

Recherches récentes et biotechnologies de la multiplication végétative

Georges Ducreux, Jacques De Buyser, Valérie Dodeman,
Robert Haïcour, Danièle Lavergne, Aimé Nato, Aïcha Ouichou,
Emmanuel Picard, Darashin Sihachakr

Les plantes peuvent réaliser deux modalités de propagation : la reproduction sexuée et la multiplication végétative. Cette dernière caractéristique est liée au fait que les processus de morphogenèse ne sont pas restreints, comme chez l'animal, au développement embryonnaire : ils sont transférés, à un stade précoce de l'embryogenèse, aux méristèmes, populations cellulaires complexes qui conservent, tout au long de la vie de la plante, la capacité de se diviser, d'initier la différenciation, d'établir une organogenèse permanente [1]. Lorsque les bourgeons axillaires, qui contiennent chacun une copie du méristème caulinaire principal, sont séparés naturellement ou artificiellement de la plante mère, ils peuvent, sous réserve d'enracinement, reproduire une plante identique à la plante d'origine. Cette multiplication végétative peut être un moyen efficace de dispersion dans l'espace, dans la mesure où les conditions écologiques le permettent. Les deux formes de reproduction, sexuée et végétative, ont été utilisées empiriquement par l'homme ; en effet, si la base de notre alimentation repose sur les céréales, les plantes à multiplication végétative (et plus parti-

culièrement les plantes à tubercule) jouent un rôle clé dans l'alimentation vivrière [2]. Par ailleurs, les techniques de bouturage et de greffage sont classiquement utilisées en horticulture et en arboriculture.

Plus récemment, le développement des techniques de cultures *in vitro* et des biotechnologies cellulaires associées a complètement renouvelé l'approche de la multiplication végétative. Ainsi la micropropagation *in vitro* a bouleversé les stratégies de multiplication clonale, ne serait-ce que pour l'assainissement viral des plantes vivrières. La mise au point de milieux de culture artificiels et de possibilités de plus en plus performantes d'aseptisation des explants a permis une meilleure exploitation de la plasticité du génome végétal. En effet, la ou les cellules végétatives somatiques peuvent se différencier et donc être à l'origine de nouveaux programmes de développement, ceci dans le cadre de l'ontogenèse normale, ou dans un contexte artificiel comme base des manipulations biotechnologiques cellulaires. À ce sujet, la possibilité de retour à un état de totipotence permet la réalisation d'une embryogenèse somatique ; il s'agit là d'une des particularités les plus originales de l'ontogenèse végétale.

À partir des caractéristiques de la multiplication végétative, cet article dégage, au travers des apports récents des biotechnologies, les nouvelles possibilités d'exploitation ainsi que les limites et les voies à explorer en vue de leur adéquation aux objectifs de l'amélioration des plantes.

Utilisation traditionnelle et signification de la multiplication végétative

Rappel de quelques idées

Les plantes sont caractérisées entre autres par l'existence de méristèmes, populations cellulaires complexes conservant tout au long de la vie de l'organisme végétal des caractères embryonnaires. Dans ce contexte, on doit distinguer les méristèmes caulinaires, responsables de la construction de la tige, et les méristèmes racinaires. En dehors du fait qu'ils conduisent à des organes différents, ces méristèmes primaires ne fonctionnent pas de la même façon. Le méristème caulinaire est responsable de la construction de l'appareil aérien (grâce à la production de nouvelles cellules qui vont croître et se différencier) mais aussi, par l'intermédiaire de l'organogenèse : formation de feuilles et bourgeons axillaires pendant la période végétative. Il est essentiel de noter que ces organes sont initiés à partir du méristème primordial, de façon itérative, en unités modulaires identiques : entrenœud-nœud - feuille-bourgeon axillaire [3]. Ce mode de fonctionnement prend toute sa valeur dans un contexte de multiplication végétative

G. Ducreux, J. De Buyser, V. Dodeman,
R. Haïcour, D. Lavergne, A. Nato, A. Ouichou,
E. Picard, D. Sihachakr : Morphogenèse végé-
tale expérimentale, Université de Paris-Sud
XI, Bâtiment 360, 91405 Orsay cedex, France.

Tirés à part : G. Ducreux

Enjeux des recherches fondamentales

où chaque bourgeon axillaire, copie conforme du méristème principal, est à même de réaliser, de façon itérative, le même mode de fonctionnement. On dispose donc chez les plantes d'un potentiel « infini » de reproduction de l'appareil aérien et, par conséquence et sous réserve d'enracinement, de multiplication conforme d'un génotype.

Le méristème racinaire de son côté est à l'origine de l'appareil souterrain. Occupant l'autre extrémité de l'axe embryonnaire, il met donc en place une racine en continuité avec l'axe caulinaire. En dehors de cette spécificité, son rôle est restreint à la production de nouvelles cellules permettant la croissance et la différenciation. La production de racines latérales est complètement dissociée de la croissance : elles sont néoformées au travers d'un processus complexe de dédifférenciation. Cette particularité est le deuxième fondement de la multiplication végétative. Le méristème caulinaire produit de façon itérative un nombre infini de copies ; la néoformation de racines adventives (figure 1), qui intervient également sur la tige, permet de réaliser la copie fonctionnelle de la plante d'origine, après séparation.

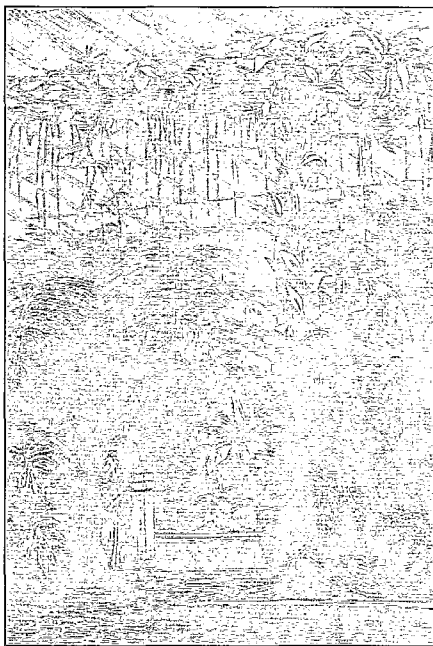


Figure 1. Racines adventives de la vanille dans les serres du Jardin des Plantes de Paris (d'après Figuier [4]).

Figure 1. Adventitious vanilla roots in greenhouses at the Jardin des Plantes in Paris.

Intérêt de la multiplication végétative

Multiplication végétative naturelle

La multiplication végétative est répandue dans tout le règne végétal. Cette modalité particulière de reproduction apparaît corrélée à deux données de base.

- ° Les végétaux sont enracinés, c'est-à-dire fixés au substrat, et leur propagation ne peut se faire qu'à partir de ce point d'attache. La croissance modulaire répond à cette nécessité. La production redondante d'une même unité de base permet une croissance indéfinie et autorise, dans le cadre de la multiplication végétative, la colonisation de nouveaux espaces, la spécialisation (polymorphisme des rameaux) et même, à la lumière des informations récentes, la construction de la fleur [3].

- ° La plante, à la différence de la majorité des animaux, ne possède pas de lignée germinale. Sa reproduction sexuée n'est donc pas inscrite automatiquement dans le déroulement de son ontogenèse. Elle est la conséquence de la transformation du méristème sous l'influence de signaux externes relayés par une cascade de signaux internes. Si les signaux initiateurs de la floraison sont absents, la plante ne fructifiera pas et, dans ces conditions, la multiplication végétative peut être un moyen de pérenniser l'individu ou l'espèce [5].

La multiplication végétative naturelle est très répandue chez les plantes. Différents dispositifs morphologiques permettent l'efficacité de ce processus mais il est important aussi de rappeler quelques observations débouchant sur des conséquences pratiques : la nécessité d'un enracinement adventif déjà évoqué ; l'éloignement et, à terme, la séparation du pied mère qui modifient les corrélations physiologiques (figure 2) ; l'importance des besoins nutritifs de la bouture naturelle qui conduit à associer fréquemment multiplication végétative et tubérisation (figure 3) ; et enfin, sur le plan génétique, trois aspects importants : l'aptitude spécifique à la multiplication végétative (naturelle ou provoquée), la conformité à la plante de départ, mais aussi la possibilité de variations qui peuvent être maintenues durablement [6].

Toujours dans le cadre naturel, deux autres points méritent d'être évoqués.

- ° Si, dans la grande majorité des cas, la multiplication végétative est consécutive à l'isolement d'un méristème préexistant, il existe quelques exemples de néoformation de plantes à partir des tissus somatiques, les plus connus étant les bégonia et les kalanchoé.

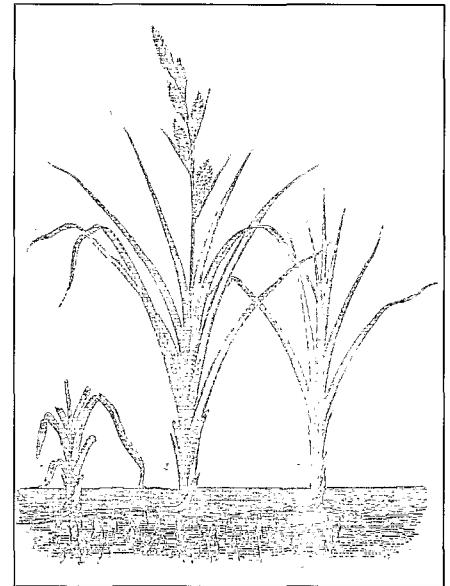


Figure 2. Multiplication végétative du *Carex* (d'après Figuier [4]).

Figure 2. *Carex* clonal propagation.

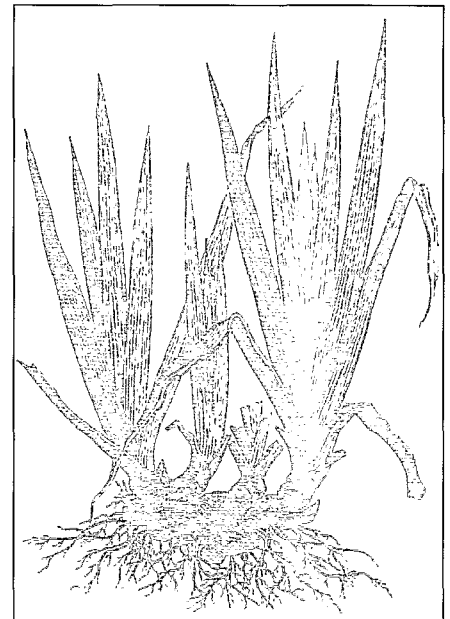


Figure 3. Tige souterraine tubérisée d'*Iris germanica* (d'après Figuier [4]).

Figure 3. Stem tubers of *Iris germanica*.

- ° La plante peut, au travers de certaines modalités de l'apomixie, réaliser des copies conformes de l'individu de départ en l'absence de fécondation, par l'intermédiaire d'une graine morphologiquement et physiologiquement construite comme la semence sexuée [7].

Exploitation de la multiplication végétative par l'homme

L'exploitation de la multiplication végétative est certainement très ancienne, dès le néolithique [8], puisque vraisemblablement liée à la récolte des tubercules. Quel que soit l'organe d'origine (tubercule, tige ou racine), elle est toujours associée à l'existence de bourgeons axillaires ou adventifs permettant la multiplication. Par exemple, la patate douce, tubercule strict de racine, est apte à développer une nouvelle tige à partir de bourgeons préexistants ou néoformés (figure 4). Cette utilisation empirique a probablement été rapidement relayée grâce à l'observation de tubérisations spontanées (donc de « multiplication » de la partie directement exploitée pour la nourriture), comme chez la pomme de terre.

De telles observations ont vraisemblablement conduit aux notions de marcottage, bouturage, puis ultérieurement de greffe. En particulier, au XIX^e siècle, l'essor de la floriculture et de l'arboriculture fruitière surtout a conduit les professionnels, comme les amateurs, à explorer toutes les subtilités et astuces de ces modes de multiplication (figure 5).

Que sait-on maintenant : multiplication végétative modernisée ou redécouverte ?

Jusqu'à une époque relativement récente, l'exploitation de la multiplication végétative est restée inscrite dans un cadre traditionnel. Plusieurs données nouvelles en ont changé l'approche.

Évolution des méristèmes au cours du cycle de développement

Les modules mis en place par le méristème caulinaire, dès la fin de l'embryogenèse [1, 5], sont identiques dans leur construction (entre-nœud, nœud, feuille, bourgeon axillaire) mais différents sur les plans morphologique et physiologique. La phase de jeunesse, qui suit la germination, est souvent caractérisée par la mise en place de feuilles

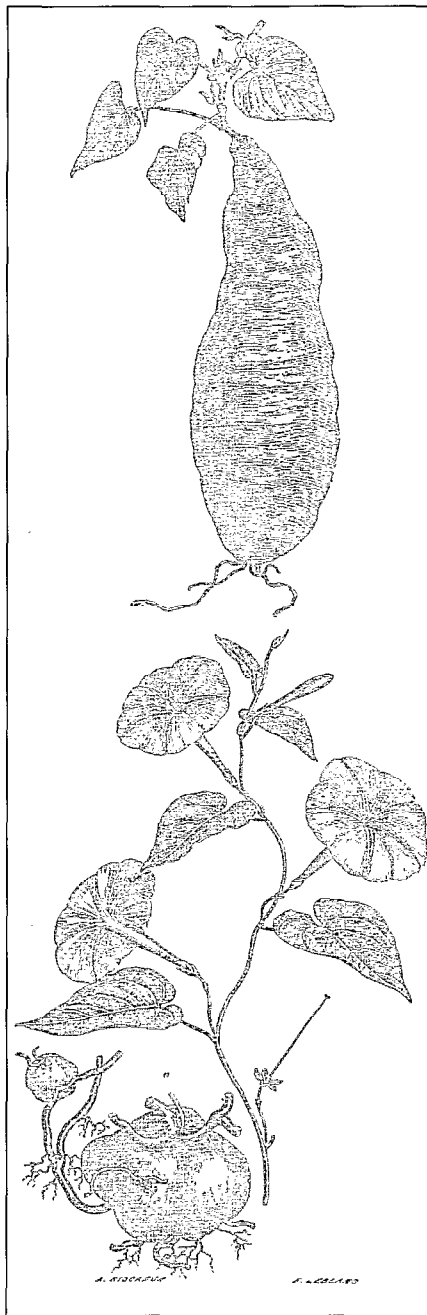


Figure 4. De la multiplication végétative naturelle à son exploitation par l'homme. En bas, *Ipomoea purga*, le jalap officinal ; en haut, *Ipomoea batatas*, la patate douce cultivée (d'après Constantin [9]).

Figure 4. Examples of natural and artificial clonal propagation. Below, *Ipomoea purga*, a medicinal plant ; above, *Ipomoea batatas*, the sweet potato.

à morphologie particulière. Mais surtout, les portions de tiges prélevées à ce niveau manifestent des aptitudes bien meilleures au bouturage et à la régénération. Ensuite prend place le développement de l'appa-

reil végétatif caractéristique de l'espèce, forme des feuilles, rameaux spécialisés... Cette modification est particulièrement évidente chez les plantes à rameaux dimorphes, le caféier par exemple, dont seuls les rameaux plagiotropes portent des fleurs. Il existe d'autres modifications physiologiques, moins directement observables, qui se traduisent par des perturbations plus ou moins importantes de l'efficacité de la multiplication végétative.

Les remaniements physiologiques profonds, liés à l'installation de la floraison, permettent de revenir à l'état initial non seulement par l'intermédiaire de la graine, mais aussi par l'intermédiaire de modifications des propriétés physiologiques de bourgeons situés à ce niveau qui peuvent, de nouveau, manifester des propriétés juvéniles. La connaissance de l'évolution des méristèmes au cours du développement a pu ainsi être mise à profit soit dans le cadre de l'amélioration de l'efficacité du bouturage, soit pour provoquer la néo-formation de bourgeons, soit encore pour favoriser l'enracinement.

Le schéma évoqué ci-dessus peut être plus ou moins profondément modifié en fonction de la longévité de la plante et des conditions environnementales. C'est particulièrement évident pour les arbres, où la longévité et le très grand nombre de bourgeons vont conduire à des situations d'une grande complexité, tandis que des corrélations vont s'établir entre les différents méristèmes existants. Chaque bourgeon (ou module), en fonction de sa position sur l'arbre, de son environnement externe ou interne, des inhibitions ou incitations corrélatives auxquelles il est soumis, aura sa propre histoire et pourra exprimer un programme morphogénétique particulier. Un méristème caulinaire, tout en conservant ses capacités d'organogenèse de base (c'est-à-dire la production répétitive de nouvelles unités fonctionnelles), peut perdre au cours du temps ou en fonction de sa localisation topographique certaines des propriétés morphologiques qui caractérisent un méristème prélevé au stade juvénile.

Ces modifications sont mises en évidence dans le cadre de la multiplication végétative. Le bouturage à partir de bourgeons ontogénétiquement vieux se traduit par une limitation et, fréquemment, par une perte de l'aptitude à l'enracinement, une faible vigueur et le maintien de morphologies particulières. Cela a deux conséquences sur le plan pratique : soit l'impossibilité de multiplier végétativement des arbres adultes ou âgés, soit la production de plantes ne présentant pas le même phénotype que celles

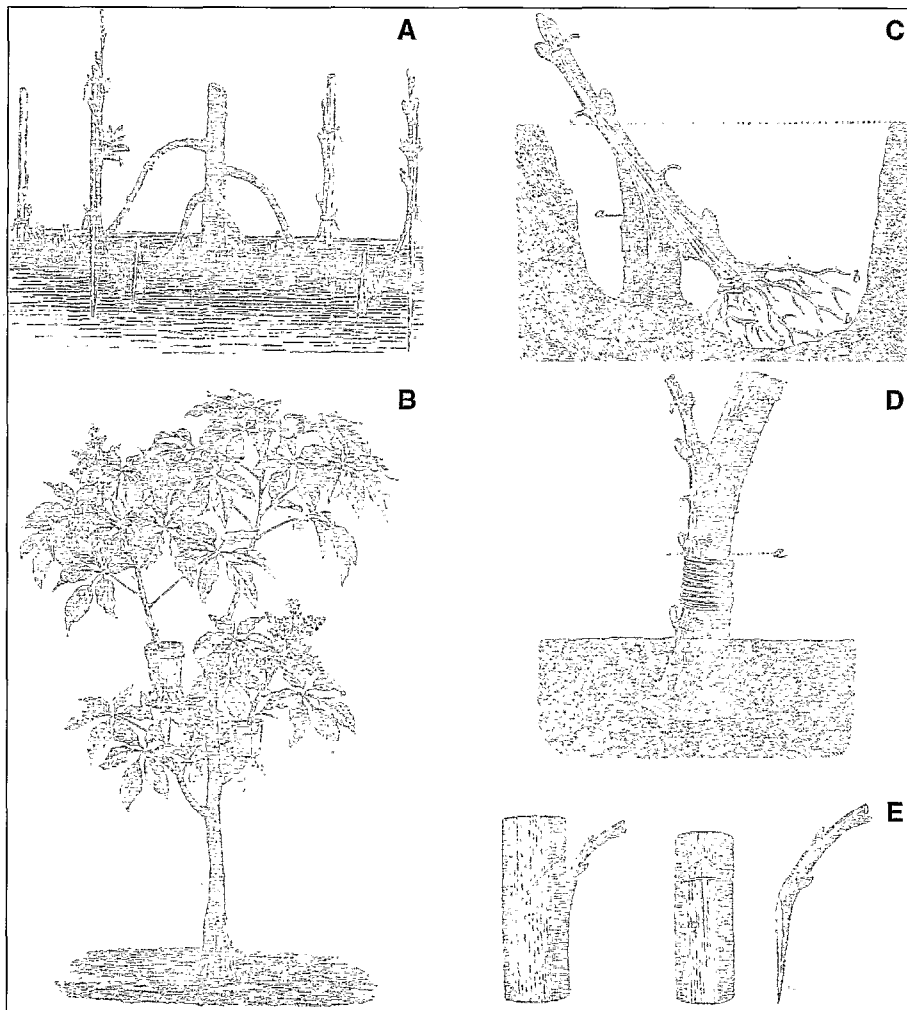


Figure 5. Exemples de pratiques de la multiplication végétative en arboriculture fruitière. **A** : marcottage par inclinaison ; **B** : marcottage par élévation (d'après Figuier [4]) ; **C** : greffe en fente - bouture ; **D** : greffe-bouture ; **E** : greffe dite « Girardin » (d'après Gressent [10]).

Figure 5. Some clonal propagation methods for fruit trees. **A** and **B** : examples of runner formation [4] ; **C** : to **E** : different kinds of graft.

issues de graines. Ces situations, et c'est là une autre particularité du végétal, ne sont pas irréversibles. On peut expérimentalement rétablir, au niveau des méristèmes prélevés sur des arbres très âgés, des conditions d'une expression physiologique juvénile. La rupture des corrélations physiologiques (taillages brutaux, recépages fréquents...) ou la modification drastique des conditions environnementales (enceintes contrôlées, maintien *in vitro*...) peuvent favoriser ce phénomène. Ces manipulations restent cependant encore largement empiriques. Ainsi, pour réussir le bouturage d'individus âgés de *Sequoia sempervirens*, on greffe, en culture *in vitro*, des bourgeons inaptes au bouturage sur des porte-greffes juvéniles issus de la germination de graine. La greffe est répétée en renouvelant le porte-greffe [11]. Les mécanismes

impliqués, qui restent méconnus, peuvent conduire à la réussite de la multiplication végétative d'arbres anciens. Les travaux actuels dans ce domaine portent sur la recherche de marqueurs biochimiques ou moléculaires qui permettent d'identifier ou de caractériser les états juvéniles ou sénescents, pour un choix plus rationnel des explants à bouturer ou pour suivre leur évolution en fonction des contraintes expérimentales [12].

Ontogenèse, filiation et régulation

Beaucoup de problèmes résultent du manque de connaissance des mécanismes du fonctionnement des méristèmes, dont l'or-

ganisation cellulaire intégrée est particulièrement complexe. Des voies nouvelles ont été ouvertes par l'approche génétique et il convient, là aussi, de distinguer le méristème caulinaire du méristème racinaire.

Le méristème caulinaire est mis en place à un stade précoce de l'embryogenèse, au stade cordiforme ; des travaux initiés sur *Arabidopsis* (mais commençant à s'étendre à d'autres plantes) montrent que sa spécification et son fonctionnement auto-entretenu sont sous la dépendance d'un certain nombre de gènes qui commencent à être identifiés (figure 6) et qui contrôlent deux grands types de fonction.

° La spécification du méristème : elle est faite au stade embryonnaire, sous la dépendance du gène *shootmeristemless* [13]. Chez les mutants, l'ensemble des cellules du méristème est mis en place mais leur état indifférencié n'est pas maintenu. Il est important de souligner que les tissus des mutants *shootmeristemless* sont inaptes à néo-former des méristèmes apicaux en culture *in vitro*. Cette observation est à rapprocher du fait que fréquemment, les embryons somatiques, tout en présentant un phénotype normal, sont incapables de former une tige. Le contrôle de la spécification des cellules méristématiques est également sous la dépendance du gène *knotted 1* qui est impliqué dans le maintien de l'état indifférencié des cellules méristématiques. On doit y ajouter le rôle du gène *clavata 1* qui contrôle le nombre de cellules indifférenciées impliquées donc la taille du méristème et, par voie de conséquence, la fréquence et la localisation des organes (figure 6) [14-16].

° La spécification de l'identité foliaire : au niveau de chaque module mis en place par le méristème, il s'agit de définir les territoires respectifs de la feuille et du bourgeon axillaire. Ce rôle revient en particulier au gène *knotted 1* déjà évoqué. Des expériences d'expression *in situ* ont montré que le gène n'est exprimé qu'au niveau du corpus du méristème et à l'exclusion des territoires d'émergence des primordiums foliaires. En complément, le gène *wuschel* délimite la superficie respective de la zone centrale du méristème et de la zone périphérique impliquée dans l'initiation des feuilles [17, 18]. Ces données font bien ressortir que la mise en place et l'identité du méristème caulinaire sont étroitement contrôlées au niveau génétique et que ces mécanismes sont à prendre en compte dans le cadre de la néo-formation des bourgeons.

Le méristème racinaire est également mis en place à un stade très précoce de l'embryogenèse, généralement avant le méristème caulinaire. Il est d'organisation beaucoup

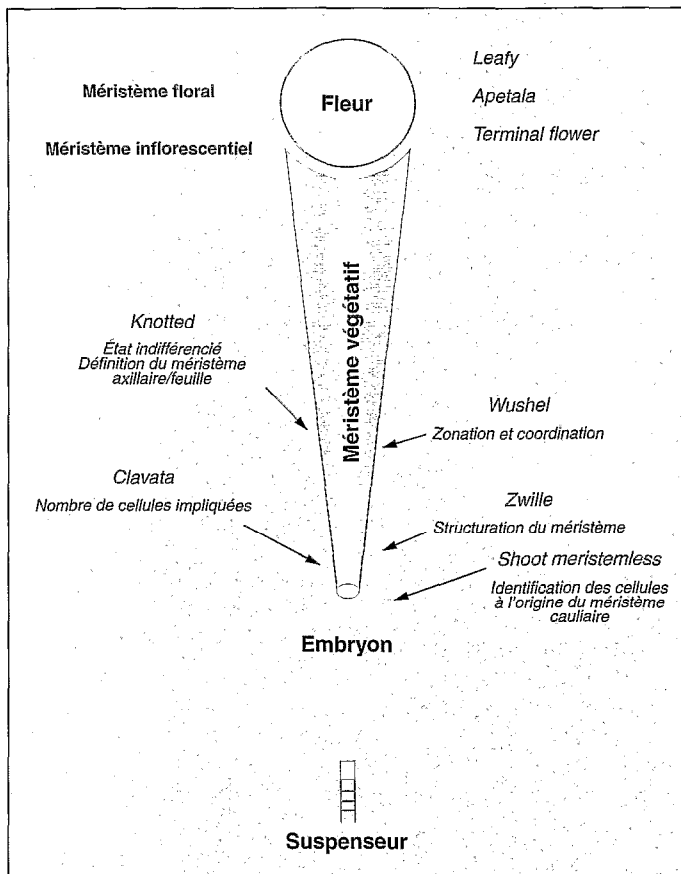


Figure 6. Représentation schématique des contrôles génétiques impliqués dans la mise en place et le fonctionnement des méristèmes (d'après [13-18]).

Figure 6. Diagram showing some genes involved in ontogenesis and meristem function.

Le développement du primordium racinaire est très organisé, avec l'établissement d'une structure en dôme comprenant quatre couches tissulaires : vasculaire, endodermique, corticale et épidermique et la mise en place très précoce des initiales correspondantes. L'activation du méristème comprend une première phase d'expansion cellulaire qui va permettre l'émergence de la racine. Chez les mutants, *root meristemless*, les racines latérales émergent suite à la phase d'élongation des cellules mises en place, mais leur croissance est immédiatement arrêtée.

Encore une fois, on constate que la mise en place comme le fonctionnement du méristème sont étroitement contrôlés. On peut rapprocher ce fait de l'observation fréquente, lors de la formation de racines adventives *in vitro*, d'arrêts de croissance, de malformations ou d'organes physiologiquement inactifs.

Multiplication végétative : acquis et tendances

Le développement et l'amélioration des techniques de culture *in vitro* ont permis de renouveler, sinon de révolutionner, les possibilités offertes par la multiplication végétative dans plusieurs directions.

Gestion des méristèmes pré-existants

Il s'agit de toutes les applications qui résultent de la micropropagation *sensu lato*. Les résultats dans ce domaine sont bien connus, aussi bien pour les plantes vivrières ou de grande culture [2, 24] que pour les plantes horticoles [25].

Les conditions physiologiques particulières de la culture *in vitro* autorisent une meilleure gestion des méristèmes pré-existants : organogenèse plus rapide (donc multiplication accélérée), meilleure aptitude à l'enracinement, culture de méristèmes (donc possibilités d'assainissement viral), toutes techniques largement utilisées et combinées pour améliorer la qualité des plantes à multiplication clonale. On doit y ajouter la possibilité, peut-être insuffisamment exploitée, de créer artificiellement les conditions permettant de favoriser ou de court-circuiter certaines étapes physiologiques, un des meilleurs exemples étant l'obtention de la microtubérisation [26-28].

plus simple, en particulier chez *Arabidopsis*, ce qui a permis de privilégier les études de filiation cellulaire. En effet, les différents tissus constitutifs de la racine sont représentés sous forme de couches mono ou paucicellulaires, disposées en files, qui sont mises en place par des initiales parfaitement repérables. Ces initiales semblent prédéterminées au cours de l'embryogenèse et leur filiation a été établie aux premiers stades de développement de la racine [19]. Des expériences d'ablation au laser d'initiales identifiées et le suivi des régénérations correspondantes ont montré que, en fait, la spécification de ces initiales est le résultat de trois mécanismes complémentaires [20, 21] :

- une information de position, c'est-à-dire que, si les initiales sont détruites, les cellules qui prennent leur place au cours de la régénération retrouvent la même spécification ;
- des interactions avec les cellules voisines ;
- des divisions asymétriques indispensables à la spécification de certains tissus (distinction – cortex endoderme par exemple) et contrôlées génétiquement par le gène *scarecrow* [22].

Ces informations sont particulièrement importantes dans le cadre de la multipli-

cation végétative, qui fait de plus en plus souvent appel, aux travers des techniques de culture *in vitro*, à la néo-formation d'organes. On constate, comme dans le cas du méristème caulinaire évoqué plus haut, que la spécification et le contrôle du fonctionnement intégré d'un méristème demandent la mise en œuvre de mécanismes complexes au niveau génétique et cellulaire, dont l'étude mérite d'être approfondie pour une meilleure maîtrise de la régénération. L'une des clés de la réussite de la multiplication végétative est la production de racines adventives par les boutures ou tiges néoformées. On dispose également de nouvelles informations sur ce processus complexe [23]. L'organogenèse des racines latérales ou adventives implique plusieurs événements contrôlés génétiquement (tableau 1). L'initiation de la racine est repérée par la dédifférenciation et l'entrée en division d'un petit nombre de cellules en situation profonde, à proximité des pôles de xylème, qui ne semblent pas prédéterminées. En revanche, il est clairement établi et confirmé par le phénotype des mutants ayant une teneur accrue en auxine endogène (*superroot*, *rooty* par exemple chez *Arabidopsis*) que l'auxine est impliquée à ce stade.

Enjeux des recherches fondamentales

En revanche, ces conditions physiologiques particulières ne permettent pas de dépasser certaines contingences génétiques ou physiologiques, comme celles évoquées dans le chapitre précédent en ce qui concerne la multiplication des ligneux. Un autre point faible réside dans la relative méconnaissance des modifications physiologiques consécutives au sevrage et de leurs conséquences sur les événements morphogénétiques ultérieurs : qualité de l'enracinement, développement végétatif, aptitude à la floraison... [29-32].

Néo-formation de méristèmes et régénération

L'une des manifestations les plus originales de la plasticité de la morphogenèse et du génome de la plante est la capacité de différenciation de la cellule végétale qui peut s'engager dans de nouveaux programmes de développement conduisant à une nouvelle plante. La construction de cette nouvelle plante passe obligatoirement par la néoformation des méristèmes caulinaires et racinaires, produisant un nouvel organisme fonctionnel. Si la différenciation va à son terme, la cellule peut être considérée comme totipotente et peut alors s'engager dans un programme d'embryogenèse récapitulante ou mimant la construction de l'embryon à l'intérieur de la graine. La maîtrise de cette embryogenèse somatique est certainement l'un des enjeux des biotechnologies végétales.

En ce qui concerne la néoformation des méristèmes (qui a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux chez une multitude de plantes), les points clés sont évoqués dans le *tableau 2*. On peut simplement remarquer que, dans le cas d'une plante dite récalcitrante, la complexité du problème est telle que l'approche reste pour une part empirique. Si on prend en compte les données portant sur l'initiation des méristèmes dans le cadre normal et le fait que les concentrations d'activateurs de croissance exogènes vont très au-delà généralement des doses physiologiques, il n'est pas étonnant d'observer fréquemment des anomalies plus ou moins profondes et plus ou moins stables en multiplication. Les mécanismes de ces anomalies (groupées sous le vocable de variation somaclonale) sont d'origines diverses (pour une revue voir [32-35]), mais elles doivent absolument être prises en compte dans tout travail de régénération. La possibilité d'utiliser cette variation aléatoire comme moyen d'amplification de la variabilité génétique ne sera pas évoquée ici.

Tableau 1

Gènes impliqués chez *Arabidopsis* aux différentes étapes de la formation des racines latérales (modifié d'après Malamy et Benfey [23])

| Événements morphogénétiques | Gènes impliqués chez <i>Arabidopsis</i> |
|--|---|
| Transport et perception des signaux auxiniques | <i>alf 4, aux 1, axr 1, axr 4</i> |
| Entrée en division des cellules en situation profonde à l'origine de la racine | <i>cyc, cdc 2a</i> |
| Formation du primordium racinaire et spécification cellulaire | <i>scr</i> |
| Accroissement cellulaire et émergence du primordium | ? |
| Production locale d'auxine | <i>alf 3</i> |
| Activation du méristème | <i>rml 1, rml 2, cyc</i> |

alf 1, alf 4 : gènes contrôlant la formation des racines latérales (*aberrant lateral root formation*) ; *axr 1, axr 4, aux 1* : gènes auxiniques ; *cyc, cdc 2 a* : gènes contrôlant les cyclines ; *rml 1, rml 2* : gènes contrôlant la mise en place du méristème racinaire (*root meristemless*) ; *scr* : gène *scarecrow*.

Arabidopsis genes involved at different stages of lateral root formation

Tableau 2

Identification des différents paramètres à prendre en compte pour mener à bien un programme de régénération par organogenèse et/ou embryogenèse

| Principales étapes | Paramètres à prendre en compte | Nouvelles approches |
|------------------------|--|--|
| Plante d'origine | Génotype Stade de développement Conditions écologiques | Marqueurs génétiques Caractérisation biochimique Pré-conditionnement |
| Explant | Type d'organe ou de tissu Stade de développement | Marqueurs biochimiques |
| Conditions inductrices | Rupture des corrélations Activateurs de croissance Milieu de culture-environnement | Cultures cellulaires Nouvelles molécules |
| Niveau cellulaire | Relations paroi-protoplastes Polarité Activité mitotique | Conditions d'isolement Cytosquelette Inducteurs du cycle |
| Conditions inductrices | Conditionnement Activateurs de croissance Milieu de culture-environnements | Identification des cellules Glycoprotéines Oligosaccharides |
| Régénération | Balance hormonale Séquence de milieux Activation des méristèmes | Marqueurs biochimiques |
| Plante régénérée | Acclimatation Variation somaclonale Développement végétatif-floraison | Physiologie vitroplants Marqueurs génétiques Marqueurs précoces |

Some parameters that should be taken into consideration for successful plant regeneration through organogenesis and/or embryogenesis

Sur la base du *tableau 2*, quelques voies peuvent permettre, à notre avis, une approche plus rationnelle à terme des processus de régénération. Il est nécessaire de mieux maîtriser l'utilisation quantitative et qualitative des régulateurs de croissance qui contrôlent les trois étapes clés : différen-

ciation, initiation ou induction, spécification ou expression de l'organogenèse ; sur le plan quantitatif, il convient de mieux évaluer les teneurs endogènes ; sur le plan qualitatif, une meilleure prise en compte, à terme, des mécanismes d'action des activateurs de croissance et de leur interaction

avec les voies de signalisation [36, 37]. La recherche d'informations sur la nature des interactions entre cellules doit être conduite à deux niveaux : l'étude des conséquences de la rupture des corrélations liée à l'excision de l'explant et/ou à la séparation des cellules. Pour les organismes multicellulaires, chez les animaux comme les plantes, la liaison entre les cellules est un facteur important pour le contrôle de la morphogenèse. Il est clair que, chez les plantes, ces interactions impliquent la paroi et ses composés. Des travaux récents réalisés sur la carotte [38] montrent que ces liaisons sont structurales (mise en évidence au microscope électronique) et biochimiques (implication de la fraction pectine avec des ponts calciques). Les modifications de ces liaisons peuvent être mises en corrélation avec l'aptitude à l'embryogenèse des cals ou leur perte de compétence. Les mêmes situations peuvent être également corrélées à des marqueurs protéiques [39, 40]. Les mécanismes à la base du phénomène de conditionnement ne sont pas toujours suffisamment pris en compte, dans la mesure où le choix d'une densité cellulaire adéquate permet le déclenchement du programme de régénération. Dans d'autres cas, un apport exogène indirect (utilisation de cultures nourrices) est indispensable [41, 42]. Si on soupçonne depuis un certain temps la mise en œuvre de composés pariétaux [43] et de glycoprotéines liées à la matrice pariétale [44, 45], leur mode d'action n'est pas encore élucidé.

Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est connue depuis 1958 [46, 47]. Cependant, les progrès les plus marquants et les plus décisifs n'ont été obtenus que dans la dernière décennie (pour des revues récentes voir [48, 49]).

Dans le contexte de la multiplication végétative, la maîtrise de l'embryogenèse somatique devrait offrir une situation idéale : possibilité de multiplication prodigieuse (une cellule somatique donne une plante), obtention d'une plante morphologiquement identique à la plante issue de graine (l'axe embryonnaire permet l'alignement des méristèmes caulinaire et racinaire), obtention à terme d'une multiplication clonale sous forme de « graine » (semence artificielle [50]). En fait, le problème est extrêmement complexe et, si la plupart des étapes ont été franchies chez la carotte par exemple qui reste le modèle de référence, dans la majorité des cas de nombreuses barrières restent à maîtriser. Dans ce cas également, les progrès nécessitent l'analyse des mécanismes

fondamentaux du développement. Dans le cadre normal, l'embryogenèse ne concerne – si on laisse de côté dans un premier temps les possibilités de reproduction apomictique [51] – que le zygote issu de la fécondation de l'oosphère. Le déroulement de l'embryogenèse au sein des tissus emboîtés de l'ovule a longtemps limité ces études au niveau descriptif. C'est l'approche génétique qui a permis récemment une première analyse des mécanismes [52-54]. Si la plupart de ces travaux ont été réalisés sur *Arabidopsis*, un certain nombre de gènes homologues ont été identifiés chez le maïs et le riz [55, 56]. Les faits essentiels sont récapitulés sur la figure 7. Il existe un nombre relativement limité de gènes (quelques dizaines tout au plus) qui contrôlent les différentes étapes de l'embryogenèse *sensu lato*, depuis la première division du zygote jusqu'à la formation d'un embryon apte à germer. Ces gènes interviennent de manière séquentielle et conduisent à des plantules dont le phénotype est plus ou moins modifié en fonction de leur précocité d'action.

Il est clair par exemple que les mutations conduisant à des délétions apicobasales

donnent des embryons avortés. Mais il est important de souligner que des phénotypes apparemment normaux au stade plantule ne donnent pas des plantes normales du fait de la défection des gènes de maturation. La complexité de ce contrôle génétique est à mettre probablement en parallèle avec le grand nombre d'anomalies observées en embryogenèse somatique et dont les phénotypes rappellent étonnamment ceux des mutants précédemment évoqués [49].

Peut-on établir un parallèle entre l'embryogenèse zygotique et l'embryogenèse somatique ?

Cette question a été longuement débattue dans des articles récents [49, 57]. Les points

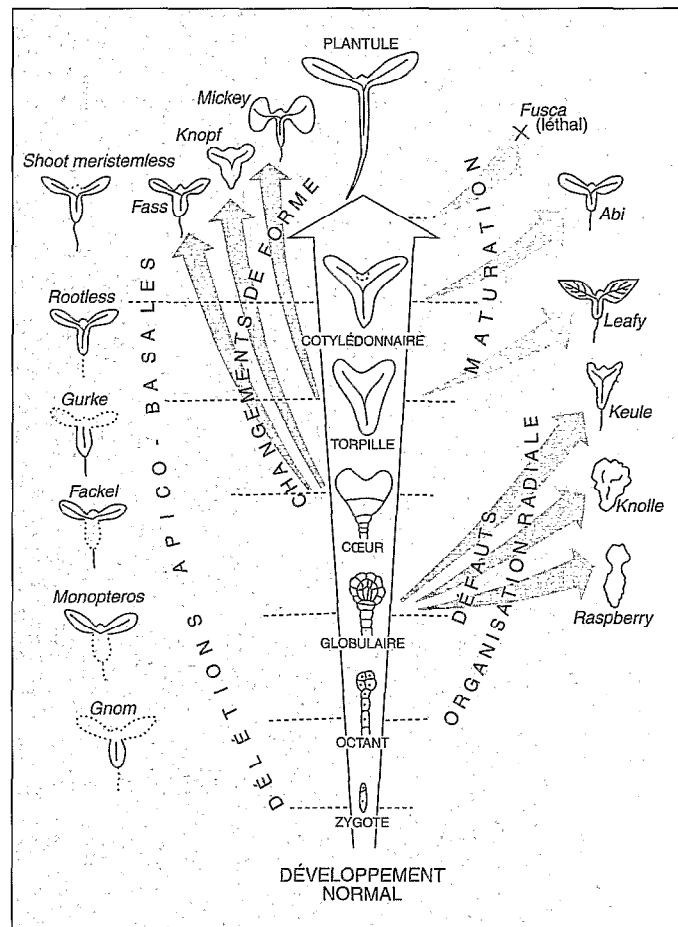


Figure 7. Phénotypes des plantules correspondant à la mutation des principaux gènes contrôlant l'embryogenèse zygotique. Au centre, étapes de l'embryogenèse chez *Arabidopsis*. Les délétions sont signalées par des pointillés (d'après Dodeman et al. [49]).

Figure 7. Main plantlet phenotypes of embryogenic mutants in *Arabidopsis*, deletions are shown by dotted lines.

Enjeux des recherches fondamentales

essentiels sont identifiés sous forme d'un tableau comparatif (tableau 3). Nous ne mettrons l'accent que sur trois des étapes les plus critiques pour la réussite de l'embryogenèse somatique.

Contrôle génétique de l'aptitude à l'embryogenèse

Même si la liste des plantes aptes à réaliser l'embryogenèse somatique s'allonge, de nombreuses difficultés persistent. Depuis longtemps un effet génotypique a été avancé mais, le problème étant complexe, il est souvent difficile de démêler ce qui résulte d'un réel contrôle génétique d'une mauvaise adéquation méthodologique : choix des stades physiologiques, caractéristiques du milieu, conditions expérimentales. Récemment, des données plus précises concernant l'existence d'un contrôle génétique ont été obtenues chez le blé [37].

L'embryogenèse somatique peut être induite au niveau de cellules isolées d'origine sporophytique [57] ou gamétophytique, c'est-à-dire à partir de microspores [58]. L'une des caractéristiques de ces systèmes cellulaires, en particulier en ce qui concerne les cellules somatiques, est leur hétérogénéité en termes d'aptitude à l'embryogenèse. Chez la carotte par exemple, qui est considérée comme l'un des systèmes les plus performants, le pourcentage de cellules embryogènes n'excède pas 1 à 2 % [59], ce qui explique la difficulté à analyser les mécanismes de développement, en particulier aux tous premiers stades. Les efforts portent actuellement sur l'identification des cellules concernées [60] ou sur l'augmentation du pourcentage des cellules embryogènes [61]. Des pistes nouvelles apparaissent dans ce domaine. Dans les suspensions cellulaires embryogènes de carotte, trois sous-populations ont été identifiées : des cellules allongées et/ou fortement vacuolisées dont l'aptitude

embryogène est très faible et deux types cellulaires sphériques respectivement vacuolisés (types B) ou riches en cytoplasme (type C). Seules les cellules C sont directement embryogènes.

Des anticorps obtenus contre une glycoprotéine de type AGB, repérée dans le milieu des suspensions embryogènes, marquent uniquement les cellules de type B. Le suivi de ces cellules marquées est particulièrement instructif. Avant de se diviser, elles se polarisent, le marquage n'impliquant plus qu'une partie de la cellule. Après division, les cellules filles ont un comportement et un contenu complètement différents. La cellule qui conserve le marquage se vacuolise et meurt, l'autre cellule est de type C, donc embryogène [45]. D'une part, il est donc possible de repérer, tout au moins chez ce matériel, les cellules aptes à l'embryogenèse et, d'autre part, l'établissement d'une polarité cellulaire est un pré-requis à la spécification de la cellule embryogène, ce qui est en accord avec la première division de l'embryogenèse zygotique.

Dédifférenciation et aptitude à l'embryogenèse

Le développement du zygote commence par une division asymétrique, ce qui signifie que le zygote est une cellule polarisée. Les mécanismes à la base de cette polarité sont difficiles à analyser expérimentalement au sein de l'ovule. Une première réponse est venue de l'étude des mutants *gnom* [53]. Ce gène est un des tous premiers à s'exprimer au cours de l'embryogenèse. La mutation se traduit par une absence d'élongation du zygote, le non-établissement d'une organisation polarisée et une division symétrique. Des informations complémentaires ont été apportées, au niveau cellulaire, par les études sur le zygote de *Fucus* (pour une revue voir [62]). Ce zygote se présente comme un protoplaste apolaire et isotrope. L'apport d'une lumière unidirectionnelle induit l'établissement de la polarité puis une division asymétrique qui sépare une cellule à l'origine du rhizoïde de celle à l'origine du thalle. L'homologie avec le zygote des angiospermes dont la première division sépare le suspenseur de l'embryon est évidente. Les études séquentielles réalisées sur le zygote de *Fucus* montrent que la polarité se met en place progressivement par l'intermédiaire d'une asymétrie du cytosquelette se traduisant par une hétérogénéité pariétale. De plus, cette organisation polarisée est

Tableau 3

Comparaison entre embryogenèse zygotique et embryogenèse somatique (d'après Dodeman *et al.* [49])

| Étapes | Embryogenèse zygotique | Embryogenèse somatique |
|-------------------------------------|--|---|
| Origine | Zygote Au sein de l'ovule | Cellule somatique Isolée ou non Cellules haploïdes (microspore ou jeune gamétophyte) |
| Initiation | Fécondation (sauf apomixie) Tous les zygotes | Induction hormonale Faible pourcentage des cellules Dédifférenciation → polarité ? Division asymétrique ? (glycoprotéines ?) |
| Construction de l'embryon | Séparation embryon/suspenseur Mise en place axe embryonnaire (contrôle génétique) | Modalités comparables + variations : Absence suspenseur Réorganisation massifs embryonnaires Embryogenèse adventive |
| | Régulation stricte | |
| Mise en place des méristèmes | Étroitement contrôlée génétiquement 1 racinaire 2 caulinaire | Interactions entre contrôle génétique et contrôle hormonal → nombreuses anomalies |
| Maturation | Accumulation de protéines de réserve (contrôle génétique) Déshydratation Dormance (contrôle génétique, ABA) Interactions plantes-embryons | Absence de maturation et endosperme → Induction par des effecteurs externe (acides aminés, sucres, ABA, déshydratation) |

Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis

stabilisée avant la division par l'établissement de liaisons structurales entre le cytoplasme cortical et la matrice pariétale au travers de la membrane plasmique.

Nous avons exploité un autre modèle expérimental, également emprunté aux algues, et apporté des éléments nouveaux concernant la dédifférenciation et la régénération des protoplastes. Ces travaux ont été réalisés avec une algue brune filamenteuse, *Sphacelaria*, dont la croissance est assurée par une cellule apicale de grande taille fortement polarisée. Il est possible d'obtenir des protoplastes de cette même cellule et donc de comparer le comportement d'une cellule identifiée (l'apicale) avec ou sans paroi [63]. La perte de la paroi, en liaison avec l'isolement du protoplaste, se traduit par une perte de la polarité ; les constituants cellulaires comme le cytosquelette sont disposés de façon isotrope autour du noyau en position centrale [64] (figure 8). Placés en condition de lumière diffuse, ces protoplastes se divisent mais ne régénèrent, pas ce qui conduit à la formation d'un microcal.

Lorsqu'ils sont placés en lumière unidirectionnelle, la polarité est rétablie rapidement, en particulier grâce à l'établissement de relations dissymétriques entre le cytosquelette et la paroi. Il en résulte une première division asymétrique à l'origine d'une cellule apicale qui construira la nouvelle plante [64]. Ces résultats, dans la mesure où ils sont directement transposables aux cellules de plantes supérieures, apportent des indications précieuses : la dédifférenciation est corrélée à des remaniements cellulaires structuraux importants et corrélativement à une perte de la polarité, le retour à la polarité étant l'une des conditions de la régénération, en particulier selon un programme embryonnaire. Ces changements de programme morphogénétique sont des conséquences des modifications des interactions noyau/cytoplasme cortical/cytosquelette/membrane plasmique/matrice pariétale. Les hypothèses de travail actuelles conduisent à considérer que la cellule végétale (et animale) a la possibilité de changer les aiguillages des voies de signalisation en fonction d'une induction, dans le cadre normal du développement ou en conditions expérimentales, pour s'engager dans la dédifférenciation, la différenciation ou la régénération.

Maturation et germination

Beaucoup de travaux ont été consacrés aux premières phases de l'embryogenèse somatique, afin d'obtenir un embryon morphologiquement comparable à l'embryon zygotique. Très rapidement, les utilisateurs ont

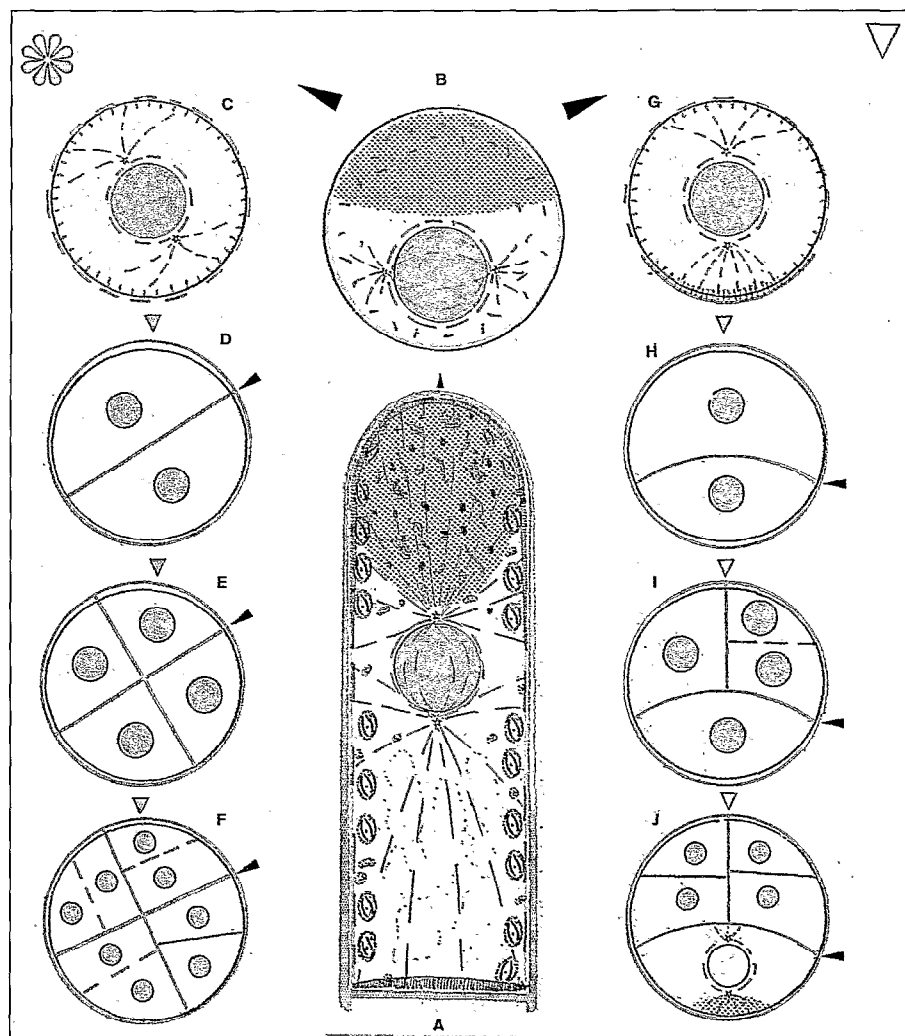


Figure 8. Conséquence de la suppression de la paroi sur la polarité cellulaire et comparaison des modalités de régénération des protoplastes en lumière diffuse et unidirectionnelle chez *Sphacelaria* (Fucophycées) (d'après Rusig *et al.* [64] et Ouichou [65]).

Figure 8. Effect of cell wall removal on cell polarity and comparison of protoplast regeneration patterns with diffused and unidirectional light in *Sphacelaria* (Fucophyceae).

constaté que la germination et les premiers stades de développement de la plante nécessitaient une phase de maturation. En référence encore une fois à l'embryon zygotique où ces phénomènes interviennent naturellement, il s'agit de l'accumulation de réserves sous forme protéique et glucidique [54]. Devant la complexité du problème, le choix a été fait d'une approche empirique, c'est-à-dire essayer de mimer, par l'intermédiaire du milieu de culture et des conditions environnementales, les situations physiologiques réalisées normalement au sein de l'ovule. Des résultats positifs ont été obtenus récemment chez la carotte [66-69] et chez le palmier à huile [70-72]. Des embryons somatiques au stade torpille

ont été placés de façon individuelle ou combinée dans des milieux enrichis en glutamine, saccharose, ABA et/ou soumis à déshydratation. L'effet de ces paramètres a été évalué par rapport à l'apparition des protéines de maturation de réserve spécifiques en électrophorèse bidimensionnelle. L'augmentation de la concentration en saccharose permet une accumulation d'amidon. En ce qui concerne les protéines, les meilleurs résultats ont été obtenus en combinant l'ABA, qui est un facteur essentiel, le saccharose et une déshydratation mesurée. Dans ces conditions, les protéines sont qualitativement identiques à celles caractérisant la maturation de l'embryon zygotique mais quantitativement en plus faible proportion [73].

Conclusion

Restée longtemps une pratique de tradition, la multiplication végétative offre de nouveaux outils performants pour une meilleure gestion des plantes cultivées. Ce statut peut être relié à deux démarches récentes :

- une maîtrise de plus en plus affirmée des biotechnologies cellulaires permettant d'accéder de façon moins empirique aux processus d'organogenèse pour la régénération contrôlée de méristèmes fonctionnels et/ou d'embryogenèse pour la production, selon des modalités de plus en plus proches de ce qui intervient au cours de la formation de la graine de plantes d'origine somatique ;
- l'utilisation de plantes modèles comme *Arabidopsis* ou la carotte pour analyser aux niveaux génétique, cellulaire et moléculaire les mécanismes fondamentaux de l'ontogenèse et de la morphogenèse végétales. Il en résulte deux séries de conséquences à terme.

La première est qu'il devient possible de gérer en fonction des ressources génétiques disponibles, des caractères morphologiques, physiologiques ou écologiques de l'espèce ainsi que de son niveau d'amélioration - toutes les possibilités de multiplication d'un génotype soit par voie sexuée, soit par voie de multiplication végétative. L'un des meilleurs exemples concerne la production des graines apomictiques qui pourront être obtenues à terme soit au travers de l'embryogenèse somatique, soit par le contrôle génétique de l'apomixie chez les plantes à reproduction sexuée prédominante [74]. Ces nouvelles méthodes devraient particulièrement bénéficier à l'amélioration des plantes tropicales dont les particularités biologiques, écologiques et économiques exigent des stratégies originales et/ou conduisent à court-circuiter certaines étapes des programmes classiques [75].

La seconde nous semble ressortir des thèmes traités dans cet article. Des progrès décisifs sont en passe d'être franchis concernant la connaissance des mécanismes fondamentaux du développement végétal. Ils ne concernent cependant que quelques plantes modèles, comme *Arabidopsis*, dont les caractéristiques sont bien éloignées, voire sans commune mesure, avec celles des plantes d'intérêt agronomique. Il convient donc de transférer, de la façon la plus efficace, ces avancées scientifiques afin de résoudre au mieux les problèmes posés par l'amélioration des plantes utiles, particulièrement tropicales. L'efficacité de cette démarche passe nécessairement par un décloisonnement

des disciplines et par des interactions de plus en plus solides entre les laboratoires du Nord et Sud ■

Références

1. Ducreux G, Le Guyader H. Ontogenèse végétale. *Encyclopedia Universalis* 1995 ; 16 : 893-902.
2. Ducreux G. Biotechnologies et plantes à multiplication végétative : quelles stratégies ? In : *Biotechnologies, amélioration des plantes et sécurité alimentaires*. Paris : ESTEM/AUPELF (in press).
3. Ducreux G, Le Guyader H. L'invention de la cellule méristématique. *Bull Soc Zool Fr* 1995 ; 120 : 139-55.
4. Figuiet L. *Histoire des plantes*. Paris : Hachette et Cie, 1865 ; 531 p.
5. Nozeran R, Ducreux G, Bancelhon-Rossignol L. Réflexions sur les problèmes de rajeunissement. *Bull Soc Bot Fr* 1982 ; 129 : 107-30.
6. Nozeran R. Integration of organismal development. In : *Positional controls of plant development*. In : Barlow PN, Carr DJ, eds. Cambridge : Univ. Press, 1984 : 375-401.
7. Koltunow AM. Apomixis : embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 1993 ; 5 : 1425-37.
8. Mazoyer M, Roudart L. *Histoire des agricultures du monde. Du néolithique à la crise contemporaine*. Paris : Seuil, 1997 ; 377 p.
9. Constantin P. Le monde des plantes. In : *Les plantes*. Paris : Baillière JP, et al. 1899 ; 810 p.
10. Gressent M. *L'arboriculture fruitière*. Paris : Gressent M, 1878 ; 6 édition, 928 p.
11. Huang L, Liu S, Huang B, Murashige T, Mahdi E, van Gundy R. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. *Plant Physiol* 1992 ; 98 : 166-73.
12. Monteuis O, Gendraud M. Nucleotide and nucleic acid status in shoot tips from juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum* during rest and growth phases. *Tree Physiology* 1997 ; 3 : 257-63.
13. Barton MK, Poethig RS. Formation of shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana* : an analysis of development in the wild type and the *shootmeristemless* mutant. *Development* 1993 ; 119 : 823-31.
14. Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM. The *clavata* and *shootmeristemless* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 1996 ; 122 : 1567-75.
15. Long JA, Moan EL, Medford JI, Barton MK. A member of the knotted class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* 1996 ; 379 : 68-9.
16. Jackson D, Veit B, Hake S. Expression of maize *knotted 1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* 1994 ; 120 : 405-13.
17. Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T. The *shootmeristemless* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at different regulatory level than the meristem genes *wuschel* and *zwille*. *Plant J* 1996 ; 10 : 967-79.
18. Barton K. Cell type specification and self renewal in the vegetative shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* 1998 ; 1 : 37-42.
19. Scheres B, Wolkenfelt H, Willemse V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 1994 ; 120 : 2475-87.
20. Van den Berg C, Willemse V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B. Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 1995 ; 378 : 62-5.
21. Van den Berg C, Willemse V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 1997 ; 390 : 287-9.
22. Dilaurenzio L, Wysockadiller J, Molamy JE, et al. The *scarecrow* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 1996 ; 86 : 423-33.
23. Malamy JE, Benfey PN. Down and out in *Arabidopsis* : the formation of lateral roots. *Trends in Plant Science* 1997 ; 2 : 390-6.
24. Sihachakr D, Ducreux G, Nozeran R. Perspectives ouvertes par les biotechnologies pour l'amélioration des plantes vivrières tropicales. *Bull Soc Bot Fr* 1989 ; 136 : 169-77.
25. Bigot C. La micropropagation *in vitro* : problèmes actuels et perspectives. *L'avenir des biotechnologies en horticulture*. Journées d'étude du 20-21 avril 1998 Versailles CNRA, 1998 : 7-20.
26. Charles G, Rossignol L, Rossignol M. Environmental effects on potato plants *in vitro*. *J Plant Physiol* 1992 ; 139 : 708-13.
27. Charles G, Rossignol L, Rossignol M. A synchronous model perfecting for fundamental studies on the tuberization process. *J Plant Physiol* 1993 ; 142 : 474-9.
28. Charles G, Rossignol L, Rossignol M. Mise au point d'un modèle de développement et de tubérisation contrôlés et synchrones chez la pomme de terre cultivée *in vitro*. *Acta Botanica Gallica* 1995 ; 142 : 289-300.
29. De Touchet B, Nato A, Lavergne D, Duval Y. Liquid medium and carboxylase activities in oil palm propagated *in vitro*. *Plant Physiol Biochem* 1993 ; 31 : 931-5.
30. Triques K, Rival A, Beule T, et al. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. *Plant Science* 1997 ; 127 : 39-51.
31. Triques K, Rival A, Beule T, Dussert S, Hoher V, Verdeil VL, Hamon S. Developmental changes in carboxylase activities of *in vitro* cultured coconut zygotic embryos : comparison with corresponding activities in seedlings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1997 ; 49 : 227-31.
32. Rival A, Bertrand L, Beulé T, Combes MC, Trouslot P, Lashermes P. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breeding* 1998 ; 117 : 73-6.
33. Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Gen* 1981 ; 60 : 197-214.
34. Karp A, Bright SWJ. On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxford Surv. Plant Mol Cell Biol* 1985 ; 2 : 199-234.

35. Henry Y, Nato A, De Buyser J. Genetic fidelity of plants regenerated from somatic embryos of cereals. In : *Somaclonal variation and induced mutations in crops improvement*. In : Join SM, Ahboowalix SSB, Brarr DS, eds. Kluwer Academic Publishers, 1998 : 65-80.
36. Nato A, De Buyser J, Jean C, Mirshahi M, Henry Y. Signaling proteins involved in wheat somatic embryogenesis. In : Siddigni KA, ed. *Somatic cell genetics and plant genetic engineering*. 1998 (sous presse).
37. Nato A, Mirshahi A, Tichtinsky G, et al. Immunological detection of potential signal transduction proteins expressed during wheat somatic tissue culture. *Plant Physiol* 1997 ; 113 : 801-7.
38. Satoh S. Functions of the cell wall in the interactions of plant cells : analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol* 1998 ; 39 : 361-8.
39. Cavalcante Alves JM, Sihachakr D, et al. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Plant Cell Rep* 1994 ; 13 : 437-41.
40. Sihachakr D, Haïcour R, Cavalcante Alves JM, Umboh I, Nzoghe D, Servaes A, Ducreux G. Plant regeneration in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Euphytica* 1997 ; 96 : 143-52.
41. Megia R, Haïcour R, Rossignol L, Sihachakr D. Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa* sp.). *Plant Science* 1992 ; 85 : 91-8.
42. Megia R, Haïcour R, Tizroutine S, Bui Trang V, Rossignol L, Sihachakr D, Schwendiman J. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* sp., ABB group). *Plant Cell Rep* 1993 ; 13 : 41-4.
43. Quatrano RS, Shaw SL. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends in Plant Science* 1997 ; 2 : 15-21.
44. Berger F, Taylor A, Brownlee C. Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development. *Science* 1994 ; 263 : 1421-3.
45. McCabe PF, Valentine TA, Forsberg LS, Pennell RI. Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell* 1997 ; 9 : 2225-41.
46. Reinert J. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebe Kulturen aus Karotten. *Naturwissenschaften* 1958 ; 45 : 344-5.
47. Steward FC, Mapes MO, Smith J. Growth and organized development of cultured cells I. Growth and division of freely suspended cells. *Amer J Bot* 1958 ; 45 : 693 ; 22 : 367-77.
48. De Jong AJ, Schmidt EDL, De Vries SC. Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 1993 ; 22 : 367-77.
49. Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Experiment Botany* 1997 ; 48 : 1493-509.
50. Redenbaugh K. *Synseeds applications of synthetic seeds to crop improvement*. London : CRC Press, 1993 ; 491 p.
51. Chaudhury AM, Craig S, Dennis ES, Peacock WJ. Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr Opin Plant Biol* 1998 ; 1 : 26-31.
52. Mayer U, Torres Ruiz RA, Berleth T, Misera S, Jürgens G. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 1991 ; 353 : 402-7.
53. Mayer U, Büttner G, Jürgens G. Apical. Isal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo : studies on the role of the GNOM gene. *Development* 1993 ; 117 : 149-62.
54. Golberg RB, Paira G de, Yadegari R. Plant embryogenesis : zygote to seed. *Science* 1994 ; 266 : 605-14.
55. Clark JK, Sheridan WF. Isolation and characterization of embryo specific mutation of maize. *Plant Cell* 1991 ; 3 : 935-51.
56. Kitano H, Tamura Y, Satoh H, Nagato Y. Hierarchical regulation of organ differentiation during embryogenesis in rice. *Plant Journal* 1993 ; 3 : 607-10.
57. Heberle-Bors E, De Vries S. Le développement embryonnaire des végétaux. *Biofutur* 1997 ; 172 : 38-42.
58. Cordewener JHG, Busink R, Traas JA, Custers JBM, Dons HJM, van Lookeren Campagne MM. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. is accompanied by specific changes in protein synthesis. *Planta* 1995 ; 195 : 50-6.
59. De Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde D, Thomas TL, van Kammen A. Acquisition of embryogenesis potential in carrot cell suspension cultures. *Planta* 1988 ; 176 : 196-204.
60. Toonen MAJ, Hendriks, Schidt EDL, Verhoeven HA, van Kammen A, de Vries SC. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 1994 ; 194 : 567-72.
61. De Buyser J, Touraine P, Ambrise A, Picard E. Induction of androgenetic embryos and chlorophyllian plants of *Triticum aestivum* from isolated microspore culture. *Proceedings of the 9th International wheat Genetics Symposium*, 1998. Saskatoon, Canada, 1998 : 175-7.
62. Kropf DL. Induction of polarity in fucoid zygotes. *Plant Cell* 1997 ; 9 : 1011-20.
63. Ducreux G, Kloareg B. Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria*. *Planta* 1988 ; 26 : 488-95.
64. Rusig AM, Le Guyader H, Ducreux G. Dedifferentiation and microtubule reorganization in the apical cell protoplast of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). *Protoplasma* 1994 ; 179 : 83-94.
65. Ouichou A. *Rôle des interactions noyau-cytoplaste-paroi dans le contrôle de la polarité et des divisions asymétriques des cellules initiales de Sphacelaria sp. (Fucophycées)*. 1999 Thèse Univ., Paris XI, Orsay.
66. Dodeman VL, Ducreux G. Isozyme patterns in zygotic and somatic embryogenesis of carrot. *Plant Cell Report* 1996 ; 16 : 101-5.
67. Dodeman VL, Ducreux G. Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. *Plant Science* 1996 ; 120 : 57-69.
68. Dodeman VL, Le Guilloux M, Ducreux G, De Vienne D. Characterization of storage proteins in *Daucus carota* L. : two novel proteins display embryo specificity. *Plant Cell Physiol* 1998 ; 39 : 49-56.
69. Dodeman VL, Le Guilloux M, Ducreux G, De Vienne D. Somatic and zygotic embryo of *Daucus carota* L. display patterns until conversion to plants. *Plant Cell Physiol* 1998 (sous presse).
70. Morcillo F, Aberlenc-Bertossi F, Trouslot P, Hamon S, Duval Y. Characterization of 2S and 7S storage proteins in embryos of oil palm. *Plant Science* 1997 ; 122 : 141-51.
71. Morcillo F, Aberlenc-Bertossi F, Hamon S, Duval Y. Differential accumulation of storage proteins, 7S globulins, during zygotic and somatic embryos development in oil palm (*Eleais guineensis* Jacq.). *Plant Physiol Biochem* 1998 (sous presse).
72. Aberlenc-Bertossi F, Noirot M, Duval Y. ABA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenetic suspensions cultures. *Plant Cell Tissues Organ Culture* 1998 (sous presse).
73. Dodeman VL, Le Guilloux M, Ducreux G, De Vienne D. Embryo maturation specific proteins in *Daucus carota* L. *Plant Cell Physiol* 1998 (sous presse).
74. Charrier A, Jacquot M, Hamon S, Nicolas D. *L'amélioration des plantes tropicales*. Toulouse : CIRAD-ORSTOM, 1997 ; 624 p.
75. Savidan Y, Berthaud J, Maize X. *Tripsacum* hybridization and the potential of apomixis transfer for maize improvement. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry : maize*. Berlin : Springer-Verlag, 1994 : 69-83.

Résumé Recherches récentes et biotechnologies de la multiplication végétative

G. DUCREUX, ET AL.

Les plantes peuvent se propager de deux façons : par reproduction sexuée ou par multiplication végétative. Cette caractéristique est une conséquence de l'existence, à l'aisselle de chaque feuille, de bourgeons axillaires contenant chacun une copie du méristème caulinaire terminal. Lorsque ces bourgeons sont séparés de la plante mère, ils peuvent, après formation de racines adventives, être à l'origine de nouvelles plantes qui sont des copies conformes de la plante d'origine. Cette multiplication végétative (puisque indépendante de la floraison et de la reproduction sexuée) est exploitée par l'homme dans le cadre naturel : la grande majorité des plantes à tubercules sont multipliées végétativement ou après intervention (multiplication végétative dite artificielle) : techniques de bouturage et de greffage classiquement utilisées en horticulture et arboriculture.

Restées longtemps traditionnelles, les techniques de multiplication végétative ont été complètement renouvelées et améliorées grâce aux méthodes de culture *in vitro* (micropropagation, cultures de tissus ou de cellules associées à la régénération) ainsi qu'à une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant la morphogénèse et l'organogénèse végétales. Cet article a pour but de dégager – au travers des apports récents des biotechnologies cellulaires et des études fondamentales sur le fonctionnement des méristèmes et de l'embryogenèse zygotique et/ou somatique – les limites et les voies à explorer pour une meilleure adéquation aux objectifs de l'amélioration des plantes.

Biotechnology and vegetative propagation

G. DUCREUX, ET AL.

Plants have two natural modes of multiplication, i.e. sexual and vegetative as a consequence of propagation via the production of axillary buds, which are copies of the shoot meristem. These buds, after isolation from the mother plant, produce new shoots and plants with the formation of adventitious roots. This type of multiplication occurs irrespective of flowering and sexual reproduction, and results in clonal propagation.

Clonal propagation has long been used by man, mainly for multiplying most tuber-bearing plants. Moreover, fruit trees, ornamental plants and many flowers are propagated from cuttings or scions.

Although clonal propagation is traditionally used for plant multiplication, new techniques are now available (including tissue culture) that take recent findings on fundamental mechanisms involved in plant embryogenesis and organogenesis into account.

The aim of this paper is to summarize the state of the art and review recent progress and prospects concerning clonal propagation.

Significance and uses of clonal propagation

Repeated production of new axillary buds is a prerequisite for efficient clonal propagation, i.e. an alternative strategy that enables plants to survive and/or conquer new territories. Concerning agricultural applications, clonal propagation is often used for the production of tuberous food crops or trees.

What's new about clonal propagation

Information on meristem origin and function is now available. The shoot meristem is initiated early during embryogenesis. Its size and organisation are under strict genetic regulations. Moreover, axillary meristems differ physiologically according to the plant age and their position on the plant. These two main points are important in the choice of buds for successful clonal propagation or regenerating new shoot meristems from tissue culture. For root meristems, the induction, activation and function of adventitious root meristems, which are also under strict genetic control, have to be taken into consideration.

Progress and prospects in clonal propagation

Clonal propagation has been greatly improved through in vitro culture, which allows massive multiplication of plants and eradication of viruses by meristem culture. Moreover, somatic embryogenesis can be induced for rapid multiplication of many species. Work is under way to identify true embryogenic cells and mechanisms involved in cell polarity and asymmetric mitosis, which seem necessary for cells to adopt an embryogenic pattern of development. The germinative potential of somatic embryos can be improved by inducing embryo maturation through an exogenous supply of abscissic acid (ABA) and nutrients, which may enhance the production of storage proteins.

It is now possible to manage different plant multiplication strategies through sexual or vegetative reproduction. Clonal propagation can thus be obtained by the production of artificial or natural seeds through somatic embryogenesis and apomixis, respectively.

These tools offer new opportunities for improving crop plants and accelerating the release and dissemination of improved genotypes.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 447-58.