

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	11
I. LA PHYSIOLOGIE DES SEMENCES	16
II. LES METHODES DE DESHYDRATATION	19
OBJECTIFS ET CHOIX DU MATERIEL	25

CHAPITRE 1

MATERIEL ET METHODES	26
A. MATERIEL ET METHODES DE CULTURE	26
1. Matériel végétal	26
2. Méthodes de culture	30
B. METHODES D'ANALYSE	31
1. Mesure de la croissance	31
2. Estimation du pourcentage de cellules vivantes	32
3. Description de l'état déshydraté	32
4. Mesure de la teneur en oxygène	34
5. Mesure de la teneur en éthylène	35
6. Etudes histologiques	35
7. Analyse des données	36
C. METHODES DE DESHYDRATATION	37
1. Déshydratation sous pression réduite	37
2. Déshydratation sous humidité relative contrôlée	37
3. Lyophilisation	39

CHAPITRE 2

ESSAI PRELIMINAIRE DE MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DESHYDRATATION 40

1. Déshydratation sous pression réduite	40
1.1. Survie et teneur en eau durant la déshydratation	40
1.2. Essais de stockage des embryons déshydratés	41
1.3. Essais de déshydratation d'embryons somatiques prétraités avec du saccharose ..	42
1.4. Discussion	47
1.5. Etudes histologiques	49
2. Déshydratation sous humidité relative contrôlée	52
2.1 Protocole expérimental	52
2.2 Survie et teneur en eau des embryons après déshydratation	52
2.3. Discussion	56
2.4. Etudes histologiques	57
3. Conclusion	58

CHAPITRE 3

ETUDE DES DIFFERENTES PHASES CONSTITUTIVES DU PROTOCOLE DE DESHYDRATATION 60

A. ETUDE DE LA PHASE DE PRETRAITEMENT	60
1. Protocole expérimental	60
2. Effet d'un prétraitement réalisé à +4°C sur l'induction d'une tolérance à la déshydratation	63
3. Effet de la durée du prétraitement à +4°C	68
3.1. Effet sur la survie des embryons après déshydratation	68
3.2. Effet sur la teneur en eau des embryons après déshydratation	69
4. Effet d'un prétraitement en présence de saccharose	72
4.1. Effet de la concentration en saccharose sur la survie des embryons après prétraitement	73
4.2. Effet de la concentration en saccharose sur la survie des embryons après déshydratation	73

4.3. Survie des embryons traités sous différentes humidités relatives	75
4.4 Discussion	84
5. Survie et teneur en eau des embryons déshydratés après un prétraitement à l'acide abscissique	88
6. Discussion	91
 B. ETUDE DE LA PHASE DE DESHYDRATATION	97
1. Effet de la température de déshydratation sur la survie et la teneur en eau des embryons	97
1.1. Evolution de la survie des embryons	97
2. Influence des conditions opératoires sur la vitesse de perte en eau durant la déshydratation	101
2.1. Protocole expérimental	101
2.2. Cinétiques de perte en eau	103
2.3. Effet conjugué du prétraitement et de la vitesse de perte en eau sur la viabilité des embryons	106
 C. ETUDE DE LA PHASE DE REHYDRATATION	109
1. Protocole expérimental	109
2. Teneur en eau des embryons en fonction du mode de réhydratation	109
 D. ETUDE DE LA PHASE DE CONSERVATION	112
1. Etude des durées de conservation	112
1.1. Survie des embryons en fonction de l'humidité relative et de la durée de stockage	113
1.2. Comparaison du comportement des semences et des embryons somatiques après déshydratation	114
1.3. Influence de la nature du prétraitement sur la durée de stockage compatible avec une survie des embryons	117
1.4. Discussion	125
2. Essais d'amélioration des durées de conservation	130
2.1. Introduction	130
2.2. Modification du mode de déshydratation	130
2.3. Modification du mode de réhydratation	132
2.4. Modification de la teneur en oxygène pendant le stockage	132
2.5. Conclusion	136

3. Etude descriptive de l'état physiologique de l'embryon déshydraté	137
3.1. Mesure de la consommation en oxygène	137
3.2. Mesure de la production d'éthylène	142
E. CONCLUSION	144

CHAPITRE 4

DESHYDRATATION D'UNE SUSPENSION EMBRYOGENE	145
1. Introduction	145
2. Survie et teneur en eau des cellules après déshydratation	145
3. Conformité de la suspension embryogène après conservation à l'état déshydraté	151
3.1. Cinétiques de croissance	151
3.2. Production d'embryons somatiques par les cultures embryogènes	152
4. Conclusion	156

CHAPITRE 5

LYOPHILISATION D'EMBRYONS SOMATIQUES	157
1. Etape de congélation basée sur l'utilisation de saccharose comme unique agent de cryoprotection	158
1.1. Effet de la taille des embryons sur leur survie après congélation	158
1.2. Adaptation du procédé de congélation	159
2. Survie et teneur en eau des embryons au cours de la lyophilisation	160
3. Essais de conservation des embryons lyophilisés	160
4. Conclusion	163
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	164
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	168
ANNEXES	181
LISTE DES ILLUSTRATIONS	187
TABLE DES MATIERES	194

ABSTRACT

A dehydration method based on the use of controlled relative humidity has been developed with carrot (Daucus carota L.) embryogenic cell lines and somatic embryos.

This process is less drastic compared to the use of vacuum dehydration and permits to preserve somatic embryos in their integrity (100% survival) after storage and rehydration.

Best results after storage in the dried state have been obtained at +4°C after an inductive treatment with sucrose. Maximal storage duration under these conditions appears to be 8 months. Over this period of time, survival is preserved but ability of the embryos to regrow is altered.

The use of fluridon has shown that sucrose effect may be mediated by elevated endogenous ABA.

Tissues water content after dehydration is not the only parameter to consider. Dehydration rates are also important. Above 0,7 g H₂O.g⁻¹ dry wt.h⁻¹, embryo survival is altered.

Rehydration is a key step of the protocol. Slow rates of water uptake (about 0,4 g H₂O.g⁻¹ dry wt.h⁻¹) are correlated with embryo survival after dehydration.

Dehydrated carrot embryogenic cell line has been preserved after 4 months of storage. After rehydration, regrowth and embryogenic potential are similar to the control. However after 8 months, ability to regrow is preserved, but ability to produce somatic embryos is lost.

Using a simplified freezing process, preliminary studies of freeze-drying have been carried out. Carrot somatic embryos withstand freeze-drying. Nevertheless, survival is rapidly lost during storage in the dried state.