

1982

9

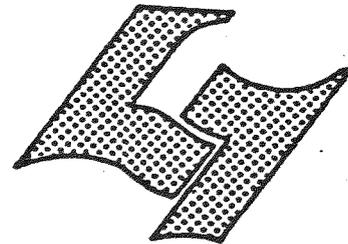
A

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON-I

43. Boulevard du 11 Novembre 1918

69621 VILLEURBANNE

0538



## Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées

NOTE DE SYNTHESE

### NOTE DE SYNTHESE

Réalisation d'une mise au point sur

LE TRANSFERT D'ORGANITES CELLULAIRES

DANS DES PROTOPLASTES ISOLES

Avec une

APPROCHE SYNOPTIQUE DES PRINCIPALES METHODES  
DE FUSION PROTOPLASTIQUE

Pour la préparation d'un plan d'expérience  
chez Euglena Gracilis.

AUTEUR : ANNE MONTAGNON

DATE : MAI 1982

BIBLIOTHEQUE DE L'ENSSIB



841188B

TU

1

D4SS 1982 9A

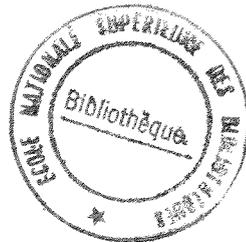
82 NON 04 / A HCP2,8

REALISATION D'UNE MISE AU POINT SUR

LE TRANSFERT D'ORGANITES CELLULAIRES  
DANS DES PROTOPLASTES ISOLES

AVEC UNE APPROCHE SYNOPTIQUE DES PRINCIPALES  
METHODES DE FUSION PROTOPLASTIQUE

POUR LA PREPARATION D'UN PLAN D'EXPERIENCE  
CHEZ EUGLENA GRACILIS



Anne MONTAGNON  
MAI 1982

U.E.R de MATHEMATIQUES  
U.E.R des SCIENCES DE LA NATURE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

*Ce travail a été fait dans le cadre des activités du laboratoire de Physiologie Cellulaire, U.E.R Sciences de la Nature, Lyon I.*

*A mon Professeur V.NIGON, qui, le premier, a favorablement accueilli ce projet, et permis sa réalisation, je souhaite exprimer ici, avec sincérité, mes remerciements.*

*Pour avoir accepté le parrainage de cette étude, -inspirée par l'un de ses sujets de recherche-, et m'avoir prodigué avec amabilité ses pertinents conseils, je remercie vivement P. NICOLAS, Docteur d'Etat es Sciences Naturelles.*

S O M M A I R E

AVANT PROPOS 3

INTRODUCTION 4

PREMIERE PARTIE

  CHAPITRE I 6  
    Quelques éléments du contexte scientifique

  CHAPITRE II 9  
    Abord du problème

  CHAPITRE III 10  
    Aspects méthodologiques

DEUXIEME PARTIE

  CHAPITRE I 16  
    Synopsis de techniques

    A.METHODES ORIGINELES 16

      1.Préliminaires

      2.Le nitrate de sodium

      3.Mélanges salins

      4.Autres méthodes

    B.METHODES CLASSIQUES 18

      1.Méthode de KELLER ET MELCHERS

      2.Le polyéthylène glycol

    C.METHODES PARTICULIERES 21

  CHAPITRE II 23  
    Elements de synthèse sur la réalisation du transfert  
    d'organites cellulaires dans des protoplastes

    A.INTRODUCTION 24

    B.TRANSFERT DE CHLOROPLASTES 25

      1.Incorporation de chloroplastes par fusion  
      de protoplastes

      2.Transfert de chloroplastes isolés

      3.Transfert de chloroplastes par fusion de  
      subprotoplastes avec des protoplastes

      4.Incorporation de chloroplastes par l'inter-  
      -médiaire de liposomes

    C.TRANSFERT DE MITOCHONDRIES 38

      1.Introduction

      2.Transfert par fusion protoplastique

      3.Transfert de mitochondries isolées

      4.Utilisation de miniprotoplastes

    D.CONCLUSION 40

## A V A N T   P R O P O S

Mr P.NICOLAS, chercheur au laboratoire de Physiologie Cellulaire, obtenait le 11 décembre 1981 le grade de Docteur d'Etat es Sciences pour sa thèse:

"Mutagénèse et réparation du génôme plastidien  
d'Euglena gracilis"

Dans la perspective de continuer son étude de l'ADN chloroplastique chez cette algue, M.NICOLAS a conçu récemment le projet de se livrer au transfert, dans des protoplastes d'Euglena gracilis, de chloroplastes marqués - (en particulier par la résistance à certains antibiotiques) - pour essayer de suivre l'expression des gènes concernés dans ce nouvel environnement.

La réalisation présentée ici a eu pour objet principal de rassembler les éléments de la littérature susceptibles, concrètement, de permettre le choix d'un plan d'expériences adéquat.

Ainsi, pour répondre le mieux possible aux besoins exprimés, ces éléments seront structurés en deux parties, à la fois distinctes et liées; l'une sera un synopsis des techniques largement relatives à ce type de manipulations, et l'autre une mise au point plus précise sur le sujet.

Cette bipartition un peu particulière, dont nous reparlerons plus loin, a semblé la meilleure organisation pour conférer à ce travail un caractère réellement constructif.

## INTRODUCTION

Pour restituer à cette étude son esprit d'origine, et pour lui conserver son intéressant caractère d'application concrète, nous avons choisi d'adopter pour la décrire un plan un peu particulier.

En effet, dans un premier temps, nous présenterons le "produit fini" avec la même démarche progressive que, lors de sa réalisation, celle adoptée pour l'approche intellectuelle aussi bien que méthodologique - qui sont étroitement liées - du problème.

Il faut alors partir du contexte scientifique que nous évoquerons dans lequel repose le cas particulier d'Eugléna Gracilis, pour évaluer les meilleures stratégies de recherche et de mise en forme de l'information utile.

La seconde partie, dans laquelle nous aborderons le traitement lui-même, sera ainsi largement introduite.

Celle-ci, pour répondre à des préoccupations concrètes, selon son objectif, a été construite sur une structure double, comportant :

- un rapport technique assez global sur les méthodes de fusion protoplastique
- une mise au point détaillée sur les travaux relatifs au transfert d'organites de type chloroplastique dans des protoplastes.

P R E M I E R E      P A R T I E

## PREMIERE PARTIE

## CHAPITRE I

## QUELQUES ELEMENTS DU CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Avant déjà le début de ce siècle, on s'accordait en Biologie Végétale, à appeler PROTOPLASTE une cellule dépourvue de sa membrane la plus externe, principalement cellulosique, rigide, ou paroi cellulaire.

Cette paroi, chez le vivant, constitue une barrière intercellulaire considérable. Son absence laisse la cellule végétale dans un état presque analogue à celui dans lequel se trouve la cellule animale, dans la mesure où elle n'est plus limitée que par sa membrane plasmique, (on plasmalemmes).

Dans cette situation le rapprochement cellulaire est possible : on connaît depuis longtemps le phénomène de fusion se produisant dans certaines conditions entre cellules animales en culture.

Or, dès le tout début de la production expérimentale de protoplastes, vers 1910 ( 33 ) et plus tard ( 34 ) ont été rapportées des observations sur l'occurrence de fusions.

Ces fusions ont d'abord été décrites comme spontanées, entre protoplastes de même origine (isolés par exemple à partir du même tissu), mais ont également, très tôt, pu être induites entre protoplastes d'origine différente ( 35, ... ) (cf deuxième partie).

En fait, tous les scientifiques concernés reconnurent rapidement l'espoir représenté par le protoplaste, avec toutes les perspectives ouvertes sur l'hybridation nucléaire délivrée des phénomènes d'incompatibilité sexuelle, et surtout sur l'hybridation somatique.

Mais longtemps l'essor de la méthode se fit attendre : la production de protoplastes, encore rigoureusement mécanique (impliquant une plasmolyse et le découpage subséquent de la paroi), était encore trop limitée pour que l'expérimentation puisse être menée sur des quantités adéquates.

Ce handicap put enfin être levé vers 1960 avec la mise au point des premières techniques de dissolution enzymatique de la paroi (cf 35), qui permirent d'obtenir en grand nombre des protoplastes isolés, intacts.

Alors l'intérêt considérable de l'utilisation des protoplastes apparut en pleine lumière, avec l'évidence que des populations de protoplastes pourraient être facilement mises en culture, que ceux-ci se révélaient capables de reformer une paroi, de se diviser et même de conduire à la régénération d'une plante entière.

Jusqu'alors la seule façon de procéder à une hybridation et une recombinaison génétique était le croisement sexuel par fusion gamétique. Cependant, dans la plupart des cas (hormis les organismes comme Clamydomonas Reinhardii et Euglena Gracilis) ce mode exclut le mélange des cytoplasmes (l'influence maternelle étant prédominante) et donc l'hybridation somatique.

Les perspectives offertes par la régénération d'une plante entière à partir de protoplastes fusionnés étaient ainsi remarquables. En effet, ce type d'hybridation permettrait non seulement de transgresser les barrières d'incompatibilité de type sexuel, mais encore d'envisager la production d'hétérocaryons pour lesquels la contribution cytoplasmique parentale serait égale.

Le premier hybride somatique viable ainsi obtenu fut décrit à l'issue de leur expériences par le groupe de CARLSON, SMITH and DEARING en 1972 (cf 74).

Depuis, le nombre et la qualité des travaux relatifs à la fusion protoplastique dans toutes sortes de systèmes différents constituent une littérature particulièrement remarquable.

Cependant, sur le plan agronomique, en ce qui concerne l'amélioration des races et des semences, les hybrides obtenus jusqu'à présent n'ont pas encore répondu à toutes les espérances et beaucoup de choses sont encore très hypothétiques (15).

Mais le développement de telles études a permis de mettre en évidence d'autres propriétés importantes du système protoplastique : en particulier, lors de la fusion, le transfert peut très bien être limité seulement à une partie de l'information.

C'est ainsi qu'ont été conçues et réalisées les premières tentatives d'incorporation de macromolécules, de microorganismes, et en 1972 d'intégration d'organites cellulaires isolés dans des protoplastes.

[ On ne peut, encore une fois, à l'issue de ces remarques, manquer de faire le parallèle entre le système protoplastique et le système des cellules animales en culture (10, 14) ]

C'est sur ce dernier type d'expérimentation, que, nous le verrons, l'on peut considérer comme un cas particulier de fusion protoplastique, que portera le principal de ce travail de synthèse.

Chez Euglena Gracilis comme chez la plupart des organismes végétaux le chloroplaste n'est pas génétiquement totalement autonome. De nombreux travaux ont mis en évidence une interaction du génôme nucléaire et du génôme chloroplastique pour la réalisation de certaines fonctions, comme par exemple lors de la synthèse de la protéine de la fraction I chez N. Tabacum (4, 17... )

L'étude de certaines mutations spécifiques du chloroplaste peut donc être difficile en présence du génôme nucléaire correspondant, puisqu'on ne peut évaluer son intervention.

Ainsi, la réalisation du transfert de chloroplastes mutés, après isolement, dans des protoplastes d'Euglena Gracilis contenant des chloroplastes d'un autre type pourrait apporter d'intéressants éléments de réponse.

## PREMIERE PARTIE

### CHAPITRE II

Euglena Gracilis est une algue verte unicellulaire dont l'organisme est assez particulier.

Il est donc censé de supposer que ses protoplastes puissent former une population de nature et de comportement éloignés des standards, tels que Nicotiana ou Pétunia, les plus étudiés.

Pour pouvoir adapter le meilleur plan expérimental à ce système totalement inconnu, il semblait tout à fait nécessaire de parcourir l'essentiel des travaux réalisés avec d'autres.

Cependant, comme nous l'avons dit plus haut, la littérature citée à propos d'expériences utilisant la fusion protoplastique est très abondante.

D'autre part, hormis les préoccupations d'ordre méthodologique, c'est en réalité sur le sujet très précis, très pointu, de la réalisation de transferts d'organites de type chloroplaste dans des protoplastes que doit être concentrée notre attention.

Il apparaît alors clairement qu'aucune de ces deux parties, pourtant étroitement liées, ne puisse être traitée dans l'autre.

Ainsi, cette étude sera bipartite :

- d'une part nous traiterons le plus largement possible la seule partie méthodologique des travaux décrivant la fusion protoplastique au sens large,
- d'autre part, nous nous consacrerons à une synthèse plus approfondie de la littérature précisément relative aux expériences de transfert d'organites.

## PREMIERE PARTIE

### CHAPITRE III

#### ASPECTS METHODOLOGIQUES

##### A. CHOIX DE LA DOCUMENTATION SECONDAIRE

Le projet original de cette synthèse reposait sur l'utilisation de façon primordiale des bases de données spécialisées, soit BIOPASCAL (servie par TELESYSTEMES et l'AGENCE SPATIALE EUROPEENNE) et BIOSIS (servie seulement par l'A.S.E.).

En ce qui concerne l'établissement du rapport technique, nous avons pour certaines raisons, -exposées plus loin-, choisi d'utiliser également la consultation manuelle systématique de BIOLOGICAL ABSTRACTS, de 1982 à 1975.

Enfin, à celles obtenues avec ces deux outils s'ajoutent quelques références obtenues grâce aux bibliographies d'articles, à propos surtout de la synthèse méthodologique.

##### B. STRATÉGIE DE RECHERCHE

Il est évident que la bipartition du plan d'étude ne pouvait qu'être fidèlement reflétée par l'organisation des recherches, pour l'établissement d'un ensemble cohérent de données.

Aucune méthode efficace et réellement constructive ne pouvait se concevoir qui aurait englobé la résolution simultanée des deux problèmes.

C'est la raison pour laquelle nous avons mis au point, et posé deux équations logiques différentes.

## 1. Conception de la première équation. (rapport technique)

Lors d'un premier essai effectué le 04 / 05 / 82 sur BIOPASCAL, la question:

PROTOPLASTE ? ET FUSION ?

avait obtenu 191 réponses, ce qui, de toute évidence, est un chiffre beaucoup trop élevé, étant donné le sujet, pour dénombrer la littérature réellement significative.

Ce résultat signifie qu'il existait donc à cette date sur BIOPASCAL 191 références comportant à la fois le descripteur PROTOPLASTE et le descripteur FUSION sous toutes les formes que permet la troncature à gauche.

Le problème rencontré ici est non négligeable, dans la mesure où, pour produire un rapport complet, il est indispensable de reprendre les mêmes descripteurs; ainsi, il faut pouvoir sélectionner les textes représentatifs dans la masse des autres;

En réalité même, le nombre des références concernées par cette équation est plus grand encore: Le 15 / 01 / 82, l'effectif des réponses sur BIOSIS devait atteindre 299.

Il faut pour comprendre ce chiffre énorme, réaliser le nombre important de publications dans lesquelles, étant donné son succès en Biologie Végétale, la fusion protoplastique depuis un certain nombre d'années n'est plus étudiée en soi, mais utilisée en tant que méthodes, à d'autres fins.

Cette situation est d'autant plus réelle que les références fournies par l'outil de recherche automatique en Biologie sont dans leur ensemble relativement récentes.

De plus, les descripteurs choisis sont très significatifs, très spécifiques, ne possèdent presque pas de synonymes, et ont donc le profil type de mots clefs attribuables dans la plupart des cas de figure.

Il a donc fallu, pour retrouver l'information utile, se livrer à l'élimination de tous les documents dans lesquels le rapport d'expériences de fusion protoplastique ne pouvait fournir d'éléments indispensables, et de tous les documents contenant de toute évidence une information non pertinente.

C'est ainsi que nous avons éliminé, en allongeant l'équation logique originelle de quelques assertions:

- tous les travaux relatifs à des systèmes procaryotiques
- tous les rapports mettant en lumière des événements nucléaires
- tous les textes dont le titre ne comportait aucun des deux descripteurs (l'analyse d'un échantillon obtenu à l'issue du premier essai a montré qu'ils étaient rarement pertinents)

## PREMIERE PARTIE

### CHAPITRE III

#### ASPECTS METHODOLOGIQUES

##### A. CHOIX DE LA DOCUMENTATION SECONDAIRE

Le projet original de cette synthèse reposait sur l'utilisation de façon primordiale des bases de données spécialisées, soit BIOPASCAL (servie par TELESYSTEMES et l'AGENCE SPATIALE EUROPEENNE) et BIOSIS (servie seulement par l'A.S.E.).

En ce qui concerne l'établissement du rapport technique, nous avons pour certaines raisons, -exposées plus loin-, choisi d'utiliser également la consultation manuelle systématique de BIOLOGICAL ABSTRACTS, de 1982 à 1975.

Enfin, à celles obtenues avec ces deux outils s'ajoutent quelques références obtenues grâce aux bibliographies d'articles, à propos surtout de la synthèse méthodologique.

##### B. STRATÉGIE DE RECHERCHE

Il est évident que la bipartition du plan d'étude ne pouvait qu'être fidèlement reflétée par l'organisation des recherches, pour l'établissement d'un ensemble cohérent de données.

Aucune méthode efficace et réellement constructive ne pouvait se concevoir qui aurait englobé la résolution simultanée des deux problèmes.

C'est la raison pour laquelle nous avons mis au point, et posé deux équations logiques différentes.

## 1. Conception de la première équation. (rapport technique)

Lors d'un premier essai effectué le 04 / 05 / 82 sur BIOPASCAL, la question:

PROTOPLASTE ? ET FUSION ?

avait obtenu 191 réponses, ce qui, de toute évidence, est un chiffre beaucoup trop élevé, étant donné le sujet, pour dénombrer la littérature réellement significative.

Ce résultat signifie qu'il existait donc à cette date sur BIOPASCAL 191 références comportant à la fois le descripteur PROTOPLASTE et le descripteur FUSION sous toutes les formes que permet la troncature à gauche.

Le problème rencontré ici est non négligeable, dans la mesure où, pour produire un rapport complet, il est indispensable de reprendre les mêmes descripteurs; ainsi, il faut pouvoir sélectionner les textes représentatifs dans la masse des autres;

En réalité même, le nombre des références concernées par cette équation est plus grand encore: Le 15 / 01 / 82, l'effectif des réponses sur BIOSIS devait atteindre 299.

Il faut pour comprendre ce chiffre énorme, réaliser le nombre important de publications dans lesquelles, étant donné son succès en Biologie Végétale, la fusion protoplastique depuis un certain nombre d'années n'est plus étudiée en soi, mais utilisée en tant que méthodes, à d'autres fins.

Cette situation est d'autant plus réelle que les références fournies par l'outil de recherche automatique en Biologie sont dans leur ensemble relativement récentes.

De plus, les descripteurs choisis sont très significatifs, très spécifiques, ne possèdent presque pas de synonymes, et ont donc le profil type de mots clefs attribuables dans la plupart des cas de figure.

Il a donc fallu, pour retrouver l'information utile, se livrer à l'élimination de tous les documents dans lesquels le rapport d'expériences de fusion protoplastique ne pouvait fournir d'éléments indispensables, et de tous les documents contenant de toute évidence une information non pertinente.

C'est ainsi que nous avons éliminé, en allongeant l'équation logique originelle de quelques assertions:

- tous les travaux relatifs à des systèmes procaryotiques
- tous les rapports mettant en lumière des événements nucléaires
- tous les textes dont le titre ne comportait aucun des deux descripteurs (l'analyse d'un échantillon obtenu à l'issue du premier essai a montré qu'ils étaient rarement pertinents)

-les documents dans le contexte desquels les deux descripteurs étaient séparés de plus de huit mots (En anglais, protoplast fusion est un groupe nominal au sens strict, et, disjoint, il porte rarement la même valeur sémantique; d'ailleurs la limite de huit mots est presque trop reculée).

-et enfin, toutes les références antérieures à 1978: en effet, il semblait préférable, pour tirer le meilleur parti de la situation, de se tourner résolument vers la recherche des mises au point ou des innovations les plus récentes. Il paraissait inutile en effet de vouloir un résultat

(Voir la photocopie de la recherche ci jointe)

Cette équation a conduit, comme on peut le constater, à l'obtention, le 15/01/82 sur BIOSIS, de 33 références dont a été demandée l'édition en différé.

Il faut préciser ici que la base BIOSIS a été, délibérément, la seule interrogée, en raison de sa beaucoup plus grande spécialisation, (BIOPASCAL est en réalité une partie de PASCAL obtenue par restriction automatique), et de la différence de taille en sa faveur (plus de cent références supplémentaires pour la même question à peu d'intervalle)

## 2. Seconde équation logique:

Dans la recherche de documents traitant d'un sujet aussi pointu et aussi clairement délimité que celui de la seconde partie de notre synthèse, l'équation logique est, par contre, très facile à obtenir.

En effet, lorsque l'étude atteint un tel degré de finesse, en Génétique comme dans d'autres disciplines Biologiques, les concepts scientifiques sont décrits par des mots précis, toujours chargés du même sens, peu remplaçables.

(Voir le document de travail photocopie, ci joint)

Pour balayer le vocabulaire adéquat dans les deux bases qui sont de langue différente, nous avons posé une équation composée de tous les descripteurs tronqués.

Le résultat de cette opération a été:

- sur BIOSIS, l'affichage de 38 références
- sur BIOPASCAL, celui de seulement 24 références, presque toutes redondantes par rapport aux précédentes.

## C. STRATÉGIE DE RECHERCHE DANS LES BIOLOGICAL ABSTRACTS

Pour consulter avec le meilleur rendement possible l'énorme masse de cet ouvrage, nous avons procédé en recherchant, tome

par tome, le mot clef

#### PROTOPLASTE

dans les index alphabétiques par tomes, puis, dans la liste des descripteurs associés, le mot FUSION, ou tout autre laissant supposer qu'il s'agissait de fusion.

Pour ce travail, l'habitude, et la connaissance du sujet et du contexte sont les seuls facteurs d'efficacité et de pertinence.

Cette recherche a été pratiquée sur 7 années consécutives de BIOLOGICAL ABSTRACTS, du volume 72 au volume 60.

De nombreux articles intéressants ont été sélectionnés de cette façon.

#### D. RESULTATS

##### 1. Partie technique:

Malgré toute les précautions prises lors de la construction de l'équation de recherche, beaucoup d'articles encore parmi les 33 sélectionnés correspondent à des cas particuliers d'étude, peu instructifs en regard de notre objectif.

En effet, la plupart n'évoque que brièvement la méthode de fusion employée (principalement d'ailleurs l'induction par le P.E.G.).

Par contre, quelques unes apportent des éléments intéressants comme la mise au point de nouvelles techniques et un certain nombre d'idées originales.

En fait, l'essentiel des résultats valables a été obtenu après la consultation des B.A., par la lecture des résumés des textes répertoriés sous les bons descripteurs, permettant le choix des documents les plus significatifs.

C'est, finalement, par la lecture de ces articles eux mêmes, et de leur bibliographie, que la composition de la base documentaire finale a été décidée.

##### 2. Partie synthétique:

Ici par contre, le taux de pertinence calculé sur l'effectif des réponses est très fort. (0,6 à 0,8)

Non seulement la quasi totalité des textes sélectionnés s'est révélée être parfaitement à propos, (faible bruit), mais encore l'étude des bibliographies d'articles, par la suite, a montré que peu de travaux importants avaient échappé au traitement. (faible silence).

Mieux encore, lors de la recherche des documents primaires, il est apparu que la plupart des documents non récupérés ne l'avaient pas été pour leur appartenance à des sources peu communes.

D'autre part, la lecture du contenu du fonds documentaire n'a jamais mis en évidence de descripteur suffisamment utilisé dans le domaine, suffisamment précis, pour qu'il ait pu fournir d'autres informations importantes.

#### E. OBTENTION DES DOCUMENTS PRIMAIRES

Etant donnée la spécialisation de la bibliothèque interuniversitaire de la DOUA, en Sciences, et particulièrement en Sciences Biologiques, aucun problème particulier n'a été rencontré dans la recherche des articles et des rapports de toutes sortes correspondant aux références.

En effet, tous ceux qui ne se trouvaient pas dans les rayons de la bibliothèque elle-même, ont pu être commandés par les systèmes de prêt inter-bibliothèques.

Quelques documents ont fait exception à cette règle; mais leur origine en était la raison principale (périodiques inexistant dans le territoire français, littérature grise étrangère...).

DEUXIEME PARTIE

## DEUXIEME PARTIE

## CHAPITRE I

## SYNOPSIS DES TECHNIQUES

## A. METHODES ORIGINELLES

1. Préliminaires

Les premiers éléments permettant de supposer la réalisation de la fusion de protoplastes furent rapportés très tôt au début du siècle.

Les techniques employées pour induire cette fusion étaient alors tout à fait rudimentaires, consistant en la compression mécanique des protoplastes les uns contre les autres ( 33, 34, 35 ).

Il sembla établi à l'époque que la fusion était complète, et qu'elle était facile à obtenir. Il apparut vite cependant que le peu de reproductibilité des travaux ne permettaient pas une telle conclusion.

Pour HOFMEISTER ( 35 ), qui reprit la majorité des expériences de ses prédécesseurs, la fusion protoplastique apparut au contraire comme un phénomène rare, et exceptionnel. Il avait cependant mis au point une technique par micromanipulation avec micropipettes et microaiguilles qui devait en inspirer d'autres ( 36 ).

Il fut le premier à constater que de meilleurs résultats étaient obtenus en milieu constitué d'eau de mer, ce qui devait éclairer le rôle de l'ion sodium.

## 2. Le Nitrate de Sodium

Avec des populations protoplastiques isolées enzymatiquement, POWER et al., en 1970, (37) démontrent l'efficacité de solutions de nitrate de sodium dans l'induction de fusions intra et interspécifiques de protoplastes de différentes origines. Il faut noter que les protoplastes étaient soumis à plasmolyse préalable dans du sucrose.

Les produits de fusion, observés en microscopie photographique, se distinguent nettement de produits de fusion spontanée.

L'action du nitrate de sodium, encore mal comprise par les auteurs, leur semble avoir son explication dans le bouleversement de propriétés électriques membranaires.

Plus tard, SCHENCK et HILDEBRANDT, (36) attribuent, à l'issue d'essais comparatifs, la même efficacité à  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ , et  $\text{LiCl}$ , ce qui accorderait à l'ion lithium la même efficacité que l'ion sodium; ce résultat ne semble jamais avoir été confirmé.

Quoi qu'il en soit, l'étape fondamentale de toute fusion protoplastique apparaît déjà comme étant le rapprochement étroit des membranes protoplastiques délivrées par l'inducteur de forces de répulsion électrique. Sous l'effet d'un pH légèrement acide, le plasmalemma pourrait atteindre un "point neutre". (36).

Cependant, l'établissement des conditions expérimentales les plus adéquates est encore difficile, la fusion protoplastique restant par ces méthodes un phénomène très aléatoire. Mais il est clair que l'un des facteurs capitaux est la conservation de la viabilité protoplastique après action de l'inducteur (36, 37).

D'autres travaux, menés en parallèle avec des électro-nographies, montrent que le  $\text{NaNO}_3$  induit des fusions locales du plasmalemma avec tendance à l'élargissement jusqu'à la formation de ponts cytoplasmiques par lesquels pourraient transiter des organites (37). L'évidence de la formation de nouveaux murs cellulaires autour des corps de fusion permet de penser que le  $\text{NaNO}_3$  ne se pose pas en inhibiteur de la régénération de la paroi (37). Il semble cependant que cet inducteur soit moins opérant pour les systèmes hautement vacuolisés.

En fait, les difficultés d'observation liées à l'apparition de gros agrégats polyprotoplastiques, la lente coalescence des corps de fusion quand ils existent, et le peu de fiabilité des méthodes, ne permettent pas de

conclure à une fusion véritable ni même le calcul d'une fréquence significative.

Enfin, même lorsque la fusion semble avoir eu lieu, les produits n'ont pas présenté d'activité mitotique au cours de cultures subséquentes, et aucune plante entière n'a pu se développer à partir de ces systèmes. ( 36, 37 ).

### 3. Mélanges salins:

Une fois constatée l'efficacité du nitrate de sodium, de nombreux auteurs ont testé d'autres solutions salines ( 35, 38 )

H. BINDING, par exemple, obtient de forts pourcentages de pro-toplastes "hybrides" avec des solutions d'eau de mer, et de

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,2M	
CaCl <sub>2</sub>	0,2M	En pH = 8
Lysozyme	0,05%	
et NaNO <sub>3</sub>	0,9M	et Mannitol 0,6M
(comparativement)		(stabilisateur osmotique.)

Il lui apparaît ainsi que la présence d'ions calcium, en pH alcalin, induit correctement le phénomène. ( 38 )

Lui aussi cependant remarque que l'induction peut avoir lieu au détriment de la viabilité protoplastique.

### 4. Autres méthodes

L'action de certains anticorps ( 39 ), de la concanavoline A ( 40 ), et d'autres lectines ( 40, 41 ) est remarquable pour provoquer l'agglutination, mais jamais la fusion véritable.

## B. METHODES CLASSIQUES

### 1. Méthode de KELLER et MELCHERS (42)

Les résultats obtenus avec Na NO<sub>3</sub> conduisent à penser que cet agent est en fait responsable d'une forte agglutination protoplastique, et plus rarement de phénomènes de fusion.

Cette réalité a conduit de nombreuses équipes à rechercher d'autres substances inductrices.

En s'inspirant d'une méthode employée en Biologie Animale, KELLER et MELCHERS procèdent à l'incubation de protoplastes de tabac en milieu de pH élevé (optimum entre 9,5 et 10,5) en présence d'ions calcium. ( 42 ). Ils constatent alors l'occurrence d'un grand nombre d'évènements positifs.

Les trente premières minutes de traitement (plus longtemps, il y a lyse), conduisent à de gros corps de fusion multinucléés qui, rapidement prennent une forme sphérique rappelant celle des produits de fusion spontanée.

Leur culture subséquente montre qu'il n'y a pas atteinte de la viabilité des protoplastes.

Cependant, aucun des hétéroplastés obtenus ne se divisera et ils mourront tous dans les premiers jours de culture.

Les résultats de ce travail, (rôle fondamental d'un stabilisateur osmotique, concentration optimale du  $\text{CaCl}_2$  autour de 0,5M, température  $37^\circ\text{C}$ , pH alcalin) s'accordent avec ceux de BINDING, quasiment contemporains (38).

Dans leur rapport, les auteurs supposent que l'élévation de pH modifie l'équilibre électrique membranaire du protoplaste, normalement porteur d'une charge électrique surfacique négative (42).

Le calcium, pour sa part, servirait à la stabilisation du protoplaste, tout en favorisant l'accolement des membranes.

Quoi qu'il en soit, l'application de cette technique a fourni les premières fréquences de fusion réellement intéressantes (entre 20 et 50%).

## 2. Le polyéthylène glycol (P.E.G.)

C'est à l'issue des travaux de KAO et MICHAYLUK en 1974, que se révèle comme l'un des inducteurs les plus puissants de la fusion protoplastique, le devenu très célèbre polyéthylène glycol. (43).

En effet, cette équipe rapporte que des solutions de PEG de haut poids moléculaire provoquent dans quatre systèmes différents la fusion.

Des marqueurs protoplastiques permettent de constater qu'il y a répartition statistique des fréquences de fusion intra et intergénériques quelle que soit la taille de l'appareil vacuolaire.

Dans les faits, l'ajout du PEG provoque dans un premier temps une forte agglutination, amenant les plasmalemmes à une forte compression mutuelle. Ce n'est qu'au moment de l'élution qu'a lieu la fusion réelle.

Le pourcentage d'"hétérocaryons" obtenu varie beaucoup avec:

- \* La concentration du PEG (Minimum 21%)
- \* Son poids moléculaire (fourchette optimale entre  
1300-1600 = PEG 1540  
et 6000-7500 = PEG 6000)
- \* La proportion d'ions  $\text{Ca}^{++}$  et d'ions  $\text{K}^+$  présents  
(En effet, la présence de l'ion  $\text{Ca}^{++}$  est très favorable, alors que l'utilisation d'un tampon à base de citrate de potassium réduit nettement l'adhésion, ce qui suppose que l'ion  $\text{K}^+$  aurait un effet nettement inhibiteur de la fusion.)

- \* le temps d'incubation qui ne doit pas être trop long
- \* la dilution de l'enzyme cellulolytique: si elle est faite trop vite, il peut y avoir reconstitution de certains éléments de la paroi
- \* l'âge des protoplastes
- \* la densité de population

Il peut atteindre 10%.

Si la vitalité d'un protoplaste peut être jugée de par son aspect coloré et turgescant, les auteurs estiment que celle-ci est variable après l'action du P.E.G.

Parfois, il y a mort cellulaire, juste après le traitement; dans certains autres cas, les produits de fusion survivent mieux que les protoplastes isolés, et peuvent se diviser jusqu'au 7ème jour de la culture.

D'après KAO et al., le PEG, par l'établissement de liaisons hydrogènes, pourrait se comporter comme un pont intercellulaire.

Il peut lier l'ion  $Ca^{++}$ , comme beaucoup d'autres cations; son attachement à la membrane peut être directement ou indirectement fonction de cet ion.

A l'éluion, il se produirait une redistribution des charges électriques, de telle sorte que les membranes protoplastiques, déjà fortement rapprochées par zones, puissent fusionner sous l'interférence de groupes de charges opposées.

Un peu plus tard, en 1974, A. WALLIN, K. GLIMELIUS, T. ERIKSSON reprennent la méthode chez Daucus Carota, en se livrant à l'investigation de différentes conditions expérimentales (44).

Ce travail est doublé d'un rapport électronique.

Sont testés ici:

- \* la concentration du PEG (optimale 28%)
- \* le laps de temps s'écoulant entre la sortie de la solution cellulolytique et le traitement au PEG (le plus court possible)
- \* l'influence de la température (de 10° à 35°, optimum 35°)
- \* le rôle de différents cations mono et divalents ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ )

en calculant le pourcentage d'aggrégation et d'obtention de protoplastes di et plurinucléés.

D'après la répartition de ces derniers, on peut calculer une fréquence d'environ 24% d'événements positifs.

Le mécanisme d'action du PEG reste encore mal connu; on peut supposer que les propriétés osmotiques de ses solutions dans l'eau jouent un rôle.

Une forte perte d'eau au niveau de la membrane protoplastique peut contribuer à modifier la concentration et la configuration protéiques, et fluidifier les lipides.

Il y a plasmolyse et rapide déplasmolyse des protoplastes, traitement connu pour induire la cyclose.

Il est fort possible que la fusion membranaire ait lieu avant et qu'il n'y ait véritable mélange des cytoplasmes qu'à l'élution.

En fait, cet évènement peut être vu comme le déroulement de certaines étapes dans le temps; tout dépend de la définition que l'on donne de la fusion interprotoplastique (44).

Au même moment, KAO et al. (1974) mettent en évidence que la dilution du PEG par une solution de PH élevé, à forte concentration en ions  $Ca^{++}$ , (au lieu de le faire avec du milieu de culture au moment du lavage), est très favorable.

Selon les genres protoplastiques employés, une telle technique permet d'atteindre un rendement variable entre 0,10 et 0,35 (45)

L.C FOWKE et P.J RENNIE, sur ces bases, se sont livrés à une étude ultrastructurale du phénomène de fusion sous PEG (46)

Notons encore que la combinaison du PEG avec du DMSO (47) ou de la concanavaline A (48) semble améliorer les performances de celui-ci.

En ce qui concerne les algues, (pour se rapprocher du cas d'Euglena Gracilis), peu d'expériences de fusion hétéroplasmique apparaissent dans la littérature.

A titre d'exemple ici, nous citons les travaux de MATAGNE et al. (20, ~~21, 22~~) sur clamydomonas avec le PEG 6000 et ceux de OHIWA sur Zygnema et Spirogyra (PEG 6000 également) (24).

#### C - METHODES PARTICULIERES

a) Fusion mécanique : chez Acetabularia, PRIMKE et al. induisent des fusions réussies à 90% par une méthode de pression de deux protoplastes l'un contre l'autre reprenant ainsi la plus vieille idée (49).

b) L'alcool polyvinylique (P.V.A.).  
Dans certaines conditions (concentration pondérale entre mannitol), le PVA induit un fort pourcentage de fusion. Son effet semble comparable à celui du PEG (50).

- c) NAGATA et al. ont pour leur part provoqué la fusion protoplastique par l'action de phospholipide synthétique chargé positivement (51).
  
- d) D'autres auteurs enfin ont essayé de procéder par l'application d'un champ électrique et obtiennent de bons résultats (52).

## DEUXIEME PARTIE

## CHAPITRE II

ELEMENTS DE SYNTHÈSE

SUR LA RÉALISATION DU TRANSFERT D'ORGANITES CELLULAIRES

DANS DES PROTOPLASTES ISOLES

## A. INTRODUCTION

Depuis longtemps, au cours de l'expérimentation menée sur la fusion protoplastique, le destin des chloroplastes a été étudié, dans la mesure où leur existence et leurs propriétés permettent de marquer une cellule de façon stable. Les mutations affectant la chlorophylle ont souvent permis d'observer et de suivre les protoplastes concernés, et même de sélectionner les produits de fusion (travaux de MELCHERS et LABIB).

Cependant, lorsqu'on s'intéresse au chloroplaste lui-même, en tant que porteur d'une information génétique spécifique, on ne peut que souhaiter pouvoir le transférer sélectivement.

Ceci, en effet, permet d'envisager une approche beaucoup plus rigoureuse de sa génétique et de sa biologie, en le délivrant de ses interférences avec le reste du matériel cellulaire, en particulier nucléaire. Ainsi, à partir de cette base d'opérations de fusion incluant des chloroplastes, de nombreux scientifiques se sont tournés vers la réalisation de "fusions" de protoplastes avec des chloroplastes.

Ceci, tout d'abord, en isolant ceux-ci et en provoquant le phénomène par les mêmes inducteurs que pour la fusion sst.

Le mécanisme de ce type de fusion restant mal connu, nous préférons le terme "transfert" ou "incorporation".

Ensuite, quelques autres essais ont été faits pour tenter de transférer les organites autrement qu'isolés : par exemple par la production de protoplastes anucléés, ou encore en les intégrant à des liposomes.

Pour l'ensemble des raisons citées plus haut, les manipulations relatives au transfert d'organites ont été beaucoup plus précoces et plus nombreuses pour le chloroplaste que pour la mitochondrie pourtant proche à de nombreux points de vue.

C'est ainsi que, après avoir traité le cas du chloroplaste, nous évoquerons celui de la mitochondrie en un dernier chapitre de cette deuxième partie.

## B. TRANSFERT DE CHLOROPLASTES

### 1. Incorporation de chloroplastes par fusion de protoplastes :

Malgré le nombre des observations ayant concerné le chloroplaste, peu d'études ont été faites sur le comportement et le devenir précis de cet organite pendant et après la fusion.

Dans quelques exemples pris parmi les travaux consacrés à des algues, les auteurs remarquent que les chloroplastes paraissent intacts juste après la fusion (25) et même après 3 jours de culture (24,16).

Il ne sont entourés par aucune membrane supplémentaire dans le cytoplasme hétérogène des produits de fusion (16,25).

Cependant, dans le cas de fusions interspécifiques (16,22) comme intraspécifiques (22) les chloroplastes semblent rapidement affectés de dégénérescence. Et ceci même si la culture des produits de fusion peut être longtemps poursuivie et si ceux-ci ont une faible activité mitotique (16).

Lors du transfert d'organelles de Clamydomonas Reinhardii dans des protoplastes de carotte par fusion protoplastique, FOWKE et al. décrivent les protoplastes comme intacts tout d'abord, puis observent une désorganisation des membranes chloroplastiques (16). Ils proposent comme explication possible de phénomène une insuffisance dans l'intensité lumineuse expérimentale.

Auparavant, T. OHIWA (24) avait, lui aussi, rapporté l'observation de la dégénérescence de certains types chloroplastiques lors de fusions intergénériques de protoplastes de Zygnema et Spirogyra. En effet, lors de fusions polyprotoplastiques du type  $n + 1$ , les chloroplastes du genre minoritaire perdent leur brillance en lumière polarisée (dûe aux structures lamellaires), et accumulent

En fait, les noyaux des deux algues ne coexistent pas non plus et le type nucléaire minoritaire dégénère aussi.

Dans les fusions de type  $1 + 1$ , ces phénomènes sont limités. Mais en cas de dégénération du noyau de Spirogyra, les chloroplastes de Spirogyra dégénèrent aussi. Pour l'auteur, la dégénération chloroplastique suit la dégénérescence nucléaire et est dépendante de l'environnement cytoplasmique mais aussi, et surtout, d'une influence défavorable du noyau étranger (24).

Les phénomènes précis de la dégénérescence ont été étudiés en 1980 par RENNIE et al. lors de fusion intra et interspécifiques chez Vicia. (22)

Après deux ou trois jours de culture, les chloroplastes sont au voisinage du noyau ou pressés contre la membrane cytoplasmique. Il y a une certaine redistribution des membranes internes mais peu de changement.

Au bout de 7 jours, il y a réduction de la taille des graná, désorganisation des lamelles. Il n'y aura jamais cependant de bouleversements aussi dramatiques que pour les fusions intergénétiques de OHIWA, qui peuvent correspondre, selon les auteurs, à des phénomènes d'incompatibilité cytoplasmique réelle.

Les chloroplastes sont connus pour être des organites dynamiques ; leur différenciation a été observée dans de nombreux tissus cultivés.

Il s'agirait ici de <sup>de</sup> différenciation due à la nature différente de deux cytoplasmes, dont les systèmes mitotiques peuvent se contrarier par exemple.

(Il a été montré que des produits de fusion pouvaient présenter un rythme mitotique intermédiaire par rapport à ceux des protoplastes parentaux).

Sur le plan génétique, il apparaît, quoi qu'il en soit, qu'il n'y ait pas mélange de l'information génétique extra nucléaire lors de la fusion protoplastique (17). Et ceci même si celle-ci est réussie et conduit à l'obtention d'une plante hybride.

SMITH, KAO et COMBATTI, en effet, furent à l'origine de la création de 16 hybrides somatiques dans le système Nicotiana (17). L'étude des polypéptides constitutifs de la protéine de la fraction I montre que la petite sous-unité (codée par l'ADN nucléaire) est hybride. Donc, il n'y a pas de problème pour l'expression synergique des deux *génomés* nucléaires parentaux.

Or, la grande sous-unité n'est jamais hybride quant à elle.

D'après H. UCHIYAMA et S.G. WILDMAN, comme d'autres, la fusion protoplastique ne semble pas un moyen prometteur d'atteindre les gènes cytoplasmiques.

En 1980, MATAGNE, chez Clamydomonas, en provoquant la fusion intraspécifique de protoplastes porteurs de chloroplastes marqués (résistance à des antibiotiques) obtient les résultats suivants :

- Un tiers des produits de fusion *diploïdes* sont transmetteurs des marqueurs des deux parents,
- Deux tiers sont transmetteurs exclusifs de l'un des marqueurs.

Il doit exister un processus d'élimination des allèles chloroplastiques qui semble indépendant du mating type (21).

Il faut citer, enfin, au sujet de la fusion protoplastique, que l'on a remarqué de fréquents phénomènes d'élimination chromosomique comme on en constate en Biologie Animale après certaines fusions cellulaires (14).

La perspective de l'exploitation de ce phénomène par inductions directionnelles, comme cela est réalisé chez les produits de fusion cellulaires animaux, ouvre de nouveaux horizons.

## 2. Transfert de chloroplastes isolés :

- a) Les premières réalisations : problèmes liés au choix des systèmes de transfert.

C'est au célèbre travail de P.S. CARLSON en 1973 ( 1 ) que remonte l'origine des manipulations par lesquelles on a cherché à introduire des organites préalablement isolés dans des protoplastes.

Le matériel utilisé provenait intégralement de tissus de N. tabacum, (fusion intraspécifique), et CARLSON semble avoir procédé sans l'aide d'un quelconque agent de fusion. Ce point est l'un de ceux sur lesquels ses résultats ont par la suite été fortement remis en question.

En effet, CARLSON rapporte avoir obtenu l'incorporation de chloroplastes capables de réplication et de physiologie normales dans leur nouvel environnement cytoplasmique. (la souche protoplastique parentale choisie est mutante albinos, dépourvue de chloroplastes fonctionnels).

Ainsi, les chloroplastes auraient échappé à toute pinocytose et seraient restés parfaitement intègres.

Mieux encore, il décrit la régénération et le développement de plantes entièrement vertes à partir des produits de fusion.

Jusqu'à aujourd'hui, cet exemple est unique.

Tout ceci supposerait alors que le noyau des mutants albinos soit capable de supporter le fonctionnement des chloroplastes étrangers, et que ceux-ci, étant donné leur survie, puissent utiliser l'information nucléaire de façon normale.

En fait, de sérieux doutes ont été émis par la suite sur la réalité de ce transfert, et ceci, comme nous le verrons plus tard, à cause du mutant utilisé par CARLSON.

POTRYKUS, un an plus tard, utilise également un mutant albinos de Petunia chez lequel il essaye de transférer des chloroplastes normaux de la même espèce ( 2 ).

POTRYKUS, en revenant sur les travaux de son prédécesseur CARLSON, suggère que ce dernier aurait logiquement dû obtenir, non des plantes totalement vertes, mais les trois types de ségréants possibles dans ce cas d'hérédité cytoplasmique.

D'autre part, les feuilles et les racines du mutant albinos "variegated" de N. Tabacum sont souvent des chimères vert/blanc/blanc, et un protoplaste, phénotypiquement blanc, de ce type, peut très bien redonner, par développement, une plante verte.

Pour provoquer la fusion, il utilise  $\text{NA NO}_3$  0,21 M, qui est encore l'agent le plus efficace connu pour induire la fusion à l'époque, en parallèle avec une technique un peu particulière de centrifugation en présence de lysozyme à 0,03 %.

L'examen des hétéroplastés montre l'intégration d'un à vingt chloroplastes verts pour 50 à 100 plastés blancs avec une fréquence comprise entre 0,1 et 0,5%.

En microscopie photonique, par le biais du roulement des protoplastes entre lame et lamelle, l'auteur montre que les chloroplastes sont réellement intracellulaires.

Cependant, bien que les chloroplastes aient semblé stables au cours de celle-ci, la culture des produits n'a pu être menée plus de 6 jours, et aucune plante n'a pu être régénérée.

Pour beaucoup d'autres auteurs dont les travaux succéderont à ceux de CARLSON, l'origine des plantes obtenues est suspecte. En effet, cet auteur n'a obtenu aucune preuve suffisante de l'incorporation réelle de chloroplastes dans les protoplastes de *N. Tabacum*. (8,3)(9)  
D'ailleurs, en l'absence d'agent inducteur, même après centrifugation, aucun transfert n'a jamais été constaté (3,8).

D'autre part et surtout, chez le mutant albinos "variegated" de *N. Tabacum*, des cellules comportent un mélange de chloroplastes défectueux (dépourvus de chlorophylle) et de chloroplastes normaux. Il est donc parfaitement concevable qu'un protoplaste provenant des tissus de ce mutant puisse permettre la régénération d'une plante verte, s'il contient au moins un chloroplaste normal (8,17).

C'est ainsi que, par la suite, les transferts seront menés de préférence de façon interspécifique ou intergénérique de manière à pouvoir correctement distinguer les chloroplastes transférés de ceux du receveur, par exemple grâce à l'étude de la protéine de la fraction I chez *Nicotiana* (4,13,17,23).

Le système de *Nicotiana* a été repris par KUNG en 1974. Grâce à la centrifugation en présence de L. polyornithine, PM 120 000, il réalise la fusion interspécifique de protoplastes de *N. Tabacum* (mutant albinos "variegated") et *N. Suavolens*. (4)

Le choix de deux espèces différentes de *Nicotiana* vise principalement à permettre de reconnaître de façon fiable les hétéroplastés des protoplastes parentaux.

En effet, la ribulose diphosphate carboxylase, ou protéine de la fraction I, possède deux sous unités dont l'une est codée par l'ADN chloroplastique (large sous unité) et l'autre par l'ADN nucléaire (petite sous unité). Or, les polypeptides constitutifs de ces unités sont différents chez les deux espèces et reconnaissables en électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Après la fusion (fréquence 0,02%) des tissus verts se sont développés, mais aucun, sauf un, n'a survécu.

Il a conduit au développement d'un mutant albinos "variegated" stérile, et de morphologie anormale.

L'analyse des polypeptides constitutifs de la ribulose diphosphate carboxylase montre que les grandes sous unités des deux origines parentales sont présentes: donc l'A.D.N chloroplastique des deux espèces est présent et s'est exprimé.

Cependant les petites sous unités de N. Tabacum et de N. Suavolens sont également révélées par l'électrophorèse.

Ceci permet de conclure à une réelle incorporation des chloroplastes dans le cytoplasme protoplastique, et à leur fonctionnalité dans la physiologie de la plante obtenue.

Cependant, ceci signifie également qu'il y a eu introduction d'un noyau isolé de N. Suavolens dans ce même protoplaste. Ce noyau aurait été présent dans la fraction "chloroplaste" lors de la préparation de ceux-ci.

Pour KUNG, comme pour beaucoup d'autres par la suite, se pose le problème de la reproductibilité d'opérations spécifiques et surtout celle de la régénération de plantes viables à partir des produits de fusion.

## b) L'intervention du P.E.G

Dans les études suivantes consacrées à ce problème de transfert d'organites isolés, les méthodes préconisées comportent toujours l'utilisation du P.E.G pour induire le phénomène.

Le poids moléculaire du P.E.G est toujours pris parmi trois valeurs significatives correspondant au P.E.G 1500 (3, 9), 4000 (19) au P.E.G 1540 (13, 17, 18, 22, 16), ou au P.E.G 6000 (5, 8, 17, 20, 21).

La concentration pondérale des solutions est optimale entre 20% et 30% pour la majorité des rapports.

Au départ, et dès adjonction, le P.E.G provoque une forte et rapide adhérence des chloroplastes et des protoplastes entre eux.

Cette agglutination est si forte que souvent elle concerne de nombreux éléments de telle sorte qu'ils forment ensemble de gros agrégats.

Selon BONNETT (3), après 10 minutes d'incubation, lors de la dilution du milieu avec la solution de lavage, les agrégats se dissolvent.

Un certain nombre cependant de protoplastes conservent des chloroplastes fortement accolés à leur membrane, et la "fusion" organite-protoplaste se produit avec une fréquence comprise entre 9,5% et 16% (30 fois plus élevée que celle obtenue par POTRYKUS).

L'intégration des chloroplastes pourrait alors se produire à l'intérieur des agrégats cellulaires, sous l'effet de forces de compression douce.

En fait, beaucoup de points de vue différent de celui-ci: l'adhérence chloroplastique ne serait qu'une première étape. L'incorporation véritable n'aurait lieu, dans un second temps, qu'à l'éluion du P.E.G, de façon analogue à ce qui se passe pour la fusion protoplastique au sens strict (5, 17, 18).

Il est, de toutes façons, à noter que le phénomène est exalté par un accroissement de la densité protoplastique, à l'origine d'un taux d'aggrégation plus fort (9).

Ici, comme ailleurs dans de nombreux rapports, le ratio chloroplastes / protoplastes apparaît comme un facteur de grande importance.

A une exception près, (8) on ne signale jamais d'agglutination et de fusion de chloroplastes entre eux.

Les protoplastes incorporent souvent plusieurs chloroplastes, qui sont le plus souvent intégrés ensemble que de façon indépendante (ils sont souvent groupés à l'intérieur du cytoplasme périphérique, après leur transfert (3, 5, 21), puis peuvent se répartir en couche sous le plasmalemme (3, 5)).

Au cours de leurs travaux, VASIL et GILES ( 5 ) arrivent à intégrer jusqu'à 40 protoplastes d'épinard dans des protoplastes de Neurospora Crassa, avec une fréquence spectaculaire de 50%. Dans ce cas, les organites se répartissent en une couche unique, dense, juste sous le plasmalemme.

Avant l'utilisation de méthodes de détection par immunofluorescence, (16,17), la situation intracellulaire des organites était vérifiée par l'observation avec roulement des protoplastes entre lame et lamelle (2,3).

En tous cas il semble à peu près sûr que l'action fusogène du P.E.G ne s'accompagne pas de dommages notables pour les protoplastes et les chloroplastes (3,5). *Ce a. Ser remis en doute (19,20)*

c) Etude des conditions de l'intégration; les phénomènes de membrane.

Jusqu'au rapport de DAVEY et al. en 1976, il avait été peu discuté de l'éventualité de modifications structurales profondes infligées aux organites lors de leur intégration.

A vrai dire, les quelques observations faites en microscopie photonique, et selon lesquelles les chloroplastes auraient paru normalement constitués ne pouvaient fournir d'arguments suffisants.

Les travaux de DAVEY et COKING en 1972 avaient établi que des protoplastes, après plasmolyse, se révélaient capables d'intégrer des microorganismes piégés dans des invaginations du plasmalemme. (14)

Or, le P.E.G, ajouté en solution adéquate à une culture de protoplastes, comme lors de l'induction, provoque une rapide baisse du volume cellulaire, et se comporte donc en agent plasmolytique (3,8,9).

Parmi d'autres hypothèses, on peut supposer que les organites du type chloroplaste sont intégrés de la même façon. Dans ce cas, ils seraient toujours enclos dans des vésicules membranaires au sein du cytoplasme hôte. Une telle situation cependant ne peut sous entendre une physiologie normale, en raison de la barrière représentée par une cytomembrane supplémentaire.

Le degré de liberté des organites dans le cytoplasme hôte est, de ce fait, un paramètre très important.

Ainsi, DAVEY et son équipe en 1976 essaient de fournir une étude ultrastructurale du transfert, et discernent trois types de situations électrographiques. (8)

Dans le premier cas, l'isolement des chloroplastes les a brisés et ils sont dépourvus d'enveloppe propre et de stroma ( type C).

Leur intégration se fait à l'intérieur de profondes invaginations du plasmalemme.

Ceci conduit à des electronographies dans lesquelles de larges vésicules ont entraîné des lamelles chloroplastiques loin dans le cytoplasme hôte, sans jamais qu'il ne se produise de fusion entre ces lamelles et le plasmalemme.

Dans le second, les chloroplastes complets, avec leur double membrane intacte (type A), s'accollent fortement au plasmalemme invaginé sous l'effet du P.E.G.

Il se produit alors des fusions membranaires locales de l'enveloppe chloroplastique sur elle même puis avec le plasmalemme, de sorte que le stroma chloroplastique se retrouve en continuité avec le cytoplasme.

Pour les chloroplastes de type B, ne possédant plus qu'une membrane après leur isolement, il y a transfert dans des vésicules membranaires de la même façon que pour le type C. Cependant, par la suite, ils perdent leur unique enveloppe par morceaux qui se replient, et certaines fusions avec la membrane vésiculaire finissent également par réaliser la continuité stroma-cytoplasme.

D'autre part, le P.E.G induit beaucoup de fusions interproto-plastiques. DAVEY et al. suggèrent que l'intégration de chloroplastes puisse se faire par emprisonnement entre les membranes, de telle d'où l'apparition de larges vésicules contenant des organismes détériorés et parfois des morceaux d'enveloppes (type C ou types A et B dégradés.)

Dans tous les cas, structure et physiologie des organites sont fortement endommagés. Pour les auteurs, les processus ultérieurs seront plus dégénératifs que régénératifs et le fonctionnement normal des chloroplastes est peu probable à l'issue de ce genre de manipulation.

En fait, hormis l'intérêt génétique que peut représenter l'apport d'un génôme chloroplastique isolé, ils accordent peu de crédit à la méthode.

Les résultats de VASIL et GILES sur Neurospora ( 5 ) sont ici jugés comme attribuables à la nature des cellules du champignon dont le comportement peut se rapprocher de celui de cellules animales (engluement amoéboïde de particules).

Les conclusions pessimistes de cette équipe sont à peu près uniques en leur genre, et ont été souvent citées.

Pour BONNETT, lorsqu'il examine en microscopie électronique le résultat du transfert de chloroplastes de carotte dans des protoplastes de Vaucheria, il semble évident que les organites ne sont entourés d'aucune membrane supplémentaire puisque dans certains cas ils sont même dépourvus de toute structure membranaire. La pincytose est donc exclue; plusieurs images d'ailleurs montrent des chloroplastes libres et complets ( 9 ).

Enfin, l'entrée des chloroplastes dans le cytoplasme étranger n'est pas liée à l'occurrence de fusions protoplastiques: en effet, les corps de fusion multinucléés n'ont pas plus de chance que les autres de contenir des chloroplastes.

On peut même établir certaines conditions dans lesquelles l'adhérence chloroplastique est favorisée par rapport à la fusion interprotoplastique ( 17 ).

Les observations de BANKS et al. ( 12 ), plus tard, confirment les observations de BONNETT, soit l'absence de cytomembrane vésiculaire, grâce à la technique des coupes fines.

#### d) Recherche de systèmes efficaces et fonctionnels

Armés des conclusions de leurs prédécesseurs, de nombreux groupes de chercheurs ont essayé d'améliorer les performances des systèmes.

Avec celui de Nicotiana, UCHIYAMA et WILDMAN essaient d'incorporer les chloroplastes de N. gossei dans les protoplastes de N. Tabacum (mutant "variegated") en testant de nombreuses possibilités.

Le sulfate de dextrane, la gélatine, la poly-L-ornithine, le lysozyme ne permettent jamais les rendements du P.E.G.

En faisant varier de nombreux paramètres, (ratio, temps d'incubation, stabilité et valeur du pH, température, présence ou absence de certains ions), il est possible de mettre au point des conditions dans lesquelles sont obtenues des fréquences allant jusqu'à 40%. (16, 17).

En particulier, la présence de l'ion  $Ca^{++}$  est indispensable dans la solution de P.E.G.

Les objectifs fondamentaux à atteindre apparaissent rapidement comme étant la survie des organites dans le cytoplasme hôte, leur fonctionnement, et surtout la possibilité de régénération de plantes entières ou d'organismes viables à partir des produits de transfert.

Grâce à l'étude des polypeptides de la protéine de la fraction I, UCHIYAMA et al. montrent que malgré l'établissement des conditions expérimentales les meilleures, il n'y a pas d'expression de l'information génétique des chloroplastes transférés. (17)

Dans le système de N. Tabacum, (mutant "variegated" et N. Excelsior, (chloroplastes normaux), LANDGREEN et BONNETT (19) ) étudient les problèmes de survie organellaire et cellulaire liés à la concentration du P.E.G, aux méthodes de rinçage, et à la densité des protoplastes dans le milieu.

Ils mettent en évidence qu'un certain nombre d'améliorations doivent être opérées dans le but de résoudre ces problèmes.

En effet, dans les expériences pour lesquelles le protoplaste receveur est possesseur de chloroplastes mutés, si on opère un contrôle sévère (13, 19, 17), jamais de plantule autotrophe n'a été régénérée, même si la culture a pu parfois être prolongée longtemps.

Il semble donc que toute l'attention doive être concentrée sur la recherche de conditions permettant la survie harmonieuse de tous les éléments concernés, au cours de l'incorporation comme après. Et ceci, en passant par l'observation des événements subis par ces éléments dans les premiers jours de leur coexistence artificielle. (19, 23, 10, 13).

### 3. Transfert de chloroplastes par fusion de subprotoplastes avec des protoplastes

Un subprotoplaste est une partie de protoplaste dans la mesure où il lui manque des éléments du contenu cellulaire normal, outre la paroi.

Pour H. BINDING et R. KOLLMAN, les problèmes dus à une incorporation incomplète des organites dans le cytoplasme receveur, ou à la perte de vitalité provoquée par l'isolement, peuvent être détournés par l'utilisation de subprotoplastes.

Dans un article de synthèse ( 41 ), ils font une revue des différents aspects de la méthode sur la base d'exemples ponctuels.

Pour réaliser son expérimentation dans l'espèce des Solanacées, H. BINDING -1976- ( 7 ) utilise des subprotoplastes comprenant une partie stratégique de l'information cellulaire (nucléaire ou cytoplasmique).

Il réalise la fusion de subprotoplastes de tomate avec des protoplastes de Pétunia, en parallèle avec la fusion protoplastique au sens strict.

Cette méthode lui permet de tester l'influence séparée des génomes nucléaires et extranucléaires sur les événements de l'hybridation protoplastique ( 7 ).

#### 4. Incorporation de chloroplastes par l'intermédiaire de liposomes

L'utilisation de vésicules lipidiques artificielles pour introduire, avec le minimum de dommages, des organites dans le cytoplasme protoplastique a été l'objet du travail original de K. GILES, V. VAUGHAN, J. P. RANCH et J. EMERY en 1979. ( 20 ).

Des liposomes, positivement chargés, contenant des chloroplastes d'épinard (Spinacea Oleracea) sont mélangés à des protoplastes de Neurospora Crassa, puis de Datura Innoxia.

La fusion -qui peut parfaitement se passer d'inducteur dans ce cas- a lieu immédiatement entre le liposome chargé et la membrane protoplastique.

Les chloroplastes, qui restent groupés 4 ou 5 heures, se détachent ensuite et adoptent une position périphérique.

La vitalité des chloroplastes ne paraît pas du tout atteinte; la souche a bien pu être cultivée mais sans activité mitotique.

L'étude s'enrichit ici d'une mesure de l'activité des lipochloroplastes inclus dans le cytoplasme étranger. Or, celle-ci se maintient et se stabilise très bien. Par contre, celle de chloroplastes témoins; incorporés sous l'effet du P.E.G chute considérablement dans le même temps et s'annule vite.

De plus, la rétention du pigment est améliorée dans le premier cas par rapport au second.

Avec les chloroplastes de Datura, jusqu'à 85% des protoplastes intègrent 6 à 20 chloroplastes, qui restent groupés.

La production d'oxygène est plus forte encore que dans les protoplastes du champignon, mais elle baisse au bout de 24 heures.

En fait, en permettant d'obtenir une très forte fréquence d'intégrations, et sans effet néfaste d'aucun ordre sur la survie et le fonctionnement des chloroplastes, la méthode de transfert par inclusion dans des liposomes semble promise à un avenir brillant.

## C. TRANSFERT DE MITOCHONDRIES

### 1. Introduction

Les quelques travaux effectués depuis 1977 sur le transfert de mitochondries dans des protoplastes ont profité tout de suite de la sophistication des méthodes de fusion, en raison de leur récence.

Les plans d'expérience comporteront toujours l'utilisation du P.E.G.4000, à des concentrations de 30-35%.

D'autre part le système utilisé sera presque toujours la levure de boulanger Saccharomyces Cerevisiae, génétiquement bien connue. En effet de nombreux marqueurs mitochondriaux, comme la résistance à certains antibiotiques, permettent de suivre très rigoureusement le destin des organites qui les portent.

Enfin, il faut noter que cet organisme est unicellulaire, d'où certaines différences entre ce système et ceux utilisés pour le chloroplaste: en particulier, le problème de la régénération de plantules après le transfert ne se pose pas.

### 2. Transfert par fusion protoplastique

Parmi les premiers, FERENCZY et MARAZ réalisent la fusion de souches de Saccharomyces Cerevisiae de même type sexuel en suivant le destin des mitochondries marquées. ( 26 )

Le receveur possède des mitochondries mutées "petite", infonctionnelles, et est hétérotrophe pour le tryptophane. Le donneur, hétérotrophe pour l'adénine, apportera des mitochondries marquées par la résistance à l'erythromycine.

Les auteurs rapportent une fréquence de transfert de 0,6% par la caractérisation de produits de fusion diploïdes prototrophes résistants à l'érythromycine.

Après haploïdisation, 40% des ségréants montreront qu'ils possèdent les mitochondries du donneur. ( 26, 28 ).

### 3. Transfert de mitochondries isolées

En 1979, K.YOSHIDA procède à l'essai de la transformation de protoplastes de plusieurs espèces hétérothalliques de levure avec des mitochondries marquées.

Les mitochondries et les protoplastes forment de gros agrégats et YOSHIDA note que les mitochondries paraissent s'agglutiner également entre elles sous l'effet du P.E.G.

De façon intraspécifique comme interspécifique, les protoplastes receveurs acquièrent les caractéristiques respiratoires des mitochondries transférées avec une fréquence comprise entre  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$ . ( 27 ).

Avec le même type de marqueurs (mutation "petite" pour les mitochondries du receveur et résistance à un antibiotique pour les mitochondries transférées), N.GUNGE obtient une fréquence de protoplastes capables de respiration normale de  $10^{-8}$  (29).

Chaque fois, après l'exposé de leurs manipulations, les auteurs avancent plusieurs hypothèses en ce qui concerne le mécanisme de l'incorporation.

Cependant, les seules certitudes sont d'ordre génétique, de telle sorte que la transformation peut être le fait de l'A.D.N mitochondrial isolé, et l'intégrité des organites n'est donc pas une condition nécessaire à la cohérence des résultats.

Il est certain que des observations en microscopie électronique, ou bien que l'application de techniques de marquage radioactif seraient nécessaires pour avancer en ce domaine, la mitochondrie étant un organite très petit (27, 29).

### 3. Utilisation de miniprotoplastes

La très faible fréquence obtenue dans les plans précédents a conduit à la recherche d'autres méthodes de transfert n'incorporant pas le matériel nucléaire.

Ainsi, la propension de S. Cerevisiae à bourgeonner a été exploitée pour la formation de miniprotoplastes: en effet la migration des mitochondries dans le bourgeon a lieu avant celle du noyau; il suffit donc de traiter les cellules pendant la phase exponentielle de croissance par de enzymes lytiques, pour obtenir une forte proportion de protoplastes anucléés.

Toujours avec les mêmes systèmes de marquage, H.FUKUDA et A.KIMURA, après avoir induit la fusion entre protoplastes d'une souche et miniprotoplastes d'une autre, rapportent une fréquence de transfert mitochondrial de  $10^{-7}$  (30).

Un peu plus tard, la même équipe provoque une fusion intergénérique entre protoplastes de S. Cerevisiae et miniprotoplastes de Hansenula Wingei. La sélection des transformants est faite grâce à des marqueurs nutritionnels, et les auteurs atteignent une fréquence de  $10^{-6}$  (31).

Toujours chez S. Cerevisiae, A.MARAZ et L.FERENCZY en 1981, enfin, remarquent que le pourcentage de restauration de la respiration chez une souche receveuse peut atteindre  $2,3 \cdot 10^{-4}$ , grâce au transfert de mitochondries fonctionnelles. (32)

D'autre part, des miniprotoplastes peuvent être obtenus chez d'autres champignons, en particulier Aspergillus Nidulans. (32)

Une telle évolution dans les résultats est très encourageante, et de nombreux travaux sont menés dans ce domaine pour approfondir les possibilités et la mécanique des événements (31, 32).

## D. CONCLUSION.

Si l'on essaie de cerner l'ensemble de la littérature relative à ce sujet de pointe, on peut être surpris par la récence et la rapidité de succession des manipulations qui la composent.

Depuis les résultats trop remarquables de CARLSON, (1), les premiers travaux prirent un départ fulgurant, mais leur chemin devait être semé d'écueils.

Il a donc fallu attendre la mise au point de techniques plus rigoureuses (comme par exemple celles utilisant l'électrophorèse des polypeptides constitutifs de la protéine de la fraction I, ou le test de marqueurs organellaires) pour établir de façon fiable les bases de l'expérimentation.

Ceci condense alors les pièces de cet édifice sur une demi douzaine d'années. Mais il se constitue, dans cet intervalle très court, d'éléments ponctuels sans que vraiment encore on ne puisse constater de réelle coordination entre eux.

Cette réalité, qui existe certainement dans la plupart des domaines aussi nouveaux, explique un certain manque de cohérence dans le déroulement des opérations, et la multitude des directions encore inexploitées dans lesquelles auraient pu être recherchées des solutions, comme celle des points qui auraient pu être plus approfondis.

En fait, on peut définir plusieurs tableaux selon les grandes idées de cet ensemble, qui ne sont pas tous jointifs.

En particulier, la lignée des transferts a été lancée depuis la lignée des expériences de fusion, et il y a pourtant un fossé entre les deux. Les mêmes méthodes ont ainsi servi des buts proches mais très distincts, au détriment de certaines qualités importantes.

En effet, le problème fondamental qui se dégage de la masse des conclusions est celui de la perte des conditions de survie physiologique, fonctionnelle et interactive des organites subissant l'incorporation.

Lorsqu'on procède au transfert par fusion st, on ne peut se pencher réellement sur l'étude de l'organite lui-même, qui est connu pour interférer étroitement avec le reste du matériel cellulaire. D'ailleurs, cette nature est à l'origine, dans de nombreux cas, de sa fragilité aux interventions d'un matériel étranger, et il peut être atteint de dégénérescence pour des causes mal connues.

Cependant, ce mode de transfert est le seul à conserver aux organites une structure telle qu'il y ait eu développement de plantes entières par la suite.

D'autre part, du point de vue génétique, cette méthode n'a pas répondu à toutes les attentes.

De l'autre côté, lorsqu'on isole des organites, on compromet fortement leur intégrité et leur physiologie.

Dans ce cas, cependant, certaines transformations ont été obtenues ; mais un ADN isolé peut également le faire et cette évaluation du transfert est uniquement génétique. C'est la raison pour laquelle d'ailleurs on observe des fréquences si faibles au cours de l'étude des mitochondries par rapport à celles décrites pour le protoplaste.

Il faut noter d'ailleurs que les calculs de fréquences relatifs au transfert de chloroplastes sont entachés d'une certaine subjectivité. Il est fortement souhaitable, à cet égard, que de nouvelles techniques, de type de celle exploitant l'autofluorescence ou, par exemple, le marquage radioactif soient développées.

Ces fréquences ne sont, en fait, pas du tout homogènes, ni entre elles, ni avec celles relevées pour les mitochondries, et l'on ne peut en dresser de tableau cohérent.

Notons, enfin, que rares sont les équipes scientifiques qui se sont réellement livrées à l'établissement de revues concernant tous ces problèmes (10, 14, 23). Dans les dernières phases de l'expérimentation, beaucoup cependant ont reconnu qu'il fallait mettre en lumière ce qui était subi par les organites pendant et après leur intégration du cytoplasme étranger. Il est en effet indispensable que l'activité fonctionnelle et répliquative de ceux-ci soient intactes pour que toute étude rigoureuse au niveau génétique comme à tous les autres niveaux puisse être menée.

Les perspectives ouvertes par d'éventuels succès dans ce type de manipulation sont, il faut le reconnaître, particulièrement attirantes :

- approche fine de la biologie et de la génétique organellaires,
- amélioration des races et des semences de végétaux supérieurs,
- approfondissement des études sur l'induction de tumeurs,
- nouvelle vision possible de la théorie symbiotique,
- et surtout, transfert de la capacité de fixer l'azote atmosphérique -présentée par certaines bactéries et les algues bleues- à des végétaux supérieurs.

(10, 14, 23).

BIBLIOGRAPHIE

- ① The use of protoplasts for genetic research  
P.S.CARLSON  
Proc. Nat. Acad. Sci., 70(2):598-602 (1973)
- ② Transplantation of chloroplasts into protoplasts of Petunia  
I.POTRYKUS  
Z.fuer Pflanztenphysiol., 70(4):364-366 (1973)
- ③ Transfer of algal chloroplasts into protoplasts of higher plants  
H.T.BONNETT // T.ERIKSSON  
Planta, 120(1):71-79 (1974)
- ④ Polypeptide composition of fraction I protein from parasexual hybrid plants in the genus Nicotiana  
S.D.KUNG / J.C.GRAY / S.G.WILDMAN / P.S CARLSON  
Science, 187:353-355 (1975)
- ⑤ Induced transfer of higher plant chloroplasts into fungal protoplasts  
I.K.VASIL / K.L.GILES  
Science, 190(4215):680 (1975)
- ⑥ Chloroplasts uptake by isolated plant protoplasts  
H.T.BONNETT  
Plant Physiol., 56(2)(suppl.):38 (1975)
- ⑦ Somatic hybridization experiments in Solanaceous species  
H.BINDING  
Mol.Gen.Genet. 144(2):171-175 (1976)
- ⑧ Polyethylene glycol induced transplantation of chloroplasts into protoplasts:an ultrastructural assessment  
M.R.DAVEY / E.M.FREARSON / J.B.POWER  
Plant.Sci.Letters, 7(1):7-16 (1976)
- ⑨ On the mecanism of the uptake of Vaucheria Dichotoma chloroplasts by carrot protoplasts treated with polyethylene glycol  
H.T.BONNETT  
Planta, 131(3):229-233 (1976)
- ⑩ Organelle transfer into isolated protoplasts  
I.POTRYKUS / H.LOERZ  
Cell genetic in higher plants.Proceedings of an international training course.DUDITS,FARGAS,et MALIGA Eds.Vol.1976,N° RECD:183-190
- ⑪ The use of suprotoplasts for organelle transplantation  
R.KOLLMAN / H.BINDING  
Cell Genetic in higher plants.Proceedings of an international training course.DUDITS,FARGAS,et MALIGA Eds. Vol 1976 N° RECD:191-200
- ⑫ The uptake of chloroplasts by higher plant protoplasts  
M.S.BANKS / H.T BONNETT  
Plant Physiol., 57(5)(suppl.):51 (1976)
- ⑬ Parameters affecting initial uptake of chloroplasts by albino protoplasts of Nicotiana Tabacum  
H.UCHIYAMA / S.G.WILDMAN  
In Vitro, 13(3):195 (1977)

- ⑭ Uptake of foreign genetic material by plant protoplasts  
E.C. COCKING  
International review of cytology, 48: 323-343 (1977)
- ⑮ Novel techniques of gene transfer and plant improvement: an appraisal of transformation in Eukaryotes  
K.K. PANDEY  
New Phytol., 81(3): 685-704 (1978)
- ⑯ Transfer of organelles of the alga *Chlamydomonas Reinhardtii* into carrot cells by protoplast fusion  
L.C. FOWKE / P.M. GRESSHOFF / H.J. MARCHANT  
Planta, 144(4): 341-348 (1979)
- ⑰ Non translation of foreign genetic information for fraction I protein under circumstances favorable for direct transfer of *Nicotiana Glauca* isolated chloroplasts into *Nicotiana Tabacum* protoplasts  
H. UCHIYAMA / S.G. WILDMAN  
In Vitro, 15(6): 463-468 (1979)
- ⑱ Chloroplast adherence to plant protoplasts  
H. UCHIYAMA  
Naturwissenschaften, 66(6): 314-315 (1979)
- ⑲ The culture of albino Tobacco *Nicotiana Tabacum* protoplasts treated with polyethylene glycol to induce chloroplast incorporation  
C.R. LANGREEN / H.T. BONNETT  
Plant. Sci. Letters, 16(1): 15-22 (1979)
- ⑳ Liposome mediated uptake of chloroplasts by plant protoplasts  
K.L. GILES / V. VAUGHAN / J.P. RANCH / J. EMERY  
In Vitro, 16(7): 581-584 (1980)
- ㉑ Chloroplast gene inheritance studied by protoplast fusion in *Chlamydomonas Reinhardtii*  
R.F. MATAGNE  
Eur. J. Cell Biol., 22(1): 503 (1980)
- ㉒ Differentiation of chloroplasts in interspecific and homospecific fusion products  
P.J. RENNIE / G. WEBER / F. CONSTABEL / L.C. FOWKE  
Protoplasma, 103(3): 253-262 (1980)
- ㉓ The analysis of organelle behavior and genetics following protoplast fusion or organelle incorporation  
H. BONNETT / A. WALLIN / K. GLIMELIUS  
Genetic Improvement of Crops. Emergent techniques, USA. Minneapolis univ. Minnesota Press : 137-152 (1980)
- ㉔ Behavior of cultured fusion products from *Zygnema* and *Spirogyra* protoplasts  
T. OHIWA  
Protoplasma, 97: 185-200 (1978)
- ㉕ Fusion of protoplasts from carrot cells culture and the green alga *Stigeoclonium*  
L.C. FOWKE / H.J. MARCHANT / P.M. GRESSHOFF  
Can. J. Bot., 59(6): 1021-1025 (1981)

- ②6. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces Cerevisiae*  
L.FERENCZY / A MARAZ  
Nature, 268(5620):524-525 (1977)
- ②7. Interspecific and intraspecific mitochondria-induced cytoplasmic transformation in yeasts  
K.YOSHIDA  
Plant.Cell Physiol., 20(4):851-856 (1979)
- ②8. Mitochondrial transfer by protoplast fusion  
L.FERENCZY / A MARAZ / M KISS  
Acta Microbiologica Acad.Sci.Hungaricae, 25(2):150 (1978)
- ②9. Fusion of mitochondria with protoplasts in *Saccharomyces Cerevisiae*  
N.GUNGE / K.SAKAGUCHI  
Mol.Gen.Genet., 170(3):243-248 (1979)
- ③0. Transfer of mitochondria into protoplasts of *Saccharomyces Cerevisiae* by miniprotoplast fusion  
H.FUKUDA / A KIMURA  
Febs Letters, 113(1):58-60 (1980)
- ③1. Transfer of mitochondria of *Hansenula Wingei* into protoplasts of *Saccharomyces Cerevisiae* by mini protoplast fusion  
K.YAMASHITA / H.FUKUDA / K.MURATA / A KIMURA  
Febs Letters, 132(2):305-307 (1980)
- ③2. Selective transfer of fungal cytoplasmic genetic elements by protoplast fusion  
A.MARAZ / L.FERENCZY  
Curr.Microbiol., 4:343-345
- ③3. E.KUSTER  
Arch.fur Entwicklungsmechanik der organ, 30:351-355 (1910)
- ③4. W.MICHEL  
Arch.F.Expt.Zellforschung, 20, 230-252. (1937)
- ③5. Production, manipulation and fusion of plant cell protoplasts as steps forward somatic hybridization  
R.U.SCHENK / A.C HILDEBRANDT  
Colloques internationaux du CNRS, N° 193 Les cultures de tissus de plantes :319 (1970)
- ③6. Fusion of isolated plant protoplasts  
J.B.POWER / S.E CUMMINS / E C COCKING  
Nature, 225:1016-1018 (1970)
- ③7. The inter and intraspecific fusion of plant protoplasts: subsequent developpement in culture, with reference to crown gall callus and tobacco and petunia leaf systems  
J.B.POWER / E.M.FREARSON  
Colloques internationaux du CNRS, N° 212 Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales :409 (1972)

- ③8. Fusionsversuche mit isolierten protoplasten von Petunia  
Hybrida L.  
H. BINDING  
Z. Pflanz. physiol., 72:422-426 (1974)
- ③9. Plant protoplast agglutination by artificial carbohydrates,  
antigens  
P. J. LARKIN  
J. Cell Sci., 30:283-292 (1978)
- ④0. Plant protoplast agglutination by lectins  
P. J. LARKIN  
Plant Physiol., 61(4):626-629 (1978)
- ④1. Lectin mediated agglutination of plant protoplasts  
C. FENTON / L. ARIEL / J. M. LABAVITCH  
Physiol. Plant., 49(4):393-397 (1980)
- ④2. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast  
fusion  
W. A. KELLER / G. MELCHERS  
Z. für Naturforschung, 28:737-741 (1973)
- ④3. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant  
protoplasts  
K. N. KAO / M. R. MICHAYLUK  
Planta, 115:355-367 (1974)
- ④4. The induction of aggregation and fusion of Daucus Carota  
Protoplasts by polyethylene glycol  
A. WALLIN / K. GLIMELIUS / T. ERIKSSON  
Z. Pflanz. physiol., 74:64-80 (1974)
- ④5. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells  
K. N. KAO / M. R. MICHAYLUK / O. L. GAMBORG  
Planta, 120:215-227 (1974)
- ④6. Ultrastructural characteristics of intergeneric fusion products  
L. C. FOWKE / P. J. RENNIE / J. W. KIRKPATRICK / F. CONSTABEL  
Can. J. Bot., 53:272 (1975)
- ④7. Increased frequency of polyethylene glycol induced protoplast  
fusion by dimethylsulfoxide *E. HAYDON / G. LAZAR / D. BUSTIS*  
Plant Sci. Letters, 10:357-360 (1977)
- ④8. Concanavalin A improves the polyethylene glycol method for  
fusing plant protoplasts  
K. GLIMELIUS / A. WALLIN / T. ERIKSSON  
Physiol. Plant., 44(2):92-96 (1978)
- ④9. Protoplasts from Acetabularia isolation and fusion  
M. PRIMKE / S. BERGER / H-G SCHWEIGER  
Cytobiologie, 16(3):375-380 (1978)
- ⑤0. A novel cell method of protoplasts fusion by polyvinyl  
alcohol  
T. NAGATA  
Naturwissenschaften, 65:263-264 (1978)

- ⑤1. Fusion of plant protoplasts induced by a positively charged phospholipid  
T.NAGATA / E.HANSJOERG / G MELCHERS  
Z.Naturforsch.(C) 34(56):460-462 (1979)
- ⑤2. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields  
U.ZIMMERMAN / P.SCHEURICH  
Planta,151(1):26-32 (1981)

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \* E S A INFORMATION RETRIEVAL SERVICE \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

USER 886 DATE:01/15/82 TIME:12:45:54

SEARCH HISTORY			PRINT SUMMARY				
SET	ITEMS	DESCRIPTION	NO.	FILE	ACCN/SET	FMT	ITEM-RANG
1	2132	PROTOPLAST?	1	7	37	4	1-33
2	3419	FUSION?					
3	299	1*2					
4	0	STAPHYL?LO?					
5	62098	BACTER?					
6	13838	BACILL?					
7	3059	MICROCOCC?					
8	3878	PROTEUS?					
9	0	STAPHY?LO					
10	14401	STAPHYLO?					
11	826	PRO?ARYOT?					
12	3888	STREPTOMYCES?					
13	90294	5+6+7+8+9+10+11+12					
14	265	3-13					
15	1676	PROTOPLAST?/TI					
16	6149	FUS?/TI					
17	7596	15+16					
18	221	14*17					
19	172	PROTOPLAST?(8W)FUSION?					
20	106	18*19					
21	1918	ORGANELL?					
22	8139	CHLOROPLAST?					
23	22016	MITOCHONDR?					
24	31221	21+22+23					
25	7722	INCORPORATION?					
26	38946	TRANSFER?					
27	46421	25+26					
28	75692	24+27					
29	1950	24*27					
30	23	29*1					
31	0	HETEROCARYON					
32	274	HETEROKARYON?					
33	144	HYBRID?(F)NUCLEAR?					
34	88	NUCLEAR?(F)FUSION?					
35	497	32+33+34					
36	98	20-35					
37	33	36/65-72					
38	201	18-35					
39	66	38/65-72					

SRCH TIME 9.50 PRINT COUNT 33 DESCS.: 13

*Equation No 1*

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \* E S A INFORMATION RETRIEVAL SERVICE \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

USER1067 DATE:01/22/82 TIME:10:50:35

SEARCH HISTORY			PRINT SUMMARY				
SET	ITEMS	DESCRIPTION	NO.	FILE	ACCN/SET	FMT	ITEM
1	2132	PROTOPLAST?	1	7	18	4	1
2	465	SPHEROPLAST?	2	7	21	4	1
3	10	HETEROPLAST?					
④	2586	1+2+3					
5	8139	CHLOROPLAST?					
6	22016	MITOCHONDR?					
7	1918	ORGANELL?					
⑧	31221	5+6+7					
→ 9	208	4*8					
10	9697	CYTOPLASM?					
⑪	39510	8+10					
→ 12	296	4*11					
13	8314	INCORPORAT?					
14	17721	TRANSFER? ?					
15	1499	INTEGRATION?					
⑫	27372	13+14+15					
17	22	9*16					
← 18	24	12*16					

Biobis

Sw 24, 19 sont pertinents

Equation N°2

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \* E S A INFORMATION RETRIEVAL SERVICE \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

USER1067 DATE:01/22/82 TIME:11:14:07

SEARCH HISTORY			PRINT SUMMARY				
SET	ITEMS	DESCRIPTION	NO.	FILE	ACCN/SET	FMT	ITEM-
1	1508	PROTOPLAST?	1	14	18	4	1-
2	235	SPHEROPLAST?	2	14	20	4	1-
3	21	HETEROPLAST?	3	14	29	4	1-
4	1747	1+2+3					
5	4529	CHLOROPLAST?					
6	11111	MITOCHONDR?					
7	416	ORGANELL?					
8	15821	5+6+7					
9	71	4*8					
10	5468	CYTOPLASM?					
11	20245	8+10					
12	101	4*11					
13	6480	INCORPORAT?					
14	57484	TRANSFER? ?					
15	5187	INTEGRATION?					
16	68722	13+14+15					
17	12	9*16					
18	18	12*16					

BIO PASCAL  
 sur 18, 15 sont pertinents

Equation N°2

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \* E S A INFORMATION RETRIEVAL SERVICE \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

USER 886 DATE:01/29/82 TIME:09:56:23

SEARCH HISTORY			PRINT SUMMARY				
SET	ITEMS	DESCRIPTION	NO.	FILE	ACCN/SET	FMT	ITEM-RANG
1	0	PROTPLAST	1	7	14	4	1-14
2	2132	PROTOPLAST?					
3	10	HETEROPLAST?					
4	465	SPHEROPLAST?					
5	2142	1+2+3					
6	2586	5+4					
7	8139	CHLOROPLAST?					
8	22016	MITOCHONDR?					
9	1918	ORGANELL?					
10	31221	7+8+9					
11	20951	UPTAKE?					
12	8499	TRANSPLANTATION?					
13	29427	11+12					
14	14	6*10*13					

FILE 14  
 (sur BiOPASCAL le même equation sauvegardé opposita 6 références) (sur lesquels 6 sont pertinents)  
 (sur lesquels 11 sont pertinents)

SRCH TIME 4.90 PRINT COUNT 14 DESCS.: 15

Equation N°2 posée avec deux descripteurs supplémentaires

Enal ement la partition <sup>posée</sup> pour la synthèse sur le transfert reviendra à

ou PROTODPLAST? }  
 ou HETEROPLAST? } ET { INCORPORAT?  
 SPHEROPLAST? } TRANSFER?  
 INTEGRATION?  
 UPTAKE  
 TRANSPLANTATION? ET { ORGANELL?  
 MITOCHONDR?  
 CHLOROPLAST?  
 CYTOPLAST?

Et en même au total  
 38 réponses sur Biobis  
 24 réponses sur BiOPASCAL