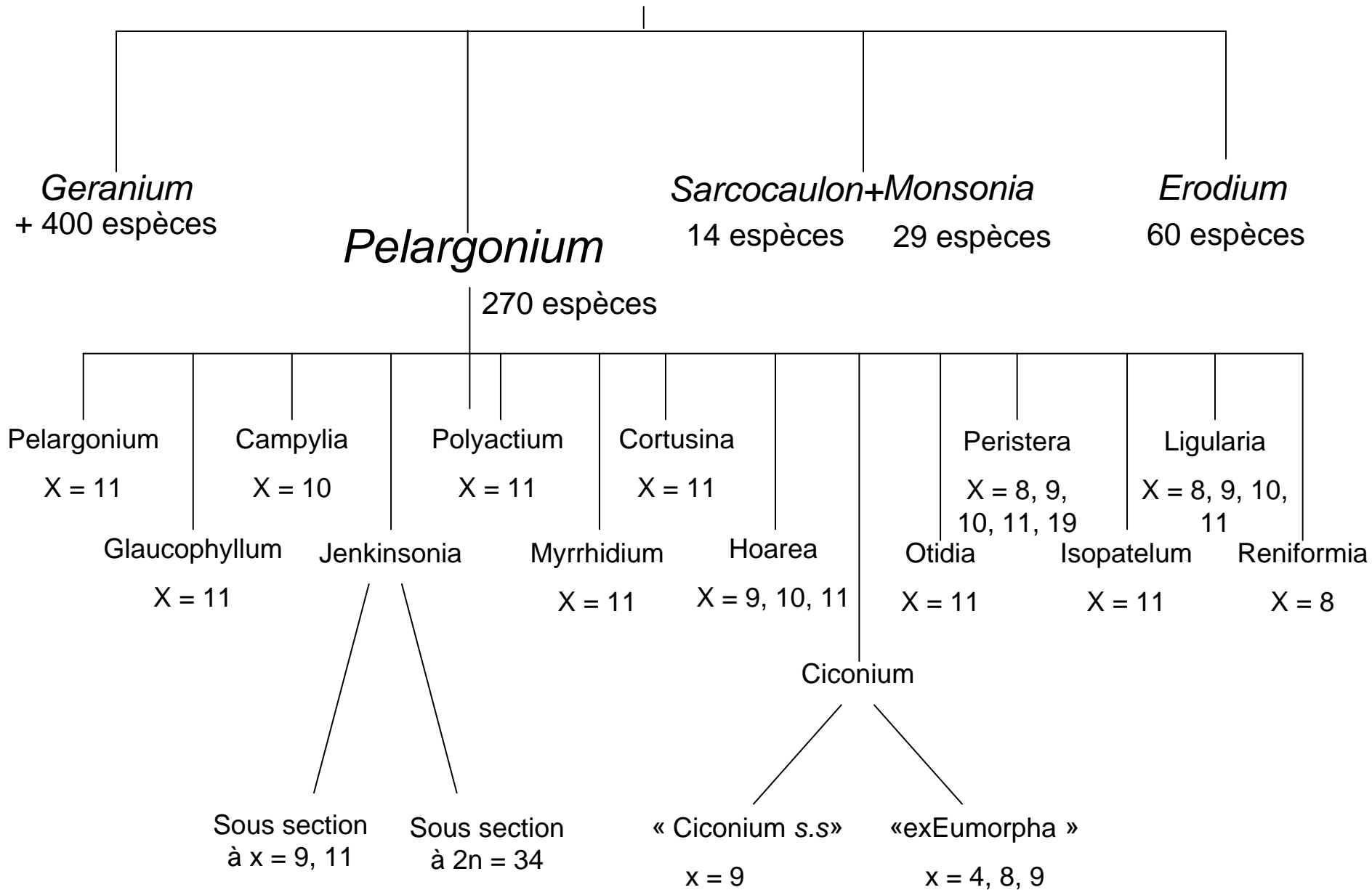


Figure 1.5 Classification et division du genre *Pelargonium* d'après James *et al* ; 1995 et 2004

virus) et de 91 à 95% d'élimination du PVY (potato virus Y) à partir d'apex cryoconservés de pomme de terre (Wang *et al.*, 2006).

Aux vues des travaux publiés, il semble que la cryoconservation ait un rôle bénéfique sur l'éradication virale. Là encore, le *Pelargonium* est un modèle d'étude intéressant car sensible à de nombreux virus. Par conséquent, nous avons entrepris au cours de la thèse de travailler sur deux virus faisant partie de la liste des virus à contrôler lors de la certification (OEPP, 2003), le PFBV (*Pelargonium* flower break virus) et le PLPV (*Pelargonium* line pattern virus), dont nous savons qu'ils sont présents dans la collection d'AGROCAMPUS-OUEST. L'étude menée a pour but dans un premier temps de vérifier si la cryoconservation a un effet bénéfique sur l'éradication des deux virus. Puis dans un deuxième temps d'essayer d'apporter des informations supplémentaires sur l'action spécifique de la cryoconservation dans l'éradication virale par la mise en place d'immunolocalisation.

1.5. Description du genre *Pelargonium*

1.5.1 Histoire et taxonomie

La famille des *Geraniaceae* (Spermaphyte, Angiosperme, dicotylédone) se compose principalement des 4 genres suivant, *Geranium*, *Pelargonium*, *Erodium*, *Monsonia* (qui inclue *Sarcocaulon*) (figure 1-5). En plus de ces 4 genres, un certain nombre de familles et de genres sont inclus par certains auteurs (*e.g.* Thorne *et al.*, 1992) dans les *Geraniaceae* mais en sont exclus par d'autres (Van der Walt et Demarne, 1988) ce qui est encore de nos jours source de débat. De part leur vaste répartition géographique et leur présence dans des écosystèmes très différents (zones arides, zones pluvieuses, régions montagneuses...), les représentants de cette famille se caractérisent par une très grande diversité morphologique (James, 1995).

Bien que les premières introductions en Europe de *Pelargonium* date de 1609 ce n'est qu'en 1789 que le genre *Pelargonium* (du grec *pelargos* signifiant cigogne en raison de la forme de la silique) fut définitivement distingué du genre *Geranium* (du grec *geranos* signifiant grue) par le français Charles Louis L'héritier de Brutelle (James, 1995). Ci-joint le tableau établi par Vidalie en 1979 sur les principales différences entre les deux genres.

Tableau 1-1 : Principales différences entre les genres *Pelargonium* et *Geranium*. D'après Vidalie(1979)

PELARGONIUM	GERANIUM
- Origine : Afrique du Sud (pour la grande majorité)	- Pays tempérés ou froids
- Fleur plus ou moins zygomorphe	- Fleur actinomorphe
- Présence d'un éperon nectarifère au sépale postérieur.	- Pas d'éperon
- 7 étamines (sur 10) fertiles	- 10 étamines fertiles

Depuis le 18^{ème} siècle, la classification du genre *Pelargonium* a subi de nombreuses évolutions grâce aux travaux de botanistes européens. D'abord basée sur des caractères morphologiques, la taxonomie du genre s'appuie aujourd'hui sur l'apport de la cytologie, de la caryologie, de la palynologie ou encore de la biologie (Van der Walt et Vorster, 1983, Dreyer *et al.*, 1992, Albers et Van der Walt, 1992, James *et al.*, 1995 et 2004). Ainsi depuis 2004, le genre *Pelargonium* est divisé en 16 sections et

sous sections regroupant environ 270 espèces différentes (James *et al.*, 2004) (figure 1-5). La très grande majorité (90 %) des *Pelargonium* provient d'Afrique australe, plus particulièrement d'Afrique du Sud où environ 200 espèces au phénotype très varié ont été décrites principalement dans la région du Cap (Van der Walt *et al.*, 1983).

1.5.2. Origine et multiplication des cultivars utilisés en horticulture

1.5.2.1. Origine des cultivars

Malgré une diversité importante des *Pelargonium*, toutes les variétés créées depuis le 17^{ème} siècle proviennent des quelques espèces ramenées par les explorateurs européens. Ainsi tous les cultivars disponibles sur le marché peuvent être divisés en quatre groupes en fonction de leur origine spécifique ceux issus de *Pelargonium x hortorum* L. H. Bailey, de *Pelargonium x peltatum (hederaefolium)* (L.) L'Her, de *Pelargonium x domesticum* L. H. Bailey et le groupe plus large des *Pelargonium* odorants.

***Pelargonium x hortorum* L. H. Bailey**

Depuis son introduction en Europe, cette espèce a beaucoup été employée par les obtenteurs pour créer de nombreux cultivars de « géranium à massif ». Au départ diploïdes les cultivars sont de nos jours quasiment tous tétraploïdes avec une duplication des fleurs pouvant être simples, doubles ou encore multiples. La gamme de couleur est relativement étendue allant du blanc au rouge foncé en passant par des colorations saumons ou violettes. En revanche, il n'existe pas à notre connaissance pour le moment de cultivars possédant des fleurs dans les tons de jaunes ou de bleus. Il est aussi à noter l'existence de cultivars au feuillage panaché.

***Pelargonium x peltatum* L'Her. (*P. hederaefolium*)**

P. x peltatum L'Her est à l'origine des cultivars de géraniums lierres disponibles sur le marché. Le succès de séries très florifères diploïdes à port lianescent retombant comme 'Balcon' et 'Decora' en font aujourd'hui l'espèce la plus vendue en Europe (Vidalie, 2004). Néanmoins la gamme de coloris est moins grande que chez *P. x hortorum*. Il existe aussi des cultivars dont le caractère ornemental est conféré par un feuillage présentant une dépigmentation du système vasculaire due à la présence de virus symbiotiques (Cassells *et al.*, 1982).

***Pelargonium x domesticum* L. H. Bailey**

Les variétés dont *P. x domesticum* est à l'origine forment ce que l'on appelle les « pélargoniums des fleuristes ». Les plantes se présentent sous la forme de plantes très ramifiées buissonnantes. Les ombelles se composent de grandes fleurs parfois bicolores. Contrairement aux « géraniums lierres » et aux géraniums à massif, il est souvent employé comme plante d'intérieur (Vidalie, 2004).

Les *Pelargonium* odorants

La gamme d'odeurs produite par les huiles essentielles de ces espèces est très large allant de l'odeur de rose à celle de menthe en passant par celle du citron. Certaines espèces sont à l'origine de nombreuses

variétés odorantes qui peuvent faire l'objet d'une exploitation industrielle dans la parfumerie et la pharmacie comme *P. capitatum* (L.) L'Her, ou *P. graveolens* L'Her (Webb, 1984).

1.5.2.2. Création et multiplication des cultivars

La production des *Pelargonium* se fait selon deux systèmes différents soit par semis d'hybrides F1 soit par bouturage. Même si actuellement certaines entreprises proposent des hybrides F1, la durée d'obtention de lignées homozygotes par autofécondations successives (entre 12 et 15 ans) (Digat et Vidalie, 1982) ne facilite pas leur diffusion à grande échelle.

Très largement répandue en Europe, le bouturage à partir de pieds mères offre l'avantage d'être facile à mettre en œuvre. Il permet d'obtenir rapidement des plantes commercialisables et de bien conserver les caractéristiques initiales de la plante mère notamment des variétés chimériques au feuillage panaché. Sa facilité à être bouturé est l'une des raisons de son succès en horticulture. Toutefois le bouturage a pour désavantage de faciliter la transmission de maladies, par conséquent les producteurs doivent respecter un itinéraire technique précis, voire, de suivre le schéma de certification établi en 2003 (OEPP, 2003) afin de mettre sur le marché des plantes saines.

1.5.3. Importance économique

Grâce à ses qualités intrinsèques (nombreux coloris, bonne résistance au stress hydrique), le *Pelargonium* s'est imposé comme la première plante à massif en France avec une production de 150 millions de plantes par an (Vidalie, 2004) ce qui représente un marché d'environ 140 millions d'euros (Mithila *et al.*, 2001). Après un doublement de la production au cours des 20 dernières années, la production est en légère diminution. Ce tassement de la production est essentiellement dû à l'importation de plantes en provenance de pays à bas coûts de main d'oeuvre (Kenya, Tunisie, Costa Rica...) et à des conditions climatiques parfois défavorables (Vidalie, 2004).

Contrairement à l'offre, la demande, elle se maintient autour de 183 millions de plantes par an (1/3 *P. x hortorum*, 2/3 *P. x peltatum*). Chaque année près de 10 millions de foyers français achètent des *Pelargonium* pour l'embellissement des balcons et fenêtres et dans une moindre mesure pour les massifs et les cimetières (Vidalie, 2004).

1.5.4. *Pelargonium* et cryoconservation

C'est à partir de 1999 que des travaux sur la conservation du *Pelargonium* ont débuté. Ils ont abouti en 2001 (Grapin *et al.*) à une première publication portant sur l'établissement d'un protocole de cryoconservation d'apex de *Pelargonium* par encapsulation-déshydratation. Suite à ce travail, Dumet *et al.* en 2002 ont cherché à optimiser la méthode existante par l'amélioration de plusieurs étapes de l'encapsulation-déshydratation dont la déshydratation osmotique et la méthode de réchauffement. Ils ont aussi déterminé la teneur en eau dans les billes pour avoir le meilleur taux de survie possible après la cryoconservation. Les travaux de recherche se sont poursuivis (Grapin *et al.*, 2003) sur les effets de la concentration en saccharose de la préculture et de la durée de déshydratation sur le taux de survie. Les résultats de ces expérimentations ont permis de mettre en place le protocole actuel d'encapsulation-déshydratation d'apex de *Pelargonium* dont les étapes sont décrites en page 27 chapitre n° 2.

En plus des indications énoncées auparavant, l'utilisation du *Pelargonium* comme plante modèle pour la thèse se justifie pour plusieurs raisons. :

Premièrement, d'un point de vue patrimonial, les cultivars horticoles sont multipliés végétativement, il existe donc de part le monde des collections dont celle d'AGROCAMPUS-OUEST pour conserver ces ressources génétiques. Ces collections ne garantissant pas une pérennité sur du long terme comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, la cryoconservation d'apex peut palier cet inconvénient. C'est pourquoi, des travaux de recherche sur la cryoconservation d'apex de *Pelargonium* ont été réalisés auxquels nous nous sommes référés pour améliorer le système existant.

Deuxièmement, le *Pelargonium* est une plante à croissance rapide puisqu'il faut environ 4 mois à partir d'une bouture pour avoir une plante suffisamment grande pour que soit prélevé des apex. De cette manière, il est possible d'avoir en permanence du matériel végétal pour réaliser les différentes études.

Enfin troisièmement, il existe au sein de la collection des cultivars chimériques au feuillage panaché. Après avoir caractérisé la structure des chimères au niveau des méristèmes, ces cultivars ont été utilisés d'une part pour estimer la conformité phénotypique et d'autre part pour essayer de localiser les couches cellulaires intervenant lors de régénération *in vitro*, notamment lors de la cryoconservation.

CHAPITRE N°2

Mise au point de la cryoconservation chez *Pelargonium*

2.1. Introduction

L'existence au sein d'AGROCAMPUS-OUEST, centre d'Angers, d'une importante collection de *Pelargonium* (299 cultivars de *Pelargonium x hortorum*, 126 cultivars *Pelargonium x peltatum* et 75 autres espèces) pose la question de sa pérennité. Les risques de perte d'accessions par le maintien en serre sont particulièrement importants. C'est pourquoi le travail de recherche mené a eu pour objectif, entre autres, d'établir à partir des acquis du passé un système de cryoconservation s'affranchissant de l'installation *in vitro* et de l'adaptation au froid, qui soit efficace, simple et rapide à mettre en œuvre.

La cryoconservation d'apex ne peut se concevoir que s'il existe un système de régénération *in vitro* qui donne satisfaction. Ce point a aussi été abordé au cours de cette étude, notre but étant qu'un apex cryoconservé reprenne sa croissance à la sortie du stockage dans l'azote liquide pour donner une seule et unique pousse feuillée sans passer par une phase de callogénèse. Cette condition est importante pour limiter les variations somaclonales qui pourraient être favorisées par une organogénèse indirecte. Le maintien de la conformité des plantes étant l'objectif principal de toutes les méthodes de conservation, il est important de veiller à limiter au maximum les risques de dérives génétiques.

Afin de comprendre quelles sont les conditions de réussite de la cryoconservation, l'étude a été complétée par un travail sur l'impact de plusieurs facteurs (génotype, méthode de cryoconservation, milieu de culture) sur la survie et la régénération à partir d'apex.

Enfin la fiabilité du procédé de cryoconservation a été testée sur 28 génotypes de *Pelargonium* issus de 10 espèces dont le choix a été fait de manière à avoir une grande diversité phénotypique.

Pour l'ensemble des essais, un cultivar de référence a été choisi. Il s'agit de *Pelargonium x peltatum* 'Balcon lilas' (figure 2-1). Il offre l'avantage de pousser rapidement, d'être facilement multiplié par bouturage et surtout le prélèvement d'apex, à partir de bourgeons axillaires non débouffés, s'avère particulièrement simple.



Figure 2-1. *Pelargonium x peltatum* 'Balcon Lilas'

Le travail de recherche présenté fait suite à celui réalisé par Grapin *et al.* (2001 et 2003) et Dumet *et al.* (2002) sur la cryoconservation d'apex de *Pelargonium* par la méthode d'encapsulation-déshydratation (ED). Au cours de ces travaux les auteurs ont cherché à mettre en place puis à améliorer le processus de cryoconservation par l'optimisation et la simplification des différentes étapes de l'encapsulation-déshydratation. L'originalité de leur démarche a consisté à disséquer, en conditions stériles, des apex prélevés sur des branches issues de plantes cultivées en serre et non pas sur du matériel végétal cultivé *in vitro* comme cela est habituellement pratiqué (*e.g.* Verleysen *et al.*, 2003). De plus aucun traitement d'adaptation au froid (prétraitement) n'a été réalisé sur les plantes

avant le prélèvement des apex. Cette simplification par rapport aux processus classiques (*e.g.* Hornung *et al.*, 2001) a donc permis un gain de temps notable sur l'ensemble de la procédure de cryoconservation. Le protocole établi par Grapin *et al.* en 2003 a été appliqué sur plusieurs cultivars issus de différentes espèces de *Pelargonium*. Les taux de survie après cryoconservation variaient entre 27,5% pour le cultivar Renard Bleu et 83,9% pour le cultivar Balcon Lilas. En revanche, les résultats portant sur la régénération des apex n'ont pas été concluants. De plus la mise en œuvre est difficile et la durée du procédé est longue. Ces observations allant à l'encontre de notre objectif initial, il a été décidé de tester une autre méthode de cryoconservation.

Au vu des résultats obtenus chez la pomme de terre par Schäfer-Menhur *et al.* (1997) et chez les *Musaceae* par Panis *et al.* (2005), le choix de la méthode de cryoconservation s'est porté sur la « droplet-vitrification » (DV). Lors de l'immersion dans l'azote liquide, l'utilisation de bandelettes d'aluminium comme support des apex offre l'avantage d'une distribution rapide et uniforme du froid dans les explants en raison de la grande conductivité de l'aluminium (Leunufna et Keller, 2003). Ainsi la vitesse de refroidissement au cours de cette étape a été estimée à $130^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ limitant de fait la formation de cristaux intracellulaires (Towill et Bonnart, 2003). LS et PVS2 conférant la tolérance à la cryoconservation des explants mais aussi en raison de leur toxicité (surtout pour PVS2), la durée des traitements doit être adaptée pour chaque type de matériel végétal, c'est pourquoi, il a été décidé de travailler sur ce paramètre. Ainsi, à partir de la procédure établie par Panis *et al.* (2005) une méthode a été adaptée aux apex de *Pelargonium* par l'optimisation des durées d'immersion des apex dans les solutions de charge (LS) et de vitrification (PVS2) afin d'obtenir les taux de survie les plus élevés possibles.

La réussite de la cryoconservation passant par un système de régénération fiable, des travaux ont été menés dans ce sens pour améliorer le système existant. De nombreuses études sur la composition notamment en régulateurs de croissance des milieux de culture ont été faites depuis longtemps chez le *Pelargonium*. Leur but était le plus souvent de produire des plantes indemnes de virus à partir d'apex. A cet égard nous pouvons rappeler les travaux de Horst *et al.* en 1976 qui ont défini un milieu de culture contenant $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'AIB (acide indole butyrique) ou $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'ANA (acide naphthalène acétique) et $0,04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zéatine. Plus récemment Mamet et Jonard en 1983 ont décrit pour trois cultivars de *Pelargonium* l'un provenant de *P. x hortorum*, un autre de *P. x peltatum* et le dernier de *P. peltatum* x *P. zonale* un milieu de culture commun contenant $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'AIA (acide indole acétique) et $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (benzylaminopurine). En 2000, Sharry et Abedini ont mis au point un milieu de régénération à partir d'apex contenant de l'AIA et de l'ANA. Dans notre laboratoire même, divers travaux ont été menés (stages d'étudiant) sur la culture *in vitro* du *Pelargonium* à partir d'apex. Ces exemples non exhaustifs montrent la très grande diversité de systèmes de régénération *in vitro* à partir d'apex. A l'aide des données publiées et du système en vigueur au laboratoire, il a été décidé de chercher à optimiser le protocole utilisé jusqu'à présent. Le processus de régénération *in vitro* tel qu'il est pratiqué au laboratoire se compose d'une succession de trois milieux de culture dont les rôles sont de favoriser la croissance et l'enracinement des pousses (voir annexe 2-1 : la composition des milieux et le protocole général de régénération). Deux procédures sont utilisées l'une pour les *Pelargonium* x *peltatum* (série BM), l'autre pour les *Pelargonium* x *hortorum* (série AM). Lors de nos premières observations, nous avons constaté que les premiers milieux de régénération BM1 contenant $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'AIA et $0,1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP et le milieu AM1 contenant $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'AIA provoquaient la formation de cal et rendaient les pousses hyperhydriques ne permettant pas une bonne régénération. Partant de ce constat des expériences préliminaires ont été réalisées notamment en réduisant la concentration en AIA et en ajoutant de l'acide gibbéréllique (GA_3).

Tableau 2-1. Liste des espèces et cultivars employés au cours des différentes expérimentations de ce chapitre. Classification des espèces selon James (1995)

Section	Espèce	Cultivar	Publication cryoleters	Expérience A	Expérience B
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	A Happy Thought	oui	oui	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Alain	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Bicolor	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Cahors	oui	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Elsie	oui	non	non
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Distinction	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Féerie orange	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Fortuna	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Isabell	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Neurot	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Panaché	oui	oui	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Panaché sud	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Renard bleu	oui	oui	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Stellar artic	oui	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x hortorum</i>	Ville d'Ostende	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltato-zonale</i>	Belle de Granges	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	Avalanche	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	Balcon lilas	oui	oui	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	Balcon rouge	oui	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	Cocorico	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	La France	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	Martine	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	Papa Crousse	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. x peltatum</i>	Raymonde	non	non	oui
<i>Ciconium</i>	<i>P. acetosum</i>		non	non	oui
<i>Pelargonium</i>	<i>P. capitatum</i>		non	non	oui
<i>Pelargonium</i>	<i>P. crispum</i>		non	non	oui
<i>Pelargonium</i>	<i>P. cuculatum</i>		non	non	oui
<i>Glaucophyllum</i>	<i>P. domesticum</i>	Pansy	non	non	oui
<i>Reniformia</i>	<i>P. fragrans</i>		non	non	oui
<i>Polyactium</i>	<i>P. gibbosum</i>		non	non	oui
<i>Chorisma</i>	<i>P. tetragonum</i>		non	non	oui

Ainsi les travaux de recherche menés dans cette partie ont porté essentiellement sur la composition et la concentration en régulateurs de croissance (AIA, BAP et GA₃) du premier milieu de culture utilisé aussitôt après le prélèvement lors d'une régénération simple d'apex ou bien juste après la cryoconservation. En effet, il conditionne la reprise de croissance des apex et donc le succès de la régénération.

2.2. Matériel et Méthodes

2.2.1. Matériel Végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de plants de *Pelargonium* multipliés par bouturage et cultivés en serre. Les consignes de températures minimales pour que les plantes se développent normalement ont été les suivantes : 18°C pendant 3 heures (de 6 h à 9 heures) puis 21°C pendant 21 heures (de 9 à 6 heures le lendemain matin). En hiver un éclairage d'appoint a été appliqué pendant 3 heures le matin (de 6 à 9 heures). L'irrigation a été assurée par un goutte-à-goutte de 2 x 6 min par semaine d'une solution nutritive (composition N-P-K-Mg SEVITAL 3-2-6 + 0,6, pH = 5,5).

En plus du cultivar Balcon Lilas, d'autres cultivars ont été employés en fonction des besoins. (tableau 2-1)

2.2.2. Méthodes

2.2.2.1 Désinfection et prélèvement des apex

Quel que soit le cultivar employé et le devenir des apex, la méthode de désinfection et le système de prélèvement ont toujours été les mêmes.

En serre, les branches sont découpées en tronçons d'environ 5 cm de longueur, chaque tronçon possédant un ou plusieurs bourgeons axillaires. La désinfection des tronçons est réalisée par la vaporisation d'alcool à 70° directement sur l'ensemble. Les tronçons sont ensuite essuyés avec du papier absorbant humidifié à l'alcool. L'excision des apex est faite en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. Les différentes pièces végétales du bourgeon sont alors retirées sous une loupe binoculaire à l'aide de scalpels montés avec des lames n°11 jusqu'à ce que l'apex soit visible (figure 2-2). A chaque niveau d'organisation du bourgeon un nouveau scalpel est utilisé pour éviter d'éventuelles contaminations de l'apex. L'apex dégagé est alors sectionné à sa base puis déposé sur un milieu de culture ou bien utilisé pour la cryoconservation.

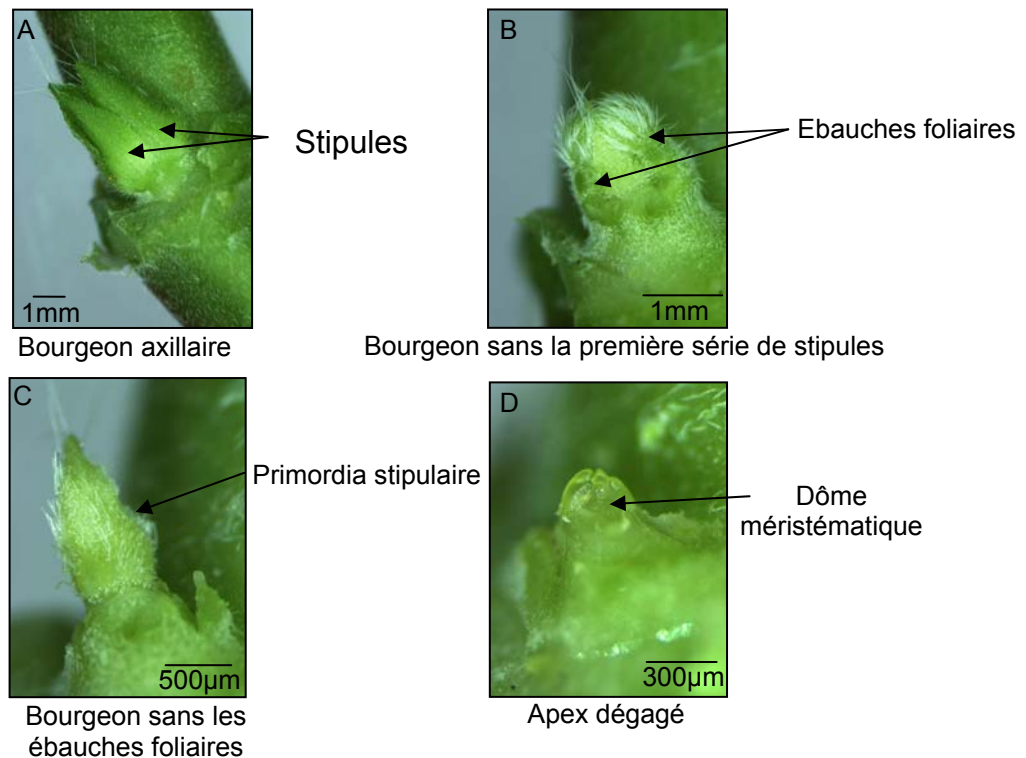


Figure 2-2. Etapes de la dissection d'un apex (cultivar 'Martine') avant le prélèvement

2.2.2.2. Cryoconservation par encapsulation-déshydratation (ED)

La méthode d'encapsulation-déshydratation utilisée s'appuie sur les travaux menés par Dumet *et al.* (2002) et Grapin *et al.* (2003) sur la cryoconservation d'apex de *Pelargonium*.

Suite au prélèvement, les apex sont immergés dans une solution d'alginate à 3 % (annexe 2-2). Ils sont alors aspirés avec la solution d'alginate avant d'être déposés goutte par goutte dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL d'une solution de chlorure de calcium à 1,32M (annexe 2-2). L'alginate en présence de chlorure de calcium va polymériser en formant des billes. Au bout de 10 min les billes d'alginate contenant les apex sont retirées de la solution de chlorure de calcium pour être plongées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL d'une solution (dite de préculture) de saccharose à 0,75 M (annexe 2-2). L'ensemble est alors placé en agitation (100 rpm). En plus des composés cités, ces trois solutions contiennent d'autres molécules dont les macro et micro éléments de Murashige et Skoog (annexe 2-2). De plus elles ont été stérilisées par autoclavage pendant 20 min à 120 °C avant leur utilisation.

Après environ 40 heures de ce traitement, les billes sont essuyées avec du papier filtre (Whatman I) puis déposées (20 par boîte) sur du papier filtre (Whatman III) dans des boîtes en verre de 9 cm de diamètre et 3,5 cm de hauteur (volume = 223 cm³) fermées hermétiquement contenant 40 g de silicagel régénéré. L'ensemble est alors placé dans une étuve à 27°C pendant 3h. Suite à cette déshydratation évaporative, les billes avec apex sont placées dans des cryotubes à raison de 6 billes par tube. Les tubes fermés sont alors plongés immédiatement dans l'azote liquide. A la sortie du stockage, les billes sont réchauffées à température ambiante pendant 1 minute dans la solution de préculture avant d'être déposées dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre contenant 25 mL de milieu de culture afin de débiter le processus de régénération. (figure 2-3).

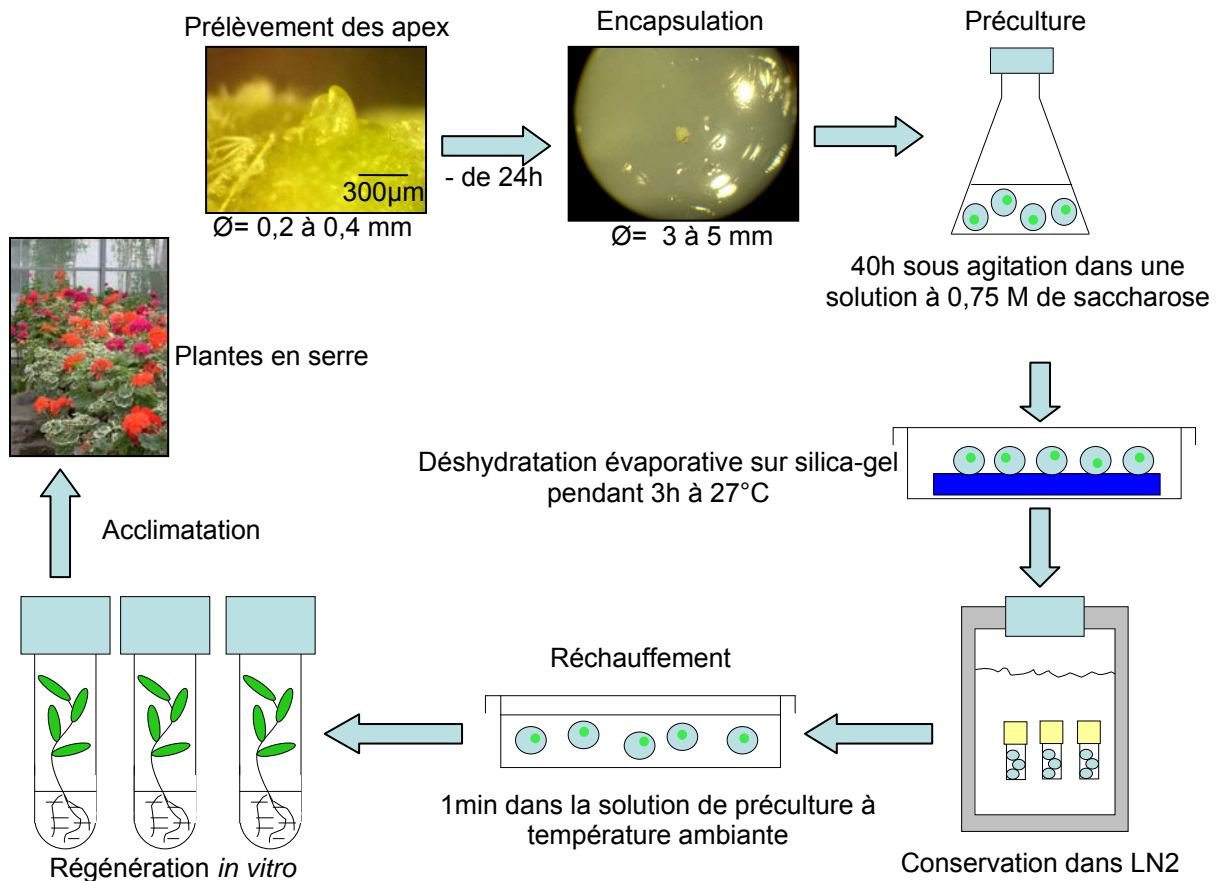


Figure 2-3. Schéma général de l'encapsulation-déshydratation d'apex de *Pelargonium*

A chaque expérience d'encapsulation-déshydratation, la teneur en eau des billes a été estimée. Pour cela 10 billes vides (sans apex) ont été pesées à la sortie de la déshydratation puis placées dans une étuve à 80°C pendant 24 heures avant d'être à nouveau pesées.

La teneur en eau a été calculée comme suit :

$$TE = \frac{\text{Poids frais} - \text{Poids sec}}{\text{Poids sec}}$$

Les teneurs en eau ont toutes été exprimées en g d'eau par g de matière sèche (g d'eau.g⁻¹MS).

Pour le travail présenté, trois répétitions d'environ 30 apex par ont été réalisées.

2.2.2.3. Cryoconservation par « droplet-vitrification » (DV)

Cette méthode de cryoconservation des apex de *Pelargonium* s'est appuyée sur les travaux réalisés par Panis *et al.* (2005) sur les *Musaceae*.

Les apex aussitôt prélevés sont plongés dans 15 mL d'un mélange stérilisé par filtration (pore de 0,22 µm) de glycérol à 2 M et de saccharose à 0.4 M dans du milieu de Murashige et Skoog (MS) à pH 5.8 et à température ambiante. Ce mélange est dénommé solution de charge ou LS (Loading Solution) (annexe 2-3). Au bout de 20 min (*e.g.* chez les *Musaceae*) à compter du dernier apex immergé, LS est retiré afin d'être remplacé par une solution de vitrification (PVS2 : Plant Vitrification Solution 2) à 0°C composée de 30% v/v de glycérol, de 15% v/v d'éthylène glycol, de 15% v/v de

diméthylsulfoxyde (DMSO) et 0,4 M de saccharose dans du milieu MS (annexe 2-3). Après 30 min (*e.g.* chez les *Musaceae*) de ce traitement les apex sont déposés sur des bandelettes d'aluminium stériles (3 cm x 0,5 cm), elles-mêmes posées sur un pain de glace afin de maintenir une température proche de 0°C. A l'aide d'une pipette l'excédent de PVS2 se trouvant autour des apex est retiré. Avant de fermer les cryotubes déjà immergés dans de l'azote liquide, les bandelettes sont placées à l'intérieur en vue d'une conservation de longue durée. Lors du réchauffement les bandelettes avec apex sont plongées 15 min à température ambiante dans une solution de réchauffement (RS : Recovery Solution) composée de saccharose à 1,2 M dissout dans du milieu MS (pH 5,8) (annexe 2-3). Les apex sont alors récupérés puis placés 24h à l'obscurité dans une boîte de Petri de 9 cm de diamètre sur un papier filtre (Whatman I) posé sur un milieu semi-solide MS contenant 0,3 M de saccharose et 2,5 g.L⁻¹ de gelrite. Le lendemain, les apex sont transférés sur les milieux de croissance pour la régénération. (figure 2-4).

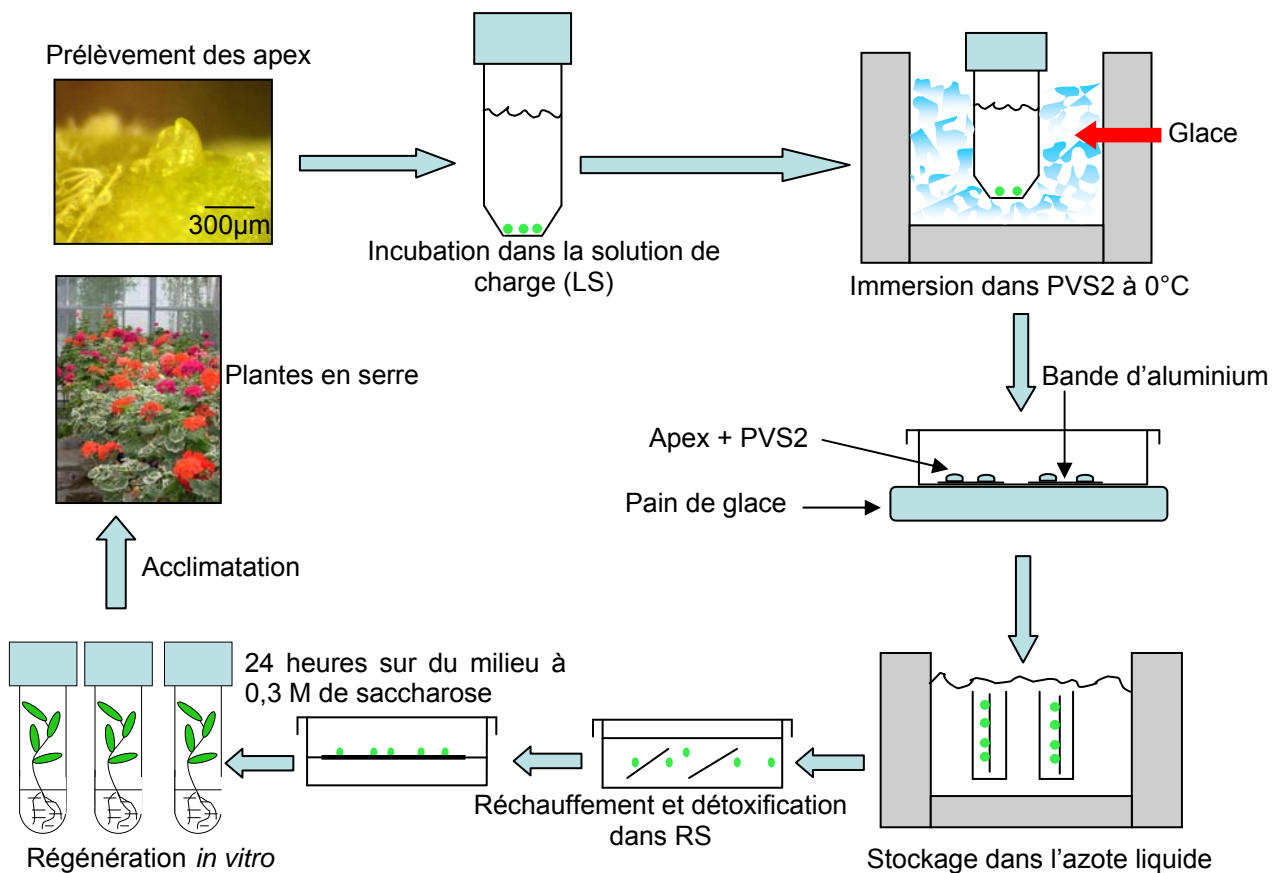


Figure 2-4. Schéma général de la « droplet-vitrification » d'apex

2.2.2.4. Adaptation de la « droplet-vitrification » (DV) aux apex de *Pelargonium* (expérience « Cryoletters »)

Le facteur « durée d'immersion » des apex dans LS et PVS2 a été testé. Ainsi les apex ont été plongés pendant quatre durées différentes dans LS (0, 20, 60 et 120 min). Suite à cette étape les apex ont été immergés pendant 30 min dans PVS2 (durée de référence). Pour l'optimisation de la durée du traitement dans PVS2, les apex ont été plongés 20 min dans LS avant d'être placés pendant 0, 10, 30 ou bien 60 min dans PVS2. A la fin des différents traitements, les apex ont été immergés et maintenus 30 min dans l'azote liquide avant d'être réchauffés pendant 15 min dans RS puis mis en culture. Suite à la cryoconservation (DV), les apex ont été placés dans des boîtes de Petri contenant 25 mL du milieu à 0,3 M de saccharose (annexe 2-4).

Les boîtes de Petri contenant les apex ont été maintenues à l'obscurité à 22°C pendant 8 h puis 24°C pendant 16 h par jour pendant une semaine. Les boîtes ont ensuite été placées à la lumière (éclairage par des tubes fluorescents -70 $\mu\text{mol. s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) à raison de 16 h d'éclairage par jour pendant 3 semaines. Un mois après la cryoconservation, les apex ayant survécu ont été transférés dans des tubes en verre de 14 cm, de long contenant 10 mL du même milieu de culture, fermés avec des bouchons en cellulose. Au bout de quatre semaines de culture en tube le taux de régénération a été estimé.

Pour chaque condition testée, 3 répétitions ont été réalisées avec environ 10 apex à chaque fois.

2.2.2.5. Régénération *in vitro*

Suite à ces expériences préliminaires. Un essai contenant de la benzylaminopurine (BAP), de l'acide indole acétique (AIA) et de l'acide gibbérellique GA₃ à quatre concentrations différentes a été mis en place. Toutes les combinaisons possibles ont été testées soit 64 milieux différents (tableau 2-2) avec 8 apex (non cryoconservés) de 'Balcon Lilas' par conditions.

Tableau 2-2. Codage des concentrations en facteurs de croissance pour définir les milieux de culture

BAP	CODE	B0	B1	B2	B3
Concentration en mg.L^{-1}		0	0.02	0.05	0.1







GA ₃	CODE	G0	G1	G2	G3
AIA		A0	A1	A2	A3
Concentration en mg.L^{-1}		0	0.1	0.25	0.5

Les 64 milieux ont été notés comme suit de B0A0G0, B0A0G1... jusqu'à B3A3G2, B3A3G3.

Par exemple, le milieu traditionnellement utilisé au laboratoire contenant 0,1 mg.L^{-1} de BAP et 0,5 mg.L^{-1} d'AIA a pour code B3A3G0.

Au bout d'un mois, pour chaque milieu de culture, les pousses obtenues ont été photographiées et notées entre 0 et 5 pour 6 critères différents (racine, taille des pousses, cal, hyperhydrie, nécrose, nombre de pousses) (tableau 2-3). La note 0 représentant la plus mauvaise note et la note 5 l'inverse, hormis pour le nombre de pousses où la note correspond au nombre réel de pousses. A titre d'exemple la note 5 pour le critère cal représente l'absence de cal tandis que la note 0 signifie que l'apex s'est complètement transformé en cal, ou encore, dans le cas de la taille des pousses, la note 0 signifie que l'apex est mort et la note 5 que l'apex a donné au moins une pousse bien développée.

Tableau 2-3. Exemples de notation dans six cas différents de régénération *in vitro* d'apex

						
Cal	5	4	0	5	4	4
Hyperhydrie	5	5	0	0	4	5
Nécrose	5	4	4	5	3	5
Nombre de pousses	0	1	0	1	1	3
Racine	5	0	0	0	0	0
Taille des pousses	0	5	0	3	4	5

L'analyse des résultats s'est faite en trois étapes :

- dans un premier temps, le rapport entre le nombre d'apex ayant donné au moins une pousse et le nombre total d'apex a été calculé (taux de régénération) pour chaque milieu. Seul les milieux ayant obtenu un taux de régénération compris entre 0,5 et 1 ont été sélectionnés.
- dans un deuxième temps, pour les milieux retenus, le taux de multiplication des apex a été calculé. Cette étape a pour but d'éliminer les milieux de culture qui favorisent la formation de plusieurs pousses à partir d'un seul apex c'est-à-dire ceux ayant un taux de multiplication supérieur à 1.
- lors de la troisième étape, la moyenne de chaque critère a été déterminée puis la somme de ces moyennes a été calculée pour les milieux sélectionnés à l'étape précédente, la note globale obtenue reflète l'efficacité du milieu par rapport à la régénération.

2.2.2.6. Effets de différents facteurs sur la survie et la régénération (expérience A)

Ce travail a été réalisé sur deux cultivars non panachés (Balcon Lilas et Renard Bleu) et deux au feuillage panaché ('A Happy Thought' et 'Panaché'). Dans le but de déterminer l'impact du génotype, du premier milieu de régénération et de la méthode de cryoconservation sur les taux de survie et les taux de régénération. En plus du facteur « génotype », les trois autres facteurs intervenant dans l'étude ont été définis comme suit :

- le facteur « méthode » composé de trois modalités, les deux méthodes de cryoconservation utilisées au cours de la thèse, l'encapsulation-déshydratation (ED) et la « droplet-vitrification » (DV) et les apex témoins n'ayant pas été cryoconservés (CT).
- le facteur « milieu » composé aussi de trois modalités, le milieu initialement utilisé au laboratoire et les deux milieux choisis lors l'étude portant sur le premier milieu de culture intervenant au cours de la régénération (Cf. point 2.2.2.5).
- le facteur « répétition » composé des trois répétitions afin de vérifier l'absence d'une différence significative entre elles.

Pour chacune des 108 combinaisons (4 génotypes x 3 méthodes x 3 milieux x 3 répétitions), 8 apex ont été utilisés. Les taux de survie et de régénération ont été estimés dans les mêmes conditions celles décrites au point 2.2.2.8.

2.2.2.7. Application de la « droplet-vitrification » sur différentes espèces et cultivars de *Pelargonium* (expérience B)

A partir de la méthode de « droplet-vitrification » définie au point 2.2.2.4. et du meilleur milieu de régénération déterminé au point 2.2.2.5., 28 taxons de *Pelargonium* ont été testés afin de savoir si l'ensemble de la procédure est généralisable (cryoconservation + régénération *in vitro*). Ainsi selon le cultivar 3 ou 4 répétitions d'environ 10 apex ont été réalisées à l'exception de *P. crispum* où il n'a pu être fait que 2 répétitions de 12 apex. Les prélèvements ont été effectués par deux personnes entre le 31 janvier 2007 et le 31 juillet 2007. Les taux de survie et de régénération ont été estimés dans les mêmes conditions celles décrites au point 2.2.2.8

2.2.2.8. Estimation des taux de survie et des taux de régénération des apex après la cryoconservation (DV et ED)

Le taux de survie a été évalué deux semaines après la cryoconservation par le comptage du nombre d'apex vivants. La figure 2-5A correspond à un apex juste après le prélèvement avant la cryoconservation. Un apex a été considéré comme vivant à partir du moment où la coloration verte s'est maintenue, qu'une augmentation de volume a été observée et qu'une différenciation cellulaire a été constatée par l'apparition de poils (figure 2-5B). Parfois la présence de cal au niveau de la zone cicatricielle a pu être observée. Contrairement aux apex vivants, les apex morts sont apparus totalement bruns, non poilus, sans cal cicatriciel et sans signes apparents de reprise de croissance (figure 2-5C).

Le taux de régénération a été exprimé huit semaines après la cryoconservation comme étant le nombre d'apex ayant formé une pousse feuillée non hyperhydrique par rapport au nombre total d'apex prélevé (figure 2-5D).

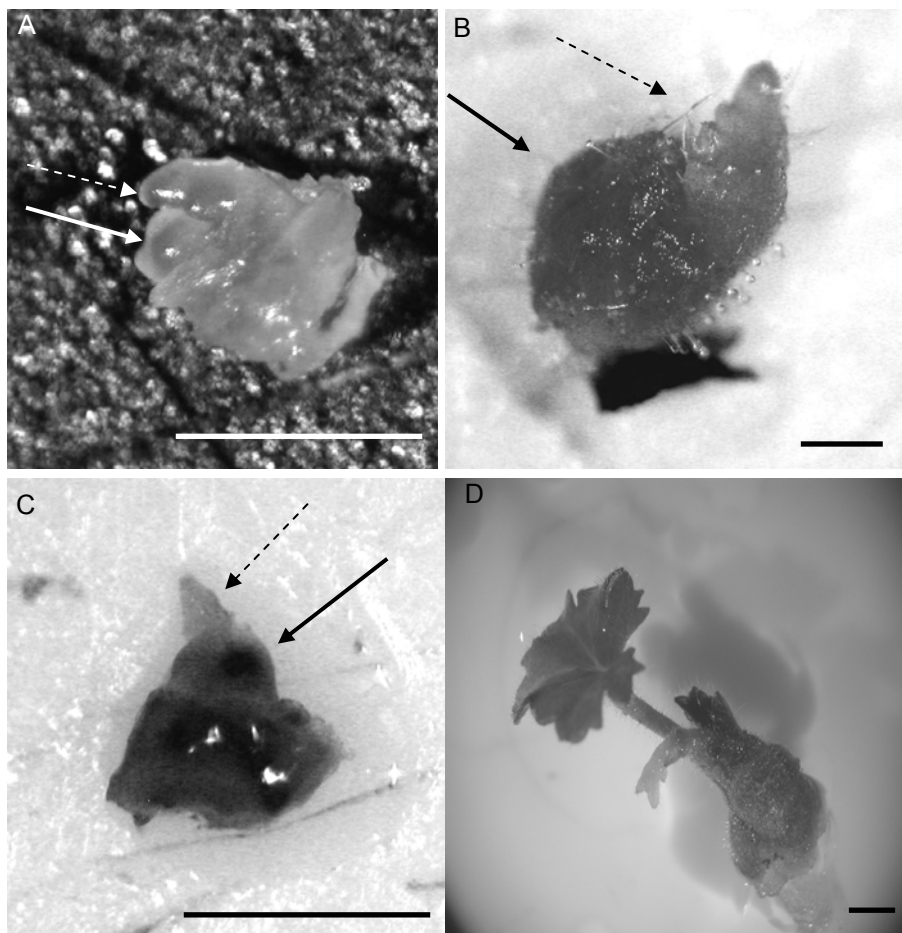


Figure 2-5. A-Apex excisé avant la cryoconservation. B-Apex vivant deux semaines après la cryoconservation. C-Apex mort deux semaines après la cryoconservation. D-Pousse huit semaines après la cryoconservation. Les flèches pleines indiquent le dôme méristématique tandis que les flèches en pointillé montrent la position du primordium foliaire. (barre = 1mm). Les photos ont été faites à partir du cultivar Balcon Lilas.

2.2.2.9. Analyses statistiques

Pour les petits effectifs, l'indépendance des taux de survie et de régénération a été vérifiée à l'aide du test G basé sur la table du χ^2 au seuil de signification de 5 % (Sokal et Rohlf, 1981).

Pour les autres études où le nombre d'apex était plus important des analyses de variance ont été pratiquées grâce au logiciel Statgraphics Plus. Pour chaque analyse de variance la normalité des résidus a été contrôlée ainsi que l'absence de différence significative entre les écarts-types. Dans le cas où une différence significative était détectée et la normalité respectée, le test de Duncan au seuil de 5 % a été appliqué pour comparer les moyennes. Lorsque la normalité n'était pas respectée, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été employé.

2.3. Résultats

2.3.1. Essais de cryoconservation par l'encapsulation-déshydratation

Bien que nous ayons toujours travaillé dans des conditions similaires, les teneurs en eau des billes sont significativement différentes (Résultats du test de Kruskal-Wallis au seuil de 5%). Les taux de survie obtenus sont différents, compris entre 1,1 % pour le cultivar Panaché et 33,8 % pour le cultivar Balcon Lilas (taux de survie moyen pour les quatre cultivars 18,6 %). De plus, seul 'Balcon Lilas' a montré une aptitude à la régénération après l'encapsulation-déshydratation, contrairement aux autres cultivars dont les apex vivants ont tous évolués en cal ou en pousses hyperhydriques (figure 2-6). Ces résultats associés au manque de répétitivité observé lors d'autres expériences nous ont mené à développer une autre méthode de cryoconservation.

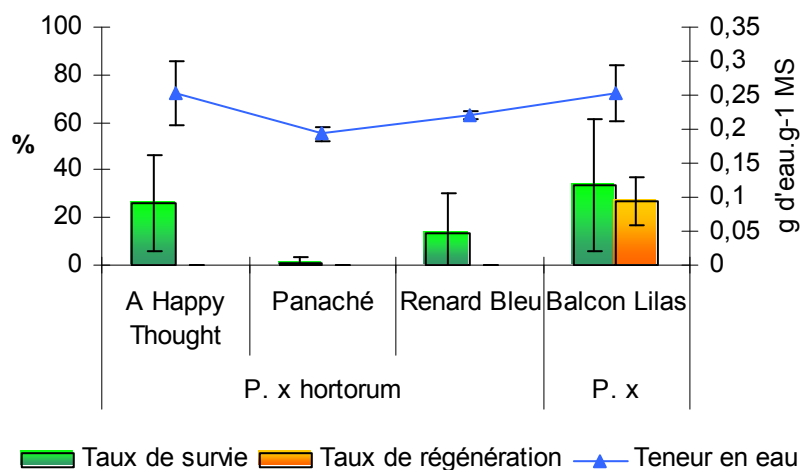


Figure 2-6. Teneur en eau des billes d'alginate à la fin de la déshydratation, taux de survie et de régénération pour quatre cultivars de *Pelargonium* après cryoconservation par encapsulation-déshydratation. Les barres sur les colonnes et les triangles représentent les écarts types.

2.3.2. Mise en place de la cryoconservation d'apex de *Pelargonium* par « droplet-vitrification »

Les résultats de cette partie reprennent ceux de l'article intitulé « Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification » paru dans la revue Cryoletters (annexe 2-5).

2.3.2.1. Effet de la durée du traitement dans la solution de charge LS (Loading Solution)

Les résultats obtenus montrent que le taux de survie des apex après cryoconservation est corrélé à la durée d'exposition dans la solution de charge. L'immersion dans l'azote liquide sans traitement dans LS au préalable a provoqué la mort de tous les apex. Pour les trois durées d'exposition testées la survie post-cryoconservation est toujours au dessus de 50%. En revanche, il n'a pas été possible de déterminer une durée optimale d'immersion dans LS. En effet, les meilleurs taux de survie sont obtenus pour des durées d'immersion des apex de 20 et 120 min tandis que pour 60 min le taux de survie est significativement plus faible (Tableau 2-4). Dans ces conditions une durée d'immersion des apex dans LS de 20 minutes a été retenue fin de réduire au maximum la durée du procédé.

Tableau 2-4 : Effet de la durée d'exposition à LS sur le survie (%) d'apex cryoconservés de *Pelargonium* 'Balcon Lilas'. Après l'exposition à LS, les apex ont été immergés 30 minutes dans PVS2 puis congelés dans l'azote liquide.

Durée d'exposition à LS (min)	Répétitions	Nb apex vivants	Nb apex morts	Pourcentage moyen et écart-type*
0	1	0	10	0
	2	0	10	
	3	0	10	
20	1	5	5	75,7 ± 21,7 a
	2	10	2	
	3	10	1	
60	1	3	7	51.6 ± 27.5 b
	2	4	6	
	3	9	2	
120	1	9	1	81.8 ± 13.7 a
	2	10	1	
	3	8	4	

*Les moyennes marquées avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon les résultats du test G.

2.3.2.2. Effet de la durée du traitement dans la solution de cryoprotection PVS2 (Plant Vitrification Solution 2)

Comme pour LS, il s'avère qu'une durée minimale d'exposition dans PVS2 est nécessaire pour obtenir la survie des apex conservés dans l'azote liquide (Tableau 2-5). Sans ce traitement, deux semaines après la cryoconservation, tous les apex sont morts. Les meilleurs taux de survie post-cryoconservation des apex sont obtenus pour une immersion dans PVS2 à 0°C comprise entre 10 minutes (92 %) et 30 minutes (89,6 %). Pour une durée d'exposition à PVS2 de 60 minutes, le taux de survie des apex est significativement plus faible (70,8 %). Par conséquent, il existe une durée optimale d'immersion des apex dans PVS2 au delà de laquelle, la survie des apex est « altérée ». A partir de ces résultats, il a été décidé de retenir une durée d'immersion des apex dans PVS2 de 15 minutes.

Tableau 2-5 : Effet de la durée d'exposition à PVS2 sur le survie (%) d'apex cryoconservés de *Pelargonium* 'Balcon Lilas'. Avant l'exposition à PVS2, les apex ont été immergés 20 minutes dans LS à température ambiante. Les apex sont ensuite plongés dans l'azote liquide.

Durée d'exposition à PVS2 (min)	Répétitions	Nb apex vivants	Nb apex morts	Pourcentage moyen et écart-type*
0	1	0	10	0
	2	0	8	
	3	0	10	
10	1	6	2	92.0 ± 14.4 a
	2	8	0	
	3	9	0	
30	1	7	0	89.6 ± 13.3 a
	2	9	0	
	3	10	3	
60	1	5	4	70.8 ± 14.1 b
	2	4	1	
	3	8	2	

* Les moyennes marquées avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon les résultats du test G.

2.3.2.3. L'application de la méthode de cryoconservation par « droplet-vitrification » définie sur huit cultivars de *Pelargonium* (cf. article, annexe 2-5)

Sur les huit cultivars de *Pelargonium* testés aucun n'est récalcitrant à la cryoconservation par « droplet-vitrification ». Le taux de survie minimum est de 55,6% pour le cultivar 'Panaché'. En effet, la réponse à la cryoconservation par cette méthode est variable en fonction du cultivar puisque le taux de survie varie entre 55,6% et 96,2% (figure 2-7). Deux semaines après la cryoconservation, la taille des apex est approximativement 10 fois plus importante qu'au moment de leur excision. Le premier primordium foliaire commence à se différencier (figure 2-5B page 31). Néanmoins pour deux cultivars, Elsie et Panaché, nous observons aussi une importante callogénèse.

Comme pour la survie, tous les cultivars ne montrent pas la même capacité à la régénération. Ainsi le taux de régénération varie de 9,1% pour le cultivar A Happy Thought à 70,6% pour le cultivar Cahors (figure 2-7). Les résultats des tests G au seuil de 5 % ont confirmé l'existence de différences entre les cultivars tant au niveau de la survie que de la régénération.

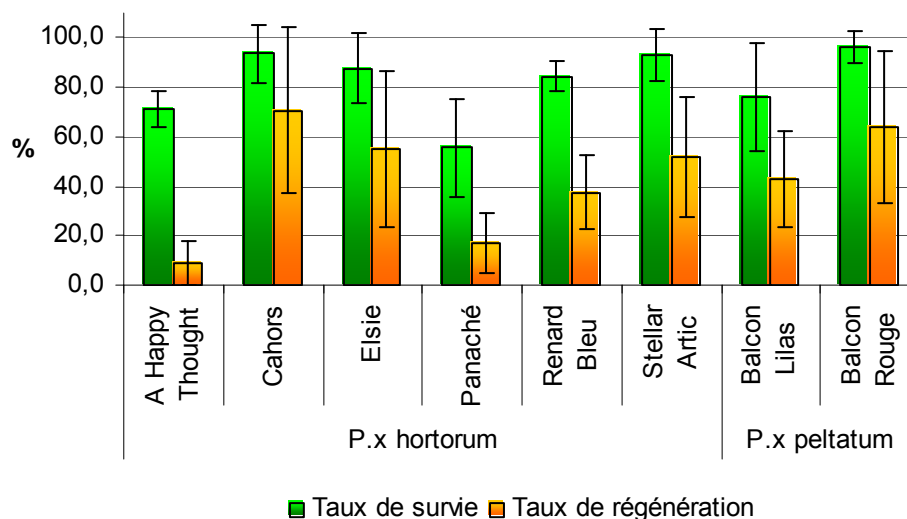


Figure 2-7. Taux de survie et taux de régénération de huit cultivars de *Pelargonium* après application du procédé de cryoconservation par « droplet-vitrification ». Chaque colonne représente la moyenne de trois répétitions de 10 apex. Les barres sur les colonnes correspondent aux écarts-types.

2.3.3. Choix des milieux de culture

Le choix du premier milieu de croissance après la cryoconservation s'est fait en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le pourcentage d'apex ayant régénéré au moins une pousse a été estimé pour chaque milieu (figure 2-8). Parmi les 64 milieux, seuls ceux ayant un taux de régénération supérieur à 50 % ont été gardés pour l'étape suivante soit 39 milieux de culture (figure 2-8). A titre d'exemple pour le milieu B2A3G0, 9 pousses sont produites mais uniquement 6 apex sur 8 ont produit au moins une pousse soit un taux de régénération de 75% (figure 2-8). Plus précisément cela signifie que parmi les 6 apex ayant survécu certains ont donné plus d'une seule pousse.

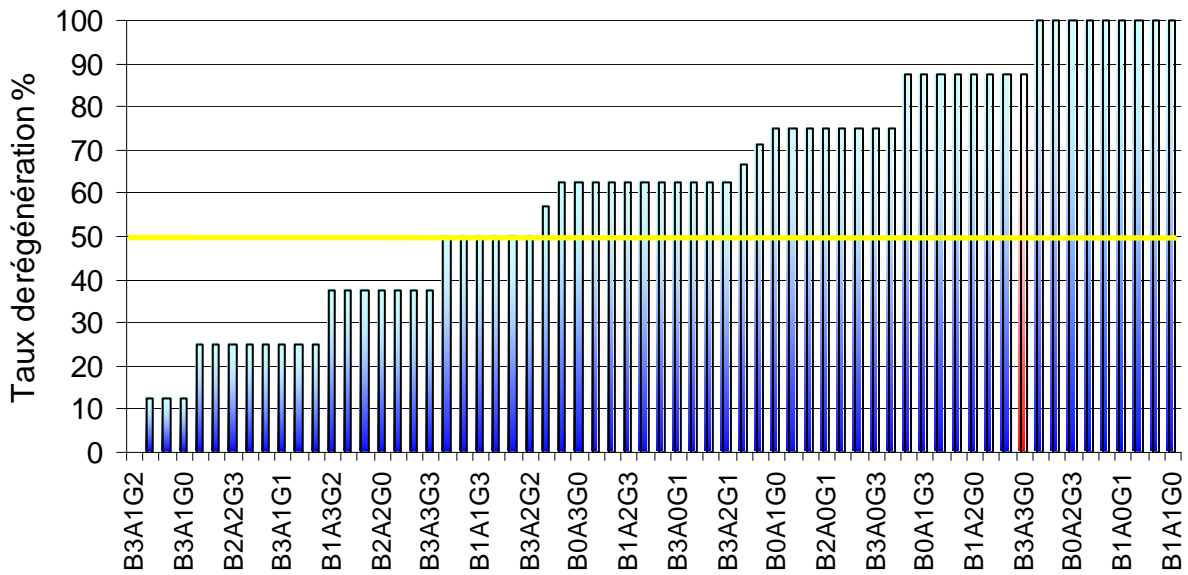


Figure 2-8. Taux de régénération des apex ne tenant pas compte de la multiplication en fonction du milieu de culture. Le milieu B3A3G0 apparaît en rouge sur la graphique.

La seconde étape a consisté à calculer pour les milieux retenus le rapport entre le nombre de pousses totales régénérées et le nombre d'apex ayant produit des pousses. Soit pour le milieu B2A3G0 où 9 pousses ont été produites mais seulement 6 apex ont donné des pousses, le taux de multiplication est alors de 1,5. Parmi les 39 milieux, tous ceux avec rapport supérieur à 1 ont été éliminés soit 17 milieux dont B3A3G0 (figure 2-9).

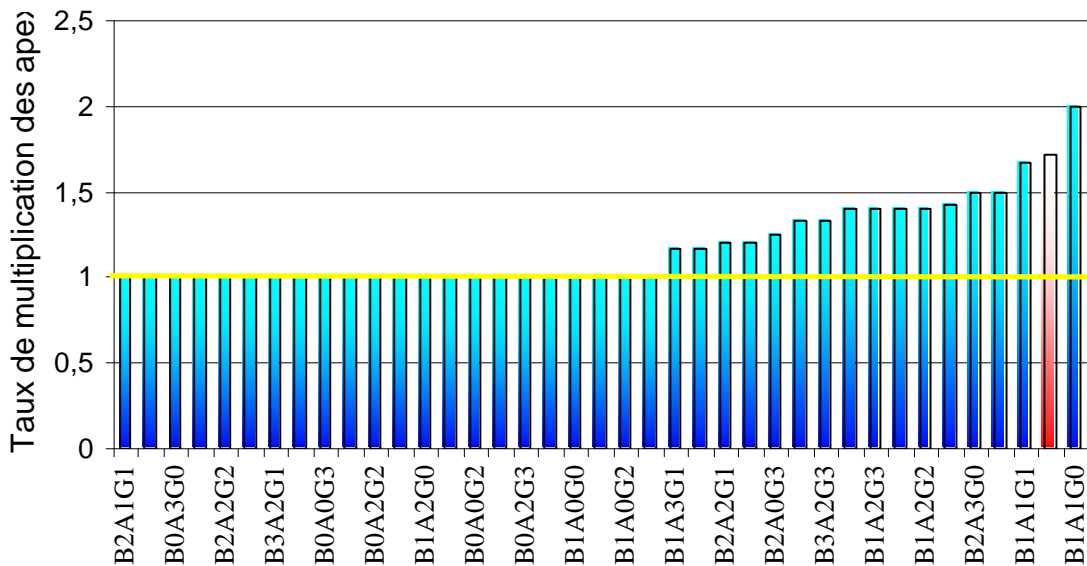


Figure 2-9. Taux de multiplication des apex pour les 39 milieux de culture sélectionnés. Le milieu B3A3G0 apparaît en rouge sur la graphique.

Le système de notation mis en place a permis de choisir entre les 22 milieux restants ceux qui ont donné de bons résultats au niveau de la régénération et de sa qualité. Il est à noter qu'en l'absence de régulateurs de croissance, la régénération est quasiment impossible puisque 7 apex sur 8 n'ont pas survécu sur ce milieu (B0A0G0). Ainsi parmi les 22 milieux, les milieux B1A0G3, B0A2G1 et

B1A0G1 ont obtenu les meilleures notes (tableau 2-6). Le milieu B0A2G1 ayant une note particulièrement faible pour le critère pousse révélant une taille de pousse très petite n'a finalement pas été retenu.

Ainsi nous avons conservé les milieux B1A0G1 se composant de 0,02 mg.L⁻¹ de BAP et de 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃ et B1A0G3 contenant 0,02 mg.L⁻¹ de BAP et 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃. Ces milieux se caractérisent par l'absence d'AIA, en effet à cette étape de la régénération, l'AIA favorise la callogénèse et l'hyperhydrie.

Le milieu de référence B3A3G0 traditionnellement utilisé au laboratoire a été ajouté dans le tableau pour le comparer au 22 milieux restants. Sa note finale est basse en raison de notes faibles pour les critères cal et hyperhydrie.

Tableau 2-6. Notation des 22 cultivars plus le milieu de référence B3A3G0 en fonction des critères cal, racine, pousse, hyperhydrie et mortalité

Milieu	Cal	Racine	Pousse	Hyperhydrie	Mortalité	Note finale
B3A2G1	0,5	0	2,6	2,5	2,9	8,5
B2A1G1	1,3	0	2,4	2,1	5	10,9
B2A2G2	1,1	0	2,8	2,5	4,6	11
B3A3G0	2,4	0	3,5	1,9	4	11,8
B3A0G2	1,5	0	3	2,5	4,8	11,8
B1A3G0	2,6	0,5	2,9	3,1	4,4	13,5
B0A3G2	4,9	0	0,6	5	3,1	13,6
B0A0G1	5	0	0,6	5	3,1	13,8
B1A2G0	3,1	0,5	2,8	3,1	4,3	13,8
B0A1G0	4,6	0,4	0,8	5	3,8	14,5
B0A1G3	4,9	0	0,9	5	4,4	15,1
B0A2G2	4,8	0	1	5	4,4	15,1
B0A3G3	4,4	0,5	0,9	5	4,4	15,1
B0A0G3	4,8	0	1,3	5	4,4	15,4
B0A3G0	4,9	1,8	1,1	5	3,1	15,9
B0A3G1	4,4	0,4	1,1	5	5	16,0
B0A0G2	5	0	1,3	5	5	16,3
B1A0G0	4,9	0	2,8	4,4	4,4	16,4
B1A0G2	4,9	0,1	3,3	4,4	4	16,6
B0A2G3	4,6	1,3	0,9	5	5	16,8
B1A0G3	4,9	0,5	3,5	4	4,3	17,1
B0A2G1	5,0	0,5	1,75	5	5	17,3
B1A0G1	4,9	0	3,5	4	5	17,4

L'efficacité des deux milieux retenus et du milieu utilisé auparavant au laboratoire (B3A3G0) a été vérifiée sur 4 cultivars cryoconservés par encapsulation-déshydratation et « droplet-vitrification » dont les taux de survie et de régénération sont présentés ci-après.

2.3.4. Rôle de plusieurs facteurs sur la survie et la régénération

Les résultats de cette étude ont été traités de deux manières différentes. Dans un premier temps l'analyse a porté sur l'ensemble des données ; les cultivars ont été considérés comme un facteur au même titre que les méthodes de cryoconservation, les milieux de culture, ou les répétitions. Dans un deuxième temps, l'analyse a été réalisée plus précisément pour chaque cultivar. L'impact des méthodes de cryoconservation, des milieux de culture et des répétitions a été évalué par l'estimation des taux de survie et de régénération.

2.3.4.1. Effet du facteur « méthode »

Les taux de survie et de régénération calculés représentent la moyenne des 36 cas de figures possibles pour chaque méthode (4 cultivars x 3 milieux x 3 répétitions) soit environ 360 apex. Concernant la survie, les meilleurs résultats sont obtenus pour les apex témoins (sans cryoconservation) (97,1 %). Pour les apex cryoconservés, le taux de survie après la droplet-vitrification s'élève à 75,9 % contre 18,7 % pour l'encapsulation-déshydratation. Ces résultats très différents entre les « méthodes » indiquent d'une part que la cryoconservation a un impact sur la survie et d'autre part que la survie post-cryoconservation des apex est fonction de la méthode de cryoconservation (figure 2-10).

D'une manière générale pour les trois conditions testées, les taux de régénération sont relativement variables. Ils s'élèvent à 31,8 % pour les apex non cryoconservés, 31,2 % pour les apex issus de la « droplet-vitrification » et seulement de 6,8 % pour les apex issus de l'encapsulation-déshydratation (figure 2-10). Le faible taux de régénération obtenu après l'encapsulation-déshydratation est directement lié au taux de survie. Etant donné que celui-ci est aussi très faible (18,7 %), il n'est pas possible de dire si cette méthode de cryoconservation a un impact sur la régénération dans notre cas.

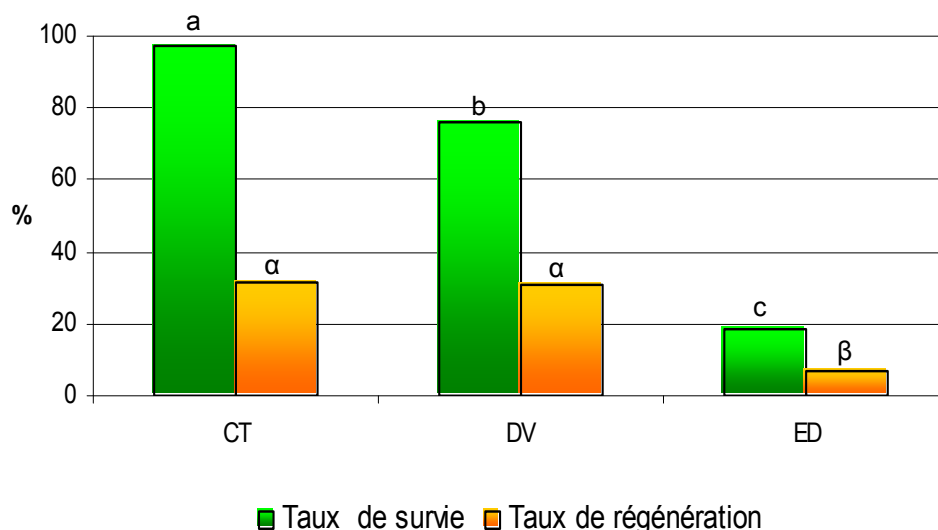


Figure 2-10. Effet du facteur méthode sur la survie et la régénération. CT-Témoin, DV-Droplet-Vitrification, ED-Encapsulation-Déshydratation. Une lettre identique l'absence de différence significative selon le test de Duncan au seuil de 5 %. Lettres latines pour les taux de survie et lettres grecques pour les taux de régénération.

2.3.4.2. Effet du facteur « génotype »

Pour les quatre cultivars considérés, la moyenne des taux de survie et des taux de régénération représentent la moyenne des 27 cas de figures possibles pour chaque cultivar (3 méthodes x 3 milieux x 3 répétitions). De fait les résultats traduisent l'aptitude générale à la survie et à la régénération de chaque génotype. Ils montrent que le taux de survie est de 68 % pour 'Balcon lilas', 66,9 % pour 'Renard Bleu', 64,3 % pour 'A Happy Thought' et 56,3 % pour 'Panaché' (figure 2-11). De même les taux de régénération sont de 33 % pour 'Balcon Lilas', 29,5 % pour 'Renard Bleu', 17,2 % pour 'Panaché' et 13,3 % pour 'A Happy Thought' (figure 2-11).

Les différences observées prouvent qu'il existe un effet du génotype sur la survie et la régénération, celui-ci étant plus important pour les taux de régénération que pour les taux de survie. Ainsi, les deux cultivars panachés possèdent une aptitude à la régénération significativement plus faible que les deux autres cultivars.

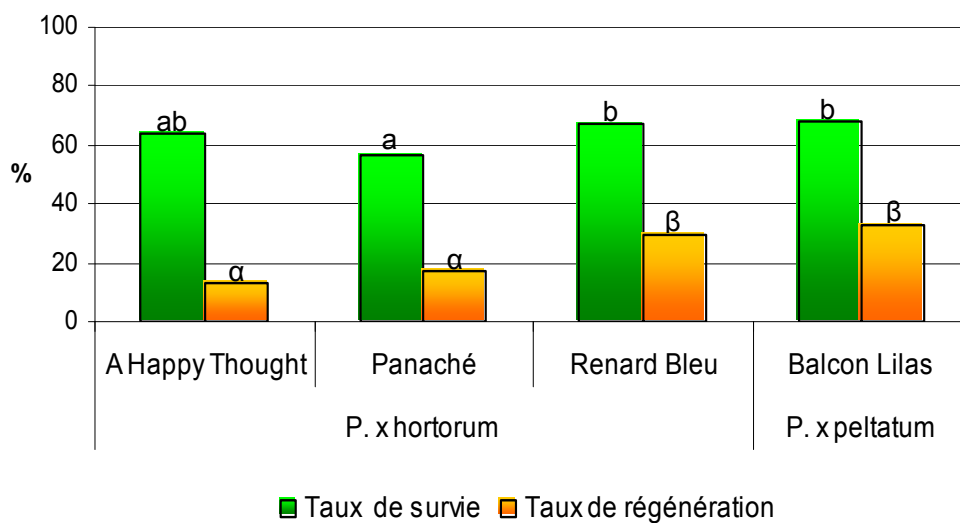


Figure 2-11. Effet du facteur génotype sur la survie et la régénération. Une lettre identique l'absence de différence significative selon le test de Duncan au seuil de 5 %. Lettres latines pour les taux de survie et lettres grecques pour les taux de régénération.

2.3.4.3. Effet des facteurs « milieu de culture » et « répétition »

Les taux de survie et les taux de régénération n'ont pas été détaillés pour ces deux facteurs en raison de l'absence de différences importantes entre les modalités des facteurs. L'analyse globale des données n'a pas mis en évidence d'effet « milieu » sur la survie et la régénération.

Un effet « répétition » a été détecté dans 3 cas de figures sur 108. Chez 'Panaché' où le taux de régénération des apex témoins sur le milieu B3A3G0 est significativement plus faible pour la répétition C (0 %) que pour les deux autres (répétition A : 30 %, répétition B : 44,4 %). Chez 'A Happy Thought' où le taux de survie des apex témoins cultivés sur le milieu de culture B1A0G1 pour la répétition A est plus faible (55,5 %) que pour celui de la répétition B (100 %) et la répétition C (100 %). La même observation est faite pour ce cultivar pour les taux de survie des apex issus de l'encapsulation-déshydratation mis en culture sur le milieu B1A0G1 (répétition A : 0 %, répétition B : 63,6 % et répétition C : 36,4 %).

2.3.4.4. Recherche d'interactions entre le facteur « méthode » et le facteur « milieu »

La comparaison des taux de survie en fonction des facteurs « méthode » et « milieu » tous cultivars confondus, nous a permis de constater, l'absence d'interaction entre les milieux de culture et les méthodes de cryoconservation. Pour les taux de régénération seule l'interaction entre les apex témoins et les milieux est significative. En effet, les résultats montrent que le milieu B3A3G0 favorise la régénération des apex témoins. Ainsi le taux de régénération des apex témoins cultivés sur le milieu B3A3G0 est sensiblement plus élevé (44,3 %) que ceux cultivés sur les milieux B1A0G1 (23,9 %) et B1A0G3 (27,3 %) (figure 2-12). A l'exception des apex témoins, nous en déduisons qu'il n'existe pas d'interactions entre les méthodes de cryoconservation et les milieux de culture dans notre cas

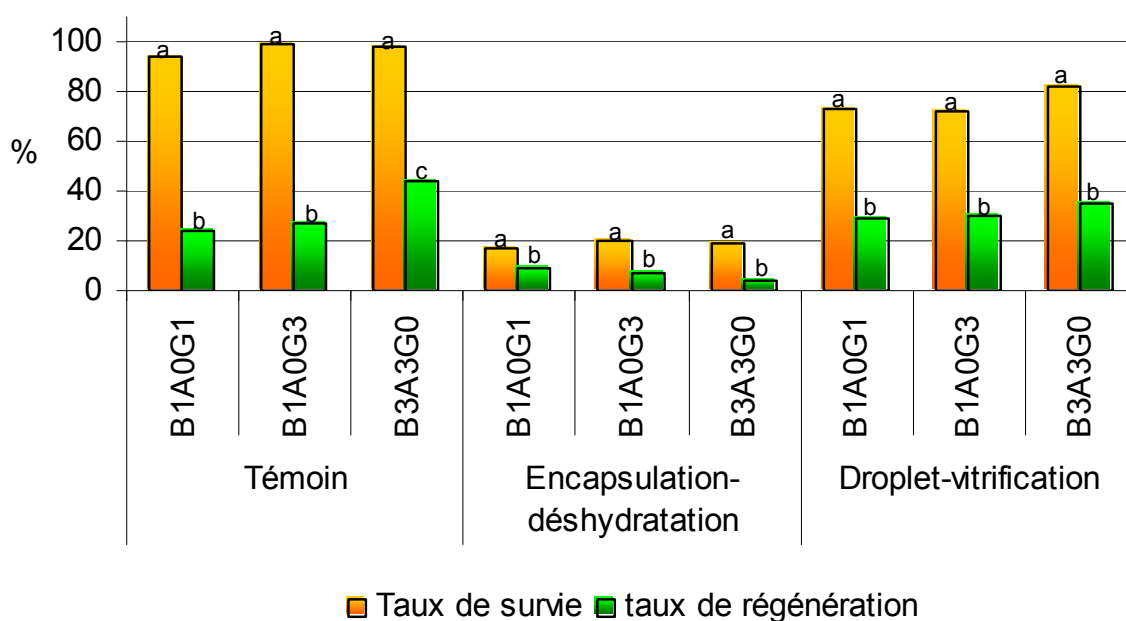


Figure 2-12. Taux de survie et de régénération en fonction des facteurs « méthode » et « milieu ». Les lettres identiques indiquent l'absence de différence significative selon le test de Duncan ou le test de Kruskal-Wallis le cas échéant au seuil de 5 %. Les analyses statistiques sont indépendantes entre les trois modalités.

2.3.4.5. Effet des facteurs « méthode », « milieu de culture » et « répétition » sur la survie et la régénération des apex pour les quatre cultivars considérés

L'analyse détaillée des résultats prenant en compte les cultivars, montre que les taux de survie pour les apex témoins sont élevés compris entre 97,7 % et 100 % ; et ce quel que soit le cultivar. Nous pouvons en déduire que le stress engendré par le prélèvement reste faible et n'a que très peu d'influence sur la mortalité des apex (figure 2-13). De plus pour les quatre cultivars, les milieux de culture n'ont jamais eu d'effet sur le taux de survie, c'est pourquoi ils n'apparaissent pas sur la figure 2-13.

Pour tous les cultivars, les taux de survie sont plus élevés pour les apex issus de la « droplet-vitrification » que pour les apex issus de l'encapsulation-déshydratation. Par exemple pour le cultivar 'Panaché', le taux de survie des apex est de 67 % après la « droplet-vitrification » contre seulement 1,1 % après l'encapsulation-déshydratation (figure 2-13). De plus il apparaît que pour une même méthode de cryoconservation, les taux de survie varie en fonction du cultivar confirmant les résultats de l'analyse globale. Ainsi après l'encapsulation-déshydratation par exemple, le taux de survie est de 33,8

% pour le cultivar Balcon Lilas, 29,3 % pour le cultivar A Happy Thought, 13,8 % pour le cultivar Renard Bleu et 1,1 % pour le cultivar Panaché (figure 2-13).

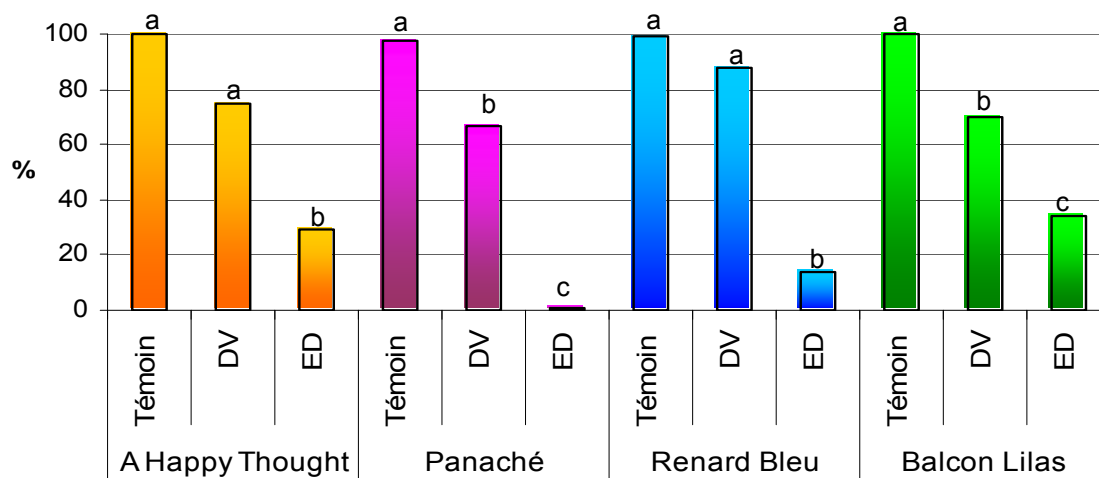


Figure 2-13. Taux de survie pour chaque cultivar en fonction du facteur « méthode ». Les lettres identiques indiquent l'absence de différences significatives selon le test de Duncan au seuil de 5 %. Les analyses statistiques sont indépendantes entre les cultivars.

Concernant les taux de régénération plusieurs commentaires peuvent être faits. Contrairement aux résultats obtenus pour les taux de survie, il existe un effet « milieu ». En effet, le milieu B3A3G0 favorise la régénération des apex témoins pour 'Renard Bleu' et 'A Happy Thought'. Ainsi les taux de régénération sont respectivement de 64,2 % pour 'Renard Bleu' et 60 % pour 'A Happy Thought' contre 32,1 % et 3,7 % pour le milieu B1A0G1 et de 23,3 % et 26,7 % pour le milieu B1A0G3 (figure 2-14). Ce résultat confirme celui que nous avons obtenu lors de l'étude de l'ensemble des données sur les interactions méthode-milieu de culture (cf. point 2.3.4.4.). Toutefois l'effet « milieu » demeure faible puisqu'il ne concerne que 2 cas sur 36 soit une proportion de 5 %.

Comme il a été indiqué au point 2.3.4.1, le facteur « méthode » joue un rôle important sur la régénération. Pour trois des quatre cultivars (A Happy Thought, Panaché et Renard Bleu), il n'a pas été possible d'obtenir des pousses feuillées à partir d'apex issus de l'encapsulation-déshydratation (figure 2-14). Par ce procédé, seul le cultivar 'Balcon Lilas' a régénéré des pousses (27 %*). En revanche, la cryoconservation par « droplet-vitrification » a permis d'obtenir des régénérations de pousses pour les quatre cultivars. Toutefois des différences notables sont observées en fonction du cultivar, ainsi le taux de régénération après la DV est de 13,5 %* pour 'A Happy Thought', 19,5 %* pour 'Panaché', 43 %* pour 'Balcon Lilas' et 48,9 %* pour 'Renard Bleu'.

De plus, il est à noter que la « droplet-vitrification » semble avoir un impact négatif sur la régénération des deux cultivars panachés (A Happy Thought et Panaché) par comparaison aux apex témoins. Au contraire pour 'Renard Bleu' et 'Balcon Lilas' les taux de régénération des apex témoins et des apex issus de cette méthode de cryoconservation sont sensiblement les mêmes (figure 2-14).

* moyenne des taux de régénération pour les trois milieux de culture (pas d'effet milieu).

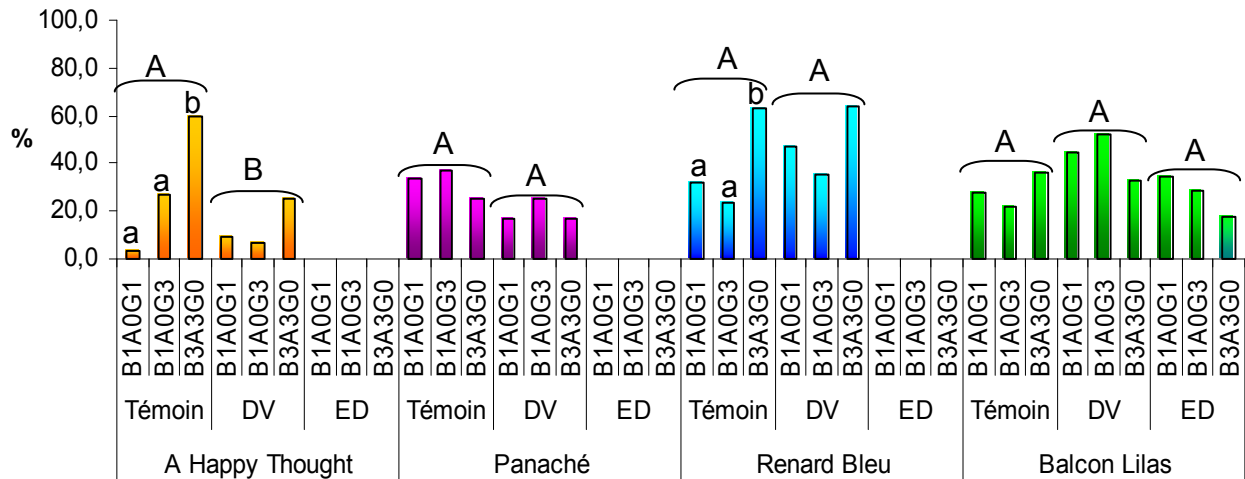


Figure 2-14. Taux de régénération pour chaque cultivar en fonction des facteurs « méthode » et « milieu ». Les lettres identiques indiquent l'absence de différences significatives selon le test de Duncan au seuil de 5 %. Les analyses statistiques sont indépendantes entre les cultivars.

Si l'on compare, les taux de survie et les taux de régénération obtenus avec la « droplet-vitrification » lors de cette étude et ceux obtenus au point 2.3.2.3., nous constatons qu'ils sont sensiblement égaux quel que soit le cultivar. Cette observation est un élément suggérant une bonne reproductibilité de la « droplet-vitrification ».

L'ensemble des résultats obtenus pour cette partie montre que la réussite de la cryoconservation en terme de survie et régénération est surtout fonction des génotypes et de la méthode de cryoconservation. Il se dégage de cette étude que l'encapsulation-déshydratation telle que nous la pratiquons au laboratoire n'est pas adaptée aux apex de *Pelargonium*. En effet à part pour le cultivar Balcon Lilas, il n'a pas été possible de régénérer des plantes après l'encapsulation-déshydratation. A l'opposé même si les taux de survie et de régénération sont variables d'un cultivar à un autre, il a toujours été possible d'obtenir des pousses feuillées à partir de la « droplet-vitrification ». Enfin, après la cryoconservation, pour les trois milieux testés, aucun n'a permis d'avoir un pourcentage de régénération plus élevé chez les quatre cultivars.

2.3.5. Application de la méthode de cryoconservation par « droplet-vitrification » sur différentes espèces et cultivars de *Pelargonium*

Le protocole de cryoconservation par « droplet-vitrification » établi ci-dessus a été testé sur 28 cultivars et espèces de *Pelargonium* représentant un échantillon de la collection d'AGROCAMPUS-OUEST. Pour chaque génotype, l'absence de différences significatives pour le taux de survie entre les répétitions a été vérifiée par l'utilisation du test statistique G.

Sur les 28 cultivars utilisés, aucune différence entre les répétitions n'a été observée pour 25 cultivars soit pour 92,6 % des génotypes testés. Seuls, les cultivars de *P.x hortorum* 'Alain' (taux de survie 40 %, taux de régénération 20 %) et 'Papa Crousse' (taux de survie 54,5 %, taux de régénération 0 %) ont présenté une différence significative entre les répétitions, c'est pourquoi ils n'ont pas été retenus dans les résultats présentés ci-après. Il faut ajouter que le 'Papa Crousse' est le seul où il n'a pas été possible de régénérer des pousses feuillées.

Les essais ayant été réalisés par deux expérimentateurs de janvier à juillet 2007, il est possible de considérer qu'il n'y a pas d'effet « manipulateur » ou d'effet « saisonnier » sur la survie des apex de *Pelargonium* après la cryoconservation.

Toutes les plantes testées ont montré une capacité à la survie après cryoconservation. En revanche, il existe des différences importantes de survie post-cryoconservation entre les cultivars, ainsi des variations notables sont observées de 17 % pour *Pelargonium fragrans* à 91 % pour *Pelargonium capitatum* (figure 2-15).

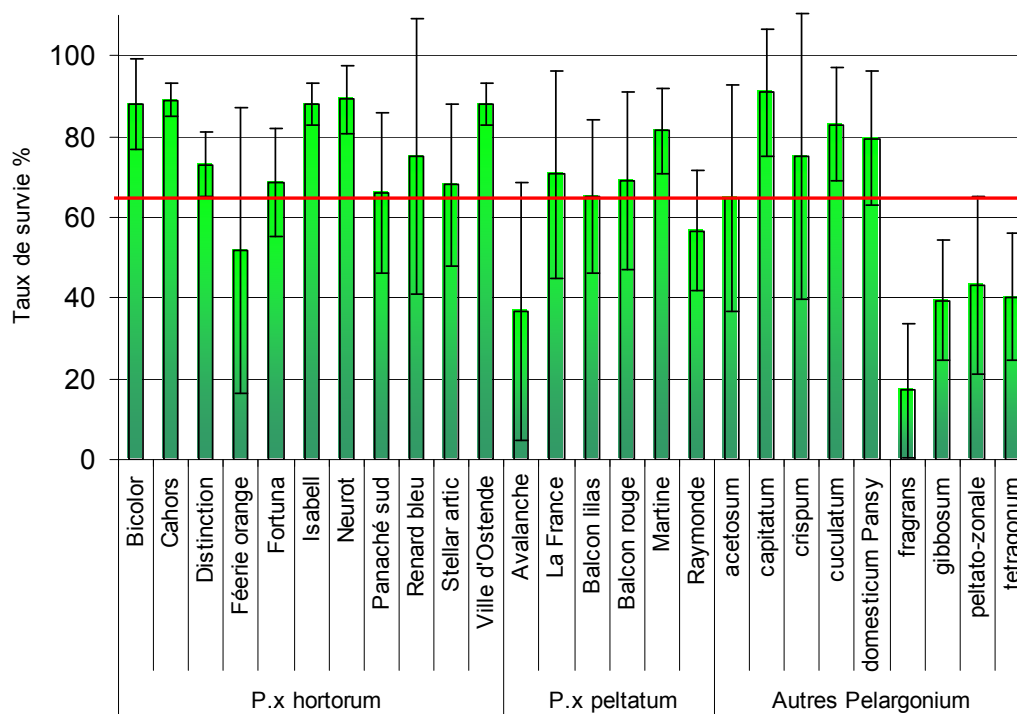


Figure 2-15. Taux de survie de 25 cultivars et espèces de *Pelargonium* testés après l'application du protocole de cryoconservation par « droplet-vitrification » défini précédemment. Chaque colonne représente la moyenne de trois ou quatre répétitions. Sauf dans le cas de *P. crispum* où il n'a pu être fait que 2 répétitions. Les barres sur les colonnes représentent les écarts types. La ligne représente la moyenne du taux de survie (66%) pour l'ensemble des cultivars et des espèces.

Lors de la régénération, dans certains cas, un apex cryoconservé a donné naissance à plusieurs pousses ce qui a abouti à un taux de régénération supérieur au taux de survie. A titre d'exemple pour *Pelargonium tetragonum* le taux de survie post-cryoconservation est de 40% tandis que son taux de régénération est de 81 %. De ce fait, les écarts types sur le graphique n'ont pas été indiqués (figure 2-16) car tous les génotypes n'ont pas montré cette aptitude à la multiplication. Comme pour la survie, il existe des différences du taux de régénération entre les cultivars et les espèces.

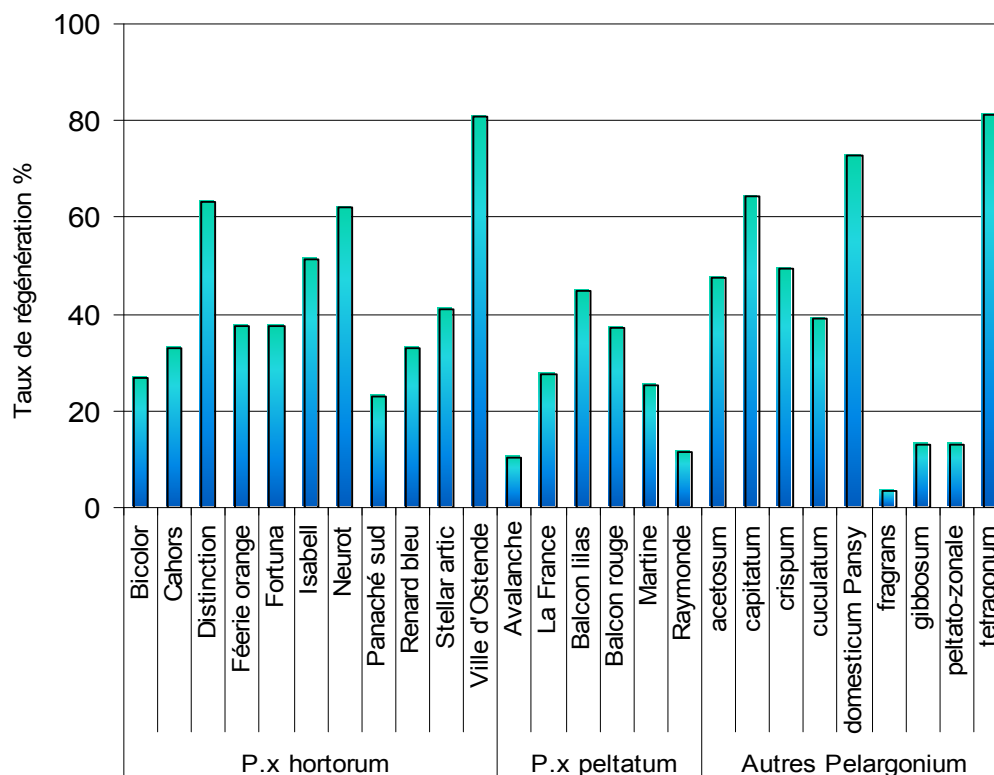


Figure 2-16. Taux de régénération de 25 cultivars et espèces de *Pelargonium* testés après l'application du protocole de cryoconservation par « droplet-vitrification » défini précédemment. Chaque colonne représente la moyenne de trois ou quatre répétitions. Sauf dans le cas de *P. crispum* où il n'a pu être fait que 2 répétitions.

L'étude des taux de survie et des taux de régénération « intra-type » montre qu'au sein des types « *peltatum* » et « *hortorum* », les différences entre les cultivars ne sont pas suffisamment importantes pour être repérées lors de l'analyse de variance (tableau 2-7).

Au contraire pour le type « autres *Pelargonium* », il existe des différences marquées entre les espèces aussi bien pour le taux de survie que pour le taux de régénération. Au vu de la répartition des espèces dans les groupes, il est même possible d'en déduire que la régénération est sensiblement moins différente entre les espèces que la survie.

Ces résultats peuvent paraître logiques, car les cultivars du type « *peltatum* » ont pour origine une seule espèce comme les cultivars du type « *hortorum* », alors que dans le type « autres *Pelargonium* » toutes les espèces sont différentes (tableau 2-7).

Tableau 2-7. Répartition des cultivars et des espèces dans chaque type de plante en fonction des résultats du test de Duncan au seuil de signification de 5% pour la survie et la régénération. * Pour les *P. x hortorum* la normalité des résidus n'étant pas respectée, le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5% a été utilisé.

	Survie	Régénération
<i>P. x peltatum</i>	P-value = 0,183	P-value = 0,352
<i>P. x hortorum</i>	P-value = 0,202*	P-value = 0,453*
Autres <i>Pelargonium</i>	P-value = 0,001	P-value = 0,024
	Test de Duncan	
<i>acetosum</i>	bc	abc
<i>fragrans</i>	a	a
<i>capitatum</i>	c	bc
<i>crispum</i>	bc	abc
<i>cucullatum</i>	bc	abc
<i>peltatum</i>	bc	abc
<i>hortorum</i>	bc	abc
<i>tetragonum</i>	ab	c
<i>domesticum</i> 'Pansy'	c	c
<i>gibbosum</i>	ab	ab

2.4. Discussion

Au cours de ce travail nous avons cherché à mettre au point un processus de cryoconservation adapté aux apex de *Pelargonium* garantissant la survie des apex, ainsi qu'un système de régénération *in vitro* qui donne satisfaction. L'impact sur la survie et sur la régénération de la méthode de cryoconservation, du génotype et de la composition du premier milieu de culture a aussi été abordé au cours de ce chapitre.

L'ensemble des travaux portant sur la cryoconservation par encapsulation-déshydratation d'apex de *Pelargonium* a été réalisé au laboratoire essentiellement par Grapin et Dumet. Cette méthode a permis d'obtenir des apex vivants pour les quatre cultivars que nous avons utilisé. Toutefois les taux de survie que nous avons obtenus ont varié d'un cultivar à l'autre de 1,1 % pour 'Panaché' à 33,8 % pour le 'Balcon Lilas'. Parmi ces quatre cultivars, deux avaient déjà été utilisés par Grapin *et al.* 2003. Nos résultats n'ont jamais été à la hauteur de ceux obtenus par ces auteurs. Ainsi le taux de survie post-cryoconservation était de 27,5 % pour 'Renard Bleu' contre 13,8 % dans notre étude et 83,9 % pour 'Balcon Lilas' contre 33,8 % dans notre travail. En revanche l'effet génotype est une constante lors de l'utilisation de cette méthode. Ce résultat est conforme à celui d'autres études sur la canne à sucre où les taux de survie de 15 génotypes variaient de 24 à 91 % (Gonzalez-Arno et Engelmann, 2006), ou encore sur sept génotypes de fraiser où la survie variait de 23 à 63 % (Clavaro-Ramirez *et al.*, 2005).

La teneur en eau des billes d'alginate lors de l'encapsulation-déshydratation est un facteur important pour la survie des apex. Une teneur en eau trop importante va engendrer une cristallisation de l'eau lors de la congélation provoquant des dommages aux cellules (Baudot *et al.*, 1998) tandis qu'une teneur en eau trop faible provoquera la mort des apex par déshydratation excessive. Il s'agit donc de trouver le bon compromis entre ces deux extrêmes.

Les différences de teneur en eau observées entre les cultivars peuvent expliquer au moins en partie des survies différentes, notamment pour 'Panaché' où la teneur en eau des billes en fin de déshydratation est particulièrement faible (0,19 g.g MS⁻¹).

Toutefois à la fin du processus de déshydratation, la moyenne des teneurs en eau des billes pour les quatre cultivars était de 0,23 g d'eau.g MS⁻¹. Cette valeur correspond pratiquement à celle obtenue par Grapin *et al.* (2003). Par conséquent d'autres facteurs doivent intervenir sur la survie des apex.

Sur les quatre cultivars, seul 'Balcon Lilas' a produit des pousses feuillées. Pour les trois autres cultivars les apex ayant survécu à la cryoconservation ont tous évolué soit en cal soit en pousses hyperhydriques. De plus nous avons pu remarquer que le simple fait d'enrober des apex, puis de les mettre en culture sans passer par la cryoconservation engendre de l'hyperhydrie et de la callogénèse. Cette observation va à l'encontre des résultats sur les embryons somatiques de pommiers où l'encapsulation n'a pas provoqué de problèmes de régénération (Paul *et al.*, 2000).

Face au manque de répétitivité des résultats lors des différents essais, à l'impossibilité de régénérer des pousses feuillées, nous aurions pu chercher à améliorer le protocole existant. Mais la variabilité observée de certains paramètres comme la teneur en eau des billes n'est pas contrôlable même en travaillant dans des conditions similaires. De plus avec un procédé d'une durée de 3 jours, l'encapsulation-déshydratation telle que nous la pratiquons ne permet pas une utilisation en routine à grande échelle. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de changer de méthode de cryoconservation tout en gardant comme préalable l'utilisation d'apex excisés de plantes cultivées en serre sans installation *in vitro*.

En 1994, Schäfer-Menuhr *et al.* ont développé une méthode dite par « droplet-freezing » dans laquelle des apex de pomme de terre sont placés dans des gouttelettes de DMSO avant d'être immergé dans l'azote liquide. A partir de cette étude plusieurs équipes de recherche ont modifié le protocole initial notamment par l'utilisation de la solution de vitrification PVS2 en lieu et place du DMSO. Elle a été appliquée avec succès sur différentes espèces comme le chrysanthème (Halmagyi *et al.*, 2004), les *Musaceae* (Panis *et al.*, 2005), la patate douce (Pennycooke et Towill, 2000), l'ail (Kim *et al.*, 2006), l'arabette (Towill *et al.*, 2006) et sur différents types d'explants tel que des apex (*e.g.* Panis *et al.*, 2005) ou des bulbilles (Kim *et al.*, 2006). Par conséquent cette méthode de cryoconservation apparaît comme étant applicable dans de nombreuses situations. De plus ce procédé offre l'avantage de se réaliser sur une durée beaucoup plus courte que l'encapsulation-déshydratation (quelques heures). Pour réduire les chocs osmotiques dus à la solution de vitrification (PVS2) (Gupta et Reed, 2006), il est important que les apex soient « pré-traités » afin d'augmenter leur osmotolérance par des étapes de préculture, de charge, ou une combinaison des deux. Une préculture des apex pendant 1, 2 ou 3 jours sur un milieu semi-solide enrichi avec 0,3M de saccharose avant l'étape de charge est couramment appliquée sur de nombreuses espèces végétales comme la vigne (Matsumoto et Sakai, 2003) ou la pomme de terre (Kim *et al.*, 2006). Cette étape conduit à une augmentation de la durée du processus général de cryoconservation et peut parfois être supprimée. Dans le cas du bananier l'application d'une préculture n'a pas d'effet bénéfique significatif sur la survie (Thin, 1997, Panis *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont montré qu'un traitement dans LS n'était pas absolument nécessaire pour la survie post-cryoconservation comme chez l'igname (Leunufna et Keller, 2003), les pommes de terre sauvages (Yoon *et al.*, 2006), le pin maritime (Touchell *et al.*, 2002) ou encore l'amandier (Channuntapiptat *et al.*, 2000). Par opposition, chez la betterave à sucre, d'une part l'immersion dans LS est nécessaire d'autre part que le traitement soit de 10 ou 20 minutes n'a pas d'impact sur la survie des apex (Vandenbussche *et al.*, 2000). Chez les apex de *Musaceae* (Panis *et al.*, 2005), aucune

différence significative de survie n'a été observée entre des apex immergés dans LS pendant 20 min ou 7 heures. En revanche chez la patate douce un traitement dans LS d'une durée de 60 min est meilleur pour la survie post-cryoconservation qu'une durée de 20 min (Pennycooke et Towill, 2000). Ces résultats démontrent que la réponse au traitement de LS est fonction de l'espèce.

Pour le genre *Pelargonium* nous avons montré d'une part qu'un traitement dans LS est nécessaire à la survie des apex et d'autre part qu'une durée d'immersion comprise entre 20 min et 2 heures n'altère pas la survie (Gallard *et al.*, 2008). Cette tolérance des apex vis-à-vis de LS est un avantage, car elle permet de laisser les apex dans LS au fur et à mesure des prélèvements. De cette manière, l'immersion des apex dans PVS2 pourra être faite en même temps pour tous les apex prélevés. Comme chez le bananier (Thinh, 1997, Panis *et al.*, 2005) ou chez le plaquemnier (Matsumoto *et al.*, 2001), seul un traitement dans LS est appliqué aux apex de *Pelargonium* pour l'acquisition de l'osmotolérance.

Concernant l'utilisation de PVS2, il existe une durée optimale d'immersion des apex pour chaque espèce en fonction de deux principes (i) la limitation de la cristallisation de l'eau et (ii) la limitation de la toxicité de PVS2. Ainsi la durée optimale du traitement dans PVS2 pour des apex de vigne est de 80 min (Matsumoto et Sakai, 2000), 60 min chez le peuplier (Lambardi *et al.*, 2001), 45 min chez le manioc (Charoensub *et al.*, 2003) ou encore 20 min pour les apex de pomme de terre sauvage (Yoon *et al.*, 2006). Dans le cas des apex de *Pelargonium*, une survie optimale a été obtenue pour une immersion dans PVS2 comprise entre 10 et 30 min. En revanche une exposition de 60 min s'est avérée trop longue (Gallard *et al.*, 2008). Les apex de *Pelargonium* semblent donc plus sensibles que ceux d'autres espèces car ils nécessitent une immersion dans PVS2 relativement plus courte mais dans le même temps ils acquièrent la tolérance à la cryoconservation rapidement.

Suite à l'adaptation de la « droplet-vitrification » aux apex de *Pelargonium*, l'amélioration du procédé de régénération a été entreprise.

Le travail que nous avons mené s'est focalisé sur l'utilisation de trois régulateurs de croissance la BAP, l'AIA et la GA₃ à quatre concentrations soit 64 milieux de culture différents. Plusieurs remarques peuvent être faites sur l'action des régulateurs de croissance. En leur absence, la régénération est pratiquement impossible. En outre, pour les concentrations les plus fortes en BAP (0,1 mg.L⁻¹) et AIA (0,5 mg.L⁻¹) la callogénèse et l'hyperhydrie sont très largement favorisées au détriment du développement des pousses. De plus à titre d'exemple le même taux de régénération (65 %) a été obtenu pour les milieux B3A2G1, B0A3G2 et B1A2G3 dont la composition et les concentrations en régulateurs diffèrent. Cette observation met en évidence l'existence d'interactions entre les régulateurs de croissance sur la multiplication, la différenciation et le grandissement cellulaire. C'est surtout l'interaction entre la BAP et l'AIA qui influence la production de cal et l'hyperhydrie. Ce résultat confirme ceux obtenus par exemple chez le mûrier et le framboisier par Mezzetti *et al.*, 1997.

Après les différentes étapes de sélection nous avons décidé de garder au final uniquement les deux milieux répondant le mieux possible à nos critères de choix, en l'occurrence les milieux B1A0G1 et B1A0G3. Ces deux milieux ainsi que le milieu de culture B3A3G0 utilisé précédemment au laboratoire ont été employés lors de l'étude sur les différents facteurs pouvant avoir un impact sur la survie et la régénération après cryoconservation.

D'une manière générale, le facteur « répétition » n'a eu que peu d'influence sur les résultats de l'étude puisque sur les 36 cas de figure possibles seul trois sont différents.

De plus nos résultats mettent en évidence que la survie et la régénération post-cryoconservation ne sont pas fonction de la composition du milieu de culture. Plusieurs suggestions peuvent être faites pour justifier ces résultats. Concernant la survie, elle est estimée deux semaines après la cryoconservation où seul le critère vivant ou mort est pris en compte, il s'avère donc que pour les trois milieux testés,

les compositions et les concentrations en BAP, AIA et GA₃ utilisées n'ont pas d'effet toxique ou bénéfique sur la survie. De manière plus surprenante il ne semble pas y avoir d'impact du milieu sur la régénération post-cryoconservation. D'autant plus que pour 'A Happy Thought' et 'Renard bleu' la régénération à partir d'apex témoins est favorisée par le milieu B3A3G0. Nous émettons l'hypothèse que pour ces deux cultivars, le stress induit par la cryoconservation est supérieur à celui engendré par le prélèvement d'apex, rendant les apex cryoconservés peut-être moins sensible à l'AIA contenu dans le milieu B3A3G0.

De plus, les analyses statistiques ne prennent pas en compte le caractère qualitatif des pousses régénérées et l'origine cellulaire de la pousse n'est pas connue. Or le milieu B3A3G0 permet d'avoir des pousses feuillées mais en même temps il engendre une forte production de cal. C'est pourquoi parmi les trois milieux étudiés, le milieu B1A0G1 a été retenu pour les autres études car il favorise une reprise directe de la croissance des apex sans production de cal.

A l'avenir il faudra intégrer dans les analyses statistiques la présence ou l'absence de cal afin de mieux caractériser l'impact de chaque milieu. En outre pour être plus proches des conditions réelles du procédé de régénération, les différents milieux de culture devraient être testés sur des apex issus de cryoconservation. De cette manière les éventuelles interactions entre le milieu de culture et la cryoconservation seraient connues. Au final, il faut rester prudent quant aux résultats statistiques sur les milieux.

Contrairement à précédemment, l'impact sur la survie et la régénération de la méthode de cryoconservation et du génotype est important. En effet, quel que soit le génotype, la survie et la régénération sont meilleures en utilisant la « droplet-vitrification » que l'encapsulation-déshydratation comme ce qui a été trouvé chez le chrysanthème (Halmagyi *et al.*, 2004).

A titre d'exemple pour le cultivar 'Panaché' le taux de survie est de 64,5 % après la « droplet-vitrification » contre seulement 1,1 % après l'encapsulation-déshydratation. Plusieurs observations peuvent être faites. D'une part, l'encapsulation-déshydratation est une méthode qui nécessite un travail d'ajustement du procédé plus important que la « droplet-vitrification ». Par conséquent cette dernière méthode est plus facilement généralisable et donc justifie son utilisation sur un grand nombre de génotypes. D'autre part avec des taux de survie tous supérieurs à 60 %, nos résultats sont en accord avec ceux trouvés chez d'autres espèces (*e.g.* chez la patate douce, Pennycooke et Towill, 2000 ou chez l'ail, Kim, 2006) et il est donc possible de s'affranchir de l'installation *in vitro* et de l'étape de « pré-traitement ».

Suite à l'adaptation de la « droplet-vitrification » et du choix des milieux de culture, l'ensemble de la procédure a été testé (cryoconservation et régénération *in vitro*) sur 28 cultivars et espèces de *Pelargonium*. Pour tous, des apex ont survécu à la cryoconservation. Ce résultat prouve qu'aucun des cultivars et des espèces utilisés n'est totalement récalcitrant à la cryoconservation par « droplet-vitrification ». Cependant la survie post-cryoconservation est variable selon le cultivar ou l'espèce (de 17,1 % à 90,9 %). Plus précisément, il existe une plus grande variabilité au sein du type « autres *Pelargonium* » qu'au sein des types « *hortorum* » et « *peltatum* » pour lesquels aucune différence significative n'a été observée entre les cultivars. Par conséquent, la survie des apex issus de la « droplet-vitrification » est plus fonction de l'espèce que du génotype.

A l'exception du cultivar 'Papa Crousse', les 27 autres cultivars ont eu la capacité de régénérer des pousses feuillées. Les commentaires concernant la survie restent valables pour la régénération. En effet, il n'y a qu'entre les espèces de *Pelargonium* que les taux de régénération diffèrent sensiblement. Par conséquent, la régénération est aussi liée à l'existence d'un facteur « espèce ».

Enfin aucun effet « manipulateur » ni « saisonnier » n'a été détecté. Ce point est important. Il signifie : premièrement, que la technique est facilement transférable d'une personne à une autre et deuxièmement, bien que les plantes soient cultivées en serre et que nous ayons observé des variations de croissance en fonction de la saison (variation de la durée du jour et de la température entre janvier et juillet), il n'est pas nécessaire de programmer des campagnes de prélèvement d'apex à des périodes bien définies.

Plusieurs éléments ressortent de ce chapitre. La cryoconservation par encapsulation-déshydratation telle qu'elle est pratiquée à l'institut ne garantit pas la survie des apex et donc *a fortiori* la régénération. En revanche l'adaptation au *Pelargonium* de la « droplet-vitrification » dont les paramètres ont été définis comme suit 20 min dans LS et 15 min dans PVS2 a donné satisfaction. Dans ces conditions son utilisation en routine est envisageable pour la constitution d'une cryobanque d'apex de *Pelargonium*. Comme chez d'autres plantes, la réponse à la cryoconservation du genre *Pelargonium* est fonction du génotype. Enfin le système de régénération a été amélioré même si celui-ci demeure perfectible. Grâce à l'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre, les différentes études qui seront développées dans les autres chapitres de la thèse ont pu être mises en place. Notamment des études histologiques afin de tenter de comprendre la réaction des cellules méristématiques et de l'apex dans son ensemble lors de la cryoconservation et de la régénération *in vitro* qui s'en suit.

CHAPITRE N°3

**Etude microscopique du comportement des cellules et des apex
lors de la cryoconservation**

3.1. Introduction

Le succès de la conservation dans l'azote liquide de ressources génétiques végétales repose sur la capacité d'explants en l'occurrence des apex à survivre aux procédés de cryoconservation.

Le développement de méthodes de cryoconservation, facilement transposable d'une espèce à une autre, ne pourra être réalisé que par la compréhension des phénomènes physiques et biologiques qui y sont rattachés. Dans ce contexte, il a été tenté au cours de ce chapitre de mieux comprendre, par des travaux de microscopie comment se comportent les apex et les cellules apicales lors d'un processus de cryoconservation. Dans ce cadre, une étude comparative a été menée notamment pour déterminer les raisons pour lesquelles la survie des apex s'est toujours révélée meilleure avec la « droplet-vitrification » qu'avec l'encapsulation-déshydratation lors de nos expériences. Suite à ce travail, nous avons cherché à savoir plus précisément, les effets de LS et PVS2 au niveau des cellules apicales et au niveau de l'apex entier lors de la « droplet-vitrification ».

Par ailleurs, l'utilisation de la cryoconservation peut se concevoir uniquement si la conformité des plantes régénérées est maintenue. C'est pourquoi, nous avons entrepris de connaître quel peut être l'impact de la « droplet-vitrification » sur la reprise de croissance ainsi que de déterminer l'origine cellulaire des plantes régénérées.

De nombreuses études ont montré que les procédés de cryoconservation ont un impact important sur les structures cellulaires. Ainsi, suite à la cryoconservation, on constate souvent une hétérogénéité cellulaire au niveau du méristème avec des zones de cellules endommagées et des zones vivantes (Grapin *et al.*, 2007). Par exemple, lors de l'encapsulation-déshydratation, chez le *Pelargonium*, des changements notables sont observés notamment l'accumulation d'amidon dans les cellules, des noyaux très foncés (pyncotiques), une plasmolyse partielle des cellules (Grapin *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats corroborent en grande partie ceux déjà trouvés chez d'autres plantes comme chez le framboisier (Wang *et al.*, 2005) ou la canne à sucre (Gonzalez-Arno *et al.*, 1993). Chez le bananier, la vitrification provoque des dommages structuraux notamment chez les cellules plus différenciées là où la vacuole est plus grande. Seule, une très petite zone de cellules méristématiques survit à la vitrification (Helliot *et al.*, 2003). Plus récemment, des modifications ont été observées chez des apex de menthe suite à la « droplet-vitrification », dont une plasmolyse des cellules, l'intensification de la coloration des noyaux, ou encore comme précédemment des dommages structuraux chez les cellules différenciées. En revanche aucune accumulation d'amidon dans les cellules n'a été mise en évidence (Volk *et al.*, 2007).

Ces études sont le résultat de l'utilisation de la microscopie optique ou de la microscopie électronique à transmission (MET). De fait, ces méthodes ne permettent ni de suivre en temps réel l'action de LS et PVS2 sur les cellules apicales et les apex dans leur globalité, ni de suivre les éventuelles déformations sur l'ensemble de l'apex au cours des traitements. Dans ces conditions des études ont été menées dans le cadre d'un projet financé par le BRG (Bureau des ressources génétiques) en collaboration avec l'IRD et le CIRAD de Montpellier. Elles ont eu pour objectif d'approfondir nos connaissances par des démarches novatrices. Ainsi deux approches scientifiques ont été menées. La première dite « dynamique » a eu pour but de suivre en temps réel le comportement des apex et des cellules, la deuxième grâce à des représentations tridimensionnelles, s'est attachée à comprendre quels pourraient être les effets de LS et PVS2 sur l'« architecture » des apex. Pour cela des systèmes microscopiques récents ont été employés tels que la microscopie en temps réel (Real Time Microscopy : RTM), la microscopie confocale à balayage laser (Confocal Laser Scanning Microscopy : CLSM) et à la microscopie multiphotonique à balayage laser (MultiPhotonic Microscopy : MPM). L'utilisation de

ces moyens techniques constitue une « première » qui par conséquent comportait un risque quant à l'obtention de résultats significatifs. C'est pourquoi, une évaluation de l'adéquation de ces outils par rapport à nos études a été entreprise.

3.1.1. Principe de la RTM et application

La RTM est un nouveau système microscopique développé par l'équipe de Richardson de l'université de Toronto (Canada) dans les années 90 (www.improvision.com). Il est basé sur la mesure des indices de réfraction de chaque composé cellulaire. Il permet l'analyse *in vivo* de matériel animal ou végétal sans l'ajout d'aucune sonde colorante ou fluorescente, avec une résolution améliorée d'un facteur $\sqrt{2}$ par rapport à un microscope « champ large » classique. Son principe est celui du contraste optique du fond noir. Dépourvu d'oculaire, la lecture se fait directement dans la fenêtre de prévisualisation du logiciel associé (Escoute, 2007).

Par ce système, il est possible de voir, les structures typiques d'une cellule comme, les parois, les membranes plasmiques, les vacuoles, le noyau, mais surtout il permet de filmer en temps réel des événements cellulaires (mouvement d'organites comme les mitochondries, formation de vésicules etc) jusqu'à présent impossible à voir. De ce fait, on redécouvre la cellule et son fonctionnement grâce à une perception dynamique. L'utilisation de la RTM reste encore très marginale, les seuls travaux publiés à notre connaissances sont ceux sur le comportement des mitochondries dans des fibroblastes de peau (Pham *et al.*, 2004) et sur la caractérisation de granules cytoplasmiques toujours dans des fibroblastes (Pham *et al.*, 2005). A cela, il faut ajouter les travaux sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (Bellanger, 2005). Actuellement plusieurs études sur du matériel végétal sont en cours de développement sur la plate forme MRI (Montpellier RIO Imaging) de Montpellier, là où se trouve le seul appareil au niveau mondial, consacré entièrement au végétal. C'est pourquoi, notre travail constitue une des premières études sur le végétal employant la RTM.

Par conséquent, son utilisation sur des apex et *a fortiori* lors d'une étude sur la cryoconservation est totalement inconnue. La mise au point des conditions d'utilisation de la RTM a donc été nécessaire avant de pouvoir étudier le comportement des cellules apicales et des apex au cours des différents traitements. A cet effet plusieurs adaptations techniques se sont révélées nécessaires dont les caractéristiques ont été détaillées dans le point 3.2.2.2. Par la suite, un important travail de traitement d'images sur les films a permis d'estimer l'impact des solutions LS et PVS2 sur les cellules et les apex.

3.1.2. Principe de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM), de la microscopie multiphotonique à balayage laser (MPM) et de leurs applications

3.1.2.1. Rappel sur la fluorescence

La fluorescence est le résultat de l'absorption d'un photon (excitation) par un fluorophore (figure 3-1) (molécules ou partie d'une molécule possédant des électrons délocalisables, c'est-à-dire des doubles, des triples liaisons ou des doublets d'électrons libres (figure 3-2)), suivi de l'émission d'un autre photon en réponse à cette excitation. L'énergie absorbée n'étant pas complètement restituée cela se traduit par une émission à une longueur d'onde plus grande (loi de Planck $E = h/\lambda$) (Bagory, 2006) (figures 3-1 et 3-3).

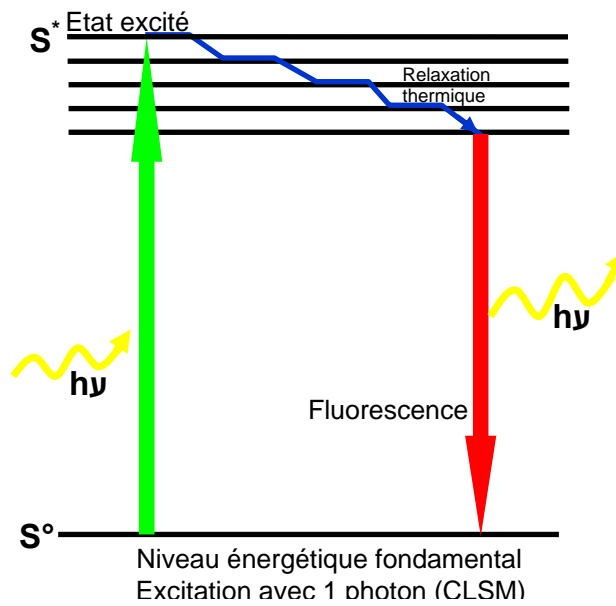
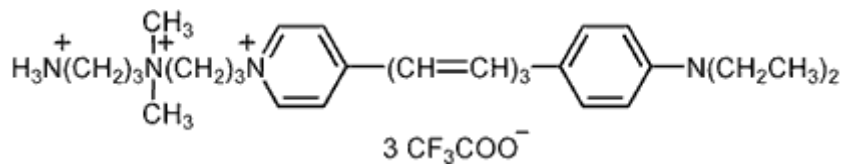


Figure 3-1. Représentation schématique d'une excitation monophotonique d'après Dossot, 2005.



Présence d'un système conjugué d'électrons délocalisables

Figure 3-2. Exemple de fluorochrome : FM4-64 (Source : www.probes.com)

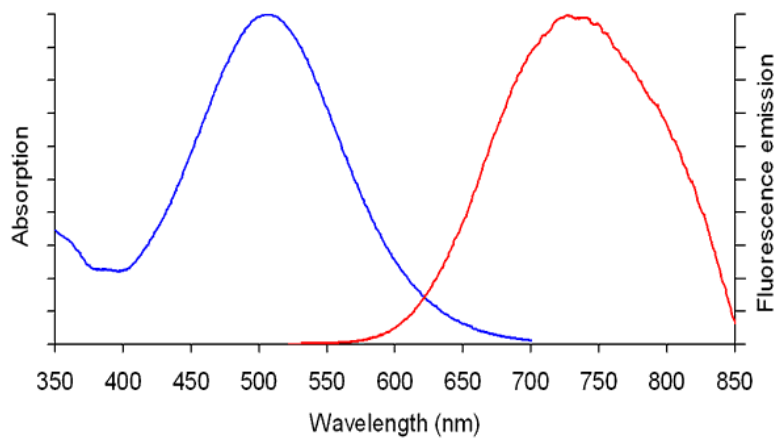


Figure 3-3. Spectre d'absorption et d'émission de FM4-64 (Source : www.probes.com)

3.1.2.2. Cas de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

Le principe du microscope confocal a été décrit par Marvin Minsky en 1957 (Héliot, 2006). Ce système microscopique repose sur la détection d'un signal lumineux produit à partir d'un fluorophore

lors d'une excitation linéaire par un laser. Deux cas sont envisageables. La fluorescence naturelle ou autofluorescence, c'est-à-dire la production naturelle de lumière due à la présence de fluorophores propres à l'échantillon observé. Par exemple, l'excitation de la chlorophylle produit une émission lumineuse rouge. En revanche dans la majorité des cas pour mettre en évidence une structure particulière ou bien la localisation d'une molécule, il est nécessaire d'utiliser des molécules fluorescentes ayant une affinité spécifique pour une molécule ou une structure précise. Il existe ainsi de nombreux fluorochromes spécifiques, nous pouvons notamment citer le FM4-64 dont l'affinité pour les chaînes aliphatiques des phospholipides en fait un très bon marqueur des membranes cellulaires (Bolte *et al.*, 2004). Dans d'autres cas la localisation d'une structure, d'une molécule, d'un virus pourra se faire par l'intermédiaire d'un anticorps spécifique sur lequel est greffé une molécule fluorescente. Par exemple la tubuline peut être visualisée par un système à deux anticorps ; un anticorps primaire (AC 1) anti-tubuline et un anticorps secondaire marqué à la FITC anti-AC 1 (Brown et Lemmon, 1991). Il est aussi possible de créer des organismes génétiquement modifiés dans lequel est inséré un gène recombinant composé d'un gène d'intérêt et d'un gène codant pour une molécule fluorescente (*e.g.* GFP, YFP...). Lorsque le gène d'intérêt est fonctionnel, la protéine fluorescente est produite indiquant où et quand le gène d'intérêt s'exprime. Par ce système, un gène codant pour la squalène synthase chez *A. thaliana* a été mis en évidence (Busquets *et al.*, 2008).

Grâce à un système de diaphragmes (pinhole), seul la lumière fluorescente émise provenant du plan focal est détectée contrairement à ce qui se passe avec un microscope à épifluorescence où tout le signal lumineux est capté. La qualité des images produites en CLSM est meilleure, facilitant ainsi leur interprétation.

Lors de l'acquisition des images, la pénétration du laser dans l'échantillon est programmée selon l'incrémentaire désirée. A chaque pas une image est alors générée. A partir des images obtenues il est alors possible de construire une image tridimensionnelle de l'échantillon observé.

Toutefois lors de l'utilisation de la microscopie confocale il est important de limiter la durée d'exposition des échantillons au laser. En effet la puissance du laser, de l'ordre de 1,5 mW au point focal, peut provoquer des dégâts irréversibles dans les cellules vivantes et engendrer une photodégradation rapide (photobleaching) des fluorochromes (Terjung, 2004).

3.1.2.3. Cas de la microscopie multiphoton à balayage laser (MPM)

Bien que le principe de l'excitation non linéaire d'électrons soit connue depuis les années 30 (König, 2000) son application en microscopie n'a été utilisée pour la première fois qu'en 1990 à l'Université de Cornell par l'équipe de Denk (Beaurepaire, 2005).

La MPM repose sur l'absorption quasi simultanée de plusieurs photons (souvent 2 ou 3) par un fluorophore. Afin d'augmenter la probabilité d'une absorption simultanée, un laser délivrant des impulsions ultrabrèves de faible énergie dans l'infrarouge est utilisé. Les pulsations du laser vont provoquer l'excitation en plusieurs étapes des électrons délocalisables. Un premier photon permettra l'excitation partielle d'un électron et avant qu'il ne retourne à son état fondamental, un deuxième photon interviendra environ une femtoseconde (10^{-15} s) plus tard afin de hisser l'électron à un niveau énergétique supérieur capable d'émettre de la fluorescence lors de son retour à l'état fondamental (figure 3-4).

Cette excitation en deux temps permet de travailler avec des longueurs d'onde moins énergétiques (infrarouge) que lors d'une excitation linéaire (CLSM) tout en permettant une émission dans le visible. En MPM, la longueur d'onde d'excitation (infrarouge) est plus grande que la longueur d'onde d'émission (visible) contrairement à la CLSM.

De cette propriété découle plusieurs remarques. Le « photobleaching » des fluorochromes est réduit ce qui permet de travailler sur des durées plus longues. L'excitation dans l'infrarouge est peu toxique sur les tissus vivants contrairement aux ondes UV-Visible. La pénétration dans les tissus des ondes infrarouges est plus importante jusqu'à 500 μm (Bagory, 2006) contre environ 40 μm en CLSM (Michel, 2005). Enfin, il y a une élimination quasi-totale de fluorescence hors du plan focal. D'où l'utilisation de plus en plus courante de cette méthode pour l'étude *in vivo* des phénomènes biologiques. D'abord utilisée dans les neurosciences la MPM est dorénavant utilisée dans d'autres domaines ainsi chez les végétaux, la croissance d'un tube pollinique de tabac exprimant la GFP a pu être filmée sans dégradation du fluorochrome (Chiu *et al.*, 1996).

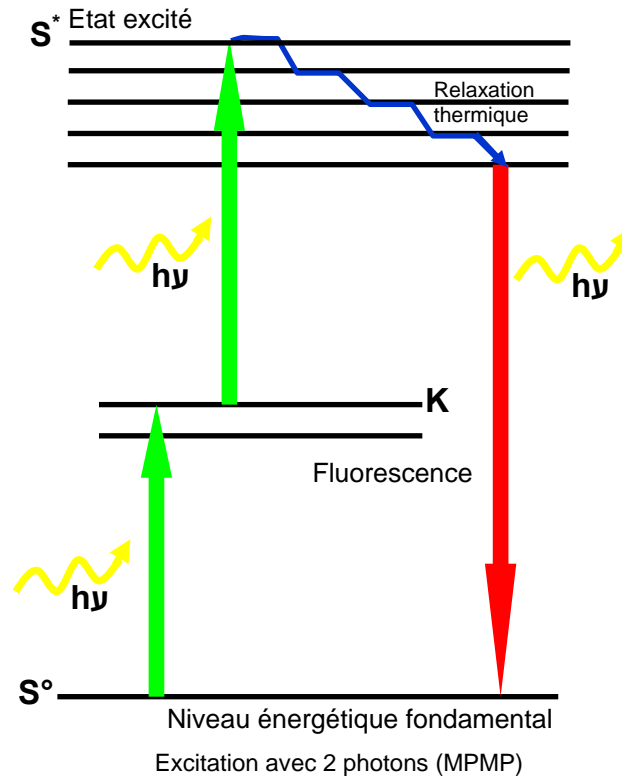


Figure 3-4. Représentation schématique d'une excitation biphotonique d'après Dossot, 2005.

A notre connaissance La CLSM et La MPM n'ont jamais été utilisées à ce jour pour une étude des effets de la cryoconservation sur des d'apex.

Après avoir vérifié qu'il n'y avait pas d'auto fluorescence naturelle des parois ou des membranes chez *Pelargonium*, il a été décidé de marquer les membranes pour suivre l'évolution de l'architecture des apex lors de la régénération et de déterminer si la cryoconservation avait une influence sur celle-ci. A partir des travaux de Barbier de Reuille *et al.*, 2005 et de Grandjean *et al.* en 1999, le choix du marqueur membranaire s'est porté sur le fluorochrome FM4-64 qui offre l'avantage de ne pas être toxique pour les cellules.

Le système microscopique disponible sur la plateforme MRI permet de passer indifféremment du mode CLSM au mode MPM et inversement. Ainsi la CLSM a été utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle de l'apex et visualiser son évolution lors des différents traitements de cryoprotection. La MPM a été employée, en parallèle de la microscopie optique pour suivre la reprise de croissance des apex après le réchauffement.

3.2. Matériel et Méthodes

3.2.1. Matériel végétal

Comme dans le chapitre précédent, le cultivar 'Balcon Lilas' nous a servi de modèle. Il faut y ajouter le cultivar de *P. x hortorum* 'Panaché' qui a servi également pour les études de régénération. Les plantes utilisées au cours de ce chapitre ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment (cf. chapitre n°2).

3.2.2. Méthodes

3.2.2.1. Microscopie optique

Tous les apex ont été préparés de la même manière (voir les protocoles de fixation, de déshydratation et d'inclusion en annexe 3-1).

Lors de l'étude comparative entre l'encapsulation-déshydratation et la « droplet-vitrification » trois apex du cultivar Balcon Lilas ont été fixés immédiatement après chaque étape des deux procédés de cryoconservation.

Dans une autre étude, la cinétique de croissance a été suivie à J0, J+1, J+3, J+7, J+14 et J+21 chez les cultivars Balcon Lilas et Panaché. J0 correspond au jour où les apex ont été mis en culture, c'est-à-dire suite au prélèvement pour les apex témoins ou après la cryoconservation pour les autres apex. Pour chaque point de cinétique entre trois et cinq apex des cultivars concernés ont été utilisés. Les apex ont été fixés au fur et à mesure des différents points de cinétique.

Les coupes de 3µm d'épaisseur réalisées au microtome (Microtome Leica RM 2165) ont été colorées à l'acide périodique-Schiff (Gabe, 1968) et au Naphthol Blue Black (Fisher, 1968) (annexe 3-2). La première coloration permet de mettre en évidence spécifiquement tous les composés osidiques notamment les parois et l'amidon par une coloration variant du rose au grenat, tandis que la deuxième coloration permet de détecter la présence (en bleu) de protéines dans les cellules. Outre la mise en évidence de protéine, cette coloration donne une indication sur l'activité cellulaire, en effet l'accumulation en protéines est souvent corrélée avec le niveau d'activité de la cellule. Les observations ont été réalisées grâce à un microscope Olympus BH2 équipé d'une caméra numérique Sony DXC-390P.

3.2.2.2. La microscopie en temps réel (RTM)

Avant de débiter nos études, un important travail de mise en point s'est avéré nécessaire notamment au niveau de la préparation des échantillons. Les apex étant trop épais pour permettre de visualiser l'intérieur des cellules, il a été nécessaire de les découper à l'aide d'un vibratome de façon à avoir des couches cellulaires intactes mais suffisamment fines pour faire des observations de qualité. Afin de suivre les effets de LS et PVS2 sur les coupes une chambre d'un volume d'environ 40 µL dans laquelle il est possible de faire diffuser des solutions par un système de capillaire a été construite spécifiquement (figures 3-5A, 3-5B, et 3-6).

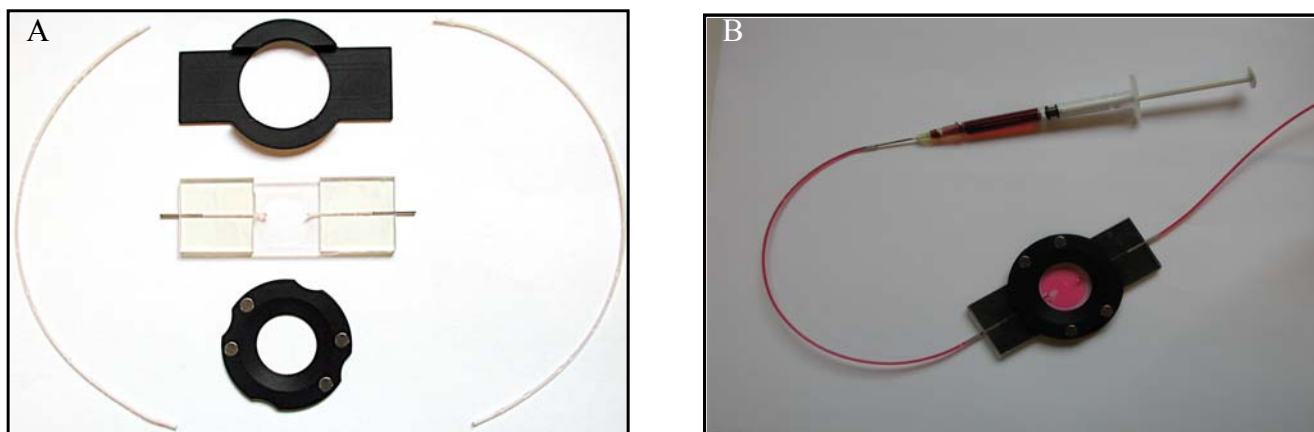


Figure 3-5. A - Chambre démontée, B – Diffusion d'une solution colorée à travers la chambre.



Figure 3-6. Chambre placée dans le RTM

Préparation et découpe des apex :

Sur un morceau de tige contenant un bourgeon axillaire, l'apex a été disséqué selon la procédure définie au point 2.2.2.1 (page 25) en le maintenant en place sur la tige.

Celle-ci est alors découpée avant d'être fixée avec de la colle (type super glue) sur la platine aimantée du vibratome (Figure 3-7A et 3-7B) de telle manière que l'apex soit découpé longitudinalement. Les coupes sont récupérées dans du tampon PBS (annexe 3-1) avant d'être posées sur une lame en verre. Les paramètres d'utilisation du vibratome (vibratome HM 650 V) sont une fréquence de vibration de 45 Hz, une amplitude de vibration de 0,5 mm et une épaisseur des coupes de 30 μm .

La sélection des coupes s'est faite par une observation rapide au microscope optique. N'ont été gardées que les coupes où l'ensemble du dôme méristématique était visible. Afin de maintenir les tissus vivants, il a été vérifié en permanence que les coupes ne se desséchaient pas.

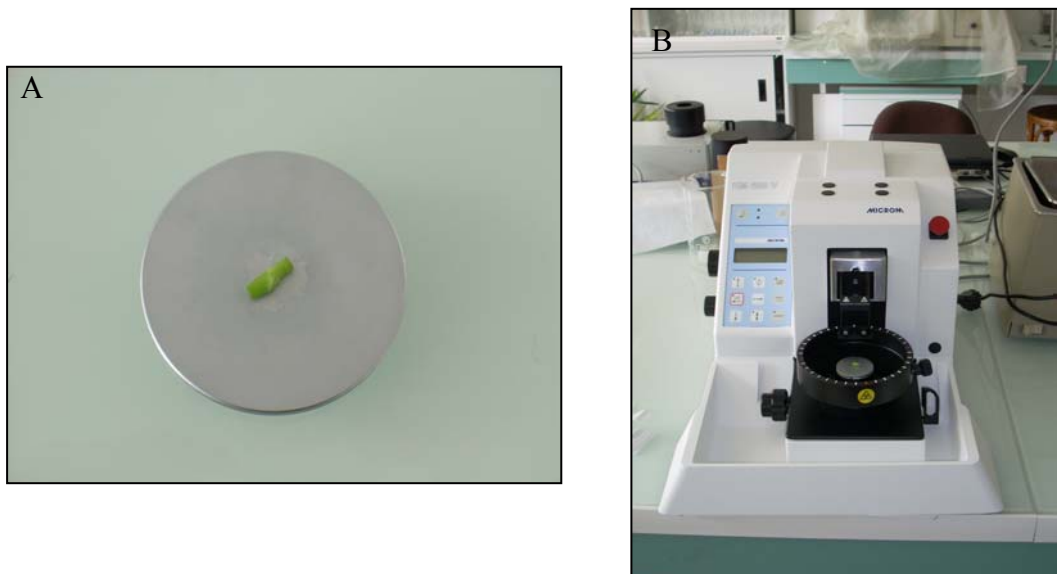


Figure 3-7. A-Tronçon de tige avec un apex axillaire collé sur la platine, B-Vibratome

Montage des coupes dans la chambre

Pour que les coupes ne bougent pas lors de l'injection des produits, elles ont été fixées au fond de la chambre du côté de la tige par un petit morceau de papier adhésif. L'ensemble a alors été immergé dans du tampon PBS.

Avant de refermer la chambre, le capillaire d'injection est purgé afin d'éviter l'apparition de bulles compliquant l'observation.

Injection de LS et PVS2 dans la chambre

L'injection de LS ou PVS2, s'est faite par l'intermédiaire d'une seringue en verre utilisée en CPG (chromatographie en phase gazeuse), de 5 ml connectée à la chambre via un capillaire en téflon. Afin de maintenir une injection régulière et très lente, la pression exercée sur le piston s'est faite par l'intermédiaire d'une vis. (figure 3-8).

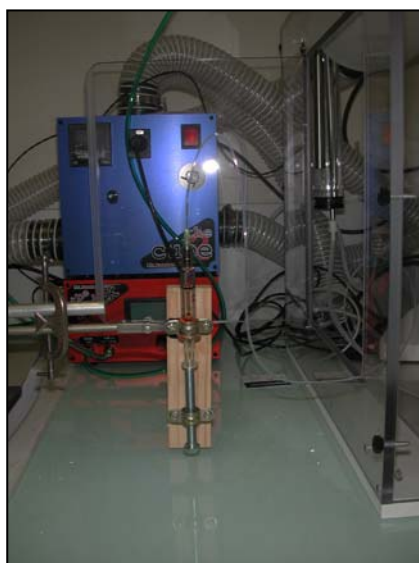


Figure 3-8. Système d'injection des solutions dans la chambre

Observation et acquisition des images et films

Cette étude a été réalisée sur des apex témoins, sur des apex après un traitement dans LS, sur des apex après un traitement dans PVS2 et sur des apex ayant subi successivement les deux traitements.

Une fois les réglages de base établis (voir fiche d'utilisation sur le site www.mri.cnrs.fr), les observations ont été faites à plusieurs grossissements (x5, x10, x20, x40, x100). A chaque changement d'objectif, l'ouverture du diaphragme de champ, l'intensité de la lumière et le gain ont été ajustés afin d'optimiser la qualité des images. Les images et les films ont été réalisés sur fond noir via le filtre « Richardson contrast FL ». Différentes vitesses d'acquisition des images ont été utilisées. Au moment de l'injection des produits, pour une acquisition de quelques minutes, les films réalisés ont été faits à une vitesse de 30 images par seconde. En revanche pour suivre les événements cellulaires après l'injection sur des durées plus longues, l'acquisition des images s'est faite à des vitesses plus lentes (1 image toutes les 10 secondes ou bien 2 images par minute).

Les observations ont été faites grâce à un RTM Richardson monté avec une caméra numérique Sony Tri ccd 640 x 480 pixels géré par le logiciel de traitements d'images Volocity de chez Improvision.

Une bibliothèque a été créée dans le logiciel d'exploitation Volocity pour le stockage et la gestion des images et des films.

3.2.2.3. La microscopie multiphotonique

Que se soit pour la microscopie confocale ou multiphotonique, la préparation des apex a toujours été la même. Avant d'observer les apex par ces systèmes microscopiques, les modalités d'utilisation du fluorochrome membranaire FM 4-64 ont été caractérisées. Ainsi à l'aide de protoplastes de *Citrus spp*, les meilleures longueurs d'excitation du fluorochrome ont été déterminées à 543 nm en mode confocal et entre 920 nm et 930 nm en mode biphoton.

Préparation des apex

Les apex ont été prélevés comme dans les expérimentations de cryoconservation (voir 2.2.2.1.).

Marquage des membranes plasmiques avec le fluorochrome FM 4-64

Après avoir dilué FM 4-64 dans du tampon PBS pour constituer une solution-mère, plusieurs concentrations (6,25 μ M, 12,5 μ M et 16,6 μ M) et plusieurs durées d'immersion des apex ont été testées (30 min, 4 heures, 5 heures et 6 heures). Ainsi une fois prélevés, les apex ont été immergés dans 2 mL d'une solution du fluorochrome FM4-64 à 12,5 μ M pendant 4 heures, sous agitation à l'obscurité, dans une chambre froide à 7°C. A la fin de ce traitement, les apex ont été rincés dans les mêmes conditions que précédemment pendant au minimum 1 heure dans du tampon PBS. Environ une vingtaine d'apex ont été traités de cette façon. Parmi ces apex, seuls ont été utilisés au cours des expériences ceux présentant à la fois un marquage des membranes de qualité et une structure intacte.

Pour ne pas les écraser durant les observations, des chambres ont été construites spécialement pour réaliser les observations.

Montage et construction de la chambre

Des chambres ont été construites à l'aide de lames et de lamelles en verre. Les apex ont été insérés dans un film de gélrîte à 4% afin qu'ils ne bougent pas lors des observations sur le statif inversé. La gélrîte ayant le même indice de réfraction que l'eau les observations ne sont pas affectées. De plus elle ne fond pas sous les effets d'échauffement dus au laser (figure 3-9). En fonction des expérimentations le tampon PBS a été remplacé par les solutions LS ou PVS2.

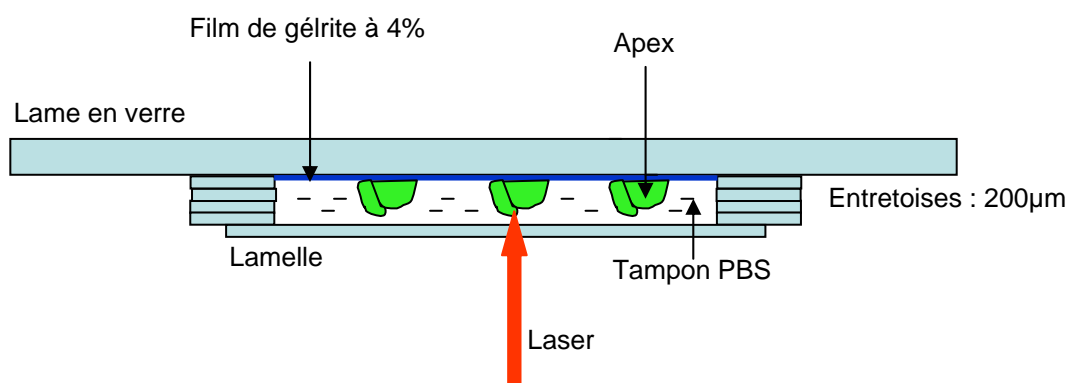


Figure 3-9. Chambre d'observation des apex

Observation et acquisition des images

Après avoir vérifié la qualité du marquage par une observation en épifluorescence directement sur le microscope inversé, les différents réglages d'acquisition des images ont été effectués selon la procédure définie sur la fiche d'utilisation (www.mri.cnrs.fr).

Toutes les acquisitions d'image ont été faites à l'aide du système Zeiss Axiovert 200M LSM 510 Meta NLO de la plate forme MRI composé de deux statifs (un droit et un inversé), d'un système laser pulsé femtoseconde Chameleon Ultra II COHERENT (690-1060nm) et d'un module laser RGB contenant un laser Argon 4 raies (30 mW), un laser Helium-Neon 543 (1mW) et un laser Helium-Neon 632,8 nm (5 mW).

L'ensemble est piloté par le logiciel LSM 510 Meta de chez ZEISS.

Les images ainsi que l'ensemble des paramètres de réglage utilisés pour réaliser les acquisitions ont été conservées dans une base spécifique du logiciel LSM 510 Meta.

3.2.2.4 Traitements des images

Les analyses d'images ont été faites à l'aide des logiciels de traitement d'images utilisés sur la plateforme MRI de Montpellier (version gratuite) à savoir, Volocity Lite, LSM Browser et le logiciel libre Image J. De plus le logiciel photoshop a été employé pour réaliser le montage des images de microscopie optique et optimiser leur qualité.

Estimation de la vitesse d'action de LS et PVS2 par RTM

A partir des films réalisés sur des coupes d'apex au cours des traitements dans LS et PVS2, nous avons tenté de quantifier les changements de taille observés. Pour cela, en raison de la taille

importante des fichiers, notamment ceux concernant l'injection des solutions de cryoconservation (30 images par secondes), il a été nécessaire de réduire la durée des films aux événements intéressants. De plus les images ont été passées du mode couleur (figure 3-10A) au mode noir et blanc (figure 3-10B) pour pouvoir travailler plus facilement avec le logiciel Image J. Les images ont alors été seuillées afin de délimiter nettement le contour de la coupe (figure 3-10C). L'aire des coupes est alors calculée directement par le logiciel à partir soit de l'image seuillée en incluant les « trous » (zones blanches appartenant à la coupe) soit à partir d'un masque de l'image (figure 3-10D). Connaissant la vitesse d'acquisition des images, il a été possible de déterminer l'évolution de la surface des coupes au cours de la durée d'acquisition.

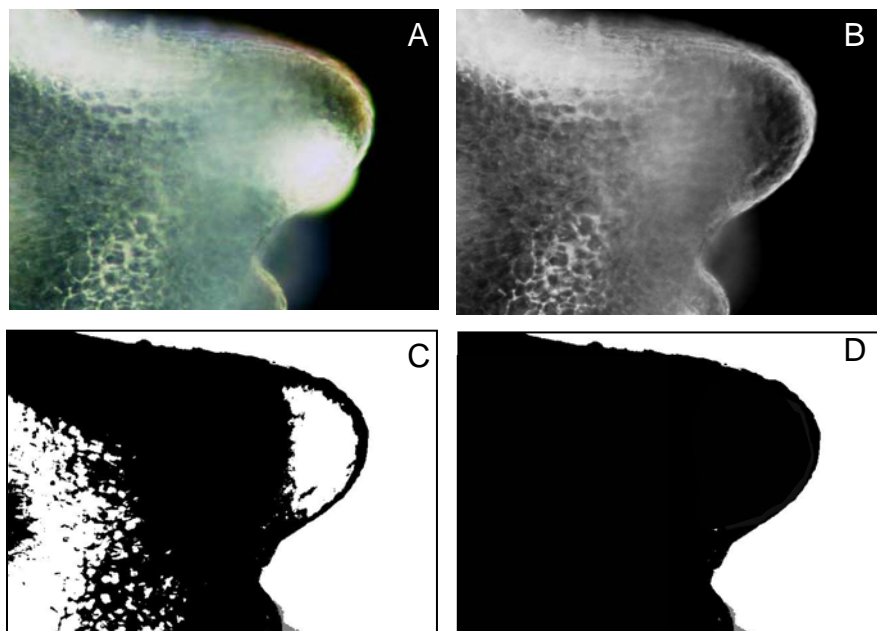


Figure 3-10. A- Image originale en couleur, B – Image en noir et blanc de format 8 bit, C – Image seuillée, D – Masque de l'image.

Estimation du volume des apex

La démarche suivie est pratiquement la même que précédemment. Pour chaque coupe optique, une image est générée (figure 3-11A). L'aire de chaque coupe optique de l'apex est calculée soit à partir de l'image seuillée (figure 3-11B) soit à partir du masque (figure 3-11C). Connaissant la surface d'un pixel pour un grossissement donné (*e.g.* objectif 40 sans zoom numérique $1 \text{ pixel} = 0,1936 \mu\text{m}^2$) et le pas d'incrémentement du laser ($0,61 \mu\text{m}$), il a été possible de calculer le volume de chaque coupe optique des apex. Il suffit alors d'additionner le volume de chaque coupe optique pour avoir une bonne estimation du volume total de l'apex.

N.B : L'estimation du volume des apex ou des dômes méristématiques au cours des expérimentations n'a pas pu être réalisée dans tout les cas, soit en raison d'une qualité d'image insuffisante, soit du fait des nombreux débris sur les apex.

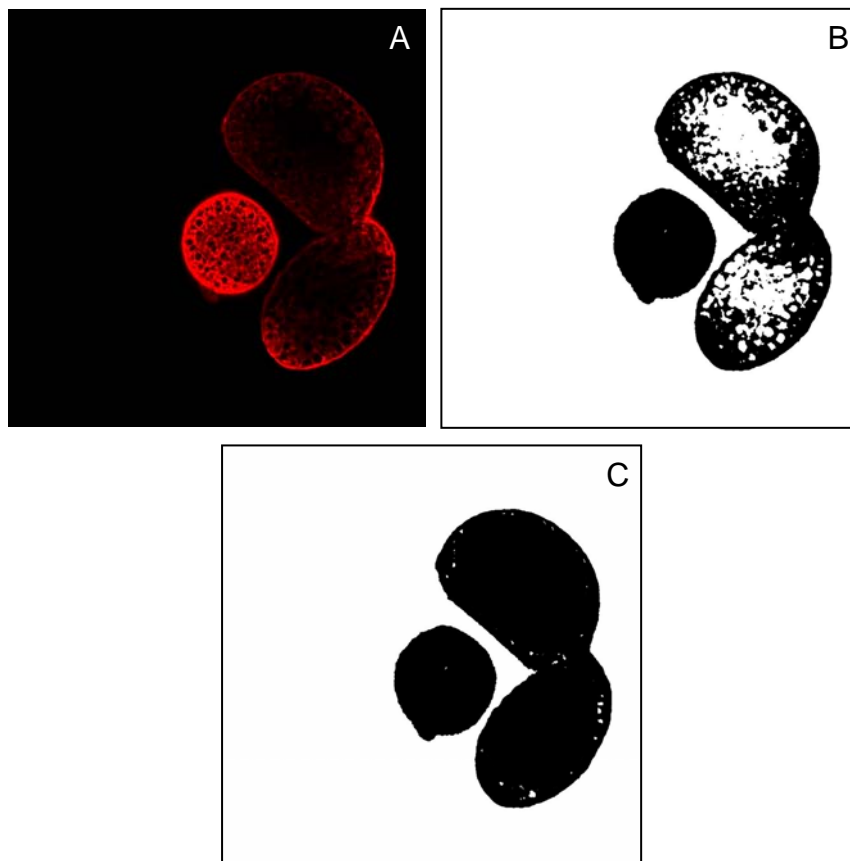


Figure 3-11. A - Coupe optique originale, B - Coupe seuillée, C - Masque de la coupe

La procédure détaillée du calcul des surfaces est décrite dans l'annexe 3-3. Certains films ayant un « poids » pouvant aller jusqu'à 3,5 Giga octets, les traitements d'images se sont révélés particulièrement long à faire (environ 3 à 4 heures selon le traitement) à partir d'un ordinateur de bureau classique en l'occurrence un DELL T7500 70 équipé d'un processeur Pentium IV.

3.3. Résultats

3.3.1. Description histo-cytologique d'apex de *Pelargonium* au cours de l'encapsulation-déshydratation et de la « droplet-vitrification »

3.3.1.1. Structure interne d'un apex avant la cryoconservation

Lors de la dissection, le méristème n'est jamais prélevé seul. En raison de sa petite taille (environ 100 μm de diamètre à sa base), il est difficile de le prélever sans courir le risque de lui infliger des chocs et des lésions incompatibles avec sa survie. C'est pourquoi se sont les apex qui sont utilisés lors de la cryoconservation. Un apex prélevé se compose, d'un méristème, d'un ou plusieurs primordia et d'une zone dite sous méristématique comprise entre le méristème et la zone d'excision de l'apex (figure 3-12A).

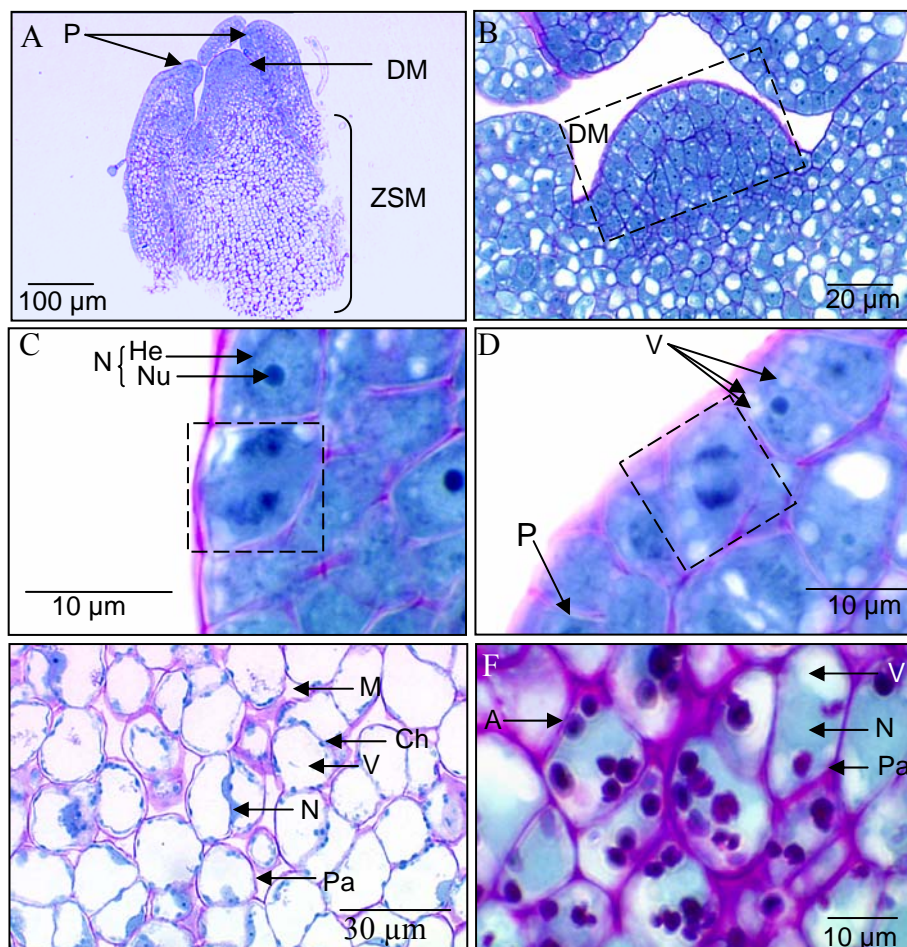


Figure 3-12. A : Apex entier – B : méristème – C : cellules méristématiques en division (télophase) – D : cellules en division (anaphase) – E : cellules de la zone sous méristématique – F : cellules contenant des grains d'amidon. Ch : chloroplaste, He : hétérochromatine, M : méristème, Me : méat, N : noyau, Nu : nucléole, P : paroi, P : primordia, V : vacuole

Le méristème se présente sous la forme d'un dôme à la surface lisse dans lequel les cellules les plus externes sont alignées de telle manière qu'elles forment deux couches contiguës (figure 3-12B). Plus précisément, les cellules méristématiques se caractérisent par une petite taille (environ 10 µm de diamètre), une forme isodiamétrique, une paroi peu épaisse, la présence de petites vacuoles et un rapport nucléocytoplasmique élevé. De plus des mitoses sont visibles dans le méristème traduisant une forte activité de ces cellules (figure 3-12 C et D). La présence en grande quantité de protéines dans les cellules se traduit par une coloration bleue intense au niveau du cytoplasme et du noyau. Cette accumulation de protéines est souvent liée à une forte activité cellulaire. Enfin l'hétérochromatine et le (les) nucléoles sont souvent nettement visibles dans ces cellules (figure 3-12 C et D). Les mêmes commentaires peuvent être faits concernant les cellules se trouvant à l'extrémité des primordia.

Dans la zone sous méristématique, les cellules possèdent moins de vacuoles (souvent une seule de grande taille), une paroi pectocellulosique plus épaisse, une taille plus grande (entre 20 et 30 µm). De plus l'accumulation de protéine est faible (pas de coloration bleue). Il est aussi observé la présence de méats entre les cellules (figure 3-12E). Parfois la présence de réserves amylicées, sous forme de grains, a été notée dans ces cellules (figure 3-12F).

D'une manière générale, plus on s'éloigne du méristème plus le volume vacuolaire est important par rapport à celui du cytoplasme.

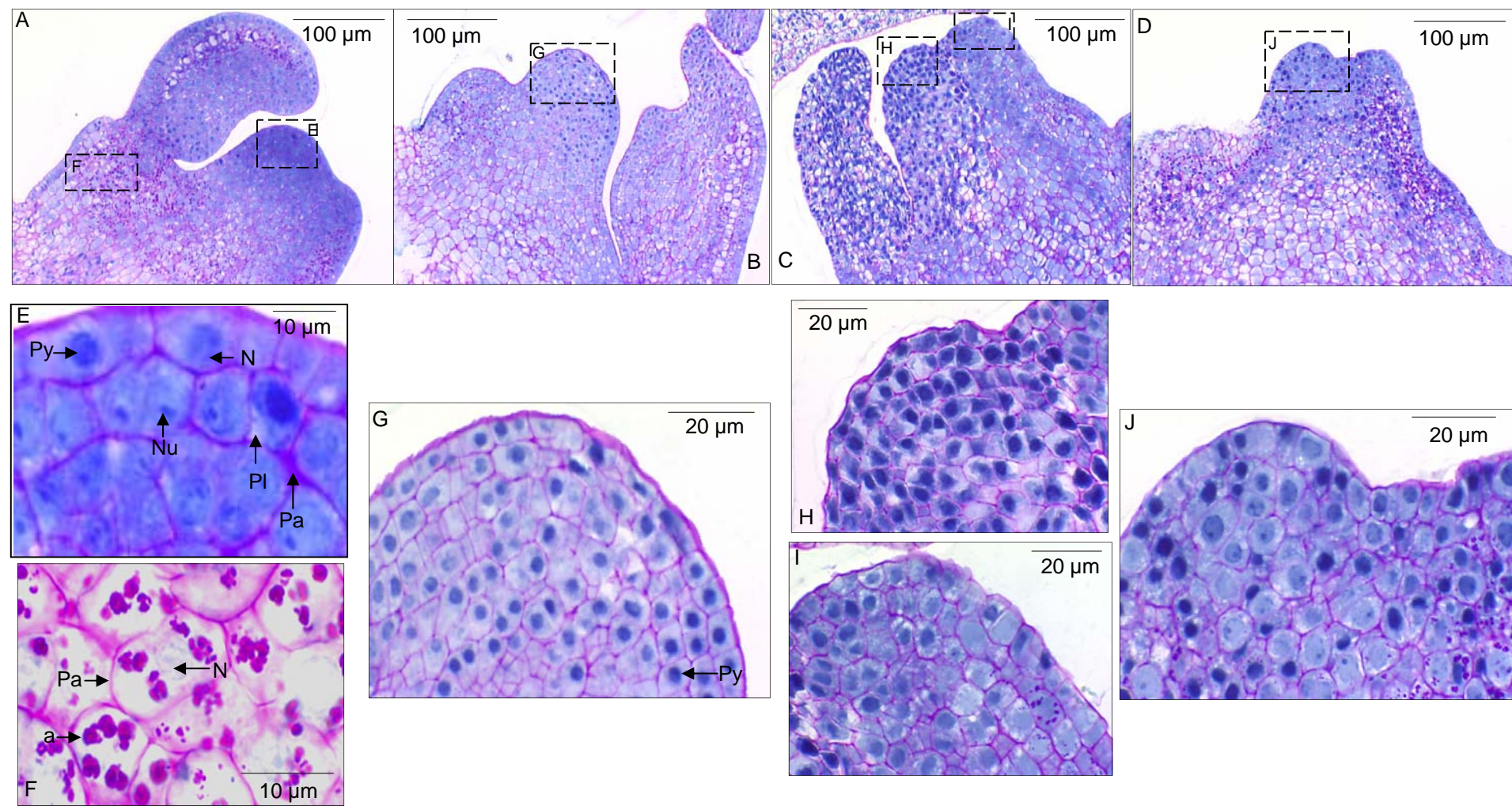


Figure 3-13. Coupes histologiques d'apex de *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' au cours des différentes étapes de l'encapsulation-déshydratation. A, E et F: après la préculture - B et G: après la déshydratation évaporative – C, H et I: à la sortie de l'azote liquide (sans réchauffement) - D et J: après le réchauffement. a: amidon – Pa: paroi – Py: noyau pycnotique – N :noyau – Nu: nucléole. Coloration acide périodique - Schiff et Naphtol Blue Black.

3.3.1.2. Evolution des apex au cours de l'encapsulation-déshydratation

Figure 3-13 A, E et F

Suite à la préculture, aucune déformation du méristème n'est observée. Comme chez les apex témoins, la quantité de protéine dans les cellules méristématique est importante. Une accumulation d'amidon est observée dans les cellules situées à la base du primordium foliaire ainsi que dans les cellules se trouvant sous le dôme méristématique. En revanche il n'y a pas de grains d'amidon dans les cellules méristématiques et dans les cellules du procambium. Les noyaux, les nucléoles et l'hétérochromatine demeurent visibles. De plus les cellules méristématiques sont faiblement plasmolysées.

Figure 3-13 B et G

Après la déshydratation évaporative, le dôme méristématique présente une surface moins lisse et légèrement ondulée, traduisant des rétractions au niveau des parois pecto-cellulosiques. Contrairement à précédemment, de nombreuses cellules possèdent des noyaux pycnotiques. Dans ces noyaux le nucléole et l'hétérochromatine ne sont plus décelables. Ce changement d'aspect laisse supposer une modification de l'activité générale des cellules.

Figure 3-13 C, H et I

A la sortie de l'azote liquide, il peut arriver que toutes les cellules méristématiques ne présentent pas le même aspect. Ainsi en haut à droite de la photo (3-13I), les cellules ne semblent pas avoir subi d'altérations. Elles possèdent les caractéristiques classiques des cellules méristématiques avec toutefois la présence de quelques noyaux pycnotiques. En revanche dans la partie gauche (3-13H) et dans le primordium foliaire les cellules présentent un aspect fortement dégradé. Elles sont caractérisées par une forte vacuolisation notamment au niveau du primordium, par une forme générale plus anguleuse et par des noyaux extrêmement foncés plus ou moins falciformes. Le dôme dans cette partie a perdu son aspect rond et lisse pour une forme beaucoup plus ondulée. Dans ces conditions, il n'est pas certain que la viabilité des cellules soit assurée.

Figure 3-13 D et J

Après le réchauffement, une partie des cellules a retrouvé le même aspect que celui d'avant la cryoconservation, c'est à dire avec des noyaux bien visibles où le nucléole et l'hétérochromatine sont discernables. La viabilité potentielle de ces cellules ne semble pas avoir été influencée par la cryoconservation. Par contre, quelques cellules conservent encore des noyaux pycnotiques à la fin du réchauffement.

3.3.1.3. Evolution des apex au cours de la « droplet-vitrification »

Figure 3-14 A et E

Suite à l'immersion dans LS, certaines cellules méristématiques sont partiellement plasmolysées. Quelques cellules présentent un noyau pycnotique mais la grande majorité possède un noyau dans lequel il est possible de distinguer le nucléole et l'hétérochromatine. Aucune accumulation d'amidon n'a été observée dans les cellules.

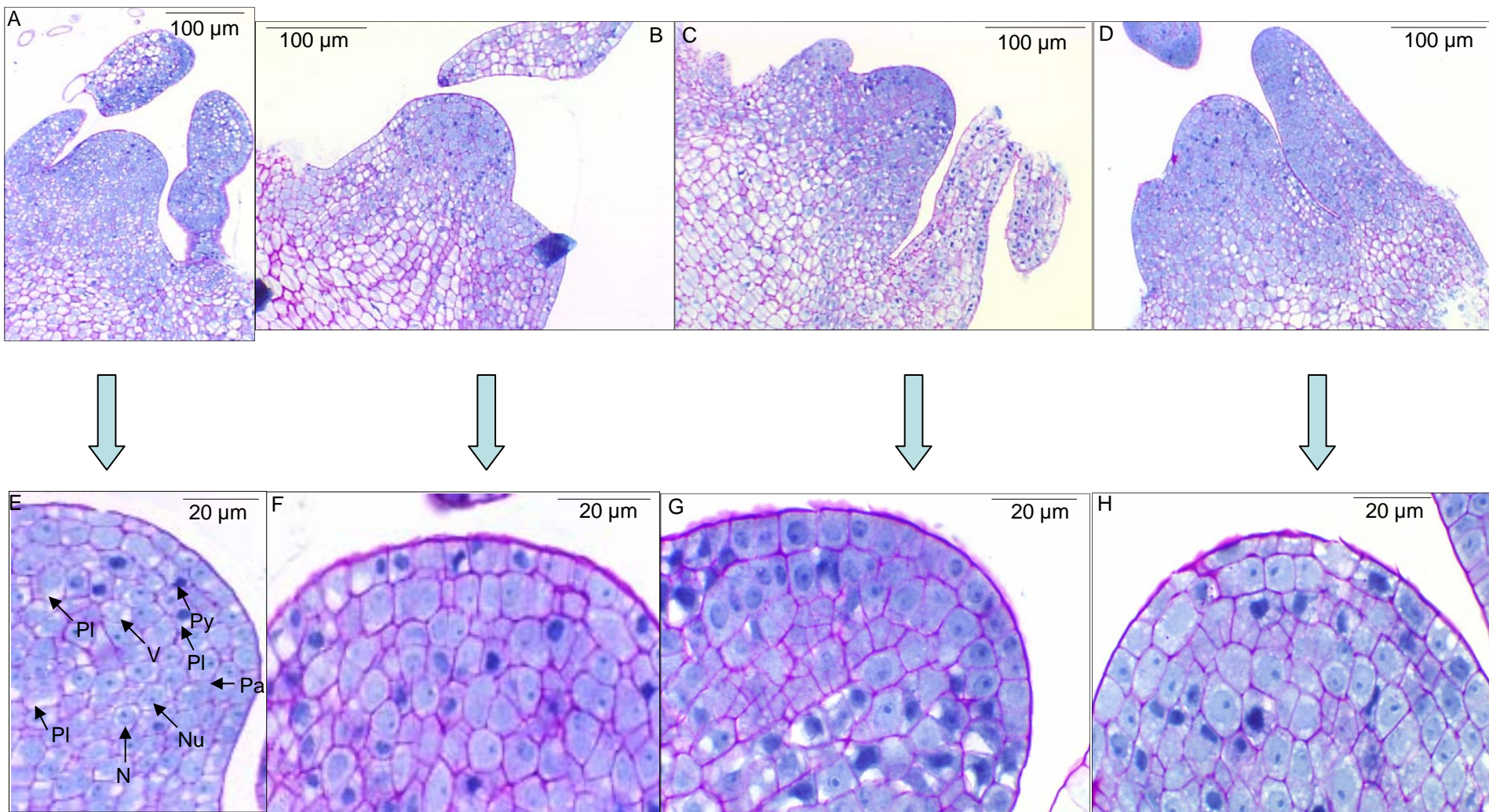


Figure 3-14. Coupes histologiques d'apex de *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' au cours des différentes étapes de la « droplet-vitrification ».

A et E: après l'étape de charge (Loading) - B et F: après 15 min dans PVS2 - C et G : à la sortie de l'azote liquide - D et H : après le réchauffement. Pa : paroi - PI : plasmolyse – Py : noyau pycnotique – N : noyau – Nu : nucléole – V : vacuole. Coloration acide périodique-Schiff et Naphtol Blue Black

Figure 3-14 B et F

Après l'immersion dans la solution de vitrification (PVS2) aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'apex ou de la structure cellulaire par rapport à l'immersion dans LS. La plasmolyse des cellules ne semble pas plus importante qu'à l'étape précédente.

Figure 3-14 C et G

A la sortie du traitement dans l'azote liquide, la structure générale de l'apex demeure inchangée. Cependant, quelques cellules à l'intérieur du dôme méristématique possèdent un noyau fortement marqué par le Naphthol Blue Black et une vacuolisation plus importante traduisant des changements de l'activité métabolique.

Figure 3-14 D et H

Au bout des 15 minutes dans la solution de réchauffement, les cellules apicales présentent les mêmes caractéristiques que celles des cellules à la fin du traitement dans la solution de charge.

Au terme de cette étude, il apparaît que l'encapsulation-déshydratation engendre plus de modifications que la « droplet-vitrification » aussi bien au niveau du méristème que des cellules. Notamment, il n'a jamais été observé pour cette dernière méthode des différences de comportement liées à la cryoconservation pour un même type cellulaire. De plus la structure interne des cellules méristématiques au cours de la « droplet-vitrification » change peu en comparaison de celles d'un apex non cryoconservé. Par conséquent, il est probable que les modifications cellulaires observées entre les méthodes ont une influence sur la survie des apex traités.

3.3.2. Etude de l'impact de LS et PVS2 sur les apex en microscopie en temps réel (RTM).

Pour cette partie, les films correspondant aux figures se trouvent sur le compact disque joint à la thèse.

3.3.2.1. Observation de coupes d'apex avant la cryoconservation

Dans les trois exemples présentés sur la figure 3-15, les apex apparaissent bleutés avec des cellules dont le cytoplasme possède un aspect granuleux et brillant. De plus, à fort grossissement il est possible de distinguer les parois et la membrane plasmique de certaines cellules ainsi que le noyau (figure 3-15 E). Les mitochondries sont parfois visibles, elles forment des petits amas très agités, brillants et nébuleux.

Le film A d'une durée réelle de 30 secondes montre qu'il existe des éléments doués de mobilité à l'intérieur des cellules méristématiques. Ces éléments ont été observés systématiquement sur toutes les coupes d'apex, ils se localisent à l'intérieur des vacuoles (figure 3-16). En raison de la forte réfringence de ces éléments, il est probable que ces structures possèdent une membrane.

Le film B (30 secondes), correspondant à la figure 3-16, montre bien les mouvements de ces structures à l'intérieur des vacuoles. Pour faciliter leur dénomination ces éléments ont été appelés par l'acronyme O.N.I.I.V pour « Objet Non Identifié Intra Vacuolaire ».

Nos observations ont mis en évidence que les O.N.I.I.V sont beaucoup plus nombreux dans les cellules méristématiques que dans les cellules plus différenciées. En effet, le film C correspondant à une acquisition de 1 minute dans une zone sous méristématique ne montre pas de mouvement dans les vacuoles.

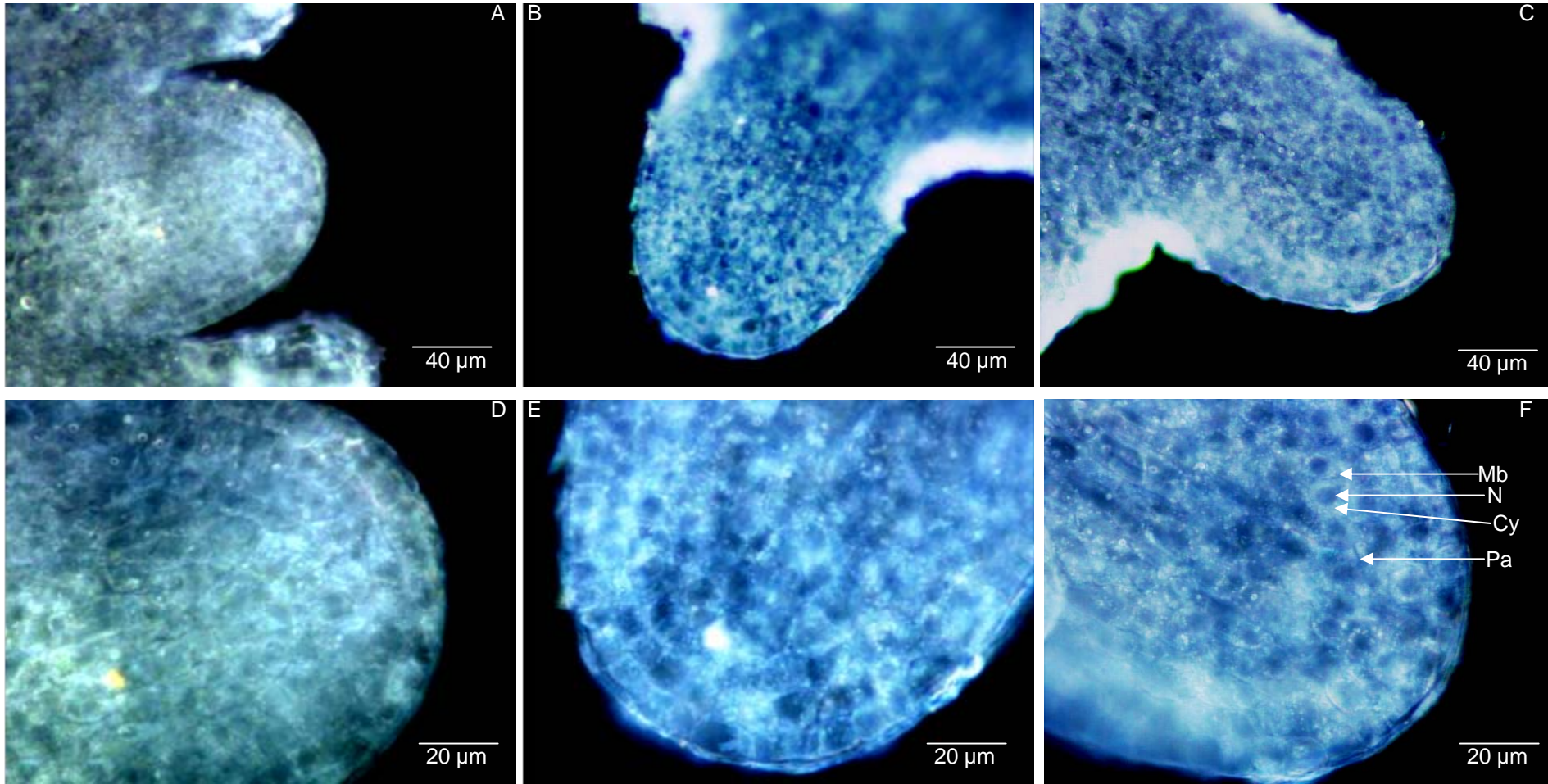


Figure 3-15. Coupes de 30 µm réalisées, au vibratome, d'apex de *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' visualisées au RTM

A,B,C, grossissement x100 et D,E,F, grossissement x400. Cy: cytoplasme – Mb : membrane plasmique – N : noyau – Pa : paroi

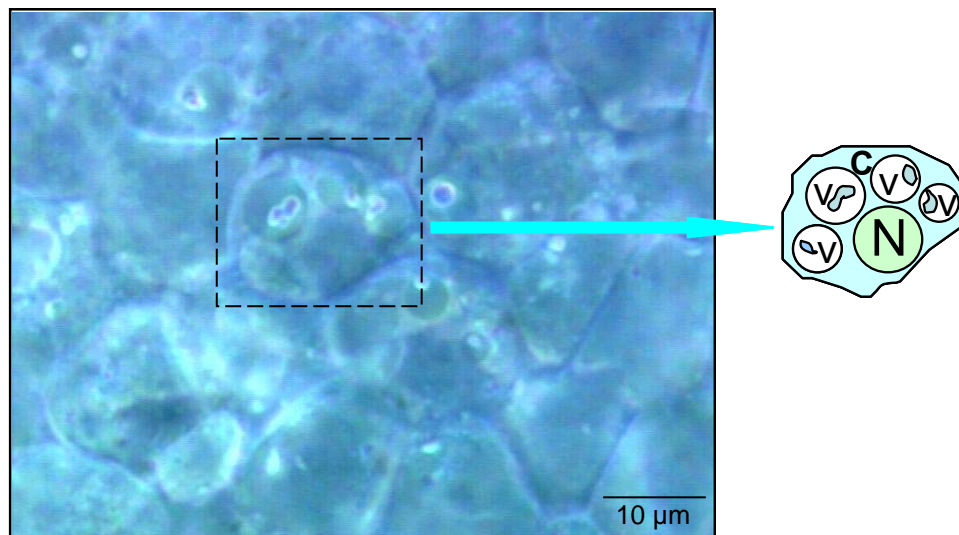


Figure 3-16. Cellules méristématiques observées en RTM – Détail d'une cellule avec schéma correspondant. N : noyau – V : vacuole – C : cytoplasme. Les éléments bleus à l'intérieur des vacuoles correspondent aux O.N.I.I.V.

La présence d'un cytoplasme dense dans les cellules, d'une quantité importante de parois et de membranes dans les zones méristématiques, augmente la réfringence et la brillance des coupes observées en RTM rendant parfois difficile l'observation du milieu intracellulaire. Au contraire dans les zones où les cellules sont bien différenciées et de grande taille, les différents éléments constitutifs des cellules sont facilement distinguables (figure 3-17 A et B).

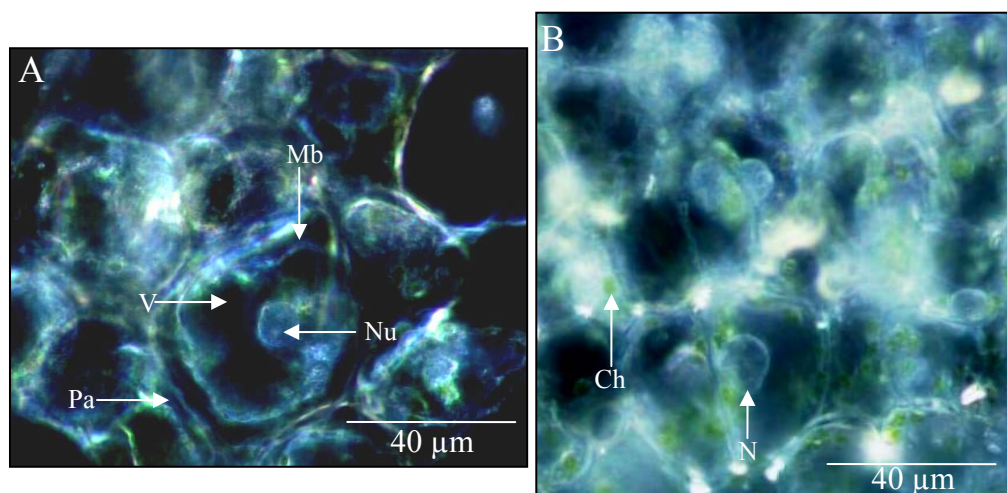


Figure 3-17. A et B : cellules différenciées de la zones sous méristématiques- N : noyau – Nu : nucléole – V : vacuole – Ch : chloroplaste – Mb : membrane – Pa : paroi.

3.3.2.2. Observation de coupes d'apex lors du traitement avec LS

Plusieurs remarques peuvent être faites. Il n'a pas été possible de visualiser la plasmolyse des cellules méristématiques au cours de l'injection de LS. La densité cellulaire est en effet trop importante pour bien distinguer la structure interne de la cellule. Aucune déformation significative du dôme notamment

l'apparition d'ondulations n'a été constatée pendant toute la durée du traitement dans LS (figure 3-18) ni variation de surface (figure 3-19). Enfin, LS n'a pas d'impact sur les O.N.I.I.V, leur mobilité n'a pas été altérée par le traitement dans LS (film D, durée réelle 1 heure).

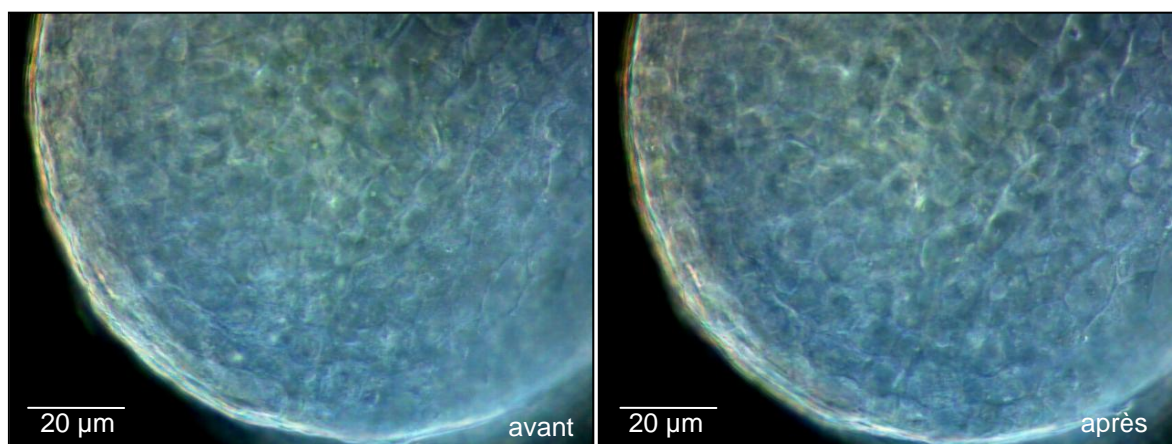


Figure 3-18. Vues d'une coupe de méristème avant l'injection de LS et au bout d'une heure d'immersion dans LS.

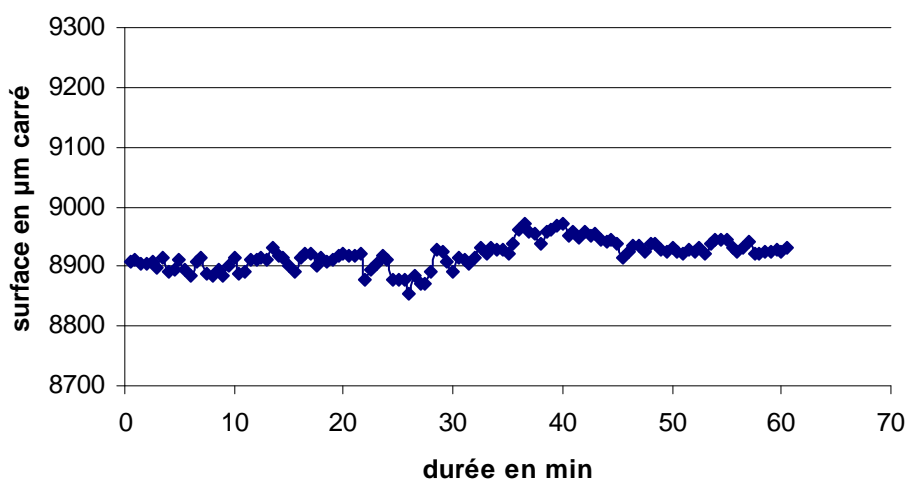


Figure 3-19. Evolution de la surface de la coupe d'un méristème pendant une immersion d'une heure dans LS.

Contrairement aux cellules méristématiques, une plasmolyse importante a pu être observée sous l'effet de LS, dans certaines cellules différenciées sous méristématiques. La sortie d'eau provoquée par la pénétration de LS dans le tissu a engendré une forte contraction de la cellule sur elle-même (figure 3-20).

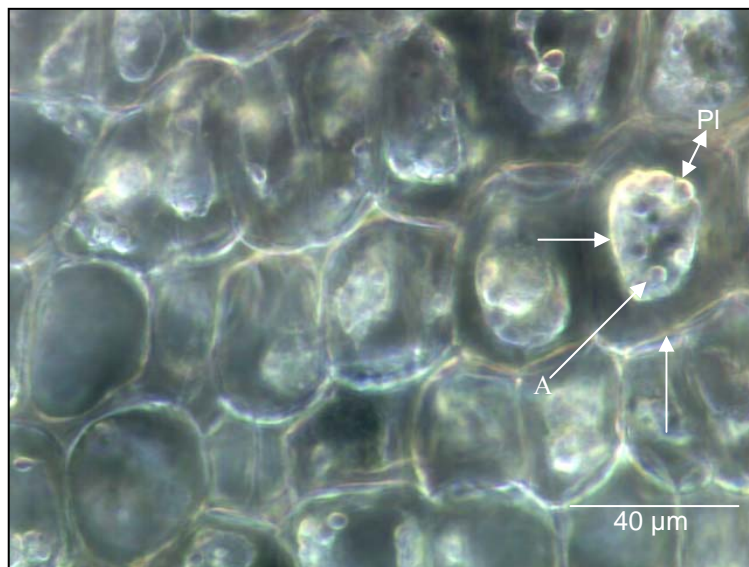


Figure 3-20. Cellules différenciées sous méristématiques après l’immersion dans LS
A : grain d’amidon - Mb : membrane - Pa : paroi – Pl : plasmolyse

3.3.2.3. Observation de coupes d’apex lors du traitement avec PVS2 sans traitement préalable avec LS

Nos observations sur trois coupes d’apex différents montrent que PVS2 a une action rapide et violente sur la structure de l’apex puisque une forte contraction du dôme a pu être systématiquement visualisée (figures 3-21 et 3-22) et quantifiée pour deux coupes (figure 3-23). PVS2 provoque la rétraction des tissus sur eux-mêmes en agissant sur les parois dès que cette solution entre en contact avec les coupes (film E, durée réelle 30 secondes). En revanche, cette méthode ne permet pas d’observer ce qui se passe au niveau des membranes.

Il est à noter que suite au traitement dans PVS2 les « O.N.I.I.V » changent de forme pour prendre un aspect sphérique, avant de s’arrêter de bouger (film F, durée réelle 40 min).

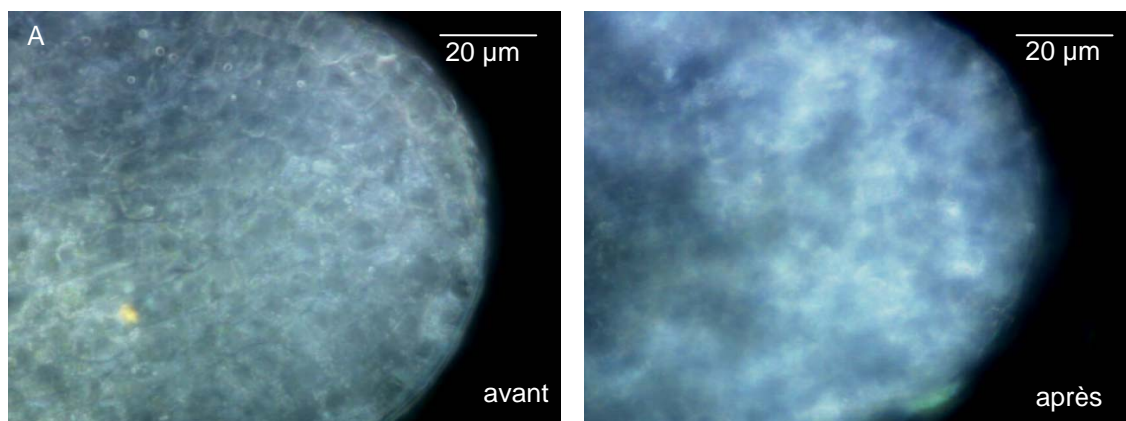


Figure 3-21. Vues d’une coupe de méristème avant et après l’injection de PVS2. **Apex A**

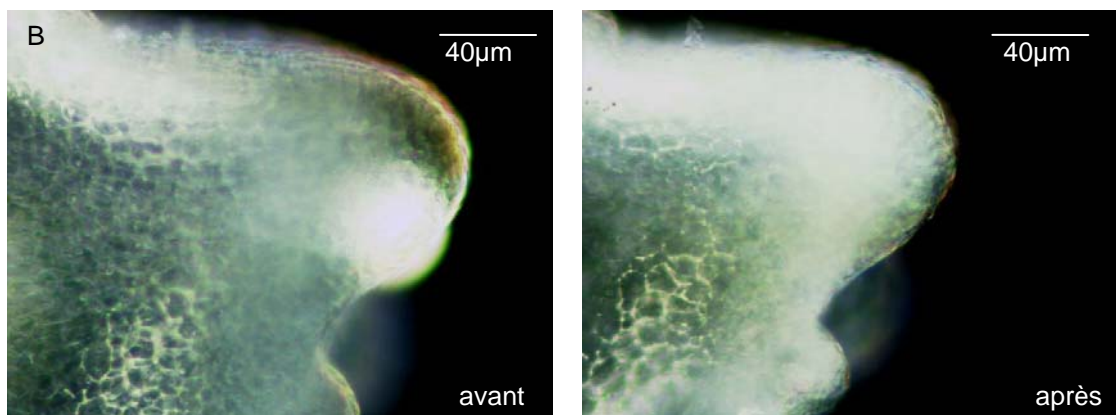


Figure 3-22. Vues d'une coupe de méristème avant et après l'injection de PVS2. **Apex B**

Dès l'entrée en contact de PVS2 avec les apex, on assiste à une contraction très rapide des durant entre de 2 et 4 secondes suivie soit d'une stabilisation de la surface de la coupe, soit d'une décroissance lente (figures 3-23). Par exemple, la vitesse de rétraction pour l'apex A peut être estimée à $112 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour au final aboutir à une contraction de la coupe d'environ 8%.

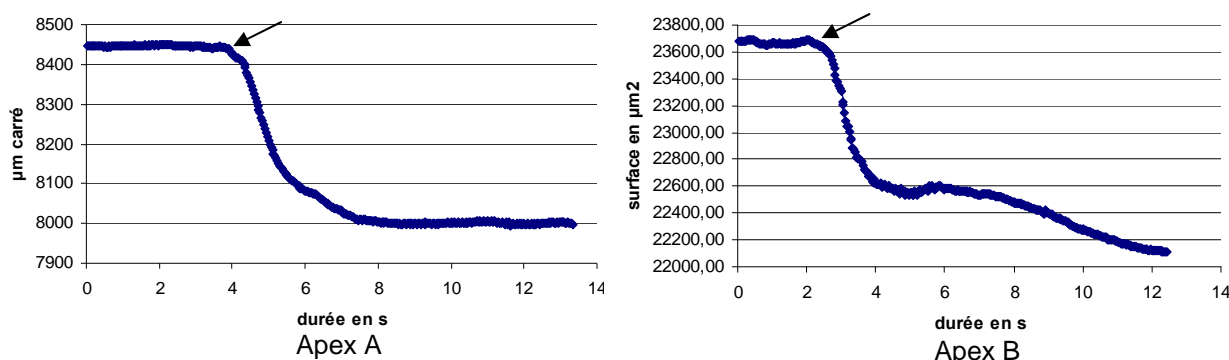


Figure 3-23. Evolution de la surface des coupes de méristème pendant l'injection de PVS2. La flèche indique le moment où PVS2 est entré en contact avec les coupes.

3.3.2.4. Observation de coupes d'apex lors du traitement avec PVS2 suivant un traitement avec LS.

Par opposition au cas précédent, les déformations du dôme sont moins importantes (figure 3-24). De plus la rétraction due à PVS2 en présence de LS est beaucoup plus progressive contrairement aux observations faites lors de l'injection directe de PVS2 seul (figure 3-25). Ainsi la vitesse de rétraction estimée est de $16 \mu\text{m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$, soit une contraction de la coupe d'environ de 3,5% en 15 min. Par comparaison, avec l'apex A, la rétraction est beaucoup plus lente. Il semblerait que LS ralentisse l'action de PVS2 sur les parois et par voie de conséquence sur le reste du contenu cellulaire. Nous avons aussi observé que dans ces conditions, les mouvements des « O.N.I.I.V » ne semblent pas affectés (film G, durée réelle 15min.).

NB : Il n'a pas été possible de comparer les retractions de l'apex B et de l'apex C étant donné qu'elles n'ont pas été observées avec le même objectif.

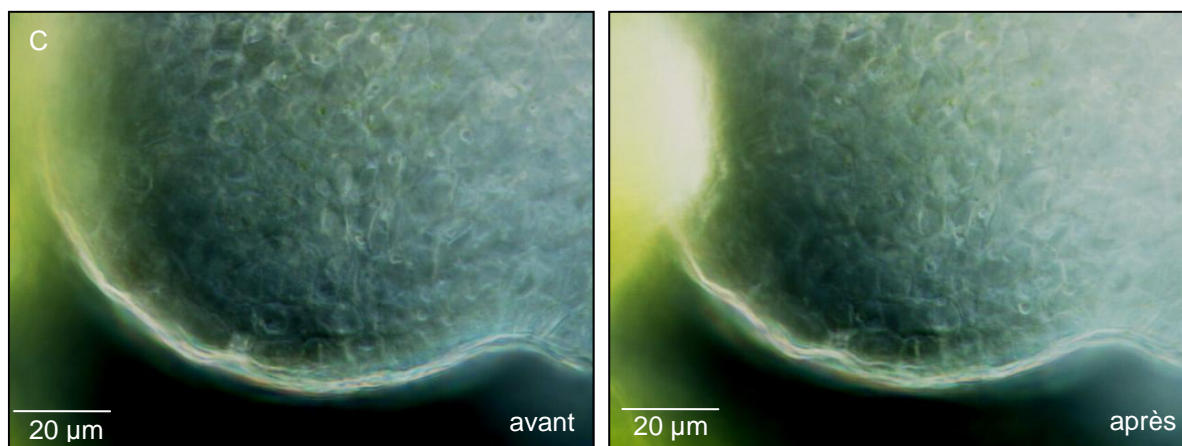


Figure 3-24. Vues d'une coupe de méristème avant et après l'injection de PVS2 suite au traitement par LS.

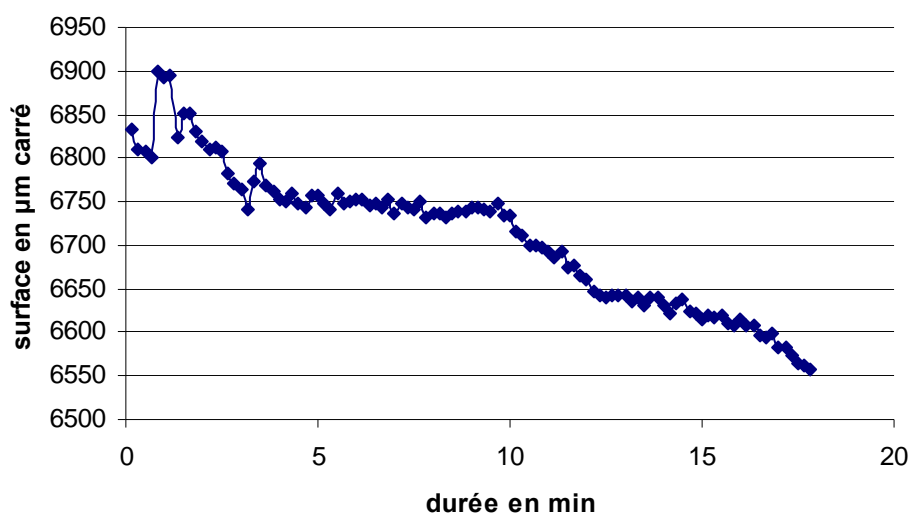


Figure 3-25. Evolution de la surface de la coupe d'un méristème suite à l'injection de PVS2 après avoir été immergé 20 min dans LS.

A partir des résultats obtenus grâce à la RTM plusieurs remarques peuvent être faites. La préparation des coupes, telle que nous l'avons faite, n'altère pas les cellules des couches internes des coupes. L'observation de la structure des cellules s'avère possible pour les cellules de grande taille. En revanche la visualisation de l'intérieur des cellules méristématiques est rendue difficile par la forte densité cellulaire. Toutefois sur certaines coupes, nous avons détecté dans les vacuoles des cellules méristématiques des éléments (O.N.I.I.V) qui jusqu'à présent n'ont jamais été observés par d'autres systèmes microscopiques. Enfin les films réalisés grâce à la RTM ont permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle spécifique des solutions de cryoconservation utilisées lors de la « droplet-vitrification » sur les cellules méristématiques et les apex. Les observations ont ainsi montré le rôle conjoint de LS et PVS2 sur le maintien de la structure des apex.

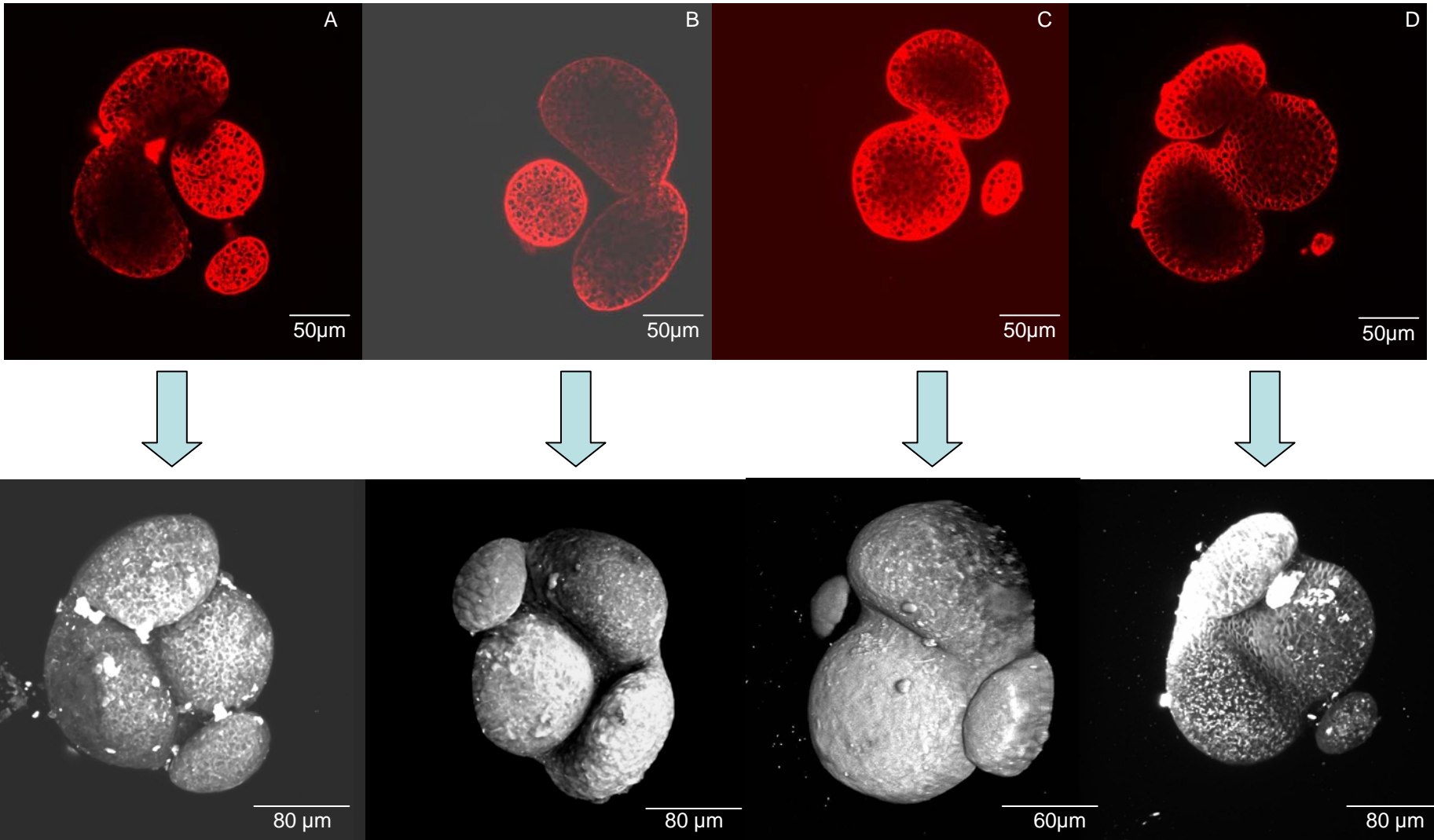


Figure 3-26. Exemples de coupes optiques d'apex marqués avec le fluorochrome FM4-64 et leur reconstruction tridimensionnelle.

3.3.3. Etude de l'impact de LS et PVS2 sur les apex par microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

3.3.3.1. Remarques sur le marquage des membranes et sur le signal émis lors de l'acquisition des images

Après avoir été immergés pendant 4h dans une solution de FM 4-64 à 12,5 μM , les apex présentent un marquage spécifique des membranes plasmiques. Notamment, nous n'avons pas observé de marquage du tonoplaste ni des membranes des organites ou des vésicules. Néanmoins, bien que le marquage soit spécifique, il est toujours plus intense au niveau du méristème qu'au niveau des primordia. En outre, plus l'épaisseur du tissu est importante, plus le signal détecté sera faible (figure 3-26 et 3-27A). Toutefois, la très bonne pénétration du fluorochrome dans les tissus et sa bonne résistance au « photobleaching » a permis de faire des acquisitions d'image sur une épaisseur d'environ 100 μm , à plusieurs reprises, sur un même apex. A partir des images ainsi obtenues, il a été possible de générer des représentations tridimensionnelles des apex.

3.3.3.2. Observation d'apex avant la cryoconservation

La figure 3-26 montre pour quatre apex, un exemple de coupe optique et la représentation tridimensionnelle de l'apex correspondant. Plus précisément sur la figure 3-27, il est possible de distinguer les différents primordia et le méristème, ce dernier formant un dôme sphérique. De plus, les différences de taille des primordia indiquent leur ordre d'apparition et donc la phyllotaxie (du plus ancien n°1 au plus jeune n°3). Enfin, il est possible de distinguer notamment sur le primordium n°3 de la figure 3-27B, des cellules de l'épiderme en forme de « coussin ».

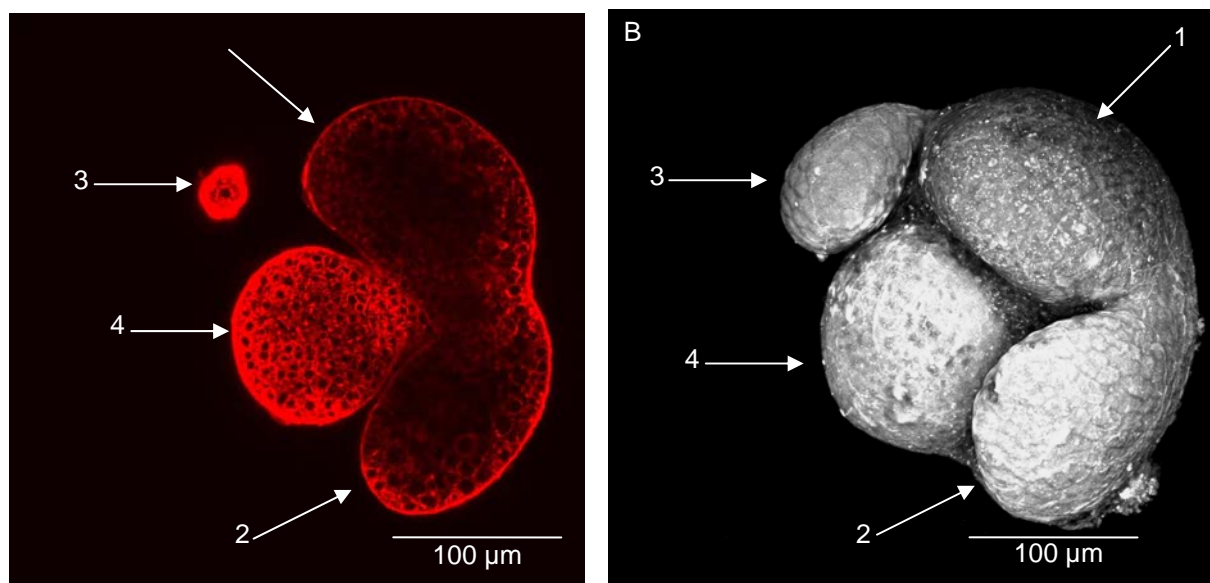


Figure 3-27. A : coupe optique d'un apex – B : représentation tridimensionnelle de l'apex
1 : primordium n°1 - 2 : primordium n°2 - 3 : primordium n°3 – 4 : dôme méristématique

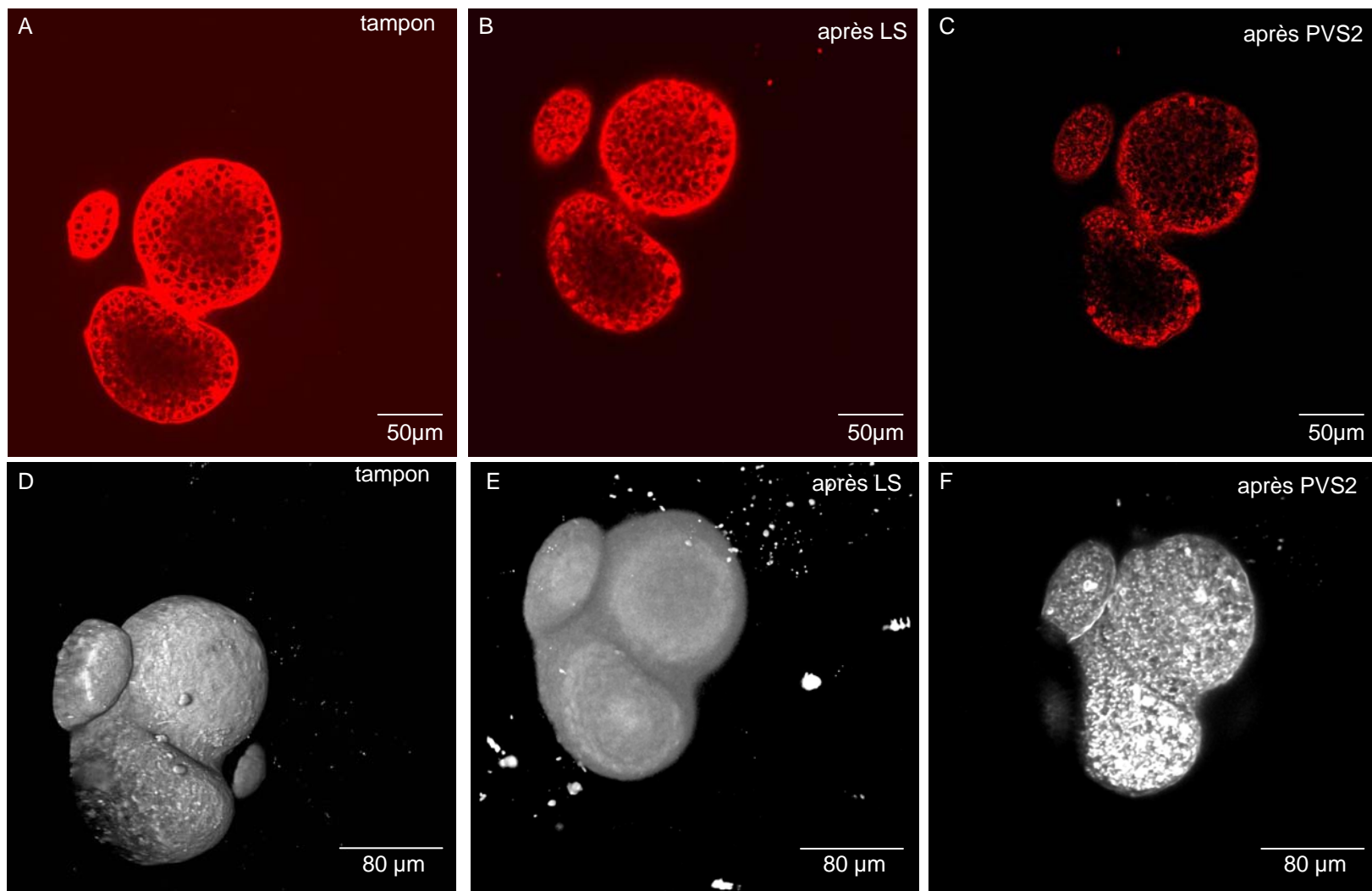


Figure 3-28. A, B et C coupe optique d'un apex dans le tampon, dans LS et dans PVS2 après l'immersion dans LS
 D, E et F représentation tridimensionnelle du même apex dans le tampon , dans LS et dans PVS2 après l'immersion dans LS

3.3.3.3. Observation d'un apex suite au traitement avec LS et PVS2

A partir de la figure 3-28, il a été possible de suivre l'évolution de la structure de l'apex au cours du procédé de cryoconservation par « droplet-vitrification » et plus particulièrement suite à l'immersion dans LS puis dans PVS2. Il faut noter qu'en présence des solutions de cryoprotection, la fluorescence détectée par le laser est, soit plus diffuse, soit plus atténuée mais que les observations demeurent possibles. Plusieurs remarques peuvent être faites, aucun changement significatif de la forme du méristème et des primordia n'est visible suite au traitement dans LS puis dans PVS2. En revanche l'estimation du volume du dôme au cours de ces étapes montre une diminution de celui-ci d'environ 15 points après LS puis encore 5 points après PVS2 soit une réduction du volume total d'environ 20 points (figure 3-29), probablement due à la déshydratation provoquée par les solutions de cryoprotection. Les mêmes observations ont été faites sur d'autres apex mais sans pouvoir estimer la contraction du volume en raison de la présence de débris ou d'une qualité d'image insuffisante.

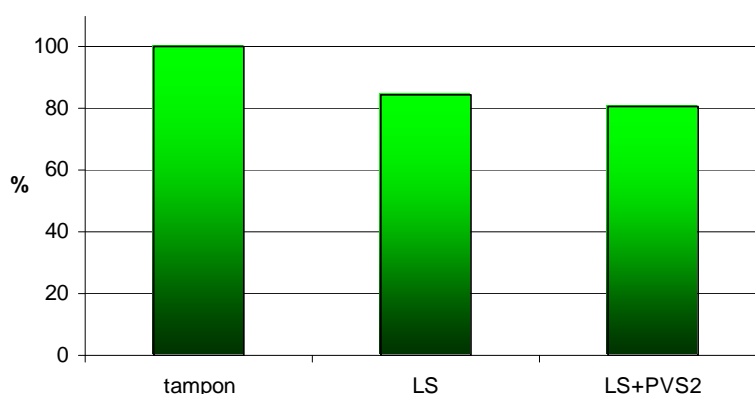


Figure 3-29. Evolution du volume d'un apex en pourcentage au cours des traitements dans LS et PVS2

3.3.3.4. Observation d'un apex suite au traitement avec PVS2 uniquement

Suite à l'immersion pendant 15 minutes d'un apex dans PVS2, des changements importants dans la forme générale de l'apex sont observés (figure 3-30). Les différentes parties de l'apex se rétractent, des sillons d'effondrement des cellules, des replis à la surface des primordia et du méristème apparaissent sur la face externe des primordia. La contraction du volume pour cet apex a été estimée à environ 10 points par rapport au volume initial (figure 3-31). Les mêmes observations ont été faites sur d'autres apex mais sans pouvoir estimer la contraction de volume.

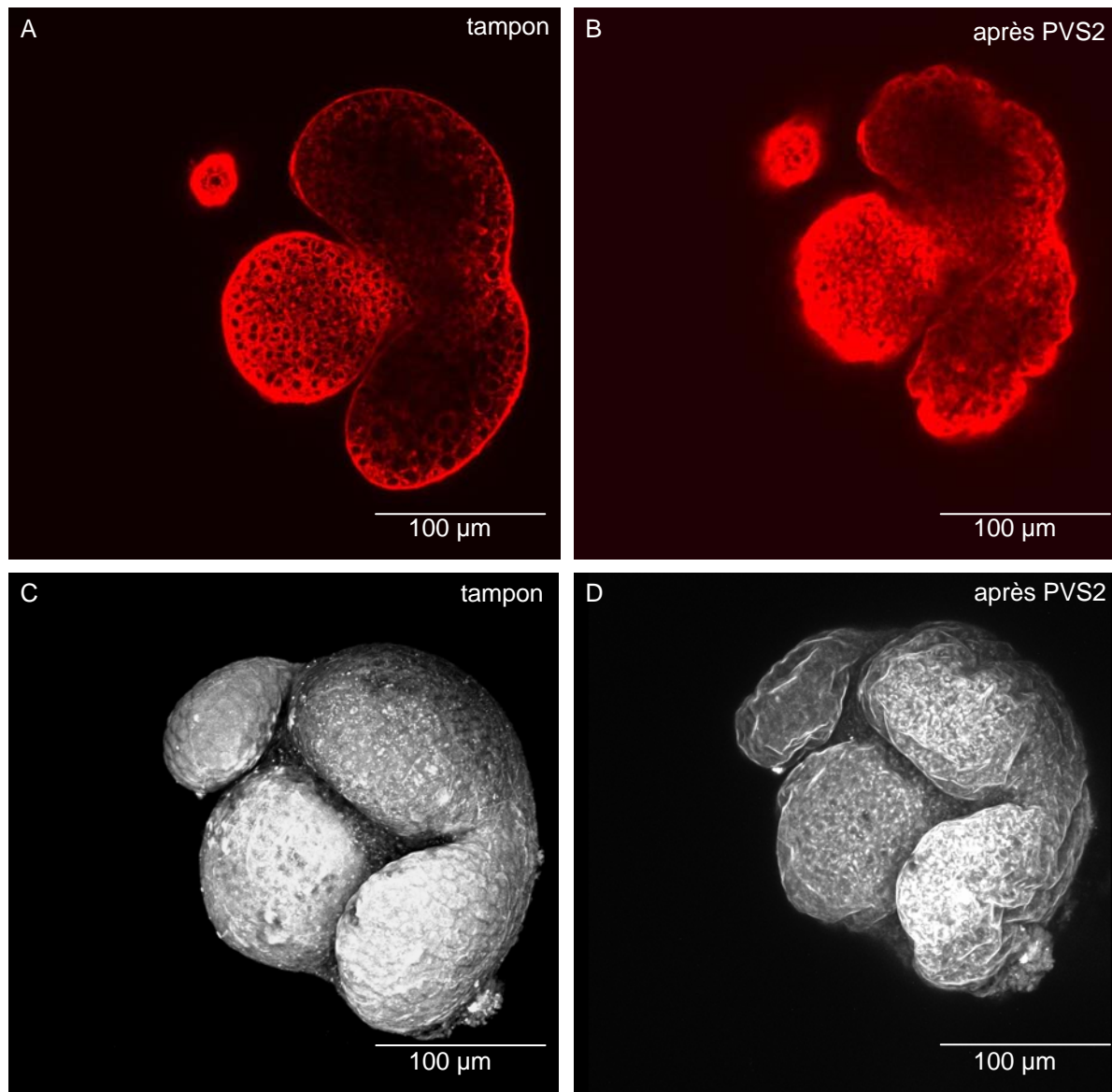


Figure 3-30. A et B coupe optique d'un apex dans le tampon puis dans la solution PVS2
C et D représentation tridimensionnelle du même apex dans le tampon et la solution PVS2

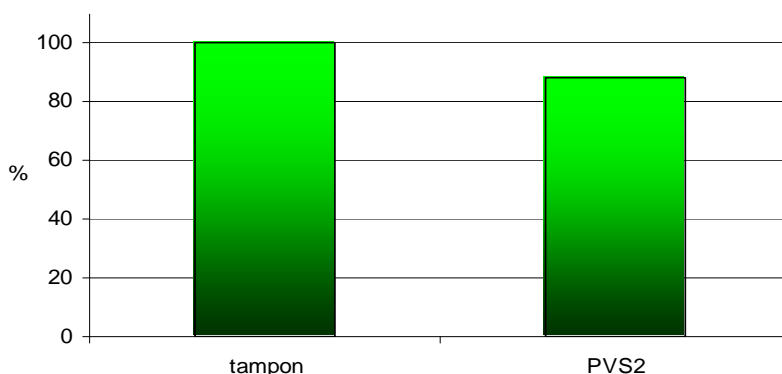


Figure 3-31. Evolution du volume d'un apex en pourcentage suite au traitement dans PVS2

Plus précisément, le suivi de l'évolution de la surface des coupes montre que la contraction due à l'action de PVS2 est plus forte au niveau de la base de l'apex, là où les cellules sont plus différenciées qu'au niveau du sommet du dôme méristématique (figure 3-32).

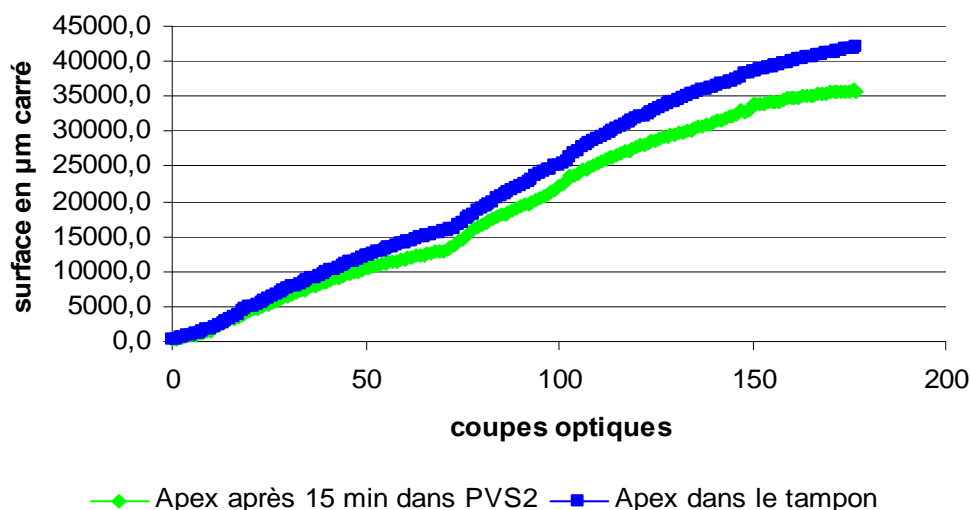


Figure 3-32. Evolution de la surface des coupes optiques en fonction de la profondeur dans l'apex (du sommet de l'apex à sa base)

L'utilisation de la CLSM a permis de créer des représentations tridimensionnelles des apex extrêmement proche de la réalité avec des images ressemblant à celles qui pourraient être obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB). Contrairement au MEB où l'échantillon est observé dans un état donné, avec la CLSM il est possible de suivre les évolutions d'une structure au cours d'un processus donné. Par ce système non destructif, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois des changements notables de la forme générale de l'apex au cours des différentes étapes. Les résultats obtenus avec la CLSM confirment ceux obtenus par la RTM, notamment sur le fait que PVS2 provoque une rétraction de l'apex sur lui-même. Mais aussi que l'immersion des apex dans LS puis dans PVS2 permet de limiter des déformations importantes de l'apex durant la « gouttelet-vitrification » tout en ayant une diminution du volume.

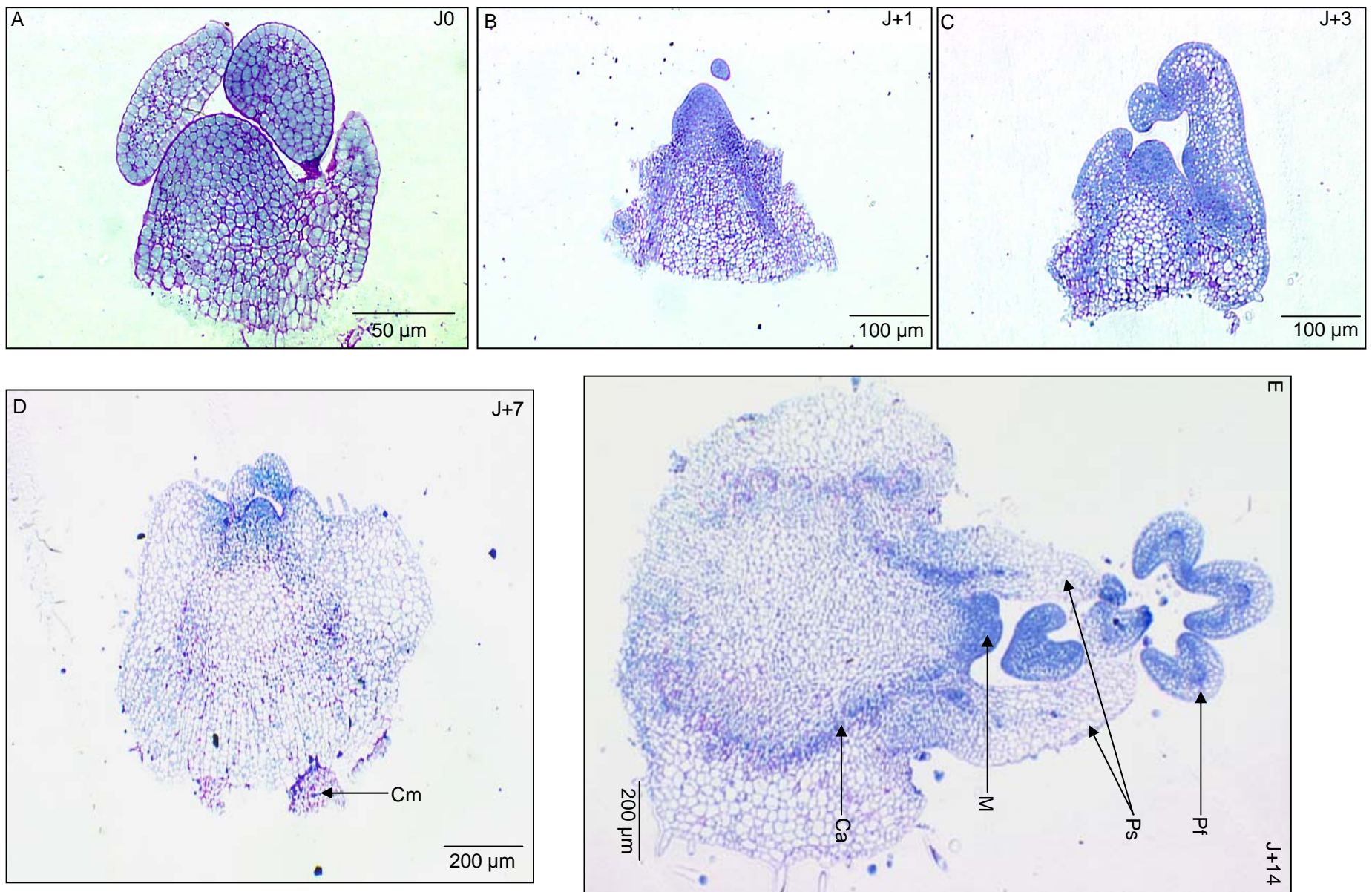


Figure 3-33. Cinétique de croissance d'apex *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' non cryoconservés. Ca : cambium
 Cm : cellules mortes – M : méristème – Pf : primordium foliaire – Ps : primordium stipulaire

3.3.4. Effet de la « droplet-vitrification » sur la reprise de croissance des apex

3.3.4.1. Reprise de croissance pour les apex non cryoconservés (témoins)

L'évolution des apex présente de grandes similarités pour les deux cultivars (Balcon Lilas et Panaché). Lors du prélèvement c'est-à-dire à J0 (figure 3-33A et figure 3-34A), les apex présentent une structure identique à celle décrite au point 3.3.1.1.

A J+1, aucune différence significative n'a été observée par rapport J0 (figure 3-33B et figure 3-34B).

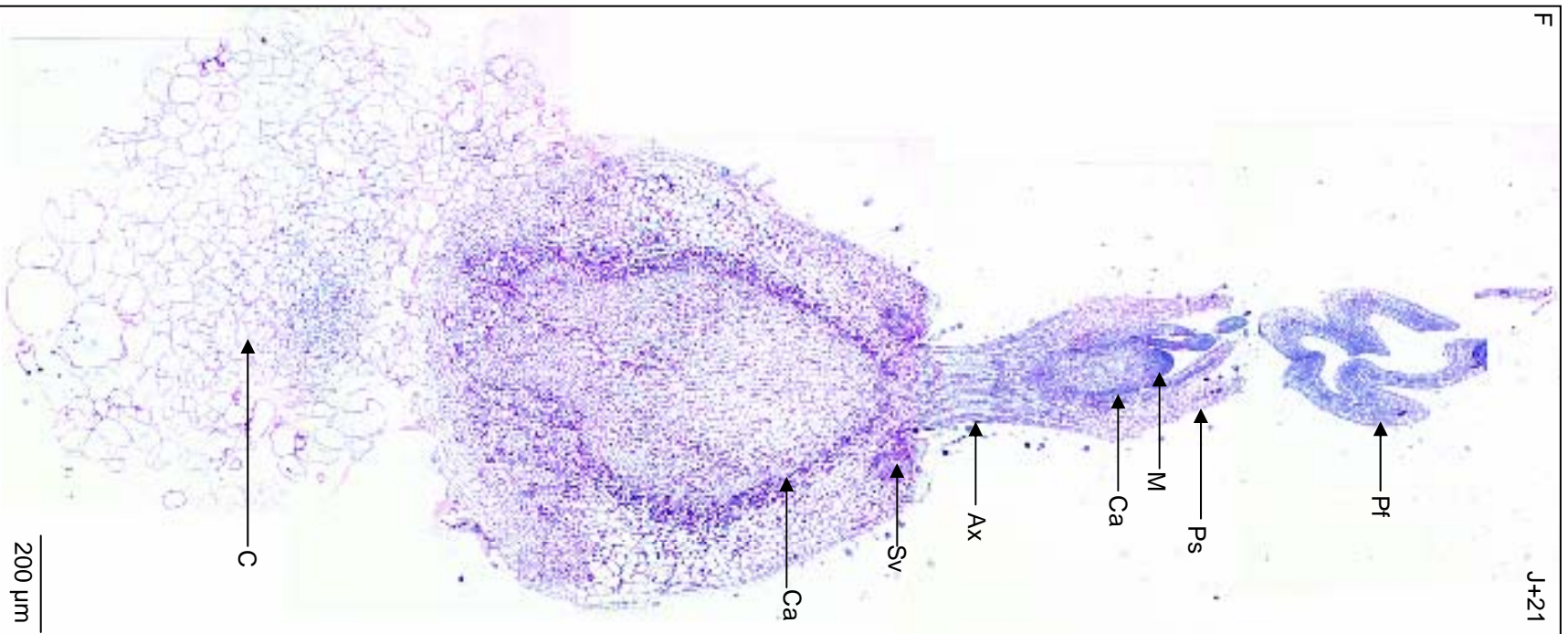
A J+3, les apex présentent sensiblement le même aspect que précédemment, avec toutefois une augmentation notable de la taille de la zone sous méristématique. Cette observation a été faite à de nombreuses reprises au cours des différentes expériences de régénération *in vitro*. Pour le cultivar Balcon Lilas, l'augmentation de volume est plus importante trois jours après la mise en culture que pour le cultivar Panaché traduisant probablement des vitesses de croissance différentes (figure 3-33C et figure 3-34C).

Sept jours après la mise en culture, la taille des apex a fortement augmenté, notamment pour 'Balcon Lilas'. Les axes de division cellulaire sont bien visibles au niveau de la zone sous méristématique. La différenciation cellulaire est de plus en plus visible dans la future zone cambiale où l'activité cellulaire est plus importante. En revanche le méristème présente toujours les mêmes caractéristiques. Au niveau de la zone d'excision, souvent se trouve des amas de cellules mortes aux parois fortement colorées vraisemblablement endommagées lors du prélèvement de l'apex (figure 3-33D et figure 3-34D).

Après 14 jours de culture, la différenciation et le grandissement cellulaire ont encore augmenté, ainsi pour les exemples présentés la pousse est environ 1,5 fois plus grande chez 'Balcon Lilas' et 5 fois plus grande chez 'Panaché' qu'une semaine auparavant. Le cambium est visible chez 'Balcon Lilas'. Il est possible de distinguer les ébauches stipulaires de forme pointue à leur extrémité et aux cellules peu actives et les ébauches foliaires présentant des digitations et dont les cellules sont très actives (figure 3-33E et figure 3-34E).

Trois semaines après le prélèvement, les pousses formées ressemblent à des plantules non enracinées avec un cambium très visible, des ébauches foliaires et stipulaires bien individualisées. L'axe principal de la future plante est nettement visible chez le cultivar Balcon Lilas. De plus, le système vasculaire est visible, il forme au sein de la pousse des amas de petites cellules réparties de part et d'autre de la pousse. Enfin dans certains cas comme sur la figure 3-33 F un cal est formé sous la zone cicatricielle, il se caractérise par de petites cellules peu actives en son centre et par d'immenses cellules à sa périphérie de l'ordre de 150 µm de diamètre parfaitement observable à la loupe binoculaire (figure 3-33F et figure 3-34F).

Au cours de la régénération, la mise en place de zones très actives composées de cellules présentant les mêmes caractéristiques que les cellules méristématiques a été souvent observées. Ces amas cellulaires ou néoformations apparaissent le plus souvent en périphérie de l'apex lors de la régénération, souvent en limite d'un cal ou à l'intérieur de celui-ci. De plus à cette étape de la régénération, l'apparition de racines n'a jamais été notée. Il est probable que ces amas cellulaires peuvent produire de nouvelles pousses dont l'origine cellulaire est imprécise (figure 3-35). Ces



F

J+21

Figure 3-33 suite. Cinétique de croissance d'apex *P. x peltatum* 'Balcon Lias' non cryoconservés. J+21. Ax : axe principal – C : cal – Ca : cambium – M : mérístème – Pf : primordium foliaire – Ps : primordium stipulaire – Sv : système vasculaire

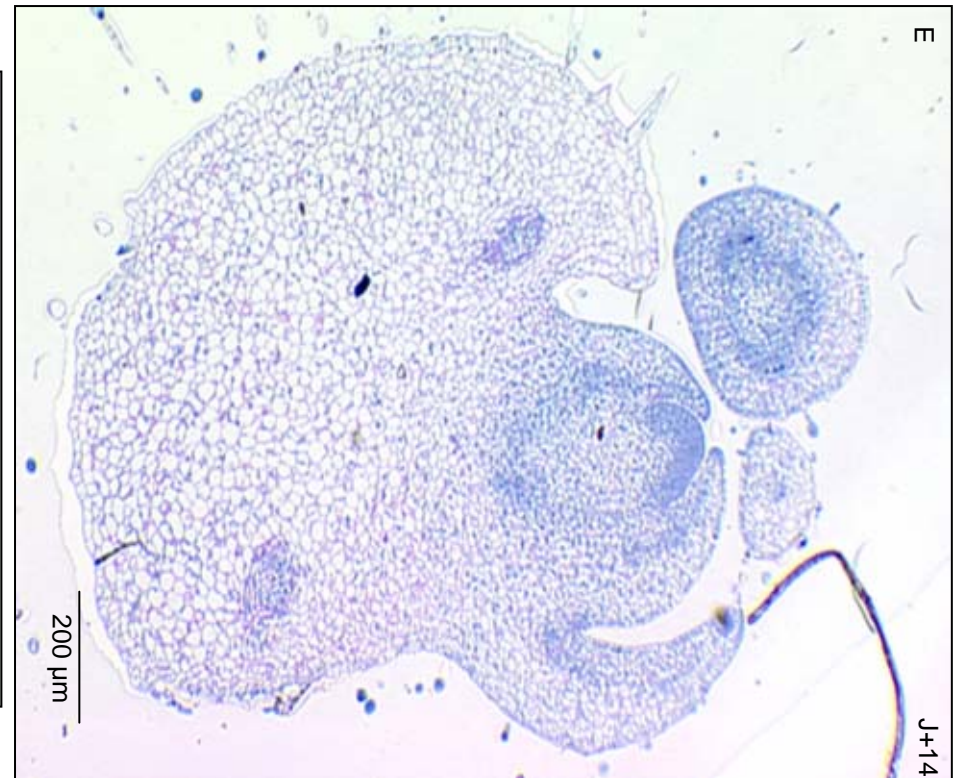
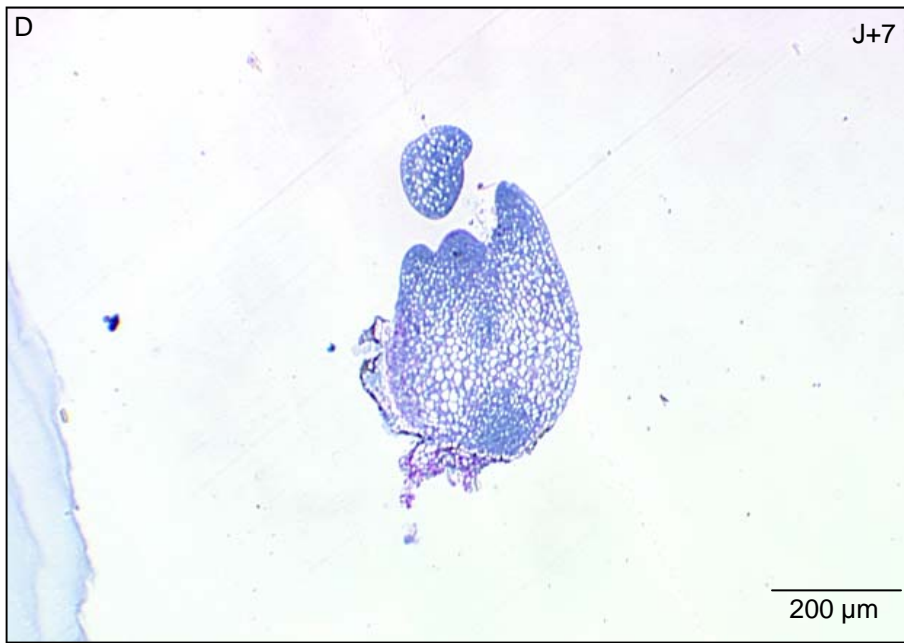
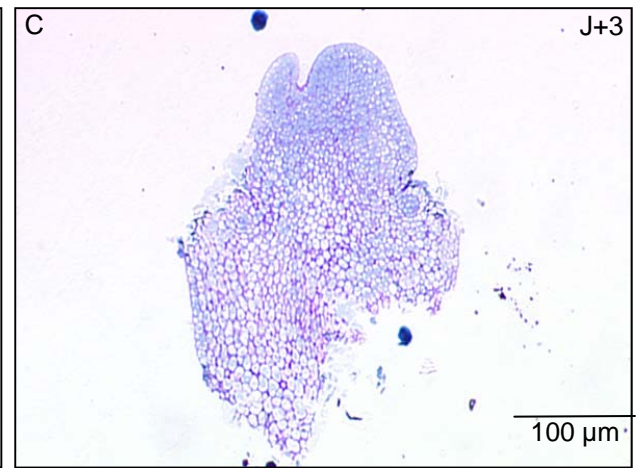
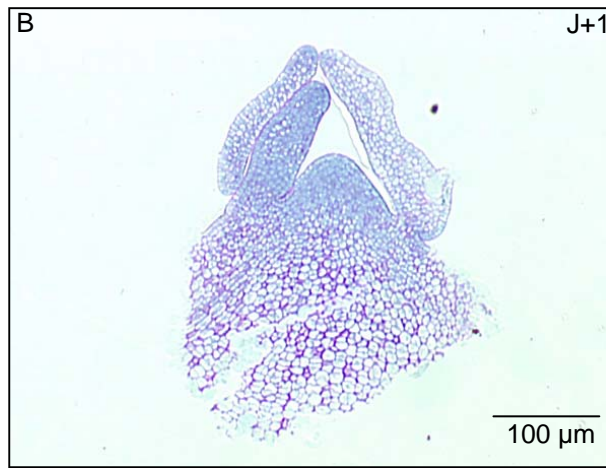
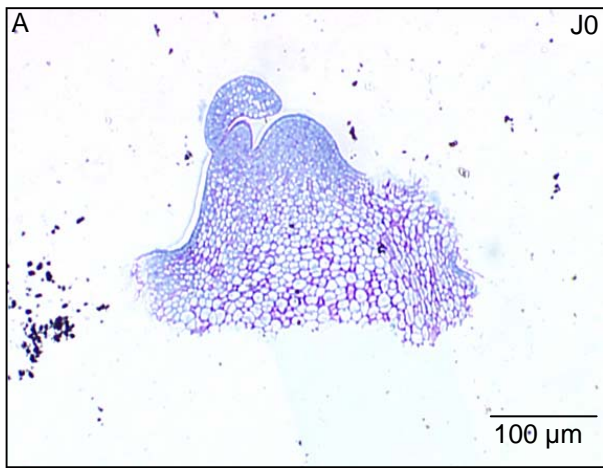


Figure 3-34. Cinétique de croissance d'apex *P. x hortorum* 'Panaché' non cryoconservés.

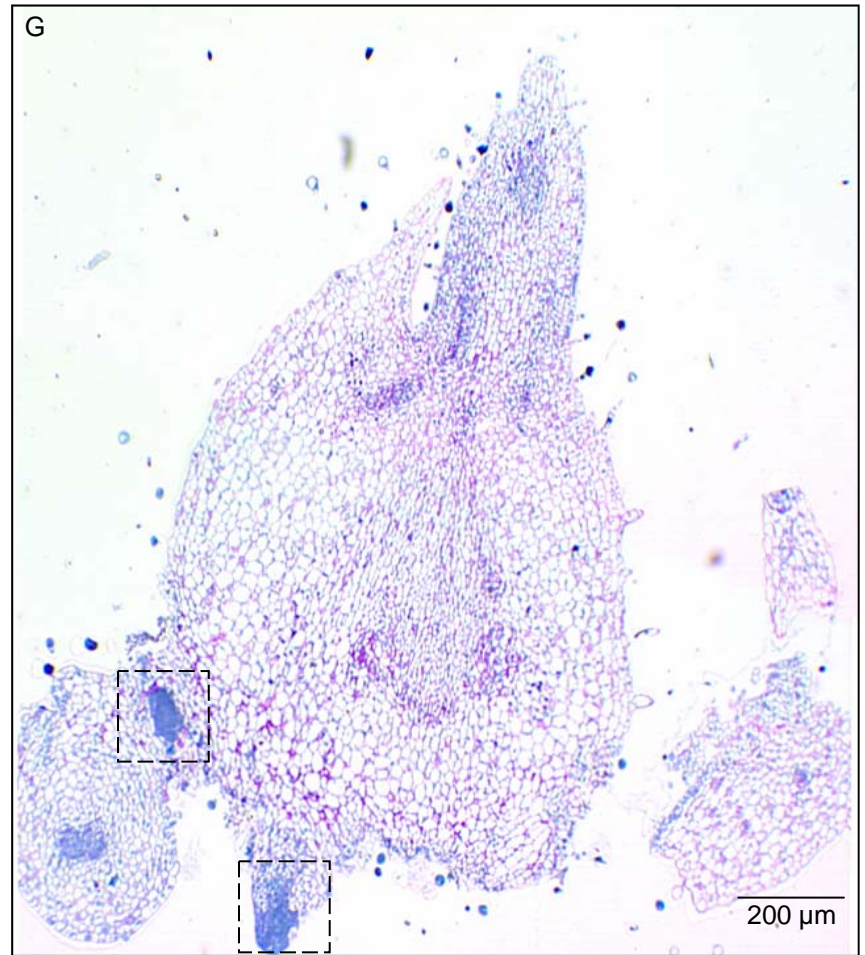
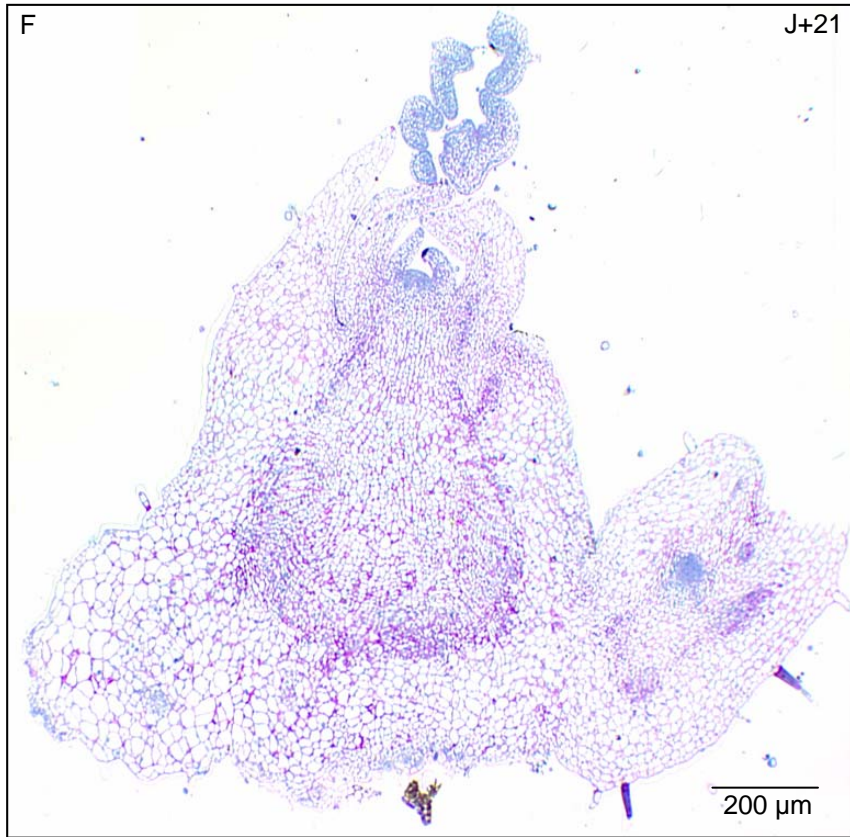


Figure 3-34 suite. Cinétique de croissance d'apex *P. x hortorum* 'Panaché' non cryoconservés. J+21. Néoformations dans les parties encadrées

néoformations sont issues d'un processus de dédifférenciation-redifférenciation, il est donc difficile de connaître le phénotype des plantes régénérées notamment pour les cultivars chimériques comme le cultivar Panaché.

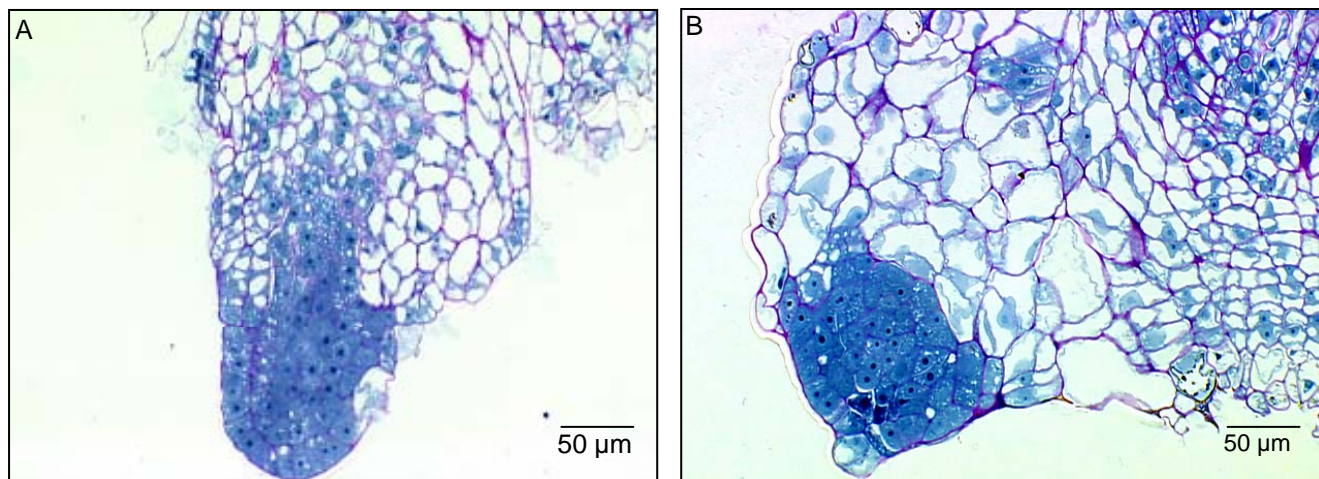


Figure 3-35. Exemples de néoformations. A - Chez le cultivar Panaché (cf figure 3-34G), B – Chez le cultivar Balcon Lilas (cf figure 3-37E).

Bien que l'évolution globale des apex soit sensiblement la même, il existe une certaine hétérogénéité des apex lors du prélèvement. Ainsi au cours de la régénération, quel que soit le cultivar, il existe des différences de vitesse croissance entre les apex. Par exemple 7 jours après la mise en culture deux apex non cryoconservés de 'Balcon Lilas' peuvent avoir des tailles très différentes. Ainsi le premier apex a une largeur d'environ 300 µm (figure 3-36A) tandis que pour le deuxième elle est d'environ 700 µm (figure 3-36B).

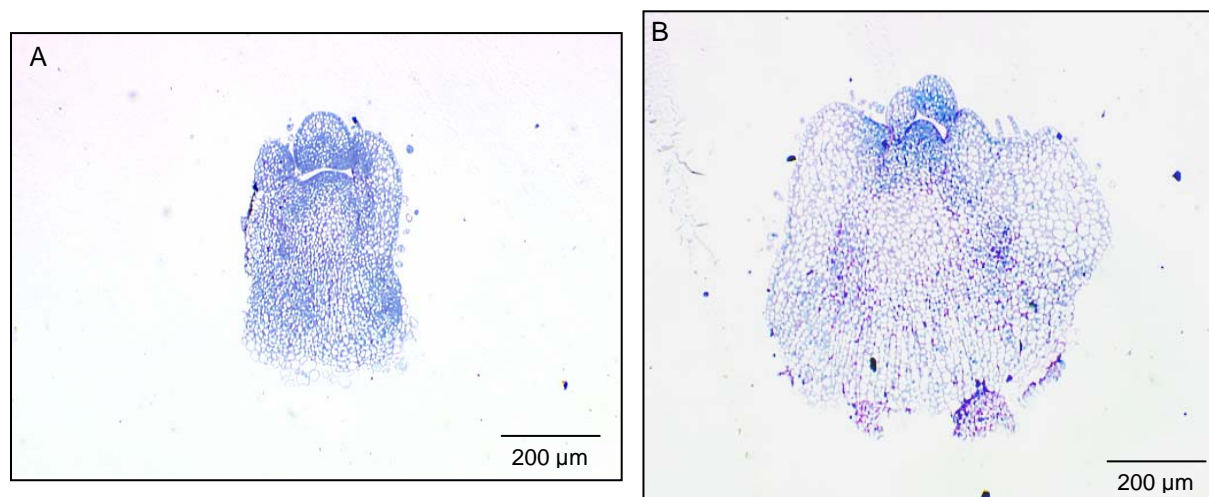


Figure 3-36. Variabilité de taille d'apex non cryoconservés du cultivar 'Balcon Lilas' au bout de 7 jours de culture *in vitro*.

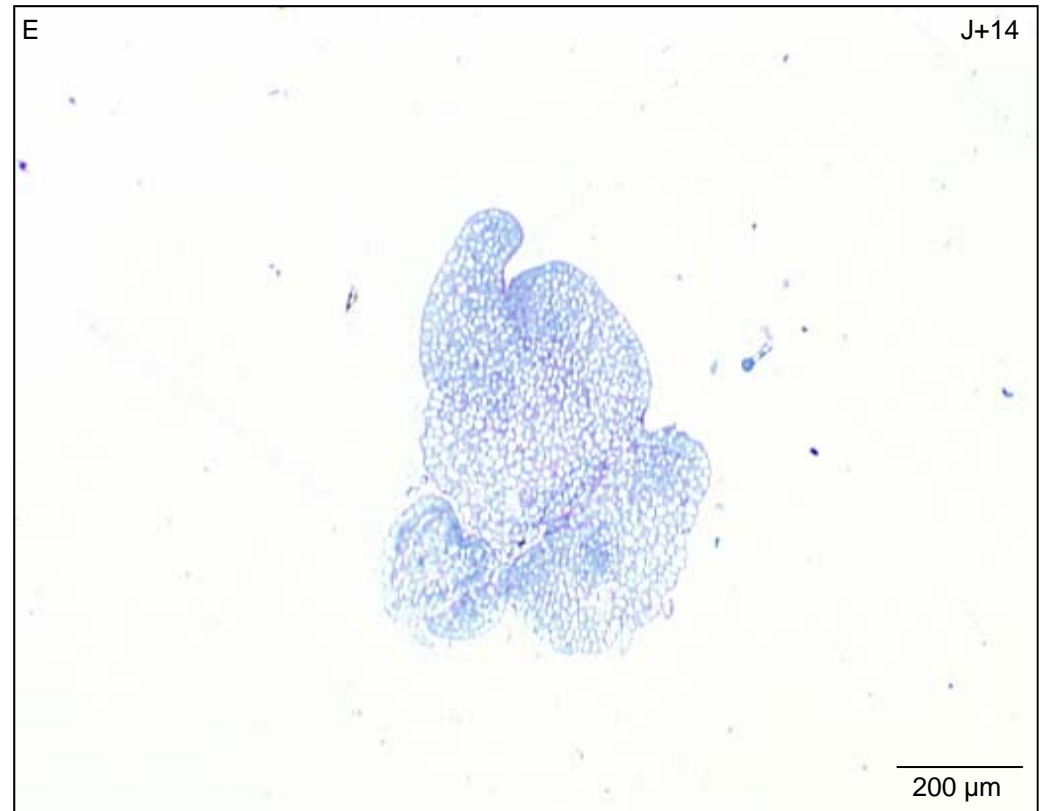
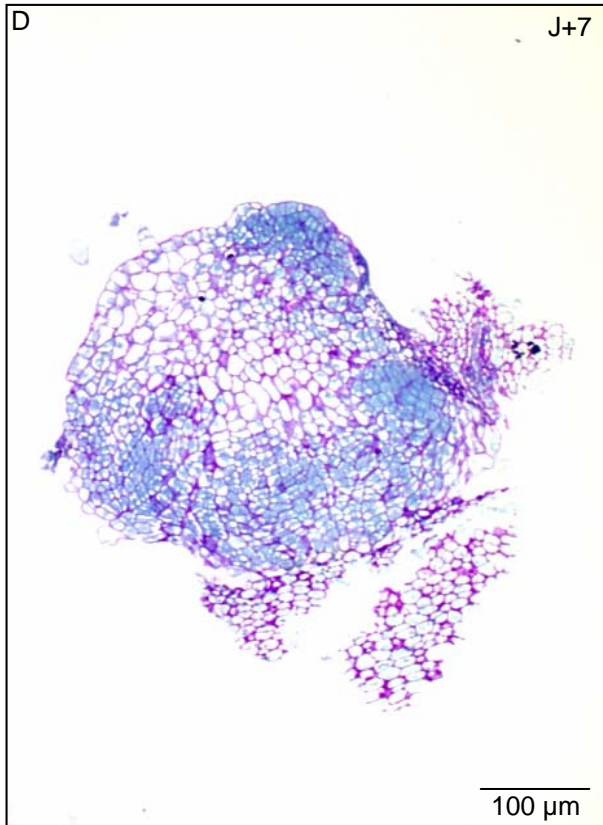
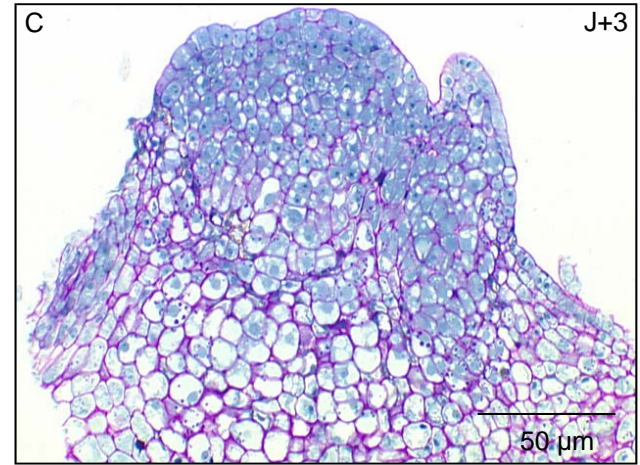
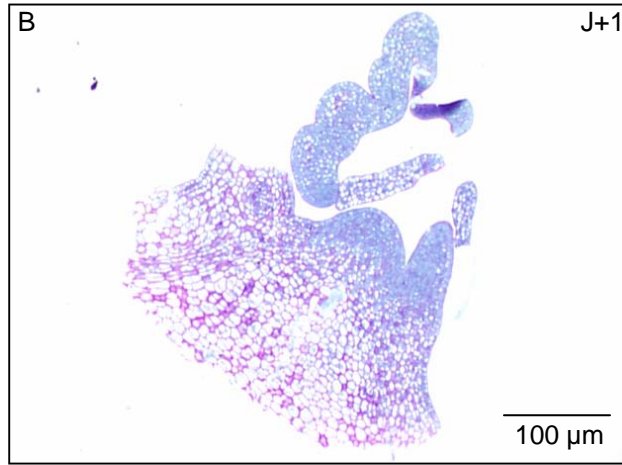
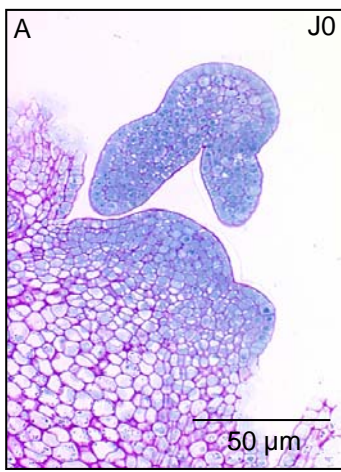


Figure 3-38. Cinétique de croissance d'apex *P. x hortorum* 'Panaché' cryoconservés.

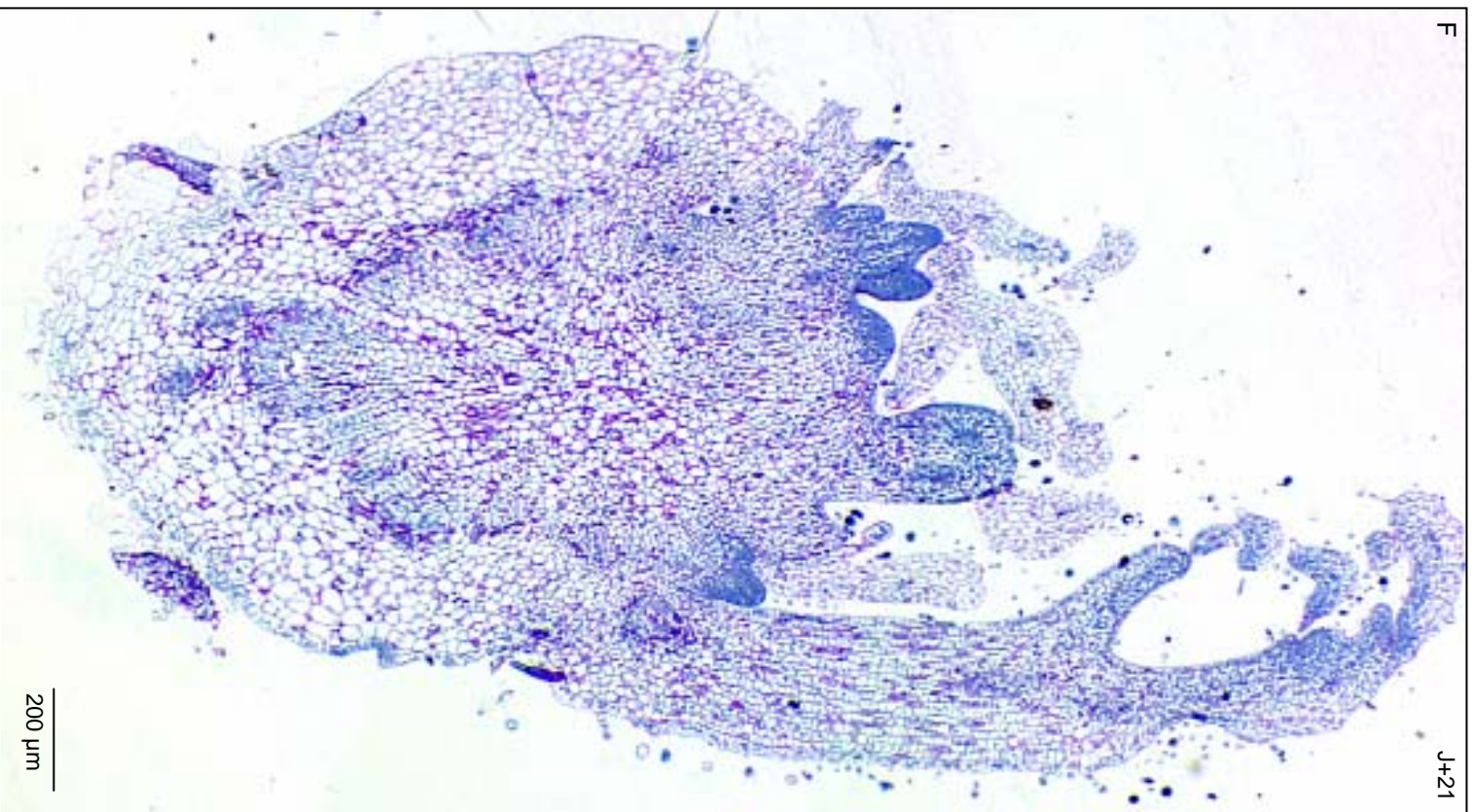


Figure 3-37 suite. Cinétique de croissance d'apex *P. x peitatum* 'Balcon Lilas' cryoconservés. J+21

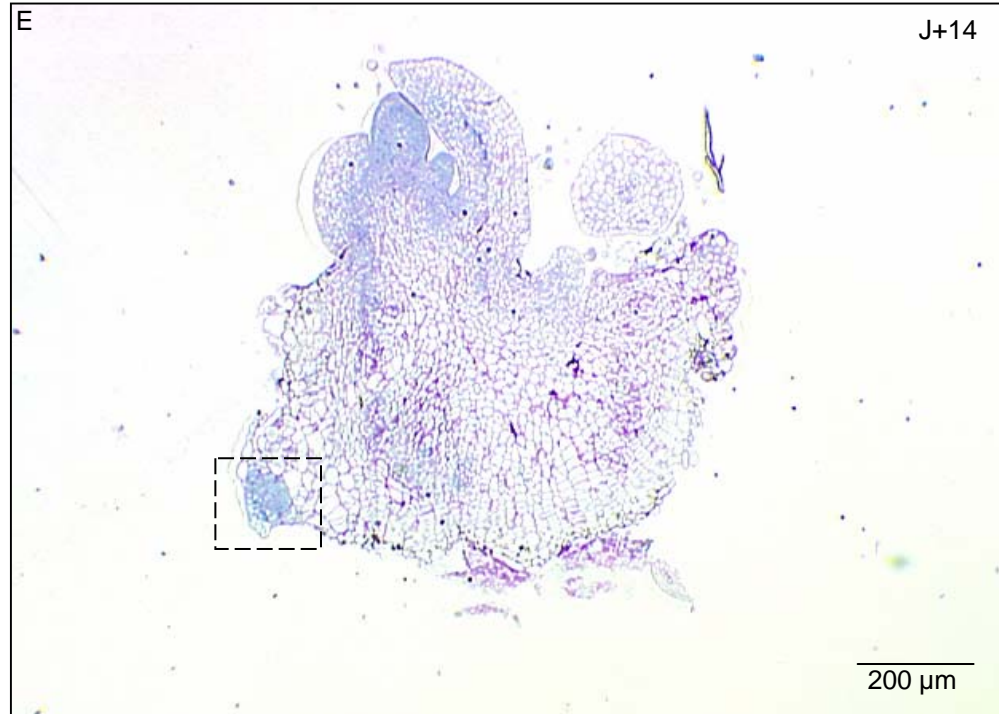
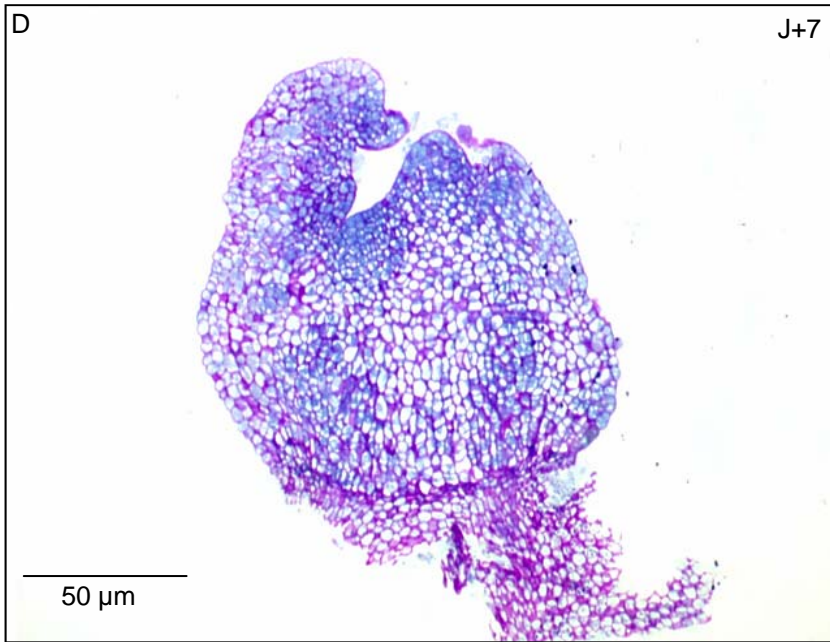
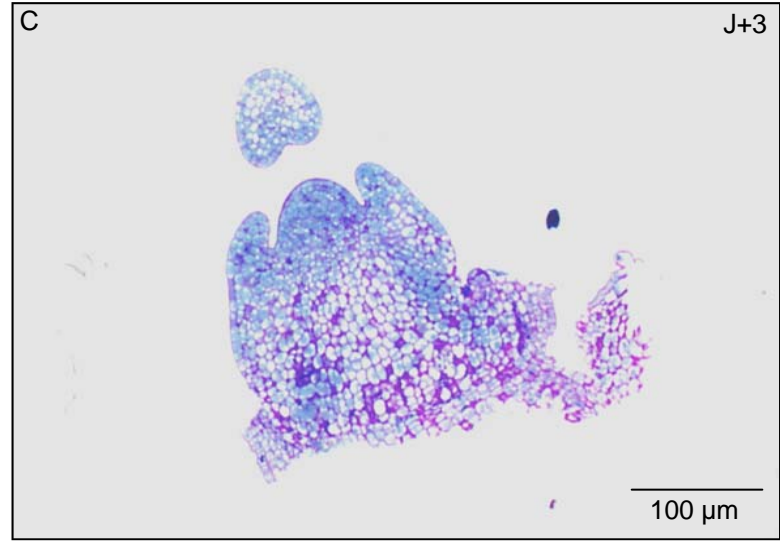
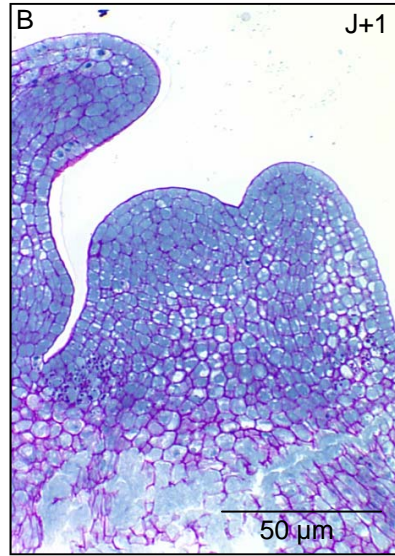
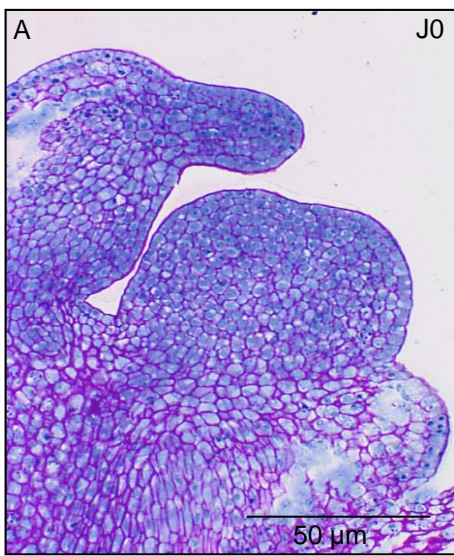
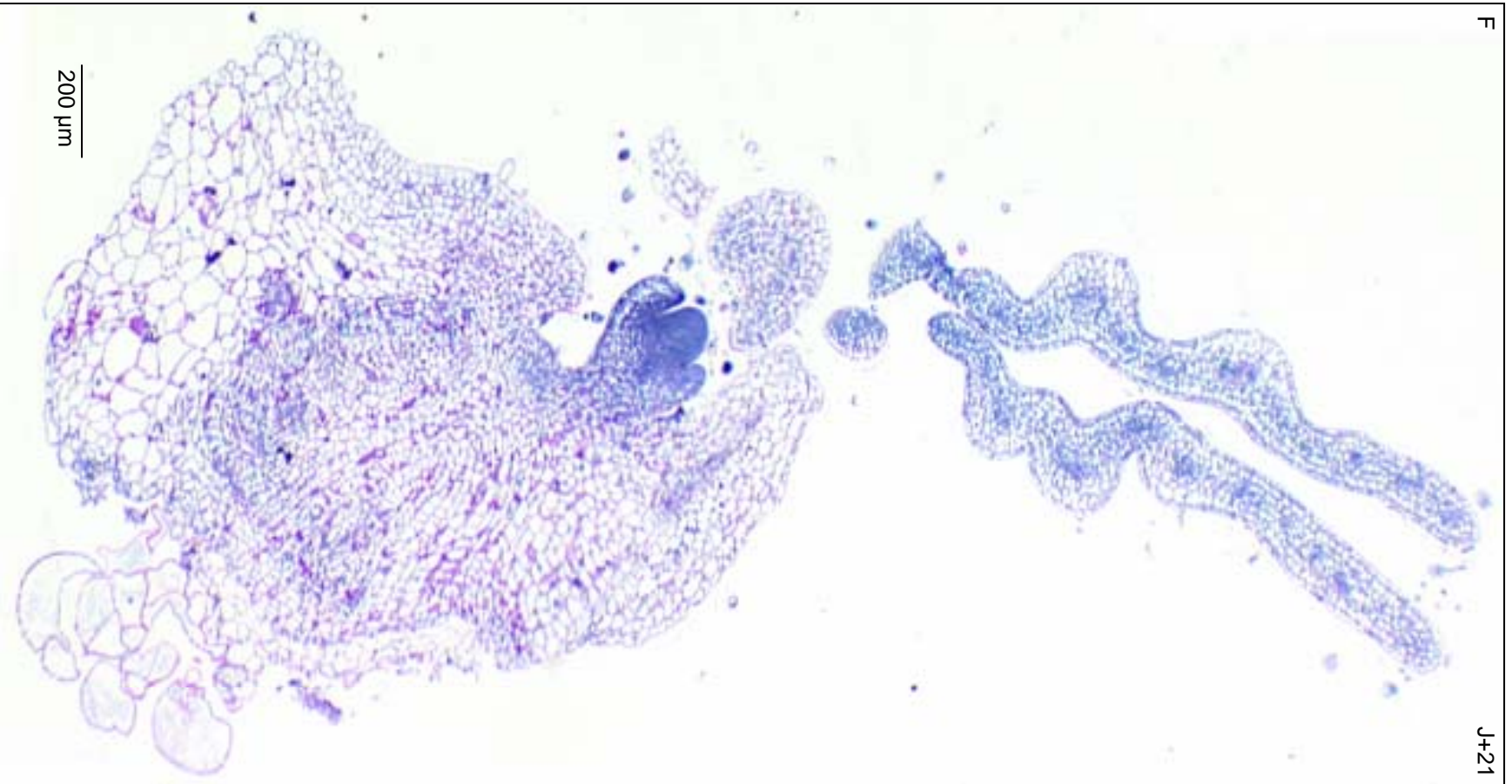


Figure 3-37. Cinétique de croissance d'apex *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' cryoconservés. Néof ormation dans la partie encadrée



F

J+21

Figure 3-38 suite. Cinétique de croissance d'apex *P. x hortorum* 'Panaché' cryoconservés. J+21

3.3.4.2. Reprise de croissance pour les apex cryoconservés

Le même travail réalisé sur des apex cryoconservées par « droplet-vitrification » a conduit aux mêmes résultats. Aucun retard, ni différence de croissance particulière ne sont mis en évidence, qui pourraient être imputable à la cryoconservation. Comme dans le cas des apex non cryoconservés, il apparaît que les apex reprennent leur croissance directement et qu'il existe aussi des néoformations pouvant aboutir à de nouvelles pousses (figure 3-37 et figure 3-38).

3.3.4.3. Cas d'un apex n'ayant pas survécu

Tous les apex ne survivent pas aux traumatismes du prélèvement ou de la cryoconservation (figure 3-39). Plusieurs observations peuvent être faites. D'une part, nous constatons une déformation totale du dôme et des ébauches, d'autre part, les cellules méristématiques présentent un aspect très anguleux, le noyau n'est plus discernable et la vacuolisation plus importante. L'apex apparaît complètement altéré avec une déstructuration totale des cellules.

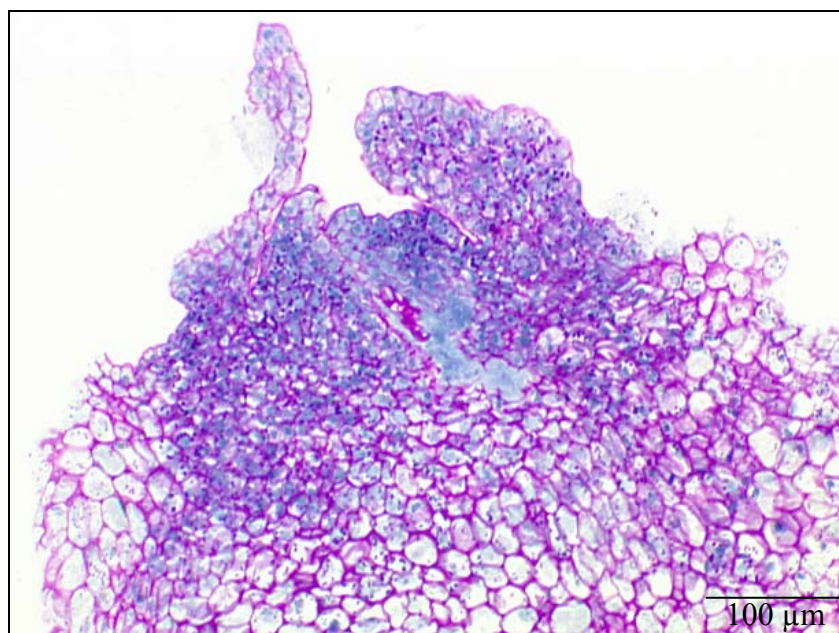


Figure 3-39. Exemple d'apex du cultivar Panaché à J+1 n'ayant pas survécu à la cryoconservation.

Le suivi de la reprise de croissances des apex a permis de mettre en avant plusieurs éléments. Aucune différence significative n'est observée entre les apex témoins et les apex issus de la « droplet-vitrification ». Notamment pour les apex cryoconservés, des zones particulières d'altération des cellules ne sont pas visualisées. Une reprise de croissance directe des apex est systématiquement observée, avec dans les premiers jours de culture une augmentation du volume de l'apex suivie d'une phase de croissance apicale correspondant à la mise en place de l'axe principal de la future plante. A côté de cet événement fondamental, il arrive qu'un méristème axillaire à la base d'un primordium devienne actif à partir duquel une seconde pousse peut se différencier. Le cas échéant, un cal peut proliférer au niveau de la zone cicatricielle dans lequel ou sur lequel peut se mettre en place des zones de cellules très actives vraisemblablement à l'origine de nouvelles pousses. L'ensemble de ces

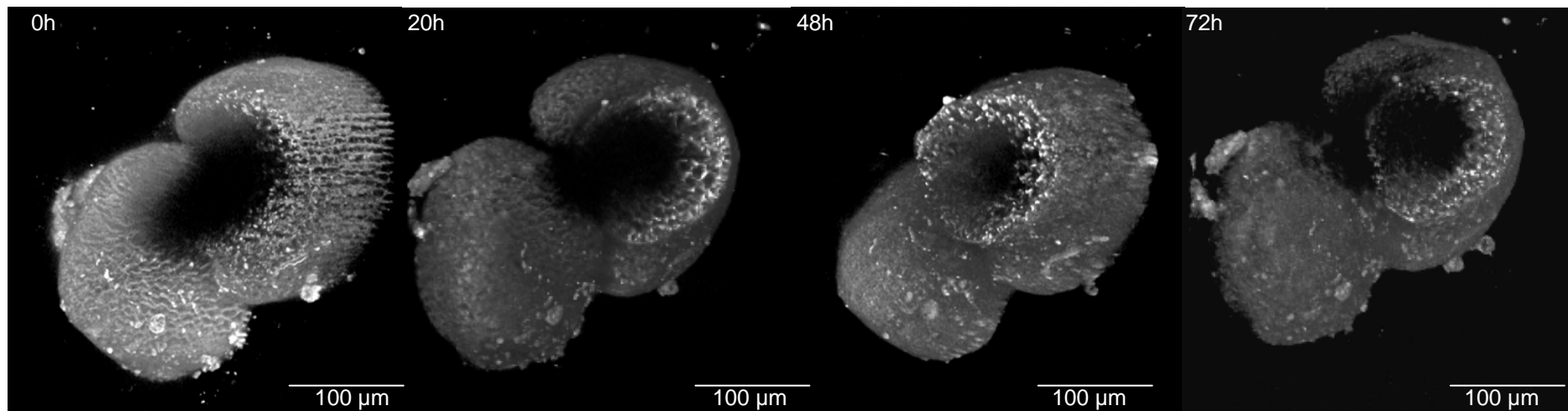


Figure 3-40. cinétique de croissance d'un apex non cryoconservé de *P. x peltatum* 'Balcon Lilas'. Observations faites au MPM

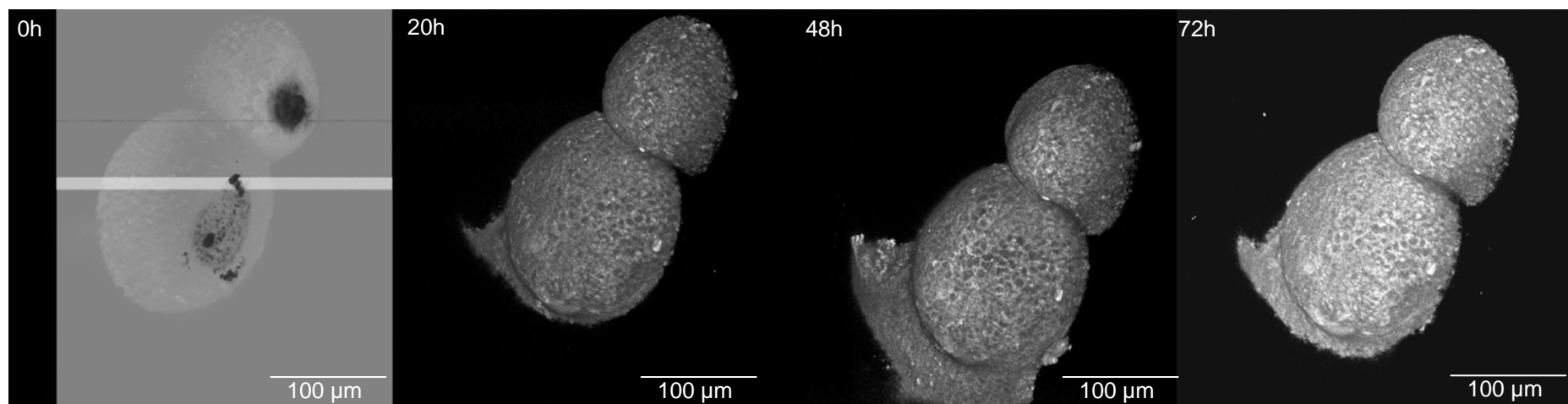


Figure 3-41. cinétique de croissance d'un apex cryoconservé de *P. x peltatum* 'Balcon Lilas'. Observations faites au MPM

événements a été observé aussi bien chez les apex témoins que chez les apex cryoconservés. La « gouttelet-vitrification » chez *Pelargonium* n'a donc pas d'impact particulier sur la reprise de croissance des apex.

3.3.5. Suivi de la reprise de croissance des apex par microscopie biphoton à balayage laser

Comme il a été indiqué dans l'introduction, l'utilisation du mode biphoton permet de travailler avec des puissances de laser beaucoup plus compatibles avec le maintien de la vie des cellules. De ce fait, la reprise de croissance d'un apex non cryoconservé et d'un apex cryoconservé a été suivie pendant les trois premiers jours de régénération *in vitro*.

3.3.5.1. Reprise de croissance d'un apex non cryoconservé

Les reconstructions tridimensionnelles de cet apex à 0h, 20h, 48h et 72h de culture permettent de constater une évolution du volume du dôme méristématique et de la portion d'ébauche foliaire (figure 3-40) notamment au bout de 48h de culture. En revanche, la qualité du marquage des membranes sur l'apex n'a pas permis de pratiquer un seuillage des plans optiques. En conséquence, le volume de l'apex au cours du suivi de la reprise de croissance n'a pas pu être estimé.

3.3.5.2. Reprise de croissance d'un apex cryoconservé

Dans ce cas, l'estimation du volume a été réalisée uniquement sur le méristème en raison de l'impossibilité de pratiquer un seuillage précis sur les coupes optiques de l'ensemble de l'apex. Ainsi, pour les quatre points de cinétique considérés, une augmentation du volume du dôme méristématique est constatée au cours des 72 heures de culture (figure 3-41). Au bout de trois jours le volume a augmenté d'environ 60 % (figure 3-42). Ce gonflement caractéristique de la reprise de croissance, et donc de la survie de l'apex corrobore les observations faites précédemment en microscopie optique.

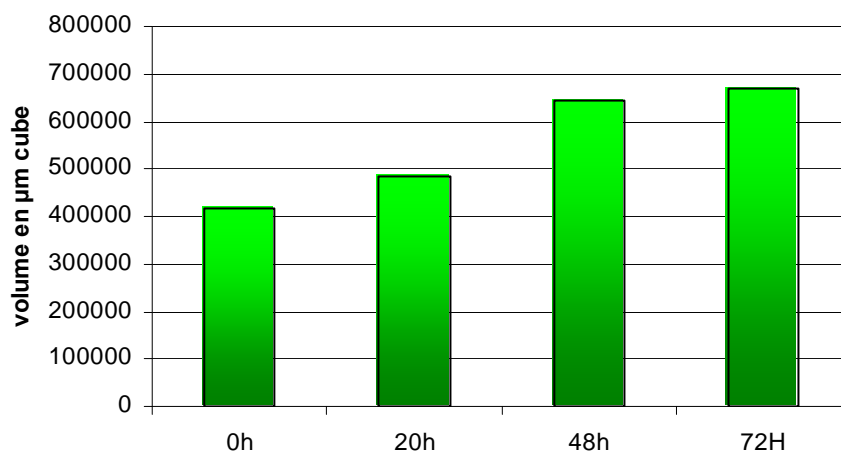


Figure 3-42. Suivi de l'évolution du volume d'un dôme méristématique cryoconservé au cours des 72 premières heures de culture.

3.4. Discussion

3.4.1. Comparaison histo-cytologique durant les procédés de cryoconservation par encapsulation-déshydratation et «droplet-vitrification»

Naturellement, les végétaux des zones tempérées et froides ont développé des systèmes de protection des cellules notamment, en limitant la cristallisation de l'eau. L'un des principaux moyens mis en œuvre par les plantes est d'augmenter la concentration en polysaccharides dans les cellules (Leopold, 1989) réduisant de fait la quantité d'eau intracellulaire. Cet événement a pour effet, d'une part de provoquer une sortie d'eau par osmose et d'autre part d'abaisser la température de congélation du milieu intracellulaire par l'augmentation de la concentration en solutés (Uragami, 1991). L'accumulation en sucres solubles notamment en glucose (Zhu *et al.*, 2006) dans les cellules de plantes endurecies au froid proviendrait de l'hydrolyse de l'amidon (Arora et Wisniewski, 1995). Toutefois, l'augmentation de la concentration en sucres solubles dans les cellules n'est pas systématiquement corrélée à l'endurcissement au froid (Farrant *et al.*, 1993).

Lors de la cryoconservation par encapsulation-déshydratation, la préculture des apex dans une solution enrichie en saccharose à 0,75M (dans notre procédé) a pour objectif d'accroître la survie des apex lors de la congélation par l'accumulation de sucres dans les tissus comme lors l'endurcissement au froid. L'étude histo-cytologique que nous avons réalisée montre une forte accumulation d'amidon dans le cytoplasme des cellules de la zone sous méristématique ainsi que des cellules partiellement plasmolysées. Ces résultats confirment ceux obtenus chez le *Pelargonium* par Grapin *et al.* en 2007 ou chez d'autres plantes (*e.g.* Panis *et al.*, 1996, Mari *et al.*, 1995).

En fin de préculture, la présence de nombreux grains d'amidon correspond à une forme de stockage du glucose, lui-même issus de la métabolisation du saccharose (Oparka *et al.*, 1990, Panis *et al.*, 1996, Bachiri *et al.*, 2000). Par conséquent, la pénétration du saccharose semble avérée même si certains auteurs indiquent le contraire (Volk *et al.*, 2007). Néanmoins, l'hypothèse de la pénétration du saccharose est la plus probable si on se réfère aux travaux de Hitmi *et al.* (1999). Ils ont montré que suite à un prétraitement de 20 jours sur un milieu contenant 0,53M de saccharose, la concentration en saccharose dans des cellules de chrysanthème avait été multipliée par 4. De fait, lors de la préculture le saccharose est métabolisé en glucose et fructose, ces sucres participent à leur tour à l'augmentation de la concentration en soluté diminuant la quantité d'eau cristallisable des cellules. Dans ces conditions l'excédent de glucose peut être remobilisé pour la synthèse d'amidon dans les amyloplastes.

Il est à noter que l'accumulation d'amidon a aussi été observée parfois chez des apex témoins c'est-à-dire non cryoconservés. La présence de réserves amyloacées dans les cellules doit être vraisemblablement fonction de l'état physiologique de la plante lors du prélèvement de l'apex.

Au cours de la déshydratation évaporative, beaucoup de cellules présentent un noyau pycnotique très foncé dans lequel il n'est pas possible de distinguer le nucléole et l'hétérochromatine. Ce changement caractéristique serait du au « stress » causé aux cellules (Bagniol *et al.*, 1992) au cours de cette étape. Néanmoins, rien n'indique que le changement d'aspect de certaines cellules a un effet sur leur survie. Contrairement à la déshydratation osmotique (préculture) au cours de laquelle seule l'eau cristallisable est retirée des cellules (Mazur, 1984), la déshydratation évaporative provoque l'évaporation non seulement de l'eau cristallisable mais aussi de l'eau non cristallisable (Crowe *et al.*, 1990). Cette fraction de l'eau cellulaire, par définition moins libre que l'eau cristallisable est un élément important du maintien de l'intégrité de la cellule. Par conséquent, la réduction de sa teneur dans les cellules

risque de provoquer des dysfonctionnements du métabolisme cellulaire qui pourraient expliquer les changements d'aspect des noyaux. Nous pouvons en déduire que cette étape de l'encapsulation-déshydratation a un impact plus important sur les apex que la préculture.

Suite à l'immersion dans l'azote liquide, il apparaît sur les images présentées que toutes les cellules de l'apex, notamment celles du méristème, n'ont pas réagi de la même manière à la congélation. Certaines ont survécu tandis que d'autres très altérées sont vraisemblablement mortes. Cette hétérogénéité de survie a déjà été observée par microscopie chez *Cosmos atrosanguineus* (Wilkinson *et al.*, 2003) entre autres. Ces auteurs ont montré que le caractère indifférencié des cellules méristématiques était un facteur favorisant la survie des cellules. Or dans notre cas, toutes les cellules méristématiques n'ont pas survécu à la congélation. Par conséquent, outre la nature des cellules d'autres facteurs doivent intervenir. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la diffusion de la solution de préculture à travers la bille ne serait pas uniforme en raison d'une polymérisation inégale de l'alginate lors de la formation des billes ou que la déshydratation est différente selon les billes. Il en résulterait des teneurs en eau variables entre les cellules suite aux déshydratations comme l'indique Reed *et al.* (2005) d'où une tolérance inégale à la congélation.

Après le réchauffement, les cellules méristématiques au noyau pycnotique sont moins nombreuses, pour beaucoup d'entre elles, le nucléole et l'hétérochromatine sont à nouveau visibles. De ces observations nous pouvons en déduire, d'une part, que le caractère pycnotique des noyaux n'est pas lié à la survie des cellules et d'autre part que les cellules ayant survécu, retrouve progressivement la même activité physiologique qu'avant la cryoconservation. Plusieurs auteurs dont Gonzalez-Arno *et al* en 1993 sur la canne à sucre font mention des mêmes observations.

Le même travail d'histo-cytologie que précédemment a été réalisé sur des apex au cours de la « droplet-vitrification ».

Suite à l'incubation des apex dans LS contenant du saccharose (0,4M) et du glycérol (2M), les cellules apicales présentent pratiquement toutes le même aspect, à savoir un cytoplasme quelque fois rétracté sur lui-même (plasmolyse), un noyau où il est possible de distinguer le nucléole dans la partie centrale et des amas d'hétérochromatine en périphérie. En plus de ces observations le petit nombre de cellules possédant un noyau pycnotique est un élément important démontrant que LS n'induit pas beaucoup de « stress ». Enfin il n'a jamais été décelé de grains d'amidon dans les cellules. Contrairement aux procédés de vitrification classique, notre méthode ne comporte pas d'étape de prétraitement des apex sur un milieu enrichi en saccharose. Généralement cette étape est relativement longue entre quelques heures et plusieurs jours. Suite à cette étape certains auteurs font mention de la présence d'amidon dans les cellules (Helliot *et al.*, 2003). Selon le même principe que lors de la préculture de l'encapsulation-déshydratation, le saccharose serait métabolisé en sucres simples puis ces sucres seraient remobilisés pour la synthèse d'amidon. De ce fait il peut paraître logique que nous n'ayons jamais observé d'amidon dans les cellules. La seule exposition des apex à LS étant trop courte pour voir l'apparition de grains d'amidon due à la métabolisation au moins partielle de saccharose en glucose et fructose. Bien que le rôle précis du glycérol ne soit pas complètement connu son association avec le saccharose favorise la vitrification de l'apex au cours d'un refroidissement rapide (Sakai cité par Gonzalez-Arno *et al*, 2006) ce qui a pour effet d'augmenter la tolérance à la congélation des apex. Bien que le traitement dans LS soit impératif pour la survie des apex de *Pelargonium*, il n'est pas suffisant seul. En complément, les apex doivent être immergés dans la solution PVS2 contenant du saccharose, du glycérol, de l'éthylène glycol et du DMSO. Seule la combinaison des deux permet la survie des apex lors de la congélation. LS aurait pour effet de protéger les cellules d'une trop grande déshydratation due à l'exposition à la solution très concentrée PVS2 (Wang *et al*, 1998). A la fin du

traitement dans PVS2 (précédé de l'immersion dans LS), les apex présentent pratiquement le même aspect qu'après l'étape de charge (LS). Seules quelques cellules présentent une plasmolyse plus importante et le nombre de cellules avec un noyau pycnotique est légèrement plus élevé. Beaucoup moins de changements sont observés après ces traitements au cours de la vitrification que chez des apex de *Citrus* (Ding *et al.*, 2007) et sur des méristèmes de bananier (Helliot *et al.*, 2002). Nos résultats sont plus en accord avec ceux obtenus sur des apex de Kiwi (Xu *et al.*, 2006).

Immédiatement à la sortie de l'azote liquide avant le réchauffement, l'intégrité de l'apex est conservée. Au niveau du méristème, comme précédemment, des cellules sont plasmolysées, certaines ont un noyau pycnotique. Après le réchauffement, la grande majorité des cellules apicales a conservé le même aspect que lors des étapes précédentes. De ce constat, il est possible d'en déduire que les traitements pratiqués sur les apex ont continué à maintenir l'intégrité structurale des cellules et que leur viabilité est vraisemblablement préservée. De plus nos observations ne mettent pas en évidence de signes évidents de dommages causés aux cellules méristématiques. Contrairement aux observations faites chez la menthe (Volk *et al.*, 2007) et chez *Citrus* spp (Ding *et al.*, 2007), les cellules plus différenciées présentent de manière plus surprenantes peu d'altérations suite à la « droplet-vitrification ».

D'après ces résultats, il apparaît que la méthode de cryoconservation par « droplet-vitrification » que nous avons développée est particulièrement adaptée aux apex de *Pelargonium* car elle permet de maintenir les caractéristiques originelles des différents types cellulaires composant les apex.

Au terme de cette étude, la principale différence entre les deux méthodes est l'absence d'importants changements dans la structure des cellules au cours de la « droplet-vitrification » par rapport à l'encapsulation-déshydratation. Il est possible d'en déduire que la « droplet-vitrification » est mieux adaptée que l'encapsulation-déshydratation telle que nous l'avons pratiquée pour les apex de *Pelargonium*. Elle permet de réduire le stress des cellules par un meilleur maintien de leur intégrité et par voie de conséquence de leur métabolisme. L'ensemble de ces éléments peut expliquer pourquoi nous avons toujours obtenu des taux de survie post-cryoconservation plus élevés avec la « droplet-vitrification » que par l'encapsulation-déshydratation.

3.4.2. Etude par RTM et CLSM lors des étapes clefs de l'immersion dans LS et PVS2 au cours du procédé par « droplet-vitrification ».

L'utilisation de ces deux méthodes de microscopie a eu pour objectif d'apporter des informations supplémentaires par rapport à celles obtenues avec les autres systèmes microscopiques (optique, électronique) couramment employées.

Face à notre méconnaissance totale de la RTM, nous nous sommes attachés à définir les conditions de son utilisation. Ainsi par comparaison avec des tissus d'origine animale où des observations très précises d'événement cellulaires ont pu être filmées (*e.g.* Pham *et al.*, 2004), la présence d'une paroi pecto-cellulosique chez les végétaux s'est avérée un facteur négatif pour visualiser l'intérieur des cellules. Notamment au niveau du méristème où la densité de cellule est très importante. Par conséquent, l'observation d'un apex de *Pelargonium* entier n'est pas possible en RTM, il a été nécessaire de faire des coupes sur du matériel frais en veillant à avoir des coupes les plus fines possibles tout en ayant des couches cellulaires intactes. Enfin pour pouvoir faire des films de bonne qualité, il a fallu mettre au point un système qui permet une injection extrêmement lente et régulière des solutions afin de limiter au maximum les vibrations synonymes de flou sur les films. A partir des

paramètres d'utilisation définis, les observations des cellules de la zone sous méristématiques et des cellules méristématiques vivantes ont été possibles, même si pour ces dernières elles restent difficiles. Ainsi nous avons mis en évidence les différents éléments constitutifs des cellules (noyaux, nucléole, vacuoles, cytoplasme, plasmalemme, paroi pecto-cellulosique) et certains organites comme les chloroplastes dans les cellules bien différenciées. Par rapport à la microscopie optique, la RTM a permis de visualiser les mouvements des mitochondries dans les cellules ainsi qu'un élément mobile dans les vacuoles des cellules méristématiques (O.N.I.I.V). Jusqu'à présent nous n'avons pas de certitude sur la nature de cet élément, vraisemblablement doté d'une membrane, nous faisons l'hypothèse qu'il s'agirait de vésicules ayant pour origine le tonoplaste.

Comme pour l'utilisation de la RTM, il a été nécessaire de définir les paramètres d'utilisation de la CLSM. Après avoir choisi le fluorochrome à l'aide de la littérature, les conditions de son utilisation ont été définies, à savoir la concentration, le temps d'immersion des apex et la longueur d'onde d'excitation. Des différences de marquage entre le méristème et les primordia ont été observées. La plus grande différenciation cellulaire dans les primordia peut justifier ces différences, d'une part les parois sont plus épaisses ce qui peut limiter la pénétration du fluorochrome, d'autre part les cellules étant plus grandes qu'au niveau du méristème, la densité cellulaire est plus faible d'où une moindre quantité de membrane donc de signal lumineux. A l'intérieur des différentes zones de l'apex le marquage des membranes est moins fort qu'en périphérie en raison de l'existence d'un gradient de pénétration du fluorochrome dans les tissus. A partir des paramètres et du montage des apex dans des chambres spécifiques, des représentations tridimensionnelles des apex de bonne qualité ont été obtenues. Ces représentations ressemblent pour beaucoup à des images de microscopie électronique à balayage (MEB) (données personnelles non montrées). Comme avec la MEB, les différentes parties de l'apex sont parfaitement visibles ainsi que la face externe des cellules à la surface des primordia et du méristème. Contrairement à la MEB, la CLSM n'est pas une méthode d'observation destructrice, elle offre la possibilité de travailler sur le même apex au cours des différents traitements et ainsi de voir si des changements notables de la forme sont observables.

Les contraintes techniques étant en grande partie levée, la RTM et la CLSM ont alors été employées pour étudier les effets de LS et PVS2 sur les apex de *Pelargonium* lors de la « droplet-vitrification ».

Les acquisitions d'images et de films par RTM au cours du traitement LS ont montré qu'il n'y avait pas de déformation substantielle des coupes de méristème ni de variation de la surface, leur aspect sphérique et lisse étant préservé. Par extrapolation, nous supposons que la forme du dôme entier et son volume ne sont pas altérés par LS. Il apparaît donc que LS n'a pas d'impact sur la structure de soutien de l'apex, c'est-à-dire sur les parois pecto-cellulosiques. En revanche, au niveau des cellules, une plasmolyse a été observée quel que soit le type de cellule (méristématique ou différenciée). Cependant, la présence d'un cytoplasme dense, riche en organites et en protéines, de petites vacuoles et d'un noyau volumineux limite la plasmolyse dans les cellules apicales comme l'a indiqué Helliot *et al* en 2003. Les cellules de la zone sous méristématique, plus différenciées, sont plus sensibles à l'effet d'osmose du à LS. Néanmoins, pour un même type cellulaire, la plasmolyse n'est pas uniforme, surtout pour les cellules différenciées. Nous avons notamment observé des cellules faiblement plasmolisées et d'autres dont le plasmalemme était complètement décollé de la paroi. Ce décollement du plasmalemme pourrait signifier la rupture de la communication intercellulaire via les plasmodesmes (Helliot *et al.*, 2003) et par voie de conséquence peut avoir une influence sur le métabolisme cellulaire.

Outre la plasmolyse comme événement visible de l'action de LS sur les cellules, aucun changement n'a été observé ni dans la mobilité ni dans la forme des O.N.I.I.V au cours du traitement avec LS. A partir de ce constat plusieurs hypothèses peuvent être émises quant au rôle du saccharose et du glycérol.

Soit le saccharose et le glycérol ne pénètrent pas dans les cellules (Volk *et al.*, 2007, Wusteman *et al.*, 2002). Le saccharose participerait alors à la stabilisation des membranes par l'extérieur de la cellule et jouerait son rôle d'osmoticum tandis que le glycérol lui interviendrait uniquement sur la déshydratation des cellules (Verleysen, 2005). La plasmolyse partielle due à LS dans ce cas n'aurait pas d'influence sur les O.N.I.I.V.

Soit ils pénètrent dans les cellules comme le sous-entend Panis *et al* en 1996 pour le saccharose ou Helliot *et al* en 2003 pour le glycérol. Dans ce cas, nous pouvons en déduire que ni le saccharose, ni le glycérol n'ont d'effet particulier sur les O.N.I.I.V. De notre point de vu, cette situation correspond plus à la réalité. En effet, bien que le caractère pénétrant du glycérol reste encore très controversé, l'hypothèse de la pénétration du saccharose dans les cellules est quant à elle nettement plus plausible (voir les commentaires de la partie précédente).

L'observation d'apex entier au CLSM après le traitement dans LS, nous indique une diminution de volume de l'apex mais sans déformation particulière du dôme et des primordia. Ce résultat peut paraître paradoxal avec ce qui a été mentionné lors des observations en RTM mais il faut bien garder à l'esprit qu'en CLSM se sont les membranes plasmiques qui sont visualisées et non les parois contrairement à la RTM où toutes les structures sont visibles. En conséquence en CLSM il est possible de voir l'effet de la plasmolyse due à LS sur le volume cellulaire de l'apex.

L'observation en RTM d'apex immergés directement dans la solution très concentrée PVS2 a montré que son action sur les coupes est rapide et immédiate (entre 2 et 4 secondes). On assiste à une contraction des coupes sur elles-mêmes. Ce phénomène observé à plusieurs reprises est intéressant car il montre clairement que PVS2 a une action sur les parois ce qui n'avait pas été montré auparavant. PVS2 et LS diffèrent par la présence d'éthylène glycol (EG) et de DMSO dans PVS2. Par conséquent, la rétraction observée serait due à la pénétration du DMSO et de EG dans les cellules et de leurs interactions avec la paroi. Cette supposition va dans le sens des résultats de Volk *et al.* (2006) sur le rôle du DMSO et de EG. Ceci apparaît d'autant plus vrai que dans les cellules, les O.N.I.I.V d'une part changent de forme pour devenir sphérique et d'autre part s'arrêtent de bouger. L'impact sur les O.N.I.I.V est une indication supplémentaire allant dans le sens d'une pénétration du DMSO et de EG dans les cellules. L'effet sur le dôme serait d'autant plus important que cette pénétration aurait pour conséquence de favoriser l'entrée du glycérol (Volk *et al*, 2006) ce qui accentuerait la déshydratation des cellules (plasmolyse) et aurait donc un impact plus ou moins significatif sur la survie des cellules. L'augmentation de la viscosité intracellulaire qui en découle (Attree et Sheffield, 1985) pourrait justifier l'immobilité des O.N.I.I.V.

Ces résultats ont été confirmés par CLSM puisque la représentation tridimensionnelle d'un apex plongé dans PVS2 présente des signes évidents de rétraction (sillons d'effondrement des cellules sur la face externe des primordia ou encore l'apparition de replis sur le méristème). Même si se sont les membranes qui sont visibles en CLSM, aux vues de l'importance des déformations du dôme visibles en RTM nous pouvons supposer que les déformations observées en CLSM sont dues à la contraction de l'ensemble de l'apex sur lui-même (membrane et paroi). De plus, il est à noter que la contraction de l'apex est plus forte à sa base qu'à son sommet, là où les cellules sont plus différenciées ce qui confirme la plus grande sensibilité à la déshydratation de ces cellules sous l'action des solutions de cryoprotection.

Les observations faites sur des apex plongés dans LS et PVS2 mettent en évidence le rôle de protection des cellules par LS. En effet la diminution du volume du dôme est d'une part plus lente qu'avec PVS2 et d'autre part elle ne s'accompagne pas de déformations importantes. LS atténue les effets de PVS2 sur les apex. Ceci confirme le rôle de protection de LS déjà mentionné dans d'autres travaux notamment ceux de Matsumoto et Sakai en 2000. Comme son nom l'indique, LS (Loading Solution) charge les apex en saccharose et en glycérol, il y aurait alors une pénétration plus lente du DMSO et de l'éthylène glycol due à une moindre accessibilité aux cellules. Les conséquences pour la cellule sont une réduction du stress par une déshydratation moins brutale, une réduction du choc osmotique et une diminution de la déformation des parois. Toutefois, les changements observés indiquent qu'il y a bien une pénétration partielle du DMSO et de l'éthylène glycol. En conséquence, une immersion trop longue dans PVS2 (après le traitement dans LS) risquerait d'accroître la mortalité des cellules à cause d'une déshydratation excessive. De plus, elle augmenterait la quantité de cryoprotecteurs dont la toxicité a été démontrée pour le glycérol (Volk *et al*, 2006) ou mentionnée pour l'éthylène glycol et le DMSO (Baudot *et al*, 2004).

Les résultats de cette partie justifient l'intérêt porté à la RTM et à la CLSM. En effet grâce à ces techniques pour la première fois, nous avons mis en évidence que l'action de PVS2 sur les apex est immédiate et rapide, qu'elle entraîne des déformations des parois ayant des conséquences importantes sur la forme générale de l'apex. Grâce à la RTM et à la CLSM le rôle protecteur de LS est confirmé. Enfin ces observations confortent l'idée que le DMSO et l'éthylène glycol pénètrent dans les cellules. Toutefois, ces premiers résultats doivent être confirmés par l'observation d'un nombre plus conséquent d'apex. De plus la qualité des images et des films doit être améliorée par un travail permanent de mise au point.

3.4.3. Etude de la régénération *in vitro* d'apex non cryoconservés et d'apex cryoconservés.

Le suivi de la reprise de croissance pendant 72 heures, par MPM, a permis d'observer dans un premier temps, des changements dans la forme du méristème et du primordium et dans un deuxième temps, d'estimer le volume du dôme méristématique dans le cas d'un apex cryoconservé. On a observé une augmentation du volume traduisant vraisemblablement une reprise de la croissance de l'apex. En conséquence :

- 1) la MPM ne semble pas altérer la viabilité des cellules
- 2) la MPM s'avère un outil intéressant pour la compréhension de la reprise de croissance et le suivi des divisions cellulaires dans le méristème.

Le suivi de la régénération *in vitro* des apex est un élément important pour comprendre l'origine cellulaire de la reprise de croissance. En effet pour garantir l'absence de variations phénotypiques, il est nécessaire que la reprise de croissance des apex soit directe. C'est-à-dire sans une phase de dédifférenciation cellulaire suivie d'une nouvelle organogenèse ou encore d'une organogenèse issue d'une ou plusieurs cellules apicales.

Par opposition aux travaux de Kaczmarczyk *et al* en 2006 et Ding *et al* en 2007 sur la vitrification, la cryoconservation d'apex de *Pelargonium* par « droplet-vitrification » ne cause pas de lésions importantes à l'ensemble de l'apex (méristème, primordia, zone sous méristématique), seule les cellules de la zone d'excision présentent les caractéristiques de cellules mortes. Les mêmes observations ont été faites chez les apex non cryoconservés. De plus comme dans les travaux de

Grabin *et al* en 2007 chez le *Pelargonium* ou de Gonzalez-Arno *et al* en 1993 chez la canne à sucre, les cellules apicales après la cryoconservation retrouvent rapidement un aspect attendu de cellules méristématiques et même des signes de croissance. En effet, à plusieurs reprises, des cellules en phase de mitose ont été observées. En revanche à notre connaissance, il n'existe pas d'études histocytologiques de la régénération sur une durée de 21 jours. Ce pas de temps relativement long a permis de mettre en évidence des phénomènes ayant des répercussions sur la régénération. Ainsi plusieurs événements cellulaires (néoformations) ont été observés à partir de 14 jours de culture aussi bien chez les apex témoins que chez les apex cryoconservés. Cette remarque importante signifie que la cryoconservation n'a pas d'influence sur le mode de régénération des apex. En revanche, rien ne prouve avec nos expériences que la fréquence d'apparition de ces néoformations n'est pas fonction de l'origine des apex.

Chez certaines pousses la mise en place d'un cal au niveau de la zone d'excision des apex a été observée. Deux cas ont été distingués soit le cal reste relativement minoritaire par rapport au développement de la pousse et ne gêne pas la régénération soit il prend le dessus sur la différenciation cellulaire et dans ce cas la régénération n'aboutit pas. De plus, à l'intérieur du cal ou à la limite entre le cal et la pousse, des cellules très actives aux mêmes caractéristiques que les cellules méristématiques peuvent proliférer pour former des amas très denses. Tout porte à croire qu'il s'agit de méristèmes néoformés dont l'origine cellulaire n'est pas connue ce qui explique pourquoi, il a été possible d'obtenir plusieurs pousses à partir d'un même apex. Afin de conserver la conformité du cultivar, il peut être préconisé de garder la pousse principale et d'éliminer le cal et les pousses « adventives » lors du repiquage.

Plus rarement, on assiste à l'activation de cellules se trouvant à la base d'un primordium correspondant à la mise en place d'un méristème axillaire. Dans ce cas il peut y avoir à partir de la pousse principale la différenciation d'une deuxième pousse dont les caractéristiques devraient être exactement les mêmes que celles de l'apex mis en culture (organogenèse directe). Cette pousse le cas échéant pourra être individualisée puis mise en culture.

Ces résultats mettent en avant le fait que la cryoconservation par « droplet-vitrification » n'a pas d'impact sur la régénération d'apex de *Pelargonium*. De plus on assiste le plus souvent à une reprise directe de croissance des apex laissant augurer le maintien de la conformité. Toutefois il faut veiller à ne pas laisser se développer de cal cicatriciel dans lequel des pousses issues d'une organogenèse indirecte pourraient prendre naissance. Dans ces conditions il peut être envisagé d'utiliser la « droplet-vitrification » lors de la création d'une cryobanque.

CHAPITRE N°4

Etude la qualité des plantes régénérées

4.1. Introduction

La mise en place d'une politique de conservation de ressources génétiques ne peut se concevoir qu'à la condition de l'existence de méthodes de conservation respectant les caractéristiques propres des taxons. Partant de ce constat des outils d'évaluation de la conformité et de l'état sanitaire des plantes régénérées ont été développés. Les études menées au cours de ce chapitre entrent dans cette démarche. En effet, afin de valider l'utilisation de la cryoconservation comme une méthode de conservation des ressources génétiques du *Pelargonium*, nous nous sommes attachés à vérifier si elle n'engendre pas de modifications des caractères propres à chaque taxon.

De nombreuses études portant sur le maintien des caractères d'une espèce ont été réalisées suite à une régénération *in vitro* ou encore après un processus de cryoconservation. L'analyse du génome par des marqueurs moléculaires est une méthode couramment utilisée. Le développement dans les années 80 et 90 des outils moléculaires comme les marqueurs RAPD (Williams *et al.*, 1990), ou encore microsatellites (Beckmann, 1990) ont permis de vérifier à plusieurs reprises chez des plantes, l'absence de modifications du génome suite à la cryoconservation. Néanmoins ces outils ne permettent pas de détecter toutes les modifications du génome. Ainsi chez *Pelargonium* l'utilisation de 57 marqueurs microsatellites n'a pas permis de différencier au niveau du génome trois cultivars de *P. x peltatum* ('Balcon rouge', 'Balcon Rose' et 'Balcon Lilas') dont la couleur des fleurs n'est pourtant pas identique (Becher *et al.*, 2000). C'est pourquoi d'autres méthodes d'évaluation ont été utilisées au cours de notre travail.

Selon l'utilisation ou la nature de la ressource à conserver, le choix des paramètres pour évaluer la conformité des plantes issues de la cryoconservation ne sera pas le même. Par exemple, chez *Dioscorea floribunda* (Ahuja *et al.*, 2002), une espèce végétale contenant une molécule utilisée en médecine, il a été vérifié que la nature et la production de la molécule d'intérêt n'ont pas été altérées par la cryoconservation. Dans d'autres cas, il a été vérifié que le phénotype était bien conservé notamment pour des espèces fruitières comme chez le fraisier (Medina *et al.*, 2007) et le pommier (Hao *et al.*, 2001).

A l'instar de ces espèces, le maintien du phénotype est essentiel pour les plantes ornementales tel que les pélagoniums. Par conséquent, nous avons vérifié que la cryoconservation par « droplet-vitrification » n'engendrait pas de modifications phénotypiques. Pour cela nous avons entrepris d'utiliser des cultivars chimériques, au feuillage panaché, pour lesquels a été déterminé l'agencement des couches cellulaires dans les méristèmes ainsi que leur possible réarrangement. La présence de plusieurs génomes leur confère une instabilité plus grande que les cultivars au génome dit « solide », pouvant aboutir de ce fait à l'apparition de variants s'exprimant par des phénotypes différents. En raison de cette instabilité, ces cultivars peuvent s'avérer être de bons indicateurs de l'impact de la cryoconservation ou d'une culture d'apex. L'intérêt d'utiliser ces cultivars réside dans le fait de pouvoir déterminer en fonction du phénotype de la plante régénérée les contributions relatives de chaque couche cellulaire et par voie de conséquence de déterminer si le méristème a subi des modifications lors de la cryoconservation ou lors de la culture d'apex.

Outre la panachure, d'autres caractères phénotypiques ont été étudiés. Ainsi des mesures de colorimétrie et de planimétrie ont été réalisées afin de contrôler la stabilité de la couleur des fleurs ainsi que le maintien de la forme et de la taille des feuilles.

En complément des travaux portant sur les caractères phénotypiques, la cytométrie en flux a été utilisée pour contrôler la quantité d'ADN dans les cellules. Traditionnellement, cette technique sert à vérifier le niveau de ploïdie. Ainsi dans le cadre d'une étude sur la cryoconservation par vitrification d'apex de pomme de terre, il a été mis en évidence que la cryoconservation n'avait pas d'impact sur la ploïdie (Schäfer-Menuhr *et al.*, 1996). A cause de phénomènes d'endoploïdie fréquents au niveau des feuilles de *Pelargonium* (N. Dorion, communication personnelle) se traduisant par des niveaux de ploïdies différents, nous avons seulement cherché à savoir, au cours de nos expérimentations, si la quantité d'ADN variait en fonction de l'origine des plantes (bouture, culture d'apex et apex cryoconservé).

Grâce à ces expériences, il nous a semblé important de chercher à différencier l'impact (s'il existe) de la cryoconservation par « droplet-vitrification » de celui d'une simple culture d'apex sur la conformité des plantes régénérées.

Notre travail s'est poursuivi par l'étude de l'état sanitaire des plantes régénérées. Depuis plusieurs décennies, la culture de méristème est utilisée comme méthode d'élimination des bactéries et des virus, notamment chez le *Pelargonium* (Hakkaart et Hartel, 1979). Cette méthode repose sur l'idée que la vitesse de multiplication cellulaire au niveau du dôme méristématique est toujours plus rapide que la vitesse de multiplication des virus ce qui les empêcherait de contaminer le dôme. Or, lors de l'excision, le dôme méristématique n'est jamais prélevé seul, il existe toujours une portion de tissu partiellement différenciée à sa base pouvant contenir potentiellement des virus. L'éradication des virus est donc fonction de la taille de prélèvement (*e.g.* Verma *et al.*, 2004, Faccioli et Marani, 1998) et de la capacité des virus à coloniser les couches cellulaires les plus proches du dôme méristématique. En conséquence, l'assainissement viral est très variable en fonction de la situation. Par exemple, il est de 73,7 % pour l'AIMV (*Alstroemeria* mosaic potyvirus) chez *Alstroemeria* (Chiari et Bridgen, 2002) contre seulement 20 % pour le PPV (Plum Pox Virus) chez *Prunus* (Brison *et al.*, 1997). Une culture de méristème ou plus exactement d'apex ne permet pas d'éliminer complètement certains virus récalcitrants. Partant de ce constat, plusieurs équipes ont mis en évidence que l'association culture d'apex et cryoconservation, augmentait sensiblement l'assainissement. On peut parler alors de cryothérapie. Cette association a permis d'augmenter l'élimination du PPV (Plum Pox Potyvirus) chez *Prunus* passant de 20% à 50% (Brison *et al.*, 1997), de plus ces auteurs ont démontré que la taille de prélèvement n'avait pas d'incidence sur l'éradication des virus dès lors que les apex ont été cryoconservés (par vitrification). Chez la vigne l'encapsulation-déshydratation et la vitrification d'apex ont augmenté les taux d'élimination du GVA (grapevine virus A) passant de 12% lors d'une culture d'apex à 97% suite à la cryoconservation (quelle que soit la méthode) (Wang *et al.*, 2003). Comme chez *Prunus*, la taille des apex n'a pas d'incidence sur l'assainissement lorsque les apex ont été cryoconservés. L'éradication du CMV (cucumber mosaic virus) chez le bananier est passée de 0 % à 30 % (Helliot *et al.*, 2002) suite à la cryoconservation par vitrification de massifs méristématiques. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la cryoconservation favoriserait l'assainissement en induisant des dommages cellulaires plus particulièrement aux cellules différenciées là où les virus se trouvent. Dans ces conditions seules les cellules méristématiques indemnes de virus participeraient à la formation d'une nouvelle pousse sans CMV.

A partir de ces travaux, il a été entrepris de vérifier par DAS-ELISA pour quatre cultivars et non pas un seul comme dans les autres études, s'il était possible d'obtenir les mêmes résultats chez *Pelargonium* en prenant comme exemples de virus le PFBV (*Pelargonium* flower break virus) et le

Tableau 4-1 : liste des cultivars utilisés dans les différentes parties du chapitre

Cultivars	Type de cultivar	Tests				
		ELISA	Immunolocalisation	Ploidie	colorimétrie	planimétrie
Angers	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Berg Palais	<i>P.x hortorum</i>	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Bicolor	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Cahors	<i>P.x hortorum</i>	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Distinction	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Elsie	<i>P.x hortorum</i>	OUI	OUI	NON	NON	NON
Féerie orange	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Golden des cars	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
A Happy Thought	<i>P.x hortorum</i>	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Neurot	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Panaché 222	<i>P.x hortorum</i>	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Panaché sud	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Renard bleu	<i>P.x hortorum</i>	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Stellar artic	<i>P.x hortorum</i>	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Ville d'Ostende	<i>P.x hortorum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Belle de grange	<i>P.x peltazonale</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Balçon lilas	<i>P.x peltatum</i>	OUI	NON	OUI	OUI	OUI
Balçon rouge	<i>P.x peltatum</i>	OUI	OUI	NON	NON	NON
Crocodile	<i>P.x peltatum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Crovira	<i>P.x peltatum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Decora rouge	<i>P.x peltatum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON
Rouletta	<i>P.x peltatum</i>	OUI	NON	NON	NON	NON

PLPV (*Pelargonium* line pattern virus). Ces deux virus ont été choisis, l'un parce qu'il provoque des déformations, des décolorations des fleurs (Albouy et Devergne, 1998), l'autre parce que son expansion en Europe ne cesse de croître même si son incidence sur la production demeure faible (Castano et Hernandez, 2005).

Dans cette perspective, l'étude menée sur l'efficacité de la « droplet-vitrification » pour l'élimination des virus a été complétée par la mise au point d'un procédé très sensible d'immunolocalisation des virus dans les apex selon le même principe de marquage des virus développé pour la localisation du PMMoV (Pepper mild mottle virus) dans les graines de *Capsicum annuum* (Genda *et al.*, 2005).

Cette méthode a été appliquée sur des apex non cryoconservés, sur des apex immédiatement après congélation et sur des pousses régénérées *in vitro* post-cryoconservation. De cette manière, nous avons cherché à savoir dans un premier temps la localisation des virus dans les apex, puis dans un deuxième temps à voir si les virus sont éliminés physiquement par la cryoconservation. Dans le cas contraire, si des virus sont localisés dans les pousses issues d'apex cryoconservés, ceci indiquera que les virus auront gardé leur capacité de multiplication et par voie de conséquence que la cryoconservation n'a pas permis leur éradication.

4.2. Matériel et Méthodes

4.2.1. Matériel végétal

Parmi la collection de *Pelargonium*, 22 cultivars (tableau 4-1) ont été choisis représentant un large échantillon des phénotypes existants. Parmi ces cultivars, seuls ceux utilisés au cours de l'étude comparative entre l'encapsulation-déshydratation et la « droplet-vitrification » et ceux sélectionnés pour les immunolocalisations ont été employés pour les mesures du niveau de ploïdie, de planimétrie et de colorimétrie (en jaune dans le tableau).

Les plantes ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre n°2.

NB : lors de leur utilisation aucune plante ne présentait de symptômes dus aux PFBV et aux PLPV.

4.2.2. Méthodes

4.2.2.1. Caractérisation des chimères

La nature chimérique des cultivars panachés a été déterminée par l'observation en MET (Jeol) et en microscopie optique (Statif Olympus BH2 équipé d'une caméra numérique Sony DXC-390P) de la structure interne des chloroplastes et de leur répartition dans les feuilles. Ainsi pour les trois cultivars panachés utilisés *P.x hortorum* 'Panaché' et *P.x hortorum* 'A Happy Thought' et *P.x hortorum* 'Panaché Sud', trois types d'échantillons de portions de feuille ont été utilisés, des chlorophylliennes, des non chlorophylliennes et des portions ayant une partie chlorophyllienne et une partie non chlorophyllienne. Les échantillons ont été ensuite fixés, déshydratés et inclus dans de la résine selon le protocole décrit en annexe 4-1. A partir de ces échantillons deux types de coupes ont été faites à l'ultramicrotome (Ultracut Reichert Leica), des coupes transversales de 1µm d'épaisseur colorées ensuite au bleu de méthylène/ azur II (SCIAM, université d'Angers) (annexe 4-2) pour les observations au microscope optique et des coupes transversales de 70 nm d'épaisseur pour les observations en MET.

A partir des observations, les couches cellulaires des méristèmes ont été identifiées selon la notation employée par Tilney-Basset (1986). Par exemple si la couche L1 est de type « vert » elle sera notée G

pour green et W pour white si elle est de « type » blanc. Le même principe est appliqué aux couches L2 et L3. A partir de ce système, l'agencement des couches cellulaires dans les méristèmes et leur correspondance au niveau des feuilles ont été schématisés de la manière suivante (figure 4-1).

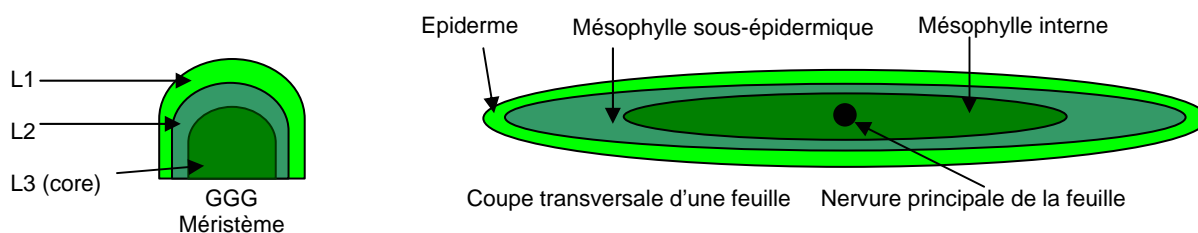


Figure 4-1. Schéma d'un méristème d'une coupe transversale de feuille en fonction de la nature des couches cellulaires L1, L2 et L3. Exemple d'une plante GGG.

4.2.2.2. Mesures de paramètres foliaires

Pour les cultivars employés au cours de cette étude, différents paramètres ont été mesurés ou calculés : la surface foliaire, le périmètre des feuilles, l'écart entre la forme de la feuille et un cercle parfait. Ces paramètres ont pour but d'apporter des informations sur la taille et la forme des feuilles pour les trois types de plantes (bouture, plante issue d'apex non cryoconservés et plante issue d'apex cryoconservés). Pour cela, sur chaque plante la quatrième feuille a été prélevée, à compter de la première feuille ouverte la plus proche de l'extrémité de la tige. Les tiges étant beaucoup plus longues chez 'Balcon Lilas' nous avons choisi d'utiliser la sixième feuille au lieu de la quatrième. En fonction du nombre de plantes régénérées, entre 3 et 5 plantes ont été testées selon les cas (cultivar, type de plantes). Pour faciliter l'acquisition des données par le planimètre (Planimètre CI-202 Portable Leaf Meter CID) se sont les photocopies des feuilles qui ont été scannées.

Ces mesures ont été faites au cours du printemps 2008 soit environ 10 mois après l'acclimatation des plantes en serre.

Avant leur acclimatation en serre, le caractère panaché, vert ou albinos des feuilles a été noté pour les plantes ayant servi au point dans le chapitre n°2 au point 2.2.2.6.

NB : toutes les plantes issues d'une culture d'apex pour le cultivar Berg Palais étant mortes au moment des mesures de planimétrie et de colorimétrie, il n'a pas été possible d'avoir des résultats pour ce cultivar.

4.2.2.3. Mesure de la couleur des fleurs

La couleur des fleurs a été déterminée à l'aide d'un colorimètre (spectrophotomètre CM 2600 d, Minolta) selon trois critères, la luminance ou clarté, la saturation et la teinte. La luminance représente la quantité de lumière (clair ou foncé), la saturation représente l'intensité de la couleur et la teinte la couleur proprement dite selon le modèle Lab édicté en 1976 par la Commission Internationale de l'Energie (CIE) (figure 4-2). La teinte étant le critère le mieux perçu par l'œil humain, il est le plus important dans l'estimation de la couleur. Elle est représentée sous la forme d'un angle dans le modèle Lab, elle est donc exprimée en degré.

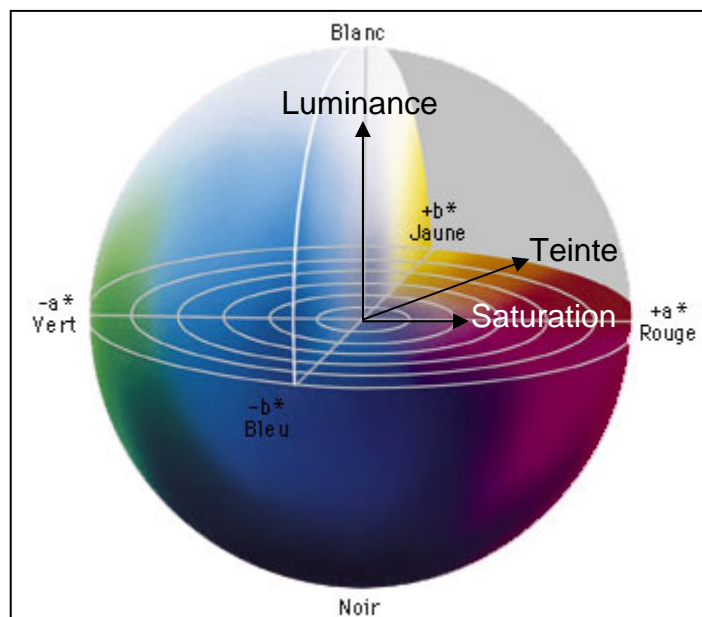


Figure 4-2. Représentation de la couleur selon le modèle Lab. Source web : www.irht.cnrs.fr.

Pour chaque plante testée, 4 fleurs prélevées si possible sur des inflorescences différentes ont été utilisées. Pour chaque fleur, la couleur des 5 pétales les plus externes a été mesurée sur la face supérieure au niveau du tiers extérieur du pétale, juste avant l'ouverture des anthères. Ainsi pour chaque plante, 20 mesures de couleur ont été réalisées. A partir de ces mesures, la moyenne a été calculée pour obtenir une valeur représentative de la couleur des fleurs pour une plante. La comparaison de la couleur des fleurs s'est faite à partir de cette valeur.

Pour l'ensemble des cultivars, les mesures de colorimétrie ont été faites après celles de planimétrie sur les mêmes plantes. Dans le cas de 'Balcon Lilas', des différences de teinte visibles à l'œil nu ont été observées avec des plantes aux fleurs lilas et des plantes aux fleurs roses. Parmi les cinq plantes issues d'une culture d'apex et les cinq plantes issues d'apex cryoconservés se trouvaient les deux coloris de fleurs. Dans ces conditions les calculs de la moyenne de la luminance, de la saturation et de la teinte n'étaient pas pertinents. C'est pourquoi, pour ce cultivar uniquement, le nombre de plantes aux fleurs lilas et le nombre de plantes aux fleurs roses ont été comptés en fonction de l'origine des plantes régénérées. Ce travail a été fait sur les plantes restantes en serre (14 plantes issues de bouture, 27 issues d'une culture d'apex et 26 issues d'apex cryoconservés). Les effectifs ont alors été comparés grâce au test statistique G.

4.2.2.4. Mesure de la quantité d'ADN dans les cellules

La stabilité de la quantité d'ADN des plantes obtenues soit par bouturage soit par culture d'apex ou d'apex cryoconservés a été vérifiée par cytométrie en flux (Cytomètre PARTEC PAII). Pour cela des échantillons de feuilles ont été préparés selon le protocole décrit en annexe 4-3. Dans la mesure du possible la quantité d'ADN a été estimée chez 5 plantes par cultivar pour chaque catégorie de plantes. De plus pour les variétés panachées l'absence de changement de quantité d'ADN entre les parties chlorophylliennes et les parties non chlorophylliennes des feuilles a été contrôlée.

4.2.2.5. Choix des cultivars virosés

Le profil viral de 22 cultivars pour le PFBV et le PLPV a été établi par la méthode de DAS-ELISA (annexe 4-4). Deux séries de tests ont pu être effectuées sur deux plantes pour chaque cultivar avec à chaque fois 2 répétitions par série, soit au total 8 tests réalisés par cultivar. En fonction de la présence des virus et de l'origine du cultivar (*P.x hortorum* ou *P.x peltatum*), 5 cultivars ont été sélectionnés pour les immunolocalisations. Deux séries de contrôle (tests ELISA) ont été aussitôt réalisées sur ces cultivars dans les mêmes conditions pour confirmer leur profil sérologique. Les plantes sélectionnées ont alors servi pour localiser les virus dans des apex non cryoconservés et des apex cryoconservés. Afin d'éviter qu'elles soient contaminées par d'autres plantes elles ont été isolées dans une serre réservée à cet effet.

4.2.2.6. Immunolocalisation

La localisation des particules virales dans les apex a été réalisée par la mise en place d'un procédé d'immunolocalisation (annexe 4-5). Cette méthode repose sur le même principe que la DAS-ELISA à savoir l'utilisation de deux anticorps, l'un dit primaire (AC1) spécifique du virus et l'autre dit secondaire (AC2) spécifique du premier anticorps. Les apex ont été découpés pour éviter des problèmes de pénétration dans les tissus des AC1 puis des AC2. Les coupes de 10 µm réalisées au cryostat (Cryostat Leica CM 3050S) ont alors été déposées sur des lames en verre préalablement traitées avec du 3-aminopropyltriéthoxysilane (annexe 4-6) pour éviter qu'elles ne se décollent au cours du procédé. A la différence de la DAS-ELISA, dans le cas d'une immunolocalisation par détection au CLSM ce n'est pas une phosphatase alcaline qui est greffée à l'anticorps secondaire mais un fluorochrome, en l'occurrence l'ALEXA Fluor 488. L'utilisation d'un marquage indirect offre plusieurs avantages, d'une part il permet une augmentation du signal par la fixation de plusieurs AC2 sur un seul AC1, d'autre part ce système est moins coûteux qu'un marquage direct car il ne nécessite pas le greffage spécifique d'un fluorochrome sur l'AC1. Par comparaison avec la DAS-ELISA, la détection via un système d'excitation d'un fluorochrome par un laser est nettement plus sensible que la réaction entre une phosphatase alcaline et son substrat.

Dans un premier temps la localisation des virus a été réalisée sur 3 apex prélevés sur les plantes en serre pour chaque cultivar choisi (plantes témoins non cryoconservées).

Dans un deuxième temps, des tests ELISA ont été effectués après environ 3 mois de culture *in vitro* sur les pousses issues soit d'une culture d'apex seule soit issues de la cryoconservation. Les pousses feuillées négatives aux tests ELISA ont alors été réutilisées pour la localisation des virus au niveau des apex (immunolocalisation). De cette manière trois interrogations ont pu être levées : quel est le seuil de détection des tests ELISA, une culture d'apex permet-elle d'assainir les plantes et enfin la cryoconservation a-t-elle un impact sur cet assainissement ?

NB : aucune pousse n'a pu être régénérée à partir du cultivar Elsie par culture *in vitro*, dans ces conditions aucune immunolocalisation n'a pu être réalisée sur les pousses issues de cryoconservation.

Pour chaque expérimentation, deux types de témoins ont été réalisés, à savoir des coupes sans l'hybridation des deux anticorps et des coupes hybridées uniquement marquées avec AC2. Le premier témoin a pour but de vérifier l'absence d'autofluorescence de même longueur d'onde que celle du fluorochrome et le deuxième témoin de s'assurer qu'il n'y a pas d'accrochage non spécifique de l'AC2.

Après avoir contrôlé la qualité des coupes et du marquage en épifluorescence, une goutte de tampon PBS a été posée sur les lames avant de déposer dessus une lamelle. L'ensemble a été ensuite lutté au vernis à ongle. Les observations ont été faites en microscopie confocale à balayage laser à différents grossissements.

Pour l'ensemble des immunolocalisations, nous avons détecté à la fois l'autofluorescence de la chlorophylle et le marquage des virus. La chlorophylle apparaît sous forme de spots rouges (figure 4-3A). Le marquage des virus apparaît en vert (figure 4-3B). La superposition des deux signaux (figure 4-3C) a permis de vérifier qu'il n'y avait pas de colocalisation entre l'autofluorescence de la chlorophylle et le marquage des virus. Dans le cas contraire, il n'aurait pas été possible de conclure sur la présence ou l'absence des virus dans les cellules. L'intensité du marquage étant proportionnelle à la quantité de virus, l'estimation des niveaux de contamination dans les différentes parties des apex a été réalisée par traitement d'image grâce au logiciel ImageJ (annexe 4-7).

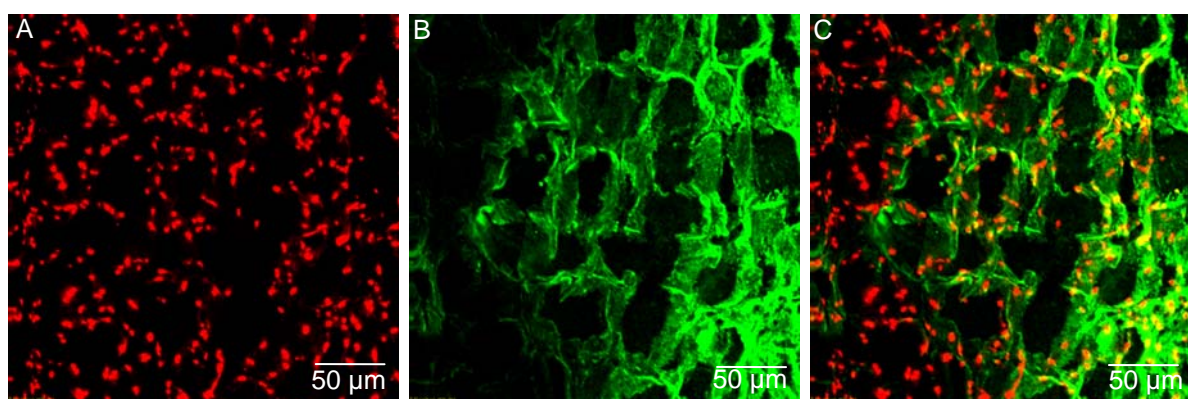


Figure 4-3. A-Autofluorescence de la chlorophylle, B-marquage spécifique d'un virus par le fluorochrome greffé sur l'anticorps spécifique du virus, C-superposition des deux images. (cultivar Elsie, virus PLPV)

4.2.2.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées de la même manière que dans le chapitre n°2 sur la proportion de variants, sur les données de planimétrie et de colorimétrie ainsi que celles de cytométrie en flux.

4.3. Résultats

4.3.1. Conformité du phénotype des feuilles de variétés panachées

4.3.1.1. Caractérisation des chimères

Les observations macroscopiques des feuilles pour les trois cultivars montrent que les panachures se répartissent de la même façon. Systématiquement, le centre des feuilles est d'une couleur et le pourtour d'une autre couleur. Etant donné, qu'il n'est pas observé de discontinuité de couleur au niveau du pourtour, nous supposons que nous sommes en présence de chimères périclinales. Ce type de chimère se caractérise au niveau du méristème par la mutation totale d'une ou plusieurs couches cellulaires contrairement aux chimères mériclines et sectorielles (Tilney-Basset, 1986).

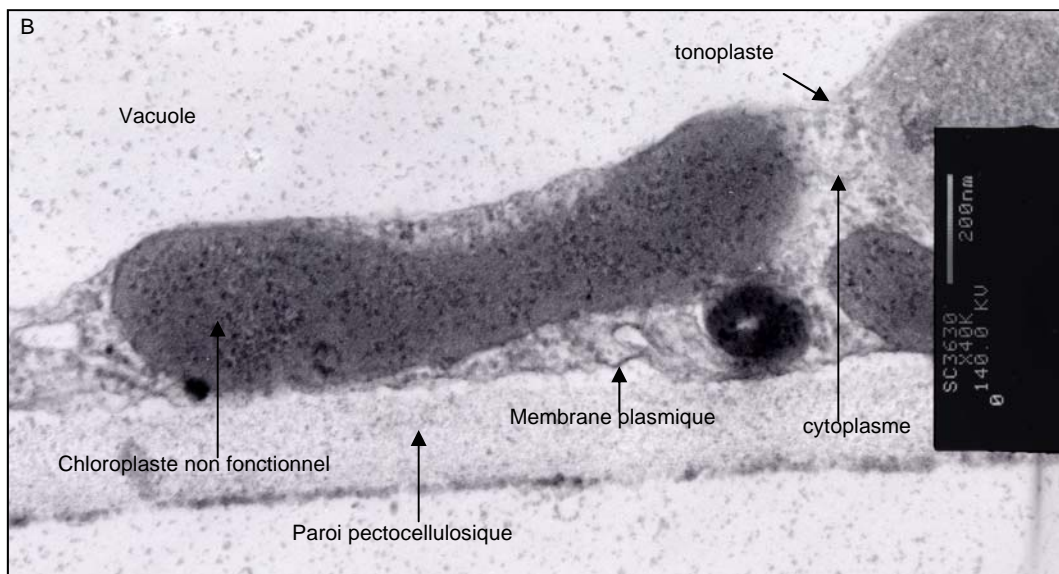
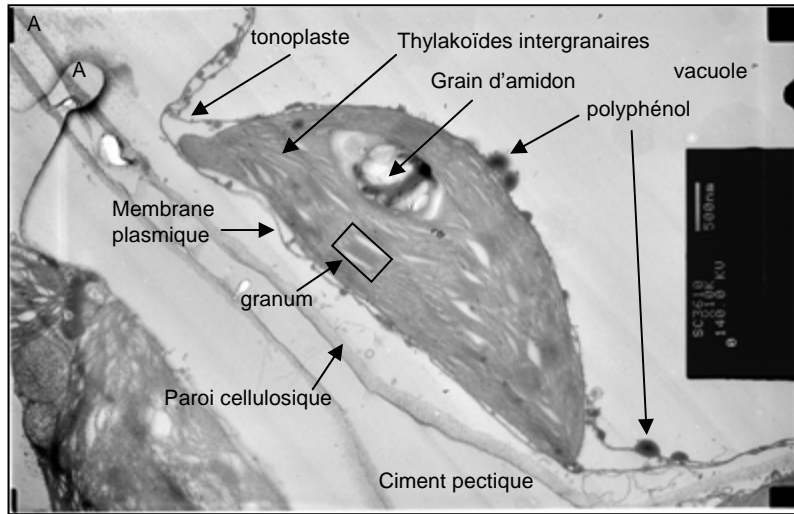


Figure 4-4. Structure interne de chloroplastes dans une partie de feuille du cultivar A Happy Thought. A-Dans une partie verte, B-Dans une partie blanche

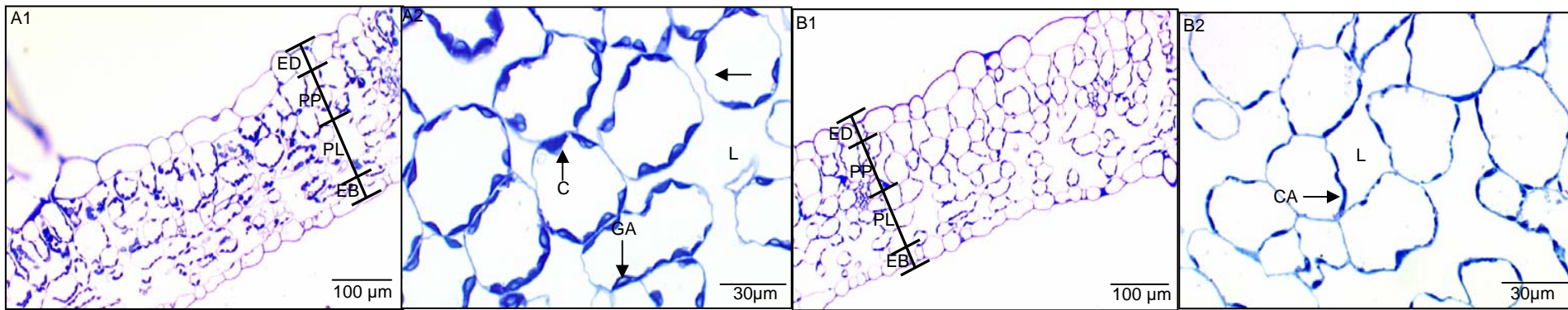


Figure 4-5. Coupes transversales de feuilles du cultivar A Happy Thought. A1 et A2- partie verte, B1 et B2 – partie Blanche. ED-Epiderme adaxial, PP-Parenchyme palissadique, PL-Parenchyme lacuneux, EB-Epiderme abaxial, L-Lacune, C-Chloroplaste, CA-Chloroplaste aplati, GA-Grain d'amidon, P-Paroi

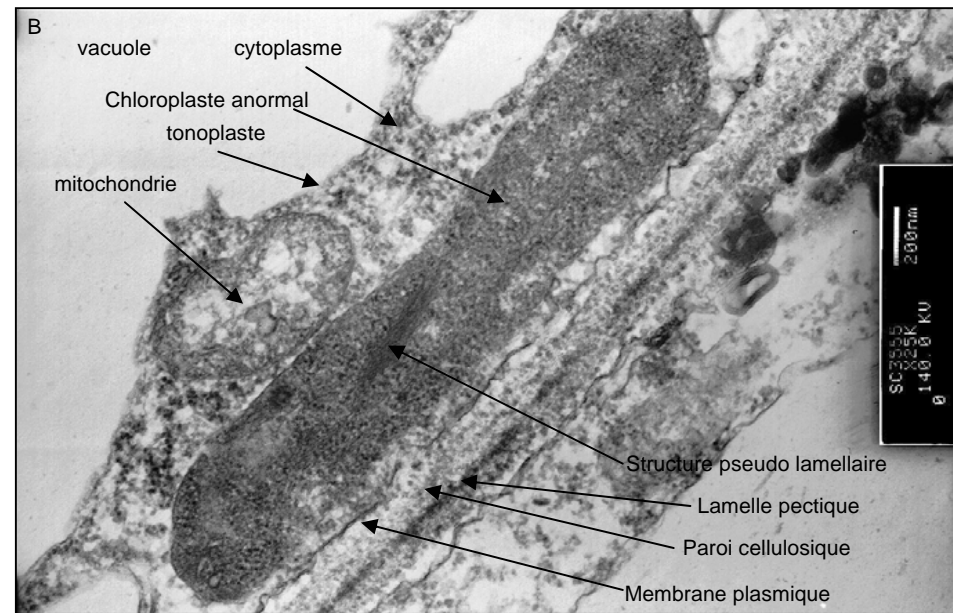
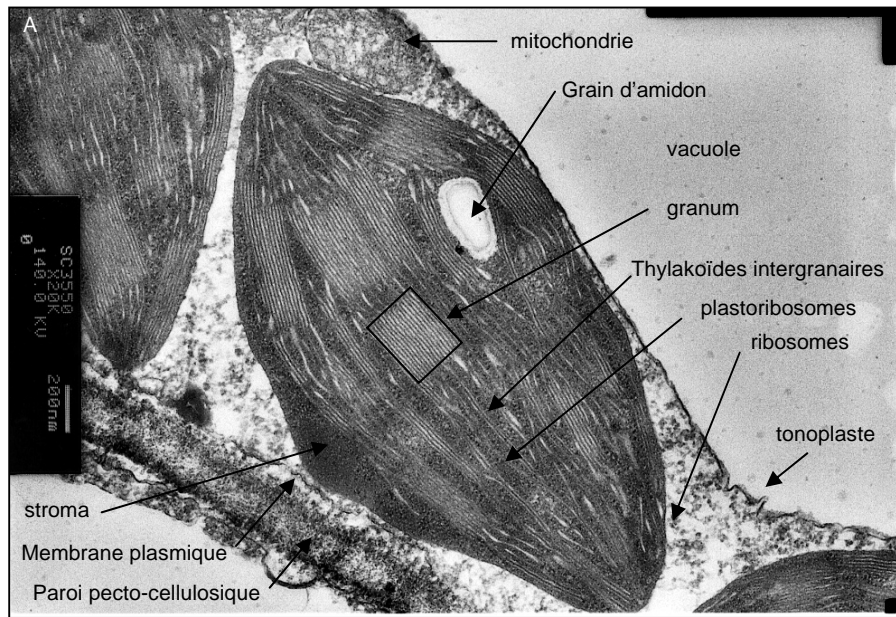


Figure 4-6. Structure interne de chloroplastes dans une partie de feuille du cultivar Panaché Sud. A-Dans une partie verte, B-Dans une partie blanche

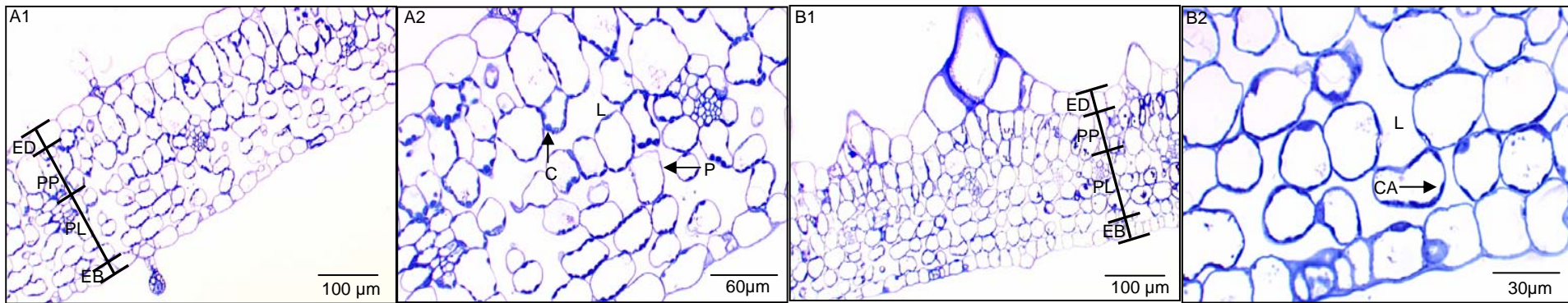


Figure 4-7. Coupes transversales de feuilles du cultivar Panaché Sud. A1 et A2- partie verte, B1et B2 – partie blanche, ED-Epiderme adaxial, PP-Parenchyme palissadique, PL-Parenchyme lacuneux, EB-Epiderme abaxial, L-Lacune, C-Chloroplaste, CA-Chloroplaste aplati, P-Paroi

Pour les trois cultivars, lors des observations en MET les chloroplastes des parties chlorophylliennes présentent une structure interne classique, où il est possible de distinguer clairement les thylakoïdes, les grana, les grains d'amidon et parfois les plastoribosomes (figures 4-4A, 4-6A et 4-9A). A l'inverse dans les parties non chlorophylliennes, les chloroplastes sont le plus souvent aplatis parfois avec une lacune à l'intérieur. Les différents éléments constitutifs tel que les thylakoïdes sont peu ou pas visibles et il n'y a pas de grana ni de grains d'amidon (figure 4-4B, 4-6B et 4-9B). Ces défauts de structure sont à l'origine de l'absence de chlorophylle dans ces parties de feuille. A partir des images de microscopie électronique, il a été possible de confirmer que les structures bleues intenses réparties le long de la membrane plasmique dans les cellules sont bien des chloroplastes. Cette distribution dans la cellule est due à la présence de la vacuole qui les repousse en périphérie. Ainsi, dans les parties chlorophylliennes les chloroplastes se présentent sous une forme pratiquement sphérique (figures 4-5A1 et A2, 4-7A1 et A2, 4-9 A1 et A2). De plus, comme chez 'A Happy Thought', une tache plus claire est parfois visible à l'intérieur de ces chloroplastes, elle correspond à la présence d'amidon (figure 4-5B). Dans les parties non chlorophylliennes, les chloroplastes non fonctionnels se présentent sous la forme de bâtonnets aplatis (figure 4-5B1 et B2 4-6B1 et B2, 4-9B1 et B2).

A partir des travaux de Tilney-Basset (1986) et des observations de la répartition dans les feuilles des cellules possédant l'un des deux types de chloroplastes il a été possible d'en déduire l'organisation des couches des méristèmes.

4.3.1.1.1. Cas des cultivars A Happy Thought et Panaché Sud

Les cultivars A Happy Thought et Panaché Sud présentant le même type de panachure, les commentaires qui vont suivre sont valables pour les deux cas.

Nos observations en MO des parties vertes montrent que toutes les cellules du mésophylle sous-épidermique possèdent des chloroplastes normaux et que l'épiderme est toujours non chlorophyllien (figure 4-4 A, 4-5A1 et A2, 4-6 A, 4-7A1 et A2). Etant donné que la couche L2 des méristèmes est à l'origine du mésophylle sous-épidermique, nous pouvons en déduire que L2 est de type G. L'absence de chlorophylle dans l'épiderme est classique chez de nombreux végétaux par conséquent il n'est pas possible de savoir si L1 est de type G ou W. Or il arrive de temps en temps que se développe une branche albinos chez une plante, l'observation de ces feuilles a montré qu'il existait parfois de petits patchs verts sur la frange. Ces patchs sont dus à une désorganisation ponctuelle des cellules épidermiques de la couche L1, les cellules en se divisant se mettent à produire du mésophylle chlorophyllien (Stewart et Burk, 1970). De cette observation nous pouvons conclure que la couche L1 est de type G.

Pour que la partie centrale apparaisse blanche, il est nécessaire que l'ensemble des cellules du mésophylle interne possède des chloroplastes anormaux (L3). Cette condition a bien été confirmée par nos observations (figure 4-5B1 et B2 et 4-7B1 et B2). Les cellules du mésophylle interne étant issues des couches L2 et L3 dans cette partie, il semble logique que les L2 et L3 soient de type W. Or nous avons vu que L2 est de type G, dans ces conditions le centre des feuilles devrait apparaître vert clair et le pourtour vert foncé. La partie centrale étant bien blanche cela suppose que L2 est de type W à cet endroit et de type G sur le pourtour des feuilles. Ce système est impossible dans le cas d'une structure péricline. L2 ne peut être que de type G et L3 de type W. L'absence de coloration au niveau de la partie blanche serait due en fait à des effets (épigénétiques) des cellules issues de L3 sur les autres cellules, elles bloqueraient la synthèse de chlorophylle et/ou le développement des chloroplastes dans les couches cellulaires adjacentes issues de L2 (figure 4-5B1 et B2 et 4-7B1 et B2) (Tilney-Basset, 1986).

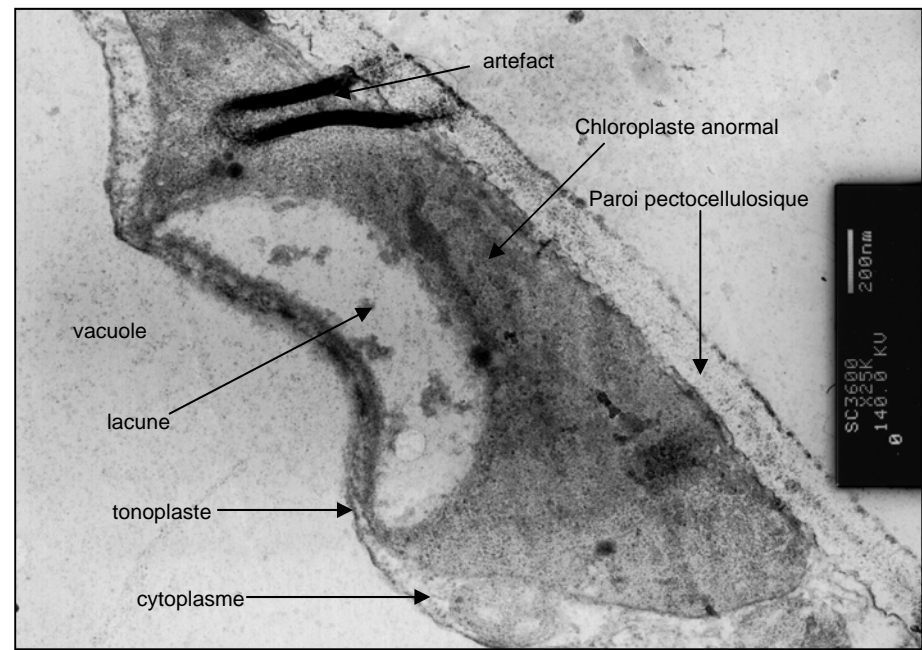
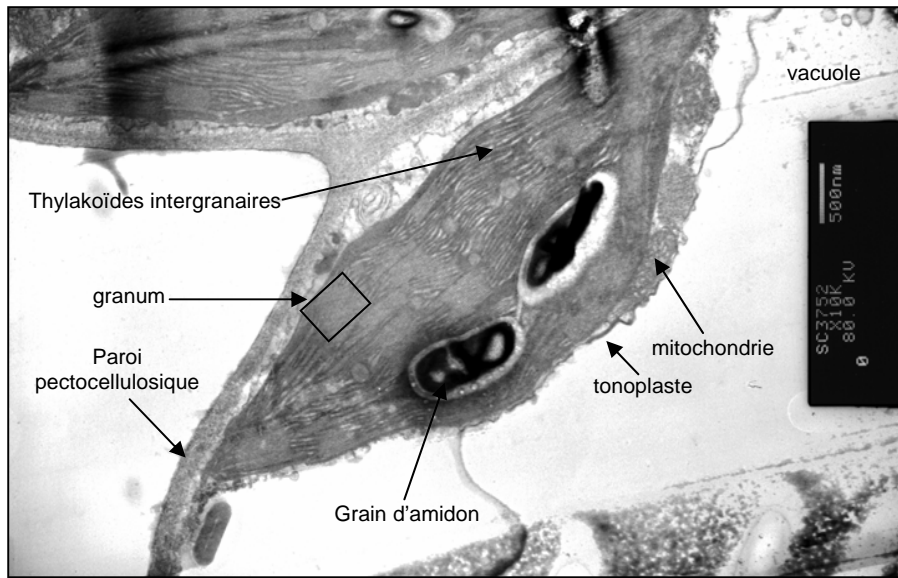


Figure 4-9. Structure interne de chloroplastes dans une partie de feuille du cultivar Panaché. A-Dans une partie verte, B-Dans une partie blanche

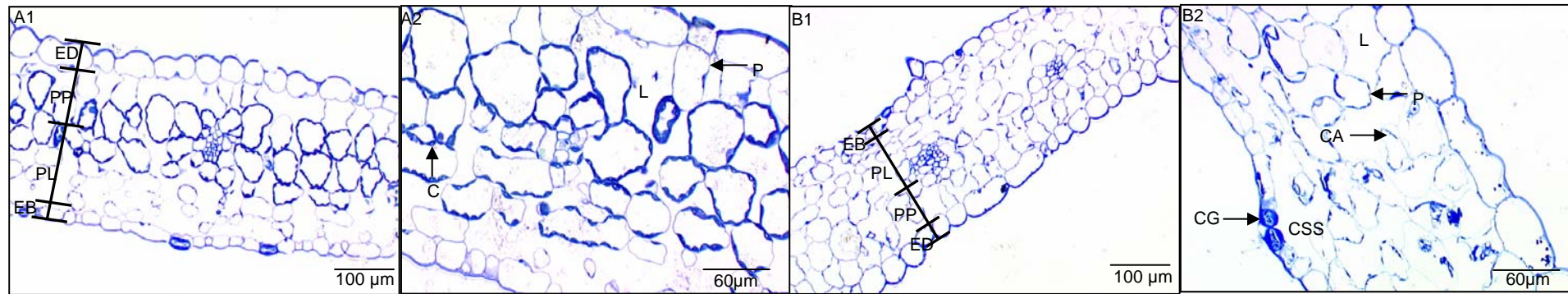


Figure 4-10. Coupes transversales de feuilles du cultivar Panaché. A1 et A2- partie verte, B1 et B2 – partie Blanche, ED-Epiderme adaxial, PP-Parenchyme palissadique, PL-Parenchyme lacuneux, EB-Epiderme abaxial, L-Lacune, C-Chloroplaste, CA-Chloroplaste aplati, P-Paroi, CG-Cellule de garde, CSS- Chambre sous-stomatique

Par conséquent, les méristèmes de A Happy Thought et Panaché Sud ont une structure de type GGW, mais avec une régulation altérée dans la partie centrale de L2 (figure 4-8).

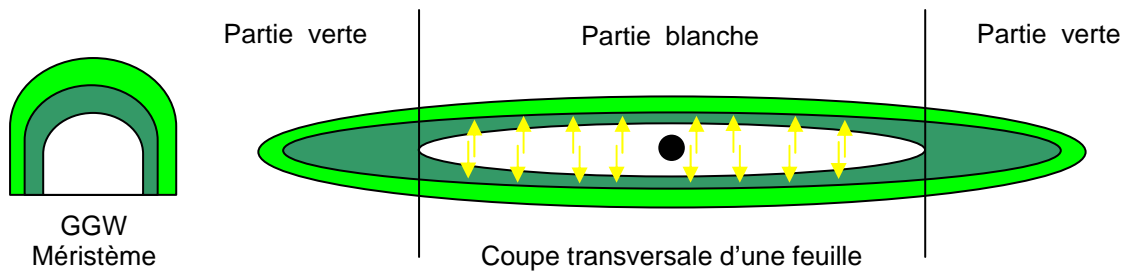


Figure 4-8. Représentation schématique de la structure interne d'un méristème et d'une feuille pour les cultivars A Happy Thought et Panaché Sud. Les flèches jaunes représentent l'influence des cellules du mésophylle interne issues de L3 sur les cellules du mésophylle sous épidermique issues de L2.

Ces deux cultivars possédant la même structure chimérique, nous avons décidé de ne garder que le cultivar A Happy Thought pour les autres études et seul son cas sera traité dans la discussion.

4.3.1.1.2. Cas du cultivar Panaché

Pour ce qui concerne 'Panaché', nous observons dans la partie chlorophyllienne au centre des feuilles que seules les cellules du mésophylle interne donc issues de L3 contiennent des chloroplastes normaux (figure 4-9A, 4-10A1 et A2). Les cellules du mésophylle sous-épidermique issues de L2 non seulement ne contiennent que des chloroplastes anormaux (figure 4-9B) mais en plus présentent une forme beaucoup plus anguleuse que les cellules du mésophylle interne (figure 4-9 B1 et B2). Nous pouvons déduire de ces observations que L3 est de type G, et L2 de type W. Le type de L2 a été confirmé par les observations des parties périphériques blanche là où il n'y a pas de L3 (figure 4-10 B1 et B2). En effet, dans ces parties les cellules du mésophylle sous-épidermique possèdent toutes des chloroplastes anormaux. Quant à la couche L1 à l'origine de l'épiderme, pour les mêmes raisons que précédemment, la présence de patches verts chez des feuilles blanches prouve la nature G de celle-ci.

Les méristèmes du cultivar 'Panaché' ont donc une structure dite en sandwich de type GWG (figure 4-11).

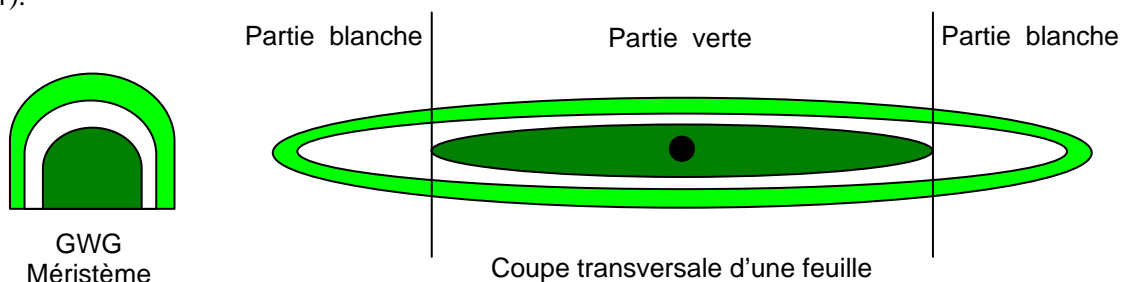


Figure 4-11. Représentation schématique de la structure interne d'un méristème et d'une feuille du cultivar 'Panaché'.

Branche aux feuilles vertes



Cultivar Panaché Sud



Cultivar A Happy Thought

Branche aux feuilles albinos



Cultivar Panaché 222

Figure 4-12. Exemples de variations phénotypiques chez des cultivars panachés

4.3.1.2. Variations possibles du phénotype chez les cultivars panachés

A plusieurs reprises nous avons pu observer chez des plantes en serre, l'apparition de variations phénotypiques ponctuelles chez les cultivars chimériques décrits ci-dessus (figure 4-12). Le développement de branches non conformes est la conséquence du doublement et le remplacement d'une des trois couches cellulaires lors du débourrement d'un bourgeon axillaire.

Ainsi nous pouvons distinguer les variations suivantes pour des méristèmes de type GGW avec les conséquences que cela entraîne sur la couleur des feuilles (figure 4-13).

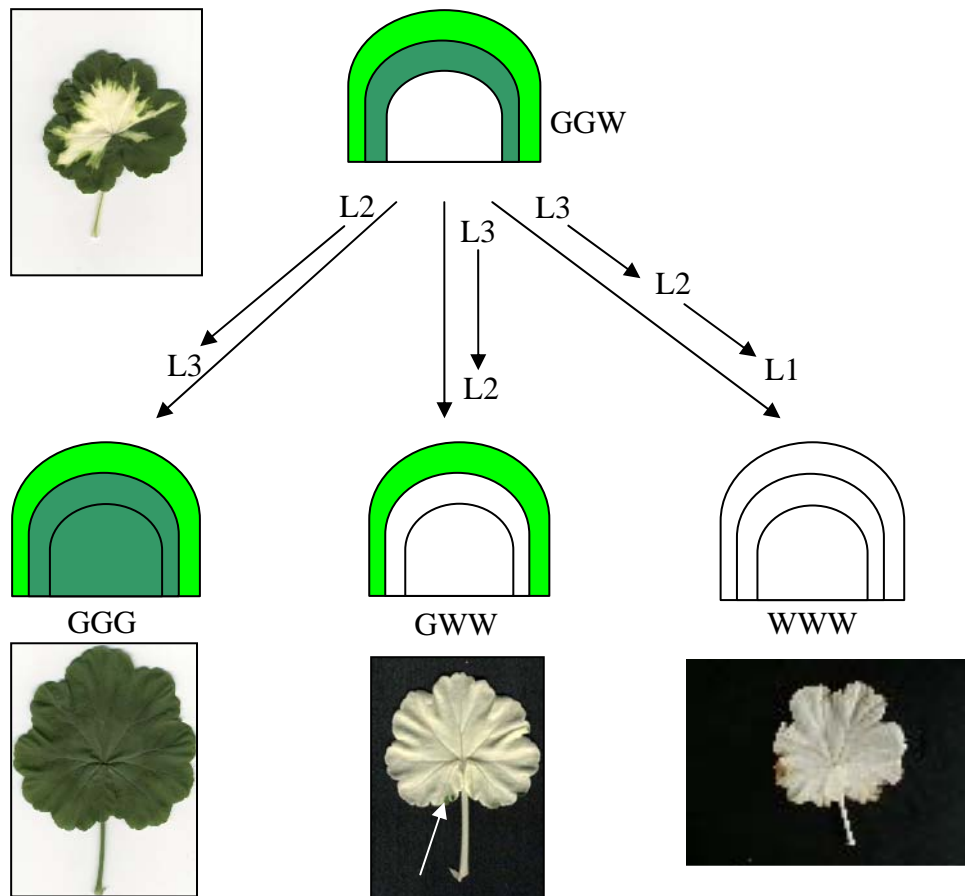


Figure 4-13. Schéma représentant les variations possibles dans l'agencement des couches cellulaires au niveau du méristème des cultivars 'A Happy Thought' et 'Panaché Sud' et de leurs conséquences sur le phénotype. La flèche indique la présence d'un patch vert.

Comme pour des méristèmes de type GGW, des variations ont été observés chez le cultivar ‘Panaché’ issu d’un méristème GWG (figure 4-14).

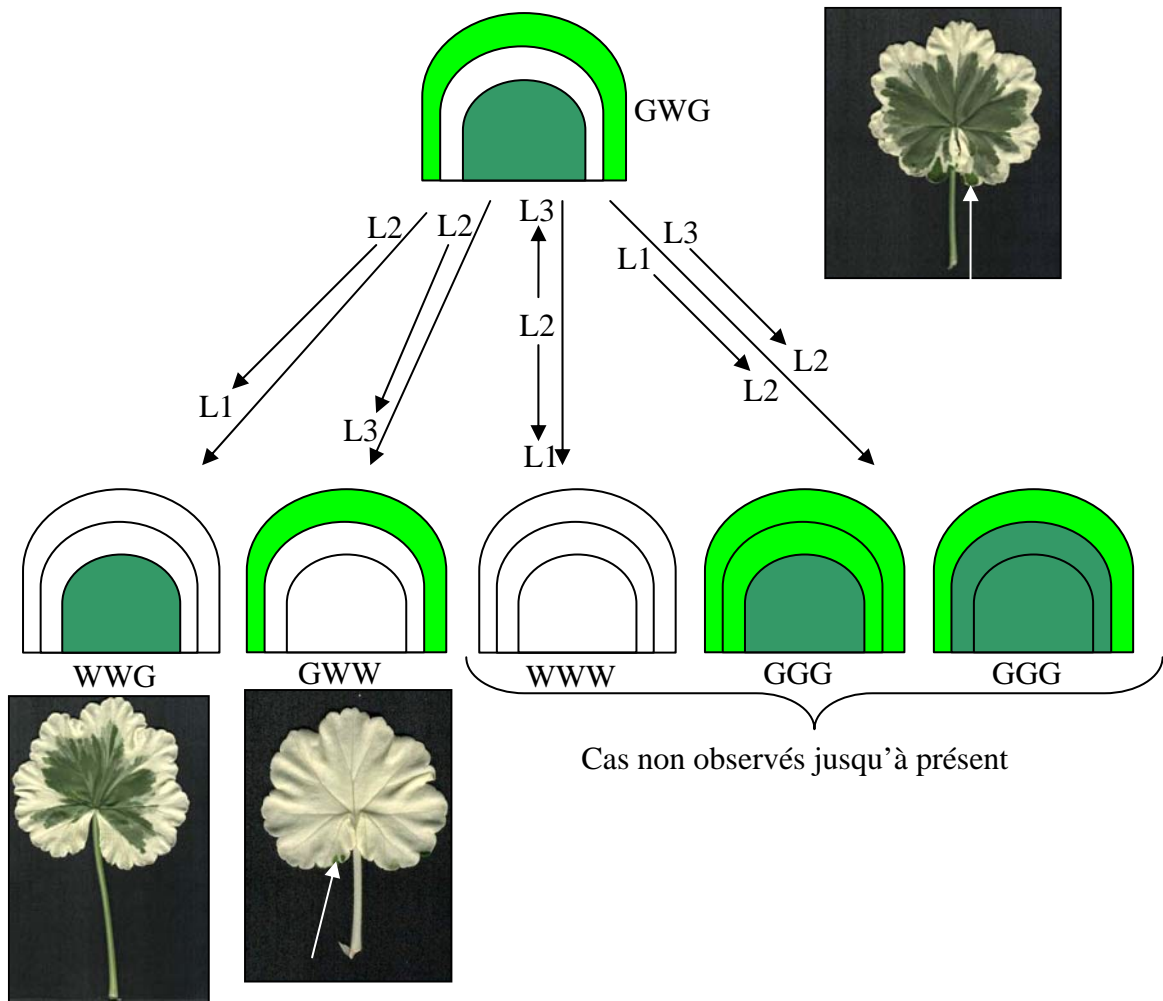


Figure 4-14. Schéma représentant les variations possibles dans l'agencement des couches cellulaires au niveau du méristème du cultivar 'Panaché' et de leurs conséquences sur le phénotype. La flèche indique la présence d'un patch vert.

4.3.1.3. Proportion de variants chez les plantes régénérées des cultivars A Happy Thought, Balcon Lilas, Panaché, et Renard bleu

Un nombre différent de plantules a été utilisé au cours de ces expériences pour chaque cultivar en raison de taux de régénération et de « duplication » différents entre les cultivars. Ainsi 36 jeunes plants ont été observés pour 'A Happy Thought', 53 pour 'Panaché', 85 pour 'Renard bleu' et 160 pour 'Balcon Lilas'.

En serre les plantes issues de bouturage pour les cultivars non panachés Renard Bleu et Balcon Lilas ne présentent pas de différences phénotypiques. A l'inverse pour les deux cultivars panachés A Happy Thought et Panaché certaines plantes présentent parfois des branches non conformes totalement dépourvues de panachure ou complètement albinos (figure 4-12). Toutefois la proportion de plantes conformes est nettement plus élevée que celle de plantes non conformes (environ 27 % pour le cultivar A Happy Thought, environ 16 % pour le cultivar Panaché).

La comparaison des pousses issues soit d'une culture d'apex simple (témoins) soit de la cryoconservation par « droplet-vitrification » met en évidence plusieurs faits. Ainsi pour 'Renard Bleu', aucune différence de coloration des feuilles n'est observée dans les deux cas. A l'inverse, nos résultats (figure 4-15) montrent que pour les deux cultivars panachés et pour 'Balcon Lilas' (figure 4-16), la régénération de plantes à partir d'une culture d'apex engendre l'apparition de variants. Pour les deux cultivars panachés, les variants sont même majoritaires par rapport aux plantes panachées avec 86 % de plantes vertes pour 'A Happy Thought' et 55 % pour 'Panaché'. Normalement complètement vert, 'Balcon Lilas' présente environ 20 % de plantes panachées.

Comme pour les plants issus d'apex témoins, des variations sont observées chez les plants issus d'apex cryoconservés sauf chez 'Renard Bleu'. En revanche, la proportion de variants demeure inchangée pour les cultivars A Happy Thought (environ 80 % de plantes vertes et 20 % de plantes panachées) et Balcon Lilas (environ 80% de plantes vertes et 20 % de plantes panachées). Par opposition la cryoconservation engendre une augmentation du nombre de variants chez le cultivar Panaché puisque toutes les plantes régénérées ont perdu ce caractère au profit de plantes au feuillage vert (84,6 %) et de plantes albinos (15,4 %).

Au vu de ces résultats, l'expression de variations phénotypiques est fonction du cultivar, du type de chimère et de l'origine de la plante (bouture, culture d'apex, apex cryoconservé). De plus il apparaît, que prélever des apex et les mettre en culture est, plus que la cryoconservation, le facteur principal de variation phénotypique.

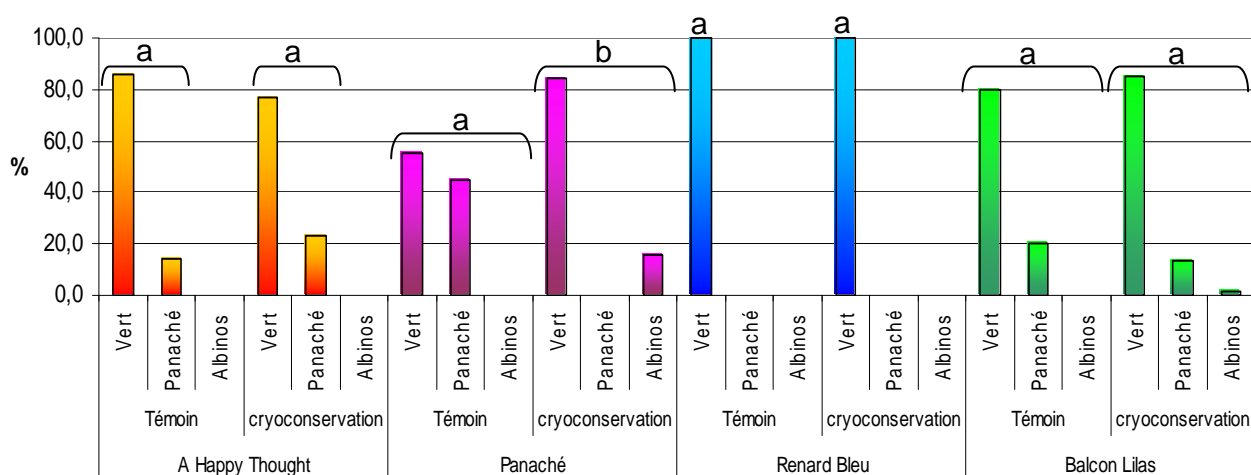


Figure 4-15. Variabilité du phénotype des plantes régénérées de quatre cultivars en fonction de l'origine des apex. Les lettres identiques indiquent l'absence de différences significatives d'après le test statistique G au seuil de 5 % entre des plantes issues d'une culture d'apex (témoins) et des plantes issues d'apex cryoconservés pour chaque cultivar. Les analyses statistiques sont indépendantes entre les cultivars.

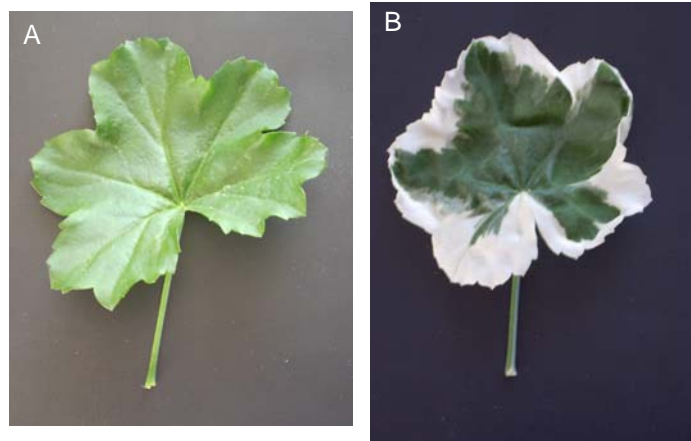


Figure 4-16. A- feuille du cultivar 'Balcon Lilas', B- feuille panachée du cultivar 'Balcon Lilas'

4.3.2. Contrôle du maintien de caractères phénotypiques et de la quantité d'ADN dans les cellules

4.3.2.1. Mesures des caractères morphologiques des feuilles

Les mesures réalisées ont eu pour but de vérifier s'il n'y avait pas de changement dans la forme et la taille des feuilles en fonction de l'origine des plantes régénérées. La mesure du coefficient de corrélation entre un cercle parfait et la forme des feuilles montre qu'il n'existe pas de déformation des feuilles en fonction de l'origine des plantes quel que soit le cultivar (tableau 4-2). Aucun effet significatif de la culture *in vitro* n'est mis en évidence pour la taille des feuilles (surface et périmètre) entre des plantes issues de bouturage ou des plantes issues d'une culture d'apex pour les cultivars où cette mesure a pu être faite. En particulier, nous n'observons pas d'effet vigueur de la culture *in vitro* puisque pour certains cultivars les feuilles sont soit plus grandes ('A Happy thought' et 'Cahors') soit plus petites ('Balcon Lilas', 'Renard Bleu' et 'Stellar Artic').

A l'issue de la cryoconservation deux cultivars ont des tailles de feuilles significativement différentes. Ainsi pour 'Berg Palais', les feuilles sont environ deux fois plus petites que chez des plantes issues de bouture, tandis que chez 'Cahors' c'est l'inverse, les feuilles sont environ 30% plus grandes (tableau 4-2) par rapport à celles des plantes issues de bouturage ou d'une culture d'apex. En revanche pour les quatre autres cultivars (A Happy Thought, Balcon Lilas, Cahors et Renard Bleu) aucune modification de taille des feuilles ne peut être imputable à la cryoconservation. Dans ces conditions il semble que la « droplet-vitrification » a un impact modéré sur la taille des feuilles.

Tableau 4-2. Valeurs du coefficient de corrélations du cercle parfait des feuilles, de la surface, du périmètre et. Les P-value correspondent aux résultats de l'analyse de variance. Une lettre identique indique qu'il n'y a pas de différences significatives selon le test statistique de Duncan au seuil de 5%. Les analyses statistiques sont indépendantes entre les cultivars. Le trait signifie l'absence de plante.

		Cercle parfait		surface (cm ²)		Périmètre (cm)	
		moyenne ± ET		moyenne ± ET		moyenne ± ET	
	P-value		0,1963		0,1249		0,0619
A Happy thought	Bouture	0,91 ± 0,01	a	78,8 ± 17,6	a	32,8 ± 3,6	a
	Culture d'apex	0,81 ± 0,16	a	99,8 ± 26,5	a	40,4 ± 11,6	a
	Cryoconservation	0,72 ± 0,23	a	115,6 ± 37	a	48,3 ± 20,9	a
	P-value		0,2452		0,4182		0,3045
Balcon Lilas	Bouture	0,80 ± 0,06	a	51,7 ± 10	a	28,4 ± 3	a
	Culture d'apex	0,86 ± 0,05	a	45 ± 20	a	25,2 ± 5,5	a
	Cryoconservation	0,85 ± 0,01	a	37,4 ± 10,5	a	23,3 ± 3,5	a
	P-value		0,0533		0,0009		0,0039
Berg Palais	Bouture	0,74 ± 0,17	a	132,9 ± 31,7	a	48,4 ± 11,4	a
	Culture d'apex	-	-	-	-	-	-
	Cryoconservation	0,92 ± 0,02	a	53,5 ± 14,4	b	26,9 ± 3,8	b
	P-value		0,5966		0,0382		0,0492
Cahors	Bouture	0,91 ± 0,03	a	59,2 ± 18,6	a	28,2 ± 4,9	a
	Culture d'apex	0,89 ± 0,03	a	63,8 ± 17,3	a	29,9 ± 4,5	a
	Cryoconservation	0,89 ± 0,05	a	86,9 ± 9,6	b	34,9 ± 1,3	b
	P-value		0,5595		0,6324		0,6168
Renard Bleu	Bouture	0,90 ± 0,02	a	90,1 ± 11	a	35,3 ± 2,2	a
	Culture d'apex	0,90 ± 0,01	a	82,6 ± 7,1	a	33,8 ± 1,6	a
	Cryoconservation	0,89 ± 0,04	a	76,5 ± 30,6	a	32,1 ± 7,1	a
	P-value		0,9101		0,2087		0,2985
Stellar Artic	Bouture	0,70 ± 0,05	a	26,4 ± 6,1	a	21,7 ± 3,2	a
	Culture d'apex	0,69 ± 0,05	a	20,1 ± 5,6	a	19 ± 2,7	a
	Cryoconservation	0,69 ± 0,02	a	24,1 ± 3,9	a	20,8 ± 1,9	a

4.3.2.2. Estimation de la couleur des fleurs

Cas du cultivar Balcon Lilas :

Il apparaît que la multiplication par bouturage n'a pas d'impact sur le colori des fleurs puisque toutes les plantes présentent des fleurs lilas conformes aux caractéristiques de ce cultivar (figure 4-17). En revanche, le prélèvement d'apex a un impact négatif sur la conformité de la couleur des fleurs puisque de nombreuses plantes aux fleurs roses sont observées. Le même constat a aussi pu être aussi fait concernant les plantes issues d'apex cryoconservés. Néanmoins, il n'y a pas de différence significative entre les plantes issues d'une culture d'apex et des plantes issues d'apex cryoconservés (figure 4-17). Nous pouvons donc en déduire que le facteur principal de variation de la couleur des fleurs est la culture *in vitro*.

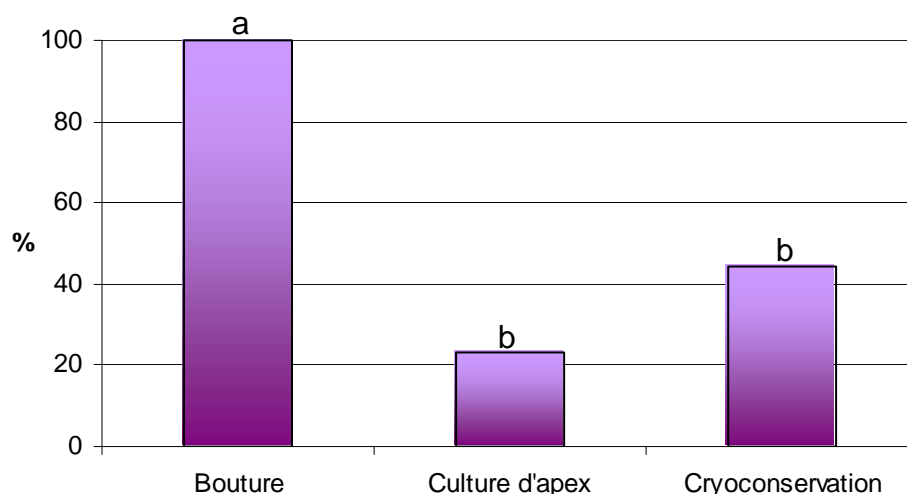


Figure 4-17. Proportion fleurs couleur lilas du cultivar Balcon Lilas en fonction de l'origine des plantes régénérées. Les lettres identiques indiquent l'absence de différences significatives d'après le test statistique G au seuil de 5 %.

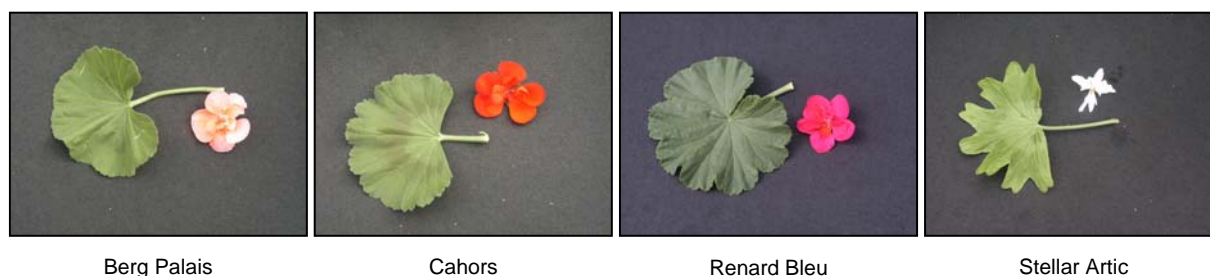


Figure 4-18. Coloris des fleurs des cultivars utilisés pour les mesures de colorimétrie

Pour les cultivars où aucune différence de couleur n'est visible à l'œil nu, les mesures de la teinte, de la luminance et de la saturation ont été réalisées. Il faut noter que 'A Happy Thought' n'apparaît pas dans le tableau 4-3 car au moment des mesures de colorimétrie, seules les plantes issues du bouturage étaient en fleur.

Logiquement, les résultats des trois paramètres mesurés diffèrent entre les quatre cultivars restants (Berg Palais, Cahors, Renard Bleu, Stellar Artic). Par exemple la teinte des plantes issues de bouturage varie de 21,1° (saumon) pour 'Berg Palais' à 355,5° (violet) pour 'Renard Bleu'.

Aucune variation de la luminance n'est détectée en fonction de l'origine des plantes régénérées quel que soit le cultivar. En ce qui concerne la saturation, seules les plantes issues d'une culture d'apex chez 'Stellar Artic' présentent une saturation plus forte que pour les deux autres type de plantes. Dans tous les autres cas la saturation demeure identique entre les types de plantes d'un même cultivar. Des changements dans la teinte des fleurs sont observés uniquement chez 'Berg Palais' et 'Stellar Artic'. Dans le cas de 'Berg Palais', l'absence de plantes issues d'une culture d'apex ne permet pas de savoir si la cryoconservation a un impact sur la teinte des fleurs. En revanche, pour le cultivar 'Stellar Artic', comme pour 'Balcon lilas', aucun effet supplémentaire de la cryoconservation n'est détecté.

Aucun changement de couleur imputable à la cryoconservation n'a été mis en évidence. En effet, l'ensemble des résultats montre que les changements de couleur en fonction de l'origine des plantes sont dus plus à la culture *in vitro* des apex qu'à la cryoconservation elle-même.

Tableau 4-3. Evolution de la luminance, de la saturation et de la teinte en fonction de l'origine des plantes régénérées. Les P-value correspondent aux résultats de l'analyse de variance. Une lettre identique qu'il n'y a pas de différences significatives selon le test statistique de Duncan au seuil de 5%. Les analyses statistiques sont indépendantes entre les cultivars. Le trait signifie l'absence de plante.

		Luminance		Saturation		Teinte (en degré)	
		moyenne ± ET		moyenne ± ET		moyenne ± ET	
	P-value		0,9254		0,841		0,0393
Berg Palais	Bouture	51,9 ± 7,3	a	48,1 ± 7,8	a	21,1 ± 0,5	a
	Culture d'apex	-	-	-	-	-	-
	Cryoconservation	51,6 ± 2,9	a	48,9 ± 3,1	a	23 ± 1,6	b
	P-value		0,3969		0,7032		0,4204
Cahors	Bouture	34,2 ± 3,4	a	65,4 ± 6,2	a	29,5 ± 1,8	a
	Culture d'apex	34,6 ± 0,7	a	63,1 ± 3,7	a	27,9 ± 1,1	a
	Cryoconservation	34,4 ± 0,9	a	63,3 ± 3,2	a	28,4 ± 2,2	a
	P-value		0,4142		0,6354		0,6422
Renard Bleu	Bouture	33,6 ± 2,5	a	58 ± 5,3	a	355,5 ± 0,9	a
	Culture d'apex	30,8 ± 1,3	a	54 ± 1,4	a	354,8 ± 0,6	a
	Cryoconservation	32,2 ± 2,6	a	56 ± 5,4	a	355,7 ± 1,4	a
	P-value		0,0603		0,0372		0,0118
Stellar Artic	Bouture	78,5 ± 0,6	a	2,1 ± 0,2	a	84,5 ± 6,4	a
	Culture d'apex	77,5 ± 0,8	a	2,4 ± 0,2	b	72,5 ± 7,7	b
	Cryoconservation	78,4 ± 0,5	a	2,1 ± 0,1	a	68,4 ± 7,8	b
	P-value		0,0603		0,0372		0,0118

4.3.2.3. Estimation de la quantité d'ADN dans les cellules

La quantité d'ADN dans les cellules a été déterminée par rapport à celle du Pois (Base 100 sur les graphiques). Des quantités différentes d'ADN ont été observées en fonction du cultivar ainsi Berg Palais possède un pic vers 25 et Cahors vers 50 (figure 4-19) ce qui correspond au fait ces deux cultivars de *P. x hortorum* sont respectivement diploïde et tétraploïde. Les variations de la quantité d'ADN observées n'étant pas significativement différentes en fonction du type de plantes (tableau 4-4) pour tous les cultivars, nous pouvons considérer que ni une culture d'apex ni la cryoconservation n'a eu d'impact sur la ploïdie des plantes régénérées.

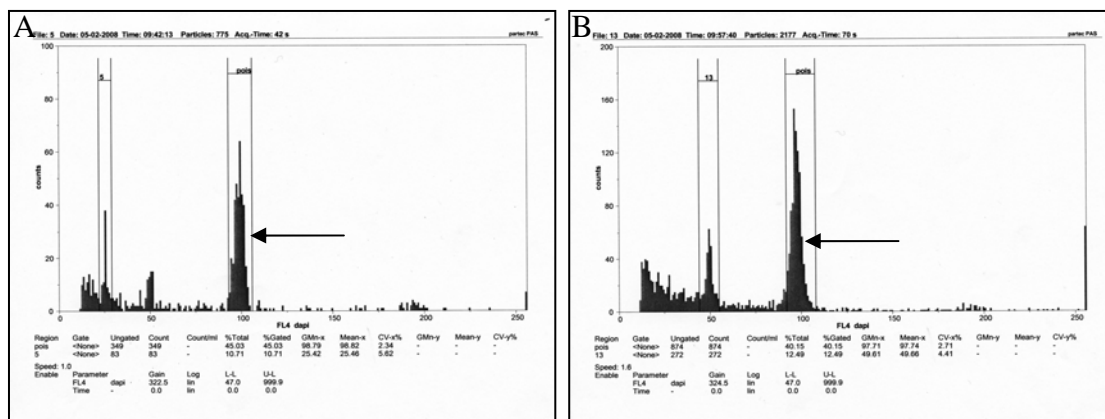


Figure 4-19. Exemples de quantité d'ADN contenue dans les feuilles par comparaison à celle du pois (*Pisum sativum*). A- Chez 'Berg Palais', B- Chez 'Cahors'. La flèche indique la référence interne (pois).

Tableau 4-4. Répartition des plantes régénérées en fonction de leur niveau de ploïdie. A : plante avec la même quantité d'ADN – B : plante ayant une quantité différente de celles de A. Une lettre identique indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les types de plantes pour un même cultivar selon le test statistique G. Les analyses statistiques sont indépendantes entre les cultivars.

		A	B	Test G
	Bouture	4	1	a
A Happy Thought	Culture d'apex	7	2	a
	Cryoconservation	5	2	a
	Bouture	5	0	b
Balcon Lilas	Culture d'apex	5	0	b
	Cryoconservation	4	1	b
	Bouture	5	0	c
Berg Palais	Culture d'apex	-	-	-
	Cryoconservation	5	0	c
	Bouture	5	0	d
Cahors	Culture d'apex	4	0	d
	Cryoconservation	5	0	d
	Bouture	5	0	e
Renard Bleu	Culture d'apex	0	2	e
	Cryoconservation	2	3	e
	Bouture	4	1	f
Stellar Artic	Culture d'apex	2	3	f
	Cryoconservation	2	3	f

4.3.3. Evolution du profil sérologique des cultivars

4.3.3.1. Choix des cultivars virosés

Parmi les 22 cultivars, nous avons choisi les cultivars de *P. x hortorum* Berg Palais, Cahors, Elsie, Stellar Artic et le cultivar de *P. x peltatum* Balcon Rouge en fonction des résultats des tests ELISA (tableau 4-5). Parmi les *P. x peltatum*, seul le cultivar Balcon Rouge a été sélectionné, les autres cultivars possédant soit le même profil sérologique soit des résultats non concordants entre les séries de tests ELISA.

Tableau 4-5 : Profil sérologique des cinq cultivars choisis au cours des quatre tests ELISA

Cultivar	espèce	PFBV				PLPV			
		test 1	test 2	test 3	test 4	test 1	test 2	test 3	test 4
Berg Palais	<i>P. x hortorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Cahors	<i>P. x hortorum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
Elsie	<i>P. x hortorum</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
Stellar Artic	<i>P. x hortorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Balcon Rouge	<i>P. x peltatum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-

4.3.3.2. Immunolocalisations des virus dans les apex

Après avoir vérifié la qualité des coupes par microscopie, il s'est avéré qu'au niveau de la zone sous méristématique, la structure des cellules est altérée par la coupe, le cytoplasme déchiré est alors plaqué sur le pourtour de la cellule. De fait les virus situés dans le cytoplasme se retrouve en périphérie de la cellule. L'autofluorescence de la chlorophylle apparaît sous forme de spots rouges, chaque spot correspondant en fait à l'emplacement d'un chloroplaste. Le marquage des virus lui apparaît en vert soit sur le pourtour des cellules différenciées soit au niveau de l'ensemble du cytoplasme dans les cellules méristématiques.

4.3.3.2.1. Exemples d'une coupe témoin sans anticorps et d'une coupe témoin avec uniquement l'anticorps secondaire

Comme nous pouvons le voir sur la figure 4-20A et B, la présence de chlorophylle dans les apex n'est pas la même partout. On distingue des parties totalement dépourvue d'autofluorescence notamment dans la zone cambiale (figure 4-20A). En revanche au niveau du dôme méristématique la présence de chlorophylle donc de chloroplastes fonctionnels, n'est pas automatique. Ainsi nous voyons figure 4-20A que le méristème est autofluorescent tandis qu'il ne l'est pas sur la figure 4-20B.

Le témoin sans AC I mais avec uniquement l'AC II a pour but de vérifier que l'AC II ne se fixe pas de manière non spécifique sur l'apex (figure 4-20B). Les quelques taches vertes que nous observons correspondent à des artefacts (figure 4-20B). En effet, il n'est pas rare d'avoir de petits débris sur les coupes d'apex, ils apparaissent soit sous forme de taches noires soit au contraire sous la forme de taches colorées (rouges ou vertes) souvent très intenses.

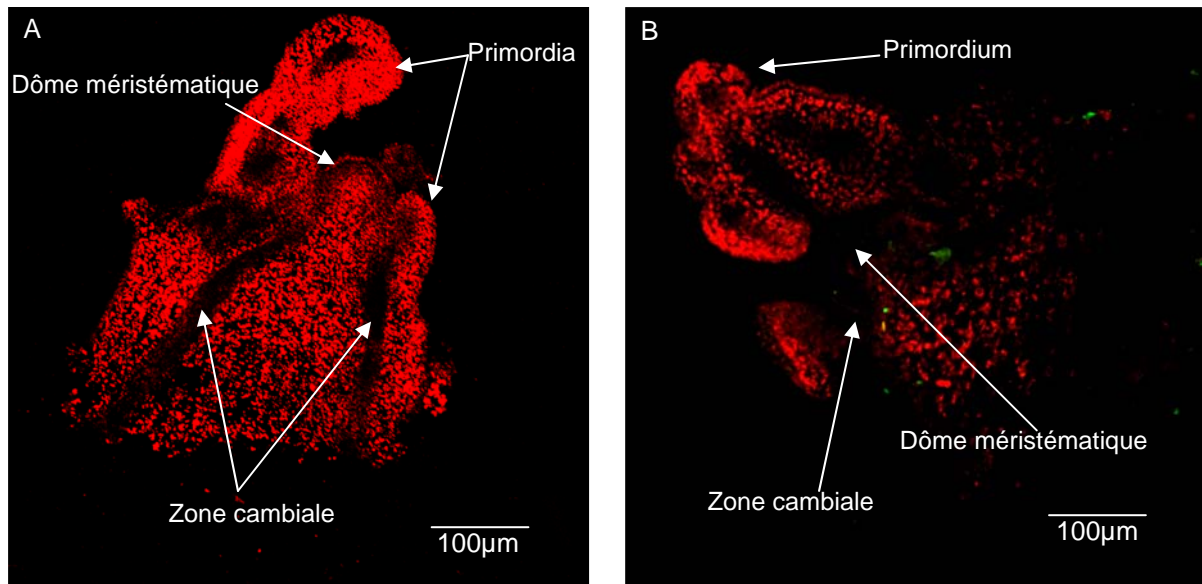


Figure 4-20. A-Témoin sans les anticorps I^{re} et II^{re}, B-Témoin sans l'anticorps I^{re} mais avec l'anticorps II^{re}. Cultivar Balcon Rouge.

4.3.3.2.2. Cas du cultivar témoin *P. x hortorum* 'Berg Palais'

Le cultivar Berg Palais est le seul cultivar où la présence du PLPV et du PFBV n'a pas été détectée lors des quatre séries de tests ELISA. Les immunolocalisations faites sur ce cultivar ont pour but de déterminer si le seuil de détection des virus est plus élevé que celui des tests ELISA. Ainsi, la détection du PLPV lors des immunolocalisations, s'est avérée positive avec la visualisation d'un léger marquage vert au niveau de l'apex (figure 4-21A) contrairement au PFBV où il n'y a pas de marquage spécifique (figure 4-21B).

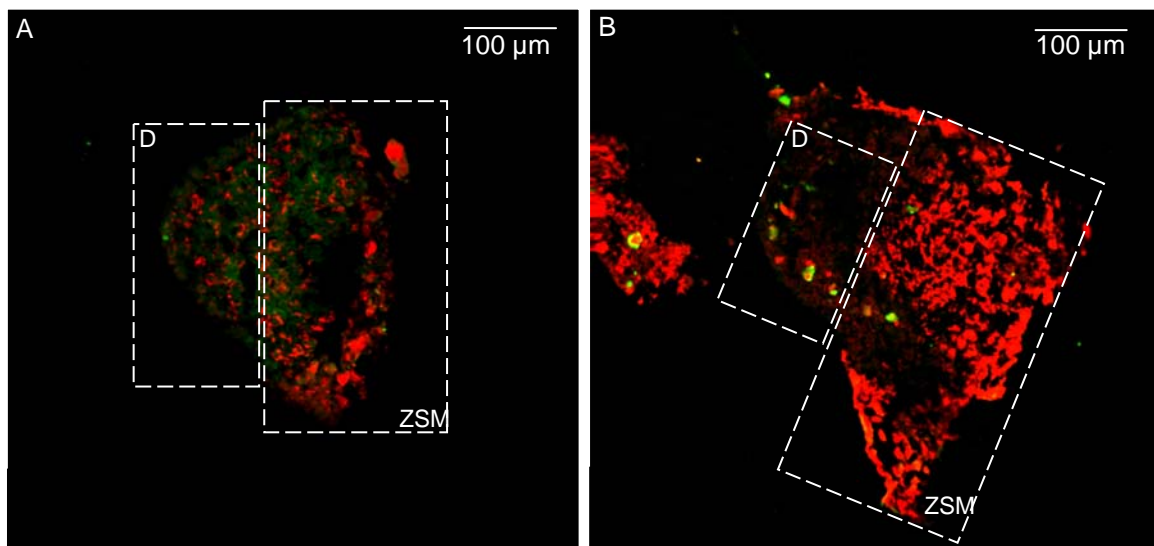


Figure 4-21. A-Immunolocalisation du PLPV, B-Immunolocalisation du PFBV. D-Dôme méristématique, ZSM- Zone sous méristématique. Cultivar Berg Palais.

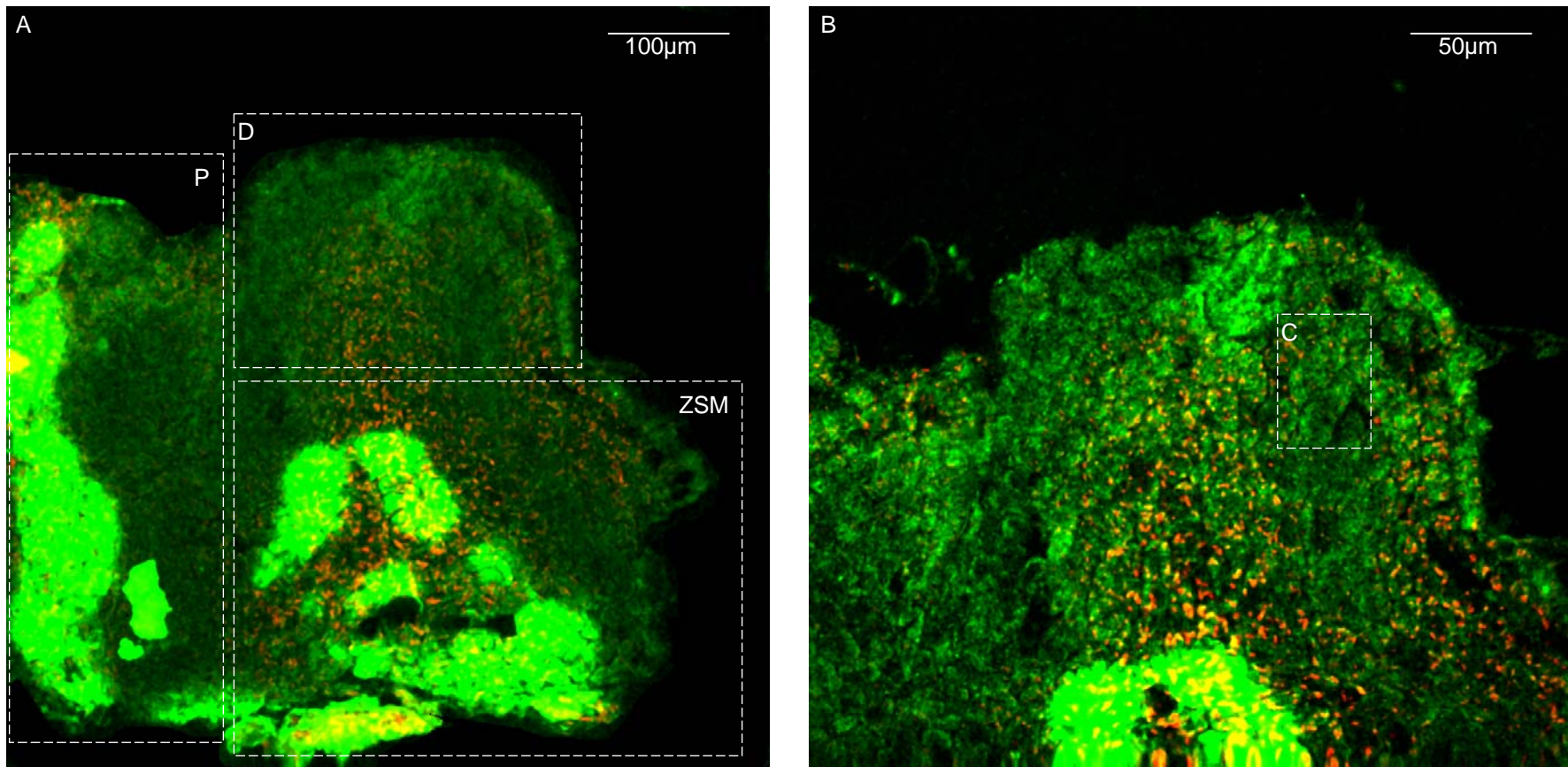


Figure 4-22. Localisation du PFBV chez des apex non cryoconservés A-Coupe d'apex du cultivar Balcon Rouge, B- détails au niveau du dôme méristématique, D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous-méristématique, C- détails cellules méristématiques

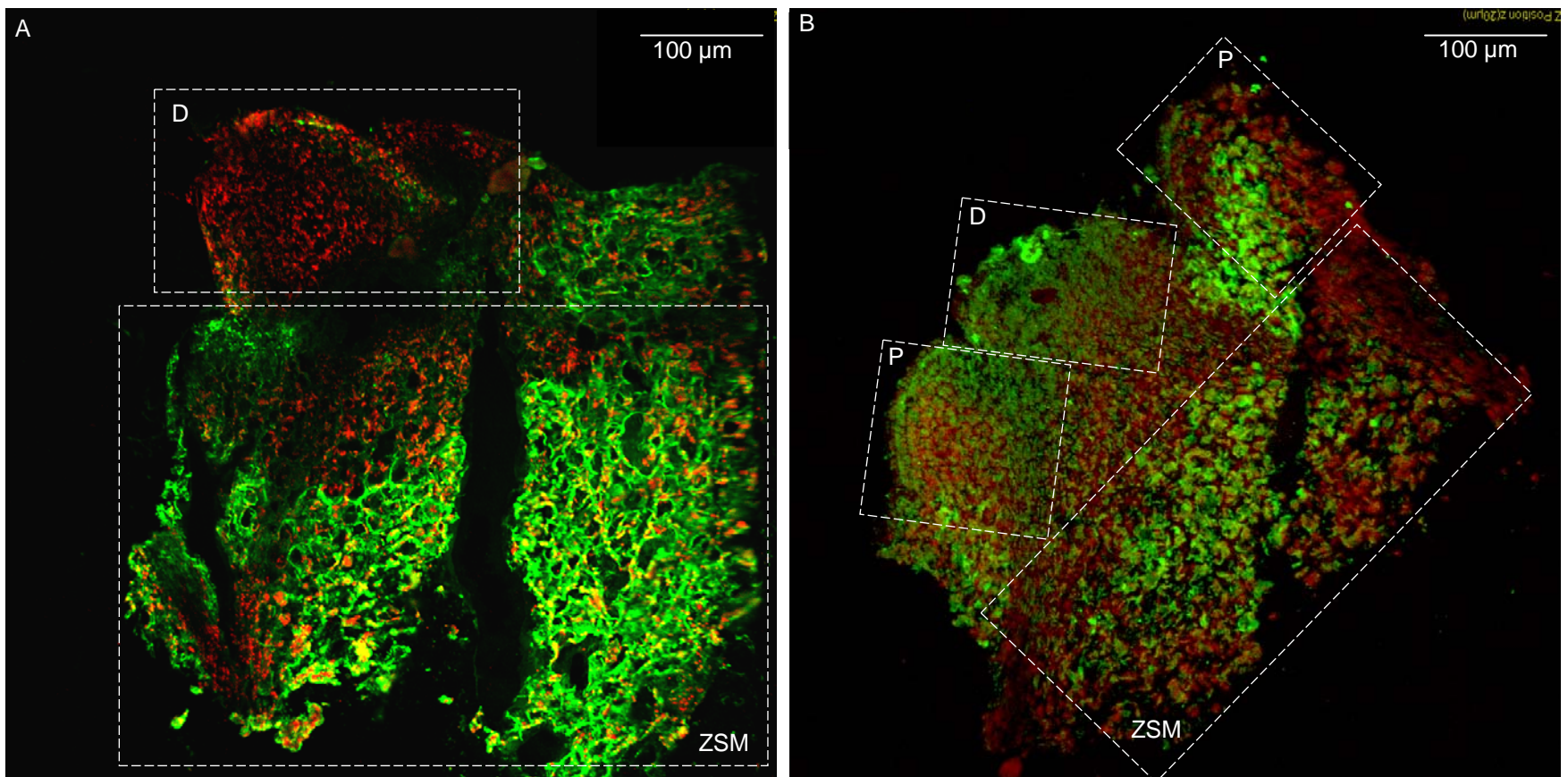
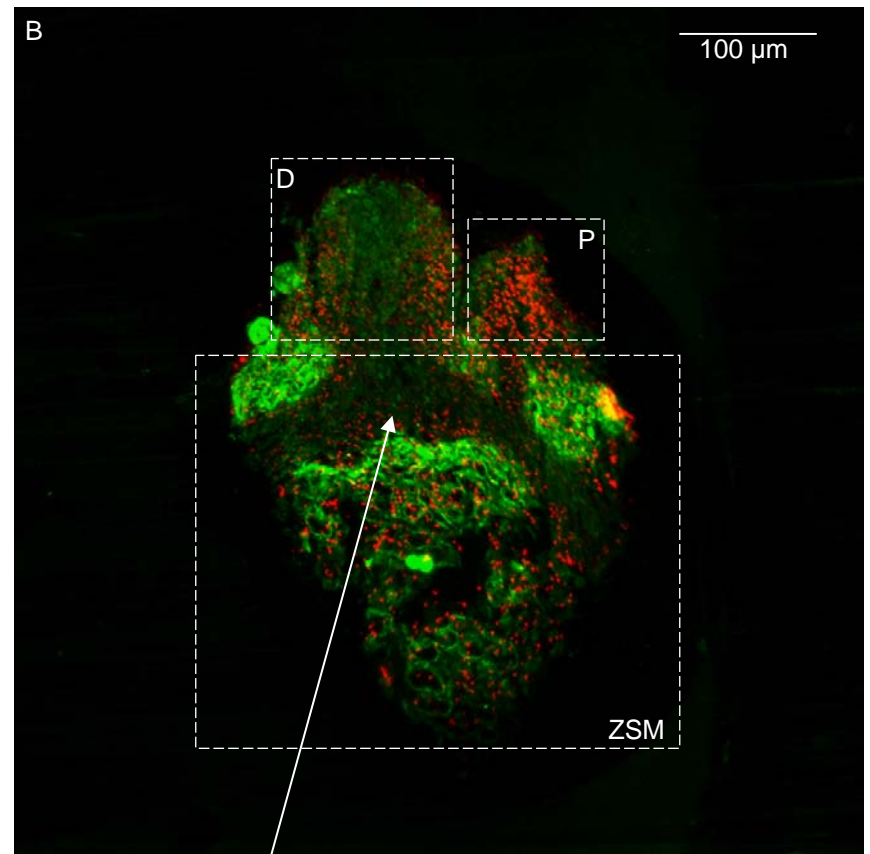
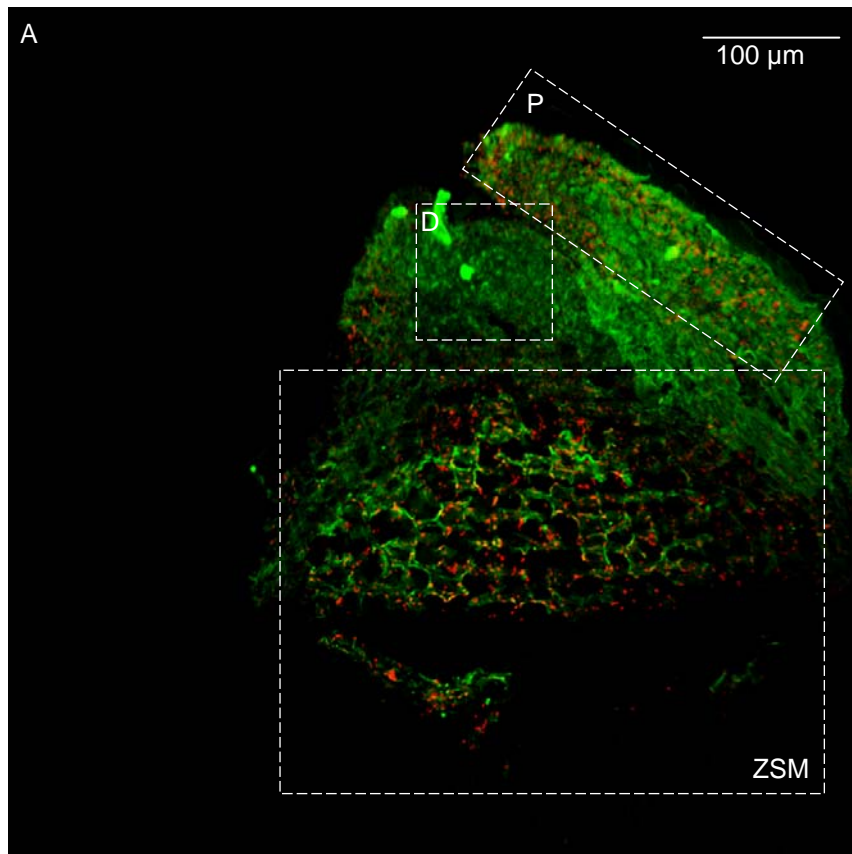


Figure 4-23. Localisation du PFBV chez des apex non cryoconservés A-Coupe d'apex du cultivar Cahors' B-Coupe d'apex du cultivar Stellar Artic. D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous-méristématique



Zone cambiale

Figure 4-24. Localisation du PLPV chez des apex non cryoconservés A-Coupe d'apex du cultivar Elsie, B-Coupe d'apex du cultivar Stellar Artic. D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous-méristématique

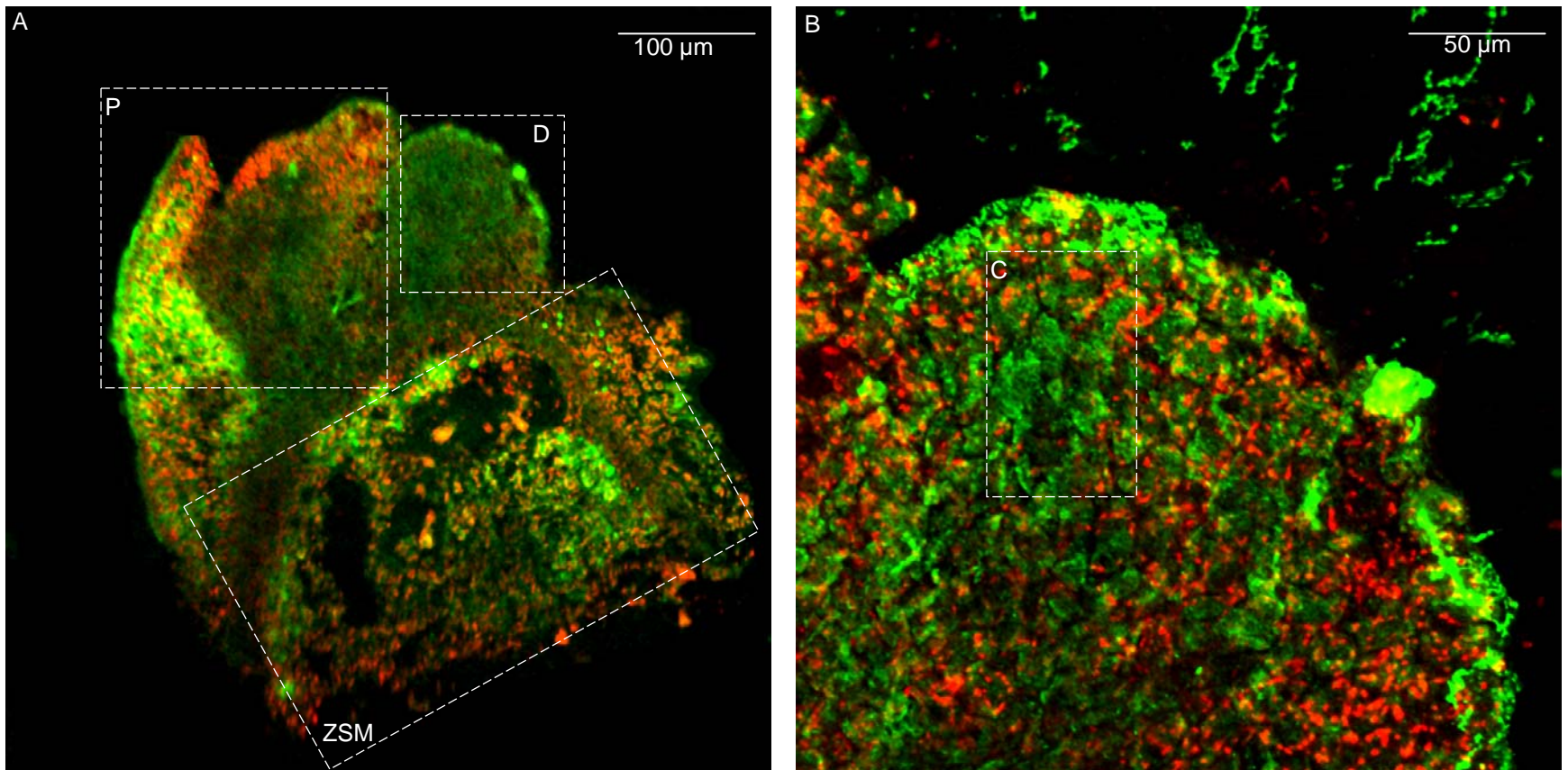
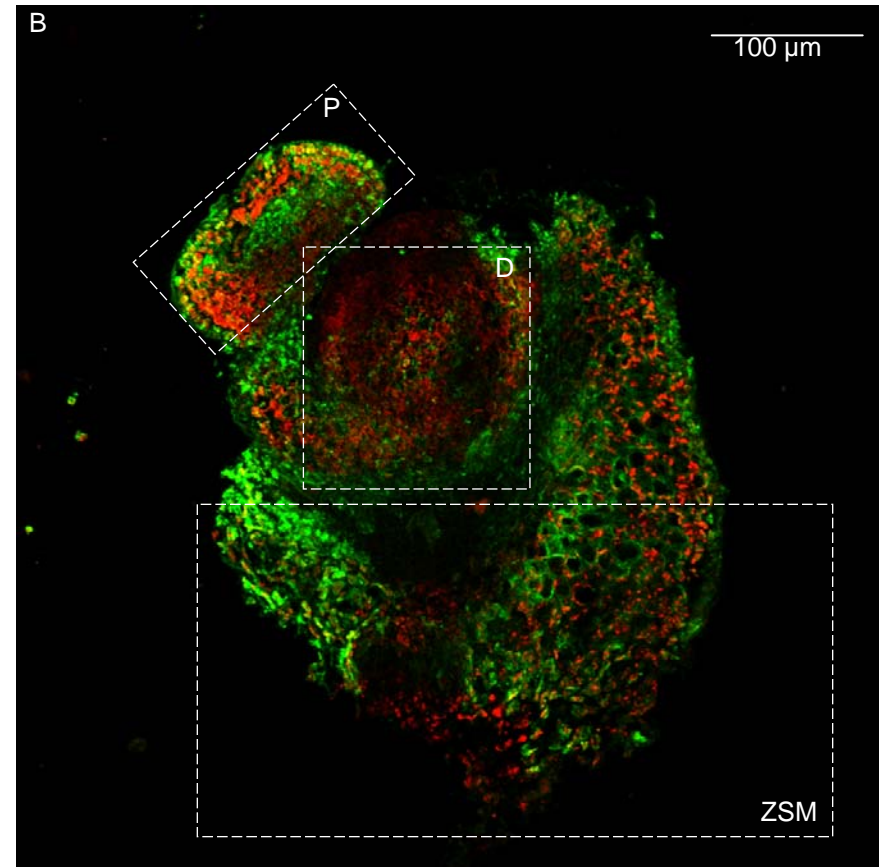
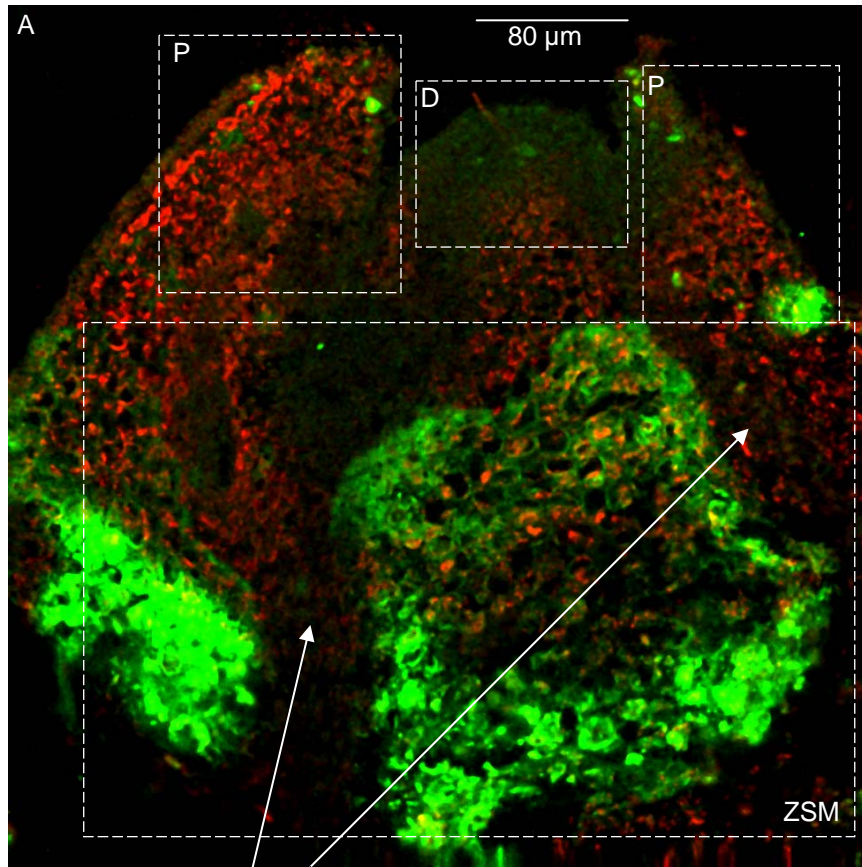


Figure 4-25. Localisation du PFBV chez des apex cryoconservés .A-Coupe d'apex du cultivar Balcon Rouge, B- zoom au niveau du dôme méristématique. D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous-méristématique, C- détails cellules méristématiques



Zone cambiale

Figure 4-26. Localisation du PFBV chez des apex cryoconservés. A-coupe d'apex du cultivar Cahors. B-Coupe d'apex du cultivar Stellar Artic. D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous méristématique

Ce résultat prouve que les immunolocalisations permettent de détecter dans les apex des quantités de virus plus faibles qu'avec les tests ELISA. Par conséquent, un test ELISA négatif ne prouve pas que la plante soit saine.

4.3.3.2.3. Localisation du PFBV et du PLPV dans les apex avant la cryoconservation

Pour les cultivars utilisés, les particules virales sont réparties dans toutes les zones des apex mais de manière non uniforme que se soit pour le PFBV ou le PLPV.

Ainsi la présence des virus est plus importante dans la zone sous méristématique que dans le dôme méristématique (figures 4-22, 4-23 et 4-24). En dehors de cette zone, les virus sont souvent présents en grande quantité dans la partie externe des primordia là où les cellules sont plus différenciées (figures 4-22A, 4-23B et 4-24B). L'intensité du marquage étant proportionnelle à la quantité de virus, les immunolocalisations mettent en évidence des différences de contaminations (figures 4-22 A, 4-23A et B). Des virus ont été mis en évidence dans le cytoplasme des cellules méristématiques mais en moins grand nombre que dans le reste de l'apex (figure 4-22 B, partie C). Par exemple, la quantité de PFBV dans les apex est environ 4,1 fois moins importante dans le méristème que dans la zone sous méristématique chez 'Cahors', 2,3 fois moins chez 'Balcon Lilas' et 1,5 fois moins chez 'Stellar Artic'. Le même constat peut être fait concernant le niveau de contamination des apex par le PLPV. Ainsi la quantité de virus est 2,5 fois moins élevée dans le méristème chez 'Stellar Artic' et 1,5 fois moins chez 'Elsie' (figure 4-24) que dans le reste des apex.

D'une manière générale les virus sont présents dans les méristèmes mais le PFBV et le PLPV sont inégalement répartis, le nombre de particules virales étant plus important là où les cellules sont plus différenciées. Plus exactement, nous avons observé à plusieurs reprises que la zone cambiale faisait en partie office de « barrière », les virus étant souvent plus nombreux en dessous cette zone (coté tige) qu'au dessus (coté méristème).

4.3.3.2.4. Localisation du PFBV et du PLPV dans les apex après la cryoconservation

A partir des mêmes plantes que celles utilisées dans le point précédent, des apex ont été prélevés et cryoconservés par « droplet-vitrification ». Les immunolocalisations ont alors été faites sur les apex aussitôt après le réchauffement. Les mêmes observations qu'au point 4.3.3.2.3. peuvent être faites sur la localisation des virus dans les apex (figures 4-25, 4-26 et 4-27). Les virus se localisent en plus grande quantité sous la zone cambiale et dans les primordia qu'au niveau du méristème (figure 4-25A et 4-26A).

Par conséquent, il semble que la cryoconservation n'élimine pas entièrement les virus.

4.3.3.2.5. Détection de la présence du PFBV et du PLPV dans des pousses *in vitro*

Chez les pousses régénérées à partir d'apex non cryoconservés, toutes les pousses se sont avérées positives au PFBV par tests ELISA. Aucun assainissement n'a donc pu être mis en évidence. Au contraire chez les pousses issues d'apex cryoconservés un assainissement de l'ordre de 25 % a été observé avec des variations selon le cultivar (18 % pour 'Cahors', 25 % pour 'Stellar Artic' et 33 % pour 'Balcon rouge') (figure 4-28).

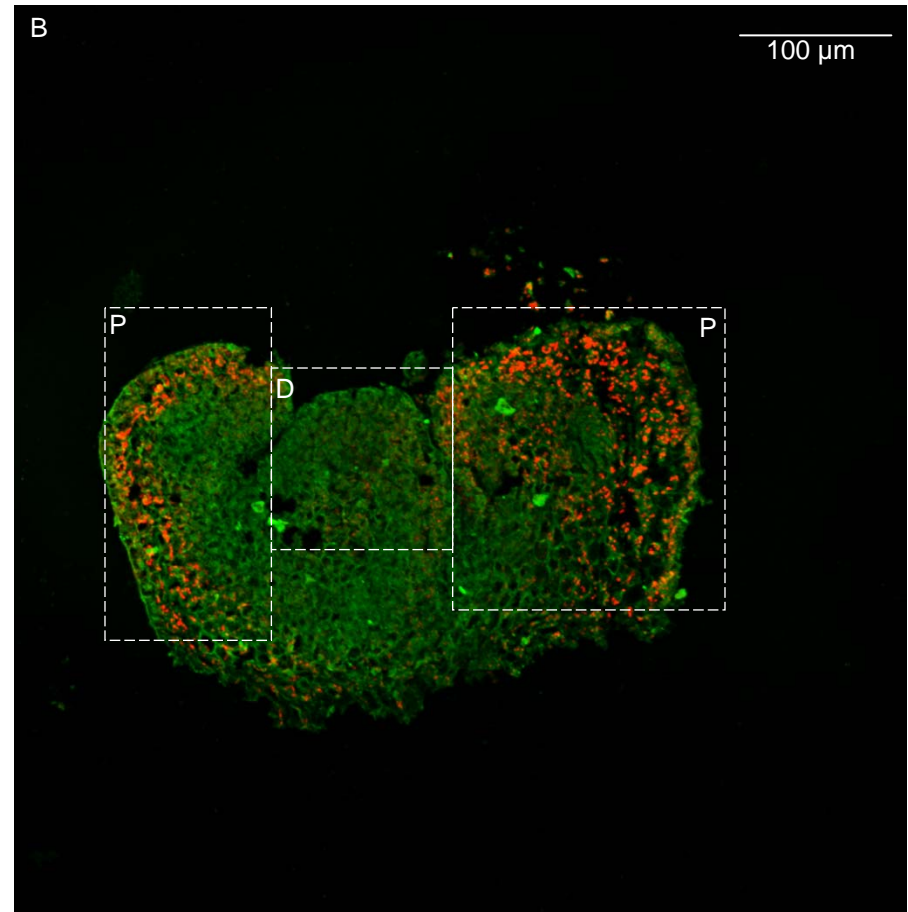
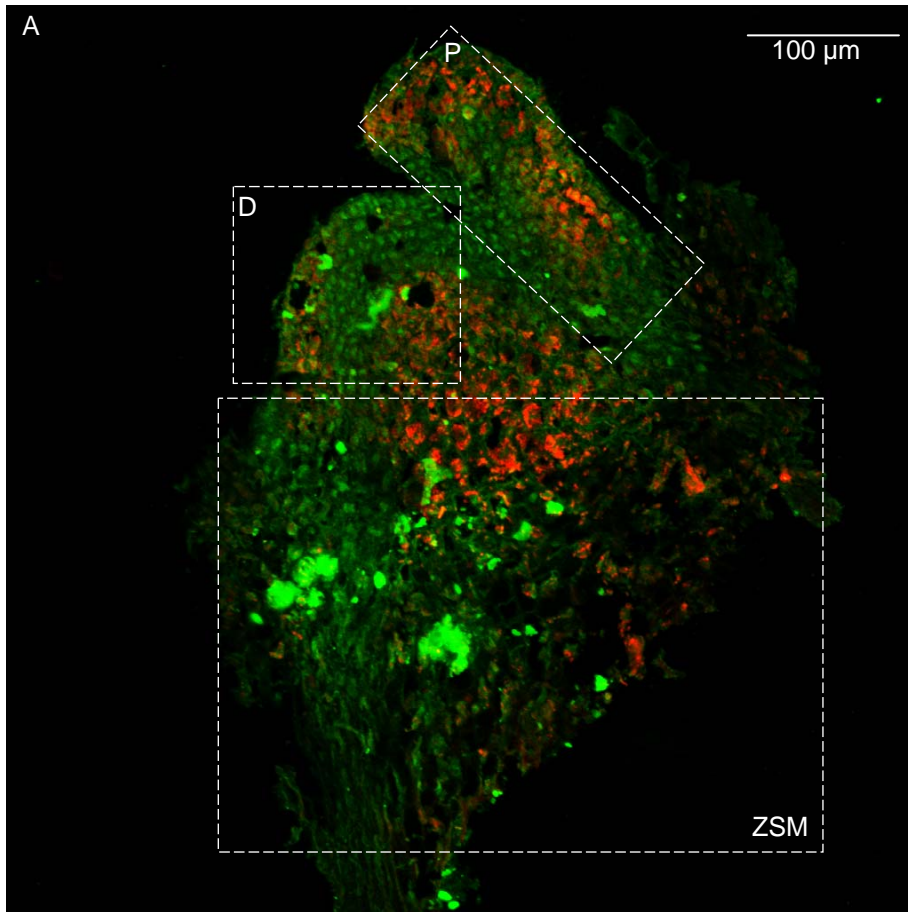


Figure 4-27. Localisation du PLPV chez des apex cryoconservés. A-Coupe d'apex du cultivar Elsie, B-Coupe d'apex du cultivar Stellar Artic. D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous-méristématique

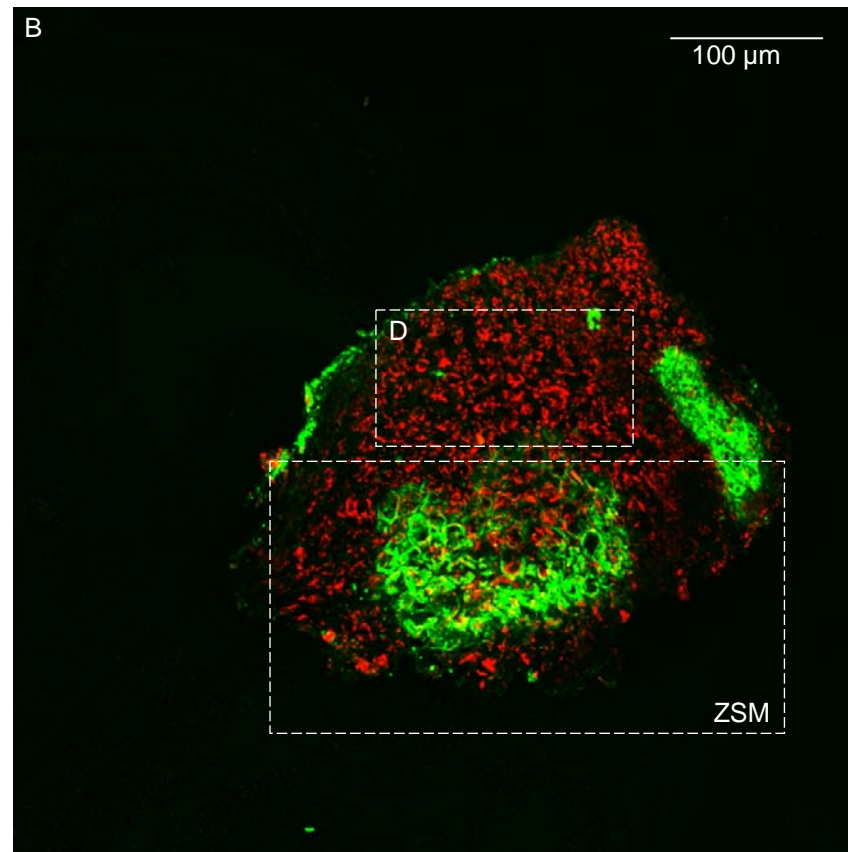
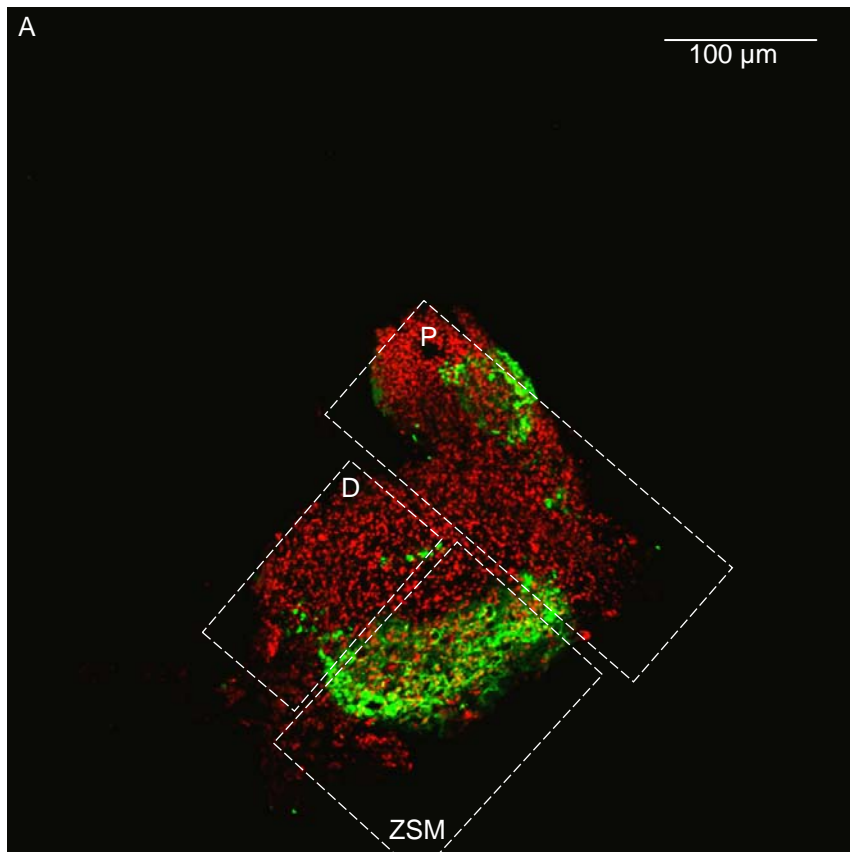


Figure 4-29. Localisation du PFBV chez des pousses issues de cryoconservation négatives par test ELISA. A-Coupe d'apex du cultivar Balcon rouge, B-Coupe d'apex du cultivar Cahors. D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous-méristématique

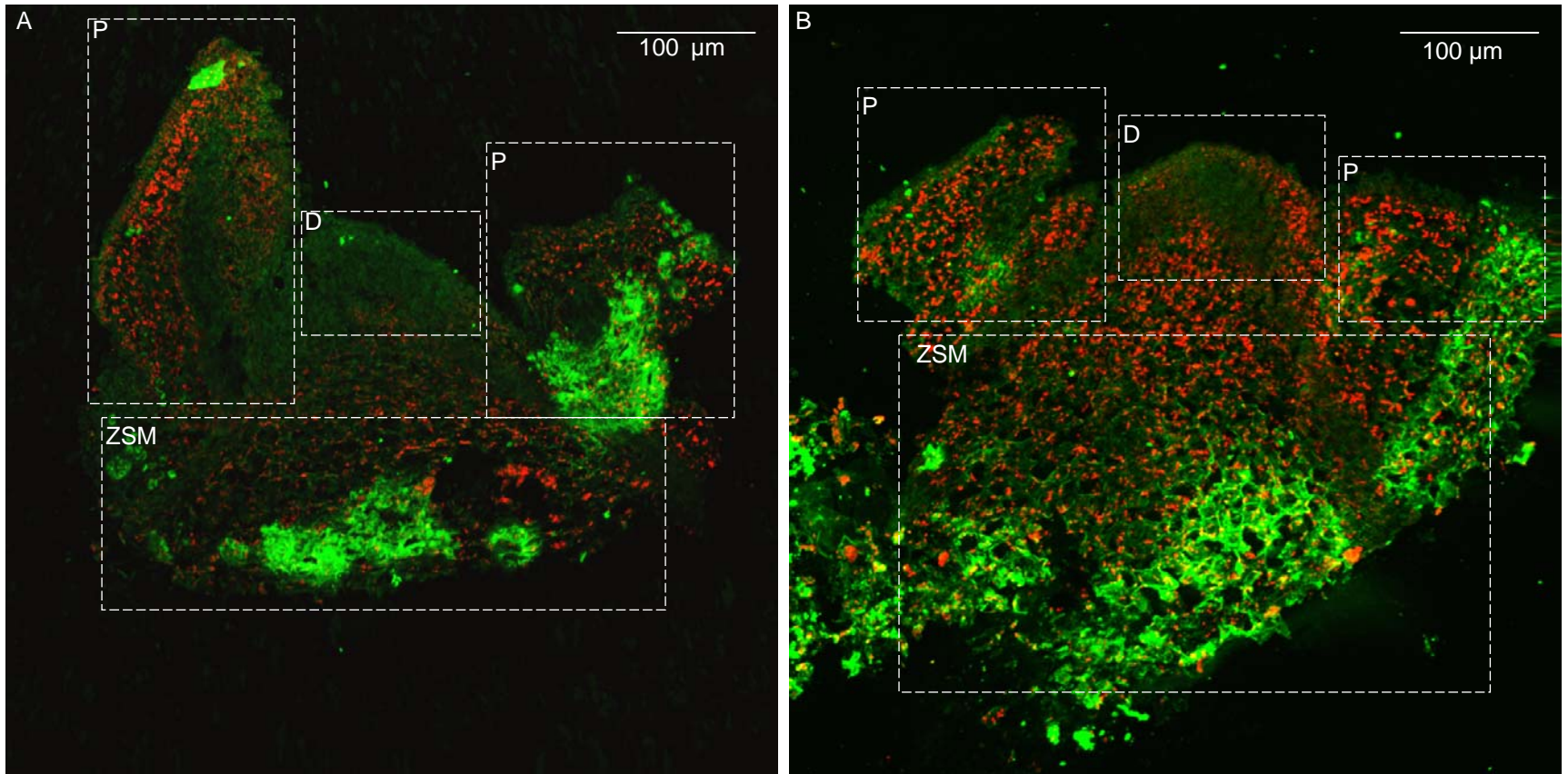


Figure 4-30. Localisation du PLPV chez des pousses issues de cryoconservation négatives par test ELISA. A et B-Coupe d'apex du cultivar Stellar Artich. D- dôme méristématique, P-primordium, ZSM- zone sous-méristématique

Chez le cultivar ‘Stellar Artic’, environ 15 % des pousses *in vitro* ont été assainies du PLPV par une culture d’apex. La cryoconservation semble avoir un effet bénéfique sur l’assainissement puisque le taux de contamination chez les plantes issues d’apex cryoconservés passe à 50% (figure 4-28).

Finalement, il semble donc que le PLPV serait éliminé (mais pas complètement) avec plus de succès par une culture d’apex que le PFBV. La cryoconservation aurait un effet bénéfique sur l’assainissement viral. Afin de vérifier si les plantes sont bien indemnes de virus des immunolocalisations ont été réalisées sur des pousses issues d’apex cryoconservés dont les tests ELISA étaient négatifs.

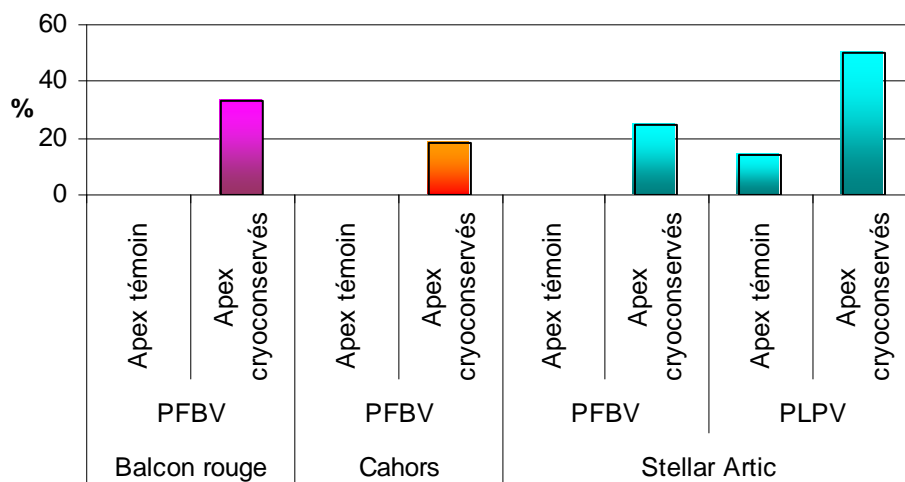


Figure 4-28. Pourcentage d’assainissement de pousses *in vitro* issues soit d’apex témoins (non cryoconservés) soit d’apex cryoconservés. Détection par tests ELISA.

Les résultats des immunolocalisations montrent que les virus demeurent présents dans les pousses issues d’apex cryoconservés. La répartition des virus ne semble pas avoir été modifiée, les quantités de virus étant toujours plus importante dans la zone sous méristématique et dans les primordia qu’au niveau du dôme méristématique et de la zone cambiale (figures 4-29 et 4-30). Ce résultat confirme la plus grande sensibilité des immunolocalisations que des tests ELISA. Par ailleurs, les virus toujours présents après la cryoconservation conservent leur capacité à se multiplier et coloniser l’ensemble des pousses.

Au terme de cette étude nous avons montré que le PFBV et le PLPV arrivent à contaminer les méristèmes de *Pelargonium* et que la cryoconservation permet de diminuer la charge virale mais sans totalement l’éliminer.

4.4. Discussion

4.4.1. Conformité des caractères morphologiques et de la quantité d’ADN des cellules

A partir des observations microscopiques et des travaux de recherche de Tilney-Basset (1986), les trois cultivars panachés ont été définis comme étant des chimères péricleines, dont la répartition des couches cellulaires a été déterminée dans les méristèmes. Connaissant cette répartition, nous avons vérifié l’impact d’une culture d’apex et de la cryoconservation sur la stabilité des chimères.

Comme chez des mutants panachés de tabac (Bae *et al.*, 2000), il est apparu que l'absence de chlorophylle dans les parties blanches des feuilles est due à des altérations de la structure interne des chloroplastes. L'absence de thylakoïdes bien définis dans les chloroplastes altérés serait la conséquence de l'expression de gènes mutants bloquant la différenciation des chloroplastes (Bae *et al.*, 2000).

Pour le cultivar Panaché, les images de microscopie électronique de coupes transversales de feuilles ont permis de déduire que les méristèmes ont une structure dite en « sandwich » de type GWG.

Concernant 'A Happy Thought', l'agencement des couches cellulaires au niveau des méristèmes a été défini comme étant de type GGW. Normalement, les pousses devraient avoir des feuilles au pourtour vert foncé et un centre vert clair en raison d'un mésophylle sous-épidermique vert (issu de L2) masquant un mésophylle interne blanc (issu de L3). Or, le pourtour est bien vert foncé, mais la partie centrale est totalement non chlorophyllienne. Dans ces conditions les cellules issues de la couche L2 ne produisent pas de chlorophylle dans la partie centrale des feuilles. Néanmoins, la couche L2 est nécessairement génétiquement « verte » (type G), dans le cas contraire nous aurions des pousses albinos avec éventuellement des patches verts sur la frange des feuilles ce qui n'est pas la réalité. Chez ce cultivar les cellules issues de la couche L3 auraient un impact sur les cellules adjacentes issues de L2 en modifiant le développement normal des chloroplastes les rendant non fonctionnels (Tilney-Basset, 1986). Nous faisons l'hypothèse, que l'action des cellules issues de L3 sur les cellules issues de L2 serait due à des effets de type épigénétique. Non seulement les gènes mutés des cellules issues de L3 bloqueraient la différenciation des chloroplastes dans ces cellules mais en plus leurs produits d'expression bloqueraient à leur tour le développement des chloroplastes dans les cellules adjacentes du mésophylle sous épidermique.

Si l'on devait émettre la même hypothèse pour 'Panaché', nous aurions systématiquement des plantes complètement albinos. Nous en déduisons que les mutations des deux cultivars panachés ne sont pas de même nature.

Comme nous l'avons vu des variations ponctuelles peuvent apparaître chez des plantes adultes. Des travaux déjà anciens (Bergann et Bergann, 1962) ont montré que ces mutations avaient pour origine la réorganisation des couches cellulaires au niveau des méristèmes axillaires. A partir des observations du phénotype des pousses régénérées nous avons tenté de modéliser les variations de la structure des méristèmes chez 'A Happy Thought' et 'Panaché' en posant comme postulat que une ou plusieurs couches sont complètement mutées et que la reprise de croissance est directe.

Ainsi pour 'A Happy Thought', nous obtenons des pousses panachées et des pousses non panachées. Les pousses complètement vertes sont environ 5 fois plus nombreuses que les pousses panachées quelles soient issues d'apex témoins ou d'apex cryoconservés. Par conséquent, les variations phénotypiques observées ne peuvent pas être imputées à la cryoconservation par « droplet-vitrification ». En revanche, le fait de prélever des apex et de les mettre en culture favoriserait les divisions périclines des cellules de la couche L2 qui remplaceraient alors les cellules de la couche L3 (figure 4-31) tout en conservant leurs caractéristiques génétiques. Ce remplacement n'altérerait pas le développement des organes (Marcotrigiano et Bernatzky, 1995). Ainsi dans le cas qui nous intéresse, les cellules de L2 en remplaçant les cellules de L3 seraient à l'origine d'un mésophylle interne vert aboutissant au génotype « solide » GGG.

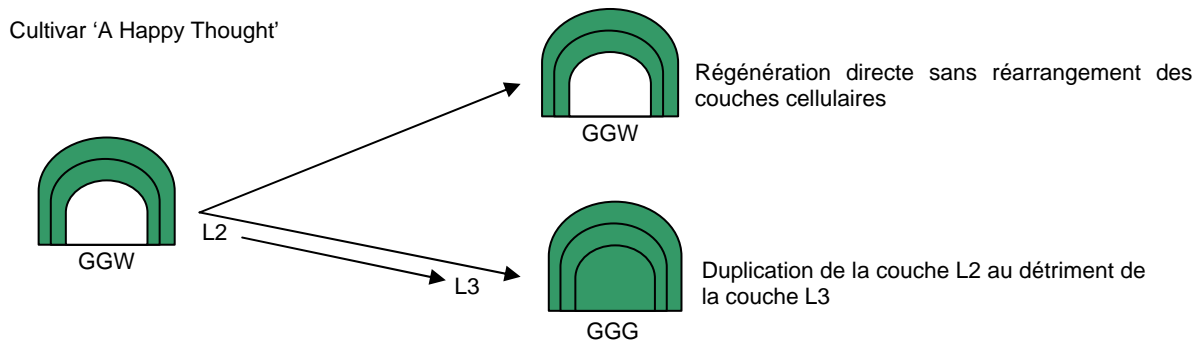


Figure 4-31. Proposition de réarrangement des couches cellulaires chez des méristèmes de 'A Happy thought'

Chez 'Panaché', contrairement au cas précédent, la cryoconservation a eu un impact sur le phénotype des pousses régénérées puisque des phénotypes différents ont été observés entre les pousses issues d'apex témoins et les pousses issues d'apex cryoconservés.

Comme chez 'A Happy Thought', la culture d'apex engendre aussi le développement de variants au génotype « solide » de type GGG. Ces variants pourraient avoir comme origine soit le remplacement de L2 par L1 soit L2 par L3 (figure 4-32). La deuxième proposition est plus probable, la couche L1 fonctionnant de manière plus indépendante que les deux autres couches cellulaires, elle serait moins sujette à remplacer la couche L2 (Marcotrigiano et Bernatzky, 1995).

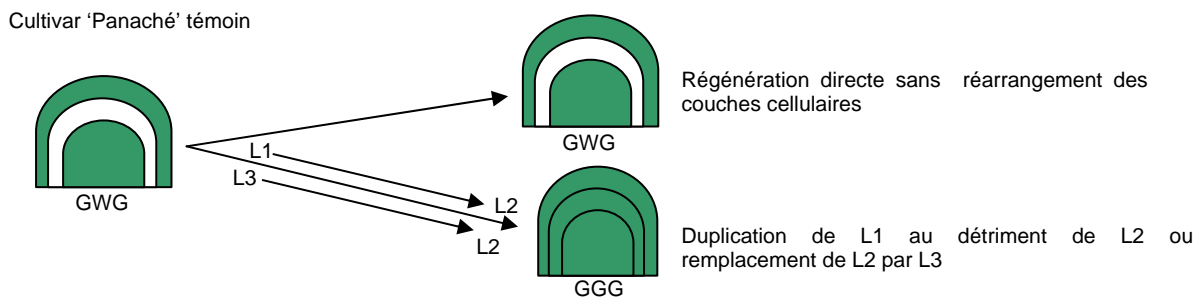


Figure 4-32. Proposition de réarrangement des couches cellulaires chez des méristèmes de 'Panaché' lors d'une culture d'apex

Lors de la cryoconservation, les perturbations des méristèmes du cultivar Panaché paraissent plus importantes que chez 'A Happy Thought' puisque la structure chimérique originale (GWG) est perdue, seules des pousses albinos ou vertes ont été observées. Les pousses albinos pourraient avoir deux origines, soit L2 prend la place de L3, dans ce cas seule L1 demeure de type G, des patches verts peuvent être alors observés sur la frange des feuilles. Soit L2 remplace à la fois L1 et L3 pour donner la structure WWW (figure 4-33). Ce deuxième cas paraît beaucoup moins probable car il nécessite deux remplacements successifs. Quant aux pousses vertes, soit L1 remplacerait L2 soit L3 remplacerait L2. Pour la même raison que chez les apex témoins la deuxième possibilité serait plus probable.

D'après nos observations, il existe donc pour des apex cryoconservés du cultivar Panaché une réorganisation plus importante des couches cellulaires des méristèmes lors de la reprise de croissance que pour des apex non cryoconservés. Par conséquent, la « droplet-vitrification » semble altérer de manière significative le fonctionnement des méristèmes de 'Panaché'. Bien que le procédé de vitrification soit différent de celui que nous utilisons, Fukai *et al* en 1994 avaient déjà mis en évidence que la cryoconservation peut altérer la structure chimérique des méristèmes. Ainsi chez la chimère

péricline de chrysanthème ‘Apricot Marble’, la cryoconservation a favorisé l’apparition de fleurs roses au lieu de fleurs couleur « abricot ».

Dans ces conditions, nous faisons l’hypothèse que la cryoconservation favoriserait le développement de pousses non conformes chez ‘Panaché’ en raison d’une instabilité plus grande de la structure GWG que celle de la structure GGW.

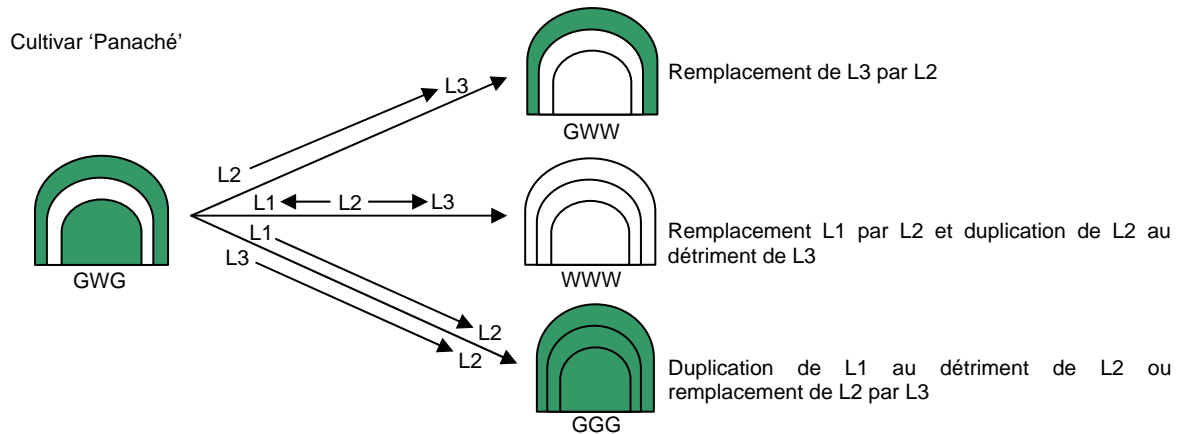


Figure 4-33. Proposition de réarrangement chez le cultivar Panaché suite à la cryoconservation

Nos observations ont aussi mis en évidence chez le cultivar non panaché Balcon Lilas des modifications du phénotype avec présence de pousses panachées aux feuilles complètement blanches sur le pourtour et vertes au milieu comme chez ‘Panaché’. Cependant, il n’a jamais été observé de patches verts sur les bords des feuilles. Dans ces conditions, nous supposons que ce cultivar est aussi une chimère péricline dont la seule structure possible pouvant donner des pousses panachées à partir de pousse verte est WGG. Comme pour ‘A Happy Thought’ la proportion des différents phénotypes ne serait pas fonction de l’origine des pousses (apex témoins ou apex cryoconservés). Là encore la « droplet-vitrification » n’aurait que peu d’influence sur le réarrangement cellulaire dans les méristèmes. Ainsi le phénotype vert est largement majoritaire avec environ 4 pousses vertes sur 5. Soit il proviendrait d’une reprise de croissance directe d’un apex de type WGG soit il serait issu du remplacement de L1 par L2 (GGG). Quand au type panaché plus rare (1 pousse sur 5), L1 remplacerait L2 pour former des méristèmes de structure WWG (figure 4-34). Bien que la cryoconservation ne semble pas avoir d’effet significatif sur le phénotype des pousses régénérées, nous avons observé une pousse complètement albinos (WWW) qui pourrait avoir comme origine le remplacement de L2 par L1 puis le remplacement de L3 par la nouvelle couche L2. La probabilité d’avoir ce phénotype semble faible puisque il nécessite deux remplacements successifs.

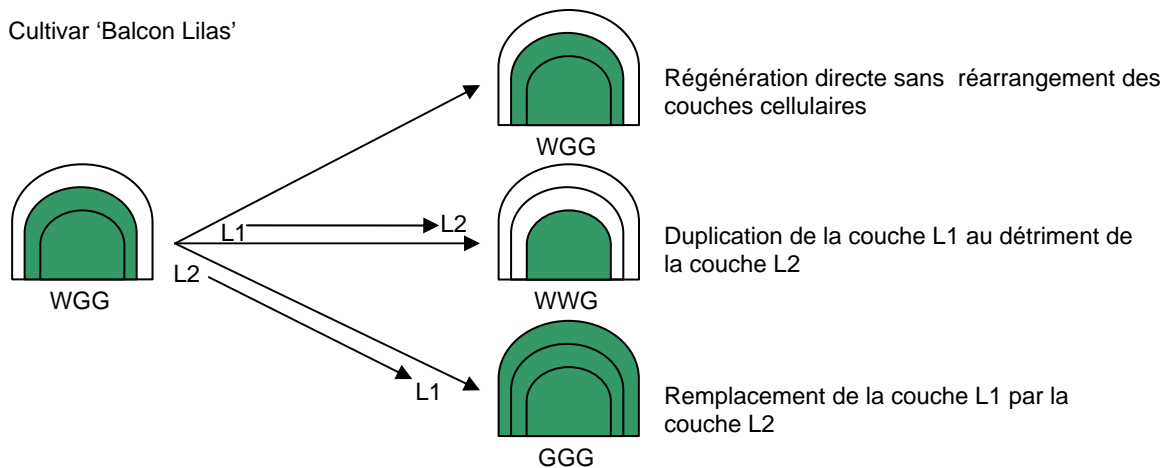


Figure 4-34. Proposition de réarrangement chez le cultivar 'Balcon lilas' suite à une culture d'apex

La présence de phénotypes différents pour un même cultivar prouve, qu'il existe des réarrangements des couches cellulaires chez les chimères péricleines confirmant la plasticité des méristèmes (Marcotriagiano et bernatzke, 1995). Contrairement au chrysanthème (Fukai *et al.*, 1994), le prélèvement serait le principal facteur de variabilité des phénotypes pour les cultivars chimériques. En outre, rien ne prouve que des réarrangements n'existent pas chez des cultivars non chimériques mais le fait que toutes les couches cellulaires soient du même type ne permet pas de les mettre en évidence. Ainsi pour le cultivar 'Renard Bleu' vraisemblablement non chimérique (génotype solide type GGG), il n'a jamais été observé de variations phénotypiques aussi bien chez les pousses issues d'une culture d'apex que chez les pousses issues d'apex cryoconservés.

Finalement sur les quatre cultivars considérés (A Happy Thought, Panaché, renard Bleu et Balcon Lilas), aucun impact significatif de la cryoconservation sur le phénotype des pousses régénérées n'a été observé sauf pour l'un d'entre eux. Par conséquent la « droplet-vitrification » a peu d'effet sur la structure des méristèmes.

Hormis le postulat de départ, nous ne pouvons pas faire abstraction de l'existence de mutations partielles d'une ou plusieurs couches cellulaires méristématiques. Nous serions alors en présence de chimères mériclines qui s'exprimeraient, par exemple, par la présence de taches non chlorophylliennes au niveau des feuilles si ces mutations sont suffisamment importantes. Etant donné que nous n'avons jamais observé ce type de phénotypes, ces mutations si elles existent ne doivent concerner qu'un nombre restreint de cellules.

De plus, nous avons émis l'idée que le méristème reprenait sa croissance normalement après le prélèvement ou après la cryoconservation. Là encore, rien n'empêcherait en théorie, une régénération directe à partir d'une cellule ou de quelques cellules du méristème. Cette hypothèse est probable puisque il a été montré chez *Pelargonium* que la couche L2 était la plus apte à la néoformation (Bigot, 1989). Selon ce principe, l'existence de plantes albinos à partir de méristème GWG n'est pas étonnante. Toutefois, selon nos résultats sur la régénération *in vitro* (chapitre n°3), ce cas de figure ne semble pas être privilégié.

Par ailleurs, nous avons vu qu'un cal cicatriciel se met parfois en place à la base de l'apex, dans lequel des néoformations peuvent se former pour aboutir à de nouvelles pousses. En fonction de l'origine cellulaire du cal, le phénotype des pousses ne sera pas le même. Par exemple, pour 'A Happy Thought', le développement de pousses vertes à partir de cal peut signifier que le cal est soit originaire

de la couche L2 soit de la couche L1 mais pas la couche L3. Par analogie avec 'A Happy Thought', la formation de cal peut aussi expliquer le développement de pousses albinos ou de pousses vertes chez 'Panaché'. Le type des pousses serait alors fonction de l'origine cellulaire du cal (albinos si issu de L2, vert si issu de L1 ou L3).

En conséquence, nous supposons qu'il existe trois systèmes de production de pousses non conformes :

- 1) via un réarrangement des couches cellulaires du méristème.
- 2) par la formation d'une néoformation à partir d'une ou plusieurs cellules du méristème.
- 3) par le développement de pousses à partir d'un cal (phénomène de dédifférenciation-redifférenciation).

L'estimation de la conformité à travers la mesure de différents paramètres morphologiques liés aux feuilles ou à la couleur des fleurs a montré que l'impact de la cryoconservation est faible pour ces critères. En effet, aucune différence dans la forme et la taille des feuilles n'a été détectée quelle que soit l'origine des apex pour quatre des cinq cultivars. Seul 'Cahors' présente des feuilles plus grandes chez les pousses issues d'apex cryoconservées. Après avoir vérifié que la quantité d'ADN est restée stable, nous émettons l'hypothèse que la « droplet-vitrification » peut avoir un rôle sur le fonctionnement physiologique de ce cultivar ou bien favorise la vigueur de la pousse par un meilleur assainissement viral dans la mesure où la pousse initiale était probablement contaminée.

De plus, nos résultats font apparaître que seule la culture d'apex peut avoir une influence sur la couleur des fleurs chez 'Stellar Artic' et 'Balcon Lilas'. Concernant 'Stellar Artic', il faut rester prudent sur la conformité de la couleur des fleurs, en effet nos observations en serres de pousses obtenues par bouturage montrent qu'il existe une variation naturelle du coloris des pétales allant du blanc pur au blanc plus ou moins rosé. De plus la forme des pétales très découpée a rendu la mesure de la couleur particulièrement difficile.

'Balcon Lilas' étant le résultat d'une variation somaclonale apparue chez 'Balcon rose' (N.Dorion, communication personnelle), le développement de plantes aux fleurs roses à partir d'apex ou plus rarement de bouture est un phénomène connu. Comme chez le pétunia (Jorgensen *et al.*, 1996) l'accumulation de pigment dans les pétales pourrait être due à un contrôle épigénétique de l'expression de certains gènes (silencing). En l'occurrence, ce contrôle serait modifié par la culture *in vitro* des apex mais pas par la cryoconservation.

La poursuite de notre étude a démontré l'absence de changements significatifs de la quantité d'ADN dans les cellules quel que soit le cultivar que nous ayons utilisé. Nous pouvons donc supposer que le niveau de ploïdie est inchangé corroborant les résultats obtenus chez la pomme de terre (Benson *et al.*, 1996), chez *Hypericum perforatum* (Urbanova *et al.*, 2002) ou encore chez *Betula pendula* (Ryynänen et Aronen, 2005).

Au terme de cette étude plusieurs éléments peuvent être mis en avant. La cryoconservation par « droplet-vitrification » n'induit pas de variation phénotypique en dehors de cas particuliers. Ce résultat important conforte l'idée que la cryoconservation n'est pas source de variabilité. De nombreux travaux utilisant différentes méthodes de cryoconservation ont donné des résultats allant dans le même sens. Par exemple, aucune différence phénotypique n'a été observée chez l'oignon (Lakhanpaul *et al.*, 1999), chez le riz (Al-Forkan *et al.*, 2001) ou encore chez l'eucalyptus (Blakesley et Kiernan, 2001). Dans ces conditions l'utilisation en routine de la « droplet-vitrification » peut être envisagée. Plus que la cryoconservation, il est apparu que le prélèvement d'apex est un facteur induisant de la variation phénotypique chez les cultivars chimériques de *Pelargonium*. En conséquence, il convient de réfléchir

à la mise au point de méthode de régénération directe des apex des cultivars chimériques ne favorisant pas ce type de variation.

4.4.2. Rôle de la cryoconservation sur l'assainissement viral : cryothérapie

Bien que le but initial de la cryoconservation soit la conservation de ressources génétiques, six études ont démontré à ce jour que la cryoconservation pouvait en plus favoriser l'assainissement viral (Brison *et al.*, 1997, Helliot *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2003, 2006), l'élimination de bactérie (Ding *et al.*, 2007) ou l'éradication de phytoplasme (Wang *et al.*, 2007). Suite à la sélection par DAS-ELISA des cultivars de *Pelargonium* en fonction de la présence des virus PFBV et PLPV, nous avons entrepris de vérifier si la cryoconservation permet d'accroître l'éradication de ces deux virus et de tenter de comprendre son action sur l'assainissement.

Bien que les coupes d'apex réalisées au cryostat soient de moins bonnes qualités que celles obtenues lors d'une inclusion dans de la résine (Genda *et al.*, 2005, Helliot *et al.*, 2007), la méthode d'immunolocalisation utilisée a bien permis de localiser les virus dans les apex. Ainsi, les immunolocalisations faites sur le cultivar Berg Palais pourtant négatif au PLPV (quatre séries de tests ELISA) révèlent la présence des virus dans les apex prouvant de fait que le seuil de détection de l'immunolocalisation est plus élevé que celui des tests ELISA.

D'une manière générale pour les apex témoins (non cryoconservés), on observe la présence en quantité importante du PFBV et du PLPV dans l'ensemble des apex. Quel que soit le cultivar, il existe des variations notables de la contamination en fonction des différentes zones cellulaires. Il est à noter que la dispersion dans les apex du PFBV et du PLPV est sensiblement la même. En conséquence, ces deux virus pourraient posséder la même capacité de contamination des apex. Ainsi, les virus sont présents en plus grande quantité dans les zones cellulaires différenciées que dans les méristèmes, là où l'activité mitotique est faible c'est-à-dire sous la zone cambiale, à la base et sur le côté externe des primordia. Cette répartition des virus dans les apex peut se justifier. En effet la zone cambiale correspond à une zone de division cellulaire très importante. Comme dans le méristème, il existerait une compétition entre la vitesse de multiplication des cellules cambiales et la vitesse de multiplication des virus qui limiterait la quantité de virus côté externe de la zone cambiale. Cependant cette « barrière » n'est pas complètement « étanche » puisque des virus sont détectés notamment dans le méristème. Ces résultats corroborent ceux obtenus récemment sur la localisation du CMV chez le bananier (Helliot *et al.*, 2007) et confirme que le concept d'immunité du méristème (Morel, 1948) n'est pas complètement vrai. Néanmoins il faut se garder de toute généralisation, par exemple chez des apex de framboisier contaminé par le RBDV (Raspberry bushy dwarf virus), les immunolocalisations ont mis en évidence la présence du RBDV dans les primordia et à la base de l'apex mais pas dans le méristème (Wang *et al.*, 2008). Dans ce cas précis il semble donc que le virus ne puisse pas contaminer les méristèmes.

Lors de nos essais d'immunolocalisation des virus, immédiatement après la cryoconservation, on a montré que les virus demeuraient présents dans les différentes parties de l'apex de la même manière que chez les témoins. Dans ces conditions, d'une part il apparaît que la cryoconservation par « droplet-vitrification » n'altère pas physiquement la capsid des virus mais d'autre part, n'apporte pas non plus de réponse sur la capacité des virus à continuer de se multiplier suite à la cryoconservation.

Les tests ELISA réalisés sur des pousses *in vitro* issues d'apex non cryoconservés mettent en évidence une élimination du PLPV de l'ordre de 15% pour le cultivar 'Stellar Artic'. Les mêmes tests effectués sur les pousses *in vitro* issues d'apex cryoconservés montre que la « droplet-vitrification » augmente l'assainissement puisque 50 % des pousses de 'Stellar Artic' sont négatives au PLPV.

Pour le PFBV aucun assainissement n'a été révélé par les tests ELISA chez les pousses issues d'apex non cryoconservés. En revanche 25,3 % des pousses issues d'apex cryoconservés (tous cultivars confondus) sont négatives au PFBV (tests ELISA). Il apparaît donc que ces deux virus sont difficilement voire pas du tout éliminable par une simple culture d'apex. Par contre, la cryoconservation semble favoriser leur éradication.

En revanche, les immunolocalisations ont prouvé la présence des virus chez des pousses issues de la cryoconservation dont les tests ELISA étaient négatifs. Par conséquent, le PFBV et le PLPV conservent bien leur capacité à se multiplier et à coloniser l'ensemble de l'apex après cryoconservation. Il ne peut donc pas être envisagé d'utiliser la « droplet-vitrification » comme méthode d'élimination de ces virus. Toutefois, même si les pousses ne sont pas indemnes de virus, nos résultats mettent en évidence que la « droplet-vitrification » permet une réduction de la charge virale de certains apex suffisamment importante pour ne plus être décelable par les tests ELISA. Il existe donc un effet de la cryoconservation sur les virus. Dans ces conditions, nous supposons que pour un même virus, toutes les particules virales n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de la cryoconservation.

La présence des virus après la cryoconservation ne lui confère pas un avantage supplémentaire pour son utilisation dans le cadre de la conservation des ressources génétiques du *Pelargonium*. Il faut donc veiller à assainir le plus possible les apex avant de les cryoconserver. Dans cet optique, les tests ELISA pourraient être remplacés par l'IC-PCR (immunocapture-PCR). En effet, il a été prouvé que cette méthode est 5000 fois plus sensible que les tests ELISA pour la détection du PPV chez *Prunus* (Wetzel *et al.*, 1992). Nous aurions ainsi un système de détection beaucoup plus sensible. En outre, l'assainissement pourrait notamment être amélioré par l'association de la thérapie et de la cryothérapie comme chez le framboisier (Wang *et al.*, 2008). En effet de cette manière, le RDBV qui n'était pas éliminé ni par une culture d'apex ni suite à la cryoconservation a pu être éliminé dans 35 % des pousses régénérées.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'horticulture ornementale comme d'autres secteurs d'activité est soumise à l'évolution du goût des consommateurs, toujours avides de nouveautés. Les obtenteurs afin de répondre à ces exigences sont en perpétuelle recherche d'innovations variétales. Pour ce faire, la conservation des ressources génétiques de plantes ornementales est essentielle. En plus de sa valeur patrimoniale, la collection de *Pelargonium* d'AGROCAMPUS-OUEST entre dans cette démarche, il convient donc d'en assurer la pérennité. Elle a notamment pour vocation de servir de pool génétique dans lequel les obtenteurs peuvent puiser pour établir des programmes de création variétale.

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a eu pour objectif la conservation à long terme des taxons de *Pelargonium* de la collection d'AGROCAMPUS-OUEST, par la mise en place d'un procédé de cryoconservation et l'amélioration du système de régénération *in vitro* à partir d'apex. A partir du procédé de cryoconservation établi, des travaux de microscopie ont été menés pour essayer de mieux comprendre comment les cryoprotecteurs agissent au niveau des cellules apicales et des apex. Enfin, la qualité des plantes régénérées a été évaluée afin de déterminer si la cryoconservation a un impact sur celle-ci.

Mise en place de la « droplet-vitrification » et de la régénération *in vitro*

Le protocole de cryoconservation par encapsulation-déshydratation existant ne répondant pas à nos objectifs, la première étape de notre travail a consisté à mettre au point la cryoconservation par « droplet-vitrification » sur les apex de *Pelargonium*.

Cette étude s'est appuyée en partie, d'une part sur les travaux portant sur l'encapsulation-déshydratation d'apex de *Pelargonium* et d'autre part sur la « droplet-vitrification » de massifs méristématiques de bananier (Panis *et al.*, 2005).

Nous avons ainsi mis en place un procédé de cryoconservation donnant de bons résultats en terme de taux de survie, simple à mettre en œuvre et reproductible. Contrairement aux procédés de cryoconservation couramment utilisés, notre système ne comporte pas d'acclimatation au froid, ni de prétraitement sur un milieu enrichi en sucres. De plus, il n'y a pas d'installation *in vitro* avant le prélèvement des apex, de cette manière le temps gagné est d'environ 4 mois.

Ainsi, les apex axillaires prélevés directement sur des plantes cultivées en serre sont plongés 20 min dans LS puis 15 min dans PVS2 avant d'être stockés dans l'azote liquide. A la sortie de la conservation à ultra basse température les apex sont réchauffés 15 min dans RS puis déposés 24 heures sur un milieu enrichi en saccharose (0,3M) avant de commencer le processus de régénération *in vitro* (figure 5-1).

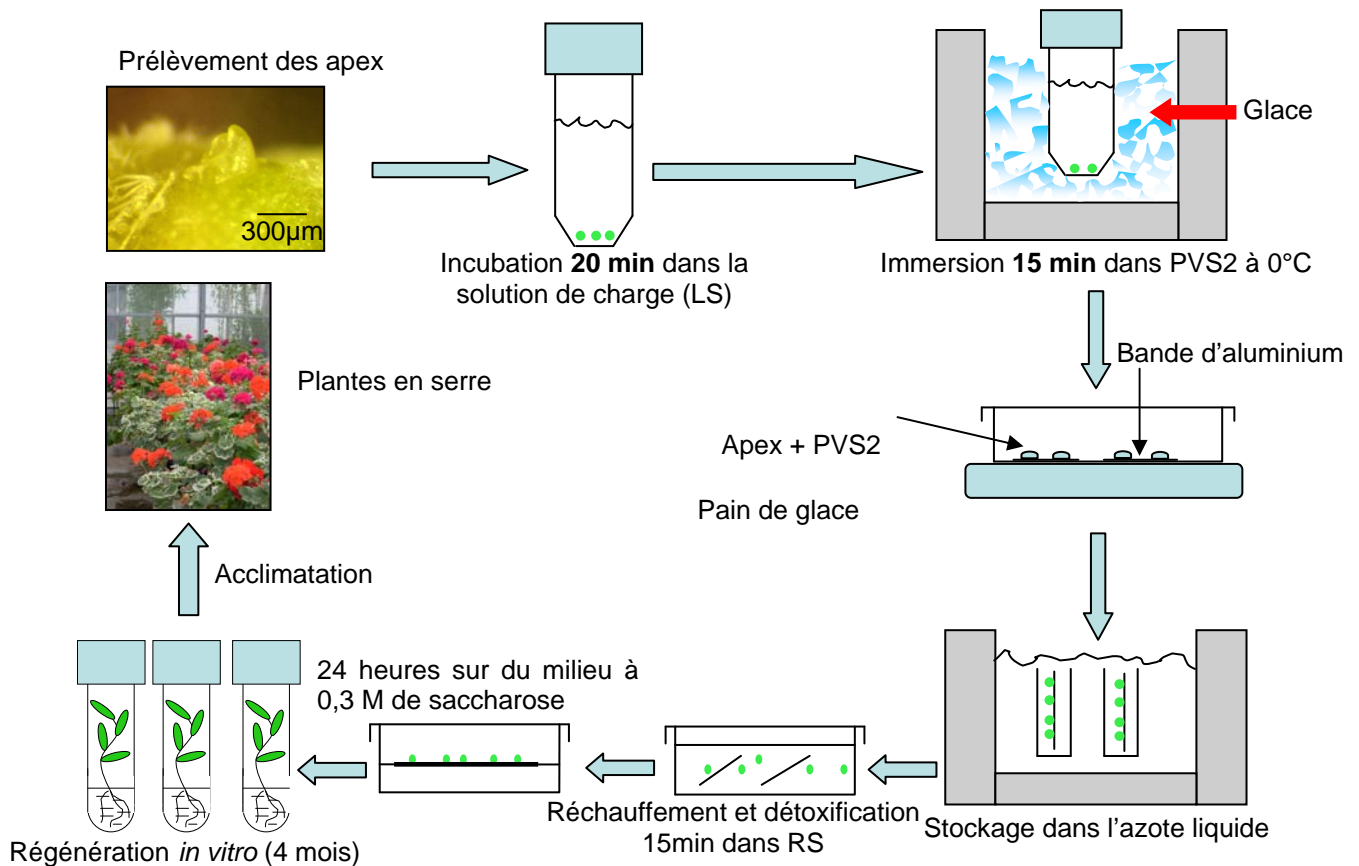


Figure 5-1 : Représentation schématique des différentes étapes du protocole de « droplet-vitrification » adapté aux apex de *Pelargonium*

Pour les 28 cultivars testés, des apex vivants ont été obtenus suite à la « droplet-vitrification ». Par ce procédé, nous estimons qu'un technicien pourra assurer la cryoconservation de 30 apex en 3 heures depuis le prélèvement jusqu'au stockage. En outre, avec un taux de régénération moyen de 43 % pour les cultivars de *P. x hortorum* utilisés dans l'article paru dans la revue *Cryoletters*, il faudrait prélever 30 apex pour avoir au moins 10 pousses régénérées selon les règles statistiques établies par Dussert *et al* (2003).

Au vu du petit nombre d'apex à prélever pour avoir la régénération de pousses et d'une durée du procédé courte, il est parfaitement envisageable d'utiliser la « droplet-vitrification » pour établir une cryobanque de la collection de *Pelargonium*.

Néanmoins, cette cryobanque ne pourra avoir d'intérêt que si la régénération *in vitro* est maîtrisée. Le premier milieu de culture utilisé étant l'étape clef de la régénération (Turner *et al.*, 2001b), notre travail s'est focalisé sur la composition de ce milieu. Pour des questions pratiques (disponibilité du matériel végétal), cette étude a été réalisée à partir d'apex non cryoconservés de Balcon Lilas.

D'après nos résultats, ce travail ne s'est pas avéré complètement satisfaisant car il ne tient pas compte de la qualité de la régénération (directe ou indirecte). De fait, aucun effet milieu n'a été mis en évidence pour les quatre cultivars employés au cours de cette étude (A Happy Thought, Balcon Lilas, Panaché et Renard Bleu) lors de la régénération post « droplet-vitrification », bien que le milieu B1A0G1 favorise une régénération sans passer par un cal contrairement à B3A3G0.

Il convient donc de réfléchir à la mise en place, comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre n°2, d'un système d'évaluation de la régénération post-cryoconservation qui prenne en compte à la fois le nombre de pousses régénérées et la qualité de la régénération. Par exemple, comme nous l'avons fait pour le choix des milieux de culture, une note comprise entre 0 et 5 pourrait être attribuée pour l'évaluation de critères de la qualité des pousses comme la présence de cal, ou l'hyperhydrie. Ainsi par l'utilisation d'apex cryoconservés et d'un système de notation, le choix du premier milieu de culture serait plus précis et devrait favoriser la mise en place d'un procédé de régénération *in vitro* suite à la cryoconservation.

Comme nous l'avons vu, il existe un effet génotype lors de la régénération. Afin de favoriser la régénération post-cryoconservation des cultivars les plus récalcitrants (*e.g.* 0 % de régénération pour 'Papa Crousse'), la procédure proposée pourrait être appliquée sur ces cultivars, en testant à la fois différentes concentrations en BAP, AIA et GA₃ et d'autres régulateurs de croissance. Par exemple, l'acide α -naphtalène acétique (ANA) qui a déjà été utilisé sur des apex de *Pelargonium* par le passé (Hakkaart et Hartel, 1979). Le but de ce travail serait d'avoir trois ou quatre procédés à disposition permettant d'obtenir des taux de régénération au minimum de 30 % pour l'ensemble des taxons de la collection de *Pelargonium*. Ce chiffre de 30% paraît un objectif réalisable et peut être considéré comme un taux correct par comparaison avec ce qui a déjà été obtenu chez d'autres plantes (*e.g.* 27 % chez la pomme de terre (Sarkar et Naik, 1998), entre 22 et 56 % chez le kiwi (Wu *et al.*, 2001)).

Plusieurs études dont celles sur *Dioscorea floribunda* (Mandal *et al.*, 2007) montrent, que les cytokinines favorisent la survie et la régénération post-cryoconservation. En multipliant, les essais de régénération post-cryoconservation par différentes procédures, il serait intéressant d'étudier en parallèle chez *Pelargonium*, le rôle spécifique des cytokinines sur la survie et la régénération d'apex cryoconservés. Ce travail pourrait être complété, par exemple, par une étude sur la localisation des cytokinines comme la BAP dans les apex. Comme pour les virus une méthode d'immunolocalisation peut être envisagée à la condition de disposer d'un anticorps primaire spécifique de la BAP. Sa localisation pourrait être aussi mise en évidence indirectement par son action sur la production de rRNA comme dans les travaux de Stoyanova-Bakalova *et al* (2001). De cette manière, il serait éventuellement possible d'établir une corrélation entre la présence de la BAP dans certaines cellules des apex avec la survie et la régénération post-cryoconservation.

A partir du protocole de « droplet-vitrification » que nous avons établi, nous avons cherché à mieux comprendre comment LS et PVS2 agissent sur les apex pour les rendre tolérants à la cryoconservation. Pour cela, nous avons utilisé des systèmes microscopiques novateurs permettant de filmer des événements cellulaires en direct ou de faire des reconstructions tridimensionnelles (3D) des apex au cours des différents traitements. Cette démarche vise à l'avenir à établir des procédés de cryoconservation optimisant la survie des apex, applicables à différentes espèces en contrôlant précisément les étapes de la « droplet-vitrification » et pourquoi pas en modifiant la composition des solutions de cryoconservation.

Mise au point technique des méthodes microscopiques

Ces travaux exposés dans le chapitre n°3, ont un caractère exploratoire par le fait que les méthodes d'observations que nous avons employées n'ont jamais encore été utilisées dans le cadre d'une étude sur la cryoconservation.

Il en est aussi de même pour l'utilisation de la RTM (Real Time Microscopy) sur des apex. C'est pourquoi un important travail de mise au point technique a été réalisé qui doit être poursuivi pour augmenter la qualité des observations. Notamment, les coupes d'apex faites au vibratome sont souvent trop épaisses (environ 30 μm) et ne permettent pas toujours de visualiser correctement la structure interne des cellules méristématiques. L'idéal serait de réussir à faire des coupes correspondant à deux couches cellulaires soit environ 20 μm . Jusqu'à présent ceci n'a pas été possible, les apex se déchirant lors de la coupe. Il est donc nécessaire de trouver un système supprimant cet inconvénient. Par exemple, les apex pourraient être inclus dans un bloc de gélose à point de fusion bas afin de rigidifier l'ensemble et ainsi faciliter la découpe. Il pourrait être aussi envisagé de les découper par microdissection laser, cette méthode aurait pour avantage de supprimer les lésions causées aux tissus par le frottement de la lame. En revanche, la viabilité des cellules devra être contrôlée, notamment pour savoir si l'échauffement provoqué par le laser n'est pas létal.

La qualité des films passant aussi par l'absence de mouvement des coupes dans la chambre lors de l'injection des solutions, un mécanisme permettant une injection très lente et régulière devrait être utilisé à la place de notre système manuel.

Concernant les aspects techniques de l'utilisation de la CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) et de la MPM (MultiPhoton Microscopy), la mise au point s'est faite par le paramétrage des longueurs d'onde d'excitation du fluorochrome FM4-64 à partir de protoplaste de *Citrus* à savoir 543 nm en mode confocal et entre 920 et 930 nm en mode biphoton. Pour les observations en CSLM et MPM, les apex ont été plongés dans une solution de FM4-64 à 12,5 μM pendant 4 heures. Le marquage réalisé, les apex placés dans une chambre conçue à cet effet, a permis de faire des reconstructions tridimensionnelles de bonne qualité des apex au cours des différentes expériences. Toutefois, lors de la préparation des apex, il faudra veiller à travailler dans un espace très propre par exemple sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter que des poussières ou des petits débris de tissus se collent sur les apex pouvant ainsi nuire à la qualité des représentations.

Les différents calculs de volumes et de vitesses de rétraction ont été réalisés par traitement d'images. Ne disposant pas des différents logiciels de traitement d'images et de visualisation employés à MRI (Volocity et LSM Browser), nous nous sommes servis des versions gratuites aux fonctions réduites (disponibles en ligne). Ainsi, en utilisant de manière combinée les logiciels Volocity Lite, LSM Browser et le logiciel libre Image J, nous avons pu faire les calculs souhaités. Néanmoins, ce travail serait nettement amélioré par l'acquisition d'un ordinateur ayant une puissance de calcul élevé, ceci permettrait un gain de temps important lors des traitements. De plus, l'achat d'un logiciel tel que Volocity aurait l'avantage à partir des acquisitions d'image de faire la reconstruction 3D, mais aussi de calculer directement avec plus de précisions des distances, des surfaces et surtout des volumes de cellule ou d'apex entier, sans passer par une multitude d'étapes comme nous l'avons fait. A la place de ce logiciel, il pourrait être aussi envisagé, l'utilisation du logiciel libre MedInria (site web : www-sop.inria.fr/asclepios/software/MedInria) consacré à l'analyse d'images médicales dont une version adaptée au végétal est actuellement en cours de développement à Montpellier RIO Imaging.

Effets de LS et PVS2 sur les cellules méristématiques et les apex

La majeure partie des contraintes techniques ayant été levées, nous avons suivi le comportement des cellules méristématiques et des apex durant les traitements dans LS et PVS2 par RTM et CLSM. Ces deux techniques apportant des informations différentes, sur la dynamique des phénomènes pour la

RTM, sur le volume pour la CLSM, elles peuvent être employées de manière indépendante en fonction des besoins.

La fluorescence étant détectable en RTM, il pourrait s'avérer intéressant de marquer spécifiquement les différents éléments constitutifs des cellules (paroi, membranes, noyau, mitochondries...). Ainsi, le marquage des membranes nous renseignerait sur le fait que les O.N.I.I.V mis en évidence uniquement en RTM possèdent bien une membrane comme nous le supposons. Une meilleure connaissance des différents composés cellulaires visibles en RTM apporterait sûrement des informations supplémentaires sur l'impact de LS et PVS2 et par conséquent sur la survie post-cryoconservation.

Les films réalisés en RTM montrent comme en microscopie optique que LS provoque une plasmolyse des cellules plus ou moins importante en fonction du niveau de différenciation cellulaire. Ceci se traduit par une diminution du volume cellulaire de l'apex visible en CLSM mais sans déformation notable de celui-ci. Grâce à la RTM, nous avons mis en évidence que LS n'avait pas d'impact sur les parois et surtout que son action sur le contenu cellulaire était minime puisque nous n'avons pas observé de changement de comportement des O.N.I.I.V.

A l'inverse, l'immersion des apex dans PVS2 provoque des changements importants tant au niveau des cellules apicales que sur l'ensemble de l'apex, notamment au niveau de la paroi par une contraction sur elle-même des cellules. Ainsi, une déformation importante de l'apex a été mise en évidence par la CLSM. De plus, la RTM nous a permis de constater que l'action de PVS2 sur les cellules est très rapide et qu'elle engendrait des modifications majeures au niveau des O.N.I.I.V en changeant leur forme et leur mobilité.

Enfin l'action successive de LS et PVS2 sur les apex n'a pas provoqué de changements soudains, nos observations mettant en évidence une rétraction lente des apex sur eux-mêmes avec le maintien de la forme et de la mobilité des O.N.I.I.V. Nous avons pu en déduire que LS outre son rôle d'osmoticum, protégeait les cellules en atténuant les effets de PVS2, c'est-à-dire plus précisément ceux du DMSO et de l'éthylène glycol.

Sachant que les apex n'ont pas survécu à la cryoconservation lorsqu'ils sont seulement exposés à PVS2, il pourrait être intéressant de vérifier la viabilité des apex après ce traitement (sans cryoconservation) en les mettant en culture. De cette manière, si les apex ne survivent pas ceci indiquerait que les changements observés en RTM sont létaux pour les cellules. Dans ces conditions des expériences sur les O.N.I.I.V pourraient être réalisées, notamment en vérifiant si et seulement si leur forme et leur mobilité sont corrélées avec la mort des cellules. Dans le cas où cette affirmation serait vraie, les O.N.I.I.V pourraient être utilisés comme indicateur de la survie des cellules.

Les résultats obtenus par RTM et CLSM doivent être confirmés par d'autres expériences mais d'ores et déjà nous pouvons affirmer que ces outils microscopiques ont apporté des informations qu'il n'était pas possible d'avoir auparavant. Leur utilisation peut donc se justifier dans de futurs travaux de recherche portant sur la cryoconservation d'apex par « droplet-vitrification ». Par exemple, sachant que le DMSO perméabilise les parois (Szechynska-Hebda *et al.*, 2006), un marquage des pectines puis une observation en CLSM comme cela a déjà été réalisé sur des tubes pollinique de pin (Ting *et al.*, 2007) permettrait vraisemblablement de mieux comprendre son action sur les parois cellulaires. Ou encore, ces outils pourraient être employés au moment du réchauffement afin de voir si les apex et les cellules reprennent l'aspect qu'ils avaient avant la cryoconservation et surtout de voir comment s'opèrent les changements (s'ils existent) au cours de cette étape.

En revanche, ces systèmes ne permettent pas pour des raisons techniques (vitesse de refroidissement trop lente par platine à effet Peltier, condensation sur les objectifs...) l'observation des apex lors de l'immersion dans l'azote liquide, pourtant une étape clef de la réussite de la cryoconservation.

A côté de ces travaux directement liés à la thèse, la RTM et la CLSM pourraient être utilisées dans le cadre d'autres études sur la cryoconservation comme la localisation et le rôle de protéines produites spécifiquement lors d'un stress hydrique ou d'une exposition au froid (LEA, HS protein...). Ainsi, il serait intéressant de savoir si les produits utilisés dans les solutions de cryoprotection induisent la production de ces protéines (comme le polyéthylène glycol avec la HS protein Em6, Boudet *et al.*, 2006) et où elles s'accumulent. Dans ce cas, un lien pourrait éventuellement être établi entre la survie des cellules lors de la cryoconservation et l'accumulation en protéines.

Grâce à l'existence d'un fluorochrome dont l'émission lumineuse varie en fonction du degré d'oxydation des lipides (C11-BODIPY^{581/591}, Pap *et al.*, 1999), le stress oxydatif des apex pourrait être aussi suivi au cours d'un procédé de cryoconservation. De cette manière, une sensibilité particulière de certaines cellules apicales à l'oxydation serait peut-être mise en évidence.

Avec le développement de ces nouveaux systèmes d'observation et des fluorochromes, les possibilités d'études sont multiples. De fait, le travail présenté n'a fait qu'effleurer le potentiel de ces outils pour l'étude des phénomènes au cours de la cryoconservation.

Estimation de la qualité des plantes régénérées

Les résultats obtenus concernant la régénération *in vitro* des apex montre que le plus souvent celle-ci est directe même s'il peut exister parfois d'autres systèmes de régénération.

Ainsi pour les cultivars non chimériques utilisés dans la thèse pour lesquels des plantes ont été obtenues à partir d'apex témoins ou d'apex cryoconservés, aucune différence significative n'a été observée au cours de la régénération, au niveau du phénotype pour les sept critères évalués (3 foliaires, 3 liés à la couleur des fleurs et un concernant la quantité d'ADN).

Néanmoins, lors des observations en serre des plantes régénérées pour un cultivar (A Happy Thought), un retard dans la floraison a été constaté par rapport à celle des plantes issues de bouture. Par conséquent une étude du développement permettrait de savoir si la cryoconservation est impliquée dans ces changements. Ce travail pourrait se baser sur celui mené actuellement à AGROCAMPUS-OUEST sur l'étude du développement et la différenciation des organes aériens chez *Hydrangea*.

Ce décalage dans le temps n'étant pas préjudiciable à l'allure générale de plante et pour les raisons évoquées précédemment, on peut considérer que la « droplet-vitrification » est généralisable aux cultivars non chimériques de la collection.

L'absence de chlorophylle dans certaines couches cellulaires des feuilles a permis de déterminer la structure des méristèmes des cultivars chimériques. A partir de ces cultivars, il a toujours été obtenu une certaine proportion de plantes aux phénotypes non conformes démontrant ainsi le caractère « plastique » (Marcotriagiano et Bernatzke., 1995) des méristèmes. C'est-à-dire la possibilité d'avoir des réorganisations entre les couches cellulaires au cours du développement. Même si ces variations sont essentiellement le résultat de la régénération *in vitro*, il sera toujours difficile de conserver ces cultivars par cryoconservation en raison de l'instabilité naturelle des apex chimériques. Néanmoins, ces cultivars sont des modèles d'études intéressants car de part leur nature chimérique péricline, il est possible de savoir quelle est l'origine cellulaire des pousses régénérées. C'est pourquoi les travaux entamés devraient être poursuivis dans le futur sur ces cultivars. Notamment, une étude plus précise que celle que nous avons réalisée sur le suivi de la régénération pourrait se baser sur des observations au MET des chloroplastes. De cette façon, nous saurions d'une part s'il existe une corrélation entre la

survie des cellules et la nature des chloroplastes et d'autre part si les néoformations observées ont toujours la même origine cellulaire.

Enfin au cours de ce travail, nous avons montré que le PFBV et le PLPV, deux virus pathogènes du *Pelargonium* avaient la capacité à contaminer l'ensemble de l'apex y compris le méristème. De plus, nos résultats ont permis de constater que la cryoconservation élimine les virus jusqu'à un seuil suffisamment bas pour ne pas être détectable par tests ELISA. En revanche, nos expériences n'expliquent pas comment la cryoconservation a éliminé partiellement les virus car contrairement à d'autres espèces nous n'avons pas visualisé d'altérations significatives des cellules sous méristématiques. Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle, les virus se trouvant dans la base de l'apex où les cellules sont détruites au cours de la cryoconservation ne pourraient plus se multiplier ne peut pas s'appliquer dans notre cas. Il convient donc de poursuivre les travaux sur l'impact de la cryoconservation en matière d'assainissement viral, notamment de chercher à quel moment du procédé une partie des virus est éradiquée. Sachant que les cryoprotecteurs sont plus ou moins toxiques pour les cellules végétales, ils pourraient l'être aussi pour les virus. De cette manière, nous saurions éventuellement des cryoprotecteurs ou des ultra basses températures lesquels, ont un impact sur la charge virale dans les apex.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahuja S, Mandal B. B, Dixit S, Strivastava P. S,

Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. *Plant Science* 2002, vol 163, p 971-977

Albers F, Van Der Walt J.J.A,

Karyological and chemotaxonomical studies of the hybrid *Pelargonium incarnatum* x *P. patulum* (Geraniaceae) and its parents, *Pl. Syst. Evolu.* 1992, vol 183, p 161-167

Albouy J, Devergne J.C,

Maladies à virus des plantes ornementales, Du Labo au Terrain, INRA, 1998

Al-Forkan M, Anthony P, Power JB, Davey MR, Lowe KC,

Effect of Erythrogen (TM) on post-thaw recovery of Cryopreserved cell suspensions of indica rice (*Oryza sativa* L.), *Cryoletters.* 2001, vol 22, issue 6, p 367-374

Apel K, Hirt H,

Reactive Oxygen Spécies : Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction, *Annu Rev. Plant Biol* 2004. vol 55, p373-99

Arora R, Wisniewski M.E,

Ultrastructural and protein changes in cell suspension cultures of peach associated with low temperature-induced cold acclimation and abscisic acid treatment, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1995, vol 40, p 17-24

Attree S.M, Sheffield E,

Plasmolysis of *Pteridium* protoplasts: a study using light and scanning-electron microscopy, *Plant* 1985. vol 165, p 151-157

Bae C. H, Abe T, Nagata N, Fukunishi N, Matsuyama T, Nakano T, Yoshida S,

Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), *Plant Science.* 2000, vol 151, p 93-101

Bachiri Y, Gazeau C, Hantsz J, Morisset C, Derreudre J,

Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration, *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 1995, vol 43, p 241-248

Bachiri Y, Bajon C, Sauvanet A, Gazeau C, Morisset C,

Effect of osmotic stress on tolerance of air-drying and cryopreservation of *Arabidopsis Thaliana* suspension cells, *Protoplasma.* 2000, Vol 214, p 227-243

Bagniol S, Engelmann F, Michaux-Ferriere N,

Histo-cytological study of apices from in vitro plantlets of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryopreservation process, *Cryoletters.* 1992, vol 12, p 405-412

Bagory M,

La microscopie multiphoton : état de l'art, applications et perspectives, *MultiPhoton Microscopy.* 2006

Bailey-Serres J, Mittler R,

The roles of reactive oxygen species in plant cells, *Plant Physiology*. 2006, vol 141, p 311

Barbier de Reuille P, Bohn-Courseau I, Godin C, Traas J,

A protocol to analyse cellular dynamics during plant development, *The Plant Journal*. 2005, vol 44, p 1045-1053

Baudot A, Mazuer J, Odin J,

Cryopreservation : conserver des éléments biologiques par vitrification, *Rev. Gén. Froid*. 1998, n° 981, p 35

Baudot A, Odagescu V,

Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions, *Cryobiology*. 2004, vol 48, p 283-294

Beaurepaire E,

Inactivation de structures intra embryonnaires par photo ablation : une nouvelle approche de la biomécanique du développement embryonnaire, 2005

Becher S.A, Steinmetz K, Weising K, Boury S, Peltier D, Renou J.P, Kahl G, Wolff K,

Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*, *Theor. Appl. Genet*. 2000, vol 101, p 643-651

Beckmann J.S,

A genomic view of breeding, *Revista Brasileira de Reproducao Animal*. 1990, issue sup 2, p 10-18

Bellanger, étude sur *C.elegans*

2005, www.mri.cnrs.fr

Benson EE, Wilkinson M, Todd A, Ekuere U, Lyon J,

Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips, *Cryoletters* 1996, vol 17, issue 2, p 119-128

Benson E,

Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance, *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant*. 2000, vol 36, p 163-170

Benson E, Bremmer D,

Oxidative Stress in the Frozen Plant: A free Radical point of View, ISBN 2004 vol 0-415-24700-4

Bergann F, Bergann L,

Über umschichtungen (translokationen) an den Sprosscheiteln perikliner chimären. *Züchter* 1962, vol 32, p 110-119 cité par Tilney-Basset, 1986

Bigot C,

Apport de la culture *in vitro* dans contrôle de la néoformation, les colloques de l'INRA. 1989, vol 51, p 35-53

Blakesley D, Kiernan R.J,

Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid, Cryoletters. 2001, Vol 22, issue 1, p 13-18

Block W,

Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germplasm, Cryobiology. 2003, vol 47, p 59-72

Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read N.D, Satiat Jeunemaitre B,

FM – dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells, Journal of Microscopy. 2004, vol 214, p 159-173

Boudet J, Buitink J, Hoekstra F.A, Rogniaux H, Larré C, Satour P, Leprince O,

Comparative Analysis of the Heat Stable Proteome of Radicles of *Medicago truncatula* Seeds during Germination Identifies Late Embryogenesis Abundant Proteins Associated with Desiccation Tolerance, Plant Physiology. 2006, vol 140, p 1418-1436

Bridgen M.P, Staby G.L,

Low pressure and lod oxygen storage of plant tissue cultures, Plant Science Letters. 1981, vol 22, p 117-186

Brisson M, De Boucaud M.T, Dosba F,

Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks, Plant Science. 1995 vol 105, p 235-242

Brisson M, Heliott B, De Boucaud M.T, Dosba F,

Incidence of cryopreservation on the sanitary state of an experimentally contaminated *Prunus* rootstocks, Acta Horticulturae.1997 vol, 447

Brisson M, Heliott B, De Boucaud M.T, Peronnet A, Dosba F,

Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus, Plant Science. 1997, vol 1213, p 189-196

Brown R.C, Lemmon B.E,

The cytokinetic apparatus in simultaneous cytokinesis, Protoplasma. 1991, vol 165, n° 1-3

Busquet A, Keim V, Clos M, Del Arco A, Boronat A, Arro M, Ferrer A,

Arabidopsis thaliana contains a single gene encoding squalene synthase, Plant Mol Biol. 2008, vol 67, p 25-36

Cassells A.C, Minas G, Bailiss K.W,

Pelargonium net vein agent and pelargonium petal streak as beneficial infections of commercial pelargoniums, Scientia Horticulturae. 1982, vol 17, issue 1, p 89-96

Castano A, Hernandez C,

Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium* line pattern virus and its relationship with the family *Tombusviridae*, Arch Viral. 2005

Chandel KPS, Chaudhury R, Radhamani J, Malik SK,

Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jachfruit, *Annals of Botany*. 1995, vol 76, issue 5, p 443-450

Channuntapipat C, Collins G, Bertozzi T, Sedgley M,

Cryopreservation of in vitro almond shoot tips by vitrification, *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 2000, vol 75, issue 2, p 228-232

Channuntapipat C, Sedgley M, Collins G,

Changes in methylation and structure of DNA from almond tissues during in vitro culture and cryopreservation, *Journal of the American Society for horticultural*. 2003, vol 128, issue 6, p 890-897

Charoensub R, Phansiri S, Yongmanitchai W, Sahai A,

Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple monodal culture, *Scientia Horticulturae*. 2003, vol 98, p 485-492

Chiari A, Bridgen M.P,

Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2002, vol 68, p 49-55

Chiu W.L, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J,

Engineered GFP as a vital reporter in plants, *Current Biology*. 1996, vol 6, issue 3, p 325-330

Clavero-Ramirez, Lopez Aranda J.M, Galvez J, Soria C, Sanchez-Sevilla J.F, Medina J.J., Bartual R, Gonzalez-Benito ME,

Cryopreservation of in vitro apices of strawberry (*Fragaria x ananassa* duch) by a new encapsulation-dehydration method, *Acta Horticulturae*. 2004, p 115-118,

Clavero-Ramirez, Galvez-Farfan J, Lopez Aranda JM, Gonzalez-Benito ME,

Apex Cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation-dehydration methods, *Cryoletters*. 2005, Vol 26, issue 1, p, 17-24

Crowe J.H, Carpenter J.F, Crowe L.M, Anchordoguy T.J,

Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules, *Cryobiology*. 1990, vol 27, issue 3, p 219-231

Crowe J.H, Oliver A.E, Hoekstra F A, Crowe L.M,

Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose : the role of vitrification, *Cryobiology*. 1997, vol 35, p 20-30

Crutzen, Steffen,

How long have we been in the anthropocene era? *Climatic Change* 2003. vol 61, p 251-257

Dereuddre J, Gazeau C,

Les végétaux et les très basses températures, *Les végétaux et le Froid*, Ed Herman. 1992, p 107-175

De Verno L.L, Park Y.S, Bonga J.M., Barrett J.D,

Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss), Plant Cell reports. 1999, vol 18, p 948-953

Digat B, Vidalie H, Vergneau J.P,

Aspects phytotechniques et phytosanitaires liés à la production du *Pelargonium* F1 de semis P.H.M, Revue Horticole. 1982, vol 223, p 29-37

Ding F, Jin S, Hon N, Zhong Y, Cao Q, Yi G, Wang G,

Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips, Plant Cell reports. 2007, vol 10, p 1007

Dixit-Sharma S, Ahuja-Ghosh S, Mandal B.B, Srivastava P.S,

Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tip of *Dioscorea deltoidea* - an endangered medicinal plant, Scientia Horticulturae 2005. vol 105, p 513-517

Dossot,

Présentation de la fluorescence. 2005, INRA NANCY

Dreyer L.L, Albers F, Van Der Walt J.J.A, Marschewski D.E,

Subdivision of *Pelargonium* sect. *Cortusina* (*Geraniaceae*) Plant Syst. Evol. 1992 vol 183, issue 1-2, p 83-97

Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Richaud F, Beule T, Durand-Gasselien T, Duval Y,

Développement de la cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile, avec un procédé amélioré, CIRAD. 1993

Dumet D, Grapin A, Bailly C, Dorion N,

Revisiting crucial steps of an encapsulation-desiccation based cryopreservation process: importance of thawing method in the case of *Pelargonium* meristems, Plant Science 2002. vol 163, p1121-1127

Dussert S, Chabrillange N, Montillet J.L, Agnel J.P, Engelmann F, Noirot M,

Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage, Physiologia Plantarum. 2003, vol 119, p 534-543

Dussert S, Engelmann F, Noirot M,

Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections, Cryoletters. 2003, vol 24, p 149-160

Elleuch H, Gazeau C, David H, David A,

Cryopreservation does not affect the expression of a foreign *sam* gene in transgenic *Papaver somniferum* cells, Plant cell Reports. 1998, vol 18, p 94-98

Engels J, Visser B,

Genebank Management Procedures, Guide to effective management of germplasm collections. 2003, p 60-79

Engelmann F, Lartaud M, Chabrilange N, Carron M.P, Etienne H,

Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*, Cryoletters. 1997, vol 18, p 107-116

Engelmann F, Dussert S,

Développement de la cryoconservation pour la conservation des ressources génétiques végétales, Cahiers Agricultures. 2000, vol 9, p 237-45

Engelmann F, Engels J.M.,

Technologies and strategies for *ex situ* conservation. 2002, pp 89-103 in managing Plant genetic Diversity, Guide to effective management of germplasm collections. 2003,

Escoute J,

Description RTM Richardson, 2005 www.mri.cnrs.fr

Fabre et Dereuddre J,

Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips, Cryoletters. 1990, vol 11, p 413-426

Faccioli G, Marani F,

Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting, cité par Helliot 2007,

Fahy G.M , Macfarlane D.R, Angell A, Meryman H.T,

Vitrification as an approach to cryopreservation, Cryobiology. 1984, vol 21, p 407-726

Fang J.Y, Wetten A, Hadley P,

Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage, Plant Science. 2004, vol 166, issue 3, p 669-675

Farrant J.M, Pammenter N.W, Berjak P,

Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types, Seed Sci Res. 1993, vol 3, p 1-13

Ferreira C.A, Pinho E.V de Von, Alvim P de O, Andrade V de, Silva T.T de A, Cardoso D.L,

Conservation and determination of the viability of maize pollen grain, Revista Brasileira de Milho e Sorgo. 2007, Vol 6, p, 159-173

Fischer D.B,

Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy, Histochemie. 1968, vol 16, p 92-96

Flachsland E, Terada G, Scocchi A, Rey H, Mroginski L, Engelmann F,

Cryopreservation of seeds and *in vitro* cultured protocorms of *Oncidium bifolium sims* (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration, Cryoletters. 2006, vol 27, issue 4, p 235-242

Frankel O.H, Brown A.H.D, Burdon J.J,

The conservation of plant biodiversity, Cambridge University Press, 1995, dans Guide to effective management of germplasm collections. 2003

Fukai S, Goi M, Tanaka M,

The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation, Scientia Horticulturae. 1994, vol 57, p 347-351

Gabe M,

Histologic contributions of the endocrine pancreas of *Ichthyophis glutinosus*(L.) (gynophione batracian), Arch Anat Histol Embryol. 1968, vol 51, issue 1, p 231-246

Gagliardi R.F, Pacheco G.P, Valls J.F.M, Mansur E,

Cryopreservation of cultivated and wild *Arachis* species embryonic axes using desiccation and vitrification methods, Cryoletters. 2002, vol 23, issue 1, p 61-68

Gallard A, Panis B, Dorion N, Swennen R, Grapin A,

Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification, Cryoletters. 2008, vol 29, issue 3, p 243-251

Genda Y, Sato K, Nunomura O, Hirabayashi T, Ohnishi J, Tsuda S,

Immunolocalization of *Pepper mild mottle virus* in *Capsicum annuum* seeds, J.Gen Plant Pathol. 2005, vol 71, p 238-242

Gibby M, Albers F, Prinsloo B,

Karyological studies in *Pelargonium* sect. *Ciconium*, *Dibrachya* and *Jenkinsonia* (*Geraniaceae*), Plant Syst. Evol. 1990, vol 170, issue 3-4, p 151-159

Gonzalez-Arno M.T, Engelmann F, Huet C, Urrea C,

Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology, Cryoletters. 1993 vol 14, p 303-308

Gonzalez-Arno M.T, Engelmann F,

Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique : review and case study on sugarcane, Cryoletters 2006. vol 27, issue 3, p 155-168

Gonzalez-Arno M.T, Panta A, Roca W.M, Escobar R.H,

Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops, Plant Cell Tissu Organ Cult. 2008, vol 92, p 1-13

Grandjean O, Vernoux T, Laufs P, Belcram K, Mizukami Y, Traas J,

In vivo Analysis of cell division, Cell growth and differentiation at the shoot apical meristem in *Arabidopsis*, The plant Cell. 2004, vol 16, p 74-87

Grapin A, Hupel C, Marche C, Dorion N,

First results of *Pelargonium* shoot apex cryopreservation, Acta Horticulturae 2001, vol 560, ISHS

Grapin A, Dumet D, Holota H, Dorion N,

Cryopreservation of *Pelargonium* shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of sucrose concentration, dehydration duration and genotype, *Acta Horticulturae* 2003, vol 623, p 225-230

Grapin A, Dorion N, Verdeil J.L, Escoute J,

Histo-cytological changes in *Pelargonium* apices during the cryopreservation process: effect of the osmotic agent chosen for the preculture step, *Acta Horticulturae*. 2007, vol 760, p 195-201

Grout B.W.W,

Genetic preservation of plant cells *in vitro*. 1995, Springer-Berlin, cité par Verleysen. 2005

Gupta S, Reed B.M,

Cryopreservation of shoots tips of Blackberry and Raspberry by encapsulations-dehydration and vitrification, *Cryoletters*. 2006, vol 27, issue 1, p 29-42

Hakkart F.A, Hartel G,

Virus eradication from some pelargonium zonale cultivars by meristem-tip culture, *Neth J.Pl. Path.*1979, vol 85, p 39-46

Halmagyi A, Fischer-Klüver G, Mix-Wagner G, Schumacher H,M,

Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches, *Plant Cell Rep.* 2004, vol 22 p 371-375

Hao Y.J, Liu Q.L, Deng X.X,

Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels, *Cryobiology*.2001, vol 43, p 46-53

Hao Y.J, Deng X.X,

Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured *Citrus* callus, *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 2002, vol 38, P 472-476

Hao Y.J, Cheng Y.J, Deng X.X,

GUS gene remains stable in transgenic *Citrus* callus recovered from cryopreservation, *Cryoletters*. 2003, vol 24, issue 6, p 375-380

Harding K,

The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth, *Plant Cell, Tissues and Organ Culture*. 1994, vol 37, p 31-38

Harding K, Benson E.E,

Analysis of nuclear and chloroplast DNA plants regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato, *Cryoletters*. 2000, vol 21, p 279-288

Hassanein AM.A,

Etude sur la résistance à la sécheresse chez les Pelargoniums et recours aux biotechnologies pour l'amélioration de cette caractéristique, Institut National d'Horticulture, Université d'Angers. 2005

Hebert C, Roux-Salembien P, Egly J.M,

La cryoconservation des échantillons biologiques, Le Technoscope de Biofutur. 1993 n°128

Heliot L,

Base de la microscopie confocale 2006, www.picin.u-bordeaux2.fr

Helliot B, Panis B, Poumay Y, Swennen R, Lepoivre P, Frison E,

Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa spp.*), Plant Cell Rep. 2002, vol 20, p 1117-1122

Helliot B, Swennen R, Poumay Y, Frison E, Lepoivre P, Panis B,

Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa spp.*) highly proliferating meristems, Plant Cell Rep. 2003, vol 21, p 690-698

Helliot B, Panis B, Busogoro J.P, Sobry S, Poumay Y, Raes M, Swennen R, Lepoivre P,

Immunogold silver staining associated with epi-fluorescence for cucumber mosaic virus localisation on semi-thin sections of banana tissues, European Journal of Histochemistry. 2007, vol 51, issue 2, p 153-158

Hirai D, Sakai A,

Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam) by optimizing conditions for osmoprotection, Plant Cell Rep. 2003, vol 21, p 961-966

Hirsh A.G,

Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection, Cryobiology. 1987, vol 24, issue 3, p 214-228

Hitmi A, Barthomeuf C, Sallonen H,

Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity, Cryoletters. 1999, vol 20, p 113-120

Hornung R, Holland A, Taylor H F, Lynch P.T,

Cryopreservation of *Auricula* Shoot Tips using the encapsulation-dehydration technique, Cryoletters. 2001, vol 22, p 27-34

Horst R. K, Smith S.H, Horts H.T, Oglevee W.A,

In vitro regeneration of shoot and growth from meristematic tips of *Pelargonium x hortorum* Bailey, Acta Horticulturae. 1976, vol 59, p 131-141

Ishikawa M, Tandon P, Suzuki M, Yamaguishi-Ciampi A,

Cryopreservation of bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells using slow prefreezing and vitrification procedures, Plant Science. 1996, vol 120, p 81-88

James C.M,

The phylogeny and molecular biology of the genus *Pelargonium* (*Geraniaceae*) Ph.D, University of Cambridge 1995, p 263

James C.M, Gibby M, Barrett J.A,

Molecular studies in *Pelargonium* (*Geraniaceae*) A taxonomic appraisal of section *Ciconium* and the origin of the 'Zonal' and 'Ivy-leaved' cultivars, *Plant Syst. Evol.* 2004, vol 243, p 131-146

Jarret R.L, Gawels N,

Abscissic acide-induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 1991, vol 24, p 13-18

Jarvis D, Hogkin T,

Farmer decision making and genetic diversity: linking multidisciplinary research to implementation on-farm, IPGRI 2000. Guide to effective management of germplasm collections. 2003,

Jokipii S, Ryyänen L, Kallio P.T, Aronen T, Häggmann H,

A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L x *Populus tremuloides* Mich , *Plant Science*; 2004, vol 166, p 799-806

Jorgensen R.A, Cluster P.D, English J, Que Q, Napoli C,

Chalcone synthase co-suppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs antisense constructs and single copy vs complex T-DNA sequences, *Plant Mol Biol.* 1996, vol 31, p 957-973

Jung D.W, Sung C K, Touno K, Yoshimatsu K, Shimomura K,

Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification, *Plant Physiol.* 2001, vol 159, p 801-805

Kaczmarczyk A, Jachim Keller E.R, Melzer M, Rutten T,

Ultrastructural analysis of potato cryopreservation using the droplet method, I.P.K Gatersleben 2006

Kim H.H, Yoon J.W, Park Y.E, Cho U.G, Sohn J.K, Kim T.S, Engelmann F,

Cryopreservation of Potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification, *Cryoletters.* 2006 vol 27, issue 4, p 223-234

Kim H-H, Lee J-K, Yoon J-W, Ji J-J, Nam S-S, Hwang H-S, Cho E-G, Engelmann F,

Cryopreservation of Garlic bulbil promordia by the droplet-vitrification procedure, *Cryoletters.* 2006 vol 27, issue 3, p 143-153

König K,

Multiphoton microscopy in life sciences, *Journal of Microscopy.* 2000, vol 200, p 83-104

Koo B, Smale M,

Economic costs of genebank operation, Guide to effective management of germplasm collections. 2003, p 93-106

Lakhanpaul S, Babrekar P.P, Chandel K.P.S,

Monitoring studies in onion (*Allium Cepa* L.) seeds retrieved from storage at -20 degrees C and - 180 degrees C, *CryoLetters.* 1996, vol 17, issue 4, p 219-232

Lambardi M, De Carlo A, Benelli C, Bartolini G,

Cryopreservation of Woody species by vitrification of shoot tips and embryogenic tissue, *Acta Horticulturae* 2001 vol 560, p 137-140

Larkindale J, Knight M.R,

Protection against heat stress-induced oxidative – Damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid, *Plant Physiol.* 2002, vol 128, p 682-695

Leunufna S, Keller E.R.J,

Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) *Plant Cell Rep.* 2003, vol 21, p 1159-1166

Leopold A.C, Vertucci C.W,

Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds, *Seed Moisture.* 1989, p 51-67

Liu Y, Wanf X, Liu L,

Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification, *Plant Science.* 2001, vol 166, p 677-685

Lovelock L,

The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, *Biochim Biophys Acta* 1953, vol 11, issue 1, p 28-36

Lu Y, Rong T, Cao M,

Analysis of DNA methylation in different maize tissues, *Genetics and genomics.* 2008, vol 35, p 41-48

MacNeely J.A, Ness G,

People, parks, and biodiversity: issues in population-environment dynamics, 1996

Mamet H, Jonard R,

Differences in varietal response, with regard to nutritional requirements for plant growth substances and nitrogen, for *in vitro* isolated apices of three *Pelargonium* cultivars, *Comptes- rendus des séances de l'Académie des Sciences III.* 1983, vol 296, issue 7, p 381-388

Mandal B.B, Ahyja Ghoshl S,

Regeneration of *Dioscorea floribunda* plants from cryopreserved encapsulated shoot tips: effect of plant growth regulators, *Cryoletters.* 2007, vol 28, issue 5, p 329-336

Marcotrigiano M, Bernatzky R,

Arrangement of cell layers in the shoot apical meristems of periclinal chimeras influences cell fate, *The Plant Journal.* 1995, vol 7, issue 2, p 193-202

Mari S, Engelmann F, Chabrillange N, Huet C, Michaux-Ferrière N,

Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique, *Cryoletters.* 1995, vol 16, p 289-298

Martin C, Gonzalez-Benito E,

Survival and genetic stability of *Dendranthema Grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration, *Cryobiology*. 2005, vol 51, p 281-289

Martinez C.A, Loureiro M. E, Oliva M.A, Maestri M,

Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress, *Plant Science*. 2001, vol 160, p 505-515

Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C, Yamada K,

Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method, *Cryoletters*. 1995, vol 16, p 189-196

Matsumoto T, Sakai A,

Cryopreservation of in-vitro-cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitrification, *Acta Horticulturae*. 2000, vol 538

Matsumoto T, Mochida K, Itamura H, Sakai A,

Cryopreservation of persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips, *Plant Cell Rep*. 2001. vol 20, p 398-402

Matsumoto T, Sakai A,

Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol, *Euphytica*. 2003, vol 131, p 299-304

Maxted N. Ford-Lloyd B.V, Hawkes J.G,

Complementary conservation strategies, *Plant Genetic Conservation*. 1997 ISBN 0.412.63400.7 and 0.412.63730.8

Mazliak P,

Les effets du froid sur les biomembranes, dans les végétaux et le froid, Ed herman. 1999, p 3-26

Mazur P,

Freezing of living cells: mechanism and implications, *Am J. Physiol*. 1984, vol 247, issue 3, p 125-42

Medina J.J, Clavero-Ramirez I, Gonzalez-Benito M.E, Galvez-Fanfan J, Lopez-Aranda J.M, Soria C,

Field Performance characterization of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) plants derived from cryopreserved apices, *Scientia Horticulturae*. 2007, vol 113, p 28-32

Meryman H.T, Williams R.J, Douglas M.S,

Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection, *Cryobiology*. 1977, vol 14, issue 3, p 287-302

Mezzetti R, Savini G, Carnevali F, Moot D,

Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry, *Biologia Plantarum*. 1997, vol 39, issue 1, p139-150

Mikula A,

Comparison of three techniques for cryopreservation and reestablishment of long-term *Gentiana tibetica* suspension culture, *Cryoletters*. 2006, vol 27.5, p 269-282

Mithila J, Murch S, KrishnaRaj S, Saxena P.K,

Recent advances in *Pelargonium in vitro* regeneration systems, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001, vol 67, p 1-9

Mittler R,

Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Plant Science*. 2006, Vol 11 n°1

Morel G,

Ann EPIPHYT 1 : 123. 1948, cité par Helliot. 2007

Murch S, Ragone D, Shi W.L, Alan A.R, Saxena P.K,

In vitro conservation and sustained production of breadfruit (*Artocarpus Altilis*, *Moraceae*): modern technologies for a traditional tropical crop, *Naturwissenschaften*. 2008, vol 95, P 95-99

Nassour M,

Etudes sur les protoplastes de *Pelargonium x hortorum* Bailey et *P.x domesticum* Bailey: application à la production d'hydrides somatiques interspécifiques, Institut National d'Horticulture, Université d'Angers. 2003

Nichols D.S, Miller M.R, Davies N.W, Goodchild A, Raftery M, Cavicchioli R,

Cold adaptation in the antarctic archaeon *Methanococoides burtonii* involves membrane lipid unsaturation, *Journal of Bacteriology*. 2004, p 8508-8515

Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawat T,

Cryopreservation of asparagus (*Asparagus-Officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant-regeneration by vitrification, *Plant Science*. 1993, vol 91, issue 1, p 67-73

Obert B, Benson E.E, Millam S, Pret'ova A, Bremmeer D.H,

Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine, *Plant Physiology*. 2005, vol 162, p 537-547

Oparka K.J, Davies H.V, Wright K.M, Viola R, Prior D.A.M,

Effects of sink isolation on sugar uptake and starch synthesis by potato-tuber storage parenchyma, *Planta*. 1990, vol 182, issue 1, p 113-117

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes,

Schéma de certification pour le *Pelargonium*, OEPP/EPPO 2002, Bulletin 32, p 67-78

Örvar B.L, Sangwan V, Omann F, Dhindsa R.S,

Early steps in cold sensing by plant cells : the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity, *The Plant Journal*. 2000, vol 23-6, p 785-794

Panis B,

Cryopreservation of *Musa* germplasm, *Informusa*. 1995, vol 4, issue 1, p 17-20

Panis B, Piette B, Swennen R,

Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*, *Plant Science*. 2005, vol 168, p 45-55

Panis B, Trotte N, Van Nimmen K, Withers L.A, Swennen R,

Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) méristem cultures after preculture on sucrose, *Plant Science*. 1996, vol 121, p 95-106

Pap E.H.W, Drummen G.P.C, Winter V.J, Kooija T.W.A, Rijken P, Wirtz K.W.A, Op Den Kamp J.A.F, Hage W.J, Post J.A,

Ratio-fluorescence microscopy of liquid oxidation in living cells using C11-BODIPY, *Febs Letters*. 1999, vol 453, p 279-282

Paul H, Daigny G, Sangwan-Noreel B S,

Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Reports*, 2000, vol 19, p768-774

Pennycooke J.C, Towill L.E,

Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.)Lam.) by vitrification, 2000, *Plant Cell Reports*. vol 19, p 733-737

Perez R.M, Navarro L, Duran-Vila N,

Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several *Citrus* species and cultivars, *Plant Cell Reports*. 1997, vol 17, p 44-49

Pham N.A, Richardson T, Cameron J, Chue B, Robinson B.H,

Altered Mitochondrial Structure and Motion Dynamics in Living Cells with Energy Metabolism Defects Revealed by Real Time Microscope Imaging, *Micosc.Microanal*. 2004, vol 10, p 247-260

Pham N.A, Gal M.R, Bagshaw R.D, Mohr A.J, Chue B, Richarson T, Callahan J.W,

A comparative study of cytoplasmic granules imaged by the real-time microscope, Nile Red and Filipin in fibroblasts from patients with lipid storage diseases, *J.Inherit Metab*. 2005, vol 28, p 991-1004

Quatrano RS,

Freeze-Preservation of cultured flax cells utilizing DMSO, *Plant Physio*.1968, vol 43, p 2057-2061

Reed B.M, Schumacher L, Dumet D, Benson E.E,

Evaluation of a modified encapsulation-dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of ribes germplasm, *In vitro Cellular & Developmental Biology-plant*. 2005, vol 41, issue 4, p 431-436

Reinoud P.J, Schrijnemakers E.W.M, Van Iren F, Kijne J.W,

Vitrification and a heat-shock treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two-step freezing, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1995, vol 42, p 261-267

Robert D, Roland J.C,

Biologie Végétale – caractéristiques et stratégie évolutive des plantes, 1989

Ryynänen L, Aronen T,

Genome fidelity during short and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2005, vol 83, p 21-32

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I,

Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus Sinensis* Osb. Var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification, *Plant Cell reports*. 1990, vol 9, p 30-33

Sakai A, Engelmann F,

Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification : a review, *Cryoletters*. 2007, vol 28.3, p 151-172

Sant R, Taylor M, Tyagi A,

Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*), *Cryoletters*. 2006, vol 27.3, p 133-142

Sarasan V, Cripps R, Ramsay M.M, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree J.K,

Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade, *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 2006, vol 42, p 206-214

Sarkar D, Naik P.S,

Cryopreservation of shoot tips of tetraoloid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification, *Annals of Botany*. 1998, vol 82, issue 4, p 455-461

Schäfer-Menuhr A, Schumacher H.M, Mix-Wagner G,

Long-term storage of old potato varieties by cryoconservation of meristems in liquid-nitrogen, *Landbauforschung volkenrode*. 1994, vol 44, issue 4, p 301-313

Schäfer-Menuhr A, Muller E, Mix-Wagner G,

Cryopreservation : an alternative fort the long-term storage of old potato varieties, *potato Research*. 1996, vol 39, issue 4, p 507-513

Schäfer-Menuhr A, Schumacher H.M, Mix-Wagner G,

Cryopreservation of Potato cultivars – Design of a method for routine application in genebanks, *Acta Horticulturae*. 1997, vol 447

Scocchi A, Faloci M, Medina R, Olmos S, Mroginski L,

Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation-dehydration and assessment of their genetic stability, *Euphytica*. 2004, vol 135, p 29-38

Sharry S, Abedini W,

Micropropagation of *Pelargonium graveolens* L'Herit, the scented-leaved geranium, *Hortic. Argent.* 2000, vol 42-43, p 51-59

Singer S.J, Nicholson G.L,

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*. 1972, vol 175

Sokal R, Rohlf F,

Biometry: the principles and practice of statistics in biological Research. 1981 2nd Ed, p 731-747

Steponkus P.L, Uemura M, Webb M.S,

Redesigning crops for increased tolerance to freezing stress, Interacting stresses on plants in a changing climate .1993, p 697-714

Stoynova-Bakalova E.Z, Petrov P.I, Karanov E.N,

Effects of benzylaminopurine and abscisic acid on distribution of rRNA in the palisade cells of excised *Cucurbita pepo* cotyledons, *Biologia Plantarum*. 2001, vol 44, issue 3, p 355-360

Suzuki N, Mittler R,

Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction, *Physiologia Plantarum*. 2006, vol 126, p 45-51

Szechnska-Hebda M, Wedzony M, Dubas E, Kieft H, Van Lammeren A,

Visualisation of microtubules and actin filaments in fixed BY – 2 suspension cells using an optimised whole mount immunolabelling protocol, *Plant Cell Rep*. 2006, vol 25, p 758-766

Tanaka D, Niino T, Isuzugawa K, Hikage T, Uemura M,

Cryopreservation of shoot apices of in vitro grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols, *Cryoletters*. 2004, vol 25, issue 3, p 167-176

Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M, Dereuddre J,

Cryoconservation par vitrification d'apex enrobes d'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivé *in vitro*, *C.R. Acad Sci. Paris* 1991, T 313, Série III, p 633-638

Terjung S,

Microscopie Confocale à Balayage, European Advanced Light Microscopy Network 2004

Thinh N,

Doctoral Dissertation, Kobe University Japan 1997, p187 cited par Sakai (2000) dans cryopreservation of tropical plant geronsplam, IPGRI, P 1-20

Thomashow M.F,

Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.* 1999, vol 50, p 571

Thorne R.F,

Classification and geography of the flowering plants, *Botanical review.* 1992, vol 58, issue 3, p 225-348

Tilney-Bassett, R A.E,

Plant Chimeras, 1986, Ed Edward Arnold

Ting T.C, Fei L.H, Feng W, Yu ZC, Xing L.J

Effets of medium components on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Picea wilsonii* Mast, *Journal of Beijing Forestry University.* 2007, vol 29, issue 1, p 47-52

Touchell D.H, Chiang V.L, Tsai C.J,

Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification, *Plant Cell Rep.* 2002, vol 21 p118-124

Touno K, Yoshimatsu K, Shimomura K,

Characteristics of *Atropa belladonna* hairy roots cryopreserved by vitrification method, *Cryoletters.* 2006, vol 27, issue 2, p 65-72

Turner S, Krauss S.L, Bunn E, Senaratna T, Dixon K, Tan B, Touchell D,

Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation, *Plant Science.* 2001a, vol 161, p 1099-1106

Turner S, Touchell D. Senaratna T, Bunn E, Tan B, Dixon K,

Effects of plant growth regulators on survival and recovery growth following cryopreservation, *Cryoletters.* 2001b, vol 22, issue 3, p 163-174

Towill L.E, Bonnart R, Volk G.M.

Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* shoot Tips, *Cryoletters* 2006, vol 27, issue 6, p 353-360

Tyler N.J, Stushnoff C,

The effects of prefreezing and controlled dehydration on cryopreservation of dormant vegetative apple buds, *Canadian Journal of Plant Science.* 1988, vol 68, issue 4, p 1163-1167

Uemura M, Steponkus P.L,

A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance, *plant Physiol.* 1994, vol 104, P 479-496,

Uemura M, Joseph R.A, Steponkus P.L,

Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*, Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions, *Plant Physiol.* 1995, vol 109, p 15-30

Uemura M, Steponkus P.L,

Cold acclimation in plants : relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane, J.Plant Res 1999. vol 112, p 245-254

Uemura M, Steponkus P.L,

Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves, Plant Cell and environment. 2003, vol 26, p 1083-1096

Uragami A,

Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultured in vitro, Bulletin of the Hokkaido Agricultural experimental station. 1991, issue 156, p 1-37

Uragami A, Sakai A, Nagai M, Takahashi T,

Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification, Plant Cell Reports. 1989, vol 8, p 418-421

Urbanova M, Cellarova E, Kimakova K,

Chromosome number stability and mitotic activity of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. meristems, Plant Cell Rep. 2002, vol 20, p 1082-1086

Urbanova M, Kosuth J,Cellarova E,

Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation, Plant Cell Rep. 2006, vol 25, p 140-147

Vandenbussche B, Weyens G, De Proft M,

Cryopreservation of *in vitro* sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique, Plant Cell Reports. 2000, Vol 19, p 1064-1068,

Van Der Walt J.J.A, Vorster P.J,

Phytogeography of *Pelargonium*, Bothalia .1983, vol 14. 3 et 4, p 517-523

Van Der Walt J.J.A, Demarne F,

Pelargonium graveolens and *P. radens*: A comparison of their morphology and essential oils, S. Afri. J. Bot. 1988, vol 54.6, p 617-922

Vassoille R, Perez J,

Bases physiques et thermodynamiques de la cryobiologie, Innov. Techn. Biol. Med. 1984, Vol 5, spécial 1

Verleysen H, Samyn G, Van Bockstaele E, Debergh P,

Cryopreservation of Azalea by Encapsulation-dehydration, Acta Horticulturae. 2003, vol 612

Verleysen H,

Cryopreservation strategies for woody ornamental plants, Université de Gand (Belgique). 2005

Verma N, Ram R, Halla V, Kumar K, Zaidi A.A,

Production of *Cucumber mosaic virus*-free chrysanthemums by meristem tip culture, *Crop Protection*. 2004, vol 23, p 469-473

Vidalie H,

Origine et Histoire des *Pelargonium x hortorum* et *Pelargonium x hederaefolium*, P.H.M. Revue Horticole. 1979, n° 198

Vidalie H,

Le pelargonium de bouture en 2004-2005, P.H.M. Revue Horticole. 2004, n° 464

Volk G.M, Walters C,

Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection, *Cryobiology*.2006, vol 52, p 48-91

Volk G.M., Caspersen A.M,

Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha X piperita*, *Protoplasma*. 2007, Vol 231, p 215-226

Volk G.M, Harris J.L, Rotindo K.E,

Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components, *Cryobiology*. 2006, vol 52, p 305-308

Walters C, Engels J,

The effects of storing seeds under extremely dry conditions. A guide to effective management of germplasm collections. 2003

Wang J.H, Ge J.G, Liu F, Huang C.N,

Ultrastructural Changes during Cryopreservation of Rice (*Oryza sativa* L.) Embryogenic Suspension Cells by Vitrification, *Cryoletters*. 1998, vol 19, p 49-54

Wang Q, Gafny R, Sahar N, Sela I, Mawassi M, Tanne E, Perl A,

Cryopreservation of grapevine (*Vitis Vinifera* L.) embryonic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration, *Plant Science*. 2002, vol 202, p 551-558

Wang Q, Mawassi M, Li P, Gafny R, Sahar N, Sela I, , Tanne E,

Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L, *Plant Science*. 2003, vol 165, p 321-327

Wang Q, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen J.P.T,

Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-déhydratation, *Plant Cell Rep*. 2005, vol 24, p 280-288

Wang Q, Liu Y, Xie Y, You M,

Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato Leafroll Virus* (PLRV) and *Potato Virus Y* (PVY), *Potato Research* 2006, vol 49, p 119-129

Wang Q.C, Valkonen J.P.T,

Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips, *Plant Pathology*. 2007

Wang Q, Cuellar W.J, Rajamäki M.L, Hirata Y, Valkonen J.P.T,

Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips, *Molecular, Plant Pathology* .2008, vol 9, issue 2, p 237-250

Watt M.P, Thokoane N.L, Mycock D, Blakeway F,

In vitro storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conclusions, *Plan Cell Tissue and Organ Culture*. 2000, vol 61, p 161-164

Webb W.J,

The *Pelargonium* family, Groom Helm.1984

Wetzel T, Candresse G, Macquaire M, Ravelonandro and Dunez J,

A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for Plum Pox Potyvirus detection, *J.Virols Methods*. 1992, vol 39, p 27-37

Wilkinson T, Wetten A, Prychid C, Fay M.F,

Suitability of cryopreservation for the Long-term storage of rare and endangered plant Species: a case History for *Cosmos atrosanguineus*, *Annals of Botany*. 2003, vol 91, p 65-74

Williams J.G.K, Kubelik A.R, Livak K.J, Rafalski J.A, Tingey S.V,

DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*. 1990, vol 18, n° 22, p 6531-6535

Winkelman T, Mubmann V, Serek M,

Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill, *Plant Cell Rep*. 2004, vol 23. issue 1, p 8

Wolfe J, Bryant G,

Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems, *Cryobiology*. 1999, vol 39, p 103-129

Wolfe J, Bryant G, Koster K.L,

What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there? *Cryoletters*. 2002, vol 23, issue 3, p 157-166

Wu Y.J, Zhao Y.H, Engelmann F, Zhou M.D,

Cryopreservation of kiwi shoot tips, *Cryoletters*. 2001, vol 22, issue 5, p 277-284

Wusteman M.C, Pegg D.E, Robinson M.P, Wang L.H, Fitch P,

Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties, *Cryobiology*. 2002, vol 44, p 24-37

Xu X.B, Cai Z.G, Gu Q.Q, Zhang Q.M,

Cell Ultrastructure of Kiwifruit (*Actinidia Chinensis*) shoot tips during cryopreservation, Agricultural Sciences in China. 2006, vol 5, issue 8, p 587-590

Yoon J.W, Kim H.H, Ko H.C, Hwang H.S, Hong E.S, Cho E.G, Engelmann F,

Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips, Cryoletters. 2006, vol 27, issue 4, p 221-222

Zhu G.Y, Geuns J.M.C, Dussert S, Swennen R, Panis B,

Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation, Physiologia Plantarum. 2006, vol 128, p 801-94

ANNEXES

Annexe 2-2

Compositions des solutions pour l'encapsulation-déshydratation

Solution de Préculture

Macro éléments de Murashige et Skoog	}	Poudre commerciale (Duchéfa) à raison de 4,4 g.L ⁻¹	
Micro éléments de Murashige et Skoog			
Vitamines de Murashige et Skoog			
MES à 14%			500 µL.L ⁻¹
Saccharose (concentration finale dans la solution 0,75M)			254,5 g.L ⁻¹
pH 6,14			

Solution de chlorure de calcium

Macro éléments de Murashige et Skoog sans Calcium	10 %	
Micro éléments de Murashige et Skoog	0,1 %	
Vitamines de Morel		200 µL.L ⁻¹
Chlorure de calcium		14,7 g.L ⁻¹
Saccharose		30 g.L ⁻¹
pH 6,14		

Solution d'alginate à 3 %

Macro éléments de Murashige et Skoog sans Calcium	10 %	
Micro éléments de Murashige et Skoog	0,1 %	
Vitamines de Morel		200 µL.L ⁻¹
Alginate		30 g.L ⁻¹
Saccharose		30 g.L ⁻¹
Pas de pH mesuré solution trop visqueuse		

Annexe 2-3

Composition des solutions pour la « droplet-vitrification »

Solution de charge (Loading Solution : LS)

Macro éléments de Murashige et Skoog	}	Poudre commerciale (Duchéfa) à raison de 4,4 g.L ⁻¹
Micro éléments de Murashige et Skoog		
Vitamines de Murashige et Skoog		
Saccharose		137 g.L ⁻¹
Glycérol		146 mL.L ⁻¹
pH 5,8		
Stérilisation par filtration (0,2 µm)		

Solution de vitrification (Plant Vitrification Solution 2 : PVS2)

Macro éléments de Murashige et Skoog	}	Poudre commerciale (Duchéfa) à raison de 4,4 g.L ⁻¹
Micro éléments de Murashige et Skoog		
Vitamines de Murashige et Skoog		
Saccharose		137 g.L ⁻¹
Glycérol		237,6 mL.L ⁻¹
Ethylène glycol		135 mL.L ⁻¹
DMSO		136,6 mL.L ⁻¹
pH 5,8		
Stérilisation par filtration (0,2 µm)		

Solution de réchauffement (Recovery Solution : RS)

Macro éléments de Murashige et Skoog	}	Poudre commerciale (Duchéfa) à raison de 4,4 g.L ⁻¹
Micro éléments de Murashige et Skoog		
Vitamines de Murashige et Skoog		
Saccharose		137 g.L ⁻¹
pH 5,8		
Stérilisation par filtration (0,2 µm)		

Annexe 2-4

Composition du milieu à 0,3 M de saccharose

Macro éléments de Murashige et Skoog	}	Poudre commerciale (Duchéfa) à raison de 4,4 g.L ⁻¹
Micro éléments de Murashige et Skoog		
Vitamines de Murashige et Skoog		
Acide ascorbique 10 ⁻³ M1 ml.L ⁻¹		

Saccharose Rectapur	102,6 g.L ⁻¹
Gelrite	2,5 g.L ⁻¹

pH 6,12

Annexe 2-5

CryoLetters 29(3), 243-251 (2008)

© CryoLetters, c/o Royal Veterinary College, London NW1 0TU, UK

CRYOPRESERVATION OF *Pelargonium* APICES BY DROPLET-VITRIFICATION

Anthony Gallard¹, Bart Panis², Noëlle Dorion¹, Rony Swennen², and Agnès Grapin^{1*}

¹UMR GenHort (INRA, INH, UA), Institut National d'Horticulture, 49045 Angers Cedex 01, France

²Laboratory of Tropical Crop Improvement, Division of Crop Biotechnics, Department of Biosystems, K.U.Leuven, B3001 Leuven, Belgium

*Correspondence author: Agnès Grapin

Abstract

The droplet-vitrification method was adapted to *Pelargonium* apices by optimizing the duration of the loading solution (LS) as well as the plant vitrification solution 2 (PVS2). The excised apices were dehydrated in two steps (20 min in LS and 15 min in PVS2) and then immersed directly in liquid nitrogen (LN). After thawing and unloading in the recovery solution at room temperature for 15 min, apices were plated onto semi-solid Murashige and Skoog medium. This simple protocol without any pretreatment was successfully applied to eight cultivars with a survival level ranging between 55.6 - 96.2 % and a regrowth level between 9.1% - 70.6%. These results prove the feasibility of the long-term storage of *Pelargonium* germplasm through cryopreservation.

Keywords: LS, PVS2, *P x hortorum*, *P x peltatum*

INTRODUCTION

Economically, *Pelargonium* is one of the most important ornamental crops in Europe and North America. *Pelargonium* germplasm is most commonly kept in greenhouse collections but this does not allow safe long-term preservation. The large amount of space required, the high cost of maintenance (14, 27), risks of loss of accessions by human errors, climatic accidents and diseases are some of the problems limiting the use of this type of maintenance for the long-term. When storing *Pelargonium in vitro*, contamination and somaclonal variation are the major risks (20). Therefore, cryopreservation in liquid nitrogen (LN) is a logical choice for the long-term storage of vegetatively propagated crops such as *Pelargonium* since it is safe and requires minimal space and maintenance. This preservation method has been successfully reported for a number of crops, such as potato (28), apple (22), strawberry (9), banana (23) and yam (13).

In previous studies, apices excised from *in vivo Pelargonium* plants have been cryopreserved without any pretreatment step using an encapsulation-dehydration protocol (3, 5, 6). This method, however, is very time consuming and the repeatability between the experiments remained low. The availability of an efficient and reliable cryogenic protocol which yields a high percentage of post-thaw survival is a basic requirement. Major problems

with cryopreservation are (i) death of cells and tissues caused by osmotic shock and (ii) destruction of membrane integrity by ice crystals during the freezing and thawing process. The vitrification procedure (28) permits avoidance of lethal ice formation. Highly concentrated cryoprotective solutions desiccate and penetrate cells in order to form a highly viscous intracellular solution that forms a metastable glass at ultra-low temperatures (32). Furthermore, droplet-vitrification is based on very fast cooling and thawing rates. As such, the likelihood of ice crystal formation during freezing and thawing is considerably reduced. Starting with the droplet-vitrification procedure established by Panis *et al.* (23) for *Musaceae*, two parameters were optimized, i.e. the duration of the loading solution (LS) and the vitrification solution (PVS2). The *Pelargonium x peltatum* 'Balcon Lilas' cultivar was used as the reference cultivar to refine the droplet-vitrification method due to the high number of plants available in the greenhouse and the simplicity of its apex excision. Subsequently, the optimized method for survival rate was tested on various genotypes of *Pelargonium* that are representative for our collection. The survival and regrowth levels were measured. This work is the first step of a study undertaken on the regeneration of periclinal chimeras of *Pelargonium* cultivars with or without cryopreservation and their conformity.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Apices used in this study were directly dissected from *in vivo Pelargonium* plants of approximately 1 year age obtained from cuttings during July 2005. *Pelargonium* plants were cultivated in the greenhouse at a minimal temperature regime of 18°C during 3 hours (from 6 a.m. to 9 a.m.) and 20°C during 21 hours (from 9 a.m. to 6 a.m. the following morning). We used several *Pelargonium* accessions representing a wide range of phenotypes of *Pelargonium x hortorum*. These included some with variegated leaves, such as the cultivars 'A Happy Thought', 'Elsie' and 'Panaché', others with green leaves, such as 'Renard Bleu', 'Cahors' and 'Stellar Artic' and two cultivars of *Pelargonium x peltatum* ('Balcon Lilas' and 'Balcon Rouge').

Surface sterilization and excision procedure

Stems were cut in pieces of 5 cm length, each containing one axillary bud. Then big leaves and stipules were removed around the buds. For surface sterilization, the stems were briefly sprayed with 70% ethanol and wiped off with sterile tissue paper. Under a binocular microscope placed in a laminar air flow cabinet, small leaves and stipules were removed one by one using each time a new sterile scalpel blade N°11 until the apical dome was visible but still partially covered by one young leaf or stipule primordial (Fig.1A). The size of the individual axillary apices was approximately 1mm³. The excised apices were then plated onto a semi-solid hormone-free Murashige and Skoog (MS) (21) medium before applying the vitrification procedure.

Vitrification procedure

The droplet-vitrification method for cryopreservation of apices was carried out according to Panis *et al.* (23) on *Musaceae*. First, apices were exposed for 20 min to filter-sterilised LS (loading solution containing 2 M glycerol and 0.4 M sucrose in MS medium, pH 5.8) (20). Then, apices were treated for 30 min in filter-sterilized PVS2 solution (consisting of 0.4 M sucrose, 30% v/v glycerol, 15% v/v ethylene glycol and 15% dimethylsulfoxide (DMSO) in MS medium) (26). These treatment durations were used as reference for the optimization of LS and PVS2 exposure times for *Pelargonium* apices. The pH was adjusted to 5.8 and the solutions were filter (0.2µm) sterilized.

When all apices were excised, they were transferred directly to 15 ml LS and kept in the dark for 0, 20, 60 and 120 min at room temperature. After loading, the solution was replaced by ice-cold PVS2 solution. Apices were treated for 30 min (reference time) with PVS2. For optimization of PVS2 exposure duration, apices were immersed for 20 min in LS (reference time) after which they were exposed to PVS2 for 0, 10, 30 and 60 min.

Then 10 apices were transferred to a drop of PVS2 placed on a strip (3 cm x 0.5 cm) of aluminium foil; the strip was maintained around 0°C with a frozen cooling element. The excess PVS2 around the apices was removed with a Pasteur pipette. Aluminium strips with apices were then directly plunged into LN with forceps and held there for 30 min.

Thawing, unloading and regeneration

For thawing, the aluminium strips with apices were immediately immersed for 15 min at room temperature into 25 ml of Recovery Solution (RS) in a Petri dish (9 cm diameter). RS consisted of 1.2 M sucrose dissolved in MS medium (pH 5.8).

Then they were plated on one layer of sterile filter paper (Whatmann N°1) laid on semi-solid hormone-free MS medium supplemented with 0.3 M sucrose and 2.5 g L⁻¹ gelrite (Duchefa Biochemie). These plates were left for one day in the dark at 23°C. Then the apices were moved to plates containing solid MS supplemented with 0.08 M sucrose, MS vitamins, 0.1 mg L⁻¹ benzylaminopurine (BAP), 0.01 mg L⁻¹ gibberillic acid (GA₃) and 2.5 g L⁻¹ gelrite (Duchefa Biochemie). All the media were sterilized for 20 min at 113°C and the pH was adjusted to 6.12 before sterilization. For each replicate, around 10 apices were plated onto a 9 cm diameter Petri dish containing 25 mL of culture medium. The dishes with cryopreserved apices were maintained in the dark for one week at 22-24°C, then transferred to fluorescent light (70 μmol s⁻¹ m⁻²) for 16 h per day. After a further 3 weeks, the growing apices were transferred to glass tubes (14 cm long) containing 10 mL of the same culture medium and were cultured for another 4 weeks before regrowth evaluation.

Assessment of post-thaw survival and statistical analysis

Survival levels were calculated two weeks after thawing by counting the number of growing apices. An apex was considered alive when it was green, swollen, hairy with sometimes a production of callus on the scar zone (Fig.1B). Dead apices appeared totally brown, not hairy and showed no sign of regrowth (Fig.1C). Shoot formation was expressed as a percentage of the total number of apices forming rootable shoots (Fig.1D) within 8 weeks after cryopreservation.

Data on survival and regrowth were recorded and presented as means with standard deviation. Independence of distribution was tested with the G-test based upon χ^2 tables and significance was reported at the 5% level (29). Three repetitions (R1, R2 and R3) were performed on different days with at least 10 excised apices tested for each condition.

RESULTS

The morphological development of apices is shown in Figure 1, from the excised apex to a growing shoot 8 weeks after cryopreservation.

Effect of duration in loading solution

The post-LN survival level of *Pelargonium* apices was significantly affected by the duration of LS exposure (Table 1). Without this loading treatment none of the apices survived LN storage. The results obtained with the three exposure times tested showed a post-LN survival that was always higher than 50%. We were, however, not able to determine a specific

optimal LS exposure duration since the highest survival levels were obtained at 20 and 120 min, while 60 min exposure gave rise to a significantly lower value.

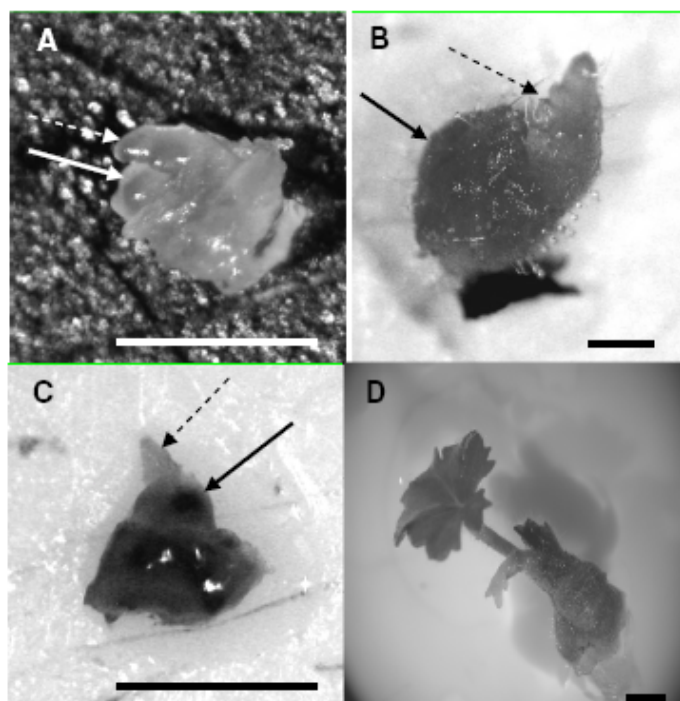


Figure 1. **A.** Excised apex before cryopreservation. **B.** Growing apex two weeks after cryopreservation. **C.** Dead apex two weeks after cryopreservation. **D.** Shoot eight weeks after cryopreservation (bar = 1mm). Full arrows indicate the position of the meristematic dome. Hatched arrows indicate the position of the leaf primordium.

Table 1. Effect of the LS exposure duration on survival (%) of cryopreserved 'Balcon lilas' *Pelargonium* apices. After LS exposure they were treated for 30 min with PVS2 and subsequently frozen.

LS exposure duration (min)	Repetition number	Growing apices	Dead apices	Mean and SD*
0	1	0	10	0 ± 0^a
	2	0	10	
	3	0	10	
20	1	5	5	75.7 ± 21.7^c
	2	10	2	
	3	10	1	
60	1	3	7	51.6 ± 27.5^b
	2	4	6	
	3	9	2	
120	1	9	1	81.8 ± 13.7^c
	2	10	1	
	3	8	4	

* Means marked with the same letter are not significantly different according to the G-test.
Effect of duration in PVS2

As was the case for the loading treatment with LS, a PVS2 dehydration treatment is always required for *Pelargonium* apices to survive LN storage (Table 2). Without immersion in PVS2 all the meristems died and appeared totally black two weeks after cryopreservation (Fig. 1C). The highest post-LN survival levels were obtained after 10 and 30 min PVS2 exposure durations at 0°C. Survival levels were significantly lower (70.8%) after a 60 min PVS2 treatment.

Table 2. Effect of the PVS2 exposure duration at 0°C on survival (%) of cryopreserved 'Balcon lilas' *Pelargonium* apices. The PVS2 treatment was preceded by an LS treatment of 20 min at room temperature.

PVS2 exposure duration (min)	Repetition number	Growing apices	Dead apices	Mean and SD*
0	1	0	10	0 ± 0 ^a
	2	0	8	
	3	0	10	
10	1	6	2	92.0 ± 14.4 ^c
	2	8	0	
	3	9	0	
30	1	7	0	89.6 ± 13.3 ^c
	2	9	0	
	3	10	3	
60	1	5	4	70.8 ± 14.1 ^b
	2	4	1	
	3	8	2	

*Means marked with the same letter are not significantly different according to the G-test

Application of the droplet-vitrification method on several Pelargonium species and cultivars

The eight cultivars under investigation responded very well to the *Pelargonium* droplet-vitrification method that was optimized for the cultivar 'Balcon lilas' (Fig. 2), with a minimal survival of 55.6 % for the cultivar 'Panaché'. Not all the cultivars showed the same tolerance to the cryopreservation procedure. Post-LN survival levels varied from 55.6 - 96.2 %. Two weeks after cryopreservation growing apices showed a normal aspect, they were green, swollen and hairy. Their sizes were approximately 10 times bigger than just after excision and the first leaf primordium appeared more differentiated and hairy (Fig 1B). Unlike other cultivars, 'Elsie' and 'Panaché' showed a significant callus production. The regrowth level was determined for all eight cultivars 8 weeks after cryopreservation (Fig. 3). An apex was considered as regenerating when it produced a plantlet with leaves showing no signs of hyperhydricity (Fig 1D). As was the case for survival, the cultivars showed different abilities to regenerate with a minimum regrowth level of 9.1% for the cultivar 'A Happy Thought' and a maximal regrowth of 70.6% for the cultivar 'Cahors'.

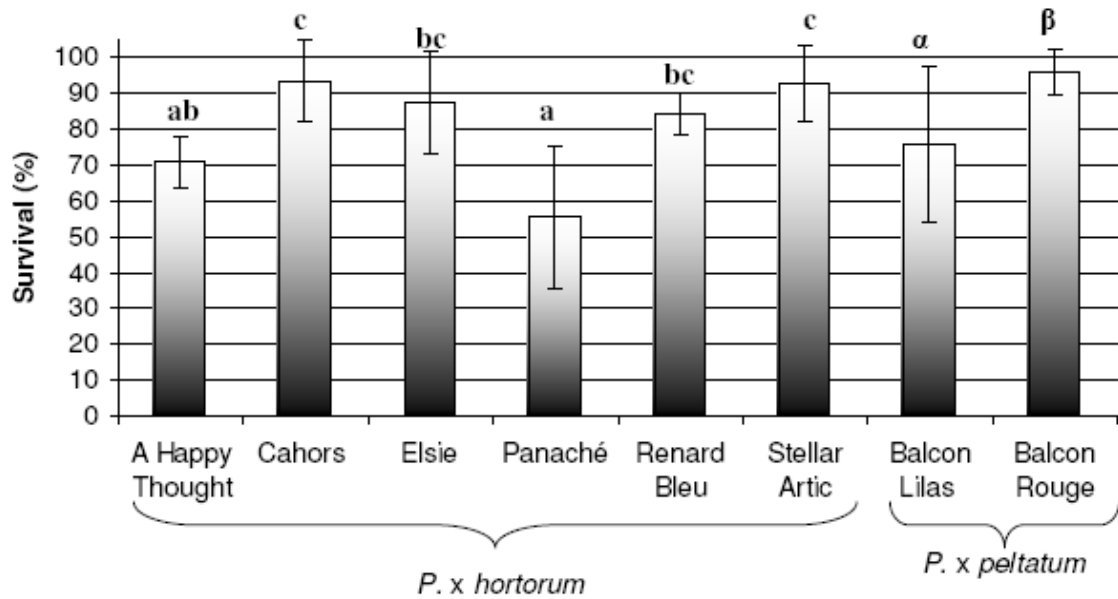


Figure 2. Post-LN survival of eight *Pelargonium* cultivars after application of the droplet-vitrification protocol. Each data bar represents the mean of three replicates of 10 apices. Bars marked with the same letter (Latin letters for *P. x hortorum* and Greek letters for *P. x peltatum*) are not significantly different according to the G-test.

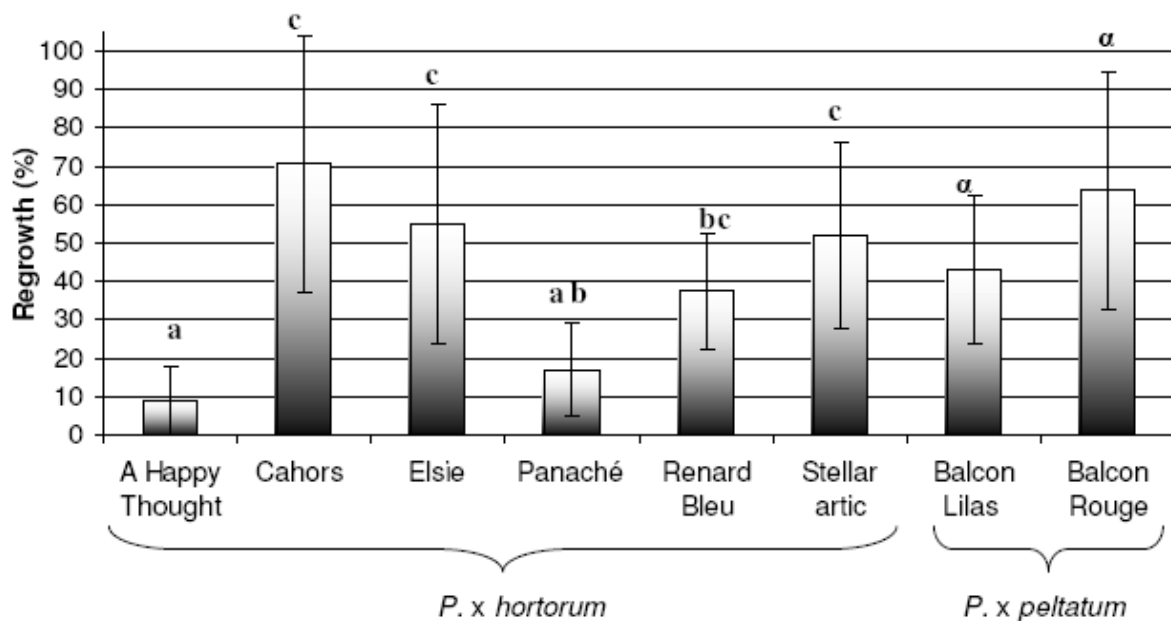


Figure 3. Post-LN regrowth of eight *Pelargonium* cultivars after application of the droplet-vitrification protocol. Each data bar represents the mean of three replicates of 10 apices. Bars marked with the same letter (Latin letters for *P. x hortorum* and Greek letters for *P. x peltatum*) are not significantly different according to the G-test.

DISCUSSION

In 1997, Schäfer-Menuhr *et al.* (28) developed the droplet-freezing method using small aluminium foil strips on which DMSO treated potato apices were placed. The thermal conductivity of aluminium permits a fast and uniform heat distribution to the explants (16) with a cooling rate around $130^{\circ}\text{C s}^{-1}$ (33) thus reducing the chance for intracellular ice crystal formation. This method has been modified for vitrification solutions and is now successfully applied to different plant species such as *Chrysanthemum* (8), *Musaceae* (23), sweet potato (24), garlic (11), *Arabidopsis thaliana* (34) and different types of explants such as shoot tips (22, 24, 34), bulbils (11), showing the wide applicability of this technique.

The present paper describes for the first time reproducible survival levels of *Pelargonium* apices after cryopreservation by droplet-vitrification. As previously reported for the encapsulation-dehydration method (3, 5, 6), axillary apices were removed directly from *in vivo* *Pelargonium* plants that were grown in the greenhouse, and not from *in vitro* plantlets as is usually the case when applying cryopreservation. It is known that some *Pelargonium* cultivars are not very genetically stable and that vegetative propagation through cuttings, and especially through *in vitro* culture, gives rise to off-type plants (loss of variegated characteristics, changed leaf shape and flower color, changed ploidy level) (unpublished results by Pr Dorion). The method of excision described above should limit the chance for somaclonal variation since it avoids one of the *in vitro* propagation steps that are normally involved in cryopreservation experiments. Surprisingly, fungal or bacterial contaminations of the cryopreserved explants were seldom observed, indicating the high efficiency of our surface sterilization and excision procedure.

In order to reduce the osmotic shock caused by the Plant Vitrification Solution 2 (PVS2), it is important to pre-condition apices to increase their osmotolerance by (i) a preculture step, (ii) a loading step or (iii) a combination of both. As was the case for persimmon (17) only an LS treatment was applied on *Pelargonium* apices for the acquisition of osmotolerance.

Preculturing apices for 1, 2 or 3 days on a solid medium that is enriched with 0.3 M sucrose before loading is a "classical" step applied to many plant species (12, 18, 24). Such an additional step is, however, time consuming and should, if possible, be avoided. In the case of banana, the application of a preculture did not show any significant benefit (23, 31). In addition, as *Pelargonium* apices are very sensitive to oxidative stress (data not shown) it could be important to limit their exposure to highly concentrated sucrose media. Post-LN survival was obtained for all eight *Pelargonium* cultivars without the application of any preculture.

Our results showed that in contrast to yam (16), wild potato (37), *Picea mariana* (32) and almond (1) an LS treatment was absolutely necessary to obtain post-LN survival of *Pelargonium* apices. Treatment with LS induces partial water loss and subsequent exposure to PVS2 further lowers the water content (36). Sucrose and glycerol stabilize the plasma membrane by interaction with the head group region of membrane lipids (25). The loading solution minimizes the injurious membrane changes resulting from severe dehydration (10). For sugar beet, a 10 or a 20 min LS exposure produced a similar post-LN survival levels (35), and for banana apices, there was no significant difference between a 20 min and a 7 hour loading treatment realized at room temperature (23). In contrast, for sweet potato a LS 60 min exposure is better for the post-LN survival than 20 min (24). These results showed that the answer to LS exposure is species dependent. For *Pelargonium*, we demonstrate that a minimal LS exposure is essential and that for the three tested treatment times (20, 60 and 120 min) with LS, the survival level was always higher than 50%. Therefore, we conclude that apices should be left in LS for at least 20 min but can be kept there for 2 hours. As for other species (13, 24, 30), the incubation time in PVS2 has been found to significantly affect survival of cryopreserved *Pelargonium* apices. This may be due to the potentially phytotoxic effect of solutions like PVS2 and to the fact that an increase of the osmotic stress could influence cell

viability (7). Thus there exists an optimal immersion time in PVS2 specific for each species arising from two principles (i) the minimization of the water crystallization and (ii) the toxicity limitation of PVS2.

Optimal treatment times were 80 min for *Vitis* shoot tips (19), 60 min for poplar shoot tips (15), 45 min for cassava apices (2) and 20 min for wild potato shoot tips (37). In the case of *Pelargonium* apices the immersion time in PVS2 for the optimal post-LN survival rate was between 10 and 30 min. Immersion in PVS2 for too long (60 min) adversely affected *Pelargonium* apex survival. *Pelargonium* apices seem therefore to be more sensitive to PVS2 compared to many other species since the optimal incubation time is shorter.

The optimized droplet-vitrification method was applied to apices of eight different *Pelargonium* cultivars resulting in high survival percentages (55.6 - 96.2 %). These results showed that none of the cultivars tested proved to be recalcitrant to the droplet-vitrification protocol. The behavior of the eight *Pelargonium* cultivars to the droplet-vitrification was, however, not equal. It was not possible to establish a correlation between the post-LN survival and the phenotype. Indeed the post-LN survival of two variegated cultivars 'Panaché' and 'Elsie' was significantly different. Also, no significant difference was observed between the green cultivar 'Renard Bleu' and the variegated cultivar 'Elsie'.

The post-thaw survival levels that we observed (55.6 - 96.2 %) were in accordance with those obtained when the droplet-vitrification method was applied to other species, such as 20 - 66 % for sweet potato (24), and around 80 % for *Chrysanthemum morifolium* (5). Although the regeneration process has not been completely optimized in this study, we evaluated the regrowth percentages 8 weeks after cryopreservation. The results indicate that none of the cultivars under investigation were totally recalcitrant, showing the power of the droplet-vitrification protocol. Further studies on the regrowth process should allow us to increase the regeneration frequencies and to reduce the variability between the replicates and cultivars. Dussert *et al.* (4) established a calculation method that determines the number of apices that needs to be cryopreserved given a specific regeneration level in order to have at least one plant that recovers after storage in LN. In the case of *Pelargonium x hortorum* the mean regeneration level was around 43 %. So, according to Dussert *et al.* for this scale value obtained with 30 tested apices, approximately 10 cryopreserved apices would be needed to produce at least one regenerated plant. Under these conditions and because of the modest number of apices to be taken, it should be perfectly possible to set up a cryobank of *Pelargonium* apices with the method described above.

Finally, we retained an exposure time of 20 min in LS and 15 min in PVS2 as the best conditions to have the highest post-LN survival levels for *Pelargonium*. With this method, a skilled technician can cryopreserve approximately 30 *Pelargonium* apices from the excision to the storage in LN within three hours. Hence this procedure using apices is promising as a routine method for the cryopreservation of *Pelargonium* germplasm. Moreover this work will make it possible to initiate studies to improve the knowledge concerning regeneration after cryopreservation (regrowth rate, experiment duration, cellular origin, and stability) and virus eradication through cryotherapy.

Acknowledgement: The authors wish to thank Dr Stéphane Dussert from IRD (Montpellier, France) for his help to establish this collaboration between the Catholic University of Leuven (K.U.Leuven, Belgium) and the National Institute of Horticulture (INH, France).

REFERENCES

1. Channuntapiptat C, Collins G, Bertozzi T & Sedgley M (2000) *J Hort Sci Biotechnol* **75**, 228-232.
2. Charoensub R, Phansiri S, Yongmanitchai W & Sakai A (2003) *Sci Hort* **98**, 485-492.
3. Dumet D, Grapin A, Bailly C & Dorion N (2002) *Plant Sci* **163**, 1121-1127.
4. Dussert S, Engelmann F & Noirot M (2003) *CryoLetters* **24**, 149-160.
5. Grapin A, Dumet D, Holota H & Dorion N (2003) *Acta Hort* **623**, 225-230.
6. Grapin A, Hupel C, Marche C & Dorion N (2001) *Acta Hort* **560**, 157-160.
7. Gupta S & Reed B (2006) *CryoLetters* **27**, 29-42.
8. Halmagyi A, Fischer-Klüver G, Mix-Wagner G & Schumacher HM (2004) *Plant Cell Reps* **22**, 371-375.
9. Hirai D, Shirai K, Shirai S & Sakai A (1998) *Euphytica* **101**, 109-115.
10. Ishikawa K, Harata K, Mii M, Sakai A, Yoshimatsu K & Shimomura K (1997) *Plant Cell Reps* **16**, 754-757.
11. Kim HH, Lee JK, Yoon JW, Ji JJ, Nam SS, Hwang HS, Cho EG & Engelmann F (2006) *Cryoletters* **27**, 143-153.
12. Kim HH, Lee JK, Yoon JW, Park EY, Cho EG, Sohn JK, Kim TS & Engelmann F (2006) *CryoLetters* **27**, 223-234.
13. Kyesmu PM, Takagi H & Yashima S (1997) *Proceedings of the Annual Meeting of Japan Molecular Biology* p 162 [cited by Sakai A (2000) in *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*, IPGRI, 1-20].
14. Lambardi M, Fabbri A & Caccavale A (2000) *Plant Cell Reps* **19**, 213-218.
15. Lambardi M, De Carlo A, Benelli C & Bartolini G (2001) *Acta Hort* **560**, 125-128.
16. Leunufna S & Keller ERJ (2003) *Plant Cell Reports* **21**, 1159-1166.
17. Matsumoto T, Mochida K, Itamura H & Sakai A (2001) *Plant Cell Reps* **20**, 398-402.
18. Matsumoto T & Sakai A (2003) *Euphytica* **131**, 299-304.
19. Matsumoto T & Sakai A (2000) *Acta Hort* **538**, 173-174.
20. Matsumoto T, Sakai A & Yamada K (1994) *Plant Cell Reps* **13**, 442-446.
21. Murashige T & Skoog F (1962) *Plant Physiol* **15**, 473-497.
22. Niino T, Sakai A & Nojiri K (1992) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **28**, 261-266.
23. Panis B, Piette B & Swennen R (2005) *Plant Sci* **168**, 45-55
24. Pennycooke JC & Towill LE (2000) *Plant Cell Reps* **19**, 733-737.
25. Popova AV & Busheva RM (2001) *CryoLetters* **22**, 293-298.
26. Sakai A, Kobayashi S & Oiyama I (1990) *Plant Cell Reps* **9**, 30-33.
27. Sakai A (1997) In: Ladzan MK, Cocking EC (eds) *Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro. Science*, USA, p 53-66.
28. Schäfer-Menuhr A, Mix-Wagner G & Schumacher HM (1997) *Acta Hort* **447**, 477-483
29. Sokal R & Rohlf F (1981) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* 2nd ed, 731-747.
30. Takagi H, Tien Thinh N, Islam OM, Senboku T & Sakai A (1997) *Plant Cell Reps* **16**, 594-599.
31. Thinh N (1997) Doctoral dissertation, Kobe University, Japan, p.187 [cited by Sakai A (2000) in *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*, IPGRI, 1-20].
32. Touchell DH, Chiang VL & Tsai CJ (2002) *Plant Cell Reps* **21**, 118-124.
33. Towill L & Bonnard R (2003) *CryoLetters* **24**, 341-346.
34. Towill L, Bonnard R & Volk G (2006) *CryoLetters* **27**, 353-360.
35. Vandenbussche B, Weyens G & De Proft M (2000) *Plant Cell Reps* **19**, 1064-1068.
36. Volk GM & Walters C (2006) *Cryobiology* **52**, 48-61.
37. Yoon JW, Kim HH, Ko HC, Hwang FS, Hong ES, Cho GI & Engelmann F (2006) *CryoLetters* **27**, 211-222.

Annexe 3-2

Coloration à l'acide périodique-Schiff et au Naphthol Blue Black

1. Coloration à l'acide périodique-Schiff

1. Mettre les lames dans un bain d'acide périodique 1% pendant 5 min
2. Rincer les lames 1 min avec de l'eau courant puis 1 min avec de l'eau distillée
3. Plonger les lames 10 min dans le réactif de Schiff à l'obscurité
4. Rincer les lames 2 min à l'eau sulfureuse puis à l'eau courante, jusqu'à ce que l'eau soit incolore.
5. Vérifier la coloration au microscope

2. Coloration au Naphthol Blue Black

1. Mettre les lames dans un bain de Naphthol Blue Black pendant 20 min (à froid)
2. Rincer à l'eau courante, jusqu'à ce que l'eau soit incolore.
3. Régresser avec de l'acide acétique à 7 % si nécessaire
5. Vérifier la coloration au microscope
6. Laisser sécher les lames
7. Montage des lamelles avec du Mowiol

Annexe 3-3

Procédure pour calculer la surface des coupes optiques à partir de LSM Browser

A partir des fichiers en .lsm de la base de données LSM

1. Ouvrir un fichier .lsm directement dans le logiciel Image J (chaque fichier contient l'ensemble des images sous forme de stacks d'une acquisition sur un apex entier)
2. Dans le menu de Image J cliquer sur image puis « adjust »
3. Dans la fenêtre « adjust » cliquer sur « Threshold »
4. Utiliser les curseurs pour augmenter le plus possible le contraste de l'objet par rapport au fond de l'image (seuillage)
5. Cliquer sur « apply » puis sur ok dans la nouvelle fenêtre pour valider le seuillage pour toutes les images du fichier.
6. Dans le menu de Image J cliquer sur image puis process
7. Dans la fenêtre « process » cliquer sur « filter » choisir le filtre « median » (permet d'éliminer le bruit de fond)
8. Dans le menu de Image J cliquer sur image puis « measure » puis « analyze particles »
9. Dans la fenêtre « analyze particles » cocher « display results », « clear results », « includes holes » et « summarize », dans « show » choisir « masks », dans « size » laisser la valeur indiquée
10. Cliquer sur ok pour lancer le calcul de l'aire des objets de chaque image
11. A partir du masque généré lors du calcul des aires, relancer un calcul de la surface des objets selon les mêmes conditions que dans le point 9 mais dans « show » choisir « nothing ». (Permet d'avoir une meilleure précision dans le calcul des surfaces)
12. Enregistrer le fichier « summarize » dans un tableur excel.

Procédure pour calculer la surface des coupes optiques à partir de Volocity

A partir d'un fichier de la base de données Volocity

1. Ouvrir Volocity lite
2. Ouvrir la base de données
3. Choisir un fichier et l'exporter en format TIFF dans un dossier créé à cet effet
4. Changer l'extension .tiff en .lsm
5. Ouvrir le fichier dans LSM Browser
6. Supprimer les images inutiles
7. Enregistrer le fichier retaillé dans le dossier créé au point 3
8. Ouvrir le fichier dans Image J
9. Réaligner les images entre elles. Cliquer sur plugins puis sur stackreg
10. Appliquer la même procédure que précédemment à partir du point 2 pour le calcul des surfaces

Annexe 4-1

Préparation des coupes pour la microscopie électronique à transmission

1. Fixation

Réactifs:

1. Préparation du « tampon » pour 1 litre
4,4 g de micro et macro éléments avec vitamines de Murashige et Skoog de chez Duchéfa
30 g de saccharose
Eau distillée QSP 1 L
Ajuster le pH à 6,12 avec de KOH avant autoclavage. pH=5,8 après autoclavage
Fixateur : glutaraldéhyde à 4 %

Protocole:

1. Prélever les feuilles au dernier moment, une fois que le fixateur est prêt.
2. Découper dans le fixateur à température ambiante des rectangles de feuille d'environ 2 mm de largeur et 4 mm de longueur.
3. Plonger les morceaux (3 par échantillon) dans un tube à hémolyse contenant du fixateur.
4. Placer l'ensemble des tubes dans une cloche à vide, faire le vide puis le casser plusieurs fois jusqu'à ce que les morceaux aient coulé au fond des tubes.
5. Laisser alors les échantillons environ une nuit dans le fixateur.
6. Rincer les morceaux de feuille 3 fois avec le tampon (puis les conserver à 4°C).
7. Ne jamais utiliser de pipettes pasteur en verre.
8. Toujours laisser un peu de liquide au fond du tube afin que les morceaux ne sèchent pas.

2. Post- Fixation

Réactifs :

- Tétraoxyde d'osmium (Aldrich 20,103-0) 250 mg
Tampon pH=5,8

Protocole:

1. Fixer dans l'osmium à 2 % pendant 1h30, toujours manipuler sous une hotte
2. Rinçage avec du tampon : 3x10 min
3. Rinçage avec de l'eau ultra pure : 3x5 min

3. Déshydratation

- | | |
|-----------------|------------|
| 1. Ethanol 50° | 1 x 20 min |
| 2. Ethanol 70° | 1 x 20 min |
| 3. Ethanol 95° | 1 x 20 min |
| 4. Ethanol 100° | 3 x 20 min |

Préparation des différents alcools à partir d'éthanol 100° pur
--

4. Inclusion

Réactifs:

Oxyde de propylène-1,2
Epon 812
2-Dodecen-1Y1-succinic anhydre
Méthylnorbonene-2,3-dicarboxylic anhydre
DMP 30

Protocole:

1. Préparation de la résine

Solution A : Epon 812	31 mL (38%) ou 37,8 g
2-Dodecen-1Y1succinic anhydre	50 mL (62%) ou 49,7 g
Solution B : Epon 812	50 mL (53%) ou 60,7 g
Méthylnorbonene-2,3-dicarboxylic anhydre	44 ,5 mL (47%) ou 55 g

Ces solutions peuvent être conservées un mois à 4°C.

Solution finale = 2 volumes de A + 3 volumes de B

Mettre en agitation 15 min la solution finale

Ajouter 2,5 % de DMP30, puis remettre en agitation pendant 15 min (24h maximum à 4°C)

2. Imprégnation

3.

Préparer sous une hotte un mélange 1/1 de la solution finale et d'oxyde de propylène

Remplacer l'Ethanol 100° des tubes par ce mélange et laisser ainsi environ une nuit

Remplacer le mélange par de la solution finale et laisser ainsi 4h

Inclure les échantillons dans des gélules

4. Polymérisation

24 h à 37°C
24 h à 45°C
48 h à 60°C

Temps minimum Ne jamais commencer par 60°C

Annexe 4-2

Coloration des coupes semi-fines

1. Réactifs

Acide périodique 1 % dans l'eau déminéralisée.

Bleu de méthylène 1 % dans du tétraborate de sodium.

Azur II 1% dans l'eau déminéralisée.

2. Technique (coloration à froid)

1. Sécher les lames à l'étuve
2. Recouvrir les lames avec de l'acide périodique pendant 10 minutes
3. Rincer à l'eau déminéralisée
4. Recouvrir les lames avec un mélange bleu de méthylène/azur II 50/50 v/v pendant 20 min
5. Rincer à l'eau déminéralisée
6. Séchage à l'étuve à 60°C
7. Passage des lames dans le xylène et montage à l'entellan

Annexe 4-3

Analyse de la quantité d'ADN par cytométrie en flux

1. Dans une boîte de Petri, mettre environ 1 cm² d'une feuille jeune et saine de la plante à analyser et 1 cm² d'une feuille de pois
2. Ajouter, 500 µl de tampon d'extraction
3. Hacher à la lame de rasoir
4. Ajouter, 1500 µl de tampon d'extraction additionné de DAPI
5. Mélanger et prélever à la pipette la totalité de la solution
6. Filtrer (filtre nylon 30 µm)
7. Attendre 30 secondes
8. Placer le tube sur le support du cytomètre
9. Lancer l'analyse
10. Enregistrer les résultats dans un fichier excel

Annexe 4-4

Protocole pour la détection des virus par DAS-ELISA

1. Préparation du premier anticorps

1. Mettre 10 mL de tampon Coating (fourni dans le kit LOEWE 07094C/480) dans un flacon
2. Ajouter 50 µL du premier anticorps
3. Déposer 100 µL du mélange dans chaque puits de la plaque de microtitration
4. Placer la plaque dans une boîte en plastique contenant du papier absorbant imbibé d'eau
5. Fermer la boîte, placer l'ensemble 2 heures dans une enceinte à 37°C

2. Préparation des isolats

1. Peser 0,40 g de morceaux de feuilles de chaque plante
2. Broyer les morceaux de feuilles et les mélanger avec 4 ml de tampon d'extraction (fourni dans le kit)
3. Récupérer l'ensemble dans un tube à hémolyse
4. Laisser décanter 1 heure au réfrigérateur

3. Lavage de la plaque et dépôt des isolats

1. Vider les puits de leur contenu
2. Rincer 3 fois avec du tampon PBS + Tween
3. Laisser sécher la plaque
4. Déposer dans les puits prévus à cet effet 100 µL de témoin négatif ou 100 µL de témoin positif
5. Déposer 100 µL de surnageant des isolats dans chaque puit
6. Remettre la plaque dans la boîte en plastique, la fermer
7. Placer l'ensemble 16 heures à 4°C
8. Rincer 3 fois avec du tampon PBS + Tween
9. Laisser sécher la plaque

4. Préparation de l'anticorps conjugué

1. Mettre 10 mL de tampon PBS + Tween dans un flacon
2. Ajouter 0,2 g de P.V.P. (Polyvinylpyrrolidone)
3. Ajouter 20 mg d'albumine bovine
4. Ajouter 50 µL de l'anticorps conjugué
5. Déposer 100 µL par puits
6. Remettre la plaque dans la boîte en plastique, la fermer
7. Placer l'ensemble 3-4 heures à 37°C
8. Rincer 3 fois avec du tampon PBS + Tween
9. Laisser sécher la plaque

5. Préparation du substrat et lecture des résultats

1. Diluer du paranitrophenyl-phosphate dans un tampon de diéthanolamine à 10 % à raison de 1mg/mL
2. Déposer 100 μ L par puits de ce mélange
3. Placer la plaque à l'obscurité
4. Lire la plaque au spectrophomètre au bout de 10 min, 30 min et 1 heure

Annexe 4-5

Protocole d'immunolocalisation

1. Préparation des lames

Les méristèmes sont découpés au cryostat, les coupes sont alors déposées sur des lames à cupules.
Coupes de 8µm maximum

2. Marquage avec les anticorps

1. Neutralisation

Immerger les coupes dans du sérum de chèvre à 1% pendant 10 minutes à température ambiante.
Remplacer le sérum par du tampon Tris HCL 0.1M à pH=7.4.

2. Préparation des anticorps I^{re}

Les anticorps sont dilués dans du tampon Tris HCL 0.1M à pH=7.4

Dilutions retenue : 1/50

Agiter doucement les dilutions

Attendre 5 minutes avant utilisation

3. Incubation

Laisser agir 2h à température ambiante dans une enceinte humide sous agitation

4. Rinçage

Les coupes sont rincées avec du Tris HCL 0.1M à pH=7.4

1^{er} rinçage 30 secondes à température ambiante puis 4 rinçages de 5 minutes. Il faut toujours maintenir les coupes humides sous agitation

5. Incubation avec le deuxième anticorps

Cet anticorps est préparé de la même manière que l'anticorps primaire : dilution retenue : 1/1000.

Immerger les coupes et laisser agir 30 minutes à température ambiante dans une enceinte humide sous agitation.

6. Rinçage

Les coupes sont rincées avec Tris HCL 0.1M à pH=7.4

1^{er} rinçage 30 secondes à température ambiante puis 4 rinçages de 5 minutes. Il faut toujours maintenir les coupes humides sous agitation

3. Montage

Une goutte de PBS est déposée sur chaque coupe avant de coller une lamelle dessus avec du vernis à ongle.

Annexe 4-6

Traitement des lames de verre pour fixation des coupes semi-fines

1. Les lames doivent être propres et dégraissées
2. Immerger les lames dans une solution de 3-Aminopropyltriéthoxysilane (Sigma réf A 3648) à 2 % dans l'acétone pendant 5 secondes.
3. Rincer les lames dans deux bains d'acétone
4. Faire un passage dans de l'eau distillée
5. Laisser sécher les lames une nuit à + 42 °C
6. Les lames peuvent se conserver à la température du laboratoire.

Annexe 4-7

Procédure pour calculer la proportion de virus

1. Ouvrir une image dans Image J
2. Cliquer sur « image » puis « type »
3. Choisir « 8 Bit » pour convertir l'image en noir et blanc
4. Définir la zone où le comptage des pixels sera effectué
5. Cliquer sur « analyze » puis sur « mesure »
6. Enregistrer la valeur dans un tableur excel
7. Refaire la même procédure sur une autre zone
8. Calculer le rapport entre les deux valeurs obtenues pour chaque zone

La conservation des ressources génétiques végétales est un défi majeur, le maintien de la biodiversité étant capital pour répondre aux besoins des générations futures. Ce travail de thèse, s'inscrivant dans cette démarche de conservation, a été réalisé sur *Pelargonium*, plante ornementale multipliée végétativement. Un procédé de cryoconservation d'apex par « droplet-vitrification » a été mis en place avec succès sur *P. x peltatum* 'Balcon Lilas'. Avec un taux de régénération moyen de 40 % obtenu sur 28 taxons testés, la constitution d'une cryobanque est maintenant possible. L'optimisation de la survie post-cryoconservation passant par une meilleure connaissance des effets des solutions cryoprotectrices sur les cellules, des études microscopiques faisant appel notamment à la RTM (Real Time Microscopy) et la CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) ont été pratiquées. Elles ont permis de mettre en évidence, d'une part que la solution de vitrification (PVS2) provoque une contraction importante et rapide des cellules en agissant sur les parois et d'autre part que la solution de charge (LS), outre son rôle d'osmoticum, atténue les altérations dues à PVS2. Les travaux sur la régénération *in vitro* à partir d'apex ont montré que celle-ci était le plus souvent directe ce qui peut favoriser le maintien de la conformité. Ainsi, une plante obtenue après régénération d'un apex cryoconservé ou non, ne présente pas de modifications phénotypiques sauf chez certains cultivars chimériques. Enfin, des tests ELISA ont montré une augmentation du taux d'assainissement lors d'une régénération après cryoconservation par rapport à une simple culture d'apex pour deux virus (PFBV et PLPV). Cependant les immunolocalisations réalisées ont mis en évidence que les virus étaient toujours présents dans les apex, l'élimination n'étant que partielle. L'augmentation de ces connaissances devrait permettre une utilisation à plus grande échelle de la cryoconservation participant ainsi à une meilleure gestion de la conservation des ressources génétiques par une offre stratégique plus importante.

Mots Clefs : Droplet-vitrification, microscopie, immunolocalisation, assainissement viral

The conservation of the plant genetic resources is a major challenge, biodiversity being a key for the future generation well-being. Being a part of this preservation topic, the main objective of this PhD thesis was to set up a cryopreservation procedure on *Pelargonium*, a vegetatively propagated ornamental plant. Apex cryopreservation by "droplet-vitrification" was optimised on *P. x peltatum* 'Balcon Lilas'. Apices of 28 accessions were successfully cryopreserved with a 40 % average regrowth. The establishment of a cryobank is now possible. However the optimisation of post-cryopreservation survival needed a better knowledge of cryoprotector effects on cells. Studies by microscopy including the RTM (Real Time Microscopy) and the CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) were realised. They allowed to bring to light, the vitrification solution (PVS2) induced an important and fast shrinkage of cells by acting on cell walls, that the loading solution (LS), besides its role as osmoticum, eased the changes due to PVS2. Studies on *in vitro* apex culture showed that the regeneration was mostly direct. This result can partially explain that regeneration apices gave true-to-type for both cryopreserved and non cryopreserved plants, except for some chimeral cultivars. Finally, using ELISA tests, we demonstrated that apex cryopreservation could also result in PFBV and PLPV viruses eradication. However immunolocalisations put in evidence cryopreservation allowed only a partial elimination of the two viruses in the apices. As shown by immunolocalisation process the increase of this knowledge should allow a wider use of cryopreservation, giving a complementary possibility so participating in a better management of the conservation plant genetic resources conservation.

Key words : Droplet-vitrification, microscopy, immunolocalisation, virus eradication
