



**HAL**  
open science

# Electroporation de protoplastes pour l'amélioration de leur aptitude à la croissance et à la différenciation de plantes

J. Ochatt

► **To cite this version:**

J. Ochatt. Electroporation de protoplastes pour l'amélioration de leur aptitude à la croissance et à la différenciation de plantes. Ecole avancée sur : "les transferts de gènes et la régulation de leur expression dans les systèmes eucaryotes", Sep 1993, Kiev, Ukraine. hal-02777714

**HAL Id: hal-02777714**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02777714v1>**

Submitted on 4 Jun 2020

**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.

## ELECTROPORATION DE PROTOPLASTES POUR L'AMELIORATION DE LEUR APTITUDE A LA CROISSANCE ET A LA DIFFERENTIATION DE PLANTES

Sergio J. Ochatt, INRA Centre de Recherches d'Angers, Station  
d'Amélioration des Espèces Fruitières et Ornementales, B.P. 57,  
49071 Beaucouzé, FRANCE

### RESUME

L'application à des protoplastes de différentes espèces et sources tissulaires d'impulsions électriques de haut voltage et courte durée (électroporation) a eu un effet prononcé sur leur aptitude à la division et formation de colonies cellulaires. La croissance et la régénération de bourgeons à partir de tissus dérivés de protoplastes électroporés ont aussi été remarquablement améliorées. De plus, une augmentation significative de la synthèse de l'ADN a été constatée chez les protoplastes électroporés, par rapport aux protoplastes non-traités, en mesurant l'incorporation de [méthyl <sup>3</sup>H] thymidine dans le matériel acide précipitable aussi bien après un régime de marquage pulsé que continu. Cette amélioration de la synthèse d'ADN due à l'électricité s'est avérée indépendante de la régénération de la paroi cellulaire par les protoplastes. L'effet promoteur de l'électroporation sur la compétence pour la prolifération et la régénération a été maintenu même pour des tissus dérivés de protoplastes qui avaient été repiqués plusieurs fois.

### 1. INTRODUCTION

La croissance (résultante de la division cellulaire) et la différenciation (le résultat de l'asymétrie) sont les deux processus clés dans le développement de tout organisme. En effet, on sait que la polarité cellulaire et une différenciation hétérogène, dérivée d'une organisation irrégulière des constituants cellulaires, précèdent la différenciation (Bunning, 1957). Dans ce cadre, divers agents (e.g. des gradients hormonaux, le pH, la température et des champs électriques) peuvent perturber des systèmes jusque-là homogènes et donc induire leur hétérogénéité et polarité ultérieures.

Chez les plantes supérieures, il existe des courants électriques transcellulaires (Behrens et al, 1982; Tanada & Vinten-Johansen, 1980; Weisenseel et al, 1979) dont le contrôle dépend de canaux et pompes ioniques situés dans différentes zones de la membrane cellulaire. L'application artificielle de champs électriques a induit la polarité morphologique aussi bien aux niveaux cellulaire (Chen & Jaffe, 1979; Lund, 1923; Novak & Bentrup, 1972) que tissulaire (Rathore & Goldsworthy, 1985a, b), et un intérêt croissant a donc été porté sur les effets possibles d'impulsions électriques d'un voltage élevé et d'une courte durée sur la perméabilité de cellules isolées et de protoplastes. Jusqu'à ce jour, les mécanismes précis de ce processus ne sont toujours pas très bien compris. Cependant, des efforts ont été faits pour essayer d'expliquer la possible influence biophysique de tels champs électriques sur les systèmes biologiques, en particulier au niveau de la membrane. Sale & Hamilton (1968) ont suggéré que l'excessive différence de potentiel à travers la membrane, résultant de l'application d'un champ électrique fort, peut induire de changements irréversibles au sein des structures membranaires organisées et, par conséquent, la rupture de la membrane. Crowley (1973) a envisagé la membrane bimoléculaire lipidique comme un condensateur élastique qui, soumis à une force électromécanique de compression comme celle provoquée par les hauts voltages, se comporte comme un condensateur élastique capable de résister à des perturbations du potentiel relativement importantes avant sa rupture électrique. Ainsi, une diffusion accrue se produirait au fur et à mesure que la membrane devient plus fine.

Neumann & Rosenheck (1972) ont rapporté l'induction de modifications transitoires de la perméabilité chez les membranes vésiculaires de cellules adéno-médullaires de boeuf cultivées in vitro, qui provoquaient la libération de catécholamines à partir des granules de chromaffine, après soumission à des champs électriques exponentiels. De plus, en délivrant des impulsions électriques rectangulaires sur des granules de chromaffine, Lindner et al (1977) ont trouvé que les perturbations structurales induites dans la membrane étaient non seulement transitoires mais aussi apparemment réversibles. Kinoshita & Tsong (1977a) ont vérifié une augmentation abrupte de la perméabilité aux ions (Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>) ou molécules ([<sup>14</sup>C]saccharose) chez des suspensions d'érythrocytes humains électropulsés. Des mesures supplémentaires de la cinétique de perméation des molécules de 10 carbohydrates différents ont montré que la perméabilité des cellules électropulsées diminuait quand la taille de la molécule augmentait, jusqu'au point de leur imperméabilité pour une taille critique. Ces acquis ont suggéré que le courant électrique appliqué (d'environ 2,2 KV/cm) avait généré un potentiel transmembranaire à travers la membrane de l'érythrocyte, et que ce potentiel ( de l'ordre de 1 V)

selon  $\tau = R.C$ , où  $R$  représente la résistance de l'échantillon, et  $C$  la capacitance des capaciteurs de décharge (10, 20, 30, 40 et 50 nF).  $R$  a été déterminée en mesurant la conductivité ( $\zeta$ ) des tampons avec un Conductimètre (CM35, WPA Scientific Instruments, Angleterre), calculée comme  $R = \zeta^{-1}$ . Trois impulsions exponentielles successives (chacune de 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ou 2000 V) ont été appliquées à chaque échantillon, à des intervalles de 10 secondes. La résistance des échantillons de protoplastes étant de l'ordre de 1000, la durée de la constante de réduction de l'impulsion (définie comme le temps nécessaire pour que le voltage délivré diminue à 63 % de sa valeur initiale) a donc été de 10, 20, 30, 40 et 50  $\mu$ sec respectivement pour les 5 capaciteurs testés. Tous les traitements électriques ont été conduits à 23°C, et des boîtes avec des protoplastes suspendus dans la solution d'électroporation, mais non soumis aux impulsions électriques, ont été employées comme témoin.

### 2.3. Culture de protoplastes électroporés et évaluation des réponses

Immédiatement après leur électromanipulation, les protoplastes ont été dilués à la densité initiale de culture requise avec leurs milieux respectifs et ils ont été cultivés dans les conditions appropriées pour chaque source (Hammatt et al, 1987; Ochatt et al, 1987; Rech et al, 1987; Ochatt & Power, 1988).

La viabilité des protoplastes a été vérifiée avec du FDA (Widholm, 1972) 24 h après leur isolement, tandis que la régénération de la paroi cellulaire a été contrôlée à l'aide du Calcofluor White (Ochatt et al, 1990). L'osmolarité du milieu a été réduite par dilution du milieu de protoplastes avec la contrepartie appropriée de milieu dépourvu d'osmoticum, pour donner des rapports (v/v) de 3:1, 2:1 et 1:1, respectivement, quand les protoplastes avaient atteint les stades de 10, 20 et 30 cellules par colonie. L'efficacité de culture (E.C., exprimée en terme du pourcentage de protoplastes en division par rapport au nombre total de protoplastes initialement mis en culture) et le nombre de cellules par colonie ont été relevés tous les 5 jours pendant les premiers 30 jours de culture. Toutes les manipulations ont été répétées au moins deux fois, avec 5 répétitions par traitement.

### 2.4. Prolifération des colonies cellulaires issues de protoplastes

Après 30 jours de culture, et suivant la réduction finale de l'osmolarité des milieux, le nombre de microcals (1-2 mm diam) produits dans chaque traitement a été noté et ils ont été transférés (trois fois, toutes les 3 semaines) sur le milieu de callogenèse approprié afin d'examiner leur compétence pour la prolifération ultérieure. Toutes les cultures ont été maintenues à 25°C, sous un éclairage continu de 1000 lux, et avec des portions de cal de 100 mg poids frais employées comme l'inoculum initial pour chaque repiquage. Leur croissance a été mesurée en terme de l'incrément de poids frais (en mg) à la fin de chaque transfert, avec toutes les expériences répétées deux fois et comprenant au moins 20 répétitions par traitement.

### 2.5. Evaluation des réponses de régénération de plantes à partir de cals issus de protoplastes électroporés de Cerisier Colt et de *Solanum dulcamara*

Des cals dérivés de protoplastes électroporés, isolés de suspensions cellulaires de cerisier Colt et *S. dulcamara*, ont été transférés sur leurs milieux de régénération respectifs et cultivés dans les mêmes conditions que pour la callogenèse. Puis, les bourgeons régénérés ont été prélevés et transférés pour leur croissance et clonage ultérieurs. Les réponses ont été mesurées en terme de la fréquence (%) de régénération et le nombre de bourgeons produits par portion de cal. Les réponses de rhizogenèse ont été exprimées à travers le pourcentage de pousses enracinées, le nombre de racines par pousse, la longueur totale des racines et le rapport tige/racine. Toutes les expériences ont été répétées deux fois avec un minimum de 20 pousses par traitement.

### 2.6. Effets de l'électroporation sur la synthèse de l'ADN

#### 2.6.1. Isolement, électroporation et culture de protoplastes

Seuls des protoplastes de suspensions cellulaires de cerisier Colt et de *Solanum dulcamara* ont été employés pour cette série d'études. Des échantillons de protoplastes (400  $\mu$ l), traités comme décrit ci-dessus, ont été soumis à 3 impulsions exponentielles successives (à des intervalles de 10 secondes), de 250 V/cm en déchargeant un capaciteur de 30 nF pour le cerisier Colt, mais à 750 V/cm et en déchargeant un capaciteur de 10 nF pour *S. dulcamara*. Ceci a représenté une durée de la constante de diminution du pulse,  $\tau$ , de 30  $\mu$ sec et 10  $\mu$ sec respectivement, quand elle a été mesurée à l'extérieur de la chambre avec un conductimètre standard. Toutefois, quand la résistance de l'échantillon a été mesurée avec un résistimètre,  $R$  a été de 2900 $\Omega$  et la durée de la constante de diminution de pulse a donc été de 87 et 29  $\mu$ sec respectivement. Après leur électroporation, les protoplastes ont été cultivés comme déjà décrit.

### 2.6.2. Inhibition de la resynthèse de la paroi cellulaire et mesurement de la synthèse d'ADN par les protoplastes électroporés et cultivés

Afin de déterminer précisément les effets de l'électroporation sur la synthèse de l'ADN, des expériences ont été d'abord entreprises pour examiner la relation existante entre la régénération de la paroi cellulaire et la synthèse de l'ADN. Ainsi, un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire, le 2,4-dichlorobenzonitrile (DBN) (Galbraith & Shields, 1982) a été rajouté au milieu pour la culture de protoplastes, à une concentration de 11,8  $\mu\text{M}$ , déterminée au préalable comme la concentration capable d'inhiber la régénération de la paroi cellulaire sans aucun effet associé négatif sur la viabilité des protoplastes cultivés.

La synthèse de l'ADN par les protoplastes électroporés a été mesurée par l'incorporation de [méthyl<sup>3</sup>H] thymidine dans le matériel acide précipitable, en utilisant soit un régime de marquage pulsé, soit par un marquage continu. Dans la première série d'expériences, concernant le marquage pulsé, la [méthyl<sup>3</sup>H] thymidine (42 Ci/mmol) a été ajoutée aux protoplastes cultivés à une concentration finale de 4  $\mu\text{Ci/ml}$ , et les cultures ont été incubées à 27°C et à l'obscurité, pendant 1,5 h. Des aliquotes (2,0 ml) de la suspension de protoplastes ont été prélevées après 2, 24, 48, 72 et 96 h, et mélangées avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à 20 % (v/v), et elles ont été placées sur de la glace pendant 10 min. Le matériel précipité a été récupéré par filtration à travers une membrane de microfibrilles en verre, et rincé deux fois avec une solution de TCA à 10 % et une fois avec de l'éthanol absolu. Les filtres ont été séchés à la température ambiante pendant 4 h, et la radioactivité a été déterminée avec un spectromètre à scintillation liquide, en employant un cocktail de scintillation "X" (FSA Lab Supplies, Angleterre). Pour le marquage continu, la [méthyl<sup>3</sup>H] thymidine a été ajoutée aux protoplastes, dans leur milieu de culture et immédiatement après leur électroporation, pour donner une concentration finale de 0,05  $\mu\text{Ci/ml}$ . Une solution de DBN a été ajoutée au milieu de protoplastes en même temps, à une concentration finale de 11,8  $\mu\text{M}$ . Des échantillons de 300  $\mu\text{l}$  ont été prélevés après 2, 24 et 48 h, et l'incorporation de [méthyl<sup>3</sup>H] thymidine a été déterminée comme pour les expériences de marquage pulsé ci-dessus.

### 2.7. Effets dans le long terme de l'électroporation de protoplastes de cerisier Colt sur leur croissance et leur aptitude à la régénération

Une suspension cellulaire à croissance rapide a été initiée à partir d'un clone de cals à prolifération rapide, dérivé de protoplastes électroporés (250 V, 30 nF). Cette suspension, désignée SCE, a été repiquée tous les 18 jours, et elle a été utilisée comme la source de protoplastes pour tous les essais sur les effets de l'électroporation sur la croissance à long terme.

Des protoplastes ont été isolés à partir de la suspension SCE pendant 16 repiquages successifs et 14 jours après leur transfert, quand les cellules étaient en croissance exponentielle. Ces protoplastes ont été cultivés côte à côte avec des protoplastes non-électroporés (NESC) ou récemment électroporés (RESC), isolés à partir d'une suspension cellulaire témoin, pendant sa croissance exponentielle (i.e. 21 jours après le repiquage), afin de comparer leurs aptitudes à la croissance et à la régénération de plantes. La suspension cellulaire témoin avait été initiée à partir de cals de racines, en même temps que la suspension cellulaire ECS.

Tous les protoplastes ont été cultivés comme décrit précédemment. Le temps de culture requis avant la première division cellulaire a été relevé en employant au moins 10 répétitions de chaque source de protoplastes. L'efficacité de culture au jour 10, ainsi que le nombre de cellules par colonie, observés tous les 10 jours pendant les premiers 30 jours, ont été notés pour les protoplastes de toutes les sources. Le nombre de microcals (de 1-2 mm diam) dans chaque traitement a été déterminé après 30 jours de culture, et des échantillons de 25 microcals/traitement ont été transférés sur le milieu de callogenèse pour évaluer leur croissance ultérieure.

Après trois repiquages (de 2 semaines chacun) sur ce milieu, des expériences de régénération de plantes ont été initiées avec ces cals, en suivant le protocole préalablement établi (Ochatt et al, 1987). Les résultats ont été évalués à travers la fréquence de régénération (% de cals montrant la production de bourgeons) et le nombre moyen de bourgeons régénérés par morceau de cal, en utilisant au moins 20 répétitions pour chaque source de protoplastes.

## 3. RESULTATS

### 3.1. Effets de l'électroporation sur la viabilité des protoplastes (Rech et al, 1987)

Pour tous les systèmes étudiés, il y a eu une influence notable des paramètres électriques sur la viabilité des protoplastes, suivant leur électroporation. Le pourcentage de protoplastes viables diminuait avec des augmentations du voltage et de la capacitance. Un voltage plus faible avec une impulsion plus longue (e.g. 250

V, 50  $\mu$ sec) était plus nuisible pour la viabilité des protoplastes que des voltages plus forts d'une durée plus courte (e.g. 1250 V, 10  $\mu$ sec). Au-delà de 1250 V, on a observé une lyse généralisée de la membrane et l'effondrement des protoplastes, et ce pour tous les systèmes étudiés. La taille des protoplastes a influencé aussi leur capacité pour survivre aux impulsions électriques. Ainsi, les protoplastes de *Prunus* (<20  $\mu$ m de diamètre) ont été moins sensibles aux impulsions électriques que les protoplastes de *Pyrus*, plus grands (>40  $\mu$ m diam). Quant aux protoplastes de *Glycine*, *Solanum dulcamara* et *S. viarum*, qui étaient intermédiaires en taille, ils ont aussi été intermédiaires dans leurs réponses de viabilité.

### 3.2. Effets des traitements électriques sur la réponse en culture des protoplastes (Rech et al, 1987)

Les observations de la régénération de la paroi cellulaire ont montré que les protoplastes électroporés avec des impulsions allant jusqu'à 1250 V avaient régénéré la paroi cellulaire et étaient entrés en division après 5 jours de culture, tandis que la régénération de la paroi était moins avancée chez les protoplastes non-traités. Ceci était particulièrement vrai pour les protoplastes de *Prunus*, *Pyrus* et *S. viarum*, lesquels se caractérisent par des longues phases de latence, de 15, 9 et 11 jours, respectivement, avant leur première division. Ainsi, des voltages entre 250 et 1750 V (chez *Prunus*, *S. dulcamara* et *S. viarum*), ou entre 250 et 1500 V (chez *Pyrus*) ont stimulé la division chez les protoplastes cultivés, mais cette gamme était considérablement réduite (250-750 V) chez *Glycine*. La stimulation de la division se produisait à toutes les capacitances testées, pour des voltages jusqu'à 1250 V chez *Prunus*, mais seulement pour des voltages en dessous de 1000 V pour les protoplastes plus grands, donc plus sensibles, issus des cals de *Pyrus*. Tous les voltages en dehors de cette gamme ont été soit incapables de stimuler une division cellulaire plus précoce, soit inhibiteurs de la division.

En général, le début des divisions chez les protoplastes électroporés a été précédé d'une augmentation remarquable du diamètre cellulaire, en particulier avec les traitements de 750 à 1250 V et des capacitances de 20 à 40 nF. Bien que la fusion de protoplastes ait occasionnellement été observée chez des protoplastes électroporés, celle-ci n'a pas été responsable des plus grands diamètres de protoplastes vérifiés (de jusqu'à 32  $\mu$ m chez *Prunus* et 61  $\mu$ m chez *Pyrus*).

En plus de la stimulation de l'entrée en division des protoplastes, l'électroporation a aussi augmenté significativement l'efficacité de culture. Comparés aux préparations non-traitées, qui s'étaient divisées seulement une fois après 10 jours de culture, les protoplastes de cerisier Colt électroporés à des voltages jusqu'à 1750 V pour des durées courtes (de 10 et 20  $\mu$ sec) avaient déjà formé des colonies cellulaires. Pour tous les systèmes, l'efficacité de culture a été inversement corrélée avec la durée des impulsions. Les impulsions longues, fournies par le condensateur à 50 nF, ont induit des stimulations plus faibles que des impulsions plus brèves au même voltage, avec l'inhibition de la croissance de protoplastes à 1500-2000 V pour les plus longues impulsions testées. Le nombre de cellules par colonie, indicatif du taux de division cellulaire, était maximum aux voltages plus bas avec les impulsions les plus longues. En effet, les protoplastes de *Prunus* électroporés à 250 V et 30 ou 40 nF s'étaient divisés environ 5 fois après 10 jours de culture, tandis que les protoplastes non-traités montraient seules des divisions sporadiques. Pour tous les autres systèmes, les protoplastes électroporés et mis en culture ont eu le même type de réponses.

Cette amélioration de la division cellulaire a été maintenue tout le long de la culture. Ainsi, après 30 jours de culture, un nombre significativement plus grand de microcals était produit par les protoplastes électroporés qu'à partir de protoplastes témoin.

### 3.3. Effets sur la croissance des cals issus de protoplastes

L'observation des protoplastes électromanipulés au-delà du stade de microcal a montré que l'amélioration de la croissance induite était maintenue aussi pendant le stade de cals (Chand et al, 1988; Ochatt et al, 1988).

Ainsi, des pulses de 250 V ou 500 V favorisaient les plus grands incréments de poids frais pour les cals issus des protoplastes électroporés du cerisier Colt, et ce indépendamment des durées d'impulsion testées. Des voltages plus élevés, jusqu'à 1500 V, stimulaient aussi la croissance, mais à mesure que le voltage augmentait, la durée des impulsions qui stimulait la callogenèse diminuait.

Chez les cals issus de protoplastes électroporés de poirier Conférence aussi, des voltages de 250 V ou 500 V étaient les plus favorables. Cependant, cette réponse dépendait plus de la durée de l'impulsion que chez le cerisier Colt, et la croissance maximale était toujours obtenue pour les plus courtes impulsions testées (10  $\mu$ sec), et seulement avec des voltages jusqu'à 750 V stimulant la callogenèse.

### 3.4. Effet de l'électroporation de protoplastes sur la régénération de plantes

Un très net effet du traitement électrique des protoplastes originaux a pu être observé beaucoup plus tard lors de leur culture, pendant l'examen des réponses de régénération de plantes. Une fréquence de régénération significativement plus élevée a été évidente chez les cals dérivés de protoplastes électroporés par rapport à ceux issus de protoplastes témoin. De plus, les bourgeons régénérés à partir des cals issus de certains traitements (i.e. 250 ou 500 V) ont été plus hauts et plus feuillus que les témoins. Par la suite, ceci a permis de les transférer directement sur le milieu d'enracinement sans qu'une phase de croissance intermédiaire soit requise pour induire l'élongation des entrenoeuds.

Les réponses d'enracinement de pousses ont aussi été améliorées pour les tiges dérivées de protoplastes électroporés, avec un maximum (basé sur le nombre de racines par pousse, la longueur totale des racines et un plus bas rapport tige/racine) à 250 et 500 V. De plus, les systèmes racinaires des pousses issues de protoplastes électro-traités étaient ramifiés, à la différence de ceux des pousses dérivées des protoplastes témoin.

Toutes les pousses dérivées de protoplastes électroporés ont été enracinées, tandis que le taux d'enracinement était seulement de 75 % chez les régénérants témoins. Il n'y a pas eu de différence discernable entre les plantes enracinées issues de protoplastes électroporés ou non, ni en terme de leur survie ni de leur croissance après le transfert en serre.

### 3.6. Effet de l'électroporation sur la synthèse de l'ADN chez les protoplastes cultivés (Rech et al, 1988)

Suivant leur électroporation, les protoplastes de *S. dulcamara* et *Prunus* se sont divisés pour la première fois après 3 et 4 jours, tandis que les protoplastes non-traités ont requis au moins 6 et 15 jours avant d'entrer en division. Dans ce contexte, les expériences de marquage pulsé ont montré que l'incorporation maximale de [methyl  $^3\text{H}$ ] thymidine dans le matériel acide précipitable se produisait après 24 h chez *Prunus*, tandis que deux pics d'incorporation maximale se produisaient chez *Solanum*, après 24 et 72 h, en suggérant une oscillation sous-jacente dans le temps de la synthèse d'ADN chez ce dernier. Chez *Prunus*, ceci a représenté une augmentation de 9 fois le niveau de [méthyl  $^3\text{H}$ ] thymidine par rapport à la valeur initiale (tamp 0), qui était réduite à environ 3 fois la valeur initiale après 48 h, et restait inchangée ci-après, jusqu'à 96 h de culture. Par contre, les protoplastes non-traités ont montré une incorporation de [méthyl  $^3\text{H}$ ] thymidine significativement plus basse pendant la même période.

Dans la deuxième série d'expériences, concernant le marquage continu pendant 48 h, les protoplastes de *Prunus* et *Solanum* ont montré des réponses similaires, consistant en une augmentation significative du contenu en [méthyl  $^3\text{H}$ ] thymidine pour les protoplastes électroporés par rapport à ceux non-traités.

Enfin, quand les protoplastes ont été cultivés dans un milieu contenant du DBN, l'incorporation de [méthyl  $^3\text{H}$ ] thymidine a été réduite brutalement chez les protoplastes témoins, tandis que la réduction induite par cet inhibiteur a été négligeable pour les protoplastes électroporés.

### 3.7. Effet dans le long terme de l'électroporation sur l'amélioration de la croissance et de la régénération de plantes à partir de protoplastes de cerisier Colt

La suspension cellulaire initiée à partir de tissus dérivés de protoplastes SCE a eu une vitesse de prolifération beaucoup plus rapide que la suspension cellulaire dérivée de cals issus des protoplastes non-électropulsés (NESC), qui montraient déjà une prolifération plus rapide au stade de cal, avec les phases exponentielles de croissance atteintes après 14 et 21 jours de culture, respectivement.

L'observation des cultures de protoplastes de cerisier Colt pendant les premiers 30 jours de culture, jusqu'au stade de microcal, a montré que l'amélioration de la croissance, résultante de l'électroporation des protoplastes originaux était soutenue même pour des protoplastes isolés à partir de tissus dérivés, eux, de protoplastes électroporés et qui avaient été répiqués pendant un très long temp avant l'isolement (ESC). Ainsi, les protoplastes ESC se sont divisés plus précocement que les protoplastes non-traités (NESC), mais 3-4 jours plus tard que les protoplastes récemment électroporés (RESC).

En ce qui concerne l'efficacité de culture, la fréquence de division a aussi été plus élevée pour les protoplastes ESC, comparée avec celle des protoplastes NESC. La production de cals de 1-2 mm de diamètre a été, elle aussi, plus élevée à partir de protoplastes ESC.

Pendant la culture ultérieure, il y a toujours eu un plus grand nombre de bourgeons régénérés par cal et avec une plus forte fréquence de régénération chez les cals issus de protoplastes ESC, par rapport aux cals issus de protoplastes NESC.

Aucune différence morphologique n'a été constatée entre les plantes enracinées issues de protoplastes des diverses origines, mais le pourcentage d'enracinement était plus fort chez les pousses dérivées de protoplastes ESC que chez celles provenant de protoplastes NESC. Toutes les plantes régénérées ont survécu au transfert en serre.

## DISCUSSION

Les forts voltages et les impulsions longues ont eu un effet significatif de réduction de la viabilité de protoplastes. Un effet similaire avait déjà été observé chez des cellules de mammifères (Chu et al, 1987) et de levures (Hashimoto et al, 1985), et aussi pour des protoplastes de soja (Cutler & Saleem, 1987) et carotte (Bates et al, 1988). De plus, ces observations ont été confirmées lors d'expériences postérieures concernant des protoplastes de *Pennisetum* (Gupta et al, 1988), tabac (Montané, 1989), chrysanthème (Sauvadet, 1992) et orge (Mordhorst & Lorz, 1992).

Sale & Hamilton (1968) et Zimmermann et al (1976) ont rapporté que le champ électrique requis pour provoquer une rupture diélectrique de la membrane était inversement proportionnel à la taille des protoplastes. Des observations similaires ont été effectuées dans ces études, en particulier chez les protoplastes de *Prunus* et *Pyrus*, pour lesquels des dommages généralisés pour tous les protoplastes, indicatif du seuil critique pour la rupture de la membrane, a été évident au-delà de 1250 V. Ceci a été lié à une perméabilité irréversible de la membrane, dérivée probablement de son incapacité pour refermer les électropores formés dans des conditions électriques fortes.

Dans cette étude, les protoplastes électroporés ont régénéré la paroi cellulaire et ils se sont divisés plus rapidement que les protoplastes témoin. Ceci pourrait être dû à un effet de préconditionnement des impulsions électriques sur la perméabilité de la membrane, avec la formation d'ouvertures, de type pore, comme décrit par Neumann & Rosenheck (1972) qui peuvent donc faciliter l'incorporation des composants du milieu. Dans ce contexte, il a été montré que les impulsions électriques stimulent la pénétration des ions (Kinoshita & Tsong, 1977a), et des molécules telles que le  $^{14}\text{C}$ -saccharose (Gordon et al, 1985), l'uréase (Zimmermann et al, 1976), et l'ADN (Neumann et al, 1982) dans des cellules animales. Il est donc envisageable que cette électro-stimulation de la membrane puisse induire une amélioration de la perméabilité de la membrane aussi aux composants du milieu. Alors, de celle-ci résulterait une augmentation de la concentration endogène des régulateurs de la croissance qui, par la suite, expliquerait la plus grande production de microcals et les gains de poids frais plus rapides chez les cals issus de protoplastes électroporés.

Toutefois, les résultats expérimentaux obtenus n'ont pas permis d'écarter la possibilité que les effets observés ne soient que la conséquence d'une incorporation initiale augmentée de phytohormones au stade protoplaste, laquelle aurait pu ensuite assurer un début plus précoce des divisions mitotiques.

L'application de champs électriques à basse intensité et pendant des périodes prolongées a amélioré non seulement la prolifération de cals chez le tabac (Rathore & Goldsworthy, 1985a) mais aussi la régénération de plantes à partir de cals non-différenciés chez le tabac et le blé (Rathore & Goldsworthy, 1985b). Ces auteurs ont attribué les réponses à un meilleur transport polaire de l'AIA entre cellules voisines au sein des tissus stimulés électriquement (Goldsworthy & Rathore, 1985). Plus tard, des observations similaires ont été faites chez *Vigna aconitifolia* (Gill et al, 1988). Or, dans les expériences décrites ici non pas des tissus mais des protoplastes isolés ont été soumis aux électro-traitements. Ainsi, une explication alternative pour les meilleures réponses observées serait que ces protoplastes électroporés auraient acquis un stimulus physiologique pour une meilleure capacité d'assimilation et d'incorporation des composants clés du milieu de culture, et ceci d'une façon continue. De plus, cette capacité accrue étant permanente, elle a dû entraîner des modifications au niveau de la membrane.

La soumission de cellules de hamster chinois à des champs électromagnétiques faibles et discontinus a induit une amélioration de la synthèse de l'ADN pour ces cellules (Takahashi et al, 1986), tandis que des études conduites sur des insectes ont montré que des champs électromagnétiques du même type peuvent jouer un rôle dans le déclenchement de la transcription cellulaire par des modifications du rythme d'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]uridine dans les chromosomes (Goodman et al, 1983). De plus, il a été suggéré qu'il existe un lien possible entre les câbles de haute tension et le cancer (Heucht, 1987) à la suite d'observations faites par Byus et al (1987) montrant que des radiations électromagnétiques de basse énergie, appliquées *in vitro* à des cellules cancéreuses humaines, de rat et de souris peuvent augmenter l'activité de l'enzyme ornithine décarboxylase, qui contrôle la synthèse de la putrescine, une polyamine qui stimule la croissance et la prolifération cellulaires. Dans ce même contexte, les résultats rapportés dans nos systèmes ont montré sans aucun doute une augmentation significative de la synthèse d'ADN chez les protoplastes électroporés (Rech et al, 1988). D'autre part, les expériences utilisant l'inhibiteur de la régénération de la paroi cellulaire DBN ont suggéré que, chez les protoplastes électroporés, ce taux augmenté de synthèse de l'ADN n'est pas nécessairement corrélé avec la

régénération de la paroi cellulaire et donc non plus avec l'éventuel moment du début de la première division mitotique par les cellules issues de protoplastes.

Les résultats des divers expériences concernant l'électromanipulation de protoplastes ont indiqué que l'explication la plus plausible pour les réponses observées se base sur l'amélioration de la synthèse de l'ADN par les protoplastes cultivés suite à leur électroporation, ce qui pourrait entraîner une expression plus précoce des gènes contrôlant la différenciation. En plus, ce phénomène a été accompagné d'une modification permanente de la membrane permettant une capacité soutenue pour une meilleure/plus efficace incorporation des composants du milieu de culture par les protoplastes électromanipulés. Dans ce cadre, la transmission de cette capacité aux tissus dérivés des protoplastes électro-traités pourrait expliquer aussi l'augmentation observée dans la production de biomasse qui a été maintenue pendant toutes les étapes de la culture et qui, enfin, a permis une organogenèse plus précoce et avec un meilleur taux de formation de bourgeons et de leur enracinement ultérieur (Chand et al, 1988; Ochatt et al, 1988a). Les résultats montrant que ces effets sur la division cellulaire et la régénération persistent après plusieurs repiquages chez le cerisier Colt donnent encore plus de poids à ces suggestions (Ochatt et al, 1988b).

L'ensemble des résultats de nos recherches, ainsi que ceux publiés aussi bien pour des cellules animales que végétales discutées dans ce texte suggèrent que les mécanismes sous-jacents à cette électro-stimulation de la croissance peuvent être universels et communs à tous les systèmes biologiques.

L'intérêt de ces traitements électriques pour améliorer les réponses de croissance et de régénération à partir de protoplastes isolés est clairement d'importance pour des systèmes de protoplastes comme ceux que l'on observe dans la majorité des génotypes dits récalcitrants et en particulier pour les espèces ligneuses, où une longue phase de latence avant la première division cellulaire, une efficacité de culture réduite et un potentiel de régénération de bourgeons caulinaires limité associé à un enracinement difficile des bourgeons produits sont tous présents.

L'électroporation telle qu'elle a été employée pour ces études n'est pas nécessairement identique à celle qui sera requise pour la production de plantes transgéniques, étant donné que les voltages utilisés pour stimuler la croissance ont en général été plus faibles que ceux indispensables pour introduire des matériels génétiques dans les protoplastes. Cependant, un effet supplémentaire de l'électroporation (comme employée dans nos études) de grande importance dans le contexte de l'amélioration des plantes, a été fourni par une augmentation significative de la production d'hétérokaryons et une amélioration de leurs réponses pendant la culture permettant la régénération de plantes hybrides somatiques, quand les protoplastes parentaux avaient été électroporés avant leur fusion chimique (Ochatt et al, 1989).

## REFERENCES

- Bates GW, Piastuch W, Riggs CD, Rabussay D (1988) Electroporation for DNA delivery to plant protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 12: 213-218
- Behrens HM, Weisenseel MH, Sievers A (1982) Rapid changes in the patterns of electric current around the root tip of *Lepidium sativum* following gravistimulation. *Plant Physiol* 70: 1079-1083
- Benz R, Zimmermann U (1981) The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown. *Biochim Biophys Acta* 640: 169-178
- Bunning E (1957) Polarität und ungleiche Teilung der pflanzlichen Protoplasten. *Protoplasmatologia* 8: 9a
- Byus CV, Pieper SE, Adey WR (1987) The effects of low energy 60-Hz environmental electromagnetic fields upon the [Aowth-related enzyme ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis* 8: 1385-1389
- Chen TH, Jaffe LE (1979) Forced calcium entry and polarized growth of *Funaria* spores. *Planta* 144: 401-406
- Chand PK, Ochatt SJ, Rech EL, Power JB, Davey MR (1988) Electroporation stimulates plant regeneration from protoplasts of the woody medicinal species *Solanum dulcamara*. *J Exp Bot* 39: 1267-1274
- Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl Acid Res* 15: 1311-1326
- Coster HGL, Zimmermann U (1975) Dielectrical breakdown in the membranes of *Valonia utricularis*. *Biochim Biophys Acta* 382: 410-418
- Crowley JM (1973) Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys J* 13: 711-724
- Cutler AJ, Saleem M (1987) Permeabilizing soybean protoplasts to macromolecules using electroporation and hypotonic shock. *Plant Physiol* 83: 24-28
- Dijak M, Smith DL, Wilson TJ, Brown DCW (1986) Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell Rep* 5: 468-470
- Fromm ME, Taylor LP, Walbot V (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by

electroporation. *Nature* 319: 791-793

Galbraith DW, Shields BA (1982) The effects of inhibitors of cell wall synthesis on tobacco protoplast development. *Physiol Plant* 55: 25-30

Gill R, Mishra KP, Rao PS (1987) Stimulation of shoot regeneration of *Vigna aconitifolia* by electrical control. *Ann Bot* 60: 399-403

Goldsworthy A, Rathore KS (1985) The electrical control of growth in plant tissue cultures: the polar transport of auxin. *J Exp Bot* 36: 1134-1141

Goodman R, Bassett CAL, Henderson AS (1983) Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription. *Science* 220: 1283-1285

Gordon PB, Tolleshaug H, Seglen PO (1985) Use of digitonin extraction to distinguish between autophagic-lysosomal sequestration and mitochondrial uptake of [<sup>14</sup>C]sucrose in hepatocytes. *Biochem J* 232: 773-780

Gupta HS, Rech EL, Cocking EC, Davey MR (1988) Electroporation and heat shock stimulate division of protoplasts of *Pennisetum squamulatum*. *J Plant Physiol* 133: 457-459

Hammatt N, Kim HI, Davey MR, Nelson RS, Cocking EC (1987) Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Glycine canescens* and *G. clandestina*. *Plant Sci* 48: 129-135

Hashimoto H, Morikawa H, Yamada Y, Kimura A (1985) A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* 21: 336-339

Heucht J (1987) Cell tests suggest link between cables and cancer. *New Scientist* 116: 28

Hibi T, Kano H, Sugiura M, Kazami T, Kimura S (1986) High efficiency electro-transfection of tobacco mesophyll protoplasts with tobacco mosaic virus RNA and cucumber mosaic virus RNA. *Plant Cell Rep* 5: 57-60

Kinosita K, Tsong TY (1977a) Hemolysis of human erythrocytes by a transient electric field. *Proc Nat Acad Sci USA* 74: 1923-1927

Kinosita K, Tsong TY (1977b) Formation and resealing of pores of controlled size in human erythrocyte membrane. *Nature* 268: 438-441

Kinosita K, Tsong TY (1977c) Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 471: 227-242

Langridge WHR, Li BJ, Szalay AA (1985) Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA. *Plant Cell Rep* 4: 355-359

Lindner P, Neumann E, Rosenheck K (1977) Kinetics of permeability changes induced by electric impulses in chromaffin granules. *J Membrane Biol* 32: 231-254

Lund EJ (1923) Electrical control of organic polarity in eggs of *Fucus*. *Bot Gaz* 76: 288-301

Montané MH (1989) Approche biophysicochimique de la transformation directe de protoplastes végétaux par des champs électriques pulsés: cas du tabac. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 359 pp

Mordhorst AP, Lorz H (1992) Electrostimulated regeneration of plantlets from protoplasts derived from cell suspensions of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol Plant* 85: 289-294

Morikawa H, Iida A, Matsui C, Ikegami M, Yamada Y (1986) Gene transfer into plant cells by electroinjection through cell walls and membranes. *Gene* 41: 121-124

Neumann E, Rosenheck K (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membrane. *J Membrane Biol* 10: 279-290

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845

Nishiguchi M, Langridge WHR, Szalay AA, Zaitlin M (1986) Electroporation-mediated infection of tobacco leaf protoplasts with tobacco mosaic virus RNA and cucumber mosaic virus RNA. *Plant Cell Rep* 5: 57-60

Nishiguchi M, Sato T, Motoyoshi F (1987) An improved method for electroporation in plant protoplasts: Infection of tobacco protoplasts by tobacco mosaic virus particles. *Plant Cell Rep* 6: 90-93

Novak B, Bentrup FW (1972) An electrophysiological study of regeneration in *Acetabularia mediterranea*. *Planta* 108: 227-244

Ochatt SJ, Cocking EC, Power JB (1987) Isolation, culture and plant regeneration of Colt cherry (*Prunus avium x pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Sci* 50: 139-143

Ochatt SJ, Power JB (1988) Rhizogenesis in callus from Conference pear (*Pyrus communis* L.) protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 13: 159-164

Ochatt SJ, Chand PK, Rech EL, Davey MR, Power JB (1988a) Electroporation-mediated improvement of plant regeneration from Colt cherry (*Prunus avium x pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Sci* 54: 165-169

Ochatt SJ, Rech EL, Davey MR, Power JB (1988b) Long-term effects of electroporation on enhancement of growth and plant regeneration of Colt cherry (*Prunus avium x pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Cell Rep* 7: 393-395

Ochatt SJ, Patat-Ochatt EM, Rech EL, Davey MR, Power JB (1989) Somatic hybridization of sexually incompatible top-fruit tree rootstocks: wild pear (*Pyrus communis* var *pyraster* L.) and Colt cherry (*Prunus avium x pseudocerasus*). *Theor Appl Genet* 78: 35-41

Ochatt SJ, Patat-Ochatt EM, Power JB (1992) Protoplasts. In: *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*;

eds FA Hammerschlag, R Litz. CAB International, Oxford, pp 77-103

Okada K, Nagata T, Takebe I (1986) Introduction of functional RNA into plant protoplasts by electroporation. *Plant Cell Physiol* 27: 619-626

Rathore KS, Goldsworthy A (1985a) Electrical control of growth in plant tissue cultures. *Biotechnology* 3: 253-254

Rathore KS, Goldsworthy A (1985b) Electrical control of shoot regeneration in plant tissue cultures. *Biotechnology* 3: 1107-1109

Rech EL, Ochatt SJ, Chand PK, Power JB, Davey MR (1987) Electroenhancement of division of plant protoplast-derived cells. *Protoplasma* 141: 169-176

Rech EL, Ochatt SJ, Chand PK, Mulligan BJ, Davey MR, Power JB (1988) Electroporation increases DNA synthesis in cultured plant protoplasts. *Biotechnology* 6: 1091-1093

Sale AJH, Hamilton WA (1968) Effects of high-electric fields on micro-organisms. *Biochim Biophys Acta* 163: 427-434

Sauvadet MA (1992) Développement de la technologie des protoplastes pour l'étude de la variation protoclonale et de la transformation génétique directe chez le chrysanthème. Thèse de Doctorat, Université de Paris-Sud, 176 pp

Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Portrykus I (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotechnology* 5: 1099-1103

Takahashi K, Kaneko I, Date M, Fukada E (1986) Effects of pulsing electromagnetic fields on DNA synthesis in mammalian cells in culture. *Experientia* 42: 185-186

Tanada T, Vinten-Johansen C (1980) Gravity induces fast electrical field changes in soybean hypocotyls. *Plant Cell Environ* 3: 127-130

Weisenseel MH, Dorn A, Jaffe LF (1979) Natural H<sup>+</sup> currents traverse growing roots and root hairs of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol* 64: 512-518

Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47: 189-194

Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F (1974) Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J* 14: 881-899

Zimmermann U, Pilwat G, Beckers F, Riemann F (1976) Effects of external dielectric fields on cell membranes. *Bioelectrochem Bioenerg* 3: 58-83