

# OPTIMISATION DES CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENES A PARTIR DE CALS D'APEX CAULINAIRE DE MIL (*Pennisetum glaucum* (L.) R.)

K. TIECOURA<sup>1</sup>, A. B. KOUASSI<sup>1</sup>, O. N'NAN-ALLA<sup>1</sup>, M. DINANT<sup>2</sup> et L. LEDOU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Génétique, UFR Biosciences, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire. E-mail : nanoulo@yahoo.fr

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire, Département de Botanique, Université de Liège, Sart Tilman, B22, B-4000 Liège, Belgique

## RESUME

L'isolement de protoplastes en vue de la régénération de plantes transgéniques chez les monocotylédones dépend de la qualité des suspensions cellulaires embryogènes. Ce travail a pour objectif d'établir les conditions optimales d'établissement de suspensions cellulaires embryogènes régénérables en plantes pour permettre une transformation génétique ultérieure. Ce travail réalisé, pour la première fois, sur des variétés de *Pennisetum glaucum* de Côte d'Ivoire, a révélé les facteurs qui influent sur l'établissement et la croissance des suspensions cellulaires embryogènes à partir de cals d'apex caulinaires. En effet, l'établissement de suspensions cellulaires embryogènes a été obtenu au bout de 8 semaines, lorsque la première filtration a été faite après 2 semaines et que les amas de cals ont été broyés à chaque filtration. En début de culture, lorsque le volume du milieu de culture a été faible (30 ml), la croissance de la suspension cellulaire embryogène a été d'autant meilleure que l'intervalle de temps entre les subcultures a été plus court (3 jours). Inversement, un intervalle de temps plus long (6 jours) entre les subcultures s'est montré meilleur pour de grands volumes de milieu de culture (60 ml). La croissance de la suspension cellulaire embryogène a été comparable sur les deux milieux de culture utilisés (MS et N6).

**Mots clés :** *In vitro*, suspension cellulaire, cal embryogène, *Pennisetum glaucum*, Côte d'Ivoire.

## ABSTRACT

EFFICIENT CONDITIONS FOR ESTABLISHING EMBRYOGENIC CELL SUSPENSIONS DERIVED FROM STEM APEX CALLUS  
IN PEARL MILLET (*pennisetum glaucum* (L.) R.)

*Isolation of protoplasts for the regeneration of transgenic monocotyledonous plants depends on the quality of embryogenic cell suspensions. This work aims to establish the optimal conditions for the establishment of regenerable embryogenic cell suspensions of plants to enable further genetic transformation. This work released for the first time, on varieties of *Pennisetum glaucum* from Côte d'Ivoire revealed the factors that influence the establishment (the date of the first filtration and the grinding of the callus) and the growth (the mass of the initial heap of callus, the volume of the culture medium and the time interval between subcultures) of embryogenic cell suspensions derived from stem apex callus. It appears that the establishment of embryogenic cell suspension is obtained after 8 weeks when the first filtration takes place after two weeks and heaps of callus are ground at each filtration. During the first days of culture, when the volume of the culture medium is low (30 ml), the growth of embryogenic cell suspension is better if the time interval between the subcultures is shorter (3 days). Conversely, a longer period of time (6 days) between subcultures is needed for larger volumes of culture medium (60 ml). The growth of embryogenic cell suspension is similar on both culture media used (MS and N6).*

**Keywords :** *Tissue culture, embryogenic cell suspension, callus, *Pennisetum glaucum*, Côte d'Ivoire.*

## INTRODUCTION

L'isolement de protoplastes en vue de la régénération de plantes transgéniques chez les monocotylédones dépend de la qualité des suspensions cellulaires embryogènes. En effet, les suspensions cellulaires embryogènes sont aussi utilisées comme cibles pour la transformation des céréales par bombardement de particules enrobées d'ADN. Les premières suspensions cellulaires de monocotylédones ont été obtenues par Wilmar *et al.* (1968) à partir d'hypocotyle d'*Asparagus officinalis*. Ces auteurs ont montré que la capacité de régénération de plantes à partir des suspensions cellulaires est fonction du temps de culture de la suspension. Depuis ces travaux, de nombreuses études portant sur la régénération de plantes issues de suspensions cellulaires ont été rapportées chez d'autres monocotylédones. Il s'agit de :

- 1) embryons immatures et jeunes inflorescences de *Panicum maximum* (Lu *et al.*, 1981 ; Gnanapragasam *et al.*, 1992) et de *Zea mays* (Kamo *et al.*, 1986 ; Shillito *et al.*, 1989).
- 2) embryons matures de *Hordeum vulgare* (Sharma *et al.*, 2005)
- 3) jeunes feuilles de *Saccharum officinarum* (Wai-Jane Ho *et al.*, 1983 ; Ramagopal, 1991).
- 4) bases de feuilles de *Oryza sativa* (Sahrawat *et al.*, 2001, Mohana *et al.*, 2011) et blé (Haliloglu, 2006)
- 5) racines et apex caulinaires de *Oriza sativa* (Zimny *et al.*, 1986 ; Arockiasamy et Ignacimuthu, 2007).
- 6) des graines et des inflorescences de *Triticum aestivum* (Karp *et al.*, 1987 ; Mejza *et al.*, 1993 ; Winfield *et al.*, 1993).
- 7) inflorescences et jeunes feuilles de semis de *Paspalum scrobiculatum* âgées d'une semaine (Naya *et al.*, 1989).

En ce qui concerne le mil, *Pennisetum glaucum* ou *Pennisetum americanum*, des plantes ont été régénérées avec des suspensions cellulaires obtenues à partir d'embryons immatures ou matures, de la base de jeunes feuilles et d'inflorescences (Vasil et Vasil (1981, 1982) ; Vasil (1994) ; Taylor *et al.*, (1993) ; Oldach *et al.* (2001) ; Arockiasamy *et al.* (2006) ; Jha *et al.* (2009)).

Des transformations génétiques du mil ont aussi été réalisées par bombardement de particules enrobées d'ADN sur des suspensions cellulaires issues de cals d'apex caulinaires (Lambé *et al.*, 1995 ; 2000) ; Devi *et al.* (2000) ; Goldman *et al.* (2003) et de cals de mésocotyles (Sharma, 2005). Sharathchandra *et al.* (2006) ont en outre utilisé des jeunes semis pour établir des suspensions cellulaires, dans le cadre de l'étude de la résistance du mil au champignon *Clerospora graminicola* (Sacc.) Schroet.

Dans les travaux susmentionnés, l'apex caulinaire n'est généralement pas l'explant utilisé et, lorsque c'est le cas (Lambé *et al.*, 1995 ; 2000), l'établissement des suspensions cellulaires n'a pas fait l'objet d'étude approfondie dans la mesure où l'objectif principal était la transformation génétique du mil.

Dans le présent travail, nous étudions, pour la première fois, et sur des variétés de *Pennisetum glaucum* de Côte d'Ivoire, les facteurs influençant l'établissement des suspensions cellulaires et les conditions optimales de croissance de ces suspensions cellulaires issues de cals d'apex caulinaires.

## MATERIEL ET METHODES

### MATERIEL VEGETAL

Des méristèmes apicaux caulinaires isolés de la variété Nord-Est (Variété NE) de *Pennisetum glaucum* ont été utilisés comme explants. Cette variété a été sélectionnée pour ses qualités organoleptiques et agro-morphologiques à partir de variétés cultivées au Nord-Est de la Côte d'Ivoire. L'isolement des explants et l'induction de la callogenèse ont été faits selon le protocole décrit par Tiécoura *et al.* (2003). Les cals embryogènes obtenus ont été utilisés pour l'établissement de la suspension cellulaire.

### METHODES

Les cals de 150 et 300 mg ont été, pour ce faire, placés dans un Erlenmeyer de 250 ml. Trente et soixante millilitres de milieu de Murashige et Skoog (MS) ou du milieu N6 additionné de 2,4-D (Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) (1 à 2 mg/l) ont été ajoutés. Le mélange ainsi obtenu a été placé sur un agitateur rotatif et soumis à une rotation de 120 à 150 t/min.

Les subcultures ont été faites tous les trois jours, soit en diluant 5 à 15 ml de la suspension cellulaire dans du milieu MS frais (Lu *et al.*, 1981 ; Vasil et Vasil, 1982), soit en ajoutant du milieu MS frais au culot, après avoir vidé le surnageant, à la suite d'un repos d'environ 30 secondes ou après une légère centrifugation.

La subculture a été ainsi poursuivie jusqu'à ce que la suspension cellulaire soit embryogène à près de 80 %.

#### PARAMETRES MESURES

##### Effet de la date de la 1<sup>ère</sup> filtration

Quinze (15) suspensions cellulaires ont été initiées avec 250 mg de cals chacune dans 30 ml de milieu MS(2), c'est-à-dire, 30 ml prélevés d'une solution d'un litre de milieu MS additionné de 2 mg de 2,4 D.

Chaque semaine, trois suspensions cellulaires ont été choisies pour leur première filtration sur un tamis de 630 µm de diamètre de maille. Les cals de taille inférieure à 630 µm ont été utilisés pour continuer la culture. Trois suspensions cellulaires non filtrées ont servi de témoins à chaque filtration.

##### Effet du broyage des amas cellulaires

Quinze (15) suspensions cellulaires ont été initiées puis filtrées dans les mêmes conditions que précédemment. Cependant, les cals ont été préalablement broyés dans un mortier avant la mise en culture. Des cals n'ayant pas subi de broyage ont servi de témoins.

##### Croissance en fonction de la masse de l'amas de cal initial

Six amas de cals (trois de 150 mg et trois de 300 mg), provenant de suspensions cellulaires embryogènes, ont été placés chacun dans un Erlenmeyer (250 ml) et complétés avec 30 ml de milieu MS(2) nouvellement préparé. Tous les 3 jours, après une légère centrifugation de chaque Erlenmeyer, le culot a été pesé à l'aide d'une balance de précision et 30 ml de milieu MS(2) nouvellement préparé ont été ajoutés au culot. Pour le témoin (300 mg de cals), le même milieu MS(2) de départ a été remis dans le culot après la pesée.

Le taux de croissance des suspensions cellulaires a été alors calculé comme suit :

Soit  $M_i$  la masse de la suspension cellulaire à la subculture "i" et  $M_{i-1}$  la masse de la suspension cellulaire à la subculture "i - 1". Le taux de croissance relatif (TC) de la subculture «i - 1» à la subculture «i», est égal à :

$$\frac{(M_i - M_{i-1}) \times 100}{M_{i-1}}$$

Soit  $M_0$  la masse de l'amas de cal initial, le taux de croissance relatif à la 1<sup>ère</sup> subculture est égal à :

$$\frac{(M_1 - M_0) \times 100}{M_0}$$

##### Croissance en fonction du volume du milieu de culture

Trois amas de cals embryogènes, de 300 mg chacun, ont été utilisés pour initier individuellement des cultures cellulaires dans respectivement 30 ml et 60 ml de milieu MS(2). A chaque subculture, tous les 3 jours, le culot de chaque suspension cellulaire a été pesé à l'aide d'une balance de précision, après une légère centrifugation. Les taux de croissances des suspensions cellulaires, d'une subculture à la suivante, ont été alors calculés.

##### Croissance en fonction de la date de subculture

Trois amas de cals embryogènes, de 300 mg chacun, ont été utilisés pour initier individuellement des cultures cellulaires dans respectivement 30 ml et 60 ml de milieu MS(2). La subculture a été faite tous les 6 jours et le culot de chaque suspension cellulaire a été pesé à l'aide d'une balance de précision, après une légère centrifugation. Les taux de croissances des suspensions cellulaires, d'une subculture à la suivante, ont été alors calculés.

##### Croissance en fonction du type de milieux de culture de la suspension cellulaire

Trois amas de cals embryogènes, de 300 mg chacun, ont été utilisés pour initier des cultures cellulaires dans respectivement 30 ml de milieu MS(2) et 30 ml de milieu N6(2). A chaque subculture, tous les 3 jours, le culot de chaque suspension cellulaire a été pesé à l'aide d'une balance de précision, après une légère centrifugation. Les taux de croissances des suspensions cellulaires, d'une subculture à la suivante, ont été alors calculés.

## ANALYSE DES DONNEES

Sur la période de temps séparant deux subcultures successives, la vitesse de division cellulaire a été estimée à travers le taux de croissance relatif de la masse de chaque suspension cellulaire. En effet, le taux de croissance relatif est d'autant plus élevé que les cellules se divisent plus vite sur la période de temps considérée.

Soit  $TC_1$  et  $TC_2$  (tels que  $TC_2 > TC_1$ ), deux taux de croissance relatifs donnés, sur deux périodes de temps différentes pour la même suspension cellulaire ou pour deux suspensions cellulaires différentes pendant la même période de temps.  $TC_1$  et  $TC_2$  ont été comparés sur la base de leur rapport (coefficient multiplicateur) noté  $CM_{1,2}$ .  $CM_{1,2} = TC_2/TC_1$ , et on en conclut que  $TC_2$  est  $CM_{1,2}$  fois plus élevée que  $TC_1$  ou réciproquement,  $TC_1$  est  $CM_{1,2}$  fois plus faible que  $TC_2$ .

## RESULTATS

### CONDITIONS D'ETABLISSEMENT D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE EMBRYOGENE

#### Effet de la date de la première filtration

Les données de la suspension cellulaire témoin ont montré que, sans filtration, il n'y a pas d'établissement de cellules embryogènes en quatre mois de culture.

Lorsque la 1<sup>ère</sup> filtration est intervenue pendant les deux premières semaines de culture, les

cellules filtrées et mises en culture sont toutes mortes et ne sont pas devenues embryogènes. Lorsque la 1<sup>ère</sup> filtration a été faite à partir de la 3<sup>e</sup> semaine de culture, la suspension cellulaire est devenue embryogène. Par ailleurs, les cellules embryogènes n'ont été observées qu'à partir de la 16<sup>e</sup> semaine de culture. après 2 semaines de culture, la suspension cellulaire embryogène est établie d'autant plus tôt que la 1<sup>ère</sup> filtration intervient plus tard. En effet, lorsque la 1<sup>ère</sup> filtration intervient à la 3<sup>e</sup> semaine de culture, la suspension cellulaire embryogène est établie (plus de 80 % de cellules embryogènes) en 16 semaines (4 mois) de culture. Par contre, lorsque la 1<sup>ère</sup> filtration intervient à la quatrième semaine de culture, la suspension cellulaire embryogène est établie en 12 semaines (3 mois) de culture (Tableau 1).

#### Effet du broyage des amas cellulaires

Le tableau 2 présente l'effet du broyage des amas cellulaires sur l'établissement de la suspension cellulaire embryogène. Les données obtenues sur le témoin ont montré que, malgré le broyage des calcs, sans filtration, en quatre mois de culture, la suspension cellulaire embryogène n'est pas établie. Lorsque la 1<sup>ère</sup> filtration intervient au terme de la première semaine de culture, les cellules filtrées et mises en culture meurent toutes et ne peuvent devenir embryogènes. La suspension cellulaire embryogène a été établie (plus de 80 % de cellules embryogènes) en 8 semaines (2 mois) même si la 1<sup>ère</sup> filtration intervient à la 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> semaine de culture.

**Tableau 1** : Effet de la date de la 1<sup>ère</sup> filtration sur l'établissement de la suspension cellulaire embryogène.

*Effects of the date of the first filtration on the establishment of embryogenic cell suspension*

Date de la 1 <sup>ère</sup> filtration (semaines)	Âge de la suspension cellulaire (en semaines)						
	1	2	3	4	8	12	16
1	-	n	n	n	n	n	n
2	-	-	n	n	n	n	n
3	-	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	+	+
Témoin non filtré	-	-	-	-	-	-	-

n = nécrose des cellules ; - = moins de 30 % de cellules embryogènes ; + = plus de 80 % de cellules embryogènes

n = necrosis of the cells ; - = less than 30 % of embryogenic cells ; + = more than 80 % of embryogenic cells

**Tableau 2** : Effet du broyage des amas de cals sur l'établissement de la suspension cellulaire embryogène.*Effects of the grinding of heaps of callus on the establishment of embryogenic cell suspension.*

1 <sup>ère</sup> filtration (semaines)	Âge de la suspension (semaines)						
	1	2	3	4	8	12	16
1	-	n	n	n	n	n	n
2	-	-	-	-	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+	+
Témoin	-	-	-	-	-	-	-

n = nécrose des cellules ; - = moins de 30 % de cellules embryogènes ; + = plus de 80 % de cellules embryogènes.

n = necrosis of the cells ; - = less than 30 % of embryogenic cells ; + = more than 80 % of embryogenic cells.

## CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE

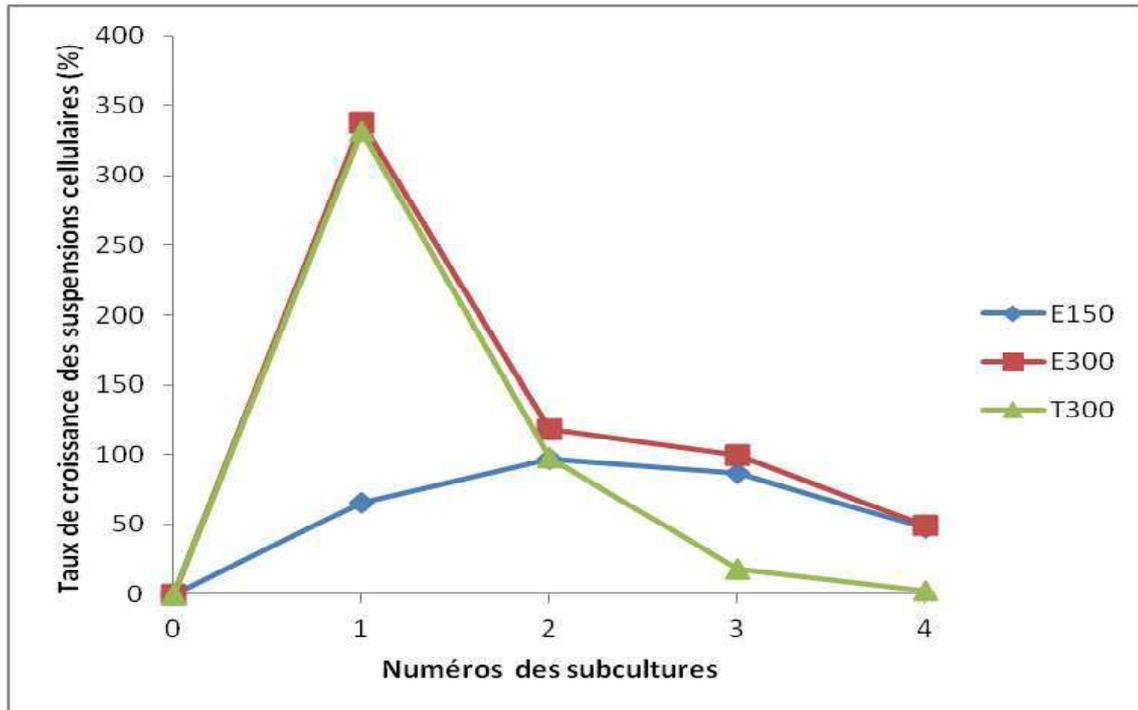
### Croissance en fonction de la masse de l'amas de cals initial

La Figure 1 présente l'évolution du taux de croissance des suspensions cellulaires, d'une subculture à la suivante, pour chacune des deux masses (150 et 300 mg) d'amas de cals initial.

Pour les deux essais, E150 et E300 (masse de l'amas de cals initial égale respectivement à 150 et 300 mg ; milieu de culture renouvelé à chaque subculture) les taux de croissance des suspensions cellulaires n'ont été significativement différents qu'à la 1<sup>ère</sup> subculture (pendant les trois 1<sup>ers</sup> jours de culture). En effet, la suspension cellulaire initiée à partir d'un amas de cals de 300 mg a présenté une croissance 5,12 fois plus élevée que celle de la suspension cellulaire initiée à partir d'un amas de cals de 150 mg (respectivement 338 et 66 % de taux de croissance). De la 1<sup>ère</sup> à la 2<sup>e</sup> subculture (du 3<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> jour de culture) les taux de croissances

des suspensions cellulaires ont convergé vers 100 %, indépendamment de la masse de l'amas de cals initial (respectivement 96,78 % et 117,58 % pour les amas de cals de 150 mg et 300 mg). De la 2<sup>e</sup> à la 4<sup>e</sup> subculture (du 6<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> jour de culture), les taux de croissance des suspensions cellulaires ont baissé globalement et sont devenus quasiment identiques (respectivement 47,55 % et 49,03 % pour les amas de cals de 150 mg et 300 mg).

De la 1<sup>ère</sup> à la 2<sup>e</sup> subculture, le non renouvellement du milieu de culture n'a pas affecté le taux de croissance des suspensions cellulaires. En effet, les données obtenues sur le Témoin T300 (masse de l'amas de cals initial égale à 300 mg ; milieu de culture de départ conservée pour toutes les subcultures) ont été assez semblables à ceux de l'essai E300 (respectivement 97,68 % et 117,58 % ; CM = 1,2). Cependant aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> subcultures (après respectivement 9 et 12 jours de culture), les taux de croissance des suspensions cellulaires ont été significativement plus faibles sur le témoin T300 comparativement aux essais E150 et E300.



**Figure 1** : Évolution du Taux de croissance des suspensions cellulaires dans 30ml du milieu de culture MS(2) pour chacune des deux masses (150 et 300mg) d'amas de cals initial.

*Evolution of the growth rate of cell suspensions in 30 ml of MS(2) culture medium for each of the two weights (150 and 300mg) of clusters of initial callus.*

Légende :

E150 et E300 (Essais) : masse de l'amas de cals initial égale respectivement à 150 et 300 mg ; milieu de culture renouvelé à chaque subculture.

T300 (Témoin) : masse de l'amas de cals initial égale à 300 mg ; milieu de culture de départ conservé pour toutes les subcultures.

Milieu de culture MS(2) = Milieu de Murashige et Skoog additionné de 2,4-D à 2mg/l.

E150 and E300 (Tests) : weight of the initial heap of callus equal respectively to 150 and 300 mg ; culture medium renewed at each subculture.

T300 (Control) : weight of the initial heap of callus equal to 300 mg ; initial culture medium preserved for all subcultures.

MS (2) culture medium : Murashige and Skoog medium supplemented with 2.4-D 2mg/l.

### Croissance en fonction du volume du milieu de culture et de l'intervalle de temps entre subcultures

La figure 2 donne l'évolution du taux de croissance des suspensions cellulaires pour deux intervalles de temps (3 et 6 jours) entre subcultures et dans deux volumes (30 et 60ml) du milieu de culture MS(2).

Sur la figure 2a, on remarque qu'à la 1<sup>ère</sup> et à la 2<sup>e</sup> subculture (entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>e</sup> jour et entre le 3<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour de culture respectivement), la croissance de la suspension cellulaire est respectivement 2,36 et 1,27 fois plus forte dans 30 ml que dans 60 ml du milieu de culture MS(2) (respectivement 319 % contre 135,33 % et 162,53 % contre 128,47 %). Cependant les taux de croissance des suspensions cellulaires sont devenus quasi-similaires dans les deux volumes

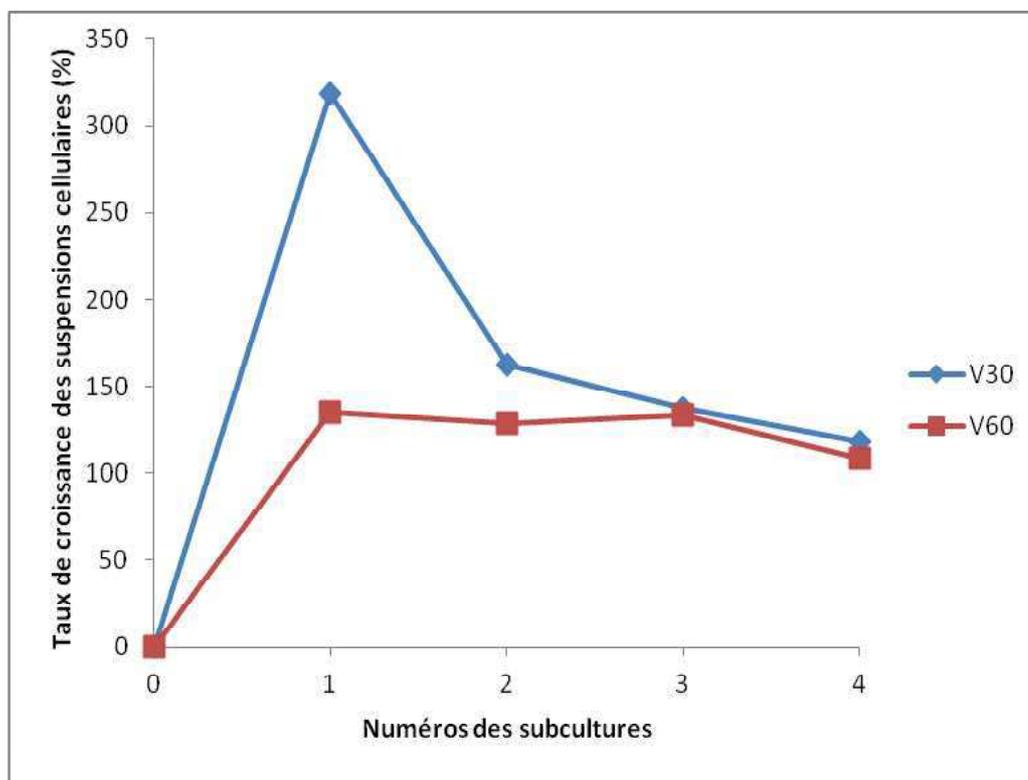
du milieu de culture MS(2), respectivement 137,64 % contre 133,91 % et 118,21 % contre 108,98, à la 3<sup>e</sup> et à la 4<sup>e</sup> subculture (entre le 6<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> et entre le 9<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour de culture respectivement).

Dans 30ml du milieu de culture MS(2), le taux de croissance de la suspension cellulaire a chuté rapidement de la 1<sup>ère</sup> à la 4<sup>e</sup> subculture (de 319 % à 118,21 %). Dans 60 ml du milieu de culture MS(2), le taux de croissance de la suspension cellulaire est resté quasi-stable de la 1<sup>ère</sup> à la 3<sup>e</sup> subculture (de 135,33 % à 133,91 %) puis a chuté légèrement entre la 3<sup>e</sup> et la 4<sup>e</sup> subculture (de 133,91 % à 108,98 %).

Sur la figure 2b, on remarque qu'à la 1<sup>ère</sup> et à la 2<sup>e</sup> subculture (entre le 1<sup>er</sup> et le 6<sup>e</sup> jour et entre le 6<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour de culture respectivement), la croissance de la suspension cellulaire est

respectivement 2,35 et 1,38 fois plus forte dans 60 ml que dans 30 ml du milieu de culture MS(2) (respectivement 1462 % contre 623 % et 133,8 % contre 96,82 %). Cependant les taux de croissance des suspensions cellulaires sont devenus similaires dans les deux volumes du milieu de culture MS(2), respectivement

13,17 % contre 14,04 % à la 3<sup>e</sup> subculture (entre le 12<sup>e</sup> et le 18<sup>e</sup> jour de culture). Dans 30 ml et 60 ml du milieu de culture MS(2), le taux de croissance de la suspension cellulaire a chuté très rapidement de la 1<sup>ère</sup> à la 2<sup>e</sup> subculture (respectivement de 6,43 et 10,93 fois) et de la 2<sup>e</sup> à la 3<sup>e</sup> subculture (respectivement de 6,89 et 10,16 fois).



**Figure 2a** : Évolution du taux de croissance des suspensions cellulaires pour 3 jours d'intervalle entre subcultures et dans deux volumes (30 et 60ml) du milieu de culture MS(2)

*Evolution of the growth rate of cell suspensions for 3 days interval between subcultures and in two volumes (30 and 60ml) of MS(2) culture medium.*

Légende : V30 = Volume du milieu de culture égal à 30ml ; V60 = Volume du milieu de culture égal à 60ml ; Milieu de culture MS(2)= Milieu de Murashige et Skoog additionné de 2,4-D à 2 mg/l

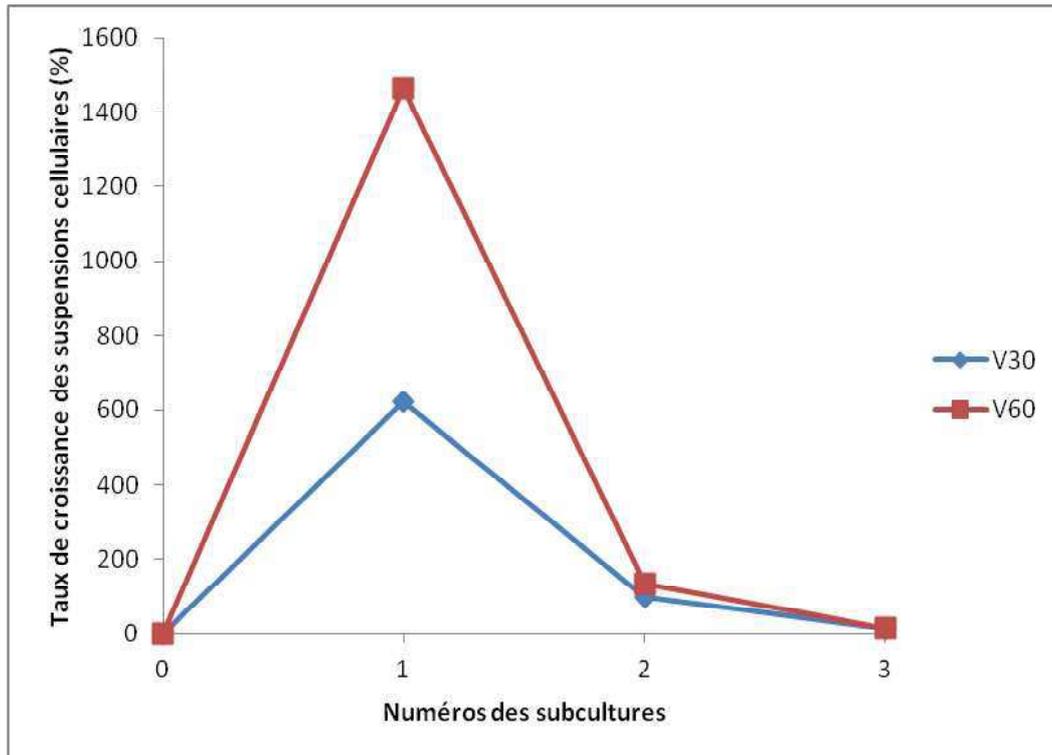
V30 = volume of culture medium equals to 30 ml ; V60 = volume of culture medium equals to 60ml.

MS (2) culture medium: Murashige and Skoog medium supplemented with 2.4-D 2 mg/l.

### Croissance en fonction du type de milieu de culture de la suspension cellulaire

La figure 3 présente l'évolution du taux de croissance des suspensions cellulaires pour chacun des deux milieux de culture MS(2) et N6(2). Il apparaît qu'à la 1<sup>ère</sup> subculture (pendant les 3<sup>es</sup> jours de culture), la croissance de la suspension cellulaire a été 1,23 fois plus forte

dans le milieu de culture N6(2) que dans le milieu de culture MS(2), soit 393 % contre 319 %. Cependant les taux de croissance des suspensions cellulaires ont baissé rapidement et sont devenus quasi-similaires dans les deux milieux de culture MS(2) et N6(2) de la 2<sup>e</sup> à la 4<sup>e</sup> subculture (du 6<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> jour de culture) soit respectivement 162,53 % contre 157,81 et 118,21 % contre 127,26 %.



**Figure 2b** : Évolution du Taux de croissance des suspensions cellulaires pour 6 jours d'intervalle entre subcultures et dans deux volumes (30 et 60ml) du milieu de culture MS(2).

*Evolution of the growth rate of cell suspensions for 6 days interval between subcultures and in two volumes (30 and 60ml) of MS(2) culture medium.*

Légende : V30 = Volume du milieu de culture égal à 30 ml ; V60 = Volume du milieu de culture égal à 60 ml ; Milieu de culture MS(2) = Milieu de Murashige et Skoog additionné de 2,4-D à 2mg/l.

V30 = volume of culture medium equals to 30 ml ; V60 = volume of culture medium equals to 60 ml ; MS(2) culture medium: Murashige and Skoog medium supplemented with 2,4-D 2mg/l.

## DISCUSSION

### ETABLISSEMENT DE LA SUSPENSION CELLULAIRE EMBRYOGENE

Une suspension cellulaire est dite embryogène, selon Vasil et Vasil (1981 ; 1982), lorsqu'elle est formée à près de 80 % de petits groupes de cellules à cytoplasme dense très riche en grains d'amidon avec de nombreuses petites vacuoles. Cette suspension est composée de peu de grandes cellules, de formes diverses, avec de larges vacuoles et pauvres en grains d'amidon selon El Mtili (1990).

Sans filtration, la suspension cellulaire embryogène n'est pas établie au bout de quatre mois de culture. Au cours des deux premières semaines, il n'y a pas suffisamment de micro-cals détachés dans le milieu de culture pour assurer les divisions cellulaires. C'est ce qui

expliquerait la nécrose de la suspension cellulaire lorsque la 1<sup>ère</sup> filtration intervient dans les deux premières semaines de culture. Après deux semaines, il y a suffisamment de micro-cals détachés dans le milieu de culture pour l'établissement de la suspension cellulaire embryogène. La suspension cellulaire embryogène peut s'établir en trois mois lorsque la 1<sup>ère</sup> filtration intervient au plus tôt à la fin de la 3<sup>e</sup> semaine de culture. Il faut par contre plus de quatre mois de culture lorsque la suspension cellulaire n'est pas filtrée. Tout se passe comme si, en absence de filtration, les gros cals ayant servi à l'initiation de la suspension cellulaire relâcheraient difficilement les micro-cals embryogènes et empêcheraient leur développement rapide.

Lorsque les gros cals sont préalablement broyés, la 1<sup>ère</sup> filtration efficace pour l'établissement de la suspension cellulaire embryogène se situe au terme de la 2<sup>e</sup> semaine de culture.

Le temps d'établissement de la suspension cellulaire embryogène est par ailleurs réduit et passe de trois à deux mois. Nous pensons que le broyage permet de relâcher rapidement une importante quantité de micro-cals pour un établissement rapide de la suspension cellulaire embryogène. L'établissement de la suspension cellulaire embryogène en deux mois représente un temps de culture très court par rapport aux 9 mois rapporté chez le riz (Dayuan Wang *et al.*, 1989).

#### CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE EMBRYOGENE

Pendant les 3<sup>er</sup> jours de culture, la suspension cellulaire initiée à partir d'un amas de cals de 300 mg (essai E300) présente une croissance 5 fois plus rapide que celle de la suspension cellulaire initiée à partir d'un amas de cals de 150 mg (essai E150) ; soit respectivement 338 % et 66 % de taux de croissance. Ces données montrent que, en début de culture, plus la densité des cellules est forte (au moins jusqu'à une densité limite), plus la vitesse de croissance de la suspension cellulaire est élevée. Le rapprochement des cellules dans le milieu de culture induirait donc des mécanismes communicationnels favorables à la division cellulaire. Cependant, la grande densité de cellules dans le milieu de culture entraîne son épuisement beaucoup plus rapide. C'est ce qui explique, dans l'essai E300, la très forte chute de la vitesse de croissance de la suspension cellulaire de la 1<sup>ère</sup> à la 2<sup>e</sup> subculture (respectivement 338 % et 117,98 % de taux de croissance). A l'opposée, la densité n'est pas saturante dans la suspension cellulaire de l'essai E150 et la vitesse de croissance augmente de la 1<sup>ère</sup> à la 2<sup>e</sup> subculture (respectivement 66 % et 96,78 % de taux de croissance). Par ailleurs, de la 2<sup>e</sup> à la 4<sup>e</sup> subculture (du 6<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> jour de culture), la culture cellulaire témoin T300 (suspension cellulaire initiée à partir d'un amas de cals de 300 mg et milieu de culture non renouvelée) présente une croissance qui est très faible et tend à s'arrêter comparativement aux essais E300 et E150. Ces résultats sont en accord avec ceux de Naya *et al.* (1989), qui ont montré que la croissance rapide des cellules non embryogènes serait à l'origine de l'épuisement du milieu de culture et la stagnation de la croissance de la culture dans le cas des suspensions cellulaires de *Paspalum scrobiculatum*. Après le 3<sup>e</sup> jour de culture, les

vitesse de croissance des deux suspensions cellulaires E300 et E150 deviennent similaires et sont décroissantes, malgré le renouvellement du milieu de culture à chaque subculture. Ces résultats peuvent s'expliquer par un encombrement stérique dû à la saturation progressive du milieu de culture en cellules qui meurent naturellement par apoptose (mort cellulaire programmée).

L'utilisation de deux volumes différents de milieu de culture MS(2) fait encore ressortir la déterminante influence de la densité de cellules sur la vitesse de croissance de la suspension cellulaire pendant la 1<sup>ère</sup> semaine de culture. En effet, à la 1<sup>ère</sup> comme à la 2<sup>e</sup> subculture, soit jusqu'au 6<sup>e</sup> jour de culture, pour la même masse de 300 mg de l'amas de cals initiateur, la croissance de la suspension cellulaire est plus importante dans 30 ml que 60 ml de milieu de culture MS(2) (respectivement 319 % contre 135,33 % de croissance pendant les trois 1<sup>ers</sup> jours de culture et 162,53 % contre 128,47 % de croissance entre le 3<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour de culture).

Les masses de la culture stagnent après le 12<sup>e</sup> jour de culture si le temps de subculture passe à 6 jours au lieu de 3. Comme précédemment, l'épuisement du milieu expliquerait la stagnation du poids après 12 jours. Cet épuisement est plus rapide dans les 30 ml de milieu de culture. Un encombrement cellulaire pourrait aussi expliquer cette baisse rapide de la croissance dans les 30 ml. Le temps de subculture qui peut être d'une semaine dans le cas de la culture en milieu solide (Tiécoura *et al.*, 2003, Sharma *et al.*, 2005) est limitant dans le cas de la suspension cellulaire. Ce temps relativement long fait baisser à moins de 50 % l'état embryogène de la culture.

Dans l'ensemble, sur la période de culture de 12 jours, les deux milieux N6(2) et MS(2) présentent des effets similaires sur la croissance des suspensions cellulaires. Cependant, le milieu N6(2) apparaît légèrement plus favorable pendant les trois 1<sup>ers</sup> jours de culture. Cette similarité entre ceux deux milieux présente un intérêt certain en ce sens qu'ils sont beaucoup utilisés pour la culture des protoplastes de graminées. Dans la présente étude, la concentration de 2 mg/l de 2,4 D est privilégiée pour la simple raison que c'est la meilleure concentration pour la croissance et le maintien de l'embryogénie. A partir de 5 mg/l, le 2,4 D devient toxique et bloque la croissance (Tiécoura *et al.*, 2003). Des concentrations plus élevées allant jusqu'à 15 mg/l de 2,4 D ont été utilisées

par Goldman *et al.* (2003), Sharma *et al.* (2005), Jha *et al.* (2009). Ces fortes concentrations de 2,4 D pourraient cependant entraîner des variations somaclonales et affecter la qualité des plantes régénérées.

## CONCLUSION

Au terme de cette étude, il apparaît que :

- L'apex caulinaire de *Pennisetum glaucum* peut être utilisé comme explant pour établir des suspensions cellulaires embryogènes au même titre que les embryons immatures et les inflorescences de graminées.

- L'établissement de la suspension est obtenu au bout de 12 semaines sans broyage lorsque la première filtration intervient après deux semaines de culture. Ce délai peut être réduit à 8 semaines si les amas de cals sont broyés à chaque filtration.

- Pendant les 3 premiers jours de culture, la suspension cellulaire embryogène initiée à partir d'un amas de cals de 300 mg présente une croissance 5 fois plus élevée que celle de la suspension cellulaire initiée à partir d'un amas de cals de 150 mg.

- En début de culture, plus la densité des cellules est forte (au moins jusqu'à une densité limite), plus la vitesse de croissance de la suspension cellulaire est élevée. En effet lorsque le volume du milieu de culture est faible (30 ml), la croissance de la suspension cellulaire embryogène est d'autant plus meilleure que l'intervalle de temps entre les subcultures est plus court (3 jours). Inversement un intervalle de temps plus long (6 jours) entre les subcultures est nécessaire pour des plus grands volumes de milieu de culture (60 ml).

- La croissance de la suspension cellulaire embryogène est similaire sur les deux milieux de culture utilisés (MS et N6).

## REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire et du F.R.F. (2.4518.93). Toute notre reconnaissance au CNRA pour le matériel végétal.

## REFERENCES

- Arockiasamy S., Rami S., Sahaya I. S., Melchias S. and G. Bajra. 2006. Efficient protocols for *in vitro* regeneration of *Pennisetum glaucum* (L.) Br. Indian J. E. Biol. 9 : 757 - 761
- Arockiasamy S. and S. S. Ignacimuthu. 2007. Regeneration of transgenic plants from two indica rice (*Oriza sativa* L.) cultivars using shoot apex explant. Plant Cell Rep. 26 (10) : 1745 - 1753
- Devi P., Zhong H. and M. B. Sticklen. 2000. *In vitro* morphogenesis of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) : efficient production of multiple shoots and inflorescences from shoot apices. Plant Cell Rep. 19 (6) : 546 - 550
- El Mtili N. 1990. Embryogenèse somatique et culture de cellules et de protoplastes chez le mil (*Pennisetum americanum* L.). Thèse de doctorat. Université d'Orsay (France), 137 p.
- Gnanaprasam S. and I. K. Vasil. 1992. Ultrastructural changes in suspension culture cells of *Panicum maximum* during cryopreservation. Plant Cell Rep. 11 : 169 - 174.
- Goldman J. J., Hanna W. W., Fleming G. and P. Ozias-Akins. 2003. Fertile transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. Br.) plants recovered through microprojectile bombardement and phosphinotricin selection of apical meristem- inflorescence- and immature- embryos derived embryogenic tissue. Plant Cell Rep. 21 (10) : 999 - 1009.
- Haliloglu K. 2006. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. Biol. Plant. 50 : 326 - 330
- Jha P., Yadav C. B., Anjalah V. and V. Bhat. 2009. *In vitro* plant regeneration through somatic embryogenesis and direct shoot organogenesis in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 45 : 145 - 154.
- Kamo K. K. and T. K. Hodges. 1986. Establishment and characterization of long-term embryogenic maize callus and cell suspension cultures. Plant Sci. 45 : 111 - 117.
- Karp A., Wu Q. S., Steele S. H. and M. G. K. Jones. 1987. Chromosome variation in dividing protoplasts and cell suspension of wheat. Theor. Appl. Genet. 74 : 140 - 146.
- Lambé P., Dinant M. and R. F. Matagne. 1995. Differential long-term expression and

- methylation of the hygromycin phosphotransferase (hph) and  $\beta$ -glucuronidase (GUS) genes in transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum*) callus. *Plant Sci.* 108 (1) : 51 - 62.
- Lambé P., Mutambel H. S. N., Deltour R. and M. Dinant. 1999. Somatic embryogenesis in pear millet (*Pennisetum glaucum*) : Strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency. *Plant cell, Tissue Organ Cult.* 55 : 23 - 29.
- Lambé P., Dinant M. and R. Deltour. 2000. Transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. Br.). *Biotech. In Agriculture and Forestry.* 46 : 84 - 108
- Lu C. and I. K. Vasil. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely - suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq. *Ann. Bot.* 48 : 543 - 548.
- Mohana P. A., Karutha P. S. and M. Ramesh. 2011. Efficient *in vitro* plant regeneration through leaf base derived callus cultures of abiotic stress sensitive popular Asian Indica rice cultivar IR64 (*Oryza sativa*). *Acta Biol. Hung.* 62 (4) : 441 - 452
- Naya P and S. K. Sen. 1989. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of a minor millet, *Paspalum scrobiculatum*. *Plant Cell Rep.* 8 : 296 - 299.
- Oldach K. H., Morgenstern A., Rother S. and M. Girgi. 2001. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Cell Rep.* 20 : 416 - 421.
- Ramagopal S. and J. B. Carr Usda-Ars. 1991. Sugarcane proteins and messenger RNAs regulated by salt in suspension cells. *Plant Cell Environ.* 14 : 47 - 56.
- Sharathchandra R. G., Geetha N. P., Amruthesh K. N., Ramachandra K. K., Sarosh B. R., Shetty N. P. and H. S. Shetty. 2006. Isolation and characterisation of a protein elicitor from *Sclerospora graminicola* and elicitor-mediated induction of defence responses in cultured cells of *Pennisetum glaucum*. *Funct. Plant Biol.* 33 (3) : 267 - 278
- Sharma V. K., Hansch R., Mendel R. R and J. Schulze. 2005. Mature embryogenesis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 56 (417) :1913 - 1922
- Shillito R. D., Carswell G. K., Johnson C. M., Dimalo J. and C. T. Harms. 1989. Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Biotechnology.* 7 : 581 - 587.
- Taylor M. G., Vasil V. and I. K. Vasil. 1993. Enhanced Gus gene expression in cereal grass cell suspension and immature embryos using the maize Uhiquitin-based plasmid pAHc25. *Plant Cell Rep.* 12 (9) : 491 - 495.
- Tiéécoura K., Ledoux L. and M. Dinant. 2003. Plant regeneration through tissue culture of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R.). *Agronomie Africaine.* 15(3) : 105 - 121.
- Vasil V. and I. K. Vasil. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Ann. Bota.* 47 : 669 - 678.
- Vasil V. and I. K. Vasil. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, Gramineae). *Amer. J. Bota.* 69 : 1441 - 1449.
- Vasil I. K. 1994. Molecular improvement of cereals. *Plant Mol. Biol.* 25 : 925 - 937
- Wai-Jane H. O. and I. K. Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L) : growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bota.* 51 : 719 - 726.
- Wihmar C. and M. Hellendoorn. 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro*. *Nature.* 217 : 369 - 370.
- Winfield M., Daavey M. R. and A. Karp. 1993. A comparison of chromosome instability in cell suspensions of diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Heredity.* 70 : 187 - 194.
- Zimny J. and H. Lörz. 1986. Plant regeneration and initiation of cell suspensions from root-tip derived callus of *Oryza sativa* L. (rice). *Plant Cell Rep.* 5 : 89 - 92.