HAL
open science

Les embryons somatiques de vigne Vitis vinifera l. cv grenache noir. Aspects morphogénétiques et causes de la tératologie

Faure Olivier

To cite this version:

Faure Olivier. Les embryons somatiques de vigne Vitis vinifera l. cv grenache noir. Aspects morphogénétiques et causes de la tératologie. Génie des procédés. Université Pierre et Marie Curie Paris VI, 1992. Français. NNT : . tel-01096258

HAL Id: tel-01096258

https://hal.science/tel-01096258v1

Submitted on 17 Dec 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat
de l'Université Pierre et Marie Curie
(Paris VI)

spécialité

Biologie et Physiologie Végétales

présentée par

M. Olivier Faure

pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université Paris VI**

Titre de la thèse :

Les embryons somatiques de Vigne (*Vitis vinifera* L.) cv Grenache noir Aspects morphogénétiques et causes de la tératologie

Soutenue le 13 avril 1992

devant le Jury composé de :

Mme	A.	Nougarède	Président
M.	N.	Bagni	Rapporteur
M.	J.M.	Favre	Rapporteur
M.	A.	Benbadis	Examinateur
M	H.	Van Onckelen	Examinateur

Thèse de Doctorat
de l'Université Pierre et Marie Curie
(Paris VI)

spécialité

Biologie et Physiologie Végétales

présentée par

M. Olivier Faure

pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université Paris VI**

Titre de la thèse :

Les embryons somatiques de Vigne (*Vitis vinifera* L.) cv Grenache noir Aspects morphogénétiques et causes de la tératologie

Soutenue le 13 avril 1992

devant le Jury composé de :

Mme	**A.**	**Nougarède**	Président
M.	**N.**	**Bagni**	Rapporteur
M.	**J.M.**	**Favre**	Rapporteur
M.	**A.**	**Benbadis**	Examinateur
M	**H.**	**Van Onckelen**	Examinateur

Remerciements

Ce n'est pas la tradition qui me conduit à remercier, en premier lieu, Madame le Professeur Nougarède, Directeur du Groupe de "Cytologie Expérimentale et Morphogenèse Végétale". En 1988, elle m'a accueilli dans son laboratoire et elle m'a aidé à élaborer un programme de recherche. Je suis conscient que c'est uniquement grâce à son soutien efficace que j'ai pu obtenir une allocation MRT puis un poste de Moniteur à l'Université Paris 6 et enfin, dernièrement, un emploi d'ATER à l'Université de Versailles. Sans cette aide qu'elle m'a constamment apportée, je ne me serais certainement jamais engagé dans un travail de thèse. Mais ce soutien financier est peu de choses en regard de la formation scientifique qu'elle m'a permis d'acquérir. A son contact j'ai découvert la rigeur de l'expérimentation, j'ai appris à analyser des résultats mais aussi à les critiquer et à les remettre en question. Madame Nougarède est pour moi un modèle de persévérance et de ténacité qu'il est difficile d'égaler. Au cours de ces trois ans et demi passés dans le laboratoire, malgré ses nombreuses responsabilités, Madame Nougarède a toujours été disponible non seulement pour me conseiller et m'orienter mais encore pour m'aider concrètement à la rédaction, à la présentation et à la mise en page de ce travail. C'est pour cette aide constante et efficace, matérielle, conceptuelle et pratique, que je tiens à lui faire part de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie aussi très vivement Monsieur le Professeur Bagni, de l'Université de Bologne, et Monsieur le Professeur Van Onckelen, de l'Université d'Anvers. Tous deux ont bien voulu m'accueillir dans leur laboratoire et ils m'ont initié aux techniques d'analyse et de dosage des régulateurs de croissance végétaux. Ils ont accepté d'évaluer ce travail et c'est pour moi un grand honneur de les compter parmi les membres de mon Jury. J'associe particulièrement à ces remerciements Madame Marisa Mengoli du laboratoire de Monsieur le Professeur Bagni et Monsieur Walter Dewitte du laboratoire de Monsieur le Professeur Van Onckelen pour le temps qu'ils m'ont si aimablement consacré.

Je suis également très reconnaissant à Monsieur le Professeur Favre pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de le juger. Il est vrai qu'une des premières publications concernant l'embryogenèse somatique de la Vigne lui est due.

Que Monsieur le Professeur Benbadis soit assuré de ma gratitude pour l'aide qu'il a toujours été prêt à m'apporter et pour la sympathie qu'il m'a si souvent manifestée. C'est un plaisir pour moi qu'il ait accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Professeur Guerdoux, Directeur de l'UFR de Biologie de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). C'est en grande partie grâce à son aide et à la confiance qu'il m'a accordée, que j'ai pu obtenir le poste d'ATER que j'occupe actuellement.

Au sein du groupe où ce travail a été réalisé, ma sympathie s'adresse particulièrement à Messieurs Landré et Rembur. Ils m'ont fait bénéficier de leurs compétences et de leur expérience en cytologie et en biochimie et ils m'ont, chaque midi, invité à leur "brain storming" quotidien accompagné de la dégustation rituelle d'un café noir. Par leur très grande vision critique, qui n'a d'égale que leur humour corrosif, ils m'ont souvent apporté des conseils et une aide irremplaçable.

Monsieur Arnaud Blondel est le photographe du laboratoire. Son sens artistique s'est souvent heurté à mon exigence de précision. Où il préférait des clichés flous et abstraits, de tendance impressionniste, je lui demandais des photographies nettes et précises, calquées sur l'hyperréalisme. L'iconographie de cette thèse représente des centaines d'heures de travail et c'est uniquement grâce à la patience et à la persévérance d'Arnaud Blondel qu'elle a pu être réalisée. Je l'en remercie vivement.

Je voudrais également adresser mes remerciements à Monsieur Alain Bouquet, Directeur de Recherches à l'INRA de Montpellier. Il m'a gracieusement fait parvenir les sarments et les graines de Vigne nécessaires à cette étude et, avec courtoisie et gentillesse, il a toujours accepté de me conseiller.

Monsieur Jawad Sarrouf et Melle Béatrice Neuville se sont joints à mon travail au cours d'un stage qu'ils ont réalisé dans le laboratoire. Leur aide a été d'une efficacité exemplaire et je les remercie vivement pour l'intérêt qu'ils ont porté au sujet que je leur avais confié.

Madame Prouteau et Mme André m'ont apporté une précieuse aide technique. Qu'elles soient assrées de ma sincère reconnaissance.

Je remercie enfin tous mes amis ou collègues du laboratoire qui m'ont, à un moment ou à un autre, conseillé et aidé ou tout simplement marqué leur sympathie. Je ne crois pas en oublier et je citerai Anne, Eneida, Gladys et Valérie, Melle Gérard et Melle Nouin, Mme Besnard, Mme Driss, Mme Dutailly, Mme Fillâtre et Mme Lagerway, Bachir, Frédérique, Jean-Claude, Karim, Marc, Ouma et Philippe, M. Cottignies, M. Perbal, M. Rondet et M. Sallé.

Durant ces quatre dernières années, ma femme et mes enfants auraient souvent souhaité recevoir ne serait-ce qu'une fraction de l'attention que j'ai porté au développement embryonnaire. Je les soupçonne même d'avoir parfois rêvé d'être des embryons de Vigne. Ils ne se doutent certainement pas que je les aurais alors broyés dans l'azote liquide ou sectionnés à 5 µm d'épaisseur. Nous avons donc échappé à un horrible fait divers. Je dédie ce travail à Florence, à Anaïs et à Charles qui m'ont toujours supporté avec patience et souvent même, avec humour et bonne humeur. Je n'oublie pas mes parents qui ont toujours été présents, malgré la distance qui nous sépare, pour nous aider et nous soutenir. J'associe également à ces remerciements Marc et Véronique F., qui m'ont permis d'accéder, sans composer le 36-15, à leur réseau....informatique ! Qu'ils soient assurés de ma sincère reconnaissance pour les nombreuses heures qu'ils ont bien voulu me consacrer.

A tous, MERCI

SOMMAIRE

Liste des abréviations 1

INTRODUCTION 3

CHAPITRE I. HISTORIQUE 6

I.1. L'histoire du vignoble 6

I.2. L'amélioration de la Vigne : objectifs et méthodes 7

I.2.1. LES TECHNIQUES CLASSIQUES D'AMELIORATION : INTERETS, RESULTATS ET LIMITES 8

I.2.2. L'APPORT DES TECHNIQUES DE CULTURE *IN VITRO* : PERSPECTIVES ET REALITES 8

I.3. L'état actuel des connaissances concernant l'embryogenèse somatique 14

I.3.1. LES ACQUIS 14

I.3.2. LES PROBLEMES 20

I.3.2.1. L'origine des cals d'anthères et des embryons auxquels ils donnent naissance 22

I.3.2.2. Les caractéristiques histologiques des embryons somatiques 23

I.3.2.3. Les particularités biochimiques des embryons somatiques 23

I.4. Les objectifs 30

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES 32

II.1. Matériel 32

II-2 Méthodes 33

II.2.1. OBTENTION DES EMBRYONS SOMATIQUES 33

II.2.2. PRELEVEMENT DES EMBRYONS SOMATIQUES ET DES EMBRYONS ZYGOTIQUES 34

II.2.3. DETERMINATION DE L'ORIGINE DES CALS D'ANTHERES ET DES EMBRYONS AUXQUELS ILS DONNENT NAISSANCE 36

II.2.4. ETUDE COMPARATIVE DES EMBRYONS SOMATIQUES ET DES EMBRYONS ZYGOTIQUES 37

II.2.4.1. Examen morphologique 37

II.2.4.2. Etude histologique 37
II.2.4.2.1. *Coloration topographique sur coupes semi-fines* 37
II.2.4.2.2. *Structure et évolution des méristèmes caulinaires* 39

II.2.4.3. Etude cytologique 39

II.2.4.4. Etude histochimique 40
II.2.4.4.1. *Mise en évidence des polysaccharides* 40
II.2.4.4.2. *Mise en évidence des lipides* 41
II.2.4.4.3. *Mise en évidence des protéines* 42
II.2.4.4.4. *Mise en évidence des tannins* 43
II.2.4.4.5. *Mise en évidence de la lignine et de la subérine* 44

II.2.4.5. Analyse du contenu en ADN nucléaire des cellules caulinaires 45
II.2.4.5.1. *Cytométrie en flux* 45
II.2.4.5.2. *Microspectrophotométrie* in situ 48

II.2.4.6. Dosage des polyamines 55

II.2.4.7. Détermination des activités arginine- (EC 4.1.1.19) et ornithine décarboxylase (EC 4.1.1.17) 59

II.2.4.8. Dosage de l'acide indolylacétique et de l'acide abscissique 61
II.2.4.8.1. *Choix de la technique* 61

II.2.4.8.2. *Application* 62
II.2.4.8.3. *Expression des résultats* 66

II. 2. 4.9. Dosage des triglycérides 66

II.2.4.10. Détermination des activités malate synthase (EC 4.1.3.2) et isocitrate lyase (EC 4.1.3.1) 67

II.2.4.11. Dosage des protéines totales 69

II.2.4.12. Evaluation des teneurs en eau 70

CHAPITRE III. RESULTATS 71

III.1. L'origine des embryons somatiques 71
III.1.1. LA CALLOGENESE 71
III.1.2. L'EMBRYOGENESE 74
III.1.3. CONCLUSION 78

III.2. Les aspects généraux du développement embryonnaire 79
III.2.1. L'EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS 79
III.2.2. L'EVOLUTION HISTOLOGIQUE DES EMBRYONS 87
III.2.3. LES TENEURS EN EAU 95
III.2.4. LES COMPOSES TANNIFERES 100
III.2.5. LES REVETEMENTS PARIETAUX 104

III.3. Les états de ploïdie et de prolifération des cellules embryonnaires 107

III.4. La nature, la localisation et l'évolution des réserves embryonnaires 112
III.4.1. L'AMIDON 112
III.4.2. LES PROTEINES 116
III.4.3. LES LIPIDES 119

III.5. Les polyamines 131

III.6. Les activités arginine- (EC 4.1.1.19) et ornithine décarboxylase (EC 4.1.1.17) 134

III.7. L'acide abscissique et l'acide indolylacétique 136

CHAPITRE IV. DISCUSSION 141

IV.1. Le développement des embryons somatiques et les symptômes de la tératologie 142

IV.1.1. LES EMBRYONS SOMATIQUES ACQUIERENT PRECOCEMENT UNE POLARITE MARQUEE, MAIS ILS LA PERDENT AU COURS DE LEUR DEVELOPPEMENT 142

IV.1.2. LES EMBRYONS SOMATIQUES SONT INCAPABLES D'UTILISER LEURS RESERVES CARBONEES 149

IV.1.3. LES EMBRYONS SOMATIQUES SONT RICHES EN POLYAMINES 153

IV.1.4. LES EMBRYONS SOMATIQUES SONT PAUVRES EN ACIDE ABSCISSIQUE ET EN ACIDE INDOLYLACETIQUE ENDOGENES 154

IV.2. Les causes de la tératologie 156

IV.2.1. L'IMPORTANCE DE LA PHASE DE MATURATION 158

IV.2.2. LA CULTURE *IN VITRO* : SOURCE DE TERATOLOGIE 163

IV.3. Les remèdes 165

IV.4. Conclusion 167

IV.5. Perspectives de recherches 168

Résumé 170

Bibliographie 171

E R R A T A

- *Remerciements* **lire**
  rigueur, assurées, Noin, Lagerwey

- Page 69 **lire**
  Les dosages concernant les sections II.2.4.9. et II.2.4.10. ont été répétés deux ou trois fois selon les échantillons.

- Page 70 **lire**

$$T_{H2O}(PMS) = \frac{PMF - PMS}{PMS} \times 100$$

- Page 95 **Tableau XII remplacer la dernière colonne par**

T_{H2O} (PMS)[d]
373 ± 39
636 ± 44
699 ± 47
688 ± 45
652 ± 54
631 ±112
777 ± 49

et dans la légende lire
c : teneur en eau relative au poids de matière fraîche en % ± erreur standard
d : teneur en eau relative au poids de matière sèche en % ± erreur standard

- Page 97 **Tableau XIII remplacer la dernière colonne par**

T_{H2O} (PMS)[b]
11,60 ± 0,30
85,00 ± 1,50

et dans la légende lire
a : teneur en eau relative au poids de matière fraîche en % ± erreur standard
b : teneur en eau relative au poids de matière sèche en % ± erreur standard

- Page 98 **lire**
  $T_{H2O}(PMS) = 4,40 \times 11,60 = 51,04$ %

- Page 123 **Tableau XIV lire**

T+	48,00 ± 0,60	1,05 ± 0,04

au bas du tableau rajouter
Les valeurs (± erreur standard) sont une moyenne issue de trois répétitions.

- Page 128 **Fig. 41 b au bas de la légende rajouter**
  Pour chaque point, le prélèvement comporte de 25 (CJPH ou CJPA) à 300 embryons (St).

Liste des abréviations

Å :	angström
ABA :	acide abscissique
ADC :	arginine décarboxylase
ADN :	acide désoxyribonucléique
AFA :	alcool - formol - acide acétique
AIA :	acide β-indolylacétique
AIB :	acide indolylbutyrique
APS :	acide periodique - Schiff
ARN :	acide ribonucléique
BAP :	benzylaminopurine
CDC :	citrulline décarboxylase
CoA :	coenzyme A
Comm. pers. :	communication personnelle
cv :	cultivar
DCHA :	dicyclohexylammonium sulfate
2,4-D :	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
DFMA :	difluorométhylarginine
DFMO :	difluorométhylornithine
DO :	densité optique
DTNB :	acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
DTT :	dithiothréitol
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
ES :	embryon somatique
FAP :	6 furfuryl-aminopurine (= kinétine)
g :	gramme
g :	gravité
GA3 :	acide gibbérellique
GRM :	germination
HCl :	acide chlorhydrique
HPLC :	chromatographie liquide à haute pression
ICL :	isocitrate lyase
IPA :	isopentényladénine
MAT :	maturation
MGBG :	méthyl glyoxal bis-(guanylhydrazone)
mn :	minute

M.S. :	milieu minéral de Murashige et Skoog
MS :	malate synthase
NCP :	N-carbamyl putrescine
NN :	milieu minéral de Nitsch et Nitsch
NOA :	acide 2-naphtoxyacétique
ODC :	ornithine décarboxylase
PA :	post-abscission
PEM :	masse proembryonnaire
PMF :	poids de matière fraîche
PMS :	poids de matière sèche
Put :	putrescine
rpm :	rotation par minute
SAMDC :	S-adénosylméthionine décarboxylase
Spd :	spermidine
Spm :	spermine
TCA :	acide trichloroacétique
TLC :	chromatographie sur couche mince
UV :	ultraviolet
V :	volume
V. :	*Vitis*
Vm :	vitesse maximale
VMP :	vert de méthyle-pyronine

INTRODUCTION

L'embryogenèse somatique consiste en la formation d'embryons, susceptibles de se développer normalement à partir de cellules diploïdes, contrairement à l'embryogenèse zygotique, qui résulte de l'union de deux gamètes haploïdes.

Ce phénomène, qui peut se produire naturellement chez quelques espèces telles que les Manguiers ou certains *Citrus*, fut décrit pour la première fois après culture *in vitro* pour la Carotte, par Reinert (1958) et par Steward *et al.* (1958). Des observations analogues furent ultérieurement réalisées chez d'autres Ombellifères, puis chez des Solanacées et enfin dans de nombreux autres groupes de plantes, monocotylédones et dicotylédones, ligneuses et herbacées. Aujourd'hui, bien que certaines familles ou espèces soient réputées plus réfractaires que d'autres, il ne fait plus de doute que la capacité à produire des embryons somatiques *in vitro* soit une propriété générale des végétaux supérieurs (Margara, 1982). En 1983, Ammirato signalait des réussites chez 132 espèces appartenant à 81 genres et 32 familles ; cette liste n'a depuis cessé de s'enrichir.

Le très vif intérêt suscité par l'étude de l'embryogenèse somatique, loin de s'émousser, n'a fait que s'accroître au cours de ces quinze dernières années. Ce nouvel outil, issu des biotechnologies végétales, ouvre en effet de très nombreuses perspectives de recherches (Rajnchapel-Messaï, 1989), à la fois dans les domaines fondamentaux et appliqués.

D'un point de vue strictement fondamental, l'embryogenèse somatique représente le modèle idéal (Komamine *et al.*, 1990) pour la compréhension des mécanismes gouvernant et contrôlant l'édification d'un organisme autonome à partir d'une cellule diploïde. Ainsi, l'étude des tout premiers stades de l'édification d'un embryon, longtemps réservée aux seuls cytologistes, est devenue, avec la maîtrise de l'embryogenèse *in vitro*, accessible aux méthodes d'analyse développées et utilisées par les biochimistes et par les biologistes moléculaires. On peut donc espérer que, dans un avenir assez proche, une synthèse des nombreux travaux réalisés à la fois *in situ* et *in vitro* permettra de dégager une vision cohérente du développement embryonnaire chez les plantes et lèvera ainsi le voile sur un des problèmes fondamentaux de la biologie.

Parallèlement, sur le plan de la recherche appliquée, l'embryogenèse somatique est exploitée ou étudiée dans trois optiques différentes : la multiplication conforme, l'obtention de variants et la production de semences artificielles.

Par leur origine asexuée et vraisemblablement unicellulaire, les embryons somatiques possèdent, en théorie, le même patrimoine génétique que la plante mère dont ils sont issus. Ils représentent donc un moyen efficace de multiplication conforme et à grande échelle d'individus sélectionnés.

Cependant, le passage par le stade de cal, étape qui précède très souvent l'obtention d'embryons somatiques, peut induire des modifications plus ou moins profondes du génome, appelées variations somaclonales (Bayliss, 1980 ; Larkin et Scowcroft, 1981). Bien que fortement dépendantes de l'explant et des conditions de culture utilisées, ces variations somaclonales sont essentiellement aléatoires. Elles peuvent être le reflet de mutations ponctuelles ou, au contraire, d'importants remaniements chromosomiques, nucléaires ou extra-nucléaires. Selon Phillips *et al.* (1990), les variations somaclonales, qui apparaissent avec une fréquence (environ 15 % des plantes régénérées) nettement plus élevée que celle des mutations spontanées (environ une pour un million ; Evans et Sharp, 1986), seraient liées à des hypo- ou hyper-méthylations de l'ADN, elles-mêmes dues à des modifications de la physiologie cellulaire engendrées par la culture *in vitro*. Ainsi, dans certaines conditions, la régénération après culture *in vitro*, en favorisant l'obtention de variants somaclonaux (Hodgson, 1990), est utilisée pour amplifier la variabilité spontanée des cultivars. L'embryogenèse somatique, qui permet un taux élevé de régénérations, peut donc être exploitée pour sélectionner des variants ne différant de la plante mère que par un petit nombre de caractères et conservant les qualités essentielles de celle-ci.

Enfin de grands espoirs sont actuellement fondés sur la production de semences artificielles (Redenbaugh *et al.*, 1986 ; Nouaille et Pétiard, 1988). Cette technologie nouvelle, basée sur la possibilité d'enrober des embryons somatiques dans des matériaux synthétiques inertes en attendant leur commercialisation puis leur germination, est aujourd'hui l'objet de très nombreuses recherches menées principalement dans le secteur privé. Dans ce domaine, les enjeux économiques sont considérables (Gros, 1990).

Cependant, malgré ses multiples applications potentielles, l'embryogenèse somatique pose encore de nombreux problèmes. Le principal d'entre eux, lié au très faible taux de conversion en plantule des embryons somatiques (Ammirato, 1989), représente un obstacle majeur à l'application industrielle de cette technique, à la fois dans les programmes de multiplication conforme, de fabrication de semences artificielles et de créations variétales.

Nous avons donc entrepris de rechercher les causes du très faible taux de conversion en plantule des embryons somatiques chez la Vigne, modèle de plante ligneuse d'une importance économique capitale pour l'agriculture française mais pour lequel les grands programmes d'amélioration, utilisant les vitro-méthodes, n'en sont encore qu'au stade expérimental (Bouquet et Branchard, 1988).

CHAPITRE I. HISTORIQUE

I.1. L'histoire du vignoble

La Vigne est une plante connue et utilisée par l'homme depuis des milliers d'années, tant pour la consommation de ses baies que pour celle des nombreuses boissons alcoolisées qui en dérivent. Il est en effet reconnu que la culture de la Vigne était déjà pratiquée dans le Caucase et en Mésopotamie environ 6 000 ans avant J.C. et qu'elle s'étendit ensuite progressivement, à l'Est, vers la Chine et, à l'Ouest, vers l'Afrique du Nord (Krul et Mowbray, 1983). La Vigne fut introduite en France par les Phéniciens et par les Grecs environ 500 ans avant J.C., à une époque où le commerce du vin était déjà bien développé entre la Grèce et Marseille qui représentait alors une sorte de plaque tournante déservant les autres régions de la Gaule (Long, 1970).

Au cours des siècles suivants, le goût des consommateurs pour le raisin, mais surtout pour ses dérivés alcoolisés, s'affirma à tel point que le vin, fruit du travail des hommes, fut sacralisé par la religion chrétienne et qu'il prit dès lors part intégrante dans le développement de la civilisation occidentale. Il s'ensuivit tout naturellement une extension rapide des vignobles et une diversification progressive des variétés de Vignes, sous l'action des contraintes exercées par les premiers sélectionneurs.

Cette tendance à l'extension et à l'amélioration de la Vigne fut cependant fortement compromise à la fin du siècle dernier et au début des années 19OO, époque à laquelle un puceron parasite d'origine américaine, *Phylloxera vastatrix*, fut accidentellement introduit en Europe. Provoquant l'apparition de galles au niveau des racines des espèces sensibles, la forme radicicole de ce puceron entraîna la disparition quasi-totale du vignoble français. Heureusement l'existence d'espèces américaines présentant des degrés élevés de résistance au parasite, associée à la possibilité de greffage, permit d'enrayer en partie le fléau. Il en résulte aujourd'hui que, dans tous les pays atteints par le phylloxéra, pratiquement aucune variété de *Vitis vinifera* n'est plantée "franc de pied", le recours au greffage étant devenu systématique.

A l'heure actuelle, les quelques dizaines d'espèces de Vigne cultivées se répartissent en plus de 10 000 variétés différentes, exploitées non seulement pour la production de vins réputés, de vins de consommation courante ou d'alcools divers, mais aussi pour celle de raisins de table, de raisins secs, de jus de raisin et d'huiles alimentaires. De plus, les vertus thérapeutiques des vins sont souvent mises en exergue (Maury, 1983) ; selon leur origine, les vins sont reconnus comme toniques, diurétiques, reminéralisants ou bactéricides et leurs qualités diététiques sont dues à leur richesse en vitamines et en sels minéraux. Ce type de traitement n'est malheureusement pas remboursé par la sécurité sociale.

Ainsi, par la qualité et par la diversité de ses produits, la Vigne représente souvent une véritable richesse agricole pour les pays producteurs. Pour n'indiquer que l'exemple de la France, la production de vins dans les exploitations représente près de 0,4 % du produit intérieur brut et, en 1984, la valeur relative des livraisons de la branche des vins représentait environ 9 % de l'ensemble des livraisons de l'agriculture alors que le vignoble n'occupe que 3,5 % de l'ensemble des terres agricoles (Dubos, 1986).

I.2. L'amélioration de la Vigne : objectifs et méthodes

Comme toutes les plantes cultivées, la Vigne a de tout temps été l'objet de travaux de sélection, empiriques ou mûrement réfléchis, visant à modifier et à améliorer certains de ses caractères, notamment ses particularités organoleptiques de même que sa résistance aux parasites et aux conditions hostiles du milieu extérieur. C'est ainsi que les anciens sélectionneurs, utilisant les méthodes de la sélection massale, positive ou négative, ont peu à peu obtenu les premiers cépages nobles.

Cependant la crise phylloxérique du début du siècle qui, comme nous l'avons vu, ne put être enrayée que par l'utilisation de porte-greffes, provoqua une modification radicale du vignoble européen et multiplia les problèmes à résoudre. En effet, les variétés américaines utilisées comme porte-greffes étaient mal adaptées au climat, aux terroirs et aux parasites présents en France et elles durent faire l'objet de longs travaux de recherche et de sélection avant de donner des résultats satisfaisants (Rives, 1986). Actuellement ces travaux d'amélioration qui, bien entendu, concernent également les cépages, sont loin d'être terminés et ils restent une des préoccupations majeures de nombreux pays producteurs (Kozma, 1970 ; Martins, 1985 ; Hidalgo *et al.*, 1985).

Pratiquement, l'amélioration des plantes peut être envisagée selon deux grands types d'approches, qui ne sont d'ailleurs pas exclusifs : les techniques de sélection classique et la culture *in vitro*.

I.2.1. LES TECHNIQUES CLASSIQUES D'AMELIORATION : INTERETS, RESULTATS ET LIMITES

Les techniques classiques de sélection sont basées sur les méthodes de sélection clonale et d'hybridations intra- ou inter-spécifiques. Utilisées et éprouvées depuis de très nombreuses années, ces méthodes se sont montrées particulièrement efficaces et, chez la Vigne, ce sont elles seules qui jusqu'alors ont permis l'obtention de tous les cépages, variétés et clones cultivés.

Il faut pourtant souligner que, alors que la sélection clonale a fourni de très nombreux résultats intéressants, à la fois chez les cépages et les porte-greffes, l'utilisation des méthodes d'hybridations interspécifiques n'a eu que peu de succès, du moins en ce qui concerne l'obtention d'hybrides producteurs directs. Pour les uns, cet échec proviendrait d'un manque d'études sérieuses (Alleweldt, 1979), alors que pour d'autres (Rives, 1984), il serait lié à la structure même du génome et à l'impossibilité de dissocier des caractères codés par des gènes trop proches. Rives (1984) remarque ainsi que "la résistance au phylloxéra et au mildiou, chez la Vigne, n'a jamais pu être séparée des arômes affreux apportés par les géniteurs américains".

Par ailleurs, ces techniques classiques de sélection, qui ne peuvent qu'exploiter la variabilité naturelle et spontanée des cultivars, demandent de très longues années (15 à 20 ans) de recherches et d'essais avant d'aboutir à la commercialisation d'une variété nouvelle.

I.2.2. L'APPORT DES TECHNIQUES DE CULTURE *IN VITRO* : PERSPECTIVES ET REALITES

Le second type d'approche utilisé pour l'amélioration des plantes a été rendu possible grâce au développement des connaissances concernant la culture *in vitro* de tissus végétaux. Cette technique, mise au point au cours des années 1930 grâce aux travaux de Nobécourt (1937), de Gautheret (1938) et de White (1939), représente aujourd'hui un outil particulièrement puissant dans le domaine de la production végétale.

Chez la Vigne, la culture *in vitro* fut réussie pour la première fois par Morel (1944 a et b), mais elle n'eut une application agronomique que vingt ans plus tard lorsque Galzy (1964) publia une technique permettant l'éradication des viroses, par culture de bourgeons associée à la thermothérapie. Cette méthode fut améliorée au cours des années suivantes (Galzy, 1969 a et b, 1972, 1977).

Mais c'est certainement sur le plan de ses applications potentielles pour l'obtention de variants que la culture *in vitro* de la Vigne est la plus prometteuse (Mullins, 1985). En théorie plusieurs démarches sont envisageables :

1°- la régénération de plantes entières à partir de cals, par caulogenèse ou embryogenèse somatique, peut fournir des variants somaclonaux qui, soumis à des pressions de sélection déterminées, peuvent être isolés puis multipliés.

2°- la régénération à partir de cellules isolées, ou mieux de protoplastes, permet d'obtenir des variants somaclonaux, mais aussi de réaliser des fusions somatiques et des transferts de gènes.

3°- la régénération à partir de tissus végétatifs transformés par des Agrobactéries permet également de réaliser des transferts de gènes.

Actuellement, seule la première démarche citée est utilisable chez la Vigne. En effet, bien que l'isolement et la culture de protoplastes aient été réussis par plusieurs équipes (Shimizu, 1985 ; Barbier et Bessis, 1988 ; Lee et Wetzstein, 1988 ; Theodoropoulos et Roubelakis-Angelakis, 1990), aucune organogenèse n'a pu être observée à partir de telles cultures. D'autres auteurs s'intéressent aux expériences de transformation par *Agrobacterium sp.* (Guellec *et al.*, 1988, 1990 ; Szegedi et Haydu, 1988 ; Baribault *et al.*, 1989, 1990 ; Mullins *et al.*, 1990), mais l'application de ces techniques est fortement limitée, non seulement par le pourcentage relativement peu élevé de cellules transformées après l'infection initiale (Baribault *et al.*, 1990), mais encore par les capacités organogènes, généralement faibles, des explants végétatifs utilisés dans ces travaux. Chez la Vigne, en effet, ce sont les cultures de tissus floraux qui se sont jusqu'ici montrées les plus aptes à la régénération. Relativement peu de réussites ont été signalées à partir de tissus végétatifs (Favre, 1977 ; Barlass et Skene, 1978 ; Hirabayashi, 1985 ; Reisch *et al.* 1985 ; Stamp et Meredith, 1988 ; Vilaplana et Mullins, 1989 ; Cheng et Reisch, 1989) et aucune régénération n'a été obtenue à partir de cellules isolées ou de protoplastes. A l'heure actuelle, chez cette espèce, la méthode de régénération la plus couramment utilisée est l'embryogenèse somatique à partir de cals issus du connectif des anthères (Bouquet *et al.*, 1982). Quel que soit le type d'explant (tige ou feuille), les régénérations par néoformation

de bourgeons (caulogenèse), parfois signalées (Barlass et Skene, 1978 ; Vilaplana et Mullins, 1989 ; Cheng et Reisch, 1989 ; Stamp *et al.*, 1990), sont encore peu exploitées.

Le premier cas d'obtention d'embryons somatiques de Vigne fut rapporté en 1976 par Mullins et Srinivasan. Ces auteurs avaient cultivé des ovules non fécondés, prélevés de 5 à 15 jours avant l'anthèse dans des fleurs de *V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon. Sur le milieu minéral liquide de Nitsch et Nitsch (1969) comportant une auxine (acide naphtoxyacétique) et une cytokinine (benzylaminopurine), ces ovules fournirent des cals d'origine nucellaire qui se révélèrent embryogènes. Par la suite de nombreux autres chercheurs obtinrent des résultats analogues à partir de différentes espèces et cultivars de *Vitis* (tab. I) et à partir de différents tissus (tab. II).

Tableau I. Espèces et cultivars de Vigne ayant permis l'obtention d'embryons somatiques en culture *in vitro*.

Génotype	Référence
V. vinifera cv	
Cabernet Sauvignon	Mullins et Srinivasan, 1976
Grenache	Srinivasan et Mullins, 1980
Triumph	Zou et Li, 1981
Cot	Bouquet *et al.*, 1982
Alicante terras	Bouquet *et al.*, 1982
Pinot	Bessis et Labroche, 1985
Chardonnay	Bessis et Labroche, 1985
Gamay	Bessis et Labroche, 1985
Koshusanjaku	Hirabayashi, 1985
Néo muscat	Hirabayashi, 1985
Kaïji	Hirabayashi, 1985
Caladoc	Bouquet *et al.*, 1987
Syrah	Bouquet *et al.*, 1987
Aranel	Bouquet *et al.*, 1987
Portan	Bouquet *et al.*, 1987
Gramon	Bouquet *et al.*, 1987
Chenançcon	bouquet *et al.*, 1987
Monerac	Bouquet *et al.*, 1987

Tableau I (suite)

***V. vinifera* cv (suite)**	
Cardinal	Stamp et Meredith, 1988
Sauvignon blanc	Stamp et Meredith, 1988
Riesling blanc	Stamp et Meredith, 1988
Sultana moscata	Bouquet (comm. pers.)
Canner seedless	Bouquet (comm. pers.)
Autre espèces et hybrides du genre *Vitis*	
3309 C	Favre, 1977
Seyval	Krul et Worley, 1977
Gloryvine	Rajasekaran et Mullins, 1979
V. rupestris du Lot	Bouquet *et al.*, 1982
ARG 9	Bouquet *et al.*, 1982
V. riparia Gloire	Bouquet *et al.*, 1982
Baco 22 A	Bouquet *et al.*, 1982
7120 C	Bouquet *et al.*, 1982
S 5455	Bouquet *et al.*, 1982
GF 7489	Bouquet *et al.*, 1982
110 R	Bouquet *et al.*, 1985
140 Ru	Bouquet *et al.*, 1985
V. aestivalis	Hirabayashi, 1985
Horizon	Reisch *et al.*, 1985
41 B	Lebrun, 1987
Fercal	Lebrun, 1987
101-14	Lebrun, 1987
V. longii Microsperma	Gray et Mortensen, 1987
PI 200692	Stamp et Meredith, 1988
Ganzin n°1	Stamp et Meredith, 1988
4453 Ma	Bouquet (comm. pers.)

L'observation du tableau II montre, comme nous l'avons signalé précédemment, que c'est principalement la culture d'anthères qui a fourni la majorité des résultats positifs chez la Vigne. Ce type de culture s'est de plus révélé applicable à la plupart des variétés étudiées, contrairement aux autres catégories de tissus testées.

Tableau II. Types d'explants à l'origine d'embryons somatiques chez la Vigne.

Explant Génotype	Référence
Limbes de plantes cultivées en serre	
Koshusanjaku	Hirabayashi, 1985
Cabernet Sauvignon	Stamp et Meredith, 1988
V. rupestris du Lot	Stamp et Meredith, 1988
PI 200692	Stamp et Meredith, 1988
Limbes de vitroplants	
3309 C	Favre, 1977
Cabernet Sauvignon	Stamp et Meredith, 1988
Pétioles	
Horizon	Reisch *et al.*, 1985
Fleurs entières	
Grenache	Lebrun, 1987
Fercal	Lebrun, 1987
V. rupestris du Lot	Lebrun, 1987
Ovules	
Cabernet Sauvignon	Mullins et Srinivasan, 1976
Grenache	Srinivasan et Mullins, 1980
Gloryvine	Srinivasan et Mullins, 1980
Pinot	Bessis et Labroche, 1985
Chardonnay	Bessis et Labroche, 1985
Gamay	Bessis et Labroche, 1985
Anthères	
Triumph	Zou et Li, 1981
V. rupestris du Lot	Bouquet *et al.*, 1982
3309 C	Bouquet *et al.*, 1982
Cot	Bouquet *et al.*, 1982
Grenache	Bouquet *et al.*, 1982
ARG 9	Bouquet *et al.*, 1982
110 R	Bouquet *et al.*, 1982
V. riparia Gloire	Bouquet *et al.*, 1982

Tableau II. (suite)

Anthères (suite)	
Baco 22 A	Bouquet *et al.*, 1982
7120 C	Bouquet *et al.*, 1982
Seyval	Bouquet *et al.*, 1982
S 5455	Bouquet *et al.*, 1982
GF 7489	Bouquet *et al.*, 1982
Alicante terras	Bouquet *et al.*, 1982
Cabernet Sauvignon	Fallot *et al.*, 1985
101-14	Lebrun, 1987
Fercal	Lebrun, 1987
Caladoc	Bouquet *et al.*, 1987
Aranel	Bouquet *et al.*, 1987
Portan	Bouquet *et al.*, 1987
Gramon	Bouquet *et al.*, 1987
Monerac	Bouquet *et al.*, 1987
Chenançon	Bouquet *et al.*, 1987
V. longii	Gray et Mortensen, 1987
Cardinal	Stamp et Meredith, 1988
Sauvignon blanc	Stamp et Meredith, 1988
Riesling blanc	Stamp et Meredith, 1988
44-53 Ma	Bouquet (comm. pers.)
Sultana moscata	Bouquet (comm. pers.)
Canner seedless	Bouquet (comm. pers.)

Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, on peut admettre que, pour la Vigne, la méthode de régénération la plus simple, la plus reproductible et la plus performante est l'embryogenèse somatique à partir de cals d'anthères. Il faut cependant souligner que le passage obligatoire par le stade de cal empêche d'utiliser cette méthode en vue d'une multiplication conforme ; en revanche elle peut raisonnablement être considérée comme un moyen efficace d'obtention de variants somaclonaux. Dans cette optique, plusieurs équipes ont développé des programmes de recherche en retenant des objectifs variés : résistance à la chlorose calcaire (Netzer et Branchard, 1988), résistance au chlorure de sodium (Lebrun, 1987) ou résistance à l'eutypiose (Fallot, 1988), par exemple.

Néanmoins cette technique d'embryogenèse somatique, qui sera présentée dans le paragraphe suivant, est loin d'être parfaitement maîtrisée et elle pose encore de nombreux problèmes. Il est en effet difficile d'obtenir simultanément des souches embryogènes stables, des cultures facilement synchronisables et un taux élevé de conversion des embryons somatiques en plantules viables. Ces trois conditions, requises pour une utilisation rationnelle et contrôlée de l'embryogenèse somatique, représentent autant de problèmes dont la résolution sera nécessaire pour l'exploitation industrielle de la culture *in vitro* de la Vigne en vue de l'amélioration des cultivars.

I.3. L'état actuel des connaissances concernant l'embryogenèse somatique

Bien que de très nombreux travaux aient été réalisés à ce jour, les connaissances concernant l'embryogenèse somatique sont encore fragmentaires et les événements qui conduisent une cellule différenciée à se dédifférencier puis à exprimer les potentialités d'un zygote restent encore énigmatiques.

Quoi qu'il en soit, certains faits semblent bien établis et, malgré les nuances qu'il est nécessaire d'apporter, nous les présenterons comme acquis, en insistant plus particulièrement sur l'exemple de la Vigne. Nous soulignerons ensuite les problèmes à résoudre afin de proposer de nouvelles voies de recherches susceptibles d'aboutir à une meilleure compréhension et à une exploitation plus rationnelle de l'embryogenèse somatique.

I.3.1. LES ACQUIS

Comme chez la plupart des espèces étudiées (Margara,1982), l'obtention de somaclones de Vigne nécessite trois étapes distinctes (Krul et Mowbray, 1983 ; Krul, 1985) reflétant des modifications temporelles des besoins nutritifs et hormonaux des cultures.

- La première étape, ou ***phase d'induction***, a été décrite pour la première fois par Halperin (1966) dans des suspensions cellulaires de Carotte. Les cellules à l'origine des embryons somatiques prolifèrent et forment des massifs cellulaires dédifférenciés appelés masses proembryonnaires (PEM). Pourtant, la formation de PEMs ne paraît pas indispensable et, dans de nombreux systèmes, l'embryogenèse peut être initiée directement à partir de cellules plus ou moins différenciées et nommées "cellules embryogènes prédéterminées" (Williams et Maheswaran, 1986).

Il est généralement reconnu que la phase d'induction de l'embryogenèse *in vitro* requiert la présence de régulateurs de croissance exogènes et, plus spécialement, d'auxine ou de combinaisons auxine-cytokinine. Selon les espèces, l'exigence en une auxine particulière est plus ou moins stricte, alors que le choix d'un type précis de cytokinine est beaucoup moins déterminant (Margara, 1982). La présence d'une cytokinine n'est d'ailleurs pas toujours indispensable (Ammirato, 1983). Il est cependant important de souligner que la nécessité d'une auxine exogène ne doit pas être considérée comme un dogme. Boussaïd et Espagnac (1988) signalent en effet l'obtention d'embryons somatiques d'une légumineuse tunisienne en la seule présence de benzylaminopurine (BAP). Par ailleurs, Smith et Krikorian (1988) obtiennent de façon parfaitement reproductible des embryons somatiques de Carotte sur des milieux dépourvus de régulateurs de croissance exogènes. A la notion de "choc auxinique" nécessaire à l'initiation des PEMs ou des cellules prédéterminées, il est donc préférable de substituer la notion de "choc inducteur", terme certes plus vague mais aussi plus stimulant pour les recherches à venir. Les travaux de Smith et Krikorian (1989, 1990) en sont le parfait exemple. Ces auteurs, qui utilisent comme explants primaires des embryons zygotiques de Carotte, ont ainsi récemment démontré que la séquence des événements conduisant à l'embryogenèse somatique pouvait être déclenchée par la seule action d'une blessure, dans des conditions bien déterminées de nutrition azotée et de pH.

Chez la Vigne cependant, la phase d'induction de l'embryogenèse somatique est toujours réalisée en présence d'une auxine et d'une cytokinine, et ce, pendant une durée d'un mois. Depuis les études de Srinivasan et Mullins (1980), la balance hormonale adoptée par la majorité des auteurs est constituée d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D, 1 mg l^{-1}) et de BAP (0,25 mg l^{-1}).

Par ailleurs, Rajasekaran et Mullins (1979), s'inspirant des travaux de Hirabayashi *et al.* (1976), ont remarqué qu'une incubation initiale à l'obscurité augmentait de façon significative la production d'embryons somatiques à partir d'anthères ; depuis lors toutes les études sont réalisées en effectuant l'induction à l'obscurité.

- La seconde étape, ou ***phase d'expression***, se traduit par l'évolution des cellules des masses proembryonnaires ou des cellules prédéterminées en embryons tout d'abord globulaires, puis cordiformes et parvenant enfin au stade torpille, comme le font les embryons zygotiques. D'une manière générale cette phase de l'embryogenèse somatique est stimulée par une diminution de la concentration en auxine du milieu, voire même par l'utilisation d'antiauxines (Margara, 1982). Cependant ce comportement général présente

également des exceptions et, dès 1975, Norreel signalait la possibilité d'obtenir des embryons somatiques de Carotte directement sur le milieu d'induction.

Dans le cas de la Vigne, le repiquage des cals primaires sur un milieu d'expression est nécessaire ; ce milieu doit être dépourvu de 2,4-D, mais il comporte, dans certains cas, de la BAP (0,25 $mg.l^{-1}$) en association avec une auxine faible (Fallot *et al.*, 1985 ; Mauro *et al.*, 1986). Il a en effet été remarqué que le passage d'un milieu contenant du 2,4-D (1 $mg.l^{-1}$) à un milieu additionné d'acide indolylacétique (AIA, 0,1 $mg.l^{-1}$) améliore sensiblement le taux d'embryogenèse ainsi que la qualité des embryons formés (Bouquet, comm. pers.).

- La troisième étape, souvent appelée ***phase de germination***, correspond au développement des embryons somatiques en plantules fonctionnelles. Elle s'effectue sur un milieu parfois qualifié de milieu de maturation (Anandarajah et Mc Kersie, 1990).

Chez la Vigne, cette étape est très mal maîtrisée et si les pourcentages de plantules obtenus peuvent être acceptables dans le cadre de travaux de recherches en laboratoire, ils sont en revanche beaucoup trop faibles pour permettre d'envisager des programmes de sélection et de création variétale à grande échelle. Les données concernant cette étape cruciale de l'embryogenèse somatique seront donc détaillées dans le paragraphe suivant.

Outre la connaissance globale des facteurs stimulant spécifiquement chacune des deux premières étapes de l'embryogenèse somatique, d'autres paramètres qui conditionnent la réponse embryogène dans son ensemble ou dont la spécificité au niveau d'une phase donnée n'a pas été établie, ont été analysés et étudiés au cours de ces dix dernières années. Parmi ces différents paramètres une distinction peut être faite entre les facteurs génétiques, c'est-à-dire inhérents à la plante elle-même, et les facteurs physico-chimiques du milieu de culture.

Les facteurs génétiques jouent sans aucun doute un rôle primordial dans les processus aboutissant à l'embryogenèse somatique. Ainsi certaines familles se montrent particulièrement aptes (Ombellifères, Solanacées) (Margara, 1982), alors que d'autres sont beaucoup plus réticentes à la production d'embryons somatiques (Conifères) (Ammirato, 1989). De même, pour une espèce donnée, on observe fréquemment des différences variétales marquées, notamment dans le cas de la Vigne où certains cépages se montrent récalcitrants pour l'obtention d'embryons *in vitro* (Bouquet *et al.*, 1982 ; Rajasekaran et Mullins, 1983 ; Krul et Mowbray, 1983). A ce sujet, il faut souligner que, chez la Tomate (Marty, 1988), mais aussi chez la Vigne (Bouquet *et al.*, 1987), des croisements entre des

variétés embryogènes et non embryogènes peuvent conduire à l'obtention d'hybrides ayant de fortes capacités embryogènes. Enfin, pour une variété donnée, seuls certains tissus sont capables d'exprimer des potentialités embryogènes (Ammirato, 1983).

Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, le terme "facteurs génétiques" reflète plus notre ignorance des mécanismes intimes régissant l'embryogenèse somatique que la connaissance précise d'un paramètre jouant un rôle connu et déterminé. Comme l'ont souligné Margara (1982) et Raghavan (1983), l'embryogenèse somatique est certainement réalisable chez tous les végétaux supérieurs, mais elle est probablement favorisée ou inhibée par des facteurs génétiques et tissulaires inconnus ou indéterminés. Reste à savoir quels sont ces facteurs endogènes et quels sont les types d'interactions qui conduisent, à partir d'un explant donné, placé dans un environnement approprié, à l'acquisition et à l'expression de potentialités embryogènes comparables à celles d'un zygote.

Les facteurs physico-chimiques, quant à eux, sont plus faciles à cerner et à étudier dans la mesure où l'on s'intéresse moins à leur mode d'action qu'à l'étude de leurs effets, stimulateurs ou inhibiteurs, sur les capacités embryogènes d'une culture donnée. Nous évoquerons ceux qui semblent les plus importants. Parmi eux, la composition minérale du milieu joue certainement un rôle majeur. Il est en effet établi que la production de masses proembryonnaires est stimulée par des milieux possédant à la fois une concentration en sels réduite, une forte teneur en azote total et un rapport azote réduit/azote total élevé (Norreel, 1975 ; Margara, 1982 ; Dodds et Robert, 1985). D'autre part, d'après Krul et Mowbray (1983), la conversion des masses proembryonnaires en embryons serait stimulée par de fortes concentrations en potassium ; à ce propos Margara (1982) indique qu'une diminution du rapport calcium/potassium stimule l'organogenèse en général.

Chez la Vigne, les milieux favorables à l'embryogenèse somatique à partir d'anthères (tab. III) sont la solution minérale de Murashige et Skoog (1962) diluée deux fois (M.S./2), et le milieu de Nitsch et Nitsch (1969). Le tableau IV montre que les principaux paramètres de ces solutions minérales sont pratiquement identiques.

Enfin, il apparaît que chez de nombreux cépages l'adjonction de substances organiques diverses, telles que des vitamines, et surtout l'hydrolysat de caséine (1 $g.l^{-1}$), augmente fortement le taux de callogenèse et d'embryogenèse (Lebrun, 1987; Bouquet *et al.*, 1987).

Un résumé succinct des différents traitements stimulant l'embryogenèse somatique à partir d'anthères de Vigne est proposé dans la figure 1.

Tableau III. Composition minérale (en mg l^{-1}) du milieu de Murashige et Skoog (1962) dilué deux fois (M.S./2) et de celui de Nitsch et Nitsch (1969) (NN), utilisés pour déclencher l'embryogenèse somatique chez la Vigne.

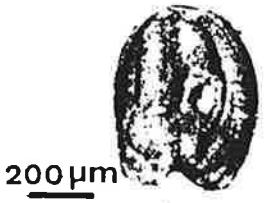
Sels minéraux	M.S./2	NN
Macroéléments		
KNO_3	950,000	950,000
NH_4NO_3	825,000	720,000
$CaCl_2$, 2 H_2O	220,000	220,000
$MgSO_4$, 7 H_2O	185,000	185,000
KH_2PO_4	85,000	68,000
Microéléments		
$FeSO_4$, 7 H_2O	27,800	27,850
Na_2 EDTA, 2 H_2O	37,300	37,250
$MnSO_4$, H_2O	16,700	18,900
$ZnSO_4$, 7 H_2O	10,600	10,000
H_3BO_3	6,200	10,000
KI	0,830	-
Na_2MoO_4, 2 H_2O	0,250	0,250
$CuSO_4$, 5 H_2O	0,025	0,025
$CoCl_2$, 6 H_2O	0,025	-

Tableau IV. Comparaison des principaux paramètres des milieux de Murashige et Skoog (1962) dilué deux fois (M.S./2) et de Nitsch et Nitsch (1969).

Paramètres	M.S./2	NN
Sels totaux (mM)	46,65	43,79
N total (meq.l^{-1})	30,02	27,40
NH_4^+ / N_t	0,34	0,33
K^+ (meq.l^{-1})	10,03	9,92
Ca_2^+ (meq.l^{-1})	3,00	2,26
Ca_2^+ / K^+	0,30	0,23

CONDITIONS STANDARD	FACTEURS STIMULANTS	ASPECTS MORPHOLOGIQUES

Induction

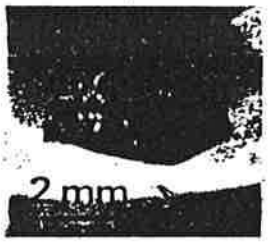


Anthère isolée au stade des tétrades

Milieu NN ou MS / 2
+ 2,4-D 1 mg.l^{-1}
+ BAP 0,25 mg.l^{-1}
Culture à l'obscurité

- Hydrolysat de caséine 1 g.l^{-1} ;
- Forte concentration en azote ;
- NH_4^+ / N_t élevé.

1 mois



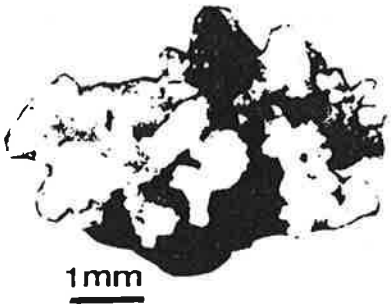
Cal dépourvu d'embryon

Expression

Même milieu de base sans hormones
Culture à la lumière

- Hydrolysat de caséine 1 g.l^{-1} ;
- Forte concentration en potassium.

1 mois



Cal embryogène

Figure 1. Quelques facteurs influençant l'embryogenèse somatique à partir d'anthères de Vigne.

I.3.2. LES PROBLEMES

Les données précédentes montrent que l'on peut obtenir des embryons somatiques de Vigne en grand nombre assez facilement. Il suffit en effet de cultiver des anthères selon une séquence de milieux relativement simples pour observer une embryogenèse intense. Cependant il est en général beaucoup plus difficile d'obtenir des plantules viables. Chez la Vigne en effet, mais aussi chez de nombreuses autres espèces, la majorité des embryons somatiques présentent une structure tératologique (Vermylen-Guillaume, 1969 ; Ammirato, 1977 ; Srinivasan et Mullins, 1980 ; Faure, 1990) et la plupart d'entre eux sont incapables de se développer en plantule (Zatiko *et al.*, 1981 ; Bouquet *et al.*, 1982 ; Mauro *et al.*, 1986 ; Lebrun, 1987 ; Chée et Cantliffe, 1988 ; Faure, 1990).

Pour augmenter le taux de conversion en plantule des embryons somatiques, différents procédés ont été proposés (tab. V). Certains auteurs ont ajouté au milieu de maturation divers régulateurs de croissance (BAP, GA3, FAP, AIB, ABA, NOA), de fortes concentrations en saccharose, du charbon activé, des acides aminés ou des inhibiteurs de la de la synthèse de polyamines. D'autres ont essayé l'action du froid, une dessiccation ou l'ablation des cotylédons sur des embryons somatiques parvenus au stade torpille ou à des stades plus avancés de leur développement. Cependant, si ces traitements permettent d'obtenir un plus grand nombre de plantules viables, ils n'apportent que peu d'informations sur les causes ou du moins sur les origines de cette incapacité à évoluer en plantule.

Chez la Vigne, ce problème est aujourd'hui interprété selon deux théories différentes. La première postule que les embryons somatiques présenteraient une dormance, comparable à la dormance embryonnaire des semences de Vigne qui ont besoin d'une stratification préalable à leur germination. Cette hypothèse s'appuie, chez plusieurs variétés de *V. vinifera* et chez l'hybride Gloryvine (*V. vinifera* L. X *V. rupestris* Scheele), sur l'observation d'une stimulation de la germination par des traitements reconnus comme efficaces pour la levée de dormance embryonnaire : froid humide (Rajasekaran et Mullins, 1979 ; Bessis et Labroche, 1985 ; Mauro *et al.*, 1986), acide gibbérellique (Mullins et Srinivasan, 1976 ; Rajasekaran et Mullins, 1979) ou ablation des cotylédons (Mauro *et al.*, 1986). Cependant, ces traitements de levée de dormance n'induisent qu'une faible augmentation du taux de conversion en plantule, ce qui nous conduit à penser que d'autres phénomènes sont aussi vraisemblablement impliqués dans l'incapacité de ces embryons à poursuivre leur développement. De même, Rajasekaran *et al.* (1982) ont montré que la teneur en acide abscissique (ABA), exprimée en ng embryon^{-1}, augmentait de façon régulière au cours de l'évolution des embryons somatiques du stade globulaire au stade torpille. Ces auteurs ont également mis en évidence qu'un traitement par le froid (2 mois à

4 °C), appliqué à des graines dormantes ou à des embryons somatiques de Vigne, provoquait une diminution de la teneur en ABA et une très forte augmentation du pourcentage de germination. Cependant, selon Lebrun (1987), l'effet du froid sur la germination dépend du génotype et du milieu d'embryogenèse utilisé. Ainsi, chez d'autres espèces de *Vitis*, de tels traitements de levée de dormance sont inefficaces. De plus l'observation de coupes histologiques d'embryons ne permet pas de reconnaître un méristème caulinaire organisé (Favre, 1977 ; Krul, 1985 ; Lebrun et Branchard, 1987 ; Lebrun, 1987).

Tableau V. Exemples de traitements stimulant la conversion en plantule des embryons somatiques de diverses espèces.

Traitement	Espèce	Référence
Addition de BAP	*Vitis sp.*	Gray et Mortensen, 1987
	Vitis sp.	Lebrun, 1987
Addition de BAP et de NOA	*Carica sp.*	Litz et Conover, 1982
Addition de BAP et d'ABA	*Helianthus sp.*	Prado et Berville, 1990
Addition d'ABA	*Carum sp.*	Ammirato, 1977
	Daucus sp.	Kamada et Harada, 1981
	Picea sp.	Dunstan *et al.*, 1988
	Medicago sp.	Fujii *et al.*, 1990
Addition d'ABA et d'AIB	*Picea sp.*	Roberts *et al.*, 1990 a
Addition de GA3 et d'IPA	*Vitis sp.*	Mullins et Srinivasan, 1976
Addition de GA3 et de FAP	*Feijoa sp.*	Cruz *et al.*, 1990
Addition de saccharose (6 %)	*Medicago sp.*	Anandarajah et Mc Kersie, 1990
Addition de charbon activé	*Punica sp.*	Raj-Bhansali, 1990
Addition de proline ou de sérine	*Dactylis sp.*	Trigiano et Conger, 1987
Addition de DFMO	*Daucus sp.*	Mengoli *et al.*, 1989
Traitement par le froid (4 °C)	*Vitis sp.*	Rajasekaran et Mullins, 1979
Dessiccation	*Glycine sp.*	Hammatt et Davey, 1987
	Vitis sp.	Gray, 1989
	Carya sp.	Wetzstein *et al.*, 1989
	Picea sp.	Roberts *et al.*, 1990 b
Ablation des cotylédons	*Corylus sp.*	Radojevic, 1980
	Vitis sp.	Mauro *et al.*, 1986

La seconde théorie avance donc que l'absence de conversion en plantule serait due à un mauvais déroulement de l'embryogenèse, aboutissant à des embryons non fonctionnels. Dans ce contexte, la BAP, dont l'action est renforcée par une dilution du milieu de culture (M.S./2 ou M.S./4) et par une température de 20 °C, stimulerait la mise en place et le développement de la gemmule, permettant ainsi la reprise d'un développement embryonnaire normal (Lebrun, 1987). Cependant, bien que ces traitements par la BAP soient parfois efficaces sur les embryons obtenus en milieu solide, il semble bien établi (Bouquet, comm. pers.) que les embryons produits en milieu liquide soient dotés d'une capacité de conversion beaucoup plus faible, voire quasiment nulle, sans que la raison en soit connue. Or dans les cultures industrielles en fermenteurs, c'est précisément l'embryogenèse en milieu liquide qui doit être maîtrisée.

Il est donc nécessaire de continuer les recherches en utilisant une approche différente et en reconsidérant le problème dès son origine. Dans cette optique, les questions à étudier sont nombreuses, nous nous proposons de poser celles qui nous semblent les plus importantes.

I.3.2.1. L'origine des cals d'anthères et des embryons auxquels ils donnent naissance

A cause de sa difficulté, cette question a été assez peu étudiée chez la Vigne. Depuis les travaux de Bouquet *et al.* (1982), la majorité des auteurs considère que les embryons obtenus par culture d'anthères proviennent des tissus diploïdes du connectif et sont donc effectivement somatiques. Rajasekaran et Mullins (1983) confirment cette observation mais ils indiquent que les cals d'anthères sont en fait mixoploïdes et constitués de deux populations cellulaires : l'une diploïde et d'origine somatique, l'autre haploïde et d'origine pollinique.

Par ailleurs, la possibilité d'obtention et de prolifération de souches tissulaires d'origine pollinique a été montrée par Gresshoff et Doy (1974) et, en 1981, Zou et Li ont rapporté l'obtention de plantules haploïdes. De plus, il est assez surprenant de constater que certains traitements stimulant l'embryogenèse somatique à partir d'anthères (traitement par le froid avant la mise en culture, prélèvement au stade des microspores, effet "nourrice" de l'anthère entière...) soient également, et surtout, des traitements connus pour stimuler l'androgenèse (Norreel, 1973).

Bien que d'après Bouquet *et al.* (1982) l'état haploïde ait de fortes chances d'être létal chez la Vigne, il n'est donc pas impossible d'envisager que les embryons obtenus par

culture d'anthères forment une population hétérogène, à la fois par leurs origines (connectif, assises pariétales, restes du filet, pollen...), et par leur niveau de ploïdie. Il ne serait alors pas étonnant d'observer un grand nombre d'embryons non viables, car d'organisation chromosomique incompatible avec une embryogenèse normale.

I.3.2.2. Les caractéristiques histologiques des embryons somatiques

Aux tout premiers stades de l'embryogenèse zygotique (Rondet, 1961 ; Mestre et Guignard, 1973 ; Thomas, 1975), on observe que la première division de la cellule-oeuf présente une orientation préférentielle et qu'elle conduit à la naissance d'un proembryon à deux cellules inégales et déjà très fortement polarisées. La cellule située au pôle micropylaire sera à l'origine du suspenseur alors que celle du pôle chalazien sera à l'origine de l'embryon lui-même. Par la suite, au cours de l'évolution du jeune embryon, une polarisation très nette apparaît à nouveau par la mise en réserve de deux territoires cellulaires qui cessent de se diviser et conservent leurs caractéristiques embryonnaires. Ces deux territoires seront à l'origine des méristèmes primaires racinaires et caulinaires (Nougarède, 1967).

Si les tout premiers stades de l'embryogenèse somatique ont parfois été étudiés (Mc William *et al.*, 1974 ; Haccius, 1973 ; Benbadis, 1973 ; Vasil *et al.*, 1985), pour la Vigne les travaux sur l'évolution des structures embryonnaires sont inexistants. Chez cette plante, la présence ou l'absence d'un suspenseur n'a pas été clairement établie, pas plus que ne l'a été celle du méristème racinaire et caulinaire. Il en résulte une certaine confusion, conduisant à des hypothèses variées : absence (Favre, 1977) ou présence (Mullins et Srinivasan, 1976 ; Krul et Worley, 1977) des deux méristèmes apicaux, présence ou fonctionnement exclusif du méristème racinaire (Krul, 1985 ; Lebrun et Branchard, 1987) ou caulinaire (Bessis et Labroche, 1985). Enfin, dans l'hypothèse de la présence d'un point végétatif, l'état cyclant ou non cyclant de ses différentes zones n'a pas été déterminé.

I.3.2.3. Les particularités biochimiques des embryons somatiques

Les études concernant les déterminismes biochimiques de l'embryogenèse somatique ont jusqu'ici principalement porté sur les mécanismes moléculaires qui déterminent et contrôlent la formation et le développement des embryons (Chen et Luthe, 1987 ; Wilde *et al.*, 1988 ; Zimmerman *et al.*, 1989 ; Komamine *et al.*, 1990). En revanche des aspects tout aussi importants de l'ontogenèse embryonnaire, tels que l'évolution des teneurs en

facteurs de croissance endogènes (polyamines et phytohormones) ou la synthèse et l'utilisation des substances de réserve, ont été peu étudiés.

Chez la Carotte, la formation des PEMs lors de l'initiation de cultures embryogènes s'accompagne d'une synthèse active d'ARN et de protéines (Fujimara *et al.*, 1980 ; Sengupta et Raghavan, 1980 ; Fujimara et Komamine, 1982). Cependant, après purification et traduction *in vitro* des ARN messagers issus de cals embryogènes et non embryogènes, il a clairement été démontré (Thomas et Wilde, 1987 ; Wilde *et al.*, 1988 ; De Vries *et al.*, 1988 ; Komamine *et al.*, 1990) que les modifications de l'expression génétique entre ces deux types de cultures sont minimes et ne portent que sur quelques espèces protéiques. L'identification de ces polypeptides, marqueurs précoces de l'embryogenèse somatique, est un travail difficile et les résultats obtenus sont encore fragmentaires. Parmi les candidats potentiels, des estérases (Chibbar *et al.*, 1988) et des isoperoxydases (Joersbo *et al.*, 1989) ont été mentionnées. Par ailleurs une protéine nucléaire, spécifiquement reconnue par l'anticorps monoclonal 21 D7 et impliquée dans la division cellulaire (Smith *et al.*, 1988), pourrait aussi jouer un rôle majeur dans l'acquisition de la totipotence (Komamine *et al.*, 1990).

Après l'induction de l'embryogenèse, le développement des embryons somatiques s'accompagne de la synthèse de protéines analogues à des protéines de choc thermique (Pitto *et al.*, 1983). L'importance et le rôle de ces protéines n'ont pas été déterminés mais il a été montré, par utilisation d'inhibiteurs des ARN polymérases (α-amanitine), que leurs ARN messagers apparaissent dès le stade globulaire. Par ailleurs, on connaît des souches thermosensibles de Carotte (Breton et Sung, 1982) qui produisent des embryons somatiques dont le développement s'arrête au stade globulaire. Chez la Vigne, dans certaines conditions, les cultures peuvent également se bloquer au stade globulaire sans que la raison en soit connue (Mauro, comm. pers.). Il semblerait donc que le stade globulaire soit une étape critique du développement embryonnaire (Zimmerman *et al.*, 1989) et que des événements précoces puissent influencer l'évolution ultérieure des embryons somatiques.

S'il est encore impossible de décrire avec précision les mécanismes génétiques impliqués dans le contrôle de la morphogenèse embryonnaire, plusieurs travaux récents (Borkird *et al.*, 1988 ; De Vries *et al.*, 1988 ; Aleith et Richter, 1990 ; Komamine *et al.*, 1990) confortent l'idée que celle-ci est spécifiée par l'expression sélective de seulement quelques gènes induits d'une manière séquentielle. Ainsi De Vries *et al.* (1988) ont isolé, à partir d'une banque d'ADNc, un gène exprimé uniquement dans les PEMs et dans les embryons somatiques. Il est à noter que ce gène est transcrit longtemps avant l'apparition

des premiers embryons et qu'il pourrait donc être exploité en tant que marqueur précoce de l'embryogenèse somatique. Par ailleurs Borkird *et al.* (1988) ont cloné et caractérisé deux gènes dont l'expression est associée à la formation des embryons cordiformes, c'est-à-dire à l'acquisition de la symétrie bilatérale. Ces deux gènes ne sont pas nécessaires à la formation des embryons globulaires mais sont transcrits dès ce stade de développement. Des anomalies quelconques au niveau de l'expression d'un de ces deux gènes pourraient donc expliquer les cas de blocage au stade globulaire mentionnés précédemment.

Parallèlement à ces travaux l'étude des mutants létaux (Poethig, 1988 ; Franzmann *et al.*, 1989), déficients au niveau de certaines étapes de l'embryogenèse zygotique, pourrait également être d'une aide efficace pour la compréhension des phénomènes régissant le développement embryonnaire. Chez *Arabidopsis thaliana* (Patton et Meinke, 1990), certains de ces mutants se développent de façon aberrante, d'une manière tout à fait comparable à ce qui est observé chez la Vigne (Faure, 1990). Il pourrait donc être envisagé que les variations somaclonales, induites au cours de la culture *in vitro*, produisent un grand nombre de mutants incapables de s'engager dans un développement embryonnaire normal.

Dans un autre ordre d'idées, quelques auteurs se sont intéressés à l'évolution de la teneur en hormones endogènes et en polyamines au cours du développement des embryons somatiques.

Les polyamines, qui interviennent dans la croissance et la multiplication cellulaire (Smith, 1985 ; Bagni, 1986 ; Evans et Malmberg, 1989 ; Galston et Kaur-Sawhney, 1990), jouent un rôle fondamental dans l'induction de l'embryogenèse somatique (Montague *et al.*, 1978, 1979 ; Robie et Minocha, 1989 ; El Hadrami *et al.*, 1989 a et b). Cependant, seuls Mengoli *et al.* (1989) ont étudié, chez la Carotte, l'évolution des teneurs en polyamines au cours des différentes phases du développement embryonnaire. Ces auteurs ont ainsi enregistré une augmentation du contenu en polyamines du stade globulaire au stade torpille. Ils ont par ailleurs remarqué que l'addition de difluorométhyl-ornithine (DFMO), un inhibiteur de la synthèse des polyamines, augmentait le taux de conversion en plantule des embryons somatiques. Il semble donc que les polyamines, qui sont d'ailleurs nécessaires au développement de l'embryon zygotique *in situ* (Nagl, 1990), jouent un rôle important dans la différenciation des embryons somatiques. Nous montrerons que, chez la Vigne (Faure *et al.*, 1991), l'évolution des embryons somatiques, du stade globulaire aux stades avancés et tératologiques de leur développement, s'accompagne d'une synthèse et d'une accumulation de polyamines beaucoup plus importante que ce qui est observé chez les embryons zygotiques. Il reste alors à déterminer

dans quelle mesure ces substances peuvent orienter la morphogenèse et quelle est leur contribution dans le développement normal ou tératologique des embryons somatiques.

De même, parmi les différentes classes de régulateurs de croissance, l'acide abscissique (ABA) joue certainement un rôle majeur dans les phénomènes conduisant à la formation, à la maturation et à l'entrée en dormance des semences (Bradbeer, 1988). Chez de nombreuses espèces (Black, 1983), on observe en effet que l'ABA est un puissant inhibiteur de la germination et que la levée de dormance des graines s'accompagne d'une diminution de la teneur endogène en ABA. Cependant il faut souligner que la levée de dormance n'est pas simplement due à une diminution de la quantité d'ABA (Black, 1983 ; Tillberg, 1983) et que de nombreux autres facteurs, encore mal connus, interviennent certainement.

Par ailleurs, au cours de l'embryogenèse zygotique (Black, 1983 ; Le Page-Degivry *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1990) on observe très souvent une accumulation transitoire d'ABA, vers le milieu de la période du développement embryonnaire, c'est-à-dire au stade cordiforme. Les embryons excisés des graines à ce moment précis sont incapables de germer. En revanche, des embryons prélevés avant ou après le pic d'ABA, peuvent s'engager dans une voie de développement appelée "germination précoce" (Ackerson, 1984 ; Le Page-Degivry *et al.*, 1990 ; Welbaum *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1990). Ce comportement s'accompagne souvent d'une évolution tératologique des embryons. La radicule grandit mais l'hypocotyle et les cotylédons se développent d'une façon disproportionnée ; le méristème caulinaire ne fonctionne pas et l'épicotyle n'est pas formé (Finkelstein et Crouch, 1984 ; Le Page-Degivry *et al.*, 1990). Ce type d'évolution n'aboutit que très rarement à l'obtention de plantules viables. Cependant, le rôle et le mode d'action précis de l'ABA sont encore largement controversés (Black, 1983) et il semblerait que d'autres facteurs, notamment un potentiel osmotique élevé (Welbaum *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1990), soient impliqués dans la maturation et dans l'inhibition de la germination précoce des embryons zygotiques.

Paradoxalement, l'ABA n'a que très rarement été recherché et dosé dans les embryons somatiques. Chez la Carotte (Kamada et Harada, 1981), on observe que la teneur en ABA atteint un maximum au stade cordiforme du développement embryonnaire, puis décroît au cours des étapes suivantes. Chez la Vigne, la seule étude réalisée (Rajasekaran *et al.*, 1982) a mis en évidence une augmentation de la quantité d'ABA (en ng embryon^{-1}) du stade globulaire au stade terminal du développement (appelé "stade mature" par ces auteurs). Par contre la teneur en ABA (en ng mg^{-1} de matière fraîche) diminue au cours du développement embryonnaire. La même étude indique de plus que,

comme pour les graines de Vigne, un traitement par le froid (1 à 2 mois à 4 °C) entraîne une chute de la teneur en ABA et stimule la germination. Cependant l'effet d'un traitement par le froid est contesté (Lebrun, 1987) et, chez de nombreuses espèces (Ammirato, 1977 ; Kamada et Harada, 1981 ; Dunstan *et al.*, 1988 ; Fujii *et al.*, 1990 ; Prado et Berville, 1990 ; Roberts *et al.*, 1990 a), on remarque souvent que l'ABA, loin d'inhiber la conversion des embryons somatiques, stimule au contraire leur développement en plantule en favorisant leur maturation et en inhibant leur germination précoce. Il est par ailleurs intéressant de constater que, à l'exemple du modèle zygotique, une augmentation de la pression osmotique du milieu de culture (Anandarajah et Mc Kersie, 1990 ; Guedira *et al.*, 1990) favorise aussi la maturation, inhibe la germination précoce et stimule la conversion en plantule des embryons somatiques.

Il existe donc très probablement, à la fois pour les embryons somatiques et pour les embryons zygotiques, une relation (Wilen *et al.*, 1990) entre leur teneur en ABA, le potentiel osmotique auquel ils sont soumis et leur capacité à évoluer en plantule normale.

Des études concernant les variations de la teneur en ABA au cours de l'évolution des embryons somatiques de Vigne devront donc être reprises, complétées et étendues à divers génotypes.

En ce qui concerne les teneurs endogènes en AIA, les données disponibles sont très fragmentaires, à la fois pour les embryons zygotiques et pour les embryons somatiques. Une des seules études réalisées (Al-Abta et Collin, 1979) indique simplement que les embryons somatiques de Céleri, aux différents stades de leur développement, présentent des quantités relativement faibles d'AIA.

Nous nous efforcerons donc de combler cette lacune en dosant l'AIA dans des embryons zygotiques et dans des embryons somatiques de Vigne au cours du développement embryonnaire.

Enfin, un des aspects les plus étonnants du développement embryonnaire concerne certainement la brusque réversion du métabolisme observée au moment de la germination. En effet les graines qui, au cours de leur formation, avaient accumulé des quantités importantes de réserves au niveau de l'albumen et (ou) des cotylédons et de l'axe embryonnaire, hydrolysent et utilisent massivement ces mêmes réserves lors de leur germination (Dure, 1975 ; Bradbeer, 1988).

Les modalités de l'utilisation des substances de réserve ont été largement étudiées (Opik, 1965, 1966 ; Kriedeman et Beevers, 1967 ; Beevers, 1975 ; Kindl, 1987 ; Huang, 1987) et elles sont maintenant bien connues dans le cas des modèles zygotiques ; les réactions cataboliques mises en jeux sont bien entendu différentes selon le type de produit (amidon, protéines ou triglycérides) préférentiellement accumulé.

Chez la Vigne, les principales réserves présentes dans la graine mûre sont de nature lipidique (Huglin, 1986). Une huile alimentaire d'excellente qualité, riche en acide linoléique (Dupré, comm. pers.), est d'ailleurs obtenue à partir des pépins de raisin.

Les remaniements physiologiques et biochimiques accompagnant l'utilisation des triglycérides de réserve stockés dans les oléosomes n'ont, à notre connaissance, jamais été étudiés dans le genre *Vitis*, mais ces phénomènes ont été décrits pour d'autres graines oléagineuses telles que celles du Coton (Doman *et al.*, 1982), du Jojoba (Moreau et Huang, 1977) ou du Concombre (Chapman et Galleshi, 1985). Une des caractéristiques essentielles de ce type de semence réside dans la conversion des lipides de réserve en glucides, dès les premiers stades de la germination.

Ce phénomène commence par une hydrolyse des triglycérides en glycérol et acides gras au niveau des oléosomes (fig. 2). Les acides gras libres sont alors transférés vers les glyoxysomes où ils subissent une β-oxydation qui les dégrade en acétyl CoA, substance à partir de laquelle est initié le cycle du glyoxylate (Tolbert, 1981). Ce cycle métabolique particulier, absent chez les animaux, constitue une étape clef de la transformation des lipides de réserve en glucides au cours de la germination ; il permet la condensation de deux unités acétyl CoA en une molécule de succinate. Deux enzymes sont spécifiques du cycle du glyoxylate : la malate synthase (MS) et l'isocitrate lyase (ICL) (Dixon et Kornberg, 1959 ; Hock et Beevers, 1966). Ce sont des analyses biochimiques sur fractions cellulaires (Trelease *et al.*, 1971 ; Moreau et Huang, 1977 ; Choinski et Trelease, 1978) ainsi que des études de cytochimie ultrastructurale (Vigil, 1970 ; Sautter et Hock, 1982 ; Titus et Becker, 1985), qui ont permis de déterminer que ces enzymes sont localisées dans les glyoxysomes, organites spécialisés et transitoires, étroitement apparentés aux peroxysomes et caractéristiques des tissus à intense activité néoglucogénique.

Le succinate issu du cycle du glyoxylate est ensuite transféré vers la mitochondrie où il est métabolisé en oxaloacétate. L'oxaloacétate ainsi formé gagne le cytoplasme et il constitue le premier précurseur de la néoglucogenèse, ou glycolyse réverse, dont le produit terminal est le glucose. Comme le schématise la figure 2, sept intermédiaires de la glycolyse réverse peuvent rejoindre le proplaste où ils subissent la suite de réactions

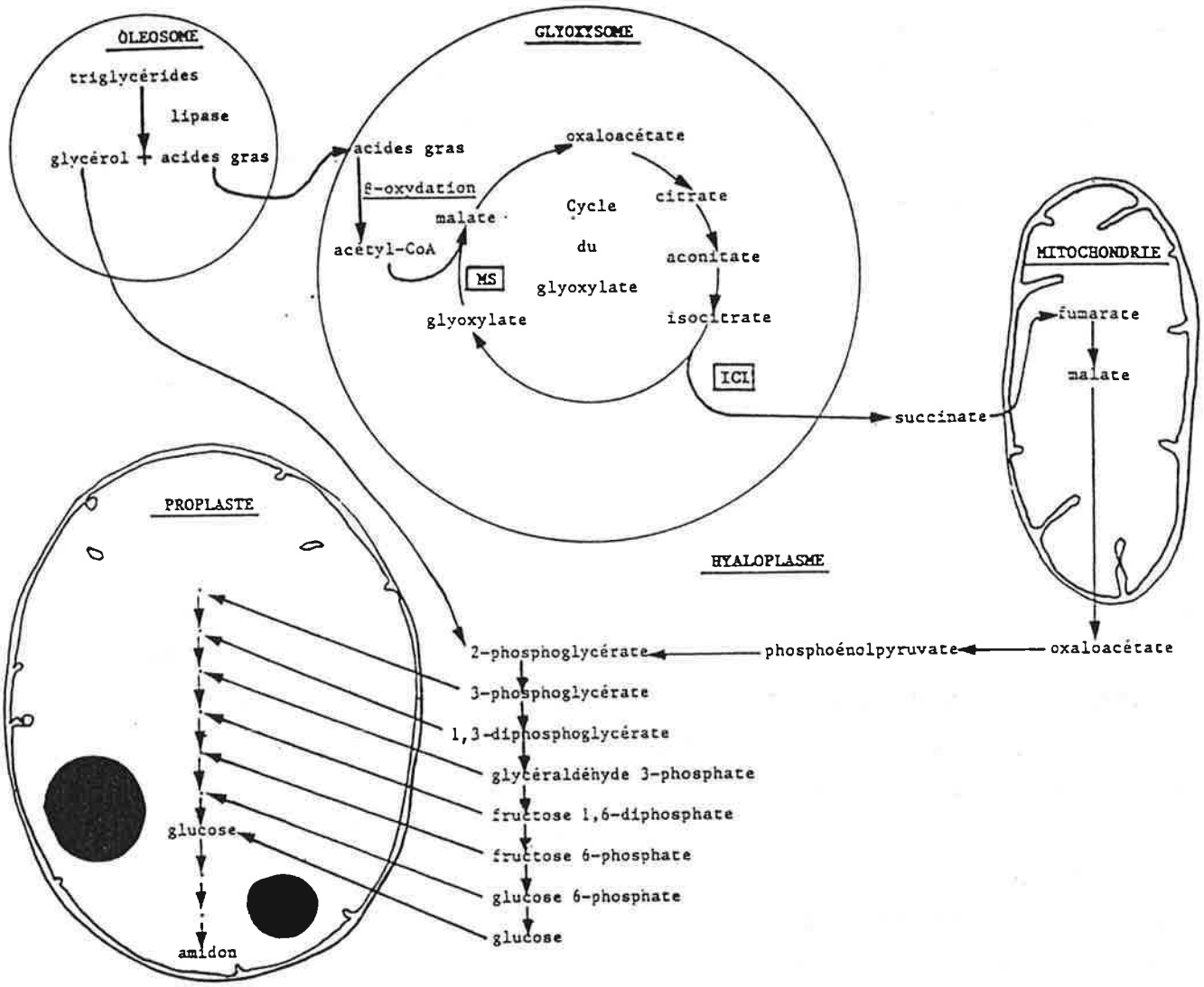


Figure 2. Hydrolyse des triglycérides, β-oxydation des acides gras, cycle du glyoxylate et glycolyse réverse, ou néoglucogenèse, conduisant à la conversion des lipides de réserve en amidon au cours de la germination chez les plantes. Compartimentation et coopération fonctionnelle faisant intervenir les oléosomes, les glyoxysomes, les mitochondries, le hyaloplasme et les proplastes. (Schéma original)

conduisant au glucose puis à l'amidon. Le proplaste se transforme alors progressivement en amyloplaste.

Dans le cas des embryons somatiques, les études concernant l'accumulation et l'utilisation des réserves sont encore très ponctuelles et portent essentiellement sur le cas particulier du stockage et de l'hydrolyse des protéines au cours de la maturation et de la conversion en plantule des embryons (Hakman *et al.*, 1990 ; Roberts *et al.*, 1990 a ; Wilen *et al.*, 1990). En revanche, pour les embryons somatiques issus de plantes à graines oléagineuses aucune étude ne mentionne la nature des réserves et les modalités de leur utilisation. Il serait pourtant intéressant de savoir si la réversion du métabolisme, qui se concrétise par l'utilisation des réserves, au moment de la germination des embryons zygotiques, se produit aussi à une étape particulière du développement des embryons somatiques.

Il paraît donc indispensable d'une part, de déterminer si les embryons somatiques de Vigne accumulent des réserves similaires, en qualité et en quantité, à celles de leurs homologues zygotiques et d'autre part, d'étudier le devenir de ces réserves dans les deux types d'embryogenèse.

I.4. Les objectifs

Le but de notre travail est donc d'étudier les différentes étapes du développement des embryons somatiques de Vigne afin de caractériser leur évolution tératologique et de déterminer les facteurs qui en sont responsables.

Dans cette optique une étude comparative approfondie entre l'embryon somatique et son homologue zygotique doit être réalisée. En effet, si l'on considère que les structures que l'on nomme communément "embryons somatiques" sont véritablement des embryons, on peut supposer que leur évolution normale requiert des conditions nutritionnelles, hormonales et physico-chimiques similaires à celles nécessaires au développement harmonieux et à la germination des embryons zygotiques. A partir d'une telle hypothèse, il apparaît donc nécessaire d'étudier les différences entre les embryons somatiques et les embryons zygotiques, de déterminer l'origine de ces différences et si possible de les estomper par des traitements appropriés.

Dans le cadre d'une telle étude, nous tenterons d'apporter des éléments de réponse aux questions posées dans les paragraphes précédents. Nous diviserons donc ce travail en six grandes parties :

1°) Par une étude histologique et histochimique de la callogenèse et des premiers stades de l'embryogenèse somatique, nous définirons quels sont les tissus qui réagissent et édifient le cal lors de la mise en culture et quelle est l'origine des embryons somatiques.

2°) Nous entreprendrons alors l'examen de l'évolution morphologique, histologique et histochimique des embryons somatiques, depuis le stade globulaire jusqu'aux stades avancés du développement. Nous déterminerons si les embryons somatiques possèdent des méristèmes apicaux et nous comparerons ces observations à celles réalisées sur des embryons zygotiques, pris comme témoins.

3°) Par des examens microspectrophotométriques *in situ* et par cytométrie en flux, nous comparerons les contenus en ADN nucléaire et les états de prolifération des méristèmes caulinaires pour des embryons zygotiques et pour des embryons somatiques, prélevés au stade torpille.

4°) Nous étudierons la nature, la localisation et l'utilisation des réserves embryonnaires en insistant plus particulièrement sur l'évolution de la teneur en triglycérides totaux et sur celle des activités isocitrate lyase et malate synthase au cours du développement des embryons somatiques et de la germination des embryons zygotiques.

5°) Nous déterminerons l'évolution des teneurs en polyamines et des activités enzymatiques qui y conduisent, pour des embryons zygotiques après levée de dormance et au cours du développement des embryons somatiques.

6°) Nous établirons, dans les mêmes conditions, l'évolution des teneurs en ABA et en AIA pour les deux types d'embryogenèse.

Ces diverses parties seront complétées par un examen de l'évolution des poids de matière fraîche et de matière sèche, des teneurs en protéines totales et des teneurs en eau dans des embryons zygotiques à maturité (stade torpille) et au cours des diverses phases de l'embryogenèse somatique.

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

Sans vouloir s'étendre sur une description détaillée de la morphologie de la Vigne et des méthodes ampélographiques, il est nécessaire, pour une bonne compréhension de la méthodologie utilisée dans la suite de ce travail, d'évoquer la structure des fleurs ainsi que celle des semences.

Les inflorescences de Vigne sont des grappes formées de petites fleurs (2 à 7 mm de hauteur selon les espèces) comportant cinq sépales libres rudimentaires, cinq pétales libres à leur base et soudés au sommet pour former une sorte de capuchon appelé calyptre, cinq étamines épipétales et un disque nectarifère intrastaminal, un pistil comportant un ovaire supère à deux carpelles clos, chaque loge ovarienne renfermant deux ovules. La grande majorité des variétés de *V. vinifera* sont hermaphrodites alors que les espèces américaines sont unisexuées, c'est-à-dire, soit mâles (pistil atrophié), soit femelles (pollen infertile).

Les pépins (fig.3) ont également une morphologie et une taille variables suivant les espèces. Ils possèdent des téguments assez durs, un albumen riche en huile et en grains d'aleurone et un petit embryon droit, présentant une dormance éliminable par le froid (Huglin, 1986).

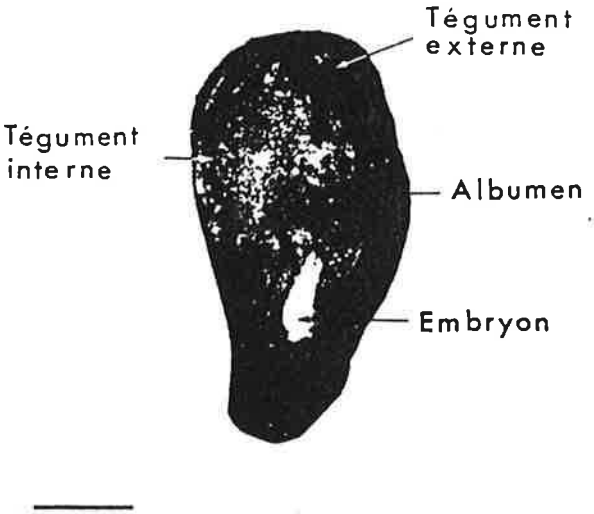


Figure 3. Coupe longitudinale d'un pépin de raisin
Barre d'échelle = 1 mm.

Les études que nous avons réalisées portent essentiellement sur des embryons zygotiques extraits de graines mûres de l'espèce hermaphrodite *Vitis vinifera* cv Grenache noir clone 6662 GF et sur des embryons somatiques de la même espèce obtenus par culture d'anthères.

II-2. Méthodes

II.2.1. OBTENTION DES EMBRYONS SOMATIQUES

Les inflorescences, nécessaires au prélèvement des anthères, proviennent de sarments (Mullins, 1966), taillés au début de l'hiver et conservés en chambre froide dans des sacs de plastique en atmosphère légèrement humidifiée. Les sarments, réhydratés durant 24 heures dans de l'eau de conduite, sont sectionnés en fragments de trois à quatre noeuds, puis bouturés dans un mélange de terreau et de vermiculite (V/V) et placés dans un compartiment climatisé (28 °C) sous une photopériode de 16 heures (tubes fluorescents Mazdafluor, 60 $W.m^{-2}$) ; ils sont arrosés tous les deux jours avec la solution minérale de Murashige et Skoog (1962) diluée deux fois. Dès le débourrement, un seul bourgeon est conservé et les feuilles sont enlevées au fur et à mesure de leur édification. Les inflorescences se développent ainsi sans compétition ; elles sont prélevées lorsque les anthères acquièrent une couleur jaune-vert translucide, caractéristique du stade microspore (Lebrun, 1987 ; Stamp et Meredith, 1988).

Les inflorescences sont désinfectées par un bain de 15 minutes dans 200 ml d'une solution d'hypochlorite de calcium (2,6 % de chlore actif) additionnée de quelques gouttes de Tween 20. Elles sont rincées quatre fois à l'eau bidistillée stérile et conservées pour la durée de l'ensemencement dans une boîte de Pétri stérile.

Les anthères sont prélevées aseptiquement sous loupe binoculaire et elles sont mises en culture dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 25 ml du milieu d'induction suivant, préalablement autoclavé durant 30 minutes à 120 °C :

- Macro- et microéléments de Nitsch et Nitsch (1969)
- Saccharose ..... : 20,00 $g\ l^{-1}$
- 2,4-D ..... : 1,00 $mg\ l^{-1}$
- BAP ..... : 0,25 $mg\ l^{-1}$
- Myo-inositol ..... : 0,10 $g\ l^{-1}$
- Thiamine ..... : 1,00 $mg\ l^{-1}$

- Acide pantothénique..... : 1,00 mg l^{-1}
- Biotine..... : 0,01 mg l^{-1}
- Pyridoxine..... : 1,00 mg l^{-1}
- Hydrolysat de caséine..... : 1,00 g l^{-1}
- pH 5,8

La densité des ensemencements est fixée à 100 anthères par Erlenmeyer. Les cultures sont placées à 24 $\pm$ 1 °C, à l'obscurité, et elles sont agitées à 100 rpm (agitateur Bioblock SM 25).

Après quatre semaines dans ces conditions d'induction, les cals obtenus sont repiqués sur un milieu d'expression, ne différant du précédent que par l'absence de 2,4-D et de BAP. Les cultures sont placées à 24 $\pm$ 1 °C, sous une photopériode de 16 heures (2 W m^{-2}) et elles sont agitées à 100 rpm comme précédemment. Les cals sont repiqués chaque semaine sur du milieu neuf.

Des embryons somatiques, aux différents stades de leur développement, sont visibles après 1 mois de culture en moyenne sur le milieu d'expression, c'est-à-dire environ 2 mois après l'ensemencement des anthères et environ 3 mois après le bouturage des sarments. Les opérations précédentes, depuis le prélèvement des anthères jusqu'à l'obtention des embryons, ont été résumées par la figure 1 (*cf.* p. 19).

II.2.2. PRELEVEMENT DES EMBRYONS SOMATIQUES ET DES EMBRYONS ZYGOTIQUES

Les embryons somatiques sont prélevés, triés manuellement sous loupe binoculaire et séparés en cinq stades de développement différents (fig. 4) : globulaire (G), cordiforme (C), torpille (T), torpille$^+$ (T+, 2 à 4 mm de longueur) et géant (5 à 10 mm de longueur).

Les embryons zygotiques sont prélevés, soit après deux jours d'imbibition des graines dans de l'eau de conduite, ils sont alors dormants, soit après une stratification d'au moins 75 jours à 4 °C, dans ce cas leur dormance est levée. Pour l'étude du développement en plantule des embryons zygotiques (fig. 5), des graines sont déposées, après stratification, sur du papier filtre humide dans des boîtes de Pétri placées à l'obscurité à 24 $\pm$ 1 °C. Les embryons sont extraits après trois jours d'imbibition germinative, au moment de l'émergence de la radicule (après 4 à 6 jours de culture) ou au stade de jeune

plantule (après une dizaine de jours de culture) ; les cotylédons sont alors foliacés mais non encore chlorophylliens et le système racinaire est bien développé.

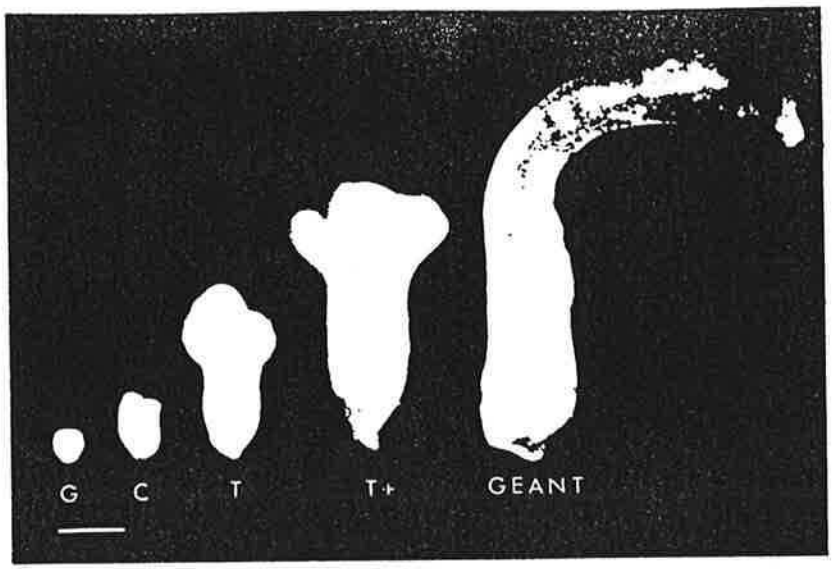


Figure 4. Etapes du développement des embryons somatiques de *Vitis vinifera* cv Grenache noir.
Stade globulaire, G ; cordiforme, C ; torpille, T ; stades ultérieurs, T+ et géant. Barre d'échelle = 500 µm.

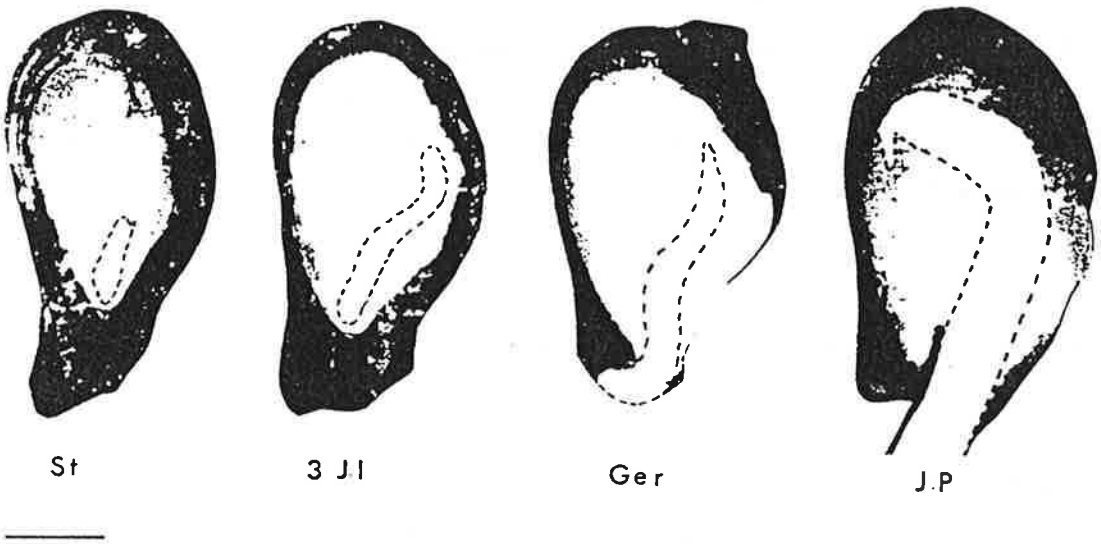


Figure 5. Etapes du développement en plantule des embryons zygotiques de *Vitis vinifera* cv Grenache noir.
Embryon après stratification, St ; après 3 jours d'imbibition germinative, 3 JI ; après percée de la radicule, Ger ; au stade jeune plantule, JP (le système racinaire et une partie de l'hypocotyle ont été sectionnés). Barre d'échelle = 1 mm.

Les échantillons prélevés sont soit directement fixés pour les études histo- et cytochimiques, soit congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 °C pour les dosages biochimiques.

II.2.3. DETERMINATION DE L'ORIGINE DES CALS D'ANTHERES ET DES EMBRYONS AUXQUELS ILS DONNENT NAISSANCE

Des anthères, prélevées sur les inflorescences avant leur ensemencement, permettent de vérifier le stade évolutif atteint à l'intérieur des sacs polliniques.

L'évolution des anthères, depuis leur mise en culture jusqu'à l'apparition des embryons, est précisée par un examen réalisé sur du matériel prélevé tous les sept jours après l'ensemencement et coloré par le mélange vert de méthyle-pyronine (VMP). La pyronine contenue dans ce mélange colorant possède une affinité sélective pour les acides ribonucléiques (Lison, 1960). Des études quantitatives (Nougarède et Rembur, 1976) ont montré que les régions les plus pyroninophiles sont celles où la concentration en ARN est la plus élevée. Ainsi, après coloration par le VMP, les territoires méristématiques, fortement pyroninophiles (Nougarède, 1967), sont facilement repérés.

Les échantillons sont fixés durant 24 heures par le mélange alcool éthylique à 95° : 85 V, formol du commerce à 35 % : 10 V, acide acétique pur : 5 V (AFA). Après un lavage à l'eau courante durant 24 heures, les pièces sont déshydratées par des bains d'éthanol de degré croissant puis incluses dans de la paraffine de point de fusion 56-58 °C. Les sections, réalisées à 5 μm d'épaisseur, sont colorées durant 2 heures par le mélange vert de méthyle-pyronine (Lison, 1960). Après une déshydratation rapide par un bain de 30 secondes dans de l'éthanol à 70°, puis par trois bains d'une minute chacun dans de l'éthanol 100°, les préparations sont éclaircies au toluène et montées au Depex.

Un contrôle de la spécificité de la réaction est réalisé en traitant des préparations par de la ribonucléase à 0,1 %, durant 1 heure à 65 °C, avant la coloration par le VMP. Les zones les plus pyroninophiles et dont la pyroninophilie disparaît après traitement par la ribonucléase, sont considérées comme les plus méristématiques.

N.B. : le mélange vert de méthyle-pyronine est préparé à partir d'une solution stock :

- Vert de méthyle ..... : 7,5 g
- Pyronine..... : 2,5 g
- Eau distillée qsp..... : 1 000,0 ml

La solution stock est débarrassée du violet de méthyle, contaminant les préparations commerciales de vert de méthyle, par 5 à 6 décantations successives en présence de chloroforme (20 ml de chloroforme pour 200 ml de solution stock).

Le mélange colorant est obtenu en diluant 2 fois la solution stock dans un tampon phosphate 0,2 M pH 5,3.

II.2.4. ETUDE COMPARATIVE DES EMBRYONS SOMATIQUES ET DES EMBRYONS ZYGOTIQUES

II.2.4.1. Examen morphologique

La morphologie des différents types d'embryons est observée en microscopie électronique à balayage.

Les échantillons sont placés pendant 2 heures dans la solution fixatrice suivante (Guillaumin, 1980) :

- Tampon phosphate 0,2 M pH 7,2..... : 50 ml
- Glutaraldéhyde à 25 % ..... : 12 ml
- Eau distillée ..... : 38 ml

Après deux lavages successifs dans le tampon phospate 0,1 M pH 7,2, les échantillons sont post-fixés durant 1 heure par une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon. Un rinçage à l'eau bidistillée est appliqué et les spécimens sont déshydratés dans des bains d'éthanol de degré croissant, puis dans trois bains d'éthanol absolu. Du dioxyde de carbone liquide est alors substitué à l'éthanol et les échantillons sont déshydratés par traitement au point critique, technique qui ne provoque aucune modification de la forme ou du volume des pièces. Les spécimens, orientés sur des porte-objets et soumis à un ombrage à l'or-palladium, sont observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage Jeol J S H 840 A.

II.2.4.2. Etude histologique

II.2.4.2.1. *Coloration topographique sur coupes semi-fines*

La confection de coupes semi-fines ($\leqslant$ 1 μm) permet d'obtenir des préparations de très haute qualité. Cette méthode, qui nécessite une inclusion des échantillons dans une résine synthétique, a cependant l'inconvénient d'être relativement longue.

Nous avons adopté ce mode de préparation : -pour l'examen préliminaire de l'organisation histologique globale des différents types d'embryons, -pour vérifier les plans de coupe lors de la confection de sections ultra-fines et -pour détecter les lipides.

Afin d'assurer une meilleure préservation des lipides, toutes les opérations précédant l'inclusion définitive des échantillons sont réalisées à froid (4 °C).

Les échantillons sont fixés durant 2 heures à 4 °C dans du glutaraldéhyde à 5 % dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2. Le matériel est ensuite rincé trois fois dans le même tampon (3 bains de 10 minutes) et post-fixé durant 2 heures, à 4 °C, par une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,2. Après quatre rinçages à l'eau distillée de 10 minutes chacun, les pièces sont déshydratées rapidement à froid par des bains de 10 minutes dans de l'éthanol de degré croissant, puis par un mélange éthanol 100° - oxyde de propylène (1 : 1, V/V) et enfin par trois bains d'oxyde de propylène pur (10 minutes par bain).

Les échantillons sont ensuite plongés dans quatre bains successifs d'oxyde de propylène et de milieu d'inclusion, selon le protocole suivant dont les durées ont été fortement allongées par rapport au protocole classique :

* 1er bain :	- oxyde de propylène	3 V
	- milieu d'inclusion	1 V
	durant 12 heures	
* 2ème bain	- oxyde de propylène	2 V
	- milieu d'inclusion	2 V
	durant 24 heures	
* 3ème bain	- oxyde de propylène	1 V
	- milieu d'inclusion	3 V
	durant 4 heures	
* 4ème bain	- milieu d'inclusion pur	
	durant 4 heures	

La composition du milieu d'inclusion est donnée ci-dessous :

- Araldite commerciale M.....: 50,00 ml
- Durcisseur 964.....: 50,00 ml
- Phtalate de butyle.....: 5,00 ml
- Accélérateur.....: 2,75 ml

L'inclusion définitive des pièces est réalisée dans des moules d'enrobage plats, ce qui facilite l'orientation des échantillons. La polymérisation de la résine est obtenue après 48 heures à 60 °C.

Les échantillons sont débités en sections de 1 μm d'épaisseur à l'aide d'un ultramicrotome LKB Ultrotome III muni d'un couteau de verre. Les coupes sont recueillies dans l'eau du réservoir de réception de l'ultrotome et prélevées avec un anneau en inox. Elles sont déposées dans une goutte d'eau placée sur une lame de verre, elle-même posée sur une plaque chauffante. Après évaporation de l'eau, une goutte de Paragon est déposée sur chaque section. Dès irisation du colorant, l'excès de Paragon est éliminé par rinçage à l'eau courante.

La composition du Paragon est donnée ci-dessous :

- Fuchsine basique ..... : 0,27 g
- Bleu de toluidine ..... : 0,37 g
- Ethanol 30° ..... : 100,00 ml

II.2.4.2.2. *Structure et évolution des méristèmes caulinaires*

La coloration par le VMP (Lison, 1960) permet une étude fine (Nougarède, 1967) de l'organisation et du fonctionnement du méristème caulinaire. Nous avons utilisé ce type de coloration pour étudier et comparer la structure et l'évolution du méristème caulinaire des embryons somatiques aux différents stades de leur développement et celles des embryons zygotiques avant et après leur germination.

Le principe de la coloration par le VMP et son mode opératoire ont été indiqués au paragraphe II.2.3. Cette coloration a seulement été utilisée pour repérer les régions les plus actives sans exploitation sur le plan quantitatif.

II.2.4.3. Etude cytologique

Des grilles de cuivre sont recouvertes d'un film de Formvar selon le protocole suivant : des lames de verre parfaitement propres sont plongées dans une solution de Formvar à 0,5 % dans le chloroforme. Après séchage, le film est décollé à l'une des extrémités de la lame à l'aide d'un trait de scalpel et il est déposé à la surface d'un cristallisoir

rempli d'eau. Des grilles de cuivre sont déposées sur le film de Formvar et le tout est recouvert d'un papier filtre qui est rapidement enlevé et retourné, amenant avec lui les grilles et le film. Après séchage le Formvar adhère aux grilles. La qualité du film de Formvar est vérifiée au microscope électronique avant utilisation des grilles.

Les échantillons sont fixés et inclus comme indiqué au paragraphe II.2.4.2.1. Les blocs sont débités en sections ultra-fines de 600 à 800 Å à l'aide d'un ultramicrotome LKB muni d'un couteau de diamant et les sections sont recueillies sur des grilles de cuivre recouvertes de Formvar.

Le contraste des préparations est obtenu en déposant les grilles durant 15 minutes, côté coupes, sur des gouttes d'une solution aqueuse saturée d'acétate d'uranyle. Cette opération est réalisée à l'obscurité, dans une boîte de Pétri à fond paraffiné, comportant un verre de montre dans lequel sont placées quelques pastilles de soude afin de réduire la tension en gaz carbonique. Après trois rinçages à l'eau bidistillée, les grilles sont séchées puis placées durant 10 minutes dans les mêmes conditions que précédemment, sur des gouttes du mélange suivant :

- Solution de citrate de plomb à 3 % ..... : 10,0 ml
- Solution de soude 10 M ..... : 0,1 ml

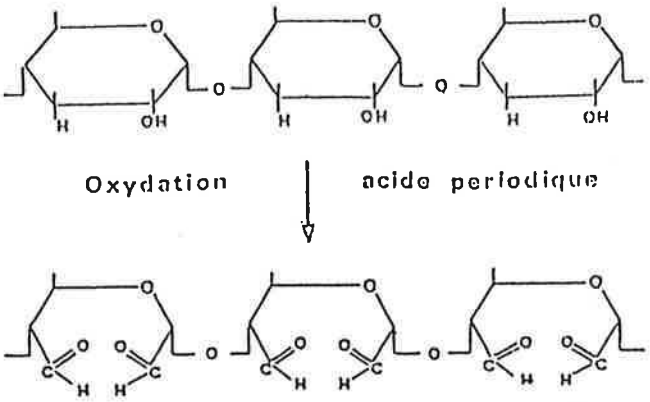
Les grilles sont rincées dans trois bains d'eau bidistillée et séchées à l'abri de la poussière. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi HU 11 E.

II.2.4.4. Etude histochimique

II.2.4.4.1. *Mise en évidence des polysaccharides*

La mise en évidence des polysaccharides est réalisée en utilisant la réaction "acide periodique-Schiff" (APS) (Lison, 1960).

L'action ménagée de l'acide periodique (HIO_4) provoque une oxydation des groupements vic-glycol des polysaccharides et les transforme en dialdéhydes selon le schéma suivant :



Les aldéhydes ainsi formés sont, dans un deuxième temps, colorés spécifiquement par le réactif de Schiff (fuchsine basique décolorée par SO_2). Les polysaccharides à fonctions vic-glycol sont colorés en rouge ; les grains d'amidon réagissent fortement (Jensen, 1962) et prennent une couleur rouge-violacé.

Les échantillons, fixés par l'AFA, déshydratés et inclus dans de la paraffine, sont sectionnés à 5 μm d'épaisseur. Après déparaffinage, les coupes sont réhydratées et soumises à une oxydation de 15 minutes dans une solution aqueuse d'acide periodique à 5 %. Elles sont alors rincées à l'eau distillée et colorées durant 25 minutes par le réactif de Schiff à l'obscurité. Les sections sont ensuite placées dans trois bains successifs, de 2 minutes chacun, d'acide sulfureux préparé extemporanément avec :

- Bisulfite de sodium ..... : 5 g
- HCl M..... : 50 ml
- H_2O..... : 950 ml

Après un lavage à l'eau courante durant 30 minutes, les préparations sont déshydratées et montées au Depex.

Un contrôle de la spécificité de la réaction est réalisé en omettant l'oxydation periodique.

II.2.4.4.2. *Mise en évidence des lipides*

La mise en évidence des globules lipidiques de réserve, lipides homophasiques au sens de Lison (1960), est en général difficile à réaliser sur coupes à la paraffine. Les lipides sont en effet solubles dans les solvants organiques tels que l'éthanol, et ils sont

progressivement dissous au cours des opérations conduisant à l'inclusion. Les liquides fixateurs habituellement utilisés pour la détection histochimique des lipides (formol à 10 %, formol-calcium) (Lison, 1960 ; Jensen, 1962 ; Gabe, 1968) n'assurent pas leur véritable fixation mais permettent seulement leur préservation, par fixation des structures cellulaires dans lesquelles ils baignent. De tels fixateurs ne peuvent donc être utilisés qu'en vue de la confection de coupes à congélation ou d'inclusion dans des milieux miscibles à l'eau (gélatine par exemple), techniques inappropriées dans le cas de très petites pièces telles que les embryons de Vigne. Par ailleurs, le tétroxyde d'osmium, véritable fixateur des lipides, présent dans le mélange de Mévès (Lance, 1957), prépare très mal les échantillons à leur inclusion dans la paraffine (Jensen, 1962 ; Gabe, 1968) et des essais infructueux nous ont conduit à abandonner cette technique.

Nous avons donc utilisé la méthode de Bronner (1975), qui consiste à inclure les échantillons dans de l'araldite après fixation par le glutaraldéhyde post-osmié, et à réaliser des coupes semi-fines de 1 μm d'épaisseur. La mise en évidence des lipides est alors effectuée par coloration classique à l'aide du lysochrome Noir Soudan B. La méthode de Bronner a également l'avantage de révéler les grains d'amidon par leur forte réfringence.

Les techniques de fixation par le glutaraldéhyde post-osmié, d'inclusion dans l'araldite et de confection des coupes semi-fines ont été indiquées au chapitre II.2.4.2.1.

Les sections semi-fines collées sur lame de verre sont traitées durant 1 à 2 minutes par de l'éthanol à 70° puis, pendant 1 heure à 60 °C, par une solution fraîchement préparée et filtrée de Noir Soudan B à saturation dans de l'éthanol à 70°. Après un rinçage d'une minute dans l'éthanol à 70°, les préparations sont lavées à l'eau courante et montées à la glycérine-gélatine. Les lipides sont colorés en noir.

II.2.4.4.3. *Mise en évidence des protéines*

La méthode la plus utilisée pour la mise en évidence des protéines totales d'une préparation histologique est la coloration à la ninhydrine-Schiff (Lison, 1960 ; Jensen, 1962 ; Gabe, 1968). Cette technique consiste à provoquer, sous l'action de la ninhydrine, une désamination oxydative des groupements α-aminés des protéines, désamination conduisant à la formation de fonctions aldéhydes.

Les aldéhydes formés sont secondairement révélés par le réactif de Schiff.

Les échantillons, fixés par l'AFA, sont inclus dans la paraffine et sectionnés à 5 μm d'épaisseur. Après déparaffinage, les préparations sont placées dans une solution de ninhydrine à 0,5 % dans de l'éthanol absolu, à 37 °C, pendant 24 heures. Elles sont ensuite rincées dans deux bains d'éthanol absolu, puis dans un bain d'eau distillée et soumises au réactif de Schiff durant 30 minutes à l'obscurité. Un rinçage est effectué, dans trois bains de 2 minutes chacun d'acide sulfureux préparé extemporanément, puis un lavage à l'eau courante est appliqué durant 30 minutes. Après déshydratation le montage est effectué au Depex. Les protéines sont colorées en rouge.

Un contrôle est réalisé par désamination des échantillons avant le bain de ninhydrine. Pour cela les préparations sont soumises, durant 24 heures à température ambiante, à la solution ci-dessous :

- Nitrite de sodium à 60 % ..... : 20 ml
- Acide acétique à 1 % ..... : 60 ml

II.2.4.4.4. *Mise en évidence des tannins*

Comme pour la recherche des lipides, le faible volume des échantillons ne permet pas de réaliser des coupes à congélation sur matériel frais, ce qui rend impossible l'identification des tannins par fluorescence. Nous avons donc localisé ces composés en microscopie optique en lumière blanche, après une fixation des pièces par un fixateur à base de bichromate de potassium, qui provoque une précipitation et une insolubilisation des composés tannifères (Langeron, 1949).

Les échantillons sont placés durant 4 jours dans le fixateur de Regaud, dont la composition est donnée ci-dessous, avec changement quotidien du mélange.

- Solution aqueuse de bichromate de potassium à 3 % ..... : 11 V
- Formol du commerce à 35 % ..... : 4 V

Les pièces sont ensuite rincées à l'eau distillée durant 1 heure, puis postchromisées pendant 7 jours dans une solution de bichromate de potassium à 3 %, renouvelée quotidiennement. Après un lavage à l'eau courante durant 24 heures, les échantillons sont inclus dans la paraffine.

Les sections, de 4 μm d'épaisseur, sont déparaffinées. Une coloration topographique est effectuée par le VMP et les préparations sont montées au Depex.

Les tannins sont visualisés sous forme d'inclusions brunes et les régions méristématiques sont fortement colorées en rouge par la pyronine.

II.2.4.4.5. *Mise en évidence de la lignine et de la subérine*

La lignine et la subérine sont détectées par des examens réalisés conjointement en microscopie à fluorescence et en microscopie classique en lumière blanche, après divers types de réactions histochimiques.

Les échantillons, fixés par l'AFA et inclus dans la paraffine, sont sectionnés à 5 ou 10 μm d'épaisseur et examinés à l'aide d'un microscope à épifluorescence Laborlux D, équipé d'un 2,4 Ploemopak et d'une lampe à vapeur de mercure HBO 50 W. Les observations sont réalisées en lumière ultraviolette, combinaison de filtres A (excitation : 340 - 380 nm, arrêt : 430 nm), en lumière bleue, combinaison de filtres H_2 (excitation : 390 - 490 nm, arrêt : 515 nm), ou en lumière blanche.

L'observation en lumière ultraviolette de coupes non colorées, sectionnées à 5 μm, peut détecter une autofluorescence bleue due à la lignine. Cet examen doit cependant être complété par d'autres tests car il peut donner une réaction positive avec la subérine ou avec des composés phénoliques autres que la lignine (Biggs, 1984 a ; Harris et Hartley, 1976). Les traitements suivants sont donc effectués :

- Coloration par la phloroglucine chlorhydrique (2 % dans HCl à 17 %) (Jensen, 1962), sur des sections de 10 μm d'épaisseur.

Ce traitement confère à la lignine une coloration rouge, facilement observable en lumière blanche. En lumière UV, son autofluorescence est éteinte ; seule subsiste donc la fluorescence résiduelle de la subérine.

- Coloration par le Soudan IV, préparé à saturation dans l'éthanol à 70°, sur des sections de 10 μm d'épaisseur.

En lumière blanche, la subérine apparaît faiblement colorée ; en lumière bleue, elle présente une fluorescence rouge-orangé intense (Biggs, 1984 b ; Knobloch *et al.*, 1989).

- Coloration par le Noir Soudan B, utilisé à saturation dans l'éthanol à 50°, sur des sections de 10 μm d'épaisseur.

Ce traitement éteint sélectivement la fluorescence de la subérine après observation en lumière UV (Biggs, 1984 b).

II.2.4.5. Analyse du contenu en ADN nucléaire des cellules caulinaires

II.2.4.5.1. *Cytométrie en flux*

Généralités : La cytométrie en flux permet de mesurer simultanément certaines caractéristiques physiques, telles que la diffraction lumineuse, l'absorption lumineuse, la fluorescence ou la taille d'objets microscopiques défilant dans un jet liquide.

Cette méthode, qui peut aussi bien être analytique que préparative, possède de nombreuses applications. Elle est, entre autre, couramment utilisée pour le tri de cellules ou de protoplastes (Brown *et al.*, 1986 ; Brown et Bergounioux, 1988) et pour la détermination du contenu en ADN nucléaire dans différents systèmes biologiques (De Laat *et al.*, 1987 ; Bergounioux *et al.*, 1988 ; Bray, 1990).

L'utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude du cycle cellulaire permet d'analyser, en un temps extrêmement réduit, des échantillons de plusieurs dizaines de milliers de noyaux ; 5 000 objets par seconde peuvent être étudiés. Des événements rares à l'échelle d'une population peuvent donc être facilement mis en évidence.

Cependant, cette technique ne peut fournir que des résultats globaux et, dans le cas d'études de tissus organisés, la localisation des noyaux est bien entendu impossible. Nous avons donc seulement utilisé cette méthode pour vérifier l'homogénéité des populations d'embryons somatiques et pour déterminer ainsi leur niveau de ploïdie. Nous l'avons aussi appliquée pour caractériser les phases d'arrêt du cycle cellulaire dans des embryons zygotiques dormants.

Principe : Le principe général de fonctionnement d'un cytomètre en flux est présenté par la figure 6.

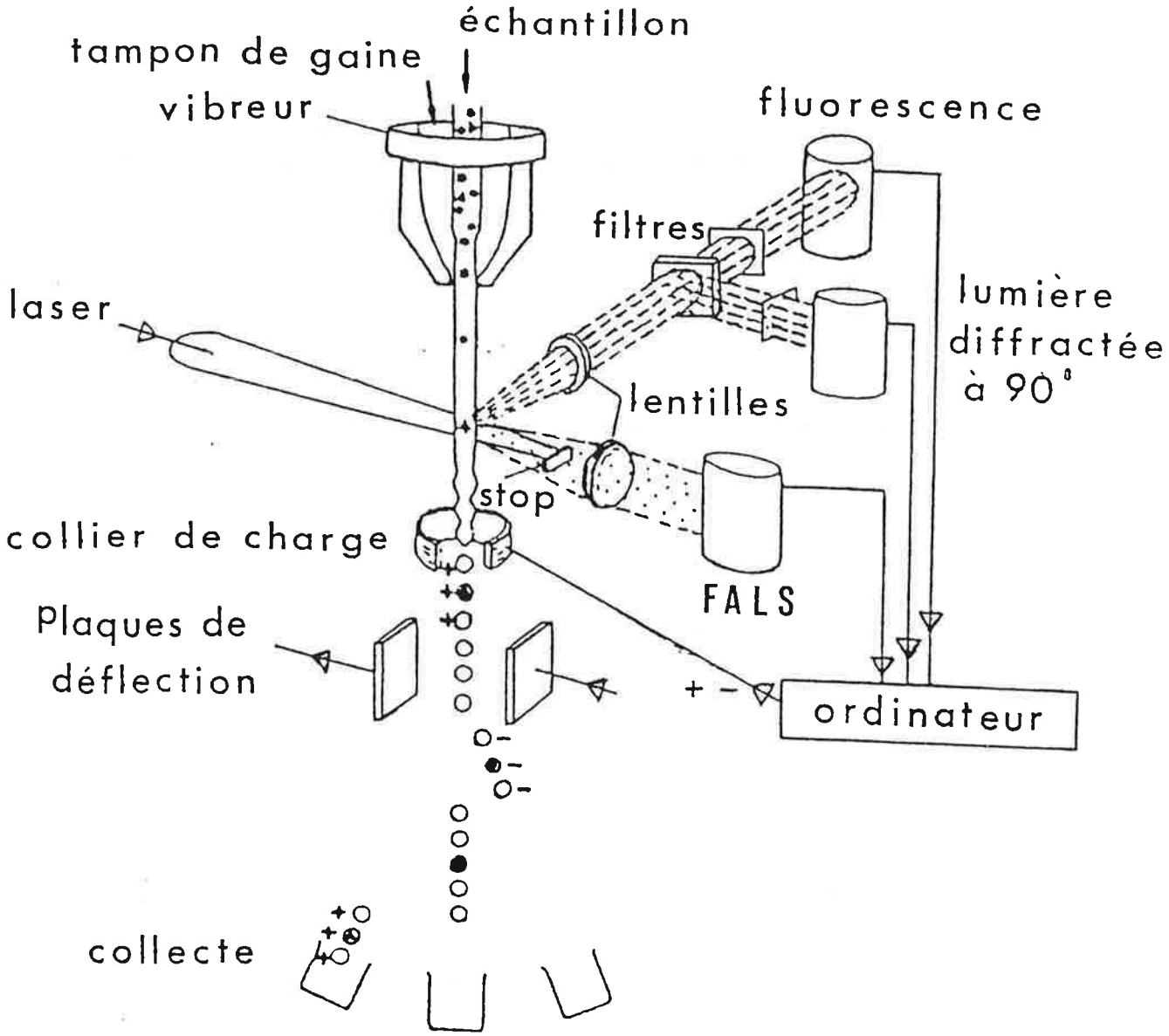


Figure 6. Principe du fonctionnement d'un cytomètre en flux (d'après Brown, 1984). Les objets à étudier défilent dans la gaine liquide et sont interceptés par le rayon laser. Le passage de chaque objet dans le faisceau induit l'émission de signaux (diffraction lumineuse ou fluorescence) qui sont collectés et analysés par ordinateur.

Les objets à analyser, en suspension dans un tampon, sont soumis à une surpression qui les conduit à passer, un à un, par une buse de diamètre variable. La gaine liquide ainsi formée est traversée par un rayon laser qui, en interceptant chaque objet, est diffracté de façon multidirectionnelle. Une série de capteurs permet alors d'analyser et de mesurer la lumière diffractée et émise (fluorescence) par les objets à étudier. Dans le prolongement du laser, une photodiode mesure la lumière diffractée aux petits angles (1 à 20°, Forward-Angle Light Scatter : FALS), qui est proportionnelle à la taille de l'objet. Un second capteur analyse la lumière diffractée à 90°, qui est en relation avec la structure interne de l'objet. La lumière émise par fluorescence est filtrée par un ou par plusieurs filtres, choisis en fonction du type de fluorescence à analyser, et elle est mesurée par un ou par plusieurs détecteurs.

Tous les signaux captés sont enregistrés, analysés par ordinateur et retransmis sous des formes graphiques choisies par l'opérateur.

Application au dosage de l'ADN nucléaire: Les échantillons étudiés, stockés à -80 °C avant utilisation, sont constitués de lots de 50 embryons somatiques au stade torpille et de lots de 50 embryons zygotiques dormants.

La teneur en ADN nucléaire est évaluée après marquage stoechiométrique de l'ADN par un fluorochrome (Hoechst 33342) et mesure de la fluorescence émise.

Les échantillons sont grossièrement broyés à l'aide d'une baguette de verre dans 500 μl de la solution suivante (Brown *et al.*, 1991) :

- $MgCl_2$ ..... : 45,0 mM
- Citrate de sodium ..... : 30,0 mM
- 4-morpholinopropane sulfonate, pH 7 ..... : 20,0 mM
- ß-mercaptoéthanol ..... : 32,0 mM
- Triton X 100 ..... : 0,1 %
- Hoechst 33342 ..... : 3,0 μg ml^{-1}

N.B. A ce milieu de broyage peuvent être ajoutés 2 μl d'une solution d'érythrocytes de poulet préparée selon Galbraith *et al.* (1983). Sachant que les globules rouges de poulet contiennent une quantité fixe d'ADN, égale à 2,3 pg, l'addition de ce standard interne permet de calculer la quantité d'ADN dans les échantillons analysés.

Le broyat est filtré sur une toile à blutter de 30 μm.

Les analyses sont réalisées à 4 °C avec un cytomètre EPICS V (Coulter Electronic, Hialeath, Floride) muni d'une buse de 100 μm, utilisant un laser Argon (Spectra-Physics 2025-05) en UV (351 à 364 nm) qui conduit à une émission du fluorochrome de 408 à 530 nm. Chaque analyse est répétée trois fois.

II.2.4.5.2. *Microspectrophotométrie* in situ

Généralités : La microspectrophotométrie, ou microdensitométrie, est l'application, à l'échelle microscopique, de la technique spectrophotométrique. Elle permet, sur des préparations histologiques, de déterminer la quantité d'une substance colorée soit naturellement, soit après une réaction spécifique et stoechiométrique (Pollister *et al.*, 1969).

Dans son principe, cette méthode est très simple. Elle repose sur la loi de Beer-Lambert qui postule que la concentration (C) d'un chromophore en solution obéit à la relation :

$$C = \frac{E}{k.d}$$

où * E est l'extinction de la solution ($E = \text{Log } I_0 / I$)

* k est le coefficient d'absorption moléculaire du chromophore (constant pour une longueur d'onde donnée)

* d est l'épaisseur traversée par le faisceau lumineux

Par ailleurs, la quantité q de chromophore dans un certain volume, V, est donnée par la formule :

$$q = C.V$$

Or pour un cylindre de surface S et de hauteur d (épaisseur de la section) on a :

$$V = S.d$$

D'où

$$q = C.S.d = \frac{E.S}{k}$$

En pratique, la connaissance de q en unités arbitraires est suffisante pour la comparaison d'objets cytologiques, et la constante k peut être négligée. On obtient donc :

$$q = E.S$$

A une longueur d'onde donnée, une simple mesure de I_0 ("blanc") et de I permet de calculer E et donc de calculer la quantité relative de chromophore, par unité de surface, dans une préparation histochimique.

Cependant cette formule, directement déduite de la loi de Beer-Lambert, n'est valable que pour des solutions vraies, c'est-à-dire uniquement dans les cas où la substance à doser est uniformément répartie dans le champ cytophotométré. Dans le cas d'objets biologiques, cette condition *sine qua non* est souvent loin d'être respectée et les mesures réalisées par la méthode à une longueur d'onde sont entachées d'erreurs importantes qualifiées d'erreurs distributionnelles (Ornstein, 1952). Pour remédier à ce problème, Ornstein (1952) et Patau (1952) ont simultanément développé un modèle mathématique, basé sur des mesures à deux longueurs d'ondes, permettant de calculer un facteur de correction de l'erreur distributionnelle. Sans entrer dans les détails de la démonstration, parfaitement revus par Garcia (1962) et par Hallet (1972), il est utile d'en connaître le résultat final.

Soit λ_1 et λ_2, deux longueurs d'ondes choisies de telle sorte que $E\,\lambda_2 = 2.E\,\lambda_1$.
On a :

$$\gamma = K.B.L_1.C$$

Où * γ est la quantité de chromophore dans le champ cytophotométré
* $K = 1 / \text{Log}\, k_1$ (=constante) (k_1 est le coefficient d'extinction moléculaire à la longueur d'onde λ_1)
* B est la surface du champ photométré
* $L_1 = 1 - T_1$ (T_1 est la transmission à la longueur d'onde λ_1)
* C est le facteur de correction de l'erreur distributionnelle

$$C = \frac{1}{2 - Q} \ln \frac{1}{Q - 1}$$

$$\text{avec } Q = \frac{L_2}{L_1} = \frac{1 - T_2}{1 - T_1}$$

Afin de faciliter les calculs, des tables donnant directement la valeur de $L_1.C$ en fonction de T_1 et T_2 ont été publiées par Mendelsohn (1958). En négligeant la constante K, la quantité de chromophore, en unités arbitraires, correspond donc à la valeur $L_1.C$, lue dans les tables de Mendelsohn, multipliée par la surface du champ photométré.

Applications au dosage de l'ADN nucléaire : réaction de Feulgen : La réaction nucléale de Feulgen (Lison, 1960 ; Jensen, 1962 ; Gabe, 1968), confère aux noyaux une coloration rose qui, sous certaines conditions, est proportionnelle à la quantité d'ADN qu'ils renferment (Lison, 1960). De ce fait, cette réaction est exploitée depuis de nombreuses années pour les dosages microspectrophotométriques de l'ADN nucléaire, en particulier dans les méristèmes caulinaires ou racinaires de nombreuses espèces (Rembur, 1972 ; Nougarède *et al.*, 1973 ; Cottignies, 1974 ; Nougarède et Rondet, 1982 ; Schatt *et al.*, 1985 ; Rembur et Nougarède, 1987 ; Gonthier et Francis, 1989 ; Nougarède *et al.*, 1990).

La réaction de Feulgen se déroule en deux temps. La première étape consiste à réaliser une hydrolyse acide ménagée de l'ADN, qui, en provoquant la rupture des liaisons N-glycosidiques des bases puriques, démasque une fonction aldéhyde au niveau de chaque désoxyribose libéré. L'ADN ainsi hydrolysé est qualifié d'acide apurinique. La seconde étape consiste à révéler les aldéhydes démasqués par l'hydrolyse, à l'aide du réactif de Schiff.

En pratique, la mise en oeuvre de la réaction de Feulgen à des fins d'études microspectrophotométriques exige quelques précautions. En effet, au cours de l'hydrolyse (Rembur, 1978), la colorabilité par le réactif de Schiff augmente tout d'abord jusqu'à un maximum (dépurinisation) puis, après un plateau plus ou moins long et variable en fonction du fixateur et du type de noyau étudié, diminue progressivement (dépolymérisation de l'ADN). Une détermination préalable de la durée optimale de l'hydrolyse doit donc être réalisée.

Par ailleurs, le choix judicieux d'un fixateur (Cottignies, 1981), de sa durée d'application et de la température de fixation, peut permettre d'optimiser l'intensité de coloration de la chromatine après réaction de Feulgen. Ce choix est déterminant pour l'étude de noyaux chromocentriques peu colorables (Germani *et al.*, 1987), type de noyaux rencontrés chez la Vigne (Faure, 1990).

Choix du fixateur et de la durée d'hydrolyse, détermination des deux longueurs d'ondes : Des pointes racinaires de 2 mm de longueur, prélevées sur des somaplants de Vigne cultivés *in vitro*, sont fixées dans les conditions présentées par le tableau VI.

Après fixation, les échantillons sont lavés par 4 bains de 15 minutes chacun dans de l'eau distillée. Le matériel est déposé sur une lame gélatinée ; il est recouvert d'une lamelle et un "squash" est réalisé par pression ménagée. Les préparations sont immergées dans de l'azote liquide et la lamelle est retirée à la lame de rasoir. Après séchage à l'air, les préparations sont collodionnées par immersion dans un bain constitué d'éthanol absolu, d'éther éthylique et de collodion à 4 % (Merck) dans les proportions 200 : 200 : 10 (V/V/V). Après séchage du collodion, les préparations sont rincées durant 30 minutes à l'eau courante, essorées sur papier filtre et placées dans HCl 5 M à température ambiante durant 15, 30, 40, 45, 50, 60 et 75 minutes. La coloration est réalisée, à température ambiante et à l'obscurité, pendant 1 h 45 par le réactif de Schiff préparé à partir de pararosaniline.

Tableau VI. Méthodes de fixation testées pour optimiser l'intensité de coloration des noyaux de Vigne après réaction de Feulgen.

Type de fixateur	Durée de la fixation (en h)	Température de fixation (°C)
AFA [a]	24	20
AFA	24	4
AFA	6	4
AFA_m [b]	6	4
F 10 % [c]	6	4

a : Ethanol à 95° : 85 V, Formol du commerce à 35 % : 10 V, Acide acétique pur : 5 V (AFA).
b : Ethanol à 95° : 60 V, Formol du commerce à 35 % : 30 V, Acide acétique pur : 10 V (AFA_m, Germani *et al.*, 1987).
c : Formol du commerce à 35 %, en solution aqueuse à 10 % neutralisée par NaOH 1 M (F 10 %).

Pour chaque fixateur utilisé, une courbe d'hydrolyse est dressée (fig. 7) à partir de la moyenne de 16 mesures d'extinction nucléaire réalisées à 560 nm, pour chaque durée d'hydrolyse, de 15 à 90 minutes.

Par ailleurs, pour chaque fixateur (tab. VII), les valeurs moyennes d'extinction, calculées pour chaque durée d'hydrolyse, sont comparées à la valeur moyenne maximale en utilisant le test t de Student (Schwartz, 1963).

L'examen de la figure 7 et du tableau VII montre que, pour les fixateurs AFA et AFA_m, la dépurinisation de l'ADN s'effectue en deux temps, plus ou moins marqués

selon la durée et la température de fixation. Elle atteint son maximum après 30 à 45 minutes d'hydrolyse et une dépolymérisation de l'ADN est observée après 50 à 60 minutes d'hydrolyse. Au contraire, après fixation par le formol à 10 %, on observe une augmentation régulière et rapide du nombre de sites colorables pendant les quinze premières minutes de l'hydrolyse puis une stabilisation de la colorabilité jusqu'à 60 minutes d'hydrolyse. Ces deux caractères, hydrolyse rapide et régulière et dépolymérisation tardive de l'ADN, nous ont conduit à adopter la fixation par le formol à 10 %, pendant 6 heures à 4 °C, et à pratiquer une hydrolyse des préparations durant 40 minutes (début du pallier) par HCl 5 M à température ambiante.

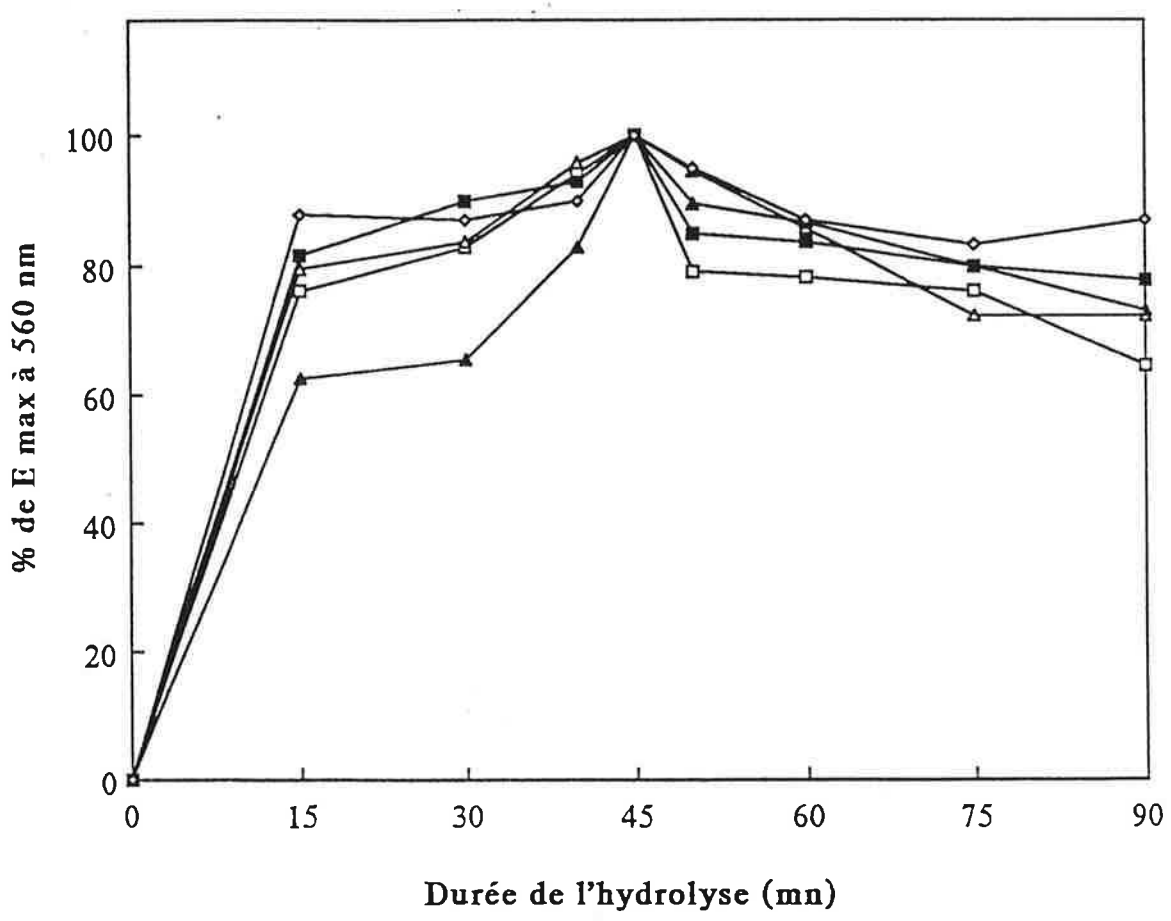


Figure 7. Evolution de l'extinction à 560 nm de noyaux de pointes racinaires de Vigne colorés par la réaction de Feulgen, en fonction de la durée de l'hydrolyse par HCl 5 M et du type de fixation.
AFA, 24 h, 20°C : —△— ; AFA, 24 h, 4°C : —■— ; AFA, 6 h, 4°C : —▲— ;
AFAm, 6h, 4°C : —□— ; Formol à 10 %, 6 h, 4°C : —◇—

La détermination des deux longueurs d'onde est réalisée à partir de courbes d'extinction (fig. 8) dressées sur trois noyaux de pointes racinaires fixées et colorées comme indiqué ci-dessus. Ces deux longueurs d'ondes sont respectivement λ_1 = 505 nm et λ_2 = 560 nm.

Tableau VII. Evolution de l'extinction moyenne (X 100), à 560 nm, de 16 noyaux de pointes racinaires de somaplants de Vigne après la réaction de Feulgen, en fonction de la durée de l'hydrolyse par HCl 5 M et du type de fixation.

Fixation	Durée de l'hydrolyse (mn)							
	15	30	40	45	50	60	75	90
AFAm[a], 6 h, 4 °C	7,9	8,6	9,8	10,4	8,2	8,1	7,9	6,7
AFA[b], 24 h, 4 °C	8,0	8,8	9,1	9,8	8,3	8,2	7,8	7,6
AFA, 24 h, 20 °C	7,7	8,1	9,3	9,7	9,2	8,3	7,0	7,0
AFA, 6 h, 4 °C	6,5	6,8	8,6	10,4	9,3	9,0	8,3	7,6
F 10 %[c], 6 h, 4 °C	8,8	8,7	9,0	10,0	9,5	8,7	8,3	8,7

a : Ethanol à 95° : 60 V, Formol du commerce à 35 % : 30 V, Acide acétique pur : 10 V (AFAm, Germani *et al*, 1987)
b : Ethanol à 95° : 85 V, Formol du commerce à 35 % : 10 V, Acide acétique pur : 5 V (AFA)
c : Formol du commerce à 35 %, en solution aqueuse à 10 % neutralisée par NaOH 1 M (F 10 %).
Les valeurs soulignées dans une même ligne ne diffèrent pas significativement au seuil 5 % (test t de Student) de la valeur maximale d'extinction.

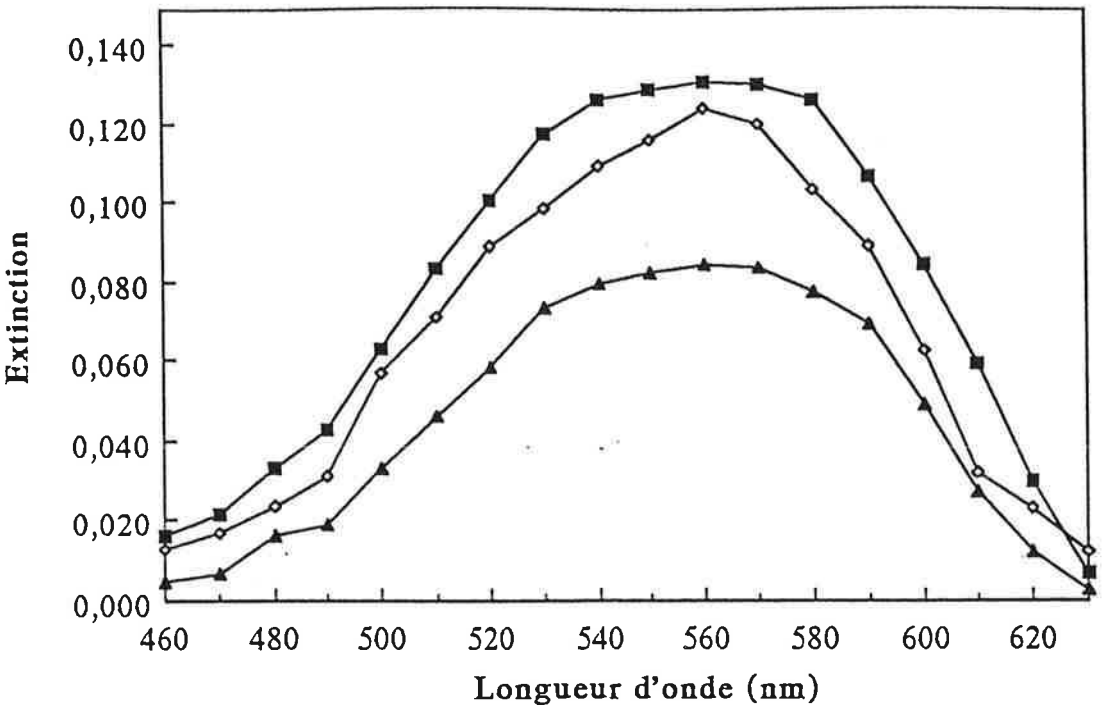


Figure 8. Courbes d'extinction obtenues sur trois noyaux de pointes racinaires de Vigne colorés par la réaction de Feulgen.

Application de la technique et mesures : Divers types d'échantillons ont été fixés et colorés comme indiqué précédemment ; ce sont des pointes racinaires de somaplants mais aussi des embryons somatiques au stade torpille, des embryons zygotiques dormants extraits de graines réimbibées durant 48 h et des embryons zygotiques après germination. Des coupes permettant de localiser les régions à étudier, et non des "squashs", ont été effectuées après inclusion dans la paraffine.

La technique de microspectrophotométrie à deux longueurs d'onde nécessite des mesures sur des noyaux entiers ; une détermination préalable des diamètres nucléaires doit donc être réalisée. Pour cela, les différents types d'échantillons (fixés par le formol à 10 % neutralisé et inclus dans la paraffine) sont sectionnés à 10 μm d'épaisseur et colorés par la réaction de Feulgen. Les préparations sont montées au Depex et les diamètres nucléaires moyens sont déterminés à l'aide d'un dispositif Visopan, sur 100 noyaux par échantillon. Les sections ultérieures sont réalisées en choisissant une épaisseur de coupe égale à une fois et demi le diamètre nucléaire moyen de l'échantillon étudié, soit 7 μm. Un tel choix permet d'obtenir un nombre raisonnable de noyaux entiers, tout en limitant les superpositions.

Les valeurs 2 C et 4 C de référence ont été déterminées en mesurant le contenu en ADN nucléaire de 100 demi-télophases et de 50 prophases appartenant à des embryons somatiques au stade torpille et de 100 demi-télophases et de 85 prophases appartenant à des embryons zygotiques après germination. Ces dernières mesures ont servi de référence pour l'examen des embryons zygotiques dormants.

Les paramètres de distribution 2 C et 4 C de référence sont donnés par le tableau VIII.

Tableau VIII. Paramètres des distributions de référence 2 C et 4 C établies d'après les mesures effectuées sur des noyaux d'embryons zygotiques et somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.

Paramètre	2 C (demi-télophases)		4 C (prophases)	
	Embryons zygotiques[a]	Embryons somatiques[b]	Embryons zygotiques[a]	Embryons somatiques[b]
Moyenne (en unité arbitraire, ua)	9,02	7,78	18,75	16,39
Ecart type	1,24	1,34	2,16	2,47
Dispersion à 95 % de sécurité	6,54 - 11,50	5,10 - 10,46	14,43 - 23,07	11,45 - 21,33

a : embryons zygotiques après germination ; 100 demi-télophases et 85 prophases ont été mesurées.
b : embryons somatiques au stade torpille ; 100 demi-télophases et 50 prophases ont été mesurées.

II.2.4.6. Dosage des polyamines

Le principe de la méthode consiste à effectuer une extraction des polyamines (libres et conjuguées), à les rendre fluorescentes par une réaction de dansylation, à les séparer par chromatographie sur couche mince (TLC) puis à les doser par spectrofluorométrie en UV.

Extraction : Dans un échantillon biologique, les polyamines peuvent se présenter soit sous forme libre, soit sous forme conjuguée. Les polyamines conjuguées peuvent être liées à de petites molécules, elles se trouveront alors dans la fraction TCA-soluble, ou bien être liées à de grosses molécules, on les retrouvera dans la fraction TCA-insoluble.

Le tableau IX présente les divers types d'échantillons analysés pour les embryons zygotiques et somatiques. Chaque dosage a été répété trois fois. Les prélèvements ont ainsi concerné, tous stades confondus, 1 060 embryons zygotiques et 3 381 embryons somatiques. Les étapes de l'extraction sont résumées dans la figure 9.

Les échantillons sont broyés dans un mortier en présence d'azote liquide et de trois volumes d'acide trichloroacétique (TCA) à 5 %. L'extrait est centrifugé à 1 500 g durant 15 mn et le surnageant est prélevé et lavé en présence d'un volume égal d'éther éthylique. La phase éthérée contenant le TCA est éliminée totalement par pipetage puis évaporation sous une hotte. La phase aqueuse contient à la fois les polyamines libres, prêtes pour la dansylation et les polyamines conjuguées de la fraction TCA-soluble, à hydrolyser avant dansylation.

Tableau IX. Effectifs et poids de matière fraîche des divers types d'échantillons utilisés pour les dosages de polyamines. Trois dosages ont été effectués dans chaque cas.

Type d'échantillon	Effectif et poids de matière fraîche[a]		
	1er dosage	2ème dosage	3ème dosage
Embryon zygotique			
stratifié	500 (75,9)	250 (37,6)	250 (38,2)
après percée de la radicule	20 (33,0)	20 (31,5)	20 (26,7)
Embryon somatique			
globulaire	1 168 (63,6)	411 (21,7)	615 (35,3)
cordiforme	262 (48,9)	223 (47,7)	124 (23,3)
torpille	210 (115,0)	84 (50,0)	51 (26,5)
T+	63 (181,6)	77 (172,8)	72 (174,5)
géant	7 (175,5)	7 (126,3)	7 (200,8)

a : Le poids de matière fraîche des échantillons, indiqué entre parenthèses, est exprimé en mg.

Pour l'extraction des polyamines conjuguées, présentes dans la fraction TCA-soluble, une aliquote de la phase aqueuse est prélevée et placée dans une ampoule en verre en présence d'un volume égal d'HCl 12 M. Les ampoules sont scellées hermétiquement à la flamme et placées à 110 °C durant 12 à 14 heures. Après hydrolyse, le contenu des ampoules est centrifugé 10 mn à 1 500 g. Le surnageant est prélevé et placé à l'étuve à 110 °C jusqu'à évaporation complète afin d'éliminer l'acide chlorhydrique, néfaste pour la dansylation. Après resuspension dans 200 μl de TCA à 5 %, les échantillons sont prêts pour la dansylation.

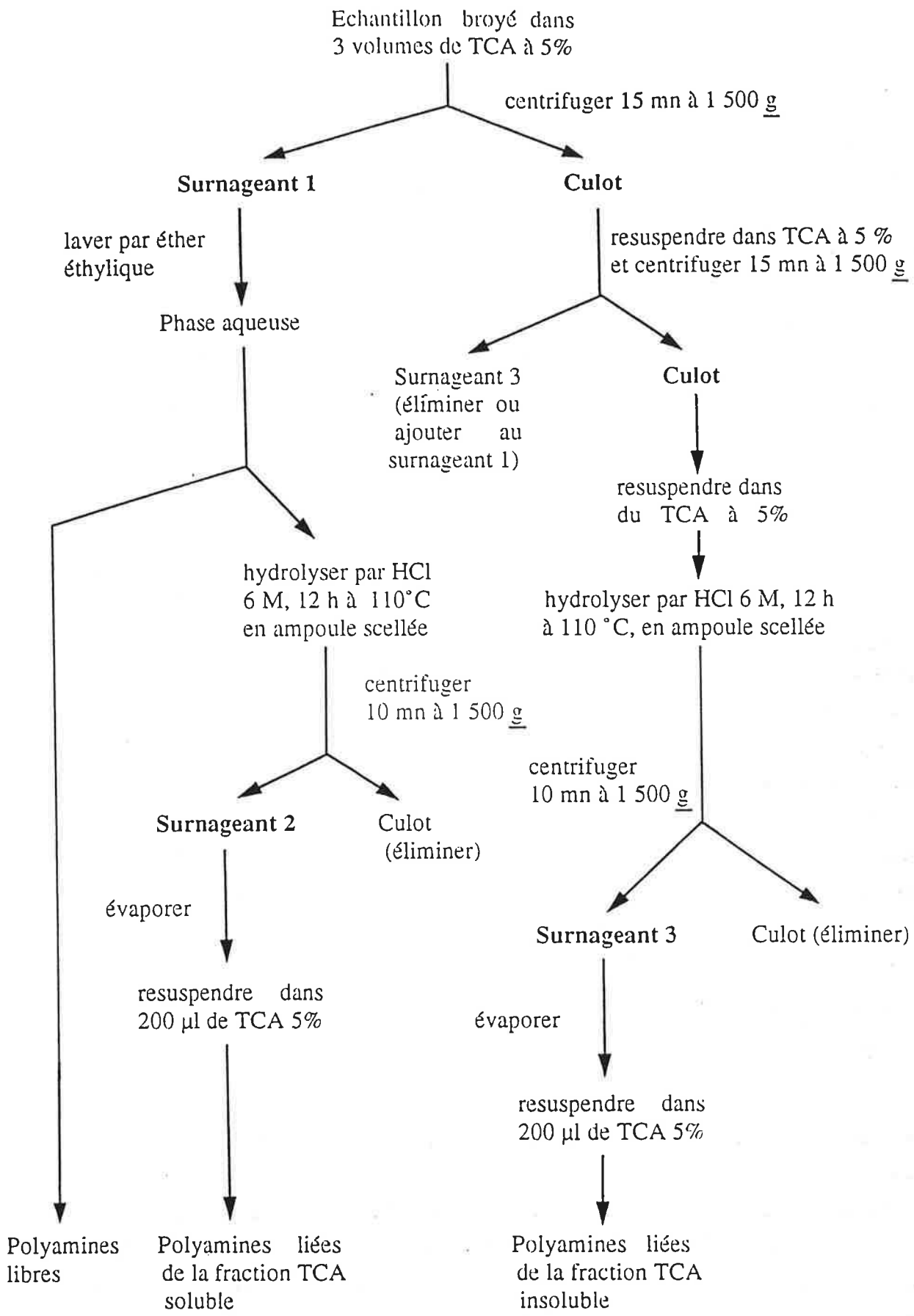
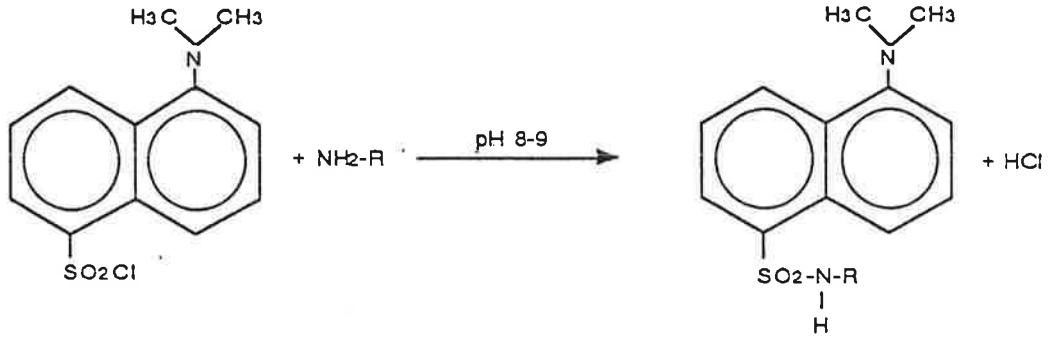


Figure 9. Protocole d'extraction des polyamines libres et conjuguées.

Pour l'extraction des polyamines conjuguées de la fraction TCA-insoluble, le culot obtenu après la première centrifugation est lavé deux fois par du TCA à 5 %, resuspendu dans du TCA à 5 % et centrifugé à 1 500 g durant 15 mn. Le nouveau culot est resuspendu dans un volume connu de TCA à 5 %. Une fraction de la suspension est prélevée et hydrolysée comme indiqué précédemment.

Dansylation :



A 100 μl des extraits contenant les polyamines sont ajoutés 200 μl de chlorure de dansyl en solution dans l'acétone (3 mg ml^{-1}) et 50 mg de $NaHCO_3$ qui ajuste le pH à 8-9. La dansylation s'effectue à température ambiante en conservant les tubes pendant 18 heures à l'obscurité.

Des échantillons de référence de putrescine (Put), spermidine (Spd) et spermine (Spm) (Sigma) en solution dans HCl 0,1 M sont dansylés suivant le même protocole.

Séparation : Aux extraits embryonnaires et aux échantillons de référence dansylés sont ajoutés 100 μl de proline (15 mg ml^{-1}) afin de fixer l'excès de chlorure de dansyl. Après 30 mn d'incubation à l'obscurité, les polyamines dansylées sont extraites par passage au vortex en présence de 500 μl de benzène anhydre. Des fractions de différents volumes (25 à 200 μl), prélevées dans la phase benzénique, sont déposées sur des plaques TLC de Silicagel 60 (Merck) fraîchement activées (12 heures à 105 °C). La migration est effectuée durant 4 heures, en utilisant comme solvant le mélange acétate d'éthyle-cyclohexane (2 : 3, V/V). Après séchage des plaques, chaque tache, visualisée sous lumière UV, est entourée et caractérisée par rapport aux références.

Dosage : Les taches correspondant aux différentes polyamines sont grattées et mélangées à 2 ml d'acétone anhydre. Après sédimentation de la poudre, les mesures sont réalisées au spectrofluorimètre (Jasco FP-550) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 506 nm.

II.2.4.7. Détermination des activités arginine- (EC 4.1.1.19) et ornithine décarboxylase (EC 4.1.1.17)

L'arginine- (ADC) et l'ornithine décarboxylase (ODC) sont deux enzymes clés de la biosynthèse des polyamines (fig. 10). Dans des extraits bruts, leur activité peut être déterminée, à concentration saturante en substrat (Vm), en fournissant des précurseurs (arginine et ornithine) radiomarqués et en estimant la vitesse de leur décarboxylation par mesure de la quantité de CO_2 radioactif dégagé pendant un temps donné.

Les divers types d'échantillons utilisés dans ce travail sont présentés dans le tableau X. Ils rassemblent, tous stades confondus, 260 embryons zygotiques et 1 627 embryons somatiques.

Tableau X. Effectifs et poids de matière fraîche des divers types d'échantillons utilisés pour la détermination des activités ADC et ODC. Trois dosages ont été effectués dans chaque cas.

Type d'échantillon	Effectif et poids de matière fraîche[a]		
	1er dosage	2ème dosage	3ème dosage
Embryon zygotique			
stratifié	100 (17,2)	50 (8,0)	50 (8,3)
après percée de la radicule	20 (26,0)	20 (23,1)	20 (23,4)
Embryon somatique			
globulaire	334 (18,3)	290 (17,6)	366 (17,4)
cordiforme	138 (29,7)	71 (18,2)	137 (21,0)
torpille	72 (38,2)	52 (32,6)	71 (37,5)
T+	22 (19,5)	22 (17,9)	23 (22,5)
géant	7 (158,0)	7 (147,5)	7 (136,1)

a : Le poids de matière fraîche des échantillons, indiqué entre parenthèses, est exprimé en mg.

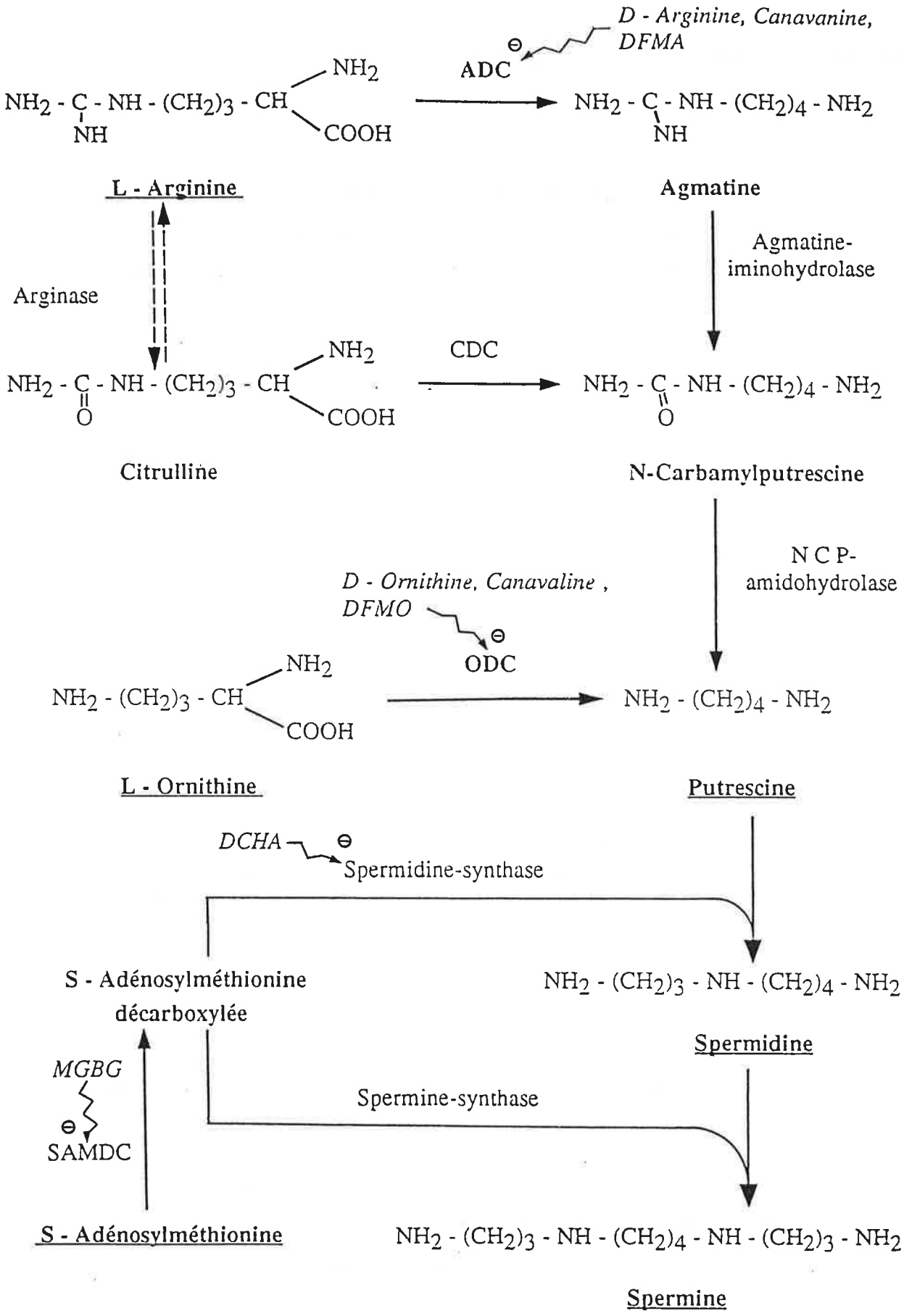


Figure 10. Voies de biosynthèse des polyamines chez les plantes (d'après Bagni, 1986).

Chaque échantillon est broyé en présence d'azote liquide dans un tampon Tris-HCl pH 8,3, contenant 50 μM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), 25 μM de pyridoxal phosphate et 2,5 mM de dithiothréitol (DTT). L'extrait est centrifugé à 26 000 g à 0 °C pendant 30 minutes. Les activités enzymatiques sont déterminées à la fois dans le surnageant et dans le culot après resuspension et sonication. Des fractions de 500 μl de surnageant ou de culot resuspendu et soniqué, sont incubées en présence de 24 μl d'eau distillée contenant 14,8 kBq de [1-^{14}C] ornithine (1,998 GBq mmol^{-1}, Amersham, Angleterre) ou de [1-^{14}C] arginine (1,698 GBq mmol^{-1}, CEA, France). De l'ornithine ou de l'arginine froide est respectivement ajoutée aux milieux d'incubation jusqu'à une concentration de 13,5 mM. Les tubes sont hermétiquement fermés par des bouchons de caoutchouc auxquels est attaché un réservoir en verre contenant 200 μl de Protosol (NEN), ammonium quaternaire permettant la capture du CO_2. La réaction se déroule durant 1 heure à 37 °C, elle est ensuite arrêtée par addition de 200 μl d'acide perchlorique à 6 %. Les tubes sont agités durant 1 heure et le Protosol est prélevé et placé dans des tubes contenant 4,5 ml de liquide à scintillation. La radioactivité des échantillons est mesurée par un compteur à scintillation Beckman LS 1 800.

II.2.4.8. Dosage de l'acide indolylacétique et de l'acide abscissique

II.2.4.8.1. *Choix de la technique*

L'AIA et l'ABA peuvent se trouver dans la plante sous forme libre ou conjuguée. Seules les formes libres sont immédiatement utilisables et ce sont elles que nous avons dosées ; les formes conjuguées sont considérées comme des éléments de réserve à partir desquelles la substance de croissance peut être relarguée ou bien elles assurent une détoxification lorsque la charge hormonale devient trop importante dans la plante (Moore, 1989).

L'étude de l'évolution des teneurs endogènes en AIA et ABA libres, au cours de l'évolution des embryons somatiques et de la germination des embryons zygotiques, nous à paru devoir être réalisée par des techniques physiques de séparation et de dosage. En effet, des méthodes réputées fiables de détection et de quantification des teneurs en ces substances de croissance (Dörffling et Tietz, 1983 ; Horgan, 1988 ; Prinsen *et al.*, 1991) étaient disponibles et elles avaient déjà fourni des données très cohérentes sur les variations des teneurs en hormones endogènes dans des conditions physiologiques bien définies (Van Onckelen *et al.*, 1980 a et b ; Wyndaele *et al.*, 1985 ; Horemans *et al.*, 1986). Par contre, si, par leur sensibilité très élevée, les méthodes immunologiques peuvent paraître les plus adaptées, de fait, comme le remarquent Prinsen *et al.* (1991), les anticorps anti-AIA ou

anti-ABA, actuellement disponibles, n'ont pas une spécificité suffisante pour être utilisés sans ambiguïté sur des extraits de plantes, même purifiés, dans des tests radioimmunologiques ou des tests ELISA. De plus ces tests ne permettent pas de distinguer les formes libres des formes liées. Les techniques immunocytochimiques sont soumises aux mêmes restrictions ; elles ne permettent pas de distinguer les formes libres des formes liées (Pence et Caruso, 1988), leur quantification n'est pas fiable et, même après de multiples vérifications, "les risques d'interprétations erronées ne sont que limités" (Sossountzov *et al.*, 1988).

II.2.4.8.2. *Application*

Le dosage de l'AIA a été réalisé par HPLC, celui de l'ABA a été effectué par chromatographie en phase gazeuse associée à un détecteur de capture d'électrons. Ces méthodes sont très sensibles : pour l'AIA la limite de détection est de 0,05 pmoles injectées, pour l'ABA elle est de 2 fmoles injectées. Cependant, ces deux types de dosages sont précédés par des étapes communes d'extraction et de purification (fig. 11) au cours desquelles des quantités plus ou moins importantes d'ABA et d'AIA sont perdues. Il est donc nécessaire de disposer d'un abondant matériel.

Tableau XI. Effectifs et poids de matière fraîche des divers types d'échantillons utilisés pour les dosages de l'ABA et de l'AIA.

Type d'échantillon	Effectif et poids de matière fraîche[a]	
Embryon zygotique		
dormant	2 089	(457,4)
stratifié	2 300	(451,0)
après percée de la radicule	113	(189,7)
Embryon somatique		
globulaire	263	(15,2)
cordiforme	375	(63,3)
torpille	385	(203,8)
T+	140	(458,2)
géant	58	(2 016,7)

a : Le poids de matière fraîche des échantillons, indiqué entre parenthèses, est exprimé en mg.

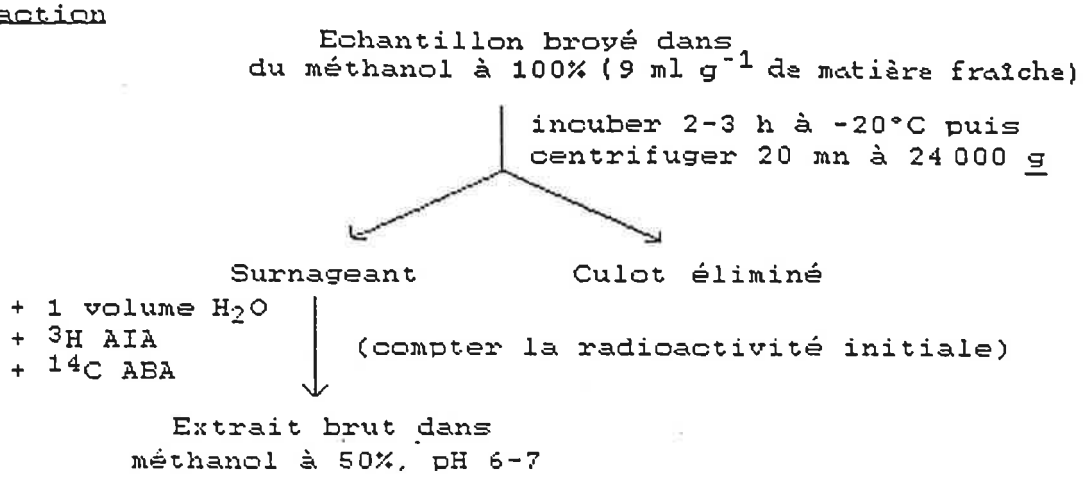
Des essais préliminaires nous ont conduit à effectuer les dosages sur les échantillons présentés dans le tableau XI. Ils regroupent, tous stades confondus, 4 502 embryons zygotiques et 1 221 embryons somatiques. En raison du grand nombre d'embryons nécessaire aux dosages, un seul extrait a pu être réalisé par type d'échantillon dans le temps dont nous disposions pour préparer cette thèse.

Extraction : Le matériel est broyé dans du méthanol à 100 % (9 ml g^{-1} de matière fraîche) et il est recueilli dans des tubes à centrifuger. Afin de pouvoir calculer le rendement de l'extraction et des purifications successives, des standards internes de ^{3}H-AIA et de ^{14}C-ABA (Amersham, Angleterre), correspondant à environ 10 000 à 20 000 dpm, sont ajoutés aux extraits. Les homogénats sont incubés à -20 °C à l'obscurité durant 2 à 3 heures, puis centrifugés à 24 000 g à 4 °C durant 20 minutes. Le surnageant est prélevé et dilué deux fois dans de l'eau distillée. On obtient ainsi l'extrait brut dans du méthanol à 50 %, pH 6-7. A ce pH, l'AIA et l'ABA sont sous forme dissociée.

Purification de l'extrait brut : L'extrait brut est filtré à travers deux cartouches successives Sep-Pack C18 (Waters Ltd) qui retiennent les composés apolaires, puis à travers une colonne de résine échangeuse d'ions DEAE-Sephadex A25 (Waters Ltd) où les molécules polaires, notamment l'AIA et l'ABA, sont retenues. Les composés fixés à la colonne de DEAE-Sephadex sont élués par de l'acide formique à 6 % (pH 2,3), puis filtrés à travers une colonne de Bound-Elut RP-C18 (Analytichem Intern.) acidifiée, pH 2,3. A ce pH, l'AIA et l'ABA sont protonés et retenus par la colonne C18 ; ils sont élués par un lavage par du diéthyléther. La phase aqueuse est éliminée et la fraction éthérée est évaporée sous vide. Après dissolution dans du méthanol à 100 %, une solution méthanolique d'AIA et d'ABA est obtenue. Le méthanol est alors totalement évaporé sous vide.

Séparation de l'AIA et de l'ABA : HPLC préparative : Les échantillons sont dissous dans 100 μl d'un solvant de supression d'ions (IS) (méthanol / eau / acide acétique, 40 : 59,5 : 0,5 ; V/V/V) puis ils sont soumis à une HPLC (Perkin Elmer series 2) en utilisant une colonne (250 X 4 mm, L X DI) de Rosil C18 HL 5 μm et une phase mobile IS en flux isocratique de 0,5 ml mn^{-1}. Préalablement à la séparation, la colonne est calibrée par injection de 100 μl d'un mélange de ^{14}C-ABA et de ^{3}H-AIA en solution dans le solvant IS. Les temps de rétention de l'ABA et de l'AIA sont déterminés par comptage de la radioactivité ^{14}C et ^{3}H dans les fractions collectées. Des aliquotes de 100 μl pour chaque échantillon sont injectées dans le chromatographe et les fractions correspondant au temps de rétention de l'ABA et de l'AIA sont recueillies. Après comptage de leur radioactivité, les fractions purifiées d'ABA et d'AIA sont lyophylisées.

I/ Extraction



II/ Purification

A)

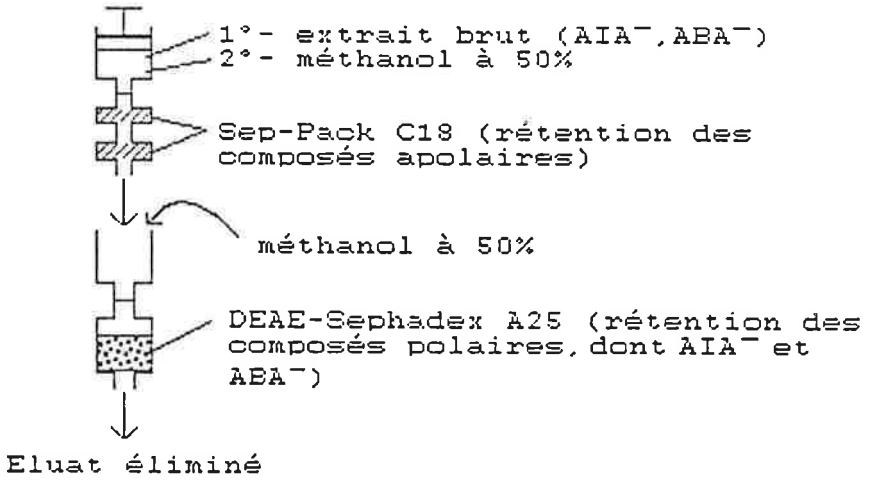
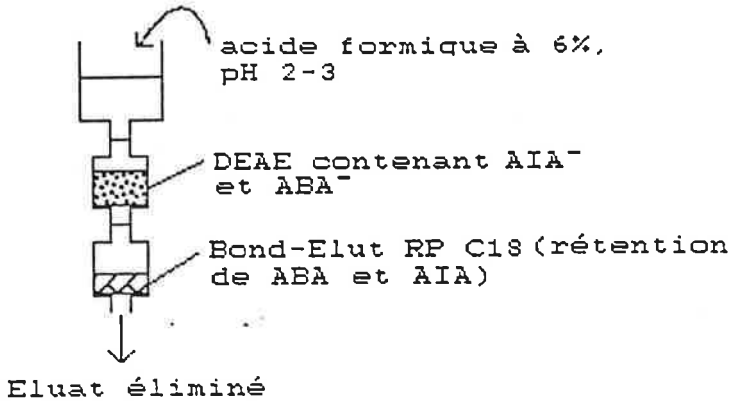


Figure 11. Etapes de l'extraction et de la purification de l'acide abscissique et de l'acide indolylacétique.

B)



C)

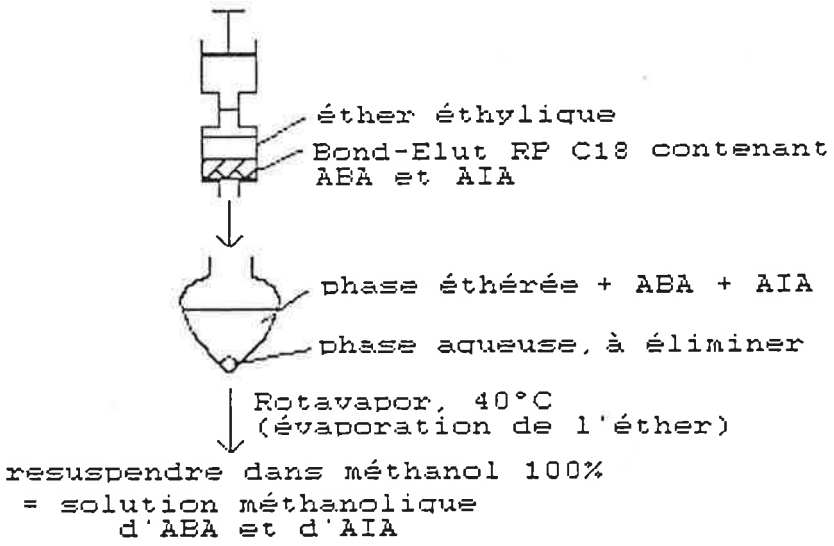


Figure 11 (suite). Etapes de l'extraction et de la purification de l'acide abscissique et de l'acide indolylacétique.

Dosage de l'AIA : HPLC analytique : Les fractions contenant l'AIA sont analysées par une HPLC identique à la précédente mais en utilisant une phase mobile d'appariement d'ions (IP) (méthanol / solution à 0,01 M d'hydroxide de tétrabutylammonium dans un tampon phosphate 0,01 M, pH 6,6 ; 50 : 50 ; V/V) en flux isocratique de 0,5 ml mn^{-1}. L'AIA est mesuré par un détecteur de fluorescence Shimadzu RF 530 (excitation : 285 nm, émission : 360 nm). Avant les dosages, la colonne est calibrée par injection d'une quantité connue de ^{14}C-AIA. On détermine ainsi le temps de rétention de l'AIA et la relation entre l'intensité de fluorescence et la quantité d'AIA dans les fractions.

Dosage de l'ABA : chromatographie en phase gazeuse : Pour être analysé en phase gazeuse, l'ABA doit être méthylé afin d'être rendu volatil. Les fractions lyophylisées contenant l'ABA sont méthylées durant 30 minutes par un mélange (V/V) de diazométhane et de méthanol 100 %, acidifié par quelques gouttes d'acide chlorhydrique. Le rendement de cette réaction n'étant pas de 100 %, les formes méthylées et non méthylées sont séparées par une nouvelle HPLC en phase réverse en utilisant comme phase mobile un mélange méthanol / eau, 50 : 50, V/V. La fraction contenant l'ABA méthylé est collectée, desséchée par de l'azote gazeux et reprise dans 100 μl de méthanol 100 %. Les analyses sont réalisées par un chromatographe en phase gazeuse (Packard 427) équipé d'un injecteur Chrompack et d'une colonne de silice OV-101 (25 m de longueur et 0,2 mm de diamètre interne), associé à un détecteur de capture d'électrons 63-Ni (Packard). Les températures sont de 235 °C dans la chambre d'injection, 220 °C dans la colonne et 245 °C au niveau du détecteur. Le gaz porteur est un mélange argon / méthane (90 : 10). Le volume d'injection est de 2 μl. Préalablement aux dosages, la colonne est calibrée par un standard de ^{14}C-ABA méthylé.

II.2.4.8.3. *Expression des résultats*

Les teneurs en ABA et en AIA sont exprimées en fonction du poids de matière fraîche et la quantité de ces deux substances est aussi évaluée par embryon.

II. 2. 4.9. Dosage des triglycérides

La technique que nous avons adoptée (Feirer *et al.*, 1989) consiste à réaliser une saponification des triglycérides suivie d'un dosage colorimétrique du glycérol libéré. Cette méthode a le triple avantage d'être simple, peu onéreuse et très sensible (Sigma, kit de diagnostic n° 405). Les étapes de la réaction sont résumées ci-dessous :

Triglycérides + KOH ---------- > Glycérol + acides gras
Glycérol + periodate ---------- > Formaldéhyde
Formaldéhyde + NH_4^+ + acétylacétone ---------- > diacétyldihydrolutidine
(absorbe à 410 nm)

Extraction : Les échantillons (10 à 100 mg de matière fraîche) sont broyés dans des tubes Eppendorf en présence de 1 ml d'isopropanol. Le broyat est agité durant 15 mn puis centrifugé 5 mn à 10 000 g. Les lipides, fortement solubles dans les solvants organiques, sont extraits par l'isopropanol et se retrouvent dans le surnageant.

Purification : 800 μl du surnageant sont transférés dans un tube contenant 0,8 g d'alumine activée et 1,8 ml d'isopropanol. Le mélange est agité durant 10 mn puis centrifugé 5 mn à 1 000 g. Cette opération permet, entre autre, de débarasser l'extrait lipidique du glycérol libre qui pourrait s'y trouver.

Dosage : Des fractions de 50 à 800 μl du surnageant purifié sont transférées dans des tubes en verre contenant 200 μl d'hydroxyde de potassium (KOH) 1 M et de l'isopropanol (qsp 1 ml). La saponification des triglycérides est réalisée en plaçant les tubes, hermétiquement fermés, durant 5 mn au bain marie à 60 °C. Après refroidissement à température ambiante, 200 μl d'une solution de periodate de sodium (125 mg de $NaIO_4$ dans 50 ml d'acide acétique 2 M) sont ajoutés à chaque tube. Après 10 mn d'incubation, 1,2 ml d'un mélange acétate d'ammonium 2 M / acétylacétone / isopropanol ; 40 : 0,15 : 8 ; V/V/V est ajouté et les tubes sont placés durant 30 mn à 60 °C.

Les lectures densitométriques sont effectuées à 410 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman 34. Les résultats sont calculés en utilisant la droite de régression d'une courbe étalon obtenue à partir de quantités connues de trioléine (0, 63, 126, 252, 375, 441 et 504 μg) saponifiée et traitée comme les échantillons.

II.2.4.10. Détermination des activités malate synthase (EC 4.1.3.2) et isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)

Extraction : Les échantillons (10 à 100 mg de matière fraîche) sont broyés à froid (0 - 4 °C) dans 2 à 3 volumes de la solution suivante (Kunce *et al.*, 1984) :

- Tampon K-phosphate pH 6,9 .....: 100 mM
- $MgCl_2$ .....: 3 mM
- DTT.....: 3 mM

Après le broyage, une concentration finale de 0,5 % de triton X 100 est ajoutée (Tchang *et al.*, 1980) et l'homogénat est rapidement vortexé. Une centrifugation de 10 mn à 270 g est réalisée, le broyat est laissé au repos durant 20 mn puis il est centrifugé durant 30 mn à 11 000 g. Toutes ces opérations sont réalisées à froid (0 - 4 °C). La phase lipidique de surface est éliminée et le surnageant est prélevé et conservé au froid ; il est utilisé tel quel pour le dosage des protéines totales (*cf.* § II.2.4.11.) et pour la détermination des activités enzymatiques.

Détermination de l'activité malate synthase (MS) : L'activité MS est évaluée par la méthode de Hock et Beevers (1966). La condensation de l'acétyl CoA avec le glyoxylate conduit à la libération de CoASH ; le groupement sulfhydryle du CoASH réagit avec de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) pour former un complexe jaune dont l'apparition peut être suivie par lecture densitométrique à 412 nm.

Pour un volume finale de 1 ml, le milieu d'incubation est préparé comme suit (Miernyk *et al.*, 1979) :

- Tris-HCl, pH 8 .....: 70,0 mM
- $MgCl_2$ .....: 4,0 mM
- DTNB.....: 0,1 mM
- Extrait enzymatique.....: 10 à 50 μl

La réaction est initiée par addition de :

- Glyoxylate de sodium.....: 3,3 mM

L'activité MS est évaluée en suivant l'évolution de la DO à 412 nm en fonction du temps (mesures toutes les minutes). Les calculs sont réalisés en considérant la partie ascendante linéaire de la courbe (Vm) et en utilisant un coefficient d'absorption moléculaire de 13,6 10^3 M^{-1} cm^{-1} pour le complexe formé.

Détermination de l'activité isocitrate lyase (ICL) : L'activité ICL est mesurée par la méthode de Dixon et Kornberg (1959).

ICL

isocitrate ---------- > glyoxylate + succinate

glyoxylate + phénylhydrazine ---------- > complexe glyoxylate-phénylhydrazone (absorbe à 324 nm)

Pour un volume final de 1,2 ml, le milieu d'incubation est préparé comme suit (Cooper et Beevers, 1969) :

- Tampon phosphate pH 7,9 ..... :	87,0 mM
- DTT ..... :	4,6 mM
- $MgCl_2$ ..... :	8,7 mM
- Phénylhydrazine ..... :	10,0 mM
- Extrait enzymatique ..... :	10 à 50 μl
La réaction est initiée par addition de :	
- Isocitrate ..... :	13,0 mM

L'activité ICL est évaluée, comme précédemment, en mesurant la DO à 324 nm et en utilisant un coefficient d'absorption moléculaire de 17 10^3 M^{-1} cm^{-1} pour le complexe glyoxylate-phénylhydrazone.

Les dosages concernant les sections II.2.4.9. et II.2.4.10. ont été répétés trois fois pour chaque échantillon.

II.2.4.11. Dosage des protéines totales

Les teneurs en protéines sont déterminées par la méthode de Bradford (1976) à partir des échantillons utilisés pour les dosages des polyamines, des triglycérides et des activités enzymatiques ADC, ODC, MS et ICL.

Le principe de la méthode consiste à solubiliser les protéines, à les colorer par du bleu de Coomassie G250 puis à mesurer l'extinction à 595 nm.

Dans le cas des échantillons utilisés pour les déterminations des activités enzymatiques, les protéines sont directement dosées dans les extraits bruts issus de la première centrifugation.

En revanche, dans les échantillons utilisés pour les dosages des polyamines ou des triglycérides, l'adjonction de TCA ou d'isopropanol provoque une précipitation des protéines. Les culots obtenus après la première centrifugation sont donc prélevés, séchés sous vide et solubilisés dans 1 ml de NaOH 1 M afin d'obtenir un extrait protéique.

Des fractions de 5 à 50 μl d'extraits protéiques sont complétées à 100 μl par la solution d'extraction, puis elles sont additionnées de 5 ml d'une solution filtrée constituée du réactif Protein Assay (Biorad) et d'eau distillée (1 : 4, V/V). Les lectures spectrophotométriques sont effectuées à 595 nm. Pour chaque type de dosage, une courbe de référence est tracée à partir d'une gamme étalon de sérum albumine bovine (Sigma) solubilisée dans le milieu d'extraction correspondant.

II.2.4.12. Evaluation des teneurs en eau

Les échantillons prélevés en vue des dosages de polyamines (*cf.* tab. IX) sont pesés (PMF), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 °C. Ils sont ensuite lyophylisés et pesés après complète déshydratation (PMS). La teneur en eau est exprimée par rapport au poids de matière fraîche :

$$T_{H2O}\,(PMF) = \frac{PMF - PMS}{PMF} \times 100$$

ou par rapport au poids de matière sèche :

$$T_{H2O}\,(PMS) = \frac{PMF - PMS}{PMS}$$

L'expérience a été répétée trois fois pour chaque type d'échantillon.

CHAPITRE III. RESULTATS

III.1. L'origine des embryons somatiques

III.1.1. La callogenese

Au moment de leur ensemencement (*cf.* fig. 1, p. 19), les anthères sont de couleur jaune translucide et elles mesurent environ 700 μm de longueur.

Une section transversale, colorée par le mélange vert de méthyle-pyronine (fig. 12, a et b), permet alors d'observer que, à l'intérieur des sacs polliniques (sp), les microspores sont au stade des tétrades (fig. 12, a et b ; t). A cette étape du développement, la face externe des sacs polliniques est délimitée par un très fin épiderme (ep) recouvrant la future assise mécanique (am), très peu colorable par le VMP et encore non lignifiée. La face interne de chaque sac est recouverte d'un tapis (ta) de cellules fortement pyroninophiles.

Entre les quatre sacs polliniques, le connectif de l'anthère (fig. 12, a ; co) est constitué de deux types de cellules. Les deux ou trois assises cellulaires au contact des sacs polliniques sont formées de grandes cellules (flèches), fortement et uniformément colorées en rouge intense par la pyronine. Cette pyroninophilie n'est pas affectée par un traitement par la ribonucléase et, sur des sections non colorées, ces cellules présentent des précipités de couleur fauve. L'affinité de ce type cellulaire pour la pyronine est donc liée à la présence de composés tannifères. Le second type de cellules formant le connectif est situé au niveau de la face ventrale (fv) de l'anthère. Ces cellules (fig. 12, a ; tête de flèche), bien que peu différenciées, présentent une pyroninophilie faible et homogène supprimée après traitement par la ribonucléase et elles sont dépourvues de tannins. Leur pyroninophilie traduit donc leur faible richesse en ARN.

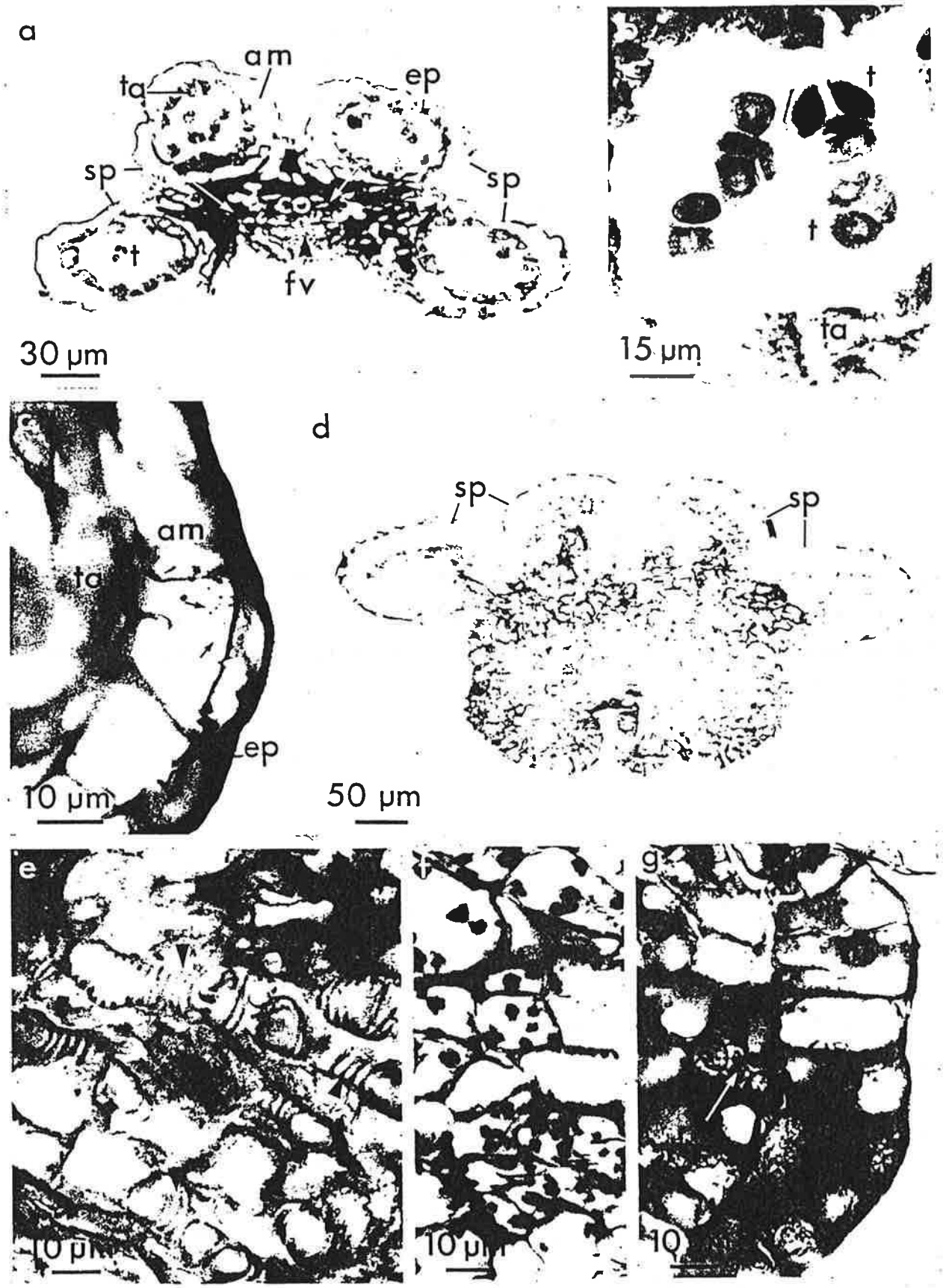
Par ailleurs, au moment de leur prélèvement, les anthères sont très pauvres en réserves amylacées. Seuls quelques très petits grains d'amidon (fig. 12, c ; flèches) peuvent être décelés au niveau de la futur assise mécanique.

Après une semaine de culture sur le milieu d'induction (fig. 12, d), les sacs polliniques sont restés intacts mais les microspores ont dégénéré et ne sont plus reconnaissables. Par contre, un début de callogenèse se manifeste au niveau du connectif de l'anthère. Les cellules à tannins, mentionnées précédemment, sont toujours présentes mais les tannins y sont moins concentrés ; de plus, la limite entre les deux types cellulaires du connectif s'estompe. Le cal présente alors un aspect et une pyroninophilie plus homogènes, et divers types cellulaires y sont reconnaissables. A l'intérieur du cal, de nombreuses trachéides se sont différenciées (fig. 12, e ; têtes de flèches) dans un ensemble de cellules parenchymateuses, plus ou moins vacuolisées et déjà riches en amidon (fig. 12, f). La surface du cal est recouverte d'une assise de cellules allongées (fig. 12, g) dont la pyroninophilie, d'intensité variable, est en partie affectée par un traitement par la ribonucléase ; ces cellules présentent cependant quelques composés tannifères, pour lesquels la coloration par la pyronine est résistante à la ribonucléase. Dans l'assise sous-jacente, des cloisonnements récents (flèche), parallèles à la surface (périclines), sont souvent observés.

Ce comportement callogène des cellules issues du connectif de l'anthère se confirme après examen de sections observées deux semaines après l'ensemencement (fig. 13, a). Le cal s'est développé assez lentement tout en conservant l'aspect et la diversité cellulaire décrits au septième jour de culture. Les sacs polliniques (sp), toujours visibles, ne sont pas affectés par la callogenèse. Les réserves amylacées sont importantes (fig. 13, b) et l'assise cellulaire à la surface du cal est souvent chargée en tannins (fig. 13, a ; flèches), qui se colorent par la pyronine sans que cette colorabilité soit affectée par un traitement par la ribonucléase.

Un mois après la mise en culture des anthères, le cal mesure 3 à 4 mm de diamètre ; c'est à ce moment que le repiquage sur un milieu d'expression, dépourvu de régulateurs de croissance, est réalisé. L'organisation histologique du cal (fig. 13, c) est alors beaucoup plus hétérogène que celle observée dans les stades plus jeunes. On y observe de petites cellules parenchymateuses, pauvres en réserves amylacées (fig. 13, d) et fortement

Figure 12. Organisation histologique et évolution des anthères de *V. vinifera* cv Grenache noir cultivées sur un milieu d'induction de l'embryogenèse.
(a, b, c) au moment de leur ensemencement ; a : section transversale d'une anthère ; le connectif est hétérogène, il possède des cellules riches en tannins (flèches) et des cellules pyroninophiles peu différenciées (tête de flèche) ; b : microspores au stade des tétrades ; c : petits grains d'amidon (flèches) au niveau de la future assise mécanique ; (d, e, f, g) après une semaine de culture ; d: cal issu du connectif et sacs polliniques toujours présents ; e: trachéides (têtes de flèches), nombreuses à l'intérieur du cal ; f : réserves amylacées dans les cellules parenchymateuses du cal ; g : assises cellulaires superficielles du cal ; cloisonnement péricline récent (flèche) observé sous l'assise de surface.
am : future assise mécanique ; co : connectif ; ep : épiderme ; fv : face ventrale ; sp : sac pollinique ; t : tétrade ; ta : tapis.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 5 μm ; coloration : (a, b, d, e et g), VMP, (c et f), APS.


a
am
ta
ep
sp
sp
t
fv
30 µm
t
t
ta
15 µm
c
am
ta
ep
10 µm
d
sp
sp
50 µm
e
10 µm
10 µm
g
10

pyroninophiles (fig. 13, c ; flèches), formant des sortes d'îlots méristématiques au sein d'un ensemble de cellules plus différenciées, riches en amidon (fig. 13, e) et beaucoup moins colorables par la pyronine. Le cal comporte également des trachéides et des amas de cellules à tannins (fig. 13, c ; têtes de flèches). A ce stade du développement, les sacs polliniques (sp) restent encore reconnaissables.

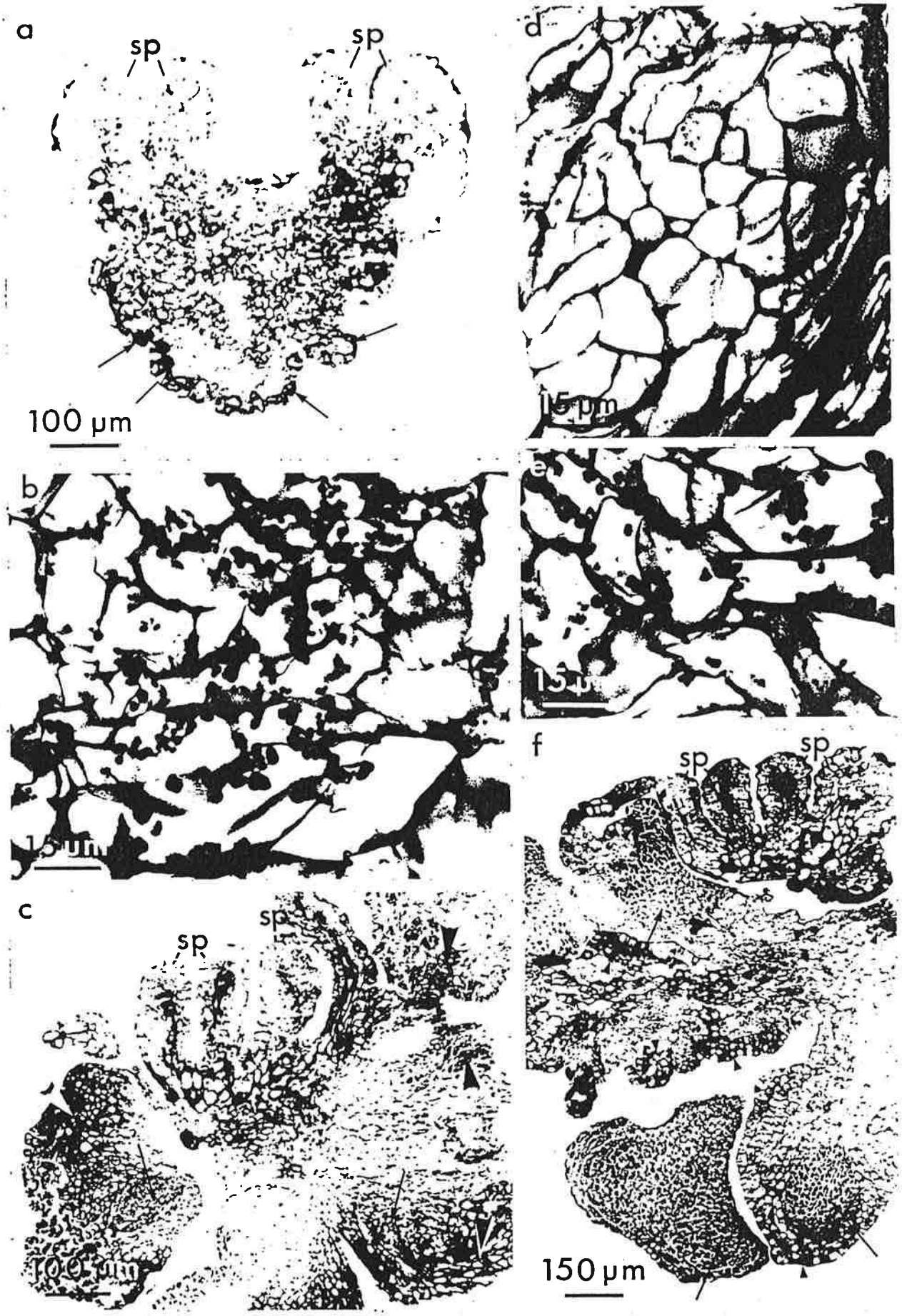
Une semaine après le repiquage sur le milieu d'expression, l'organisation histologique des cals (fig. 13, f) est tout à fait comparable à celle décrite précédemment. On y retrouve les quatre sacs polliniques intacts (sp), englobés dans un cal massif constitué d'îlots méristématiques (flèches) et de cellules plus différenciées, parfois très riches en tannins (têtes de flèches).

III.1.2. L'EMBRYOGENESE

L'étude histologique de la formation d'un embryon somatique au sein d'un cal est un travail difficile. En effet, l'identification précise des structures proembryonnaires nécessite l'obtention de sections longitudinales axiales et sériées. Or, il est, par essence, impossible d'orienter correctement le cal avant de le sectionner. L'observation de sections passant par l'axe de symétrie d'un proembryon est donc un événement rare et aléatoire.

Pour réaliser cette étude, plusieurs centaines de sections ont donc dû être analysées. D'un point de vue pratique, nous avons tout d'abord commencé par localiser les zones du cal présentant des proembryons caractéristiques. A partir de ces observations nous avons recherché, dans les zones précédemment définies, si des divisions asymétriques, à l'origine des proembryons, pouvaient être observées. Nous avons ainsi pu reconstituer l'évolution des embryons somatiques, du stade bicellulaire au stade globulaire.

Figure 13. Evolution des cals d'anthères de *V. vinifera* cv Grenache noir cultivés dans des conditions favorisant l'embryogenèse.
(a et b) après 14 jours de culture sur milieu d'induction ; **(a)** : les sacs polliniques sont intacts ; l'assise superficielle du cal, issu du connectif, est riche en composés tannifères (flèches) ; **b** : réserves amylacées du cal ; **(c, d et e)** après 1 mois de culture sur milieu d'induction ; **c** : les sacs polliniques sont intacts ; le cal présente des îlots de cellules méristématiques (flèches), de nombreuses cellules à tannins (têtes de flèches) et des cellules parenchymateuses, peu pyroninophiles ; **d** : îlot méristématique, dépourvu de réserves amylacées ; **e** : cellules différenciées du cal, riches en amidon ; **(f)** après une semaine de culture sur milieu d'expression ; les sacs polliniques sont intacts ; le cal est hétérogène, il possède des îlots méristématiques (flèches) au sein de cellules différenciées et des régions riches en tannins (têtes de flèches).
sp : sac pollinique.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 5 μm ; coloration : (a, c et f), VMP, (b, d et e), APS.


a
sp
sp
100 µm
d
15 µm
b
15 µm
e
15 µ
f
sp
sp
c
sp
sp
150 µm

Toutes les étapes de la proembryogenèse, du stade bicellulaire au stade de proembryon possédant quinze à vingt cellules en section, peuvent être observées dans les cals d'anthères dès le quatorzième jour de culture sur le milieu d'induction. Par contre, les premiers embryons globulaires n'apparaissent qu'une semaine après le repiquage des cals sur le milieu d'expression.

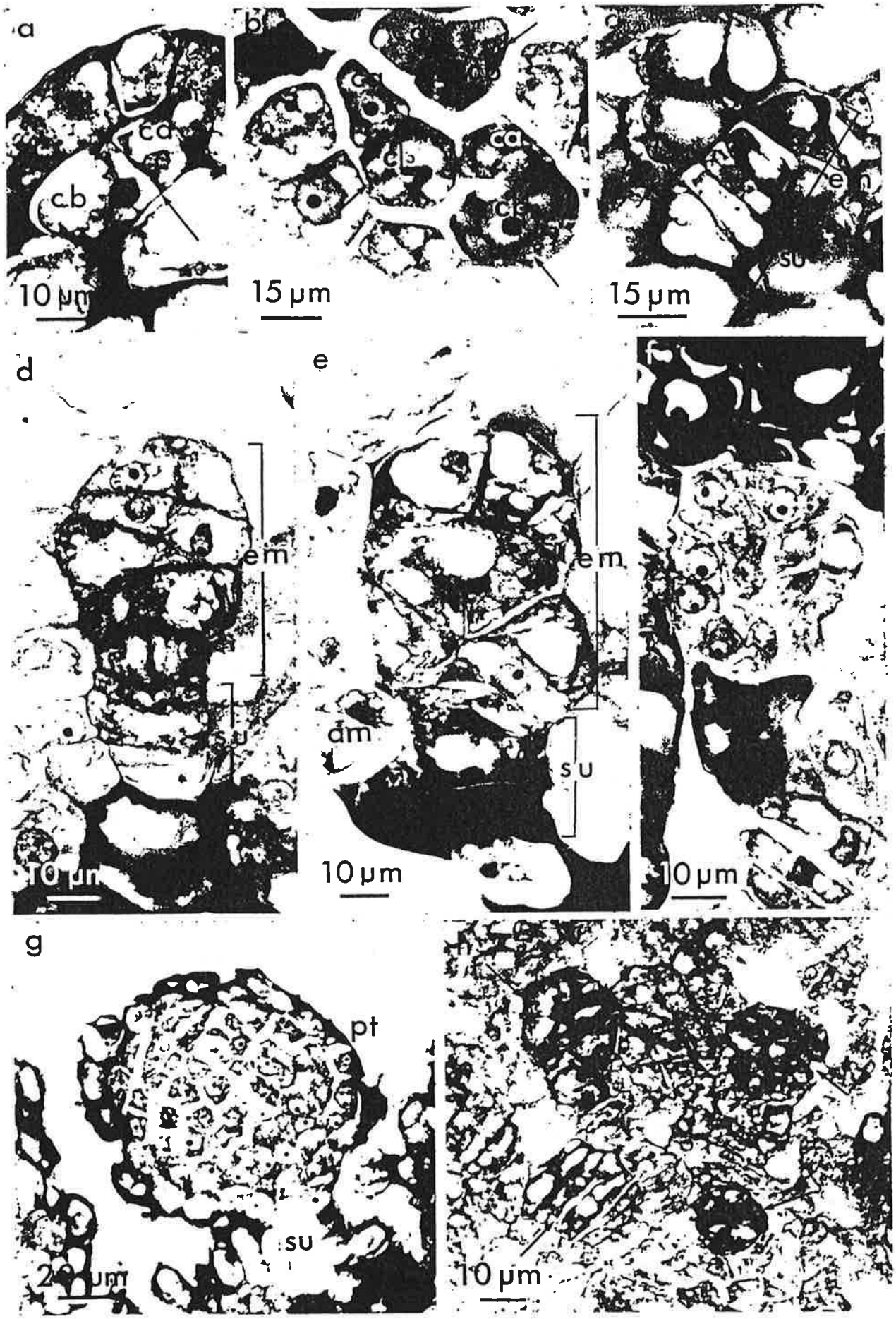
Les embryons bicellulaires (fig. 14, a et b ; flèches) sont caractérisés par leur asymétrie. Ils sont constitués d'une cellule basale (cb) volumineuse et d'une cellule apicale (ca) plus petite. On les observe dans des zones superficielles du cal, c'est-à-dire au niveau de cinq à six assises cellulaires, tout au plus, à partir de la surface. Ces jeunes embryons se forment, isolement (fig. 14, a) ou par groupes (fig. 14, b), au sein de cellules différenciées, vacuolisées et assez peu pyroninophiles.

Les premiers cloisonnements qui suivent le stade bicellulaire sont transversaux ; ils conduisent à la formation de structures unisériées, subcylindriques (fig. 14, c), comportant quatre à cinq cellules aplaties et empilées. On reconnaît alors facilement les cellules suspensoriales (su) et les cellules embryonnaires proprement dites (em), un peu moins différenciées, moins vacuolisées et plus pyroninophiles.

La segmentation ultérieure des cellules embryonnaires conduit à la formation de jeunes proembryons (fig. 14, d et e) comportant une dizaine de cellules en section. Ces proembryons sont formés d'un assez large suspenseur (su), surmonté d'un massif globulaire de cellules embryonnaires (em) vacuolisées et dont la dédifférenciation à l'issue de ces premiers recloisonnements est encore peu avancée.

Dans la majorité des cas, ces proembryons (fig. 14, d) sont observés au niveau des assises superficielles du cal, issu du connectif de l'anthère. Cependant, nous avons parfois observé des proembryons typiques (fig. 14, e), au contact direct de l'assise mécanique (am) de l'anthère. Dans tous les cas, un suspenseur est reconnaissable.

Figure 14. Evolution des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir, du stade bicellulaire au stade globulaire.
(a et b) proembryon à deux cellules (flèches) ; (c) proembryon à cinq cellules ; (d et e) proembryons possédant une dizaine de cellules en section, observés (d) au niveau des assises superficielles du cal et (e) au niveau de la future assise mécanique de l'anthère ; (f) proembryon comportant une vingtaine de cellules en section ; (g) embryon globulaire ; (h) groupe de proembryons (flèches) observés dans un cal après une semaine de culture sur milieu d'expression.
am : future assise mécanique ; ca : cellule apicale ; cb : cellule basale ; em : cellules embryonnaires ; pt : protoderme ; su : suspenseur.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 5 μm ; coloration : VMP.


a
ca
cb
10 µm
b
ca
cb
cs
15 µm
c
e
su
15 µm
d
em
su
10 µm
e
em
dm
su
10 µm
f
10 µm
g
pt
su
10 µm

L'évolution de ces très jeunes embryons s'accompagne d'une dédifférenciation cellulaire rapide et d'une diminution du volume des cellules embryonnaires. Au cours de cette évolution, qui fait intervenir le recloisonnement de cellules originelles de grandes dimensions, le doublement du nombre de cellules embryonnaires, du stade à une dizaine de cellules (fig. 14, d et e) au stade à une vingtaine de cellules (fig. 14, f) en section, ne s'accompagne pas d'une augmentation de la taille de l'embryon. A la fin de la période d'induction, c'est-à-dire après un mois de culture des cals, on observe ainsi de très petits proembryons d'aspect globulaire (fig. 14, f), comportant quinze à vingt cellules en section. Ces proembryons sont constitués de petites cellules à cytoplasme pyroninophile (dont la pyroninophilie est sensible à la RNase), à gros noyau central et nucléole volumineux. Leur organisation histolologique est homogène et ils n'ont pas encore édifié de protoderme.

Ce n'est qu'une semaine après le repiquage des cals sur un milieu sans régulateur de croissance exogène que les premiers embryons globulaires typiques peuvent être observés (fig. 14, g). Ces embryons sont formés de petites cellules peu différenciées et pyroninophiles ; ils sont recouverts par un protoderme (pt) assez irrégulier et ils sont reliés au cal par un suspenseur massif (su). On notera que, dans ces cals, de nombreux proembryons, à tous les stades de leur développement, sont encore présents (fig. 14, h ; flèches).

III.1.3. CONCLUSION

Cette étude de la callogenèse et des premières étapes de l'embryogenèse dans des cultures d'anthères de *V. vinifera* cv Grenache noir, permet d'affirmer sans ambiguité que les embryons obtenus sont d'origine somatique.

Nous avons en effet montré que le cal est exclusivement issu du connectif de l'anthère et que les embryons proviennent, soit de ce cal, soit de l'assise mécanique de l'anthère. Dans ce deuxième cas, beaucoup moins fréquent, l'embryogenèse est directe et ne nécessite pas un passage par le stade de cal.

Par ailleurs, l'origine unicellulaire des embryons somatiques paraît bien établie. En effet, nous avons pu observer de nombreux stades bicellulaires, bien individualisés et possédant déjà une très nette polarité. Cette polarité précoce se maintient et se confirme au cours de la segmentation ultérieure et elle conduit à la formation de proembryons typiques possédant un pôle suspensorial et un pôle embryonnaire.

Il faut également souligner que les embryons somatiques se forment toujours à partir de cellules relativement différenciées : jeune assise mécanique de l'anthère ou zones peu pyroninophiles du cal. Nous n'avons jamais observé la formation d'embryons au niveau des îlots méristématiques présents dans les cals.

Enfin, il apparaît que le milieu d'induction, comportant auxine et cytokinine, bloque le développement des embryons à un stade précoce de la proembryogenèse. Par contre, après repiquage des cals sur le milieu d'expression, dépourvu de régulateurs de croissance, toutes les étapes de la proembryogenèse, du stade bicellulaire au stade globulaire, et de l'embryogenèse proprement dite, du stade globulaire au stade torpille (et stades ultérieurs ; *cf.* § III.2.1.) peuvent se dérouler.

III.2. Les aspects généraux du développement embryonnaire

III.2.1. L'EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS

Dans le chapitre II.2.2, nous avons indiqué que les embryons somatiques ont été séparés en cinq stades selon leur développement : stades globulaire. cordiforme, torpille, T+ et géant (*cf.* fig. 4, p. 35).

Les trois premières étapes (embryon globulaire, cordiforme et torpille) ressemblent à celles décrites lors de l'évolution (Mestre et Guignard, 1973 ; Thomas, 1975) des embryons zygotiques. Ces derniers en effet subissent, juste après la fécondation, une période de divisions cellulaires rapides qui les conduit à former des structures globulaires, constituées de cellules très dédifférenciées. Ce stade globulaire précède (Rondet, 1961) l'individualisation des méristèmes apicaux et l'initiation des jeunes cotylédons, qui confèrent à l'embryon zygotique une symétrie bilatérale, caractéristique du stade cordiforme. Par l'allongement des cotylédons et de l'hypocotyle, l'embryon zygotique acquiert ensuite une morphologie typique, lui donnant l'aspect d'une torpille. C'est généralement à ce stade que le développement embryonnaire s'arrête, la croissance de l'embryon zygotique ne reprenant que lors de la germination.

Pour les embryons somatiques, les trois phases caractéristiques du développement zygotique ont également lieu. Cependant, ces embryons ne subissent pas l'arrêt de croissance observé pour les embryons zygotiques ; ils continuent leur évolution et forment des structures géantes et tératologiques, incapables d'évoluer en plantule. Nous avons arbitrairement divisé cette évolution anarchique en deux étapes : le stade T+ pour les

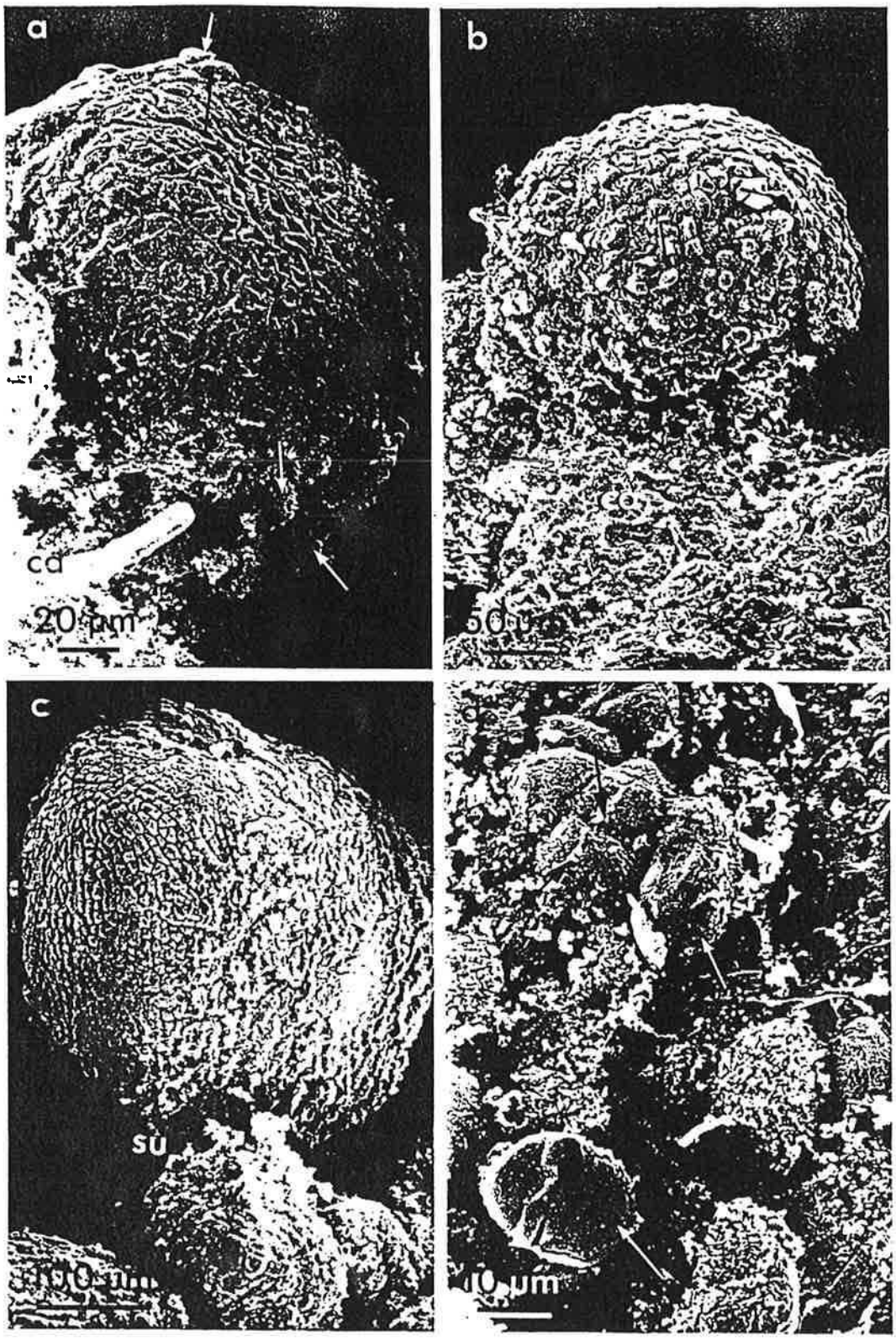


Figure 15. Formation d'un embryon somatique globulaire (a, b, c) sur un cal issu d'une culture d'anthères de *V. vinifera* cv Grenache noir et détail des cellules de surface (d).
La surface des embryons comporte de nombreuses cellules sphériques et turgescentes (flèches).
ca : cal ; su : suspenseur.

embryons ayant une longueur comprise entre 2 et 4 mm, et le stade géant pour les embryons dont la longueur est supérieure à 5 mm.

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage nous a alors permis de suivre l'évolution morphologique des embryons somatiques du stade globulaire au stade géant.

La formation d'un embryon globulaire (fig. 15) débute par une sorte de bourgeonnement (fig. 15, a), observé à la surface des cals embryogènes. A ce stade, le jeune embryon est en contact étroit avec le cal qui lui a donné naissance ; il en émerge ensuite peu à peu (fig. 15, b et c) et s'individualise tout en restant relié au cal par un pédoncule massif (fig. 15, c ; su) qui, par sa localisation, peut être comparé au suspenseur d'un embryon zygotique. A cette étape du développement, le diamètre de l'embryon est environ égal à 300 μm. On observe de plus que la surface des embryons somatiques globulaires n'est pas parfaitement lisse. En de nombreux endroits, le protoderme est en effet recouvert de cellules sphériques et turgescentes (fig. 15, a, b, c ; flèches et fig. 15, d ; flèches).

Au stade cordiforme (fig. 16, a, b, c, d), l'embryon commence à s'allonger et l'on observe la formation des ébauches cotylédonaires (cot). Les jeunes cotylédons (fig. 16, d) proviennent du soulèvement d'une couronne de cellules entourant le méristème caulinaire et édifiant autour de lui une sorte d'entonnoir. A ce stade précoce ne se réalise donc pas l'initiation de deux cotylédons qui marquerait l'acquisition de la symétrie bilatérale. A la base de l'hypocotyle, un suspenseur massif est encore visible (fig. 16, a, b, c ; su). L'embryon, toujours recouvert de cellules sphériques et turgescentes (flèches), mesure alors entre 400 et 500 μm de longueur.

La multiplication et la croissance plus ou moins régulières des cellules de la couronne cotylédonaire confèrent aux embryons, arrivés au stade torpille, une morphologie des plus variables. Dans tous les cas, une tératologie prononcée est mise en évidence et l'on ne peut alors observer que peu d'analogies morphologiques entre l'embryon somatique, au stade torpille, et son homologue zygotique, au même stade de développement.

Les embryons zygotiques extraits de graines mûres (fig. 17) sont frêles et de petite taille (1 à 1,5 mm de longueur). Leurs cotylédons, en fer de lance, représentent environ la moitié de la longueur totale de l'embryon. Leur protoderme est lisse, un suspenseur est visible à la base de l'hypocotyle et la symétrie bilatérale est nettement apparente.

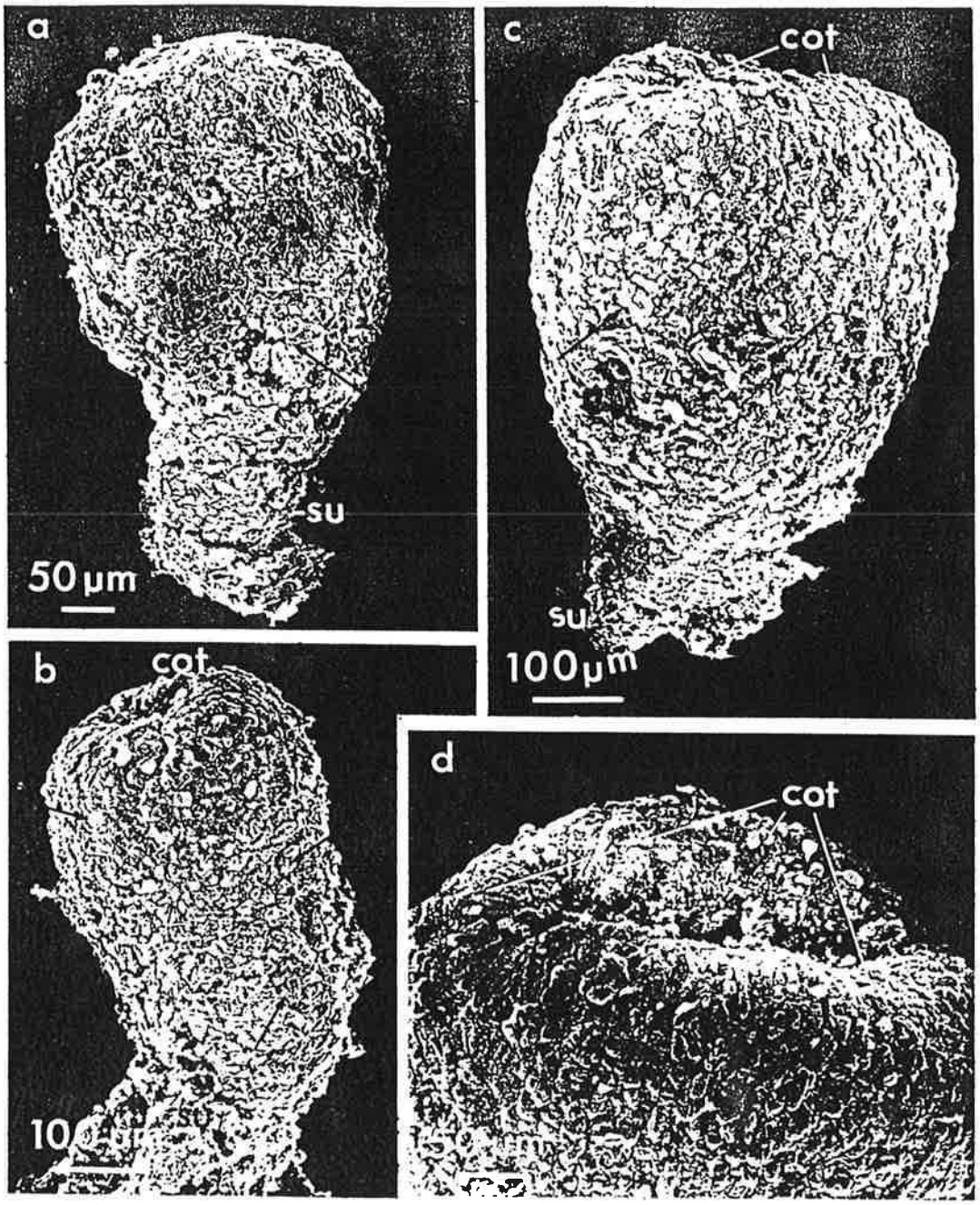


Figure 16. Aspects morphologiques (a, b, c, d) des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir au stade cordiforme.
L'initiation des cotylédons (d) provient du soulèvement d'une couronne de cellules entourant l'apex caulinaire. Noter la présence de cellules turgescentes (flèches) à la surface des embryons.
cot : cotylédons ; su : suspenseur.

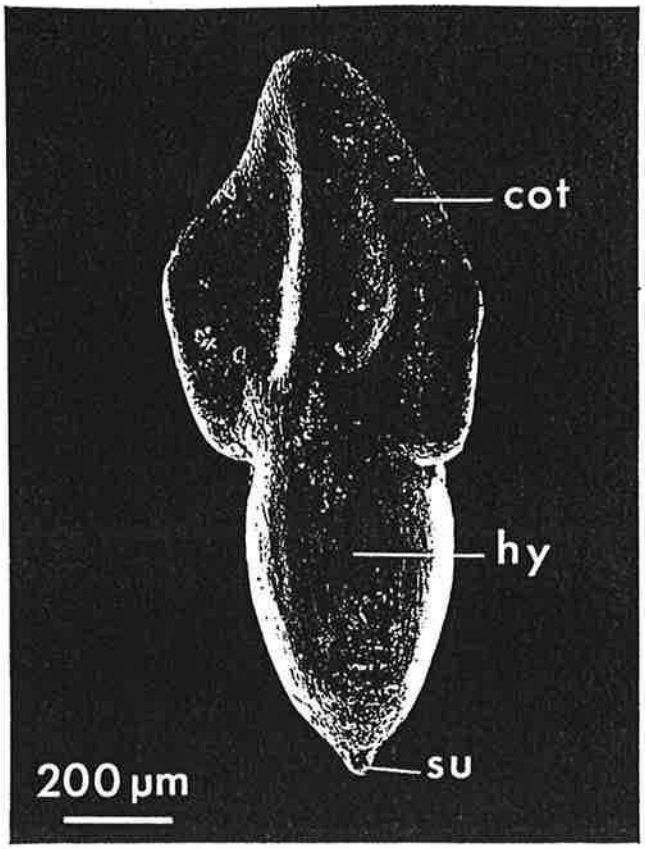


Figure 17. Embryon zygotique de *V. vinifera* cv Grenache noir extrait de graine mûre stratifiée.
cot : cotylédons ; hy : hypocotyle ; su : suspenseur.

Par contre, les embryons somatiques au stade torpille (fig. 18), d'une longueur comprise entre 1 et 2 mm, ont un aspect en général assez trapu. Leurs cotylédons forment le plus souvent un manchon continu autour du pôle caulinaire (fig. 18, a, b) ou se présentent sous forme de lames ramifiées et plus ou moins repliées sur elles-mêmes (fig. 18, c). Dans quelques cas, à la fin du stade torpille (fig. 18, d), la couronne cotylédonaire, en proliférant de façon asymétrique, simule l'obtention de deux cotylédons en éventail (cot) mais qui ne présentent jamais la morphologie caractéristique en fer de lance, observée chez les embryons zygotiques. Un suspenseur (su) est visible à la base de l'hypocotyle et des cellules sphériques de surface (flèches), moins abondantes que pour les stades de développement précédents, sont souvent encore présentes. Par ailleurs, on observe parfois des formes siamoises (fig. 19 a et b), issues de la réunion intime de deux embryons différents.

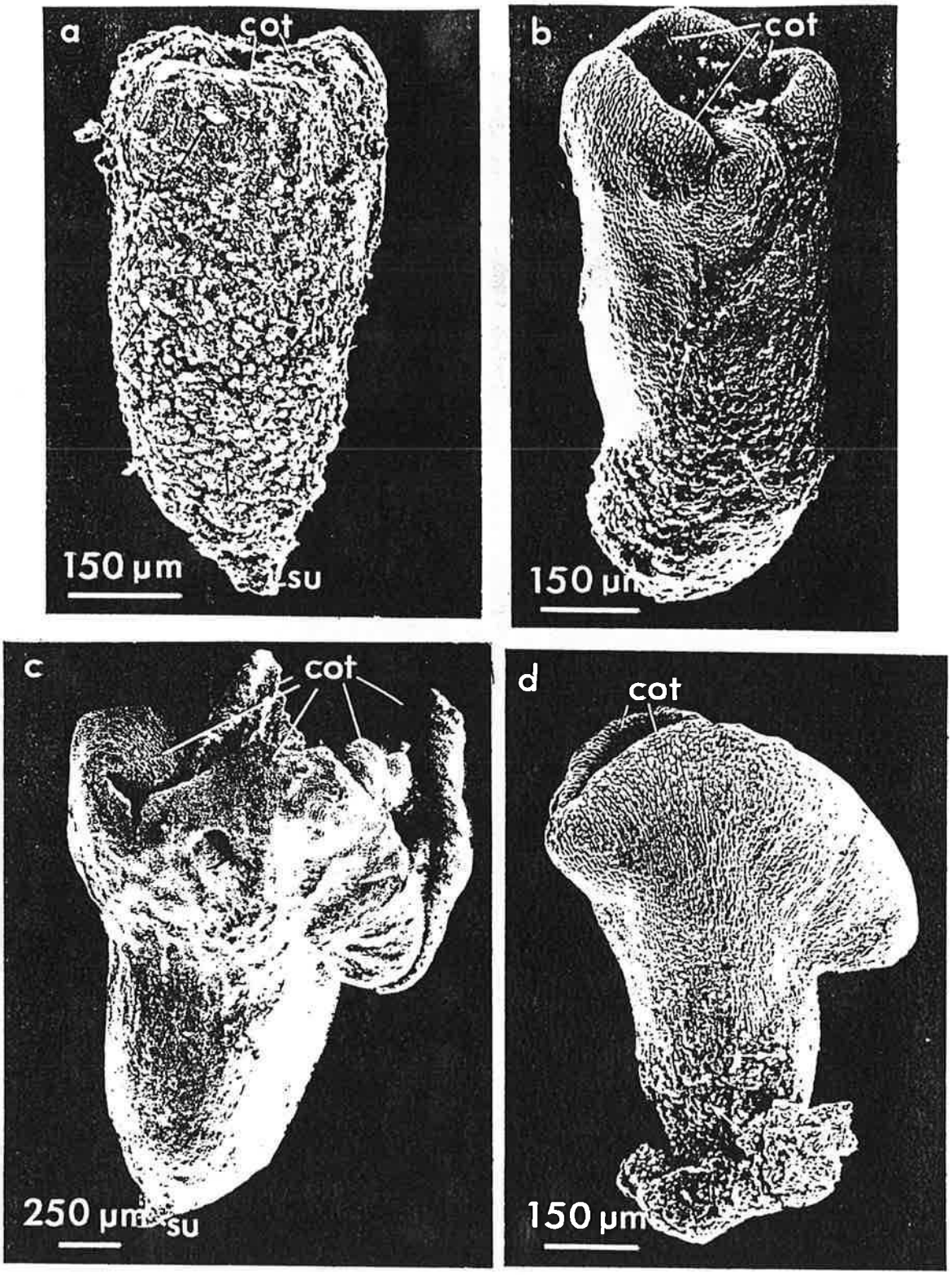


Figure 18. Embryons somatiques (a, b, c, d) de *V. vinifera* cv Grenache noir observés au stade torpille.
Noter la tératologie des cotylédons et la présence fréquente de cellules turgescentes (flèches) à la surface des embryons.
cot : cotylédons ; su : suspenseur.

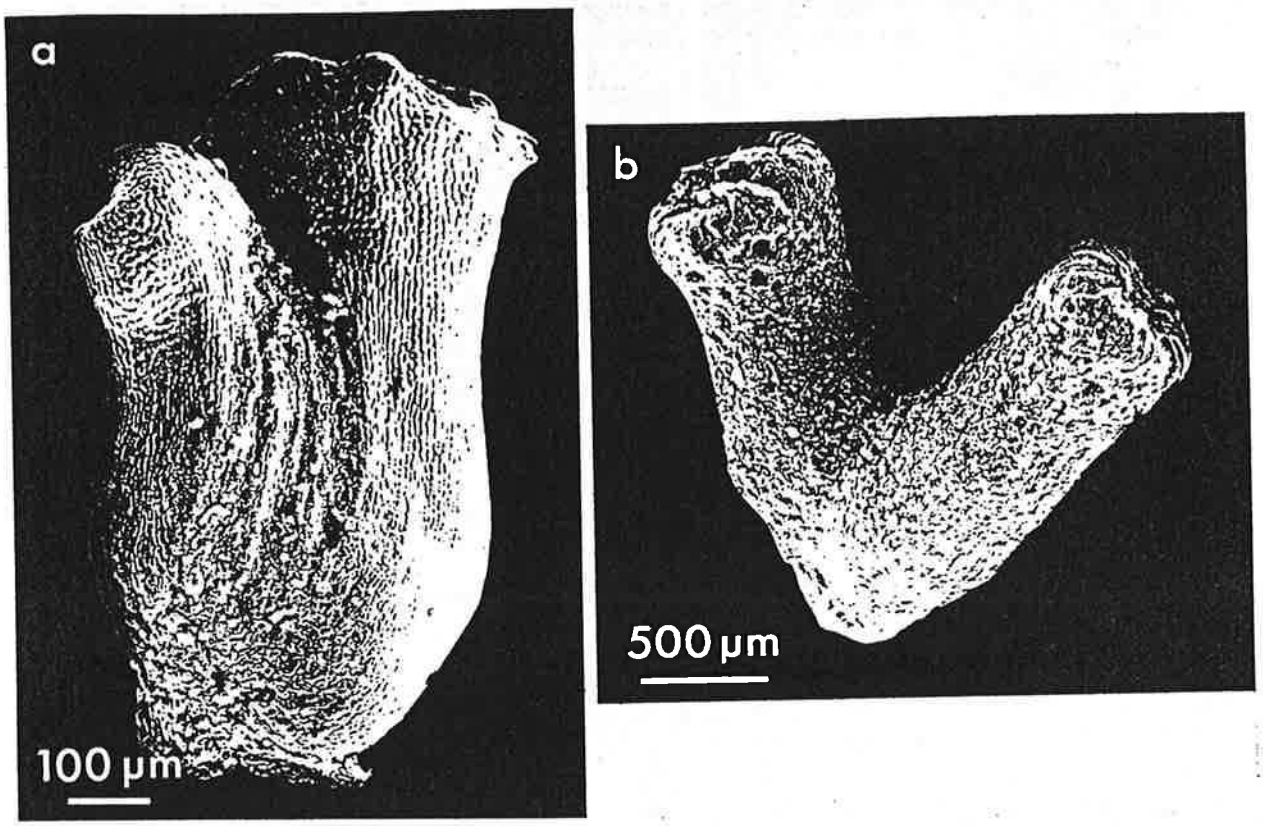
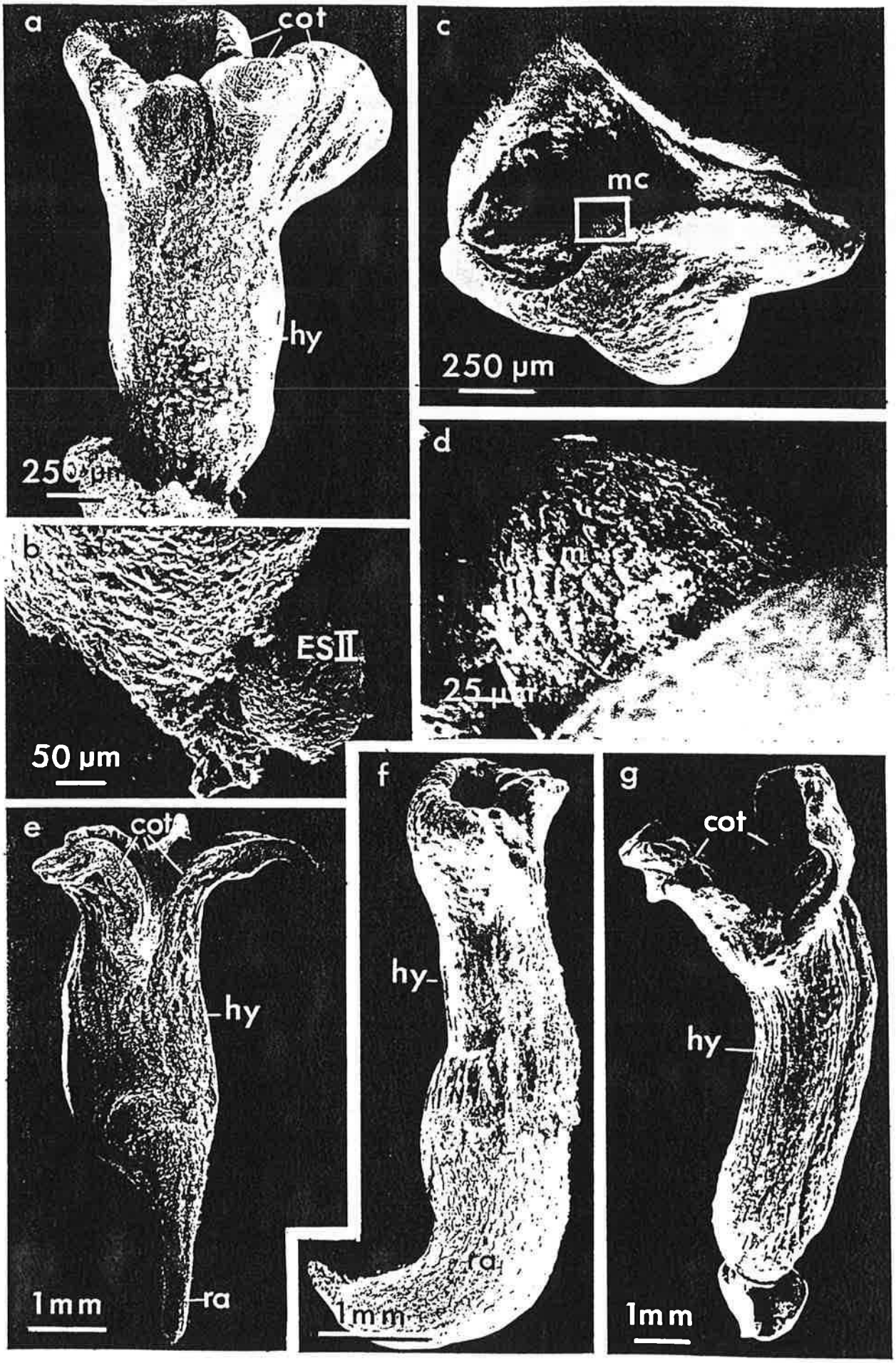


Figure 19 a et b. Formes siamoises d'embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir observés au stade torpille.

Au stade T+ (fig. 20, a, b, c, d), la morphologie des embryons est comparable à celle décrite pour le stade torpille ; seule une augmentation de taille est enregistrée. On assiste de plus, dans quelques cas, à une embryogenèse de second ordre (fig. 20, b ; ES II) au niveau de la base de l'hypocotyle des embryons. Par ailleurs, on peut parfois observer, au fond du puits délimité par les cotylédons (fig. 20, c et d), un dôme régulier (mc) formé par les cellules méristématiques caulinaires. Nous verrons, dans le chapitre suivant, que cette structure en dôme du méristème caulinaire est caractéristique des embryons zygotiques en cours de germination.

Les embryons géants (fig. 20, e, f, g) sont arrivés au stade ultime de leur évolution. Leur longueur atteint parfois 1 cm. Leurs cotylédons sont fortement tératologiques ; leur hypocotyle est hypertrophié. Par contre ces embryons sont pourvus d'une radicule (ra) d'apparence saine et vigoureuse. Lorsque les embryons sont repiqués sur un milieu gélosé, cette croissance de la radicule est toujours observée mais l'axe caulinaire ne se développe tout au plus que dans 5 % des cas.


a
cot
hy
250 µm
c
mc
250 µm
d
m
25 µm
b
ESII
50 µm
e
cot
hy
ra
1mm
f
hy
ra
1mm
g
cot
hy
1mm

III.2.2. L'EVOLUTION HISTOLOGIQUE DES EMBRYONS

Les examens morphologiques révèlent que les embryons somatiques au stade torpille diffèrent profondément de leurs homologues zygotiques extraits de graines parvenues à maturité. Il nous a alors paru nécessaire de réaliser une étude histologique comparative entre les deux types d'embryons afin de mieux connaître leurs similitudes et leurs différences mais aussi afin de vérifier si les formations obtenues *in vitro* sont véritablement des embryons, c'est-à-dire des structures bipolaires développant précocement et simultanément un méristème racinaire et un méristème caulinaire.

Nous avons vu que les embryons somatiques différencient toujours une radicule vigoureuse, la présence d'un méristème racinaire ne fait donc aucun doute. Par contre, la présence constante d'un méristème caulinaire n'est pas établie. Nous avons donc examiné les caractéristiques histologiques des embryons somatiques en insistant plus particulièrement sur la structure et l'évolution du pôle caulinaire. Nous avons par ailleurs réalisé des examens similaires sur des embryons zygotiques avant et après leur germination.

Embryons somatiques

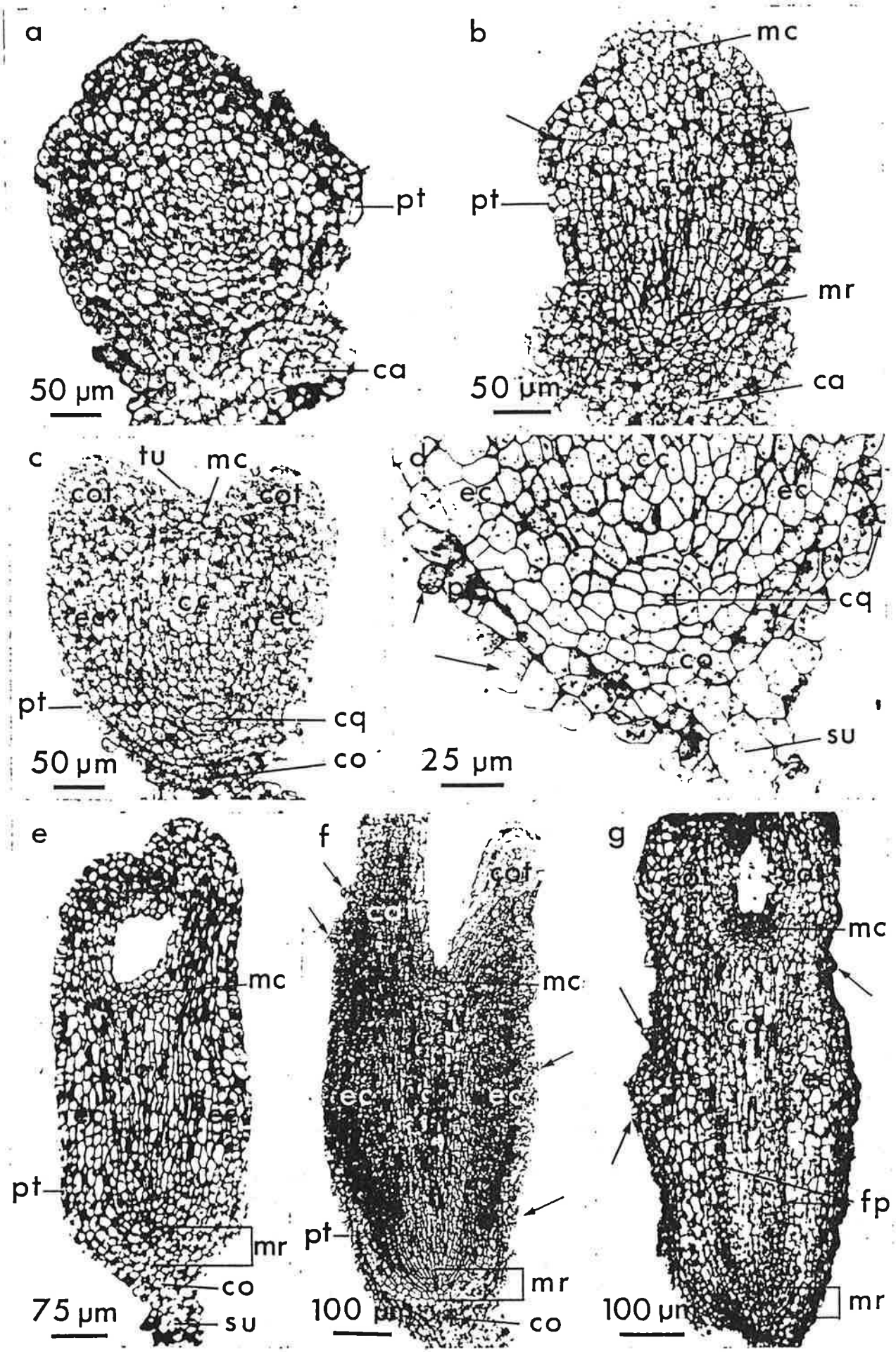
Les embryons somatiques en début de stade globulaire (fig. 21, a) présentent, en section longitudinale axiale, un aspect arrondi ou légèrement oblong. Ils sont entourés d'une assise protodermique (pt) souvent irrégulière et ils sont constitués de petites cellules peu différenciées d'aspect homogène. A un stade globulaire plus avancé (fig. 21, b), un début de différenciation tissulaire de l'embryon est reconnaissable : les cellules axiales commencent à s'allonger et à se différencier en cellules de cylindre central, alors qu'aux deux pôles de l'embryon les méristèmes, caulinaire (fig. 21, b ; mc) et racinaire (fig. 21, b ; mr), s'individualisent. On notera (fig. 21, b ; flèches) que l'initiation de la couronne cotylédonaire s'effectue par des cloisonnements périclines sous-protodermiques comme se réalise l'initiation des cotylédons des embryons zygotiques (Rondet, 1962).

Figure 20. Embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir aux stades T+ (a, b, c, d) et géant (e, f, g).
Au stade T+ les embryons mesurent plus de 2 mm de longueur (a) et une embryogenèse secondaire est souvent observée à la base de l'hypocotyle (b ; ES II). Entre les deux cotylédons (c) on observe parfois un dôme (d) formé par les cellules du méristème caulinaire.
Au stade géant (e, f, g) la radicule est très souvent formée mais la morphologie des embryons est fortement tératologique.
cot : cotylédons ; hy : hypocotyle ; mc : méristème caulinaire ; ra : radicule.

Au stade cordiforme (fig. 21, c), les différents territoires embryonnaires sont parfaitement reconnaissables. Le méristème caulinaire, situé entre les cotylédons (cot), montre, en section longitudinale axiale, une tunica (tu) d'origine protodermique recouvrant dix à quinze petites cellules en section très peu différenciées. Au pôle basal de l'embryon (fig. 21, d), le méristème racinaire est également facilement identifiable ; le centre quiescent (cq) est présent et la coiffe (co), de type ouvert (Clowes, 1978), est bien individualisée. On observe par ailleurs très souvent, à la base de l'embryon, un massif cellulaire (fig. 21, d ; su) pouvant présenter quatre à cinq cellules dans sa plus grande largeur et rappelant, sous une forme plus massive, le suspenseur des embryons zygotiques. A l'aplomb des deux méristèmes apicaux, le cylindre central de l'hypocotyle (fig. 21, c ; cc) est constitué de cellules allongées organisées en files plus ou moins régulières. De part et d'autre du cylindre central, la zone corticale (fig. 21, c ; ec) est formée d'une dizaine d'assises cellulaires déjà relativement vacuolisées. L'ensemble de l'embryon est entouré par une assise de cellules protodermiques dont certaines, souvent situées à la base de l'hypocotyle (fig. 21, d ; flèches), prolifèrent et confèrent à l'embryon une surface irrégulière.

La transition du stade cordiforme au stade torpille (fig. 21, e, f, g) s'accompagne d'un allongement important de l'embryon. Cependant, les mitoses sont rares et elles ne peuvent être décelées qu'au niveau du protoderme et des cotylédons. L'augmentation de la taille des embryons traduit donc une forte croissance et différenciation cellulaires. Les cellules médullaires et corticales se vacuolisent et grandissent tandis que des faisceaux procambiaux (fig. 21, g ; fp), à la périphérie du cylindre central et rejoignant les cotylédons, s'individualisent. On observe toujours une prolifération anarchique de certaines cellules protodermiques (fig. 21, g ; flèches) et les deux méristèmes apicaux sont encore tous deux présents. Par ailleurs, la coloration par le mélange vert de méthyle-pyronine montre que le méristème caulinaire, observé en aire maximale (fig. 22, a) ou en aire minimale (fig. 22, b), comporte en section une seule assise tunicale recouvrant quatre

Figure 21. Organisation histologique des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir au cours de leur développement du stade globulaire au stade torpille.
(a) stade globulaire précoce, l'embryon est formé d'un ensemble homogène de cellules indifférenciées ; (b) stade globulaire avancé, les cellules embryonnaires commencent à se différencier et les deux méristèmes apicaux s'individualisent, la couronne cotylédonaire est initiée par des cloisonnements (flèches) périclines sous-épidermiques ; (c) stade cordiforme, les ébauches cotylédonaires sont formées et les différents territoires embryonnaires sont reconnaissables ; (d) pôle racinaire d'un embryon cordiforme, noter la prolifération anarchique (flèches) des cellules superficielles ; (e, f, g) stade torpille, les embryons sont des axes bipolaires possédant toujours un méristème caulinaire et un méristème racinaire. Noter la prolifération anarchique (flèches) des cellules superficielles.
ca : cal ; cc : cylindre central ; co : coiffe ; cot : cotylédons ; ec : écorce ; fp : faisceaux procambiaux ; mc : méristème caulinaire ; mr : méristème racinaire ; pt : protoderme ; su : suspenseur.
Fixation : (a à f), glutaraldéhyde postosmié, (g), AFA ; épaisseur de section : (a à f), 1 μm, (g), 5 μm ; coloration : (a à f), paragon, (g), VMP.


a
pt
ca
50 µm
b
mc
pt
mr
ca
50 µm
c
tu
mc
cot
cot
cc
ec
ec
pt
cq
co
50 µm
d
cc
ec
ec
cq
co
su
25 µm
e
mc
pt
mr
co
su
75 µm
f
cot
mc
ec
ec
pt
mr
co
100 µm
g
mc
fp
mr
100 µm

à cinq assises cellulaires moyennement pyroninophiles et qu'il ne présente pas encore de zonation.

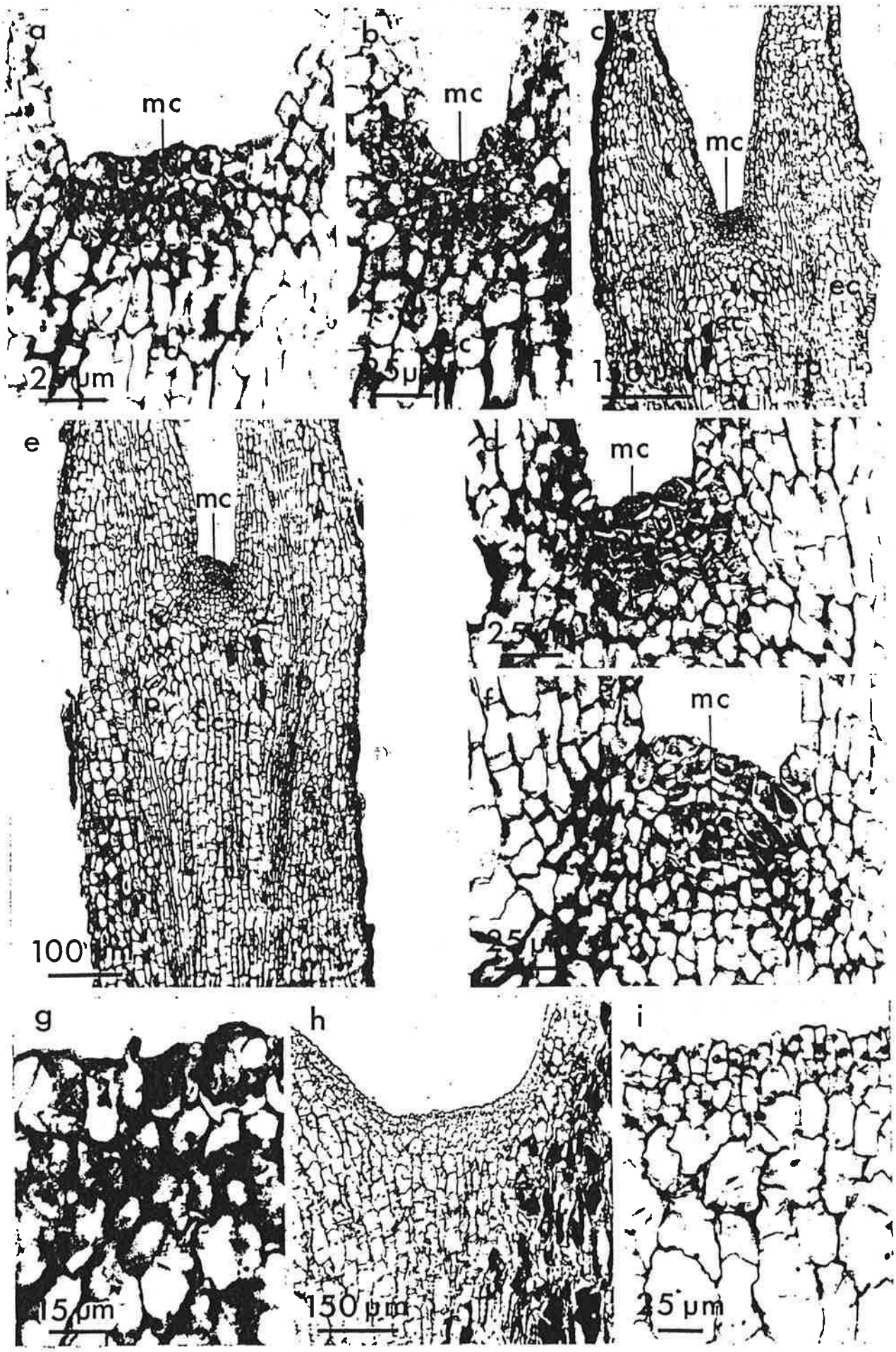
Au stade T+ (fig. 22, c, d, e, f, g), la différenciation embryonnaire s'accentue mais l'organisation histologique générale des embryons reste comparable à celle décrite pour le stade torpille. Cependant, l'apex caulinaire présente une structure et des caractéristiques variables suivant les échantillons. Dans la majorité des embryons (fig. 22, c et d), le méristème est plat et il possède une organisation et une pyroninophilie tout à fait comparables à celles observées précédemment. Néanmoins, dans certains cas (fig. 22, e et f), les cellules méristématiques prolifèrent, leur pyroninophilie s'accentue et le méristème acquiert une structure en dôme. Dans d'autres cas enfin (fig. 22, g), le pôle caulinaire possède des cellules peu pyroninophiles en cours de différenciation et le méristème n'est plus reconnaissable.

Au stade final de leur évolution, les embryons géants (fig. 22, h et i) ne sont formés que de grandes cellules très différenciées et leur pôle caulinaire ne présente plus aucune caractéristique méristématique.

Embryons zygotiques

Les embryons zygotiques au stade torpille (fig. 23, a, b, c), extraits de graines parvenues à maturité, sont des axes bipolaires comportant un méristème racinaire (mr) et un méristème caulinaire (mc). Entre ces deux territoires, le cylindre central de l'hypocotyle (cc) est constitué de grandes cellules allongées organisées en files relativement régulières ; il est bordé par des faisceaux procambiaux (fig. 23, c ; fp) rejoignant les cotylédons (cot). La zone corticale (ec) comporte, en section, une dizaine d'assises cellulaires. L'ensemble de l'embryon est entouré d'un protoderme lisse (pt) formé de petites cellules peu différenciées.

Figure 22. Evolution du méristème caulinaire des embryons somatiques de V. *vinifera* cv Grenache noir, du stade torpille au stade géant.
(a) stade torpille, aire maximale ; (b) stade torpille, aire minimale ; (c et d) stade T+, méristème plat ; (e et f) stade T+, méristème en dôme ; (g) stadé T+, méristème en cours de différenciation ; (h et i) stade géant, le pôle caulinaire ne présente plus aucune caractéristique méristématique.
cc : cylindre cental ; ec : écorce ; fp : faisceaux procambiaux ; mc : méristème caulinaire ; tu ; tunica.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 5 μm ; coloration : VMP.


a
mc
b
mc
c
mc
ec
e
mc
d
mc
f
mc
g
h
i
15 µm
150 µm
15 µm

Au niveau racinaire (fig. 23, a), le méristème (mr) comporte un groupe de petites cellules, ébauche du futur centre quiescent (cq), vers où convergent les files cellulaires du cylindre central et de l'écorce. Sous le centre quiescent, la coiffe (co), de type ouvert, est bien individualisée. A l'extrémité de la coiffe, les restes d'un suspenseur (su) un peu plus fin que celui des embryons somatiques, peuvent être observés.

Dans l'espace intercotylédonaire, le méristème caulinaire (fig. 23, b) comporte une seule assise tunicale (tu) recouvrant trois à quatre assises de cellules indifférenciées. La coloration par le mélange vert de méthyle-pyronine (fig. 23, c) montre que les cellules méristématiques ont une pyroninophilie homogène mais faible. Le méristème ne présente pas encore de zonation et il est inactif sur le plan mitotique.

Après la germination, au moment de la percée de la radicule, l'organisation histologique de l'axe embryonnaire (fig. 23, d) a profondément changé. L'hypocotyle (hy) et les cotylédons (cot) se sont développés de façon importante ; ils présentent de grandes cellules vacuolisées fortement différenciées ou de nombreuses mitoses peuvent cependant être observées. Au niveau caulinaire, le point végétatif est maintenant en dôme ; il comporte deux assises tunicales (fig. 23, e ; tu 1 et tu 2) recouvrant un ensemble de petites cellules indifférenciées dont la pyroninophilie hétérogène, importante sur les flancs et faible au centre du dôme méristématique, reflète la spécialisation fonctionnelle en zones latérales (zl) et axiale (ax) du méristème caulinaire. A cette étape du développement, la radicule a grandi et elle a percé les téguments de la graine mais le méristème caulinaire n'a encore exprimé aucune capacité organogène : il n'a pas édifié de feuille.

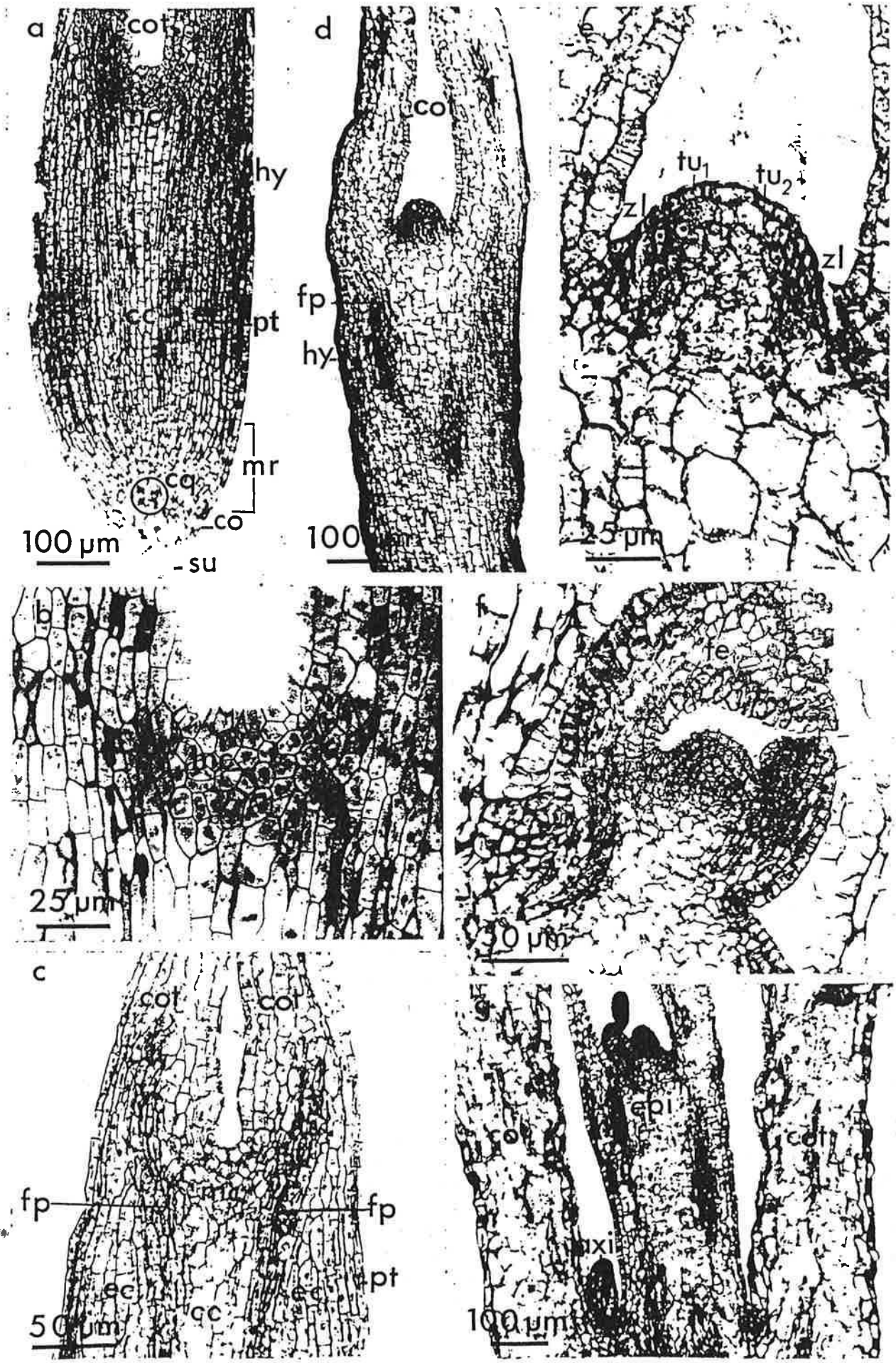
Trois à quatre jours après la percée de la radicule, l'élaboration de la première feuille par le méristème caulinaire (fig. 23, f ; fe1) confère à la jeune germination la qualité de jeune plantule. Après deux à trois jours d'activité organogène au niveau du méristème (fig. 23, g), l'épicotyle (epi) s'est allongé et les premiers bourgeons axillaires (axi) sont formés. La conversion en plantule fonctionnelle est alors pleinement réalisée.

Figure 23. Organisation histologique des embryons zygotiques de *V. vinifera* cv Grenache noir au cours de leur développement en plantule.

(a) stade torpille, organisation générale ; (b et c) stade torpille, méristème caulinaire ; (d et e) embryon au moment de la percée de la radicule ; d : organisation générale de l'axe hypocotylé ; e : méristème caulinaire ; (f) stade jeune plantule, méristème caulinaire après l'initiation de la première feuille ; (g) stade jeune plantule, axe épicotylé.

ax : zone axiale ; axi : bourgeon axillaire ; cc : cylindre central ; co : coiffe ; cot : cotylédons ; cq : centre quiescent ; epi : épicotyle ; fe 1 : feuille de rang 1 ; fp : faisceaux procambiaux ; mc : méristème caulinaire ; mr : méristème racinaire ; pt : protoderme ; tu : tunica ; zl : zone latérale.

Fixation : (a et b) glutaraldéhyde postosmié, (c à g) AFA ; épaisseur de section : (a et b) 1 μm, (c à g) 5 μm ; coloration : (a et b) paragon, (c à g) VMP.


a
cot
hy
pt
mr
cq
co
su
100 µm
d
co
fp
hy
100
e
tu1
tu2
zl
zl
25 µm
b
25 µm
f
fe
50 µm
c
cot
cot
fp
fp
pt
ec
ec
cc
50 µm
g
epi
co
cot
axi
100 µm

Conclusion

Les formations d'origine somatique obtenues *in vitro*, sont des axes bipolaires qui différencient toujours, précocement (fin du stade globulaire) et simultanément, un méristème caulinaire et un méristème racinaire ; ce sont donc effectivement des embryons.

Malgré leur forte tératologie et leur peu de ressemblance morphologique avec les embryons issus de graines, les embryons somatiques au stade torpille possèdent une organisation histologique comparable, sinon similaire, à celle de leurs homologues zygotiques. Dans les deux cas, le méristème caulinaire est réduit à un petit massif cellulaire sans organisation interne et inactif sur le plan mitotique ; le méristème racinaire, comporte un centre quiescent typique et une coiffe bien individualisée, à l'extrémité de laquelle un suspenseur est souvent encore visible. Par ailleurs, l'hypocotyle, qui comporte une dizaine d'assises corticales entourant les faisceaux procambiaux et le cylindre central, est également organisé de la même façon dans les deux types d'embryons. A l'exception de la forte tératologie de leurs cotylédons, les embryons somatiques au stade torpille ne semblent donc différer de leurs homologues zygotiques que par une prolifération résiduelle de certaines cellules protodermiques et par une plus grande différenciation et une plus grande taille de leurs cellules cotylédonaires et hypocotylaires.

Cependant, au cours des étapes ultérieures de leur développement, les deux types d'embryons évoluent différemment et ils perdent rapidement leurs caractéristiques histologiques communes.

Les embryons zygotiques, arrivés au stade torpille, subissent un arrêt de la morphogenèse embryonnaire. Ils ne redeviendront actifs qu'après l'imbibition germinative et ils s'engageront alors dans une voie de développement tout à fait différente. Au cours de cette réorientation morphogénétique, le méristème racinaire édifie la jeune racine, alors que le méristème caulinaire subit de profonds remaniements structuraux et fonctionnels et élabore l'axe feuillé épicotylaire.

Les embryons somatiques, au contraire, n'ont pas de période d'arrêt de développement. Du stade torpille au stade géant, ils subissent une croissance et une différenciation cellulaires continues. Leur méristème caulinaire montre parfois un début d'organisation comparable à ce qui est observé lors de la germination des embryons zygotiques, mais dans la très grande majorité des cas, il n'exprime aucune capacité organogène et il finit, à son tour, par se différencier et par perdre ses caractéristiques

méristématiques. En revanche, le méristème racinaire élabore toujours une radicule ; son activité n'est donc pas affectée par la différenciation des cellules embryonnaires.

Le très faible taux de conversion en plantule des embryons somatiques provient donc de l'incapacité du méristème caulinaire à acquérir une structuration interne et un fonctionnement organogène. Il reste donc à déterminer quels sont les facteurs qui, dans l'embryon zygotique, permettent la structuration et contrôlent le fonctionnement du point végétatif.

III.2.3. LES TENEURS EN EAU

Le tableau XII compare l'évolution des poids de matière fraîche, de matière sèche et des teneurs en eau dans les différents types d'embryons.

Tableau XII. Evolution des poids de matière fraîche, des poids de matière sèche et des teneurs en eau, au cours de la germination des embryons zygotiques et au cours du développement des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.

Type d'échantillon	PMF[a]	PMS[b]	T_{H2O} (PMF)[c]	T_{H2O} (PMS)[d]
Embryon zygotique				
stratifié	0,170	0,034	78,40 ± 1,50	3,73 ± 0,39
percée de la radicule	1,517	0,190	86,20 ± 0,90	6,36 ± 0,44
Embryon somatique				
globulaire	0,055	0,007	87,50 ± 0,80	6,99 ± 0,47
cordiforme	0,190	0,026	87,00 ± 0,80	6,88 ± 0,45
torpille	0,540	0,076	86,40 ± 1,00	6,52 ± 0,54
T+	2,500	0,229	84,90 ± 1,90	6,31 ± 1,12
géant	27,150	2,580	88,40 ± 0,60	7,77 ± 0,49

a : mg de matière fraîche par unité, déterminé sur l'ensemble des échantillons prélevés (tab. IX, X et XI).
b : mg de matière sèche par unité, déterminé sur les échantillons utilisés pour les dosages des polyamines et des activités ADC et ODC.
c : teneur en eau relative au poids de matière fraîche.
d : teneur en eau relative au poids de matière sèche.

Pour chaque stade de développement, le poids de matière fraîche indiqué dans le tableau XII représente la moyenne de neuf pesées indépendantes réalisées sur les échantillons utilisés pour les dosages - des polyamines (*cf.* tab. IX, p. 56), - des activités ADC et ODC (*cf.* tab. X, p. 59) et - des phytohormones (*cf.* tab. XI, p. 62). Ces neuf pesées concernent, au total, 3 500 embryons zygotiques stratifiés, 233 embryons zygotiques après percée de la radicule, 3 447 embryons somatiques (ES) globulaires, 1 330 ES cordiformes, 925 ES torpilles, 419 ES T+ et 100 ES géants.

De la même façon, le poids de matière sèche représente la moyenne de six pesées indépendantes, réalisées après lyophilisation des échantillons utilisés pour les dosages des polyamines et des activités ADC et ODC. Ces six pesées concernent, au total, 1 200 embryons zygotiques statifiés, 120 embryons zygotiques après percée de la radicule, 3 184 ES globulaires, 955 ES cordiformes, 540 ES torpilles, 279 ES T+ et 42 ES géants.

Embryons zygotiques

La germination des embryons zygotiques s'accompagne non seulement d'une augmentation de leurs poids de matière fraîche et de matière sèche, mais encore d'une modification de leur état hydrique.

La teneur en eau moyenne, exprimée en fonction du poids de matière fraîche, est initialement égale à 78 % dans les embryons au stade torpille, extraits après stratification des graines. Au moment de la percée de la radicule, soit quatre à cinq jours après l'imbibition germinative, elle atteint une valeur de 86 %. L'utilisation du test t de Student-Fischer permet de comparer ces deux moyennes. La teneur en eau des embryons zygotiques stratifiés est significativement différente, au seuil 1 % ($t = 4,43$; $t_{0,01} = 3,17$), de celle des embryons zygotiques après germination. La germination s'accompagne donc d'une augmentation de 8 % de la teneur en eau relative au poids de matière fraîche.

Cette augmentation de la teneur en eau apparaît encore plus nettement si l'on se réfère au poids de matière sèche. On observe alors que la quantité d'eau représente 3,7 fois le poids de matière sèche des embryons prélevés au stade torpille après stratification, et qu'elle atteint une valeur correspondant à 6,4 fois le poids de matière sèche au moment de l'émergence de la radicule. La teneur en eau à donc presque doublé (multipliée par 1,7) au cours de la germination.

La maturation des semences de type orthodoxe (Côme, comm. pers.), telles que celles de la Vigne, s'accompagne d'une forte déshydratation. Afin de quantifier

l'importance de cette phase de dessiccation pour l'embryon zygotique, il serait intéressant de connaître les poids de matière fraîche, de matière sèche et la teneur en eau dans des embryons extraits de graines sèches à maturité, mais les difficultés techniques inhérentes au prélèvement de ces échantillons rendent impossible la réalisation directe de telles mesures. Nous avons donc seulement étudié l'évolution des teneurs en eau dans des graines entières, sèches ou après réimbibition et stratification. Les résultats sont rapportés dans le tableau XIII.

Tableau XIII. Teneurs en eau dans des graines parvenues à maturité de *V. vinifera* cv Grenache noir, avant et après imbibition et stratification.

Type d'échantillon	T_{H2O} (PMF)[a]	T_{H2O} (PMS)[b]
graines sèches[c]	10,30 ± 0,05	0,116 ± 0,003
graines stratifiées[c]	45,90 ± 0,50	0,850 ± 0,015

a : teneur en eau relative au poids de matière fraîche.
b : teneur en eau relative au poids de matière sèche.
c : pesées réalisées sur 3 lots de 50 graines ; poids de matière sèche déterminé, après totale déshydratation, par un passage de 4 jours à l'étuve à 90 °C.

La teneur en eau mesurée dans les graines sèches est très faible ; elle représente 10,3 % du poids de matière fraîche, soit environ 1 / 9 ème du poids de matière sèche. Ce résultat fournit cependant une valeur moyenne, mesurée sur la graine entière, et il ne peut être extrapolé à l'embryon zygotique inclus dans cette graine.

Effectivement, dans les pépins réhydratés et stratifiés, la teneur en eau est nettement plus faible que celle enregistrée pour les embryons isolés qui en sont extraits. Cette observation indique donc que l'embryon zygotique présente un excès d'eau par rapport aux autres parties de la graine. On peut ainsi déterminer que la teneur en eau de l'embryon, exprimée en fonction du poids de matière fraîche et de matière sèche, est respectivement égale à 1,7 (78,4 / 45,9) fois et à 4,4 (3,73 / 0,85) fois la teneur en eau moyenne mesurée sur la graine entière.

Si l'on imagine que la réimbibition est un phénomène passif qui se produit uniformément dans toutes les parties de la graine, on peut postuler que l'excès d'eau, mis en évidence dans les embryons extraits de graines stratifiées, était déjà marqué dans

l'embryon, à l'intérieur de la graine sèche. On peut alors estimer la teneur en eau des embryons zygotiques non réhydratés en réalisant les calculs suivants :

$$T_{H2O}\ (PMF) = 1,7 \times 10,3 = 17,5\ \% \quad \text{et} \quad T_{H2O}\ (PMS) = 4,4 \times 0,116 = 0,51$$

Ces calculs, bien que très approximatifs, donnent cependant une première estimation d'un paramètre difficilement mesurable. Ces données seront discutées dans le chapitre IV.

Embryons somatiques

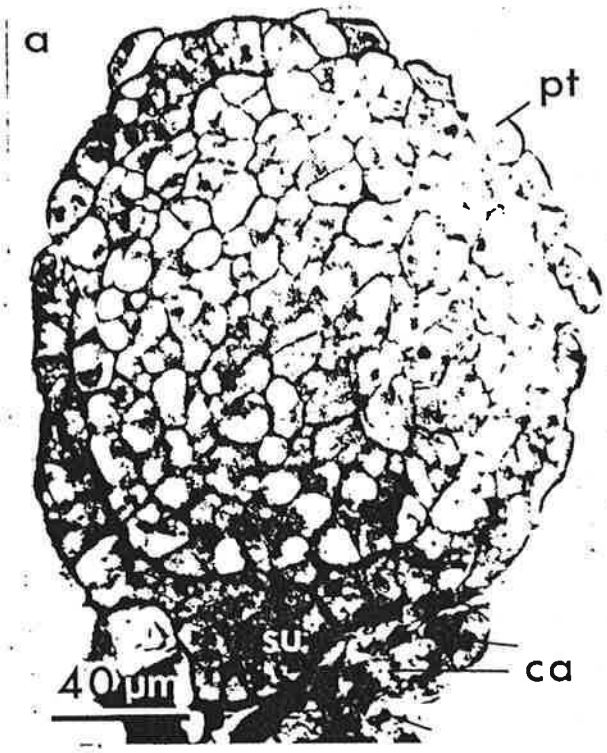
Au cours du développement des embryons somatiques, du stade globulaire au stade géant, on observe une augmentation en parallèle des poids de matière fraîche et de matière sèche (*cf.* tab. XII). Pour ces différents types d'échantillons, une analyse de variance par le test F indique que les teneurs en eau ne sont pas significativement différentes ($F = 1,37$; $F_{0,05} = 2,76$). L'évolution et la croissance des embryons somatiques s'effectuent donc à niveau d'hydratation constant et élevé. La teneur en eau des embryons représente ainsi environ 87 % de leur poids de matière fraîche, ce qui correspond à 6,9 fois leur poids de matière sèche.

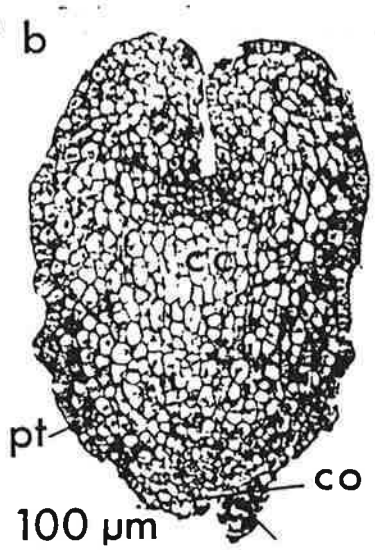
Conclusion

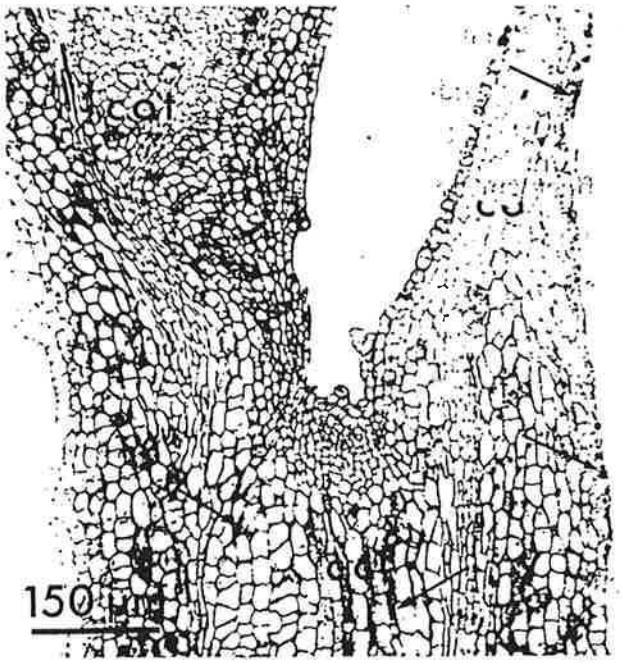
Les embryons zygotiques et somatiques ont donc un comportement tout à fait différent en ce qui concerne l'évolution de leurs teneurs en eau.

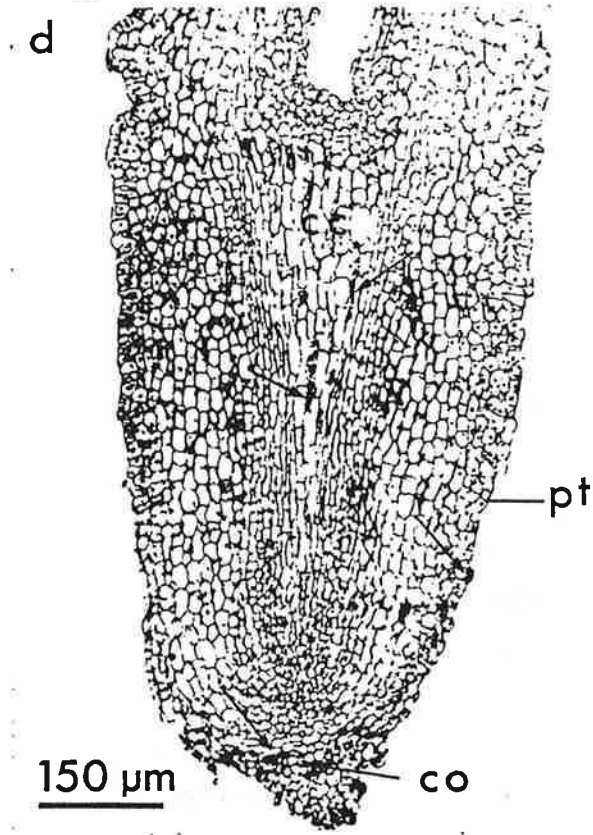
Pour les embryons issus de graines, trois phases peuvent être définies. La première phase caractérise la graine sèche arrivée à maturité ; l'embryon possède une très faible teneur en eau. La seconde phase correspond à l'imbibition des graines placées en condition de stratification ; l'embryon subit une importante réhydratation, sa teneur en eau, relative au poids de matière sèche, est alors multipliée par 7. La dernière phase enfin, correspond à la germination des graines ; la teneur en eau, mesurée dans l'embryon, augmente à nouveau et atteint sa valeur maximale.

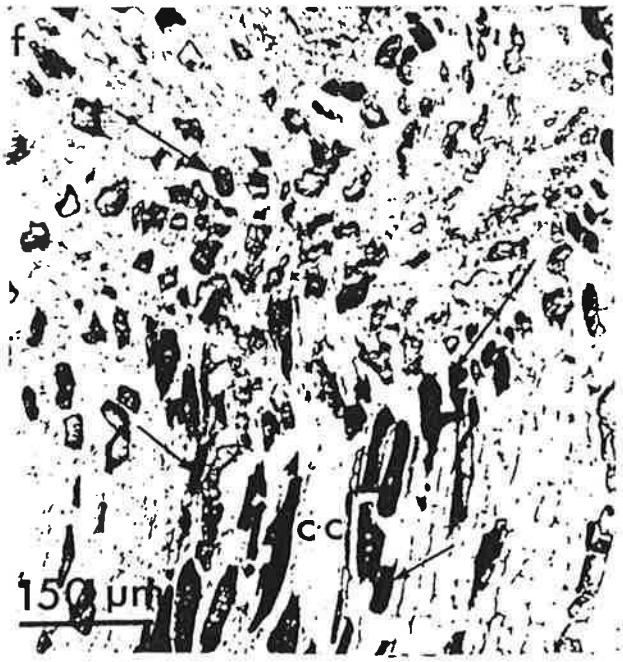
Figure 24. Mise en évidence des composés tannifères (flèches) au cours du développement des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
(a) stade globulaire ; (b) stade cordiforme ; (c) stade cordiforme, détail du pôle basal et de la coiffe ; (d) stade torpille ; (e) stade T+ ; (f) stade géant ; (g) stade T+, cellules cotylédonaires.
ca : cal ; cc : cylindre central ; co : coiffe ; cot : cotylédon ; pt : protoderme ; su : suspenseur.
Fixation : mélange de Regaud ; épaisseur de section : 4 μm ; coloration : VMP.


a
pt
ca
40 µm


b
pt
co
100 µm


cat
150 µm


d
pt
150 µm
co


f
cc
150 µm

Pour les embryons somatiques, au contraire, aucune modification de la teneur en eau n'est enregistrée au cours du développement. Le milieu liquide dans lequel ils baignent empêche toute évolution de leur état hydrique et leur confère une teneur en eau élevée et constante. Cette teneur en eau correspond d'ailleurs à la valeur maximale mesurée dans les embryons zygotiques au moment de leur germination.

III.2.4. LES COMPOSES TANNIFERES

Embryons somatiques

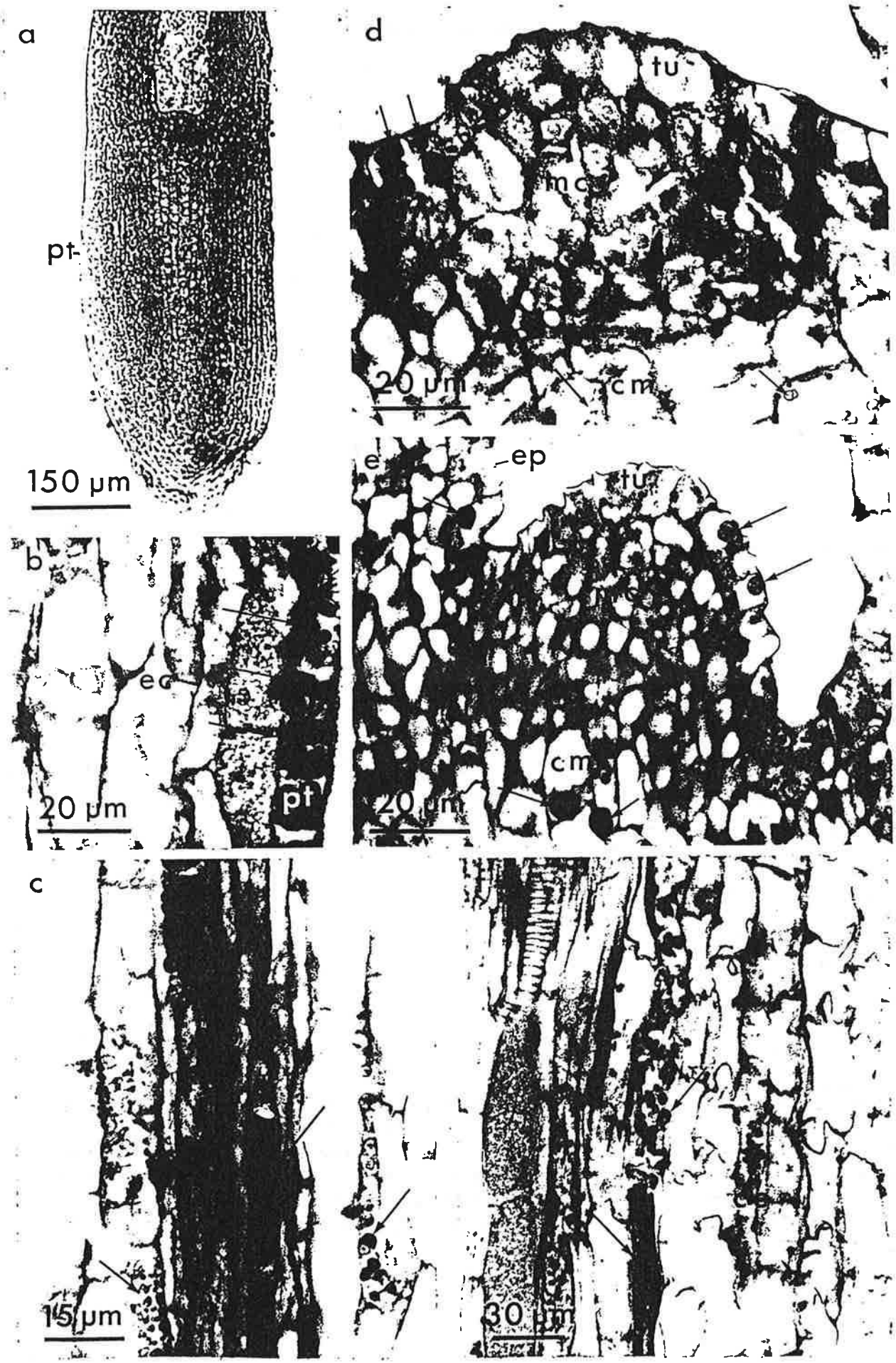
Après fixation par le mélange de Regaud, les embryons somatiques au stade globulaire (fig. 24, a) ne présentent pratiquement aucun précipité de nature tannifère ; seul le suspenseur (su) et quelques cellules protodermiques (flèches) possèdent des tannins, et chez certains embryons seulement. Par contre, le cal (fig. 24, a ; ca) supportant l'embryon est très riche en composés tannifères (flèches).

Au stade cordiforme (fig. 24, b et c), quelques cellules de la coiffe (co ; flèches) et du protoderme de l'hypocotyle (fig. 24, c ; flèches) sont pourvues de précipités tanniques. Mais les embryons restent globalement pauvres en tannins.

A partir du stade torpille (fig. 24, d), des composés tannifères (flèches) sont toujours présents au niveau de la coiffe et du protoderme de l'hypocotyle, mais des tannins apparaissent aussi au niveau des cellules du cylindre central (cc ; flèches).

Cette accumulation de tannins s'amplifie au stade T+ (fig. 24, e) puis au stade géant (fig. 24, f), étapes du développement pour lesquelles les précipités tannifères (flèches) envahissent le cylindre central et les cellules protodermiques des cotylédons (fig. 24, g ; pt).

Figure 25. Mise en évidence des composés tannifères (flèches) au cours de la germination et du développement en plantule des embryons zygotiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
(a) stade torpille, prélevé après stratification des graines ; (b, c et d) embryon après germination, au moment de l'émergence de la radicule ; b : écorce et protoderme ; c : faisceaux procambiaux ; d : méristème caulinaire ; (e et f) stade jeune plantule ; e : méristème caulinaire ; f : hypocotyle.
cc : cylindre central ; cm : cellules médullaires ; ec : écorce ; ep : épiderme ; fp : faisceaux procambiaux ; pt : protoderme ; tu : tunica.
Fixation : mélange de Regaud ; épaisseur de section : 4 μm ; coloration : VMP.


a
pt
150 µm
d
tu
mc
20 µm
cm
e
ep
tu
cm
20 µm
b
ec
pt
20 µm
c
15 µm
30 µm

Embryons zygotiques

Dans les embryons zygotiques dormants ou stratifiés (fig. 25, a), la fixation par le mélange de Regaud ne permet de déceler aucun globule tannique.

Après la germination (fig. 25, b, c et d), au moment de la percée de la radicule, des tannins (flèches) sont observés au niveau du protoderme (fig. 25, b), du cylindre central dans la moitié inférieure de l'hypocotyle et à proximité des faisceaux procambiaux (fig. 25, c ; fp). Quelques globules tanniques sont également présents (fig. 25, d) dans la première assise tunicale (tu) du point végétatif et au dessous de lui, au niveau des jeunes cellules médullaires (cm).

Dans les jeunes plantules (fig. 25, e), les tannins (flèches) sont nombreux au niveau de l'épiderme des jeunes feuilles (ep), dans la première assise tunicale du méristème caulinaire et dans les cellules médullaires (fig. 25, e) et ils sont toujours présents au niveau du protoderme et du cylindre central de l'hypocotyle (fig. 25, f ; flèches).

Conclusion

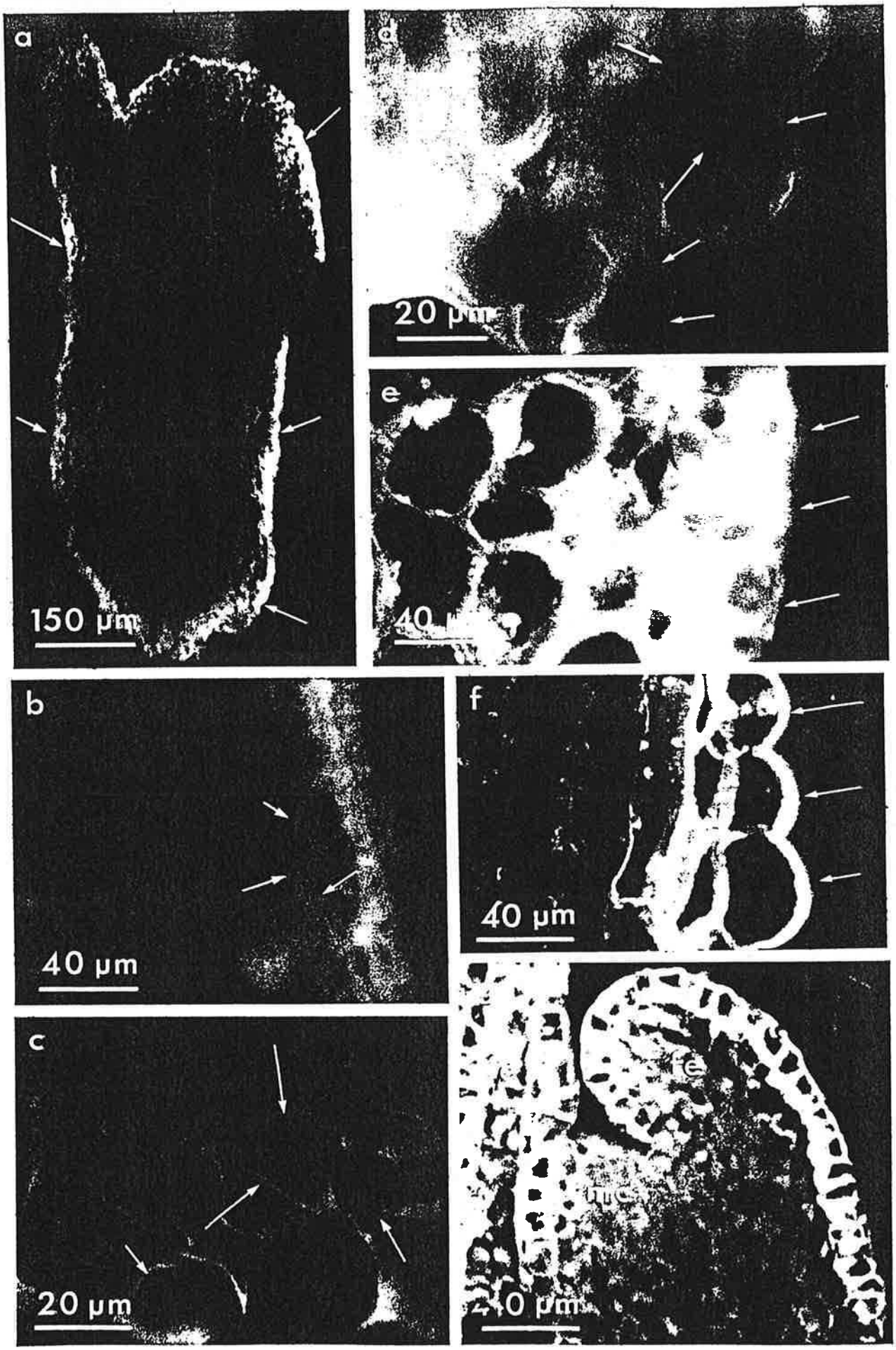
D'après ces observations, il apparaît donc que la présence de tannins est caractéristique non seulement de certaines cellules ou de certains tissus, mais aussi d'étapes bien définies du développement. Ainsi les embryons somatiques jeunes, c'est-à-dire au stade globulaire ou cordiforme, ont pratiquement dépourvus de tannins, tout comme les

---

Figure 26. Autofluorescence et impact de différentes colorations sur la fluorescence pariétale d'embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir et d'embryons zygotiques de la même espèce en cours de germination.

(a) embryon somatique au stade torpille, observé sans coloration en lumière UV ; noter l'intense autofluorescence bleue (flèches) des assises cellulaires superficielles ; (b) localisation pariétale (flèches) de l'autofluorescence bleue en lumière UV des assises cellulaires superficielles d'un embryon somatique observé au stade torpille ; (c) mise en évidence d'une subérification (liseré bleu vif ; flèches) des cellules superficielles d'un embryon somatique examiné au stade torpille ; coloration par la phloroglucine chlorhydrique et observation en lumière UV ; (d) subérification (liseré rouge-orangé ; flèches) des assises cellulaires superficielles d'un embryon somatique examiné au stade torpille ; coloration par le Soudan IV et observation en lumière bleue ; (e) revêtement subérifié externe (liseré rouge-orangé ; flèches) observé en lumière bleue sur un embryon somatique au stade torpille coloré par le Soudan IV ; (f) mise en évidence d'un revêtement externe subérifié (liseré rouge-orangé ; flèches) au niveau de l'hypocotyle d'un embryon zygotique après germination ; coloration par le Soudan IV et observation en lumière bleue ; (g) apex caulinaire d'une jeune plantule d'origine zygotique, après coloration par le Soudan IV et observation en lumière bleue ; le méristème (mc) et les jeunes feuilles (fe), qui ne présentent pas d'autofluorescence rouge-orangé, sont dépourvues de subérine.

Fixation : AFA ; épaisseur de section : a et b, 5 μm ; c à g, 10 μm.


a
150 µm
d
20 µm
e
40 µm
b
40 µm
f
40 µm
c
20 µm
e
40 µm

embryons zygotiques au stade torpille. Pour les embryons zygotiques, l'apparition des premiers globules tanniques coïncide avec la germination. Parallèlement, dans les embryons somatiques, l'accumulation de tannins s'observe à partir du stade torpille et s'amplifie dans les stades plus avancés du développement. Les globules tanniques ont une localisation comparable et leur accumulation est liée à la différenciation des embryons en plantule fonctionnelle, dans le cas des embryons zygotiques ou en structure géante et tératologique, dans le cas des embryons somatiques.

III.2.5. LES REVETEMENTS PARIETAUX

Embryons somatiques

Les examens réalisés en microscopie à fluorescence révèlent que les embryons somatiques au stade globulaire ne présentent pas d'autofluorescence. Par contre, du stade cordiforme au stade géant, ils sont entourés de cellules présentant une fluorescence bleue intense, lorsque l'observation est réalisée sans coloration en lumière ultraviolette (fig. 26, a ; stade torpille). Cette autofluorescence est localisée au niveau des parois (fig. 26, b ; flèches) des cellules protodermiques et des assises cellulaires sous-jacentes, mais elle est absente au niveau des cellules superficielles de la face interne des cotylédons. Son intensité augmente avec l'âge de l'embryon. Au stade cordiforme, seul le protoderme fluoresce alors qu'aux stades ultérieurs du développement (fig. 26, b) les assises cellulaires sous-protodermiques présentent une intense autofluorescence.

Les résultats des différents tests réalisés afin de déterminer l'origine de cette autofluorescence pariétale sont rapportés ci-desous.

Après traitement par la phloroglucine chlorhydrique et observation en lumière blanche, aucune coloration rouge, caractéristique de la lignine, n'est décelée dans les embryons aux stades globulaire, cordiforme et torpille. Par contre, aux stades T+ et géant, des trachéides spiralées (fig. 27 ; têtes de flèches), dont la paroi lignifiée acquiert une coloration rose plus ou moins soutenue, apparaissent dans le système vasculaire des embryons. Cette coloration par la phloroglucine chlorhydrique est cependant exclusivement localisée au niveau des cellules vasculaires et elle ne concerne pas les cellules corticales et protodermiques entourant les embryons. L'intense autofluorescence bleue pariétale, observée en lumière ultraviolette sur les préparations non colorées, ne révèle donc pas la présence de lignine, mais elle pourrait provenir d'autres composés phénoliques liés à la paroi (Harris et Hartley, 1976). De plus, la phloroglucine

chlorhydrique diminue l'intensité de la fluorescence bleue observée en lumière ultraviolette, à l'exception de celle de certaines cellules, localisées à la surface de l'embryon et à la base de l'hypocotyle, qui restent entourées d'un liseré fluorescent bleu vif (fig. 26, c ; flèches). La persistance de ce type de fluorescence après traitement par la phloroglucine chlorhydrique indique la nature subérifiée des parois cellulaires.

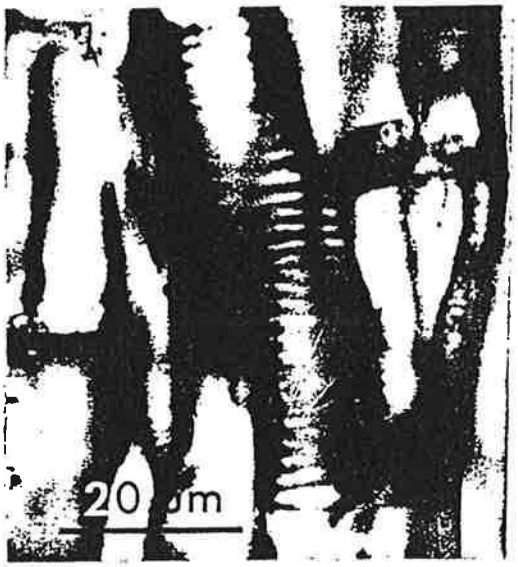


Figure 27. Trachéides spiralées observées dans le système vasculaire d'embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir au stade T+.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 10 µm ; coloration : phloroglucine chlorhydrique.

La subérification de certaines cellules embryonnaires est confirmée à la fois après coloration par le Soudan IV et observation en lumière bleue (fig. 26, d et e) qui révèle une intense fluorescence rouge-orangé (flèches), et après coloration par le Noir Soudan B qui éteint totalement la fluorescence en lumière ultraviolette.

Par ailleurs, dès le stade cordiforme, deux types de cellules subérifiées peuvent être identifiées. Les unes sont de grandes cellules superficielles, très différenciées, issues de la prolifération anarchique de cellules embryonnaires de surface. Elles montrent (fig. 26, c), comme nous venons de le voir, une intense autofluorescence bleue après traitement par la phloroglucine chlorhydrique et observation en lumière ultraviolette et une intense fluorescence rouge-orangé après coloration par le Soudan IV et observation en lumière bleue (fig. 26, d). Le second type de cellules subérifiées est constitué par de véritables cellules protodermiques, beaucoup plus petites que les précédentes et peu différenciées, dans lesquelles seule la face externe de la paroi (fig. 26, e ; flèches) montre un liseré fluorescent rouge-orangé après coloration par le Soudan IV et observation en lumière bleue.

Embryons zygotiques

Au stade torpille, les embryons zygotiques ne montrent aucune autofluorescence pariétale. Par ailleurs, leur système vasculaire, uniquement constitué de faisceaux procambiaux, est totalement dépourvu d'éléments lignifiés.

Après la germination, au moment de la percée de la radicule, la coloration par le Soudan IV, associée à une observation en lumière bleue (fig. 26, f), met en évidence un liseré rouge-orangé, recouvrant totalement le protoderme de l'hypocotyle et des cotylédons et traduisant la présence d'un revêtement externe subérifié (flèches). De plus, à ce stade du développement, un traitement par la phloroglucine chlorhydrique permet d'observer les premières trachéides spiralées.

Chez les jeunes plantules, c'est-à-dire au moment de l'élaboration de la première feuille, la lignification du système vasculaire s'amplifie et le revêtement subérifié est toujours présent au niveau de l'hypocotyle et des cotylédons. Cependant, ce revêtement externe subérifié est absent au niveau de l'apex caulinaire et des feuilles en formation (fig. 26, g), comme le montre l'abscence de fluorescence rouge-orangé.

Conclusion

Les examens en microscopie à fluorescence permettent d'observer que les embryons somatiques se distinguent de leurs homologues zygotiques par une accumulation précoce de composés polyphénoliques pariétaux présentant une intense autofluorescence bleue en lumière ultraviolette. La synthèse de ces composés est très probablement liée aux conditions de culture des embryons puisqu'elle n'est observée qu'au niveau des assises cellulaires superficielles, en contact étroit avec le milieu extérieur et qu'elle n'apparaît pas au niveau des tissus plus profonds et de la face interne des cotylédons, à l'abri du milieu de culture.

Par ailleurs, les embryons somatiques et zygotiques s'entourent d'un revêtement subérifié à une étape définie de leur évolution, mais l'élaboration de cette barrière imperméable est beaucoup plus précoce pour les embryons somatiques. La subérification n'apparaît en effet qu'au moment de la germination des embryons zygotiques, alors qu'elle est observée dès le stade cordiforme pour les embryons somatiques.

Enfin, alors que la lignification des premiers éléments conducteurs n'intervient qu'après la germination des embryons zygotiques, des trachéides lignifiées sont

observables précocement dans les faisceaux procambiaux des embryons somatiques, à partir du stade T+, ce qui plaide en faveur de leur rapide différenciation.

III.3. Les états de ploïdie et de prolifération des cellules embryonnaires

L'analyse du niveau de ploïdie global des embryons somatiques au stade torpille et de leurs homologues zygotiques dormants, également prélevés au stade torpille, a été réalisée par cytométrie en flux. Cette méthode nous a, de plus, permis de déterminer la quantité d'ADN par noyau 2 C (où 1 C représente la quantité d'ADN d'un noyau gamétique) dans les deux types d'échantillons.

La lecture des histogrammes de répartition des teneurs en ADN nucléaire (fig. 28 a et b) montre que les embryons somatiques et zygotiques possèdent une population majoritaire de noyaux en 2 C, et deux sous-populations minoritaires s'inscrivant dans les limites de répartition 2 C - 4 C et 4 C. Ainsi, dans les embryons somatiques (fig. 28, a), 73 % des noyaux sont en phase G_1 du cycle cellulaire alors que seulement 4 % d'entre eux sont en phase G_2 ; les noyaux restants (23 %) comportent une quantité d'ADN située entre les valeurs 2 C et 4 C. Pour les embryons zygotiques dormants (fig. 28, b), la proportion de noyaux en phase G1 du cycle cellulaire est sensiblement supérieure et elle correspond à 81 % de la population nucléaire ; les 19 % de noyaux restants se répartissent entre les valeurs 4 C (6 %) et les valeurs intermédiaires 2 C - 4 C (13 %).

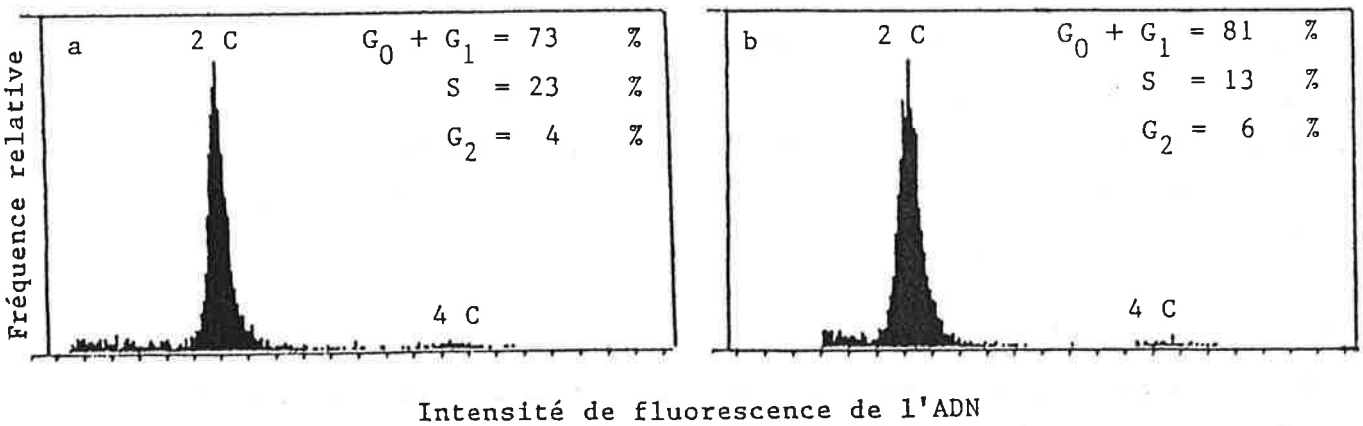


Figure 28. Histogrammes de distribution de la teneur en ADN nucléaire d'embryons somatiques (a) et zygotiques (b) de *V. vinifera* cv Grenache noir prélevés au stade torpille.
Les quantités d'ADN sont proportionnelles à l'intensité de fluorescence des noyaux. Echelle linéaire.

Par ailleurs, sur les échantillons étudiés, aucun noyau ne présente une quantité d'ADN inférieure à la valeur de référence 2 C ou supérieure à la valeur de référence 4 C. Les embryons somatiques au stade torpille sont donc, tout comme leurs homologues zygotiques, typiquement diploïdes et ils ne comportent pas de noyaux aneuploïdes ou polyploïdes.

La détermination de la quantité d'ADN par noyau 2 C est établie en comparant l'intensité de fluorescence des noyaux de Vigne en phase G_1 avec celle d'érythrocytes de poulet, utilisés comme standard interne et contenant une quantité fixe et connue (2 C = 2,3 pg) d'ADN.

Les résultats présentés dans la figure 29 (a et b), montrent que la position des pics 2 C de Vigne par rapport au standard est identique pour les embryons somatiques et zygotiques. Quelle que soit l'origine de l'embryon examiné, la quantité d'ADN par noyau 2 C est donc équivalente. En mesurant précisément les positions respectives des pics, on peut estimer cette quantité 2 C d'ADN à 1,6 pg par noyau diploïde de Vigne.

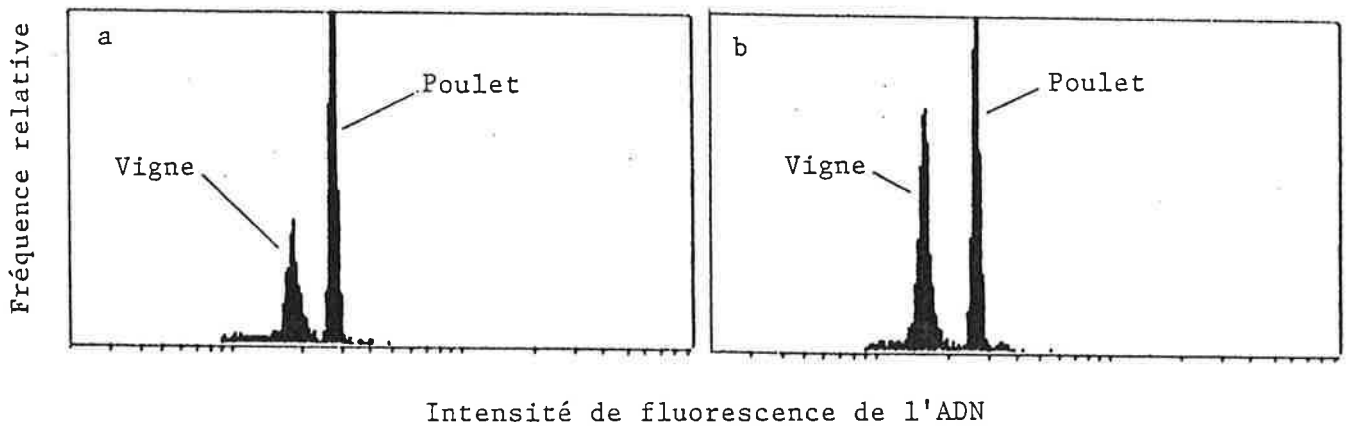


Figure 29. Estimation de la quantité d'ADN dans les noyaux 2 C d'embryons somatiques (a) et zygotiques (b) de *V. vinifera* cv Grenache noir prélevés au stade torpille.
Des érythrocytes de poulet (2 C = 2,3 pg) sont utilisés comme standard interne. Les quantités d'ADN sont proportionnelles à l'intensité de fluorescence des noyaux. Echelle semi-logarithmique.

Les données acquises par cytométrie en flux fournissent des renseignements à l'échelle d'une population homogénéisée ; elles n'apportent donc qu'une vue d'ensemble de l'état de prolifération "moyen" des embryons. L'utilisation de la microspectrophotométrie *in situ* permet d'affiner ces résultats en étudiant, sur un nombre limité d'embryons, la répartition des noyaux dans les différentes phases du cycle cellulaire, pour des territoires embryonnaires précis.

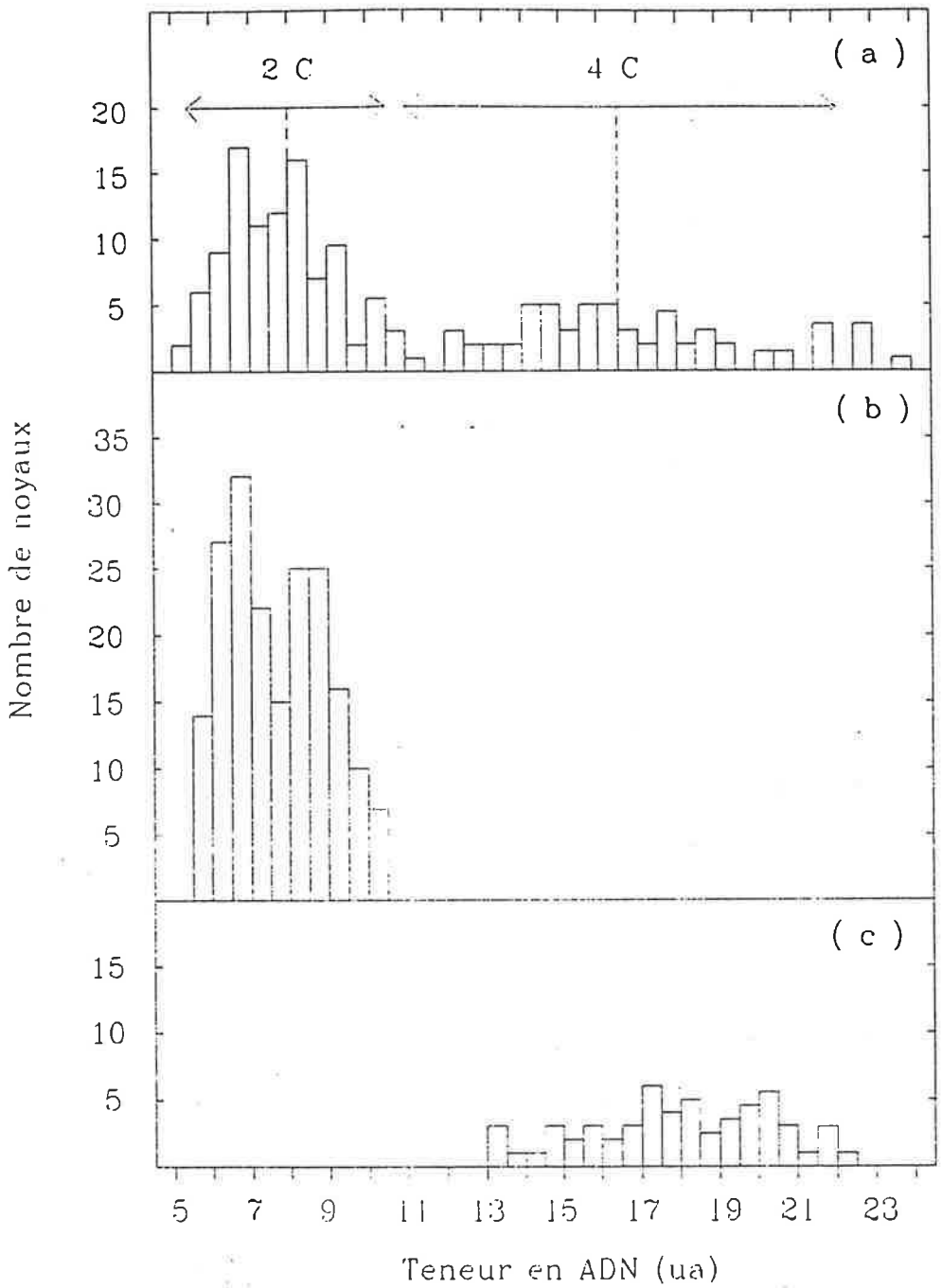


Figure 30. Histogrammes de fréquence distributionnelle des teneurs en ADN (en unités arbitraires, ua) de noyaux télophasiques et prophasiques d'embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir au stade torpille et de noyaux interphasiques des cellules du méristème caulinaire des mêmes embryons.
(a) valeurs de référence 2 C et 4 C obtenues sur 100 noyaux télophasiques (2 C) et 50 noyaux prophasiques (4 C). Les limites de dispersion à 95 % de sécurité des teneurs 2 C et 4 C sont matérialisées en haut des histogrammes en reportant la valeur de deux écarts types de part et d'autre de chaque moyenne ; (b et c) mesures réalisées au niveau des noyaux du méristème caulinaire de dix embryons somatiques ; en (b) mesures obtenues sur huit des embryons ; en (c) mesures obtenues sur deux des embryons.

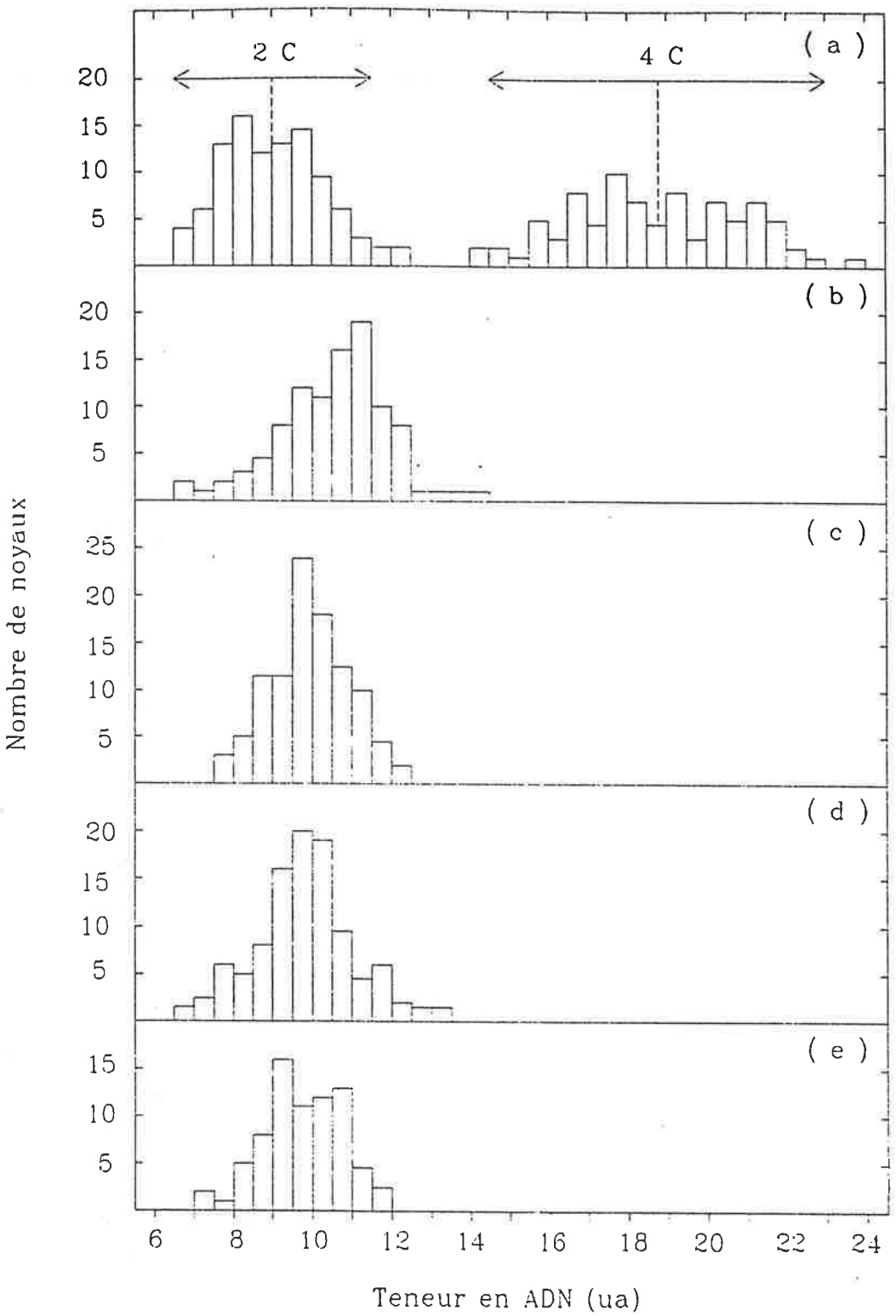


Figure 31. Histogrammes de fréquence distributionnelle des teneurs en ADN (en unités arbitraires, ua) des noyaux télophasiques et prophasiques d'embryons zygotiques de *V. vinifera* cv Grenache noir en cours de germination et de noyaux interphasiques examinés au niveau de différentes régions d'embryons zygotiques dormants de la même espèce.

(a) valeurs de référence 2 C et 4 C obtenues sur 100 noyaux télophasiques (2 C) et 85 noyaux prophasiques (4 C). Les limites de dispersion à 95 % de sécurité des teneurs 2 C et 4 C sont matérialisées en haut des histogrammes en reportant la valeur de deux écarts types de part et d'autre de chaque moyenne ; (b) méristème caulinaire ; (c) cotylédons ; (d) méristème racinaire ; (e) hypocotyle.

Nous avons réalisé ce type d'examen au niveau du méristème caulinaire de dix embryons somatiques prélevés, de façon aléatoire, au stade torpille. Pour chaque échantillon, la quantité d'ADN (en unités arbitraires) à été mesurée dans vingt à trente noyaux entiers non superposés. La lecture des histogrammes (fig. 30, b et c) se fait en comparant les profils de distribution des teneurs en ADN avec les profils de distribution des noyaux à l'état 2 C (demi-télophases) et 4 C (prophases) de référence (fig. 30, a) (Nougarède *et al.*, 1982).

Les moyennes des teneurs de référence en ADN, 2 C et 4 C, sont mentionnées avec leur limite de dispersion à 95 % de sécurité, obtenue en reportant la valeur de deux écarts types de part et d'autre de chaque moyenne.

Pour huit embryons sur les dix étudiés, les noyaux du méristème caulinaire sont totalement regroupés autour de la teneur 2 C en ADN (fig. 30, b) ; pour les deux autres embryons, tous les noyaux du méristème caulinaire se regroupent autour de la valeur 4 C (fig. 30, c). En aucun cas des noyaux de cellules méristématiques possédant une teneur en ADN inscrite entre les limites de répartition 2 C et 4 C n'ont été observés.

Nous avons également utilisé la microspectrophotométrie *in situ* pour l'étude du cycle cellulaire dans des embryons zygotiques dormants (fig. 31). Nous avons ainsi examiné la distribution de la teneur en ADN au niveau des méristèmes caulinaire et racinaire, des cotylédons et de l'hypocotyle. Pour chaque zone étudiée, cent noyaux appartenant à quatre à cinq embryons différents, ont été mesurés.

Les histogrammes présentés dans la figure 31 (b à e) indiquent que, dans les embryons zygotiques dormants, les teneurs en ADN sont regroupées autour de la valeur 2 C. Dans le méristème caulinaire (fig. 31, b), les cotylédons (fig. 31, c), le méristème racinaire (fig. 31, d) et l'hypocotyle (fig. 31, e), respectivement 78 %, 94 %, 90 % et 97 % des noyaux sont en phase G_1 du cycle cellulaire. Les noyaux restants s'inscrivent entre les limites 2 C et 4 C sans atteindre la dispersion 4 C. Par ailleurs, au niveau du méristème caulinaire, on observe un déplacement de la teneur moyenne en ADN vers la limite supérieure de la dispersion 2 C ; dans les autres tissus, au contraire, la teneur moyenne en ADN correspond à la valeur moyenne de la référence 2 C.

Conclusion

Dans le méristème caulinaire des embryons somatiques au stade torpille, aucun noyau en phase S n'est observé et aucune figure de mitose ne peut être décelée. Les

cellules méristématiques caulinaires des embryons somatiques sont donc de toute évidence non cyclantes et elles subissent un blocage total de leur cycle cellulaire, préférentiellement en phase G_1 (80 % des cas), mais parfois aussi en phase G2 (20 % des cas). Par contre, au niveau des cotylédons et des cellules superficielles de l'hypocotyle, l'observation de mitoses indique que le blocage du cycle cellulaire ne concerne pas l'ensemble des cellules embryonnaires ; ce résultat est d'ailleurs conforté par les données obtenues par cytométrie en flux, qui montrent que 23 % des noyaux des embryons somatiques sont en phase S.

Pour les embryons zygotiques dormants, les observations histologiques révèlent qu'aucune figure de mitose n'est présente ; ces embryons subissent donc un arrêt total de leur cycle cellulaire. Les mesures en flux et *in situ* indiquent que ce blocage se produit principalement en phase G_{0-1}. Cependant l'arrêt en G_{0-1} n'est pas total et quelques noyaux possédant une quantité d'ADN intermédiaire entre les valeurs 2 C et 4 C de référence sont décelés. Ces noyaux sont surtout localisés au niveau du méristème caulinaire (56,4 %) mais ils se rencontrent aussi au niveau du méristème racinaire (25,6 %), des cotylédons (15,4 %) et de l'hypocotyle (2,6 %). Par contre, les noyaux en phase G_2 sont très peu nombreux ; ils ne représentent que 6 % des noyaux examinés en cytométrie en flux et ils n'ont pas été décelés par les mesures *in situ*.

III.4. La nature, la localisation et l'évolution des réserves embryonnaires

III.4.1. L'AMIDON

La coloration par la réaction APS nous a permis de suivre l'évolution des réserves amylacées (fig. 32 et 33) dans les embryons somatiques aux différents stades de leur développement et dans les embryons zygotiques avant et après la germination.

Embryons somatiques

Au stade globulaire (fig. 32, a), les embryons somatiques possèdent de nombreux grains d'amidon, localisés principalement au niveau des cellules du protoderme (pt) et des quatre à cinq assises cellulaires sous-jacentes (ec). Les cellules centrales de l'embryon sont par contre beaucoup moins riches en amidon et seulement quelques grains épars peuvent y être décelés.

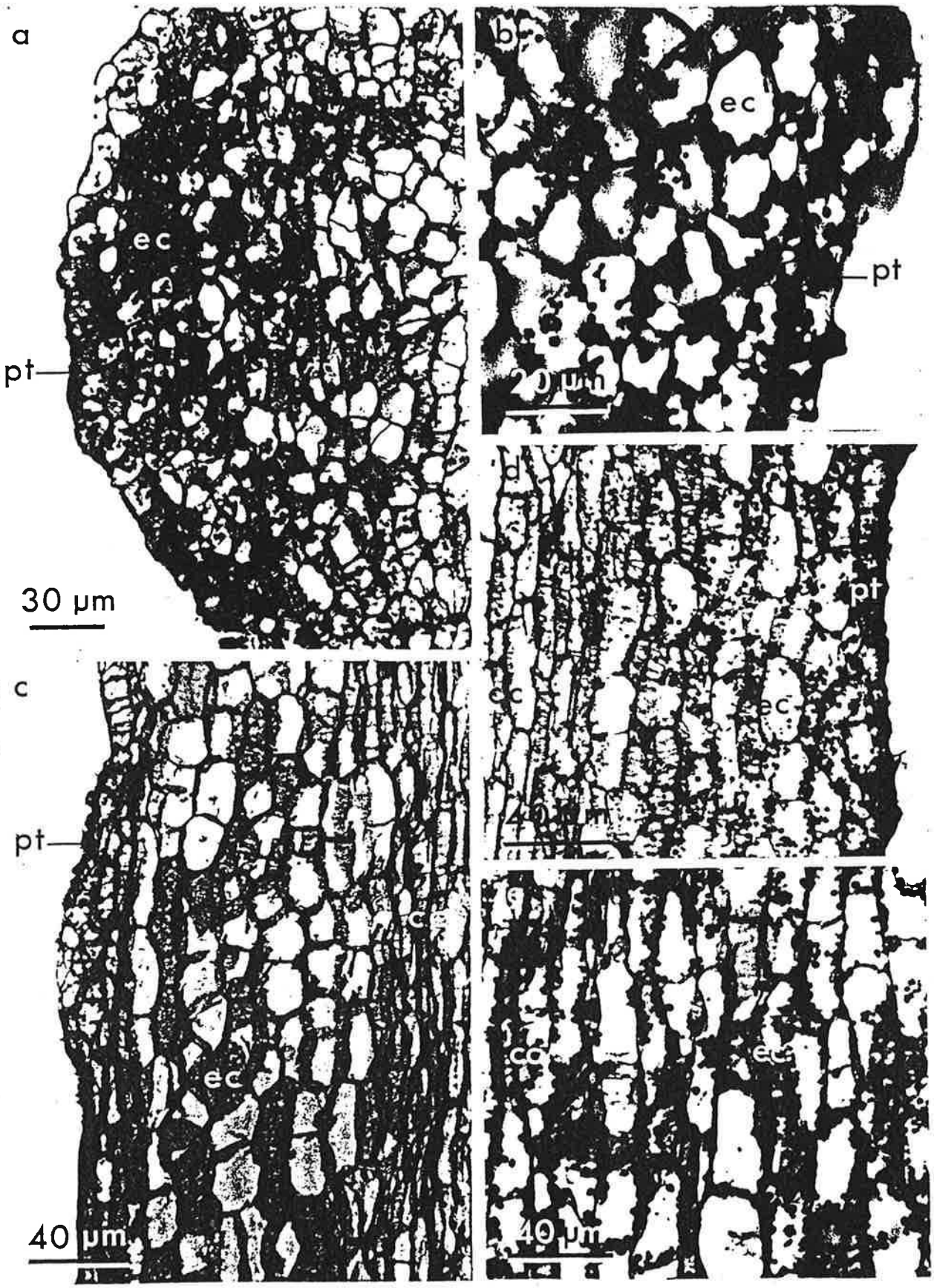


Figure 32. Mise en évidence de l'amidon au cours du développement des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
(a) stade globulaire ; (b) stade cordiforme ; (c) stade torpille ; (d) stade T+ ; (e) stade géant.
cc : cylindre central ; ec : écorce ; pt : protoderme.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 5 μm ; coloration : APS.

Les embryons somatiques au stade cordiforme (fig. 32, b) sont également riches en réserves amylacées. Comme dans les embryons globulaires, les grains d'amidon, absents au niveau du cylindre central, sont principalement localisés au niveau du protoderme et des quatre à cinq assises cellulaires corticales; ils apparaissent aussi au niveau des jeunes cotylédons.

Au stade torpille (fig. 32, c), les embryons s'appauvrissent considérablement en réserves amylacées. Les cotylédons restent riches en amidon mais le protoderme et les assises corticales ne présentent plus que quelques petits grains.

Au cours des stades ultérieurs de leur développement (fig. 32, d et e), les embryons somatiques accumulent à nouveau des quantités importantes d'amidon. Au stade T+, les réserves amylifères sont concentrées au niveau du protoderme, de l'écorce (fig. 32, d ; ec) et des cotylédons, mais elles sont rares dans les cellules du cylindre central (fig. 32, d ; cc). Par contre, au stade géant (fig. 32, e), toutes les cellules embryonnaires sont gorgées d'amidon.

Embryons zygotiques

Chez les embryons zygotiques, dormants ou après stratification (fig. 33, a), la réaction APS ne permet de déceler que quelques rares grains d'amidon, très petits et exclusivement localisés au niveau des cellules corticales.

Après la germination (fig. 33, b), c'est-à-dire au moment de l'émergence de la radicule, une forte accumulation d'amidon est observée au niveau de l'écorce de l'hypocotyle et dans les cotylédons (cot). Aucun grain d'amidon ne peut par contre être décelé au niveau du cylindre central et des méristèmes apicaux.

Enfin, chez la jeune plantule d'origine zygotique (fig. 33, c, d, e), après l'élaboration de la première feuille (fig. 33, c), les réserves amylacées de l'hypocotyle ont été totalement utilisées et elles sont absentes de l'épicotyle (epi) et des jeunes feuilles (fe) ; elles sont par contre encore très importantes dans les cotylédons (fig. 33, d) et au niveau de la coiffe (co) des racines (fig. 33, e).

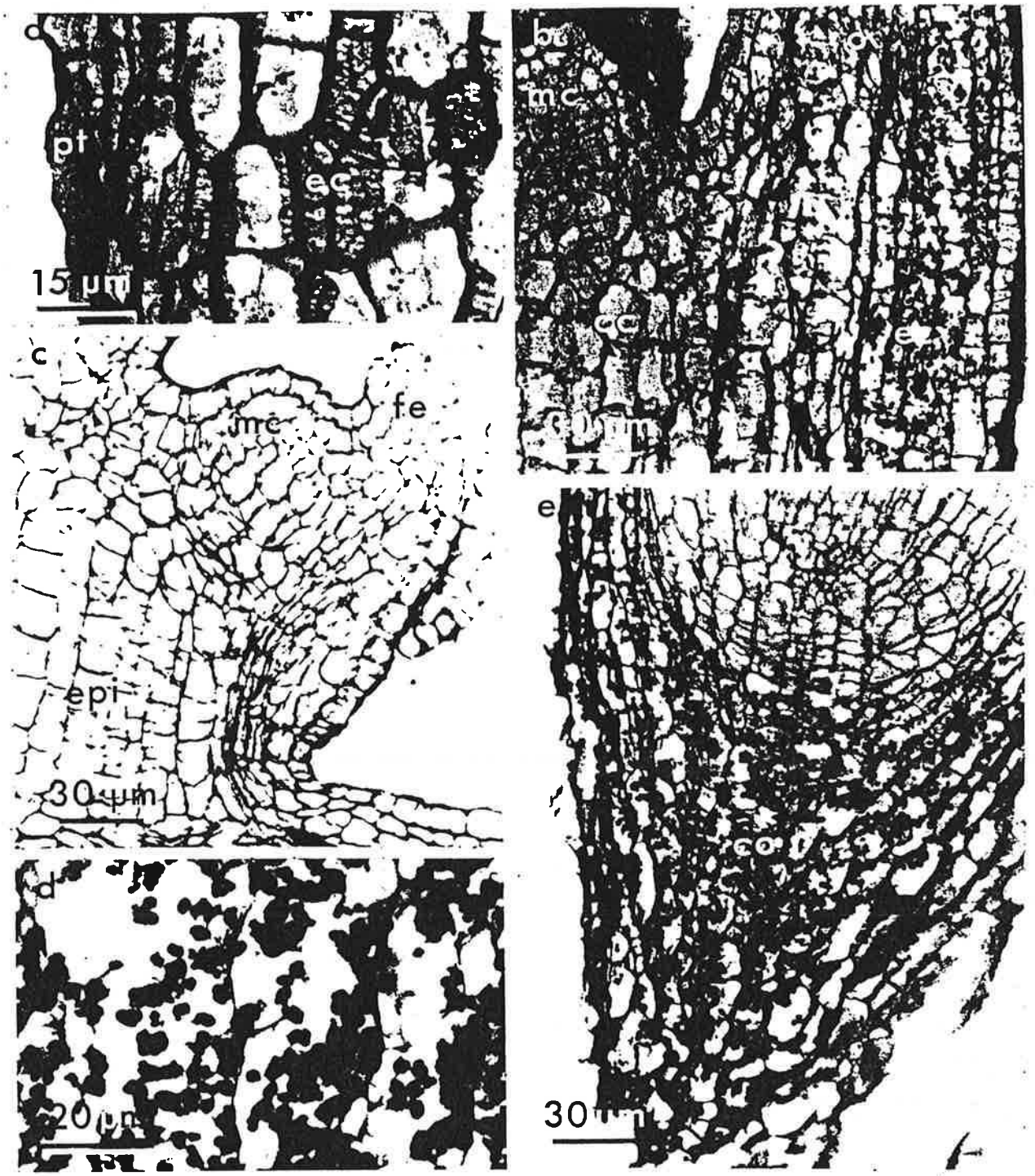


Figure 33. Mise en évidence de l'amidon au cours de la germination et du développement en plantule des embryons zygotiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
(a) stade torpille, prélevé après stratification des graines ; (b) embryon après germination, au moment de l'émergence de la radicule ; (c, d et e) stade jeune plantule ; c : méristème caulinaire ; d : cellules cotylédonaires ; e : pointe racinaire.
cc : cylindre central ; co : coiffe ; cot : cotylédon ; ec : écorce ; fe : feuille ; mc : méristème caulinaire.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 5 μm ; coloration : APS.

Conclusion

Cette étude comparative de l'évolution des réserves amylacées au cours du développement des embryons somatiques et au cours de la germination des embryons zygotiques permet donc de dégager plusieurs points importants.

En premier lieu il apparaît que, chez les embryons somatiques, le passage du stade cordiforme au stade torpille s'accompagne d'une utilisation massive et d'une diminution transitoire des réserves en amidon. Tout comme l'embryon zygotique extrait de la graine, l'embryon somatique au stade torpille est donc caractérisé par une faible charge en polysaccharides de réserve.

Par ailleurs, dans les deux types d'embryogenèse, le stade torpille est suivi par une étape d'accumulation massive d'amidon. Cette phase du développement correspond à la germination pour les embryons zygotiques, et au début de la croissance anarchique pour les embryons somatiques.

Les stades ultérieurs du développement sont par contre totalement différents dans les deux types d'embryogenèse. La jeune plantule d'origine zygotique utilise les réserves amylacées accumulées au cours de la germination et élabore de premières feuilles ; l'embryon somatique continue sa croissance et accumule massivement de l'amidon sans différencier d'épicotyle.

III.4.2. LES PROTEINES

Quelle que soit l'origine (somatique ou zygotique) et le stade de développement des échantillons observés, la coloration des protéines par la réaction à la ninhydrine-Schiff confère aux embryons une coloration rose plus ou moins intense (fig. 34, a). Cependant, aucune accumulation protéique de type grain d'aleurone n'est observée ; de telles inclusions (fig. 34, b) sont par contre très nombreuses au niveau de l'albumen des graines.

Les dosages de protéines, réalisés aux différents stades du développement des embryons somatiques (fig. 35), révèlent que la teneur en protéines (exprimée en $\mu g\ mg^{-1}$ de matière fraîche) diminue du stade globulaire au stade T+ puis reste constante du stade T+ au stade géant. Cependant, cette chute de la teneur en protéines entre les stades globulaire et T+ est simplement due à une forte augmentation du poids de matière fraîche (*cf.* tab. XII, p. 95) et elle ne reflète donc qu'un phénomène de dilution. En revanche, entre les stades T+ et géant, la stabilité de la teneur en protéines, observée en dépit de la

nette augmentation du poids de matière fraîche, traduit une intense activité de synthèse protéique.

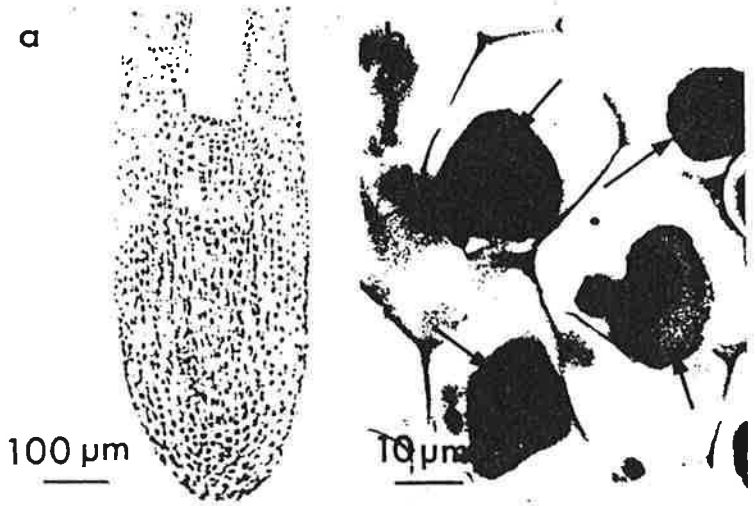


Figure 34 a et b. Mise en évidence des protéines de réserve par coloration à la ninhydrine-Schiff.
(a) embryon zygotique dormant de *V. vinifera* cv Grenache noir ; noter l'absence de grains d'aleurone ; (b) albumen extrait de graines dormantes de *V. vinifera* cv Grenache noir ; les grains d'aleurone (flèches) sont présents sous forme d'inclusions fortement colorables.
Fixation : AFA ; épaisseur de section : 5 μm.

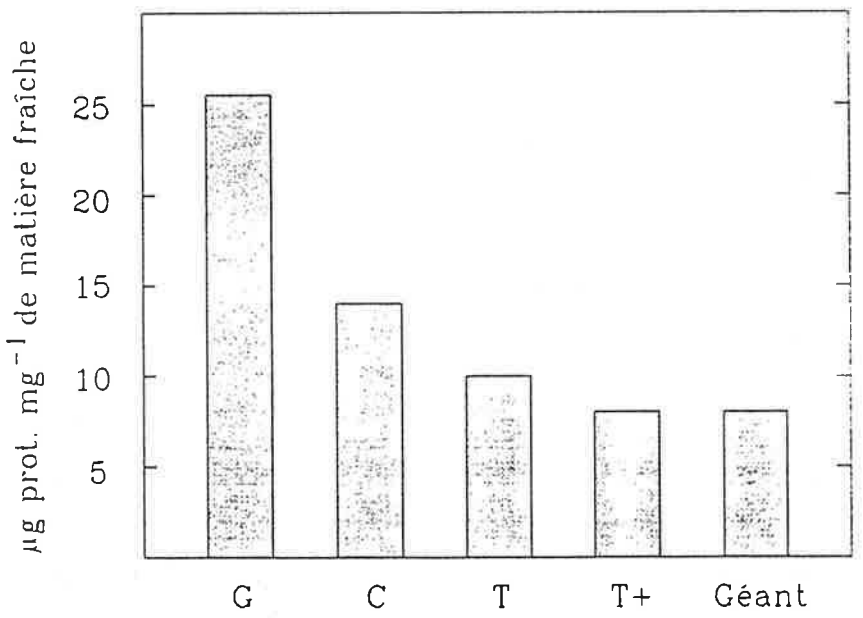


Figure 35. Evolution de la teneur totale en protéines (prot.) (en μg mg^{-1} de matière fraîche) au cours du développement des embryons somatiques de V. vinifera cv Grenache noir.
G : stade globulaire ; C : stade cordiforme ; T : stade torpille ; stades ultérieurs T+ et Géant.
Chaque dosage a été répété trois fois. Les erreurs standards, trop faibles pour l'échelle utilisée, ne sont pas mentionnées.

Pour les embryons zygotiques (fig. 36), la teneur en protéines (exprimée en $\mu g\ mg^{-1}$ de matière fraîche) reste constante durant la stratification, puis décroît rapidement dès les premiers jours de l'imbibition germinative. Au moment de la percée de la radicule, la teneur en protéines a diminué de moitié ; elle se stabilise alors et reste constante dans les jeunes plantules, ce qui traduit une évolution parallèle du poids de matière fraîche et de la quantité de protéines.

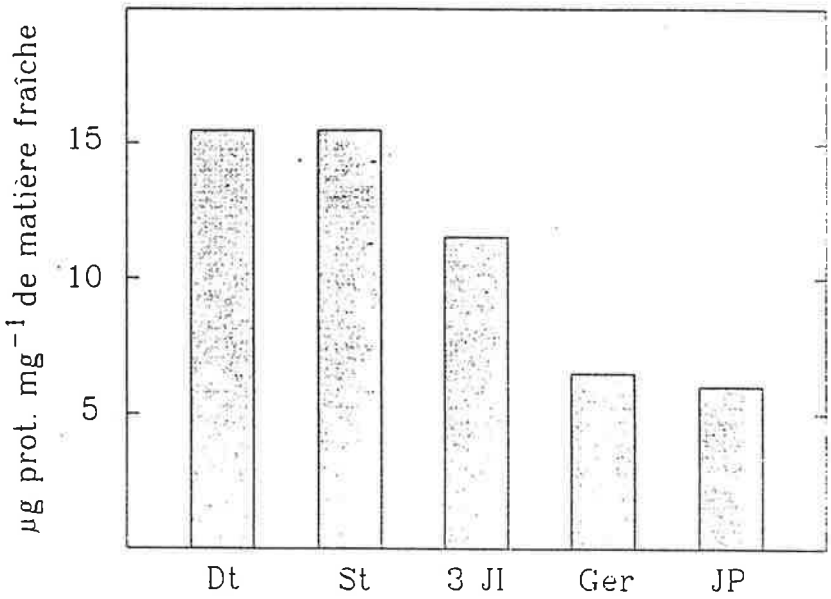


Figure 36. Evolution de la teneur totale en protéines (prot) (en $\mu g\ mg^{-1}$ de matière fraîche) au cours de la germination et du développement en plantule des embryons zygotiques de V. vinifera cv Grenache noir.
Dt : embryon dormant ; St : après stratification ; 3 JI : après 3 jours d'imbibition germinative ; Ger : au moment de la percée de la radicule ; JP : jeune plantule.
Chaque dosage a été répété trois fois. Les erreurs standards, trop faibles pour l'échelle utilisée, ne sont pas mentionnées.

Conclusion

Au stade torpille, la teneur en protéines, exprimée en fonction du poids de matière fraîche, est plus faible dans les embryons somatiques que dans les embryons zygotiques. Cependant, nous avons vu dans les paragraphes précédents que les embryons somatiques diffèrent de leurs homologues zygotiques à la fois par leur taille, par leurs poids de matière fraîche et sèche et par leur teneur en eau ; il est donc difficile de comparer leurs teneurs respectives en protéines, quel que soit le critère de référence adopté.

L'évolution globale de la teneur en protéines au cours du développement des deux types d'embryons peut par contre être analysée. Il apparaît ainsi que les embryons

somatiques et zygotiques, dépourvus de grains d'aleurone, présentent des caractéristiques et un comportement similaires. Après le stade torpille, leur teneur en protéines diminue rapidement, puis elle se stabilise et reste constante, à partir de la percée de la radicule pour les embryons zygotiques, ou à partir du stade T+ pour les embryons somatiques. Or nous avons vu qu'à ces stades du développement la teneur en eau des deux types d'embryons est identique ; il est donc alors possible de comparer les valeurs absolues de leurs teneurs en protéines. On observe alors que, dans les deux cas, ces valeurs sont équivalentes et égales à 7 à 8 μg par mg de matière fraîche.

Les embryons somatiques aux stades T+ et géant sont donc comparables aux embryons zygotiques après germination et aux jeunes plantules, en ce qui concerne leur teneur en protéines.

III.4.3. LES LIPIDES

Les lipides de réserve sont stockés sous forme d'inclusions cytoplasmiques de nature triglycéridique, qualifiées d'oléosomes. Ils sont utilisés lors de la germination et fournissent les précurseurs nécessaires au cycle du glyoxylate et à la formation de sucres, facilement mobilisables par la jeune plantule en croissance. L'étude de la répartition, de la teneur et des modalités d'utilisation des triglycérides de réserve nous a conduit à utiliser plusieurs méthodes conjointes.

Pour chaque type d'échantillon, des observations histologiques après coloration par le Noir Soudan B, complétées par des études sur sections ultrafines, nous ont permis de connaître la répartition et la densité des oléosomes. Parallèlement, ces résultats ont été quantifiés par des dosages des triglycérides totaux.

Par ailleurs, nous avons caractérisé les phases d'utilisation des réserves lipidiques en déterminant les activités des deux enzymes clef du cycle du glyoxylate, l'isocitrate lyase (ICL) et la malate synthase (MS).

Embryons somatiques

Au stade globulaire, les embryons somatiques ont une teneur en triglycérides égale à 12 μg par mg de matière fraîche (fig. 37, a), ce qui correspond à une quantité égale à 1,70 μg par embryon (fig. 37, b). Par ailleurs, les colorations par le Noir Soudan B (fig. 38, a), de même que les observations de sections ultrafines (fig. 38, b), indiquent que des

globules lipidiques sont présents (flèches) au niveau de la zone corticale des embryons. A ce stade du développement, les oléosomes coexistent avec de jeunes amyloplastes (am) et se présentent sous forme d'inclusions sphériques et d'aspect homogène, dans des cellules peu vacuolisées à cytoplasme dense.

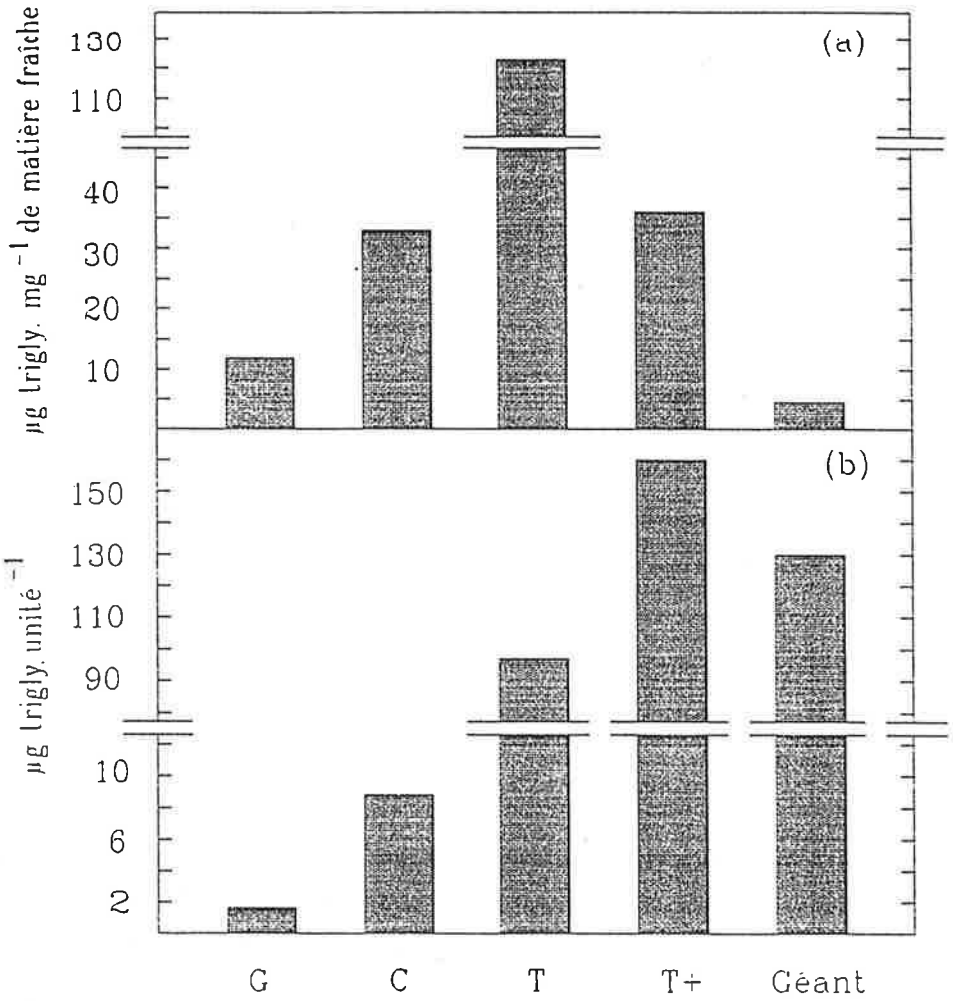


Figure 37. Evolution de la teneur en triglycérides (trigly) au cours du développement des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
Les résultats sont exprimés (a) par mg de matière fraîche, (b) par unité. Chaque dosage a été répété trois fois. Les erreurs standards, trop faibles pour les échelles utilisées, ne sont pas mentionnées.
G : stade globulaire ; C : stade cordiforme ; T : stade torpille ; stades ultérieurs : T+ et Géant.

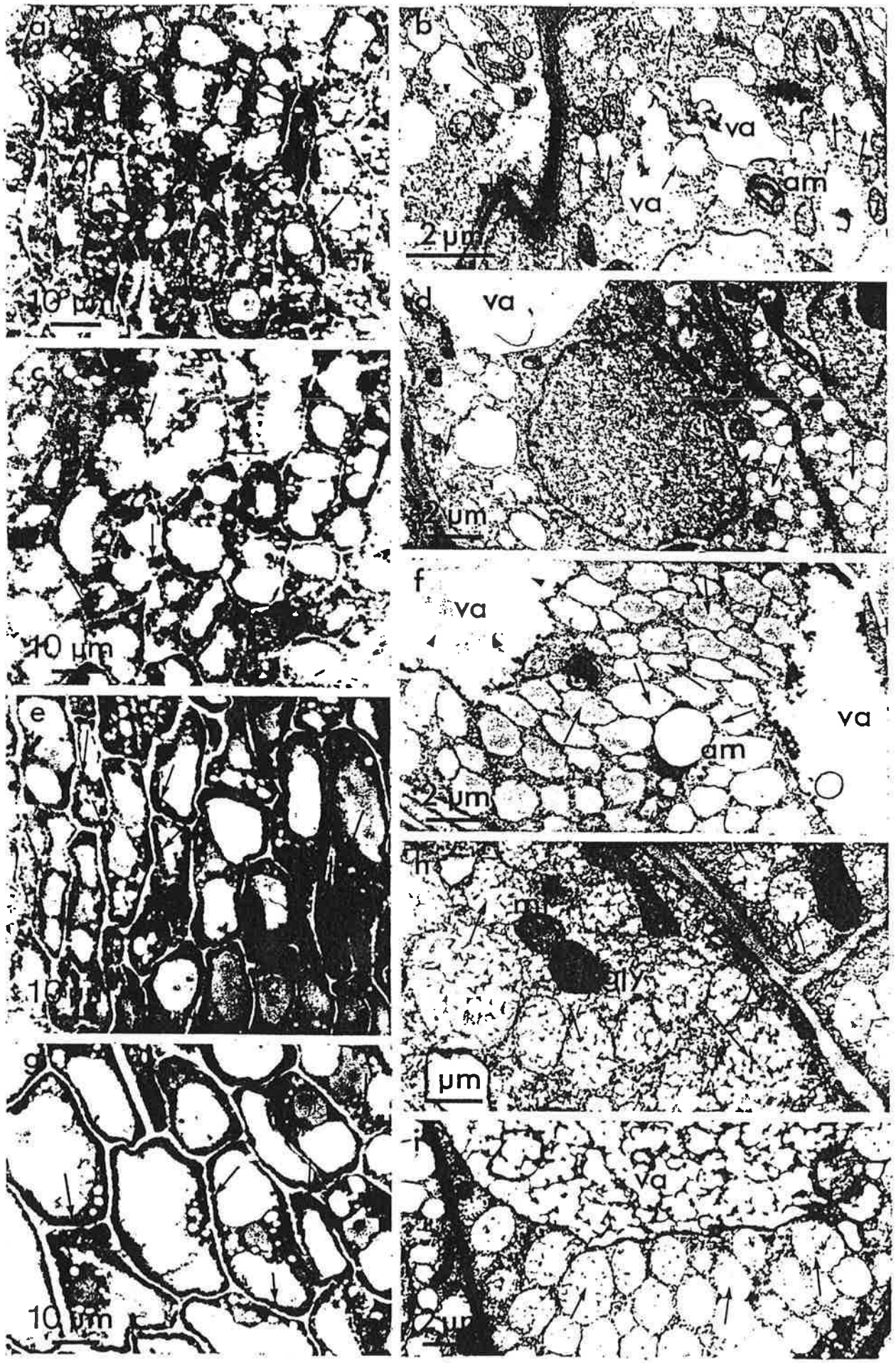
Au stade cordiforme, les inclusions lipidiques apparaissent plus nombreuses qu'au stade globulaire. Les oléosomes sont essentiellement localisés au niveau des cellules corticales (fig. 38, c et d) et dans les jeunes cotylédons, mais ils sont néanmoins présents, bien que beaucoup moins nombreux, au niveau du cylindre central. Les résultats des dosages des triglycérides totaux complètent ces informations et indiquent que la quantité de

lipides de réserve, exprimée par embryon (fig. 37, b), a été multipliée par cinq par rapport au stade globulaire.

Cette synthèse et cette accumulation massive de lipides de réserve se confirme au stade torpille, où l'on observe que la teneur en triglycérides, exprimée par mg de matière fraîche (fig. 37, a) ou par unité (fig. 37, b), subit une augmentation très importante. Comme dans le stade précédent, les oléosomes sont principalement concentrés au niveau de l'écorce et des cotylédons. A cette étape de leur évolution, les cellules corticales (fig. 38, e) et cotylédonaires (fig. 38, f) des embryons sont fortement différenciées. Elles possèdent une ou deux grandes vacuoles qui sont souvent remplies d'une substance diffuse légèrement opaque aux électrons (fig. 38, f ; têtes de flèches). Les oléosomes, séparés par de fines travées cytoplasmiques, occupent alors l'ensemble du volume cellulaire disponible (fig. 38, f ; flèches).

Au stade T+, la teneur en triglycérides, exprimée en fonction du poids de matière fraîche (fig. 37, a), chute brutalement. Cependant, cette diminution apparente est uniquement liée à une augmentation du poids de matière fraîche des échantillons et la quantité totale de triglycérides par embryon (fig. 37, b) subit, en fait, un net accroissement. Les globules lipidiques sont, comme au stade torpille, localisés dans les cellules de l'écorce et des cotylédons. Au niveau cortical (fig. 38, g), l'augmentation du volume vacuolaire provoque une concentration des oléosomes entre la paroi cellulaire et le tonoplaste ; ceux-ci forment alors une sorte de chapelet autour de la grande vacuole centrale. Par ailleurs, principalement au niveau des cotylédons (fig. 38, h), l'aspect des globules lipidiques est fortement modifié. Les oléosomes n'ont en effet plus l'apparence homogène qu'ils présentaient au cours des stades précédents et ils semblent en partie vidés de leur contenu. De plus on observe l'apparition d'organites (gly) possédant une matrice dense et homogène, souvent en contact étroit avec des mitochondries (mi) ; ces organites sont des glyoxysomes.

Au dernier stade de leur évolution, les embryons géants (fig. 38, i) possèdent de très nombreux oléosomes d'apparence granulaire et d'aspect semblable à celui décrit pour le stade T+. Cependant, la teneur en triglycérides, exprimée par mg de matière fraîche (fig. 37, a), diminue de façon marquée et elle atteint sa valeur minimale. A ce stade du développement, la quantité totale de triglycérides par embryon (fig. 37, b) diminue aussi légèrement, par rapport au stade T+. Elle se stabilise à un niveau intermédiaire entre les valeurs mesurées dans les embryons au stade torpille et celles mesurées dans les embryons T+.


a
10 µm
b
va
va
am
2 µm
c
10 µm
d
va
2 µm
f
va
va
am
2 µm
e
10
h
mi
gl
µm
g
10 µm
i
va

Les évaluations des activités malate synthase et isocitrate lyase permettent de compléter ces observations. Les résultats sont rapportés dans le tableau XIV.

Tableau XIV. Evolution des activités malate synthase et isocitrate lyase au cours du développement des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir, du stade globulaire au stade géant.

Stade du développement	malate synthase (nmole mn^{-1} μg^{-1} de protéines)	isocitrate lyase (nmole mn^{-1} μg^{-1} de protéines)
Globulaire	--[a]	--
Cordiforme	--	--
Torpille	--	--
T+	48	1,05
Géant	--	--

a : --, activité indétectable.

On remarque que, aux stades globulaire, cordiforme et torpille, aucune activité enzymatique caractéristique du cycle du glyoxylate n'est détectable. Par contre, au stade T+ on observe une forte activité MS (48 nmoles mn^{-1} μg^{-1} de protéines). Cette activité de la malate synthase n'est cependant accompagnée que d'une très faible activité ICL (1,05 nmoles mn^{-1} μg^{-1} de protéines). Le rapport MS / ICL, environ égal à 46, est donc très élevé. De plus, ces deux activités enzymatiques sont extrêmement fugaces et, dès le stade géant, elles redeviennent indétectables.

Il apparaît donc que, du stade globulaire au stade T+, les embryons somatiques synthétisent des réserves triglycéridiques, qu'ils accumulent dans leurs cellules corticales et cotylédonaires, sous forme de globules lipidiques. Au stade T+, on observe l'apparition de glyoxysomes et des activités enzymatiques qui leur sont associées ; l'aspect des oléosomes se modifie et leur contenu devient hétérogène. Cependant, le stade T+

Figure 38. Mise en évidence des lipides de réserve (oléosomes ; flèches) au cours du développement des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
(a et b) stade globulaire, zone corticale ; **(c et d)** stade cordiforme, zone corticale ; **(e et f)** stade torpille ; **e :** zone corticale ; **f :** cellule cotylédonaire, substance faiblement opaque aux électrons dans les vacuoles (têtes de flèches) ; **(g et h)** stade T+ ; **g :** zone corticale ; **h :** cellule cotylédonaire ; **(i)** stade géant, zone corticale.
am : amyloplaste ; gly : glyoxysome ; mi : mitochondrie ; va : vacuole.
Fixation : glutaraldéhyde post-osmié ; épaisseur de section : (a, c, e et g) 1 μm, (b, d, f, h et i) 800 Å ; coloration : (a, c, e et g) Noir Soudan B ; contraste : (b, d, f, h et i) acétate d'uranyle-plomb.

n'est pas suivi d'une utilisation massive des lipides de réserve et, au stade géant, la quantité de triglycérides n'a que légèrement diminué.

Embryons zygotiques

Les embryons zygotiques au stade torpille, extraits de graines parvenues à maturité après stratification, comportent environ 150 μg de triglycérides par mg de matière fraîche (fig. 39, a), ce qui représente 29 μg par unité (fig. 39, b). Les observations histo- et cytologiques (fig. 40, a et b) révèlent que ces valeurs correspondent à des quantités très importantes de lipides de réserve. En effet, des oléosomes sont présents dans toutes les cellules embryonnaires et, au niveau des cotylédons (fig. 40, a), de l'écorce et du protoderme (fig. 40, b), les cellules sont littéralement gorgées de globules lipidiques.

Trois jours après l'imbibition germinative, la croissance et l'augmentation du poids de matière fraîche des embryons provoquent une diminution de leurs teneurs globales en triglycérides (fig. 39, a). Cependant, les lipides de réserve n'ont pas été utilisés, et la quantité totale de triglycérides par embryon (fig. 39, b) n'est pas modifiée.

Au moment de la percée de la radicule, les oléosomes sont encore très nombreux au niveau des cotylédons (fig. 40, c) et au niveau du méristème caulinaire (fig. 40, d). Par contre, dans les cellules de l'hypocotyle (fig. 40, e), seuls quelques rares globules lipidiques sont encore visibles. Sur le plan quantitatif, ces observations se traduisent par une diminution très nette de la teneur en triglycérides, exprimée en fonction du poids de matière fraîche (fig. 39, a). Cependant, la quantité totale de triglycérides par embryon (fig. 39, b), augmente de façon significative ; elle est multipliée par 1,7 par rapport aux stades précédents.

Dans les jeunes plantules, prélevées une dizaine de jours après l'imbibition germinative, le phénomène observé lors de la percée de la radicule s'amplifie. Aucun oléosome n'est visible au niveau racinaire et hypocotylaire, et les globules lipidiques qui étaient encore présents au niveau du méristème caulinaire ont été totalement utilisés (fig. 40, f). Les quantités massives de triglycérides alors enregistrées (fig. 39, a et b) sont accumulées dans les cotylédons. A ce stade du développement, la quantité de lipides de réserve a été multipliée par trente par rapport à la valeur mesurée dans les embryons zygotiques au stade torpille. Cependant, les observations cytologiques révèlent que l'aspect des oléosomes est profondément modifié ; dans les cotylédons des jeunes plantules, encore non chlorophylliens, les globules lipidiques (fig. 40, g ; flèches) se présentent en effet sous

forme de volumineuses inclusions cytoplasmiques, à contenu hétérogène. Par ailleurs, on observe toujours de nombreux glyoxysomes (gly).

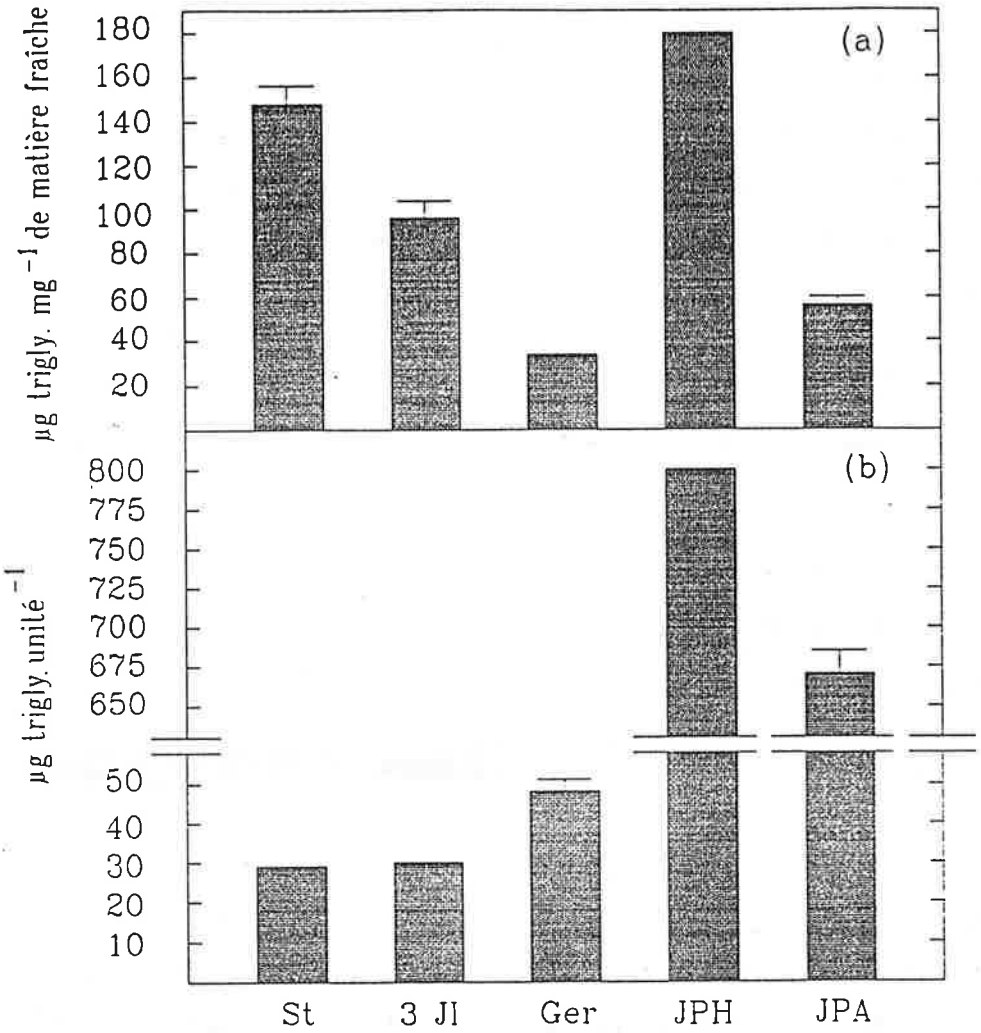
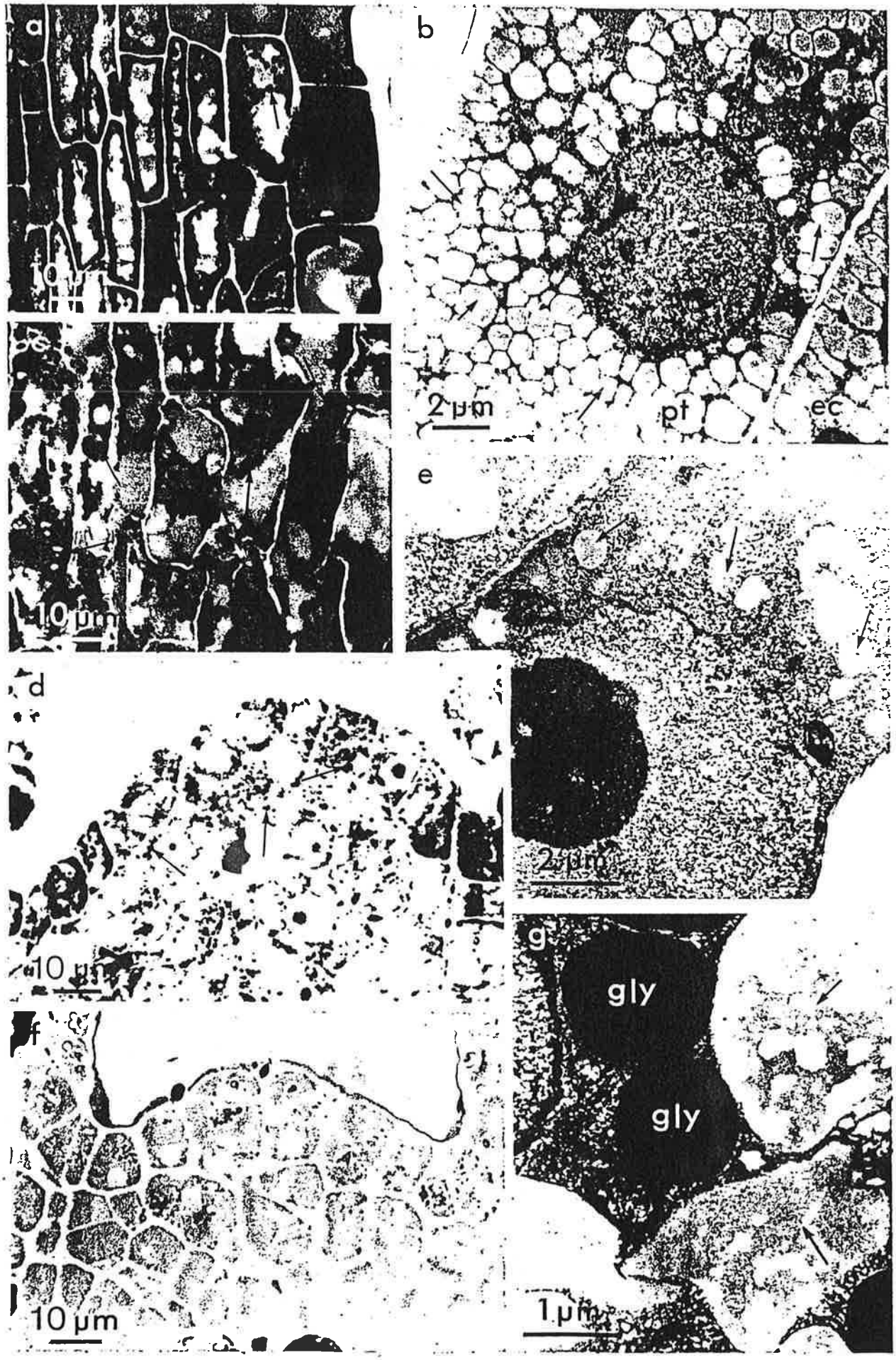


Figure 39. Evolution de la teneur en triglycérides au cours de la germination et du développement en plantule des embryons zygotiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
Les résultats sont exprimés (a) par mg de matière fraîche, (b) par unité. Chaque dosage à été répété trois fois. Les erreurs standards sont omises quand leurs valeurs sont trop faibles pour l'échelle utilisée.
St : embryon au stade torpille, extrait après stratification des graines ; 3 JI : après trois jours d'imbibition germinative ; Ger : percée de la radicule ; JPH : jeune plantule hétérotrophe (cotylédons non chlorophylliens) ; JPA : jeune plantule autotrophe (cotylédons chlorophylliens).

La germination des embryons zygotiques, puis leur évolution en plantule, s'accompagne donc à la fois d'une hydrolyse et d'une utilisation rapide des lipides de réserve présents dans l'axe hypocotylé, mais aussi d'une synthèse et d'une accumulation massive de triglycérides au niveau des cotylédons. Ce n'est que lorsque les cotylédons


a
10 µm
b
2 µm
pt
ec
10 µm
e
2 µm
d
10 µm
f
10 µm
g
gly
gly
1 µm

deviennent chlorophylliens, soit environ 12 à 13 jours après l'imbibition germinative, que l'on observe une diminution de la quantité des réserves lipidiques (fig. 39, a et b ; JPA).

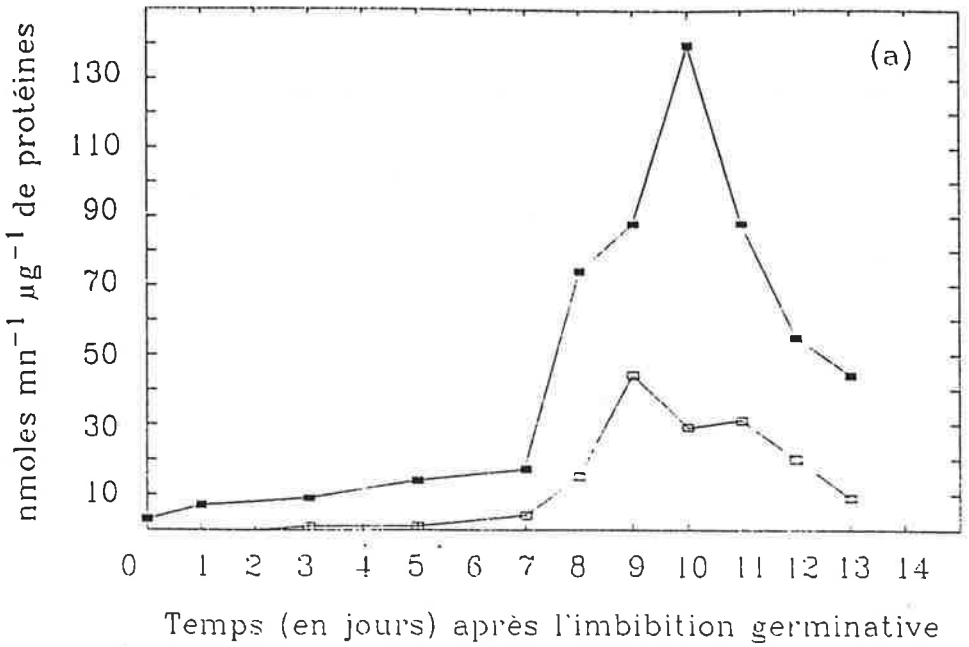
Cette augmentation très importante des réserves cotylédonaires lors de la germination des embryons zygotiques, ne peut être liée qu'à une arrivée massive de précurseurs, fournis par l'albumen de la graine. Or, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I.3.2.3., celui-ci contient principalement des réserves lipidiques, non diffusibles. Il est donc très probable que ces lipides de réserve, présents dans l'albumen, soient tout d'abord convertis en glucides diffusibles, puis transférés à l'embryon en cours de germination. Nous avons donc évalué les deux activités enzymatiques caractéristiques du cycle du glyoxylate dans l'albumen de graines en cours de germination (fig. 41, a). Nous avons également dosé les activités malate synthase et isocitrate lyase dans l'embryon lui même (fig. 41, b), au cours de son évolution en plantule.

Dans l'albumen prélevé dans des graines en fin de stratification (fig. 41, a ; temps 0), une faible activité MS (4,5 nmoles mn^{-1} μg^{-1} de protéines) est déjà présente, mais aucune activité ICL n'est détectable. Ce n'est que deux jours après l'imbibition germinative que ces deux activités enzymatiques peuvent être simultanément mesurées ; l'activité MS est alors très supérieure à l'activité ICL, et leur rapport (MS / ICL) est voisin de 18. Au cours des jours suivants, les activités isocitrate lyase et malate synthase augmentent régulièrement et rapidement, et elles atteignent leur valeur maximale respectivement au 9ème et 10ème jours après l'imbibition germinative. Par ailleurs, dés le 7ème jour, et jusqu'au 13ème jour, le rapport MS / ICL reste stable et l'activité MS n'est plus qu'entre 2 et 5 fois supérieure à l'activité ICL.

Dans les embryons zygotiques extraits de graines stratifiées (fig. 41, b ; St), aucune activité enzymatique caractéristique du cycle du glyoxylate ne peut être mesurée. Durant les premiers jours qui suivent l'imbibition germinative, les deux activités enzymatiques (MS et ICL) restent indétectables, et ce n'est qu'au moment de la percée de la radicule que l'on peut simultanément déceler leur présence. A cette étape du développement (fig. 41, b Ger), le rapport MS / ICL est environ égal à 4,5. Neuf jours après l'imbibition

---

Figure 40. Mise en évidence des lipides de réserve (oléosomes ; flèches) au cours du développement en plantule des embryons zygotiques de *V. vinifera* cv Grenache noir.
(a et b) stade torpille ; **a** : cotylédon ; **b** : portions de cellules protodermique et corticale ; **(c, d et e)** embryon au moment de la percée de la radicule ; **c** : cellules cotylédonaires ; **d** : méristème caulinaire ; **e** : cellule corticale ; **(f et g)** jeune plantule ; **f** : méristème caulinaire ; **g** : portion de cellule cotylédonaire.
ec : écorce ; gly : glyoxysome ; pt : protoderme.
Fixation : glutaraldéhyde post-osmié ; épaisseur de section : (a, c, d et f) 1 μm, (b, e et g) 800 Å ; coloration : (a, c, d et f) Noir Soudan B ; contraste : (b, e et g) acétate d'uranyle-plomb.



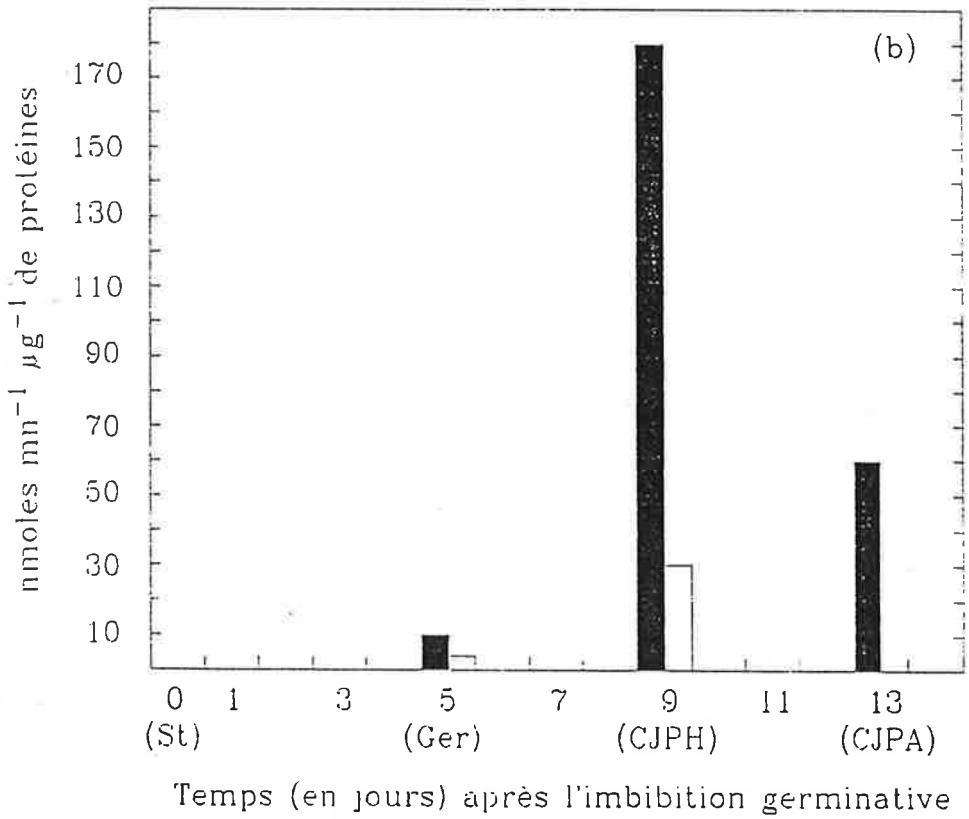


Figure 41. Evolution des activités malate synthase (■) et isocitrate lyase (□) après imbibition germinative des graines de *V. vinifera* cv Grenache noir.

En (a), activités mesurées dans l'albumen ; en (b), activités mesurées dans l'embryon ou dans la jeune plantule.

(St : embryon au stade torpille, prélevé après stratification ; Ger : embryon lors de la percée de la radicule ; CJPH : cotylédons non chlorophylliens des jeunes plantules hétérotrophes ; CJPA : cotylédons chlorophylliens des jeunes plantules autotrophes.

Chaque mesure a été répétée deux fois avec des résultats équivalents. Les valeurs mentionnées sont les moyennes de ces deux mesures.

germinative, les activités MS et ICL mesurées dans les cotylédons des jeunes plantules encore hétérotrophes (fig. 41, b ; JPH), sont très importantes et, tout en conservant un rapport constant, elles atteignent leur maximum. Au 13ème jour après l'imbibition germinative, lorsque les cotylédons ont verdi et que la jeune plantule est devenue autotrophe (fig. 41, b ; CJPA), une activité MS, relativement élevée, peut encore être mesurée, mais l'activité ICL n'est plus détectable ; le fonctionnement du cycle du glyoxylate est donc arrêté.

D'après les données acquises ci-dessus, nous pouvons donc proposer un schéma cohérent, permettant d'interpréter les modifications de la teneur et de la localisation des lipides de réserve, enregistrées au cours de la germination et du développement en plantule des embryons zygotiques.

Lors de la germination des graines de Vigne, l'utilisation des réserves lipidiques débute tout d'abord dans l'albumen. Ce phénomène se manifeste par l'apparition précoce des activités malate synthase et isocitrate lyase, caractéristiques du cycle du glyoxylate et nécessaires à la néoglucogenèse.

Ces premiers événements métaboliques sont suivis d'une accumulation massive de triglycérides, mise en évidence dès la percée de la radicule, dans les cotylédons de l'embryon en cours de développement. De plus, jusqu'au stade de jeune plantule hétérotrophe, on note une augmentation en parallèle des activités MS et ICL dans l'albumen et de la quantité de lipides de réserves dans les cotylédons. Ces observations suggèrent donc que, au cours de son développement en plantule, l'embryon zygotique est soumis à un flux important de molécules glucidiques qui sont, au moins en partie, reconverties en triglycérides et stockées dans les cotylédons sous forme d'oléosomes.

Cependant, l'accumulation des triglycérides s'accompagne aussi d'une série de réactions cataboliques conduisant à la dégradation des lipides de réserve. En effet, dès la percée de la radicule, alors même que d'importantes réserves lipidiques sont accumulées dans les cotylédons, on observe une disparition rapide des oléosomes présents dans l'hypocotyle et l'on enregistre la présence des activités MS et ICL.

Ce phénomène est encore plus marqué dans les cotylédons des jeunes plantules hétérotrophes, où l'on observe, au même moment et dans un même tissu, que la teneur en triglycérides d'une part et les activités MS et ICL d'autre part, atteignent simultanément leurs valeurs maximales. Dans les cotylédons des jeunes plantules âgées d'une dizaine de jours, on peut donc considérer qu'il existe un équilibre entre la synthèse et l'accumulation

des lipides de réserve et leur dégradation puis leur transformation en glucides. Passé ce stade, les processus cataboliques deviennent prédominants et la quantité de triglycérides diminue. Cependant, il faut souligner que lorsque les cotylédons verdissent et que la jeune plantule devient autotrophe, la diminution rapide de l'activité ICL inactive le cycle du glyoxylate ; la dégradation des lipides de réserve ne conduit donc plus à la néoglucogenèse.

Conclusion

Les embryons somatiques au stade torpille, comme leurs homologues zygotiques, possèdent d'importantes réserves lipidiques. Cependant, au cours du développement ultérieur des deux types d'embryons, le métabolisme de ces réserves est manifestement différent.

Dans les embryons zygotiques, l'évolution des lipides de réserve au cours du développement en plantule résulte d'un équilibre complexe entre des réactions anaboliques, qui conduisent à une synthèse et à une accumulation massive de triglycérides, et des réactions cataboliques, qui permettent la dégradation et l'utilisation de ces réserves. Par contre, dans les embryons somatiques après le stade torpille, ces événements métaboliques sont très peu marqués, voire totalement absents.

En effet, pour les embryons zygotiques en cours de germination, les réactions de l'anabolisme triglycéridique, qui sont alimentées par des précurseurs fournis par l'albumen, ont uniquement lieu dans les cotylédons et conduisent à une multiplication par trente de la teneur initiale en lipides de réserve. Par contre, dans les embryons somatiques, la quantité de lipides de réserve n'est multipliée que par 1,7 entre les stades torpille et T+ ; de plus, cette accumulation n'est pas exclusivement localisée dans les cotylédons.

Parallèlement à ces processus de synthèse, les réactions cataboliques se manifestent aussi dans les embryons zygotiques en cours de germination. Ces réactions, qui s'accompagnent de fortes activités MS et ICL, ont lieu à la fois dans l'hypocotyle, où elles consomment rapidement la totalité des réserves présentes, et dans les cotylédons. Jusqu'à l'acquisition de l'autotrophie, l'activité des enzymes liées au cycle du glyoxylate est importante et les réserves lipidiques contribuent ainsi à la formation de sucres, facilement mobilisables par la jeune plantule en cours de développement.

Dans les embryons somatiques en revanche, on n'observe aucune disparition des oléosomes présents dans l'hypocotyle, et les réserves lipidiques n'ont que très peu diminué

au stade géant. Cette mauvaise utilisation des réserves est très probablement liée au non fonctionnement du cycle du glyoxylate. En effet, l'activité ICL, qui n'est décelable qu'au stade T+, est très faible et le rapport MS / ICL est dix fois supérieur à celui mesuré dans les embryons zygotiques en cours de germination. Cependant, les processus conduisant à l'utilisation des réserves lipidiques dans les embryons somatiques ne sont certainement pas entièrement inactifs. En effet, dans les embryons au stade T+, on observe la présence de quelques glyoxysomes (*cf.* fig. 38, h ; gly) et l'activité MS est relativement importante. De plus, aux stades T+ et géant, l'aspect cytologique des oléosomes est tout à fait comparable à celui des globules lipidiques en cours de digestion, observés dans les cotylédons des jeunes plantules d'origine zygotique.

III.5. Les polyamines

Les polyamines ont été dosées dans des embryons zygotiques stratifiés et après germination et dans des embryons somatiques prélevés aux cinq stades de développement décrits précédemment. Dans aucun des échantillons étudiés des polyamines conjuguées n'ont pu être détectées. Les résultats présentés concernent donc les polyamines libres. Nous avons exprimé l'évolution des teneurs en polyamines au cours du développement des embryons zygotiques et somatiques en fonction de trois critères : par mg de matière sèche, par mg de protéines (teneur) et par embryon (unité$^{-1}$) (quantité).

Embryons zygotiques

Dans les embryons zygotiques stratifiés et après germination, la teneur en polyamines (fig. 42, a, b, c) est relativement faible. Dans les deux cas, le rapport putrescine / spermidine est approximativement égal à un, alors que la quantité de spermine est environ trois à quatre fois plus faible que celle de putrescine ou de spermidine.

La quantité totale de polyamines, exprimée par unité (fig. 42, a), est six fois supérieure dans les embryons zygotiques, après germination, à celle enregistrée dans les embryons stratifiés. Cependant lorsque les résultats sont exprimés en fonction de la quantité de protéines (fig. 42, b), ou en fonction du poids de matière sèche (fig. 42, c), la teneur en polyamines n'est pas significativement différente dans les embryons stratifiés et dans les embryons ayant germé. Il doit être souligné que la quantité de protéines ainsi que le poids de matière sèche sont tous deux six fois plus élevés dans les embryons ayant germé que dans les embryons stratifiés.

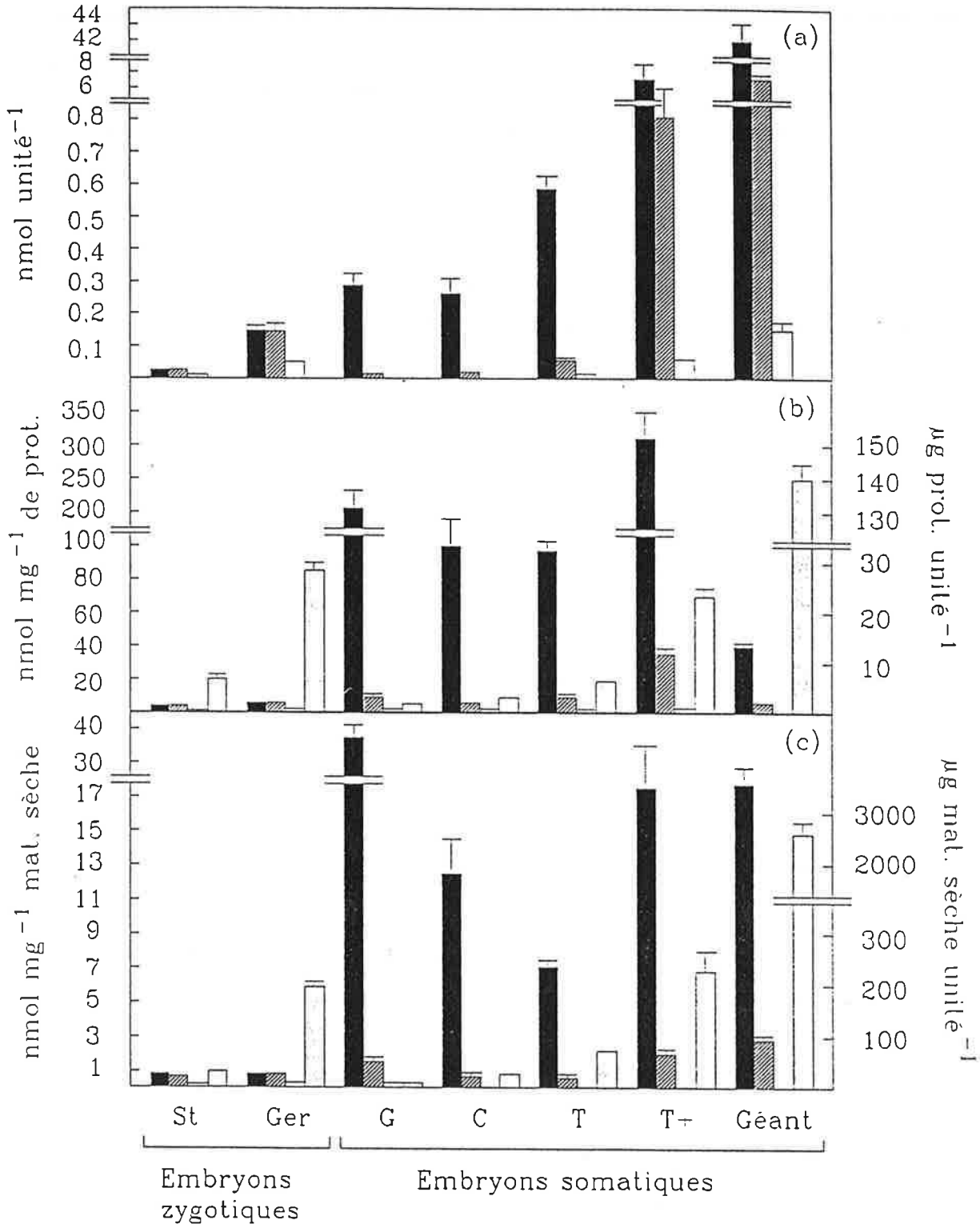


Figure 42. Evolution de la teneur en polyamines (Put, ■ ; Spd, ▨ ; Spm, □) dans des embryons zygotiques stratifiés (St) et ayant germé (percée de la radicule, Ger) de *V. vinifera* cv Grenache noir et dans des embryons somatiques de la même espèce aux différents stades de leur développement (globulaire, G ; cordiforme, C ; torpille, T ; stades ultérieurs du développement, T+ et géant).

Les résultats sont exprimés (a) par unité, (b) par mg de protéines (prot.), (c) par mg de matière sèche (mat. sèche). En (b), (□), µg de protéines (prot.) par unité ; en (c), (□), µg de matière sèche (mat. sèche) par unité.

(Les erreurs standards sont omises quand leurs valeurs sont trop faibles pour l'échelle utilisée).

Embryons somatiques

Comparés aux embryons zygotiques, les embryons somatiques contiennent des quantités très importantes de polyamines (fig. 42, a, b, c) et en particulier de putrescine. Le rapport putrescine/spermidine est toujours beaucoup plus élevé que pour les embryons zygotiques; il décroît progressivement du stade globulaire (Put/Spd = 29) au stade géant (Put/Spd = 6).

La quantité de polyamines, exprimée par unité (fig. 42, a), ne varie pas du stade globulaire au stade cordiforme mais augmente de façon marquée du stade cordiforme au stade torpille, et du stade torpille aux stades ultérieurs du développement.

Inversement, la teneur en polyamines rapportée à la quantité de protéines (fig. 42, b), décroît du stade globulaire au stade cordiforme et reste inchangée du stade cordiforme au stade torpille. Cependant, cette apparente diminution de la teneur en polyamines entre les stades globulaire et torpille est simplement due à une forte augmentation de la quantité de protéines, qui est respectivement deux et quatre fois plus élevée dans les embryons au stade torpille que dans les embryons cordiformes et globulaires. Dans les embryons au stade T+, un net accroissement, à la fois de la teneur en polyamines et de la quantité de protéines, est enregistré; ce fait indique clairement qu'une synthèse et une accumulation de polyamines se sont produites. Dans les embryons géants, une diminution de la teneur en polyamines, due à une augmentation importante de la quantité de protéines, est observée.

Exprimée en fonction du poids de matière sèche (fig. 42, c), la teneur en polyamines décroît du stade globulaire au stade torpille. Cette diminution est en fait également due à une forte augmentation du poids de matière sèche. Par contre, dans les embryons T+ et géants, bien que le poids de matière sèche augmente considérablement, une nette augmentation de la teneur en polyamines est aussi observée.

Conclusion

Les embryons somatiques se distinguent nettement des embryons zygotiques par leur très fortes teneurs en polyamines, et notamment en putrescine. Au stade torpille, c'est-à-dire à un stade de développement comparable à celui atteint par les embryons zygotiques à l'intérieur de la graine mûre, les embryons somatiques possèdent, selon le mode de représentation adopté, entre huit et vingt fois plus de putrescine que leurs homologues zygotiques. Cependant, la quantité de spermidine et celle de spermine sont sensiblement égales dans les deux types d'échantillons.

III.6. Les activités arginine- (EC 4.1.1.19) et ornithine décarboxylase (EC 4.1.1.17)

Les activités de l'arginine- (ADC) et de l'ornithine-décarboxylase (ODC), qui sont les deux principales enzymes impliquées dans la synthèse de putrescine, ont été mesurées dans les embryons somatiques, au cours des différents stades de leur développement (fig. 43). Au cours des trois premiers stades, globulaire, cordiforme et torpille, l'activité de l'ADC est toujours supérieure à celle de l'ODC et le rapport ADC/ODC augmente progressivement du stade globulaire (ADC/ODC = 2) au stade cordiforme (ADC/ODC = 3) et au stade torpille (ADC/ODC = 4). Au contraire, dans les embryons géants l'activité de l'ODC est plus élevée que celle de l'ADC.

En accord avec les résultats concernant la quantité de polyamines, les activités ADC et ODC, exprimées par embryon (fig. 43, a), augmentent du stade globulaire au stade torpille et sont maximales dans les embryons géants.

Exprimées en fonction de la quantité de protéines (fig. 43, b), les activités ADC et ODC décroissent du stade globulaire au stade cordiforme, mais cette diminution est simplement due à une augmentation de la quantité de protéines. En revanche, un net accroissement des activités ADC et ODC et de la quantité de protéines sont observés au stade torpille. Cette augmentation des activités enzymatiques précède l'augmentation de la teneur en polyamines enregistrée au stade T+. Enfin, les embryons somatiques géants sont caractérisés par de très importantes activités ADC et ODC.

Exprimées en fonction du poids de matière sèche (fig. 43, c), les activités ADC et ODC diminuent au cours de l'évolution des embryons du stade globulaire au stade géant. Dans les trois premiers stades du développement embryonnaire (stades globulaire, cordiforme et torpille), cette diminution peut être mise en parallèle avec la baisse de la teneur en polyamines (fig. 42, c), mais la diminution des activités enzymatiques, tout comme celle des teneurs en protéines, sont dues à une forte augmentation du poids de matière sèche. De plus, dans les embryons géants la teneur élevée en polyamines, observée en dépit de la baisse des activités ADC et ODC, pourait être due à un phénomène d'accumulation.

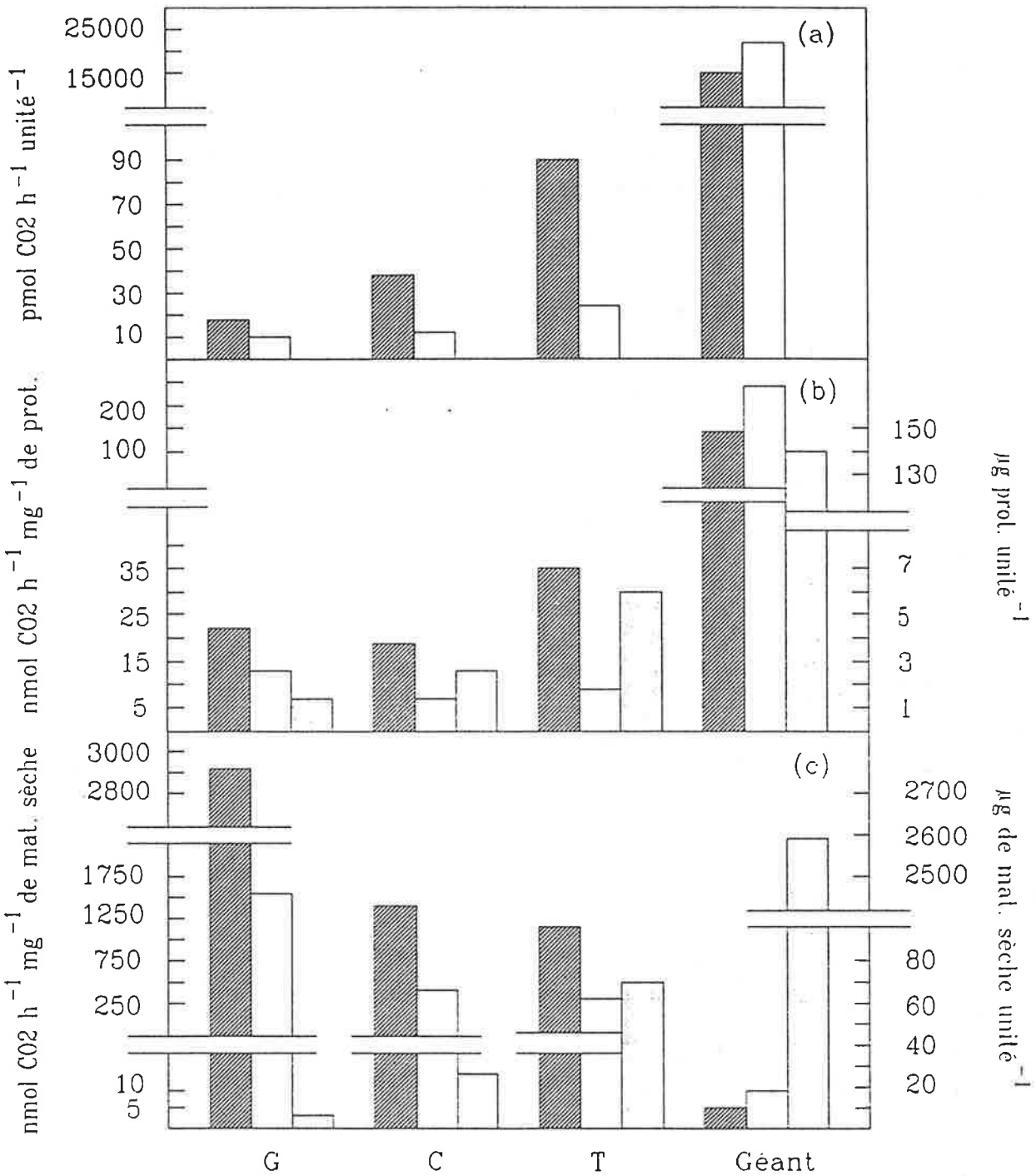


Figure 43. Activités ADC (▨) et ODC (□) totales, dans des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir aux stades globulaire (G), cordiforme (C), torpille (T) et géant.
Les résultats sont exprimés (a) par unité, (b) par mg de protéines (prot.), (c) par mg de matière sèche (mat. sèche). En (b), (□), µg de protéines (prot.) par unité ; en (c), (□), µg de matière sèche (mat. sèche)par unité.

III.7. L'acide abscissique et l'acide indolylacétique

L'acide abscissique (ABA) et l'acide indolylacétique (AIA) libres ont été dosés dans des embryons zygotiques avant et après la levée de dormance, et dans des embryons zygotiques juste après la germination (percée de la radicule). Nous avons également réalisé ces dosages pour des embryons somatiques aux différentes étapes de leur évolution, du stade globulaire au stade géant.

Comme pour les dosages effectués précédemment, les résultats obtenus sont souvent tout à fait différents selon le critère de référence adopté. Nous avons donc choisi d'exprimer nos données à la fois en fonction du poids de matière fraîche et par embryon. La confrontation de ces deux types de présentation permet d'obtenir une vision dynamique de l'évolution des teneurs en ABA et en AIA libres au cours du développement des embryons somatiques et au cours de la levée de dormance et de la germination des embryons zygotiques.

Embryons zygotiques

Dans les embryons zygotiques dormants, prélevés au stade torpille, la teneur en ABA (fig. 44, a) est égale à 7,0 pmoles par mg de matière fraîche et celle en AIA (fig. 45, a) est de 86,0 fmoles par mg de matière fraîche. Ces valeurs correspondent à des quantités de 1,5 pmoles d'ABA (fig. 44, b) et 19,0 fmoles d'AIA (fig. 45, b) par embryon.

Après stratification des graines, c'est-à-dire après la levée de dormance, les embryons se sont considérablement appauvris en ABA. On observe en effet que la teneur (fig. 44, a) et la quantité d'ABA par embryon (fig. 44, b) ont toutes deux été divisées par 3,5. Par contre, la teneur (fig. 45, a) et la quantité d'AIA par embryon (fig. 45, b) ne se sont pas modifiées.

Après la germination, lorsque la radicule à percé les téguments de la graine, la teneur en ABA augmente légèrement (fig. 44, a) malgré la forte augmentation du poids de matière fraîche des échantillons. Il y a bien une synthèse et une accumulation active d'ABA dans les embryons après germination comme l'indiquent les résultats exprimés par embryon (fig. 44, b). Par ailleurs, on observe que la teneur en AIA reste apparemment stable (fig. 45, a), malgré la forte augmentation du poids de matière fraîche des échantillons (*cf.* tab. XI). En fait, après germination, les embryons accumulent une quantité importante d'AIA, comme l'indiquent à nouveau les résultats exprimés par embryon (fig. 45, b).

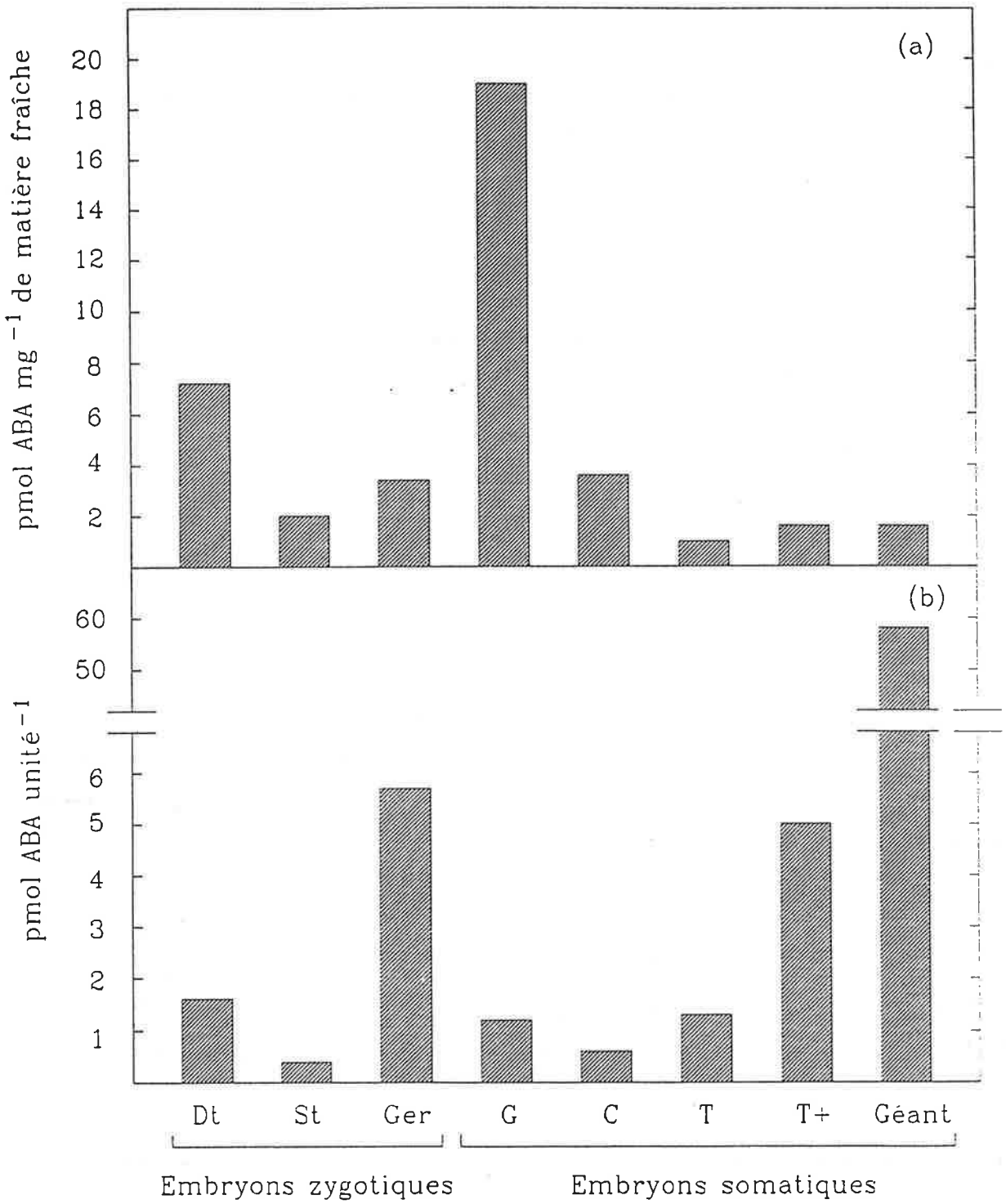


Figure 44. Evolution de la teneur en acide abscissique dans des embryons zygotiques dormants (Dt), stratifiés (St) et ayant germé (Ger) de *V. vinifera* cv Grenache noir et dans des embryons somatiques de la même espèce aux différents stades de leur développement (globulaire, G ; cordiforme, C ; torpille, T ; stades ultérieurs du développement, T+ et géant).
Les résultats sont exprimés (a) par mg de matière fraiche, (b) par unité.

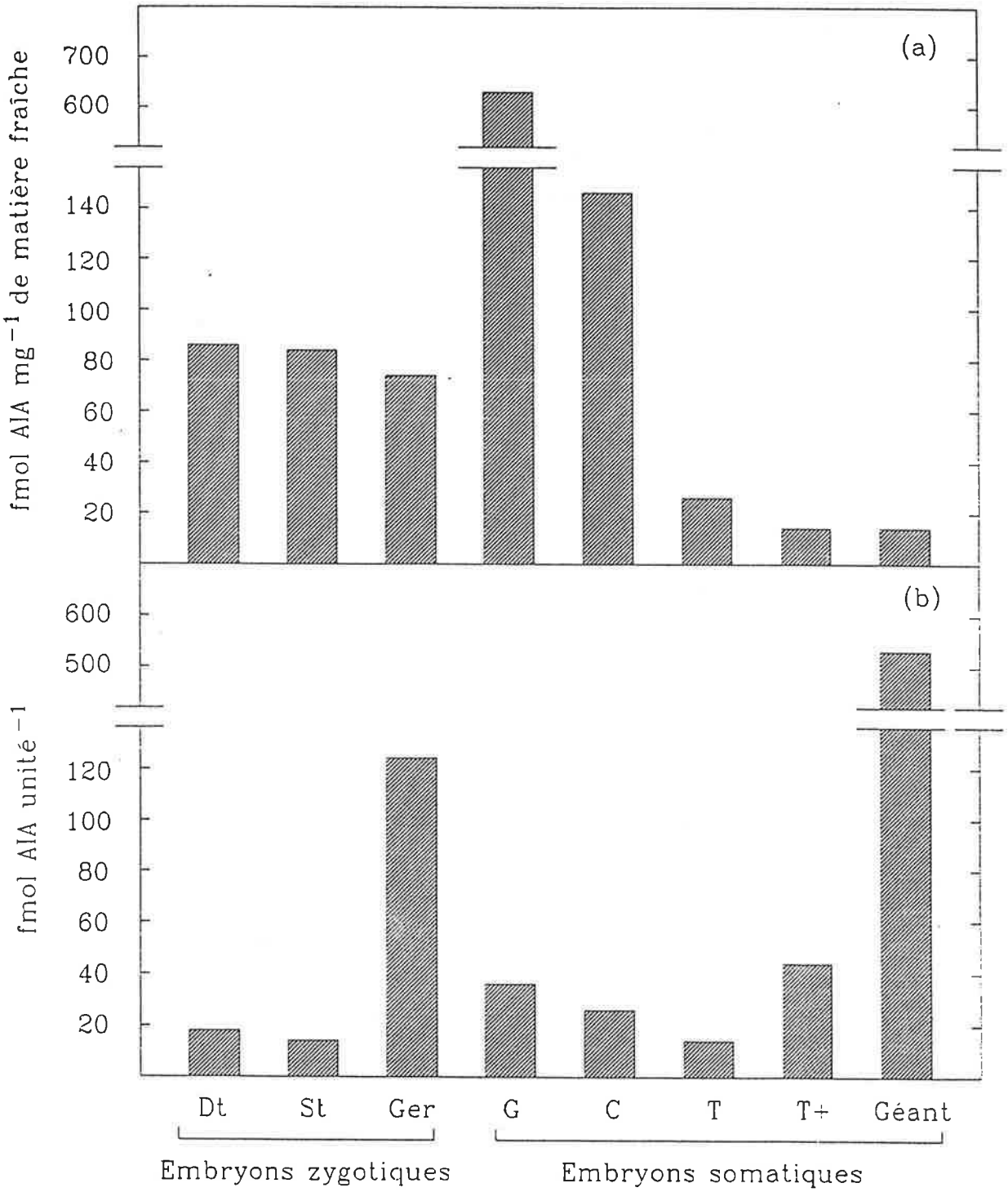


Figure 45. Evolution de la teneur en acide indolylacétique dans des embryons zygotiques dormants (Dt), stratifiés (St) et ayant germé (Ger) de *V. vinifera* cv Grenache noir et dans des embryons somatiques de la même espèce aux différents stades de leur développement (globulaire, G ; cordiforme, C ; torpille, T ; stades ultérieurs du développement, T+ et géant).
Les résultats sont exprimés (a) par mg de matière fraiche, (b) par unité.

Embryons somatiques

Au stade globulaire, les teneurs en ABA (fig. 44, a) et en AIA (fig. 45, a) sont respectivement égales à 19 pmoles par mg de matière fraîche et à 621 fmoles par mg de matière fraîche. Ces valeurs, qui sont les plus élevées observées au cours du développement embryonnaire, correspondent à des quantités totales de 1,1 pmoles d'ABA (fig. 44, b) et 35,9 fmoles d'AIA (fig. 45, b) par embryon.

Le passage au stade cordiforme s'accompagne d'une diminution sensible des teneurs en ABA et en AIA, exprimées en fonction du poids de matière fraîche (fig. 44, a et 45, a). Cette chute des substances de croissance endogènes provient non seulement d'une augmentation du poids de matière fraîche des échantillons, mais aussi d'une diminution de la quantité totale d'ABA (fig. 44, b) et d'AIA (fig. 45, b) par embryon. Ainsi, par rapport au stade globulaire, la quantité totale d'ABA est divisée par 1,7 et elle atteint sa valeur minimale ; de même la quantité totale d'AIA est divisée par 1,5.

Au stade torpille, les teneurs en régulateurs de croissance endogènes continuent à décroître (fig. 44, a et 45, a). Cependant, il faut souligner que la diminution de la teneur en ABA est uniquement due à une augmentation du poids de matière fraîche des échantillons et il y a, en fait, une nette augmentation de la quantité d'ABA par embryon (fig. 44, b). Par contre, pour l'AIA, la diminution de teneur enregistrée provient à la fois d'une augmentation du poids de matière fraîche des échantillons et d'une diminution de la quantité totale d'AIA par embryon (fig. 45, b). A ce stade du développement, la quantité totale d'AIA par embryon atteint à son tour sa valeur la plus faible.

Dans les embryons aux stades T+ et géant, les teneurs en ABA et en AIA sont à leurs valeurs minimales et elles se stabilisent à environ 1,6 pmoles par mg de matière fraîche pour l'ABA, et à environ 14 fmoles par mg de matière fraîche pour l'AIA (fig. 44, a et 45, a). Cette stabilité des teneurs en ABA et en AIA conduit à une augmentation rapide de la quantité totale de ces deux hormones par embryon (fig. 44, b et 45, b).

Conclusion

D'une manière générale, les embryons somatiques sont beaucoup plus pauvres en ABA et en AIA que leurs homologues zygotiques. En effet on observe que, à teneur en eau identique, les teneurs en ABA et en AIA sont respectivement 2,3 fois et 5,7 fois plus faibles dans les embryons somatiques aux stades T+ et géant que dans les embryons zygotiques en cours de germination.

Néanmoins ces observations doivent être modulées et il apparaît nettement que les embryons somatiques globulaires sont caractérisés par de très fortes teneurs en ABA et en AIA.

Les jeunes embryons somatiques sont donc capables de synthétiser et d'accumuler massivement ces deux phytohormones. Ultérieurement, lors de la transition du stade globulaire aux stades cordiforme et torpille, une baisse de la teneur en ABA et en AIA a lieu. Cette diminution rapide résulte à la fois d'un phénomène de dilution (augmentation du poids de matière fraîche des échantillons) et d'une utilisation des formes libres de l'ABA et de l'AIA. A partir de ces étapes de l'évolution embryonnaire, la synthèse et l'accumulation de l'ABA et de l'AIA ne sont pas interrompues mais elles se stabilisent à un faible niveau de base. Ce niveau d'équilibre final conduit à une teneur hormonale plus faible dans les embryons somatiques que dans les embryons zygotiques.

Les rôles et les contributions possibles du suspenseur, de l'embryon lui-même et de l'albumen, dans l'ajustement et le contrôle des teneurs en ABA et en AIA au cours du développement et de la germination des embryons, seront analysés dans la discussion.

CHAPITRE IV. DISCUSSION

Dans la première partie de ce travail, nous avons présenté une synthèse de l'état actuel des connaissances concernant l'embryogenèse somatique chez la Vigne. Nous avons alors constaté que l'un des obstacles majeurs, à l'application à grande échelle de cette technique, résidait dans la tératologie prononcée et dans le faible taux de conversion en plantule des embryons somatiques.

Cette simple constatation nous a conduit à souligner le manque de connaissances fondamentales concernant l'évolution histophysiologique des embryons somatiques au cours de leur développement. Nous nous sommes donc proposé de combler partiellement cette lacune en répondant à un certain nombre de questions, reformulées ci-dessous :

1°- quelle est l'origine des embryons somatiques, comment se forment-ils et quelles sont les modalités de la proembryogenèse et de l'embryogenèse proprement dite ?

2°- quelles sont les caractéristiques histologiques et histochimiques des embryons somatiques au cours de leur évolution ?

3°- quelles sont les réserves embryonnaires, quand et comment sont-elles utilisées ?

4°- comment évoluent les teneurs en ABA, en AIA et en polyamines au cours du développement des embryons somatiques ?

Les résultats que nous avons obtenus permettent d'apporter des éléments de réponse satisfaisants à ces questions.

Nous décrirons donc, dans un premier temps, les principales caractéristiques du développement des embryons somatiques. Nous confronterons ces données aux résultats acquis pour les embryons zygotiques et nous soulignerons les critères de la tératologie.

Dans une deuxième partie, nous tenterons de dégager des relations causales entre ces différents résultats et nous proposerons des hypothèses permettant d'appréhender et de définir les origines de la tératologie des embryons somatiques.

Dans une troisième partie enfin, nous discuterons de méthodes susceptibles d'améliorer le taux de conversion en plantules des embryons et nous proposerons de nouvelles voies de recherches.

IV.1. Le développement des embryons somatiques et les symptômes de la tératologie

IV.1.1. LES EMBRYONS SOMATIQUES ACQUIERENT PRECOCEMENT UNE POLARITE MARQUEE, MAIS ILS LA PERDENT AU COURS DE LEUR DEVELOPPEMENT

L'acquisition de la polarité

L'étude de l'origine et de l'évolution histologique des embryons somatiques de Vigne fait ressortir une étonnante similitude entre les étapes de la proembryogenèse et de l'embryogenèse dans les modèles somatiques et zygotiques.

Nous avons ainsi mis en évidence que les embryons somatiques trouvent leur origine au niveau de cellules superficielles, du cal ou de l'assise mécanique de l'anthère, dont l'état de différenciation assez prononcé (importante vacuolisation, faible rapport nucléo-cytoplasmique, richesse en amidon) n'est pas sans rappeler celui du zygote des Angiospermes (Vallade, 1976). Dans tous les cas, l'embryogenèse somatique de la Vigne est induite à partir d'une seule cellule appartenant aux tissus précités. Deux voies conduisent à des embryons somatiques, l'une directe, à partir de la future assise mécanique de l'anthère, l'autre indirecte, à partir des cellules superficielles du cal issu du connectif. Par contre, les amas méristématiques internes du cal, qui participent à son accroissement de volume, ne sont jamais producteurs de cellules embryonnaires.

Chez la Vigne nous n'avons jamais observé l'édification de masses proembryonnaires et l'induction de l'embryogenèse somatique se fait apparemment à partir de cellules uniques de type prédéterminé.

Dans d'autres systèmes, tels que les suspensions cellulaires de *Daucus carota* (Mc William *et al.*, 1974), les cals foliaires de *Nigella sativa* (Banerjee et Gupta, 1976), les

cotylédons de *Solanum aviculare* (Alizadeth et Mantell, 1991) ou les limbes de *Cichorium sp.* (Dubois *et al.*, 1991), les embryons somatiques sont aussi initiés à partir de cellules différenciées, vacuolisées et assez grandes, appartenant au parenchyme ou à l'épiderme, mais les deux voies, directe et indirecte, n'ont jusqu'ici jamais été signalées pour le même matériel.

Nous noterons de plus que la tendance à l'isolement qui, pour le zygote, se traduit par un épaississement de la paroi et une disparition des plasmodesmes (Thomas, 1975 ; Vallade, 1976), a aussi été rapportée dans plusieurs cas d'embryogenèse somatique. Ainsi, Norreel (1975) observe, dans des cals de Carotte, la formation d'embryons somatiques à partir de cellules à "parois épaissies". De même, Dubois *et al.* (1990) indiquent que, chez *Cichorium sp.*, les cellules à l'origine des embryons somatiques s'isolent des tissus environnants par la mise en place d'un dépôt pariétal de callose, dépôt qui pourrait être comparé aux substances tannifères ou polyphénoliques observées dans les zones embryogènes des cals de Vigne. Par ailleurs, il a clairement été montré (Wetherell, 1984) que la rupture des communications entre cellules, par un traitement plasmolysant, stimule l'embryogenèse somatique chez la Carotte.

Il semblerait donc que les cellules à l'origine des embryons somatiques partagent avec le zygote un caractère différencié et une tendance à l'isolement.

Au cours des étapes ultérieures de l'évolution des embryons somatiques de Vigne, l'analogie avec le développement zygotique se renforce. Nous avons en effet observé que, dès la première division, la polarité du jeune embryon somatique est acquise ; deux cellules d'aspect et de devenir différents sont reconnaissables : l'une, massive et en position basale, donnera essentiellement le suspenseur, l'autre, beaucoup plus petite et en position apicale, sera à l'origine des cellules embryonnaires proprement dites. Cette polarité précoce se confirme au cours des étapes de la segmentation et elle conduit à la formation d'un proembryon constitué d'un suspenseur épais, surmonté par un petit massif de cellules embryonnaires qui se dédifférencient progressivement.

La polarité de la première division et la dédifférenciation rapide des cellules embryonnaires, que nous avons observées au cours de la proembryogenèse somatique de la Vigne, sont aussi des phénomènes fondamentaux de la proembryogenèse zygotique (Jensen, 1963 ; Mestre et Guignard, 1973 ; Thomas, 1975). Paradoxalement, ces deux critères ont été assez peu étudiés dans le cas du développement somatique et ils sont rarement rappelés.

Pourtant, des études histo- et cytologiques déjà anciennes (Halperin, 1966, 1967), réalisées sur des embryons somatiques de Carotte, ont aussi clairement illustré l'asymétrie de la première division et la mise en place précoce d'un suspenseur. Plus récemment, chez la même espèce, Timmers *et al.* (1989) ont mis en évidence que la calmoduline, protéine de liaison du calcium, présente une distribution polarisée dans les cellules des masses proembryonnaires. Or, il est généralement admis (Bryant, 1985) que la polarité du zygote serait aussi établie par un gradient de charges électriques, dû à une distribution asymétrique du calcium intracellulaire. Enfin, plusieurs études histologiques réalisées sur diverses espèces (Gray et Mortensen, 1987 ; Cornu et Geoffrion, 1990 ; Fransz et Schel, 1991), sans décrire les tout premiers stades du développement des embryons somatiques, ont permis l'observation de structures, dont la position et l'organisation sont analogues à celles d'un suspenseur ; ces études confirment donc aussi la polarité embryonnaire, sans que les auteurs aient mis l'accent sur ce phénomène.

La dédifférenciation des cellules embryonnaires au cours de la proembryogenèse somatique est par contre moins bien documentée. Cependant, ce phénomène apparaît nettement sur les clichés présentés par Halperin (1966) et par Mc William *et al.* (1974), pour la Carotte et par Bhaskaran *et al.* (1988) pour le Sorgho. Ces auteurs soulignent d'ailleurs l'étroite analogie entre l'évolution des embryons zygotiques et somatiques.

Pour des raisons techniques, il est très difficile, sinon impossible, d'étudier et de suivre précisément les plans de segmentation et la filiation des cellules constitutives des proembryons somatiques. Pourtant, Mc William *et al.* (1974) indiquent que, chez la Carotte, les premières étapes de la segmentation peuvent être différentes dans les proembryogenèses zygotique et somatique. Néanmoins, chez la Vigne, les faits rapportés ci-dessus nous conduisent à penser que, au moins dans leurs grandes lignes, les modalités et les caractéristiques de la proembryogenèse somatique sont comparables à celles de la proembryogenèse zygotique.

A la phase de segmentation, caractéristique de la proembryogenèse zygotique, succède une phase d'organogenèse embryonnaire. Cette étape du développement (Buvat, 1989) est marquée par l'initiation des cotylédons qui confèrent au jeune embryon une symétrie bilatérale. Elle est aussi caractérisée par une différenciation des tissus embryonnaires et par la mise en place des deux méristèmes apicaux (Nougarède, 1967). Le développement polarisé de l'embryon zygotique se manifeste donc une nouvelle fois.

Ces caractéristiques de l'organogenèse embryonnaire se retrouvent aussi au cours de l'évolution des embryons somatiques de Vigne, du stade globulaire au stade torpille. Nous

avons en effet pu observer que, dès la fin du stade globulaire, les premiers signes de l'initiation cotylédonaire et de la mise en place des méristèmes apicaux se manifestent. Ainsi, au stade cordiforme, les embryons somatiques de Vigne présentent, en section longitudinale axiale, l'organisation typique de leurs homologues zygotiques (Vallade *et al.*, 1987). Il en est d'ailleurs de même pour les embryons somatiques de Carotte (Halperin, 1966 ; Norreel, 1975), de Sorgho (Bhaskaran *et al.*, 1988) et de Maïs (Fransz et Schel, 1991).

Cependant, dès l'initiation cotylédonaire, deux caractéristiques fondamentales opposent les jeunes embryons somatiques de Vigne aux embryons zygotiques. En premier lieu on observe que, pour les embryons somatiques, les cotylédons forment une couronne plus ou moins régulière autour de l'apex caulinaire ; à strictement parler, la symétrie bilatérale n'est donc pas établie. En second lieu, il apparaît que les cellules constitutives des embryons somatiques sont beaucoup plus différenciées (plus grande dimension, vacuolisation plus importante) que celles de leurs homologues zygotiques. Ces deux caractéristiques, qui ne sont d'ailleurs pas spécifiques aux embryons de Vigne, seront discutées dans les chapitres suivants.

A la suite de l'organogenèse embryonnaire, les embryons d'origine zygotique cessent de se diviser et ils subissent une période de quiescence (Bradbeer, 1988). Au contraire, dans les embryons somatiques de Vigne, à partir du stade torpille, nous avons observé que le méristème racinaire est fonctionnel ; il élabore une radicule qui s'allonge et se ramifie rapidement. Il n'y a donc pas de phase d'arrêt du développement racinaire. Le méristème caulinaire, par contre, n'exprime aucune capacité organogène. Ce comportement singulier, très souvent rapporté pour des espèces diverses (Ammirato, 1977 ; Chée et Cantliffe, 1988 ; Buchheim *et al.*, 1989 ; Cruz *et al.*, 1990), est une caractéristique assez générale du développement somatique.

Afin de caractériser ce blocage de la morphogenèse apicale, nous avons comparé, par microspectrophotométrie *in situ*, l'état du cycle cellulaire au niveau des cellules méristématiques caulinaires des embryons somatiques de Vigne au stade torpille et des embryons zygotiques dormants, au même stade de développement.

Nous avons montré que, dans les embryons somatiques et zygotiques de Vigne, le méristème caulinaire subit un blocage préférentiel du cycle cellulaire en phase de présynthèse (G_{0-1}) de l'ADN. Ce type de blocage, mis en évidence pour la première fois, renforce l'analogie de comportement des deux types d'embryons.

Cependant dans les embryons zygotiques, aucun noyau en phase G_2 n'est présent, mais un faible pourcentage de noyaux possède une quantité d'ADN intermédiaire entre les valeurs de référence 2C et 4C. Dans les embryons somatiques, au contraire, tous les noyaux du méristème caulinaire sont bloqués dans la même phase du cycle cellulaire, soit en G_{0-1} pour 80 % des embryons étudiés, soit en G_{0-2} pour les 20 % restants. Une explication doit donc être recherchée pour comprendre ces différences.

Dans les embryons zygotiques de Fève et de Blé en cours de dessiccation (Brunori, 1967 ; Brunori et d'Amato, 1967), le blocage préférentiel en G_{0-1} et l'arrêt du cycle à des teneurs intermédiaires de type 2C - 4C seraient dûs à des différences de sensibilité à la perte d'eau de la mitose et de la phase de synthèse de l'ADN. Les noyaux en phase S, lors de la dessiccation, se bloqueraient immédiatement alors que les noyaux en G_2 ou en mitose pourraient poursuivre leur cycle, ne s'arrêtant qu'ultérieurement en G_{0-1}. Ce type d'interprétation peut s'appliquer aux embryons zygotiques de Vigne. Si le modèle précédent est retenu, on peut aussi comprendre l'absence de blocage en S dans les embryons somatiques, lié à l'absence de dessiccation. Nous avons en effet montré que les embryons somatiques se développent à teneur en eau élevée et constante. Par contre, les arrêts en G_{0-1} et en G_{0-2} ne peuvent être attribués à la perte d'eau. Il serait pourtant naïf de penser que les blocages du cycle cellulaire, mis en évidence dans les embryons zygotiques et somatiques de Vigne, obéissent aux mêmes types de mécanismes régulateurs. Nous avons envisagé que, dans le modèle zygotique, la perte d'eau pourrait jouer un rôle important, alors qu'il est certain qu'elle n'intervient pas dans le modèle somatique. En fait, la régulation du cycle cellulaire est soumise à des mécanismes extrêmement complexes (North, 1991 ; Davidson, 1991) que les expérimentations réalisées dans le cadre de ce travail ne permettent pas d'appréhender. Nous pouvons simplement souligner que le cycle cellulaire est certainement contrôlé par les polyamines (Smith, 1985 ; Bagni, 1986) et par l'ABA (Naylor, 1984 ; Nougarède *et al.*, 1987 ; Davidson, 1991).

De fait, les déterminations des teneurs endogènes en polyamines et en ABA que nous avons réalisées montrent que, dans les embryons zygotiques au stade torpille, l'arrêt total du cycle cellulaire est accompagné par une faible teneur en polyamines et par une forte teneur en ABA. Par contre, dans les embryons somatiques au même stade du développement, le cycle cellulaire n'est bloqué qu'au niveau du méristème caulinaire et la prolifération intense des cellules hypocotylaires et cotylédonaires va de pair avec de fortes teneurs en polyamines et de faibles teneurs en ABA.

Dans cette première partie, nous avons mis l'accent sur les homologies entre les embryons somatiques et zygotiques de Vigne au cours de leur développement. Nous avons

ainsi souligné que, globalement, les deux types d'embryons évoluent de façon comparable jusqu'au stade torpille. Cependant des différences à la fois morphologiques, histologiques et biochimiques, que nous avons succinctement mentionnées précédemment, apparaissent rapidement et conduisent à une perte de la polarité des embryons somatiques. Ce sont ces aspects de la tératologie du développement que nous allons maintenant envisager.

La différenciation précoce et la perte de la polarité

Tout observateur regardant une culture embryogène de Vigne, remarque en premier lieu la présence de nombreuses formations de grande taille, ne présentant, sur le plan morphologique, que peu de points communs avec des embryons zygotiques. Ces structures fortement tératologiques, que nous avons appelées embryons "géants", représentent le stade ultime de l'évolution des embryons somatiques.

Sans autre forme d'analyse, la seule observation de ces embryons géants, dont l'axe hypocotylé dépasse parfois 1 cm de longueur, permet de définir deux caractéristiques principales de l'embryogenèse somatique : la différenciation rapide et l'absence de période d'arrêt de croissance au cours du développement embryonnaire.

Afin de caractériser plus précisément ce comportement tératologique, nous avons étudié l'évolution histologique des embryons somatiques, du stade globulaire au stade géant, et celle des embryons zygotiques en cours de germination. Nous avons également examiné leur évolution histochimique, en nous intéressant plus particulièrement à quelques marqueurs de la différenciation cellulaire : la lignification, la subérification et l'accumulation de composés de nature polyphénolique.

Les études histologiques nous ont permis d'observer que les cellules des embryons somatiques présentent, dès le stade cordiforme, une vacuolisation importante qui leur confère un aspect déjà plus différencié que celui des embryons zygotiques au stade torpille. Cette différenciation prononcée et précoce n'est pas spécifique de la Vigne ; un tel phénomène a été rapporté pour les embryons somatiques de Carotte (Halperin, 1966 ; Vermyllen-Guillaume, 1969 ; Norreel, 1975) et pour les embryons androgénétiques de Datura et de Tabac (Norreel, 1975).

Au cours des étapes ultérieures du développement, chez la Vigne, la différenciation cellulaire s'accentue et elle gagne finalement l'ensemble de l'embryon qui, au stade géant, n'est constitué que de grandes cellules fortement vacuolisées. Le méristème caulinaire

n'échappe pas à cette différenciation rapide et les cellules qui le composent perdent totalement leurs caractéristiques méristématiques. Par contre, le méristème racinaire n'est en général pas concerné par cette évolution et l'expression de son activité organogène lui permet de conserver une structure et une organisation normales.

Ces observations mettent fin à la controverse concernant la présence ou l'absence d'un méristème caulinaire ou racinaire dans les embryons somatiques de Vigne. En effet, nous avons clairement mis en évidence que les embryons relativement jeunes, c'est-à-dire jusqu'au stade T+, sont des axes bipolaires présentant un méristème caulinaire et un méristème racinaire dont l'organisation est comparable à celle de leurs homologues zygotiques. Ce n'est qu'au cours de l'évolution ultérieure des embryons que l'on observe, dans la très grande majorité des cas, une différenciation et une disparition totale des cellules méristématiques caulinaires et donc une perte de la polarité embryonnaire. Les études réalisées jusqu'à présent (Favre, 1977 ; Mullins et Srinivasan, 1976 ; Krul et Worley, 1977 ; Krul, 1985 ; Bessis et Labroche, 1985 ; Lebrun et Branchard, 1987) n'indiquent pas le stade de développement examiné et il n'est donc pas étonnant qu'elles aient fourni des résultats contradictoires, puisque la présence ou l'absence d'un méristème caulinaire dépend du stade de développement observé.

L'étude histochimique des marqueurs de la différenciation cellulaire, mentionnés précédemment, permet d'affiner ces résultats. Nous avons en effet noté que l'évolution tératologique des embryons somatiques de Vigne s'accompagne d'une lignification précoce des éléments conducteurs, d'une importante accumulation de tannins et d'une subérification des assises cellulaires superficielles. Or, toutes ces caractéristiques sont aussi observées au cours du développement des embryons zygotiques, mais seulement après la germination.

Il apparaît donc que des événements typiques de la germination ont aussi lieu pour les embryons somatiques, sans que la conversion en plantule se réalise. Un tel phénomène de différenciation précoce est souvent rapporté comme étant caractéristique du développement des embryons somatiques (Ammirato, 1987). Par ailleurs, un comportement tout à fait similaire, connu sous le nom de "germination précoce" (Finkelstein et Crouch, 1984 ; Welbaum *et al.*, 1990) est très souvent rapporté pour les embryons zygotiques immatures cultivés *in vitro*.

L'observation des premiers stades de l'embryogenèse a démontré l'origine somatique et unicellulaire des embryons de *V. vinifera* cv Grenache noir obtenus à partir de cultures d'anthères. Cette origine somatique et le caractère diploïde des embryons ont été confirmés par les analyses de ploïdie, réalisées par cytométrie en flux, sur des individus parvenus au stade torpille. Nous pouvons donc écarter d'emblée l'hypothèse formulée dans le chapitre I.3.2.1., où nous envisagions que le faible taux de conversion en plantule des embryons somatiques pourrait être dû à une embryogenèse déficiente, liée à la présence de nombreux individus haploïdes, polyploïdes ou aneuploïdes.

Au contraire, le développement embryonnaire, qu'il soit d'origine somatique ou zygotique, se déroule globalement de la même manière. La polarité embryonnaire, acquise dès la première division, se maintient au cours de la proembryogenèse et elle conduit à la formation d'embryons différenciant, précocement et simultanément, un méristème caulinaire et un méristème racinaire. L'hypothèse postulant que le faible taux de conversion en plantule serait dû à l'absence d'un des deux méristèmes apicaux, peut donc également être éliminée.

De plus il est clair que les embryons somatiques de Vigne ne présentent pas de dormance comparable à celle des embryons zygotiques, contrairement à l'hypothèse formulée, entre autres, par Rajasekaran et Mullins (1979).

En fait, les données histologiques et histochimiques que nous avons réunies nous permettent de penser que les embryons somatiques se comportent comme le feraient des embryons zygotiques immatures cultivés *in vitro*. Ils subissent une germination précoce qui se traduit par une tératologie prononcée, un blocage de la morphogenèse caulinaire et, seulement secondairement, une perte de la polarité embryonnaire.

IV.1.2. LES EMBRYONS SOMATIQUES SONT INCAPABLES D'UTILISER LEURS RESERVES CARBONEES

Au cours du développement des embryons somatiques de Vigne, nous avons pu mettre en évidence que la synthèse et l'accumulation des réserves débutent dès le stade globulaire. Nous avons ainsi montré, qu'à cette étape du développement, les embryons possèdent à la fois des réserves lipidiques et des réserves amylacées, toutes deux localisées principalement au niveau des cellules parenchymateuses corticales. Cependant, les réserves

amylacées sont transitoires et, si les grains d'amidon sont encore très nombreux au stade cordiforme, ils disparaissent totalement de l'axe hypocotylé au stade torpille. Par contre, la teneur en triglycérides augmente régulièrement et rapidement du stade globulaire au stade torpille. La diminution brutale des réserves amylacées marque donc certainement une étape importante du développement embryonnaire.

Une augmentation régulière et rapide de la quantité de lipides de réserve (Dutta *et al.*, 1991) est aussi observée au cours du développement des embryons zygotiques et somatiques de Carotte. De même, une diminution de la teneur en amidon (Rest et Vaughan, 1972 ; Rosenberg et Rinne, 1987 ; Leprince *et al.*, 1990 ; Luthra *et al.*, 1991) est couramment observée dans les embryons zygotiques parvenus au stade torpille. Les réserves amylacées, accumulées provisoirement durant les premières phases du développement embryonnaire, représentent une source de précurseurs pour la biosynthèse des lipides qui s'accumulent massivement en fin d'embryogenèse (Luthra *et al.*, 1991). L'amidon pourrait également être utilisé pour la formation de sucres libres, tels que le saccharose et le stachyose (Leprince *et al.*, 1990), qui joueraient un rôle protecteur envers la dessiccation. En envisageant cette dernière éventualité, nous pouvons imaginer que les embryons somatiques, qui ne subissent pas de phase de dessiccation, s'y prépareraient tout de même, comme le font les embryons zygotiques.

Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu suivre l'évolution des réserves carbonées au cours de la formation des embryons zygotiques de Vigne. Toutefois il semble très probable que les modifications décrites au cours du développement des embryons somatiques soient aussi caractéristiques des embryons zygotiques.

En effet, dans la graine à maturité, les réserves accumulées par les embryons zygotiques de *V. vinifera* cv Grenache noir sont presque exclusivement de nature lipidique ; les grains d'amidon sont très peu nombreux et les grains d'aleurone, bien que présents dans l'albumen, sont totalement absents de l'embryon. Ces caractéristiques sont tout à fait comparables à celles que nous avons observées pour les embryons somatiques au stade torpille, c'est-à-dire au même stade de développement. De plus, nous avons souligné, qu'au cours des étapes qui conduisent les embryons somatiques de Vigne jusqu'au stade torpille, l'évolution des réserves est similaire à celle décrite pour des embryons zygotiques appartenant à d'autres espèces. Par ailleurs, les études comparatives concernant l'évolution des réserves au cours de l'embryogenèse zygotique et somatique chez une même espèce (Avjioglu et Knox, 1989 ; Taylor D.C. *et al.*, 1990 ; Dutta *et al.*, 1991) soulignent, toutes, l'analogie de comportement entre les deux types d'embryons. Seules quelques petites différences dans la nature des acides gras accumulés (Dutta et

Appelqvist, 1991) ont pu être mises en évidence chez la Carotte, mais ces différences (Griffiths et Harwood, 1991) pourraient être uniquement dues à une maturation incomplète (absence de dessiccation) des embryons somatiques.

L'accumulation des réserves au cours du développement des embryons somatiques de Vigne paraît donc se réaliser normalement et nous pouvons affirmer que, par la qualité et par la quantité de leurs réserves, les embryons somatiques et zygotiques de Vigne sont tout à fait comparables lorsqu'ils atteignent le stade torpille.

Cependant, si l'accumulation de réserves appropriées représente une étape essentielle, leur utilisation correcte n'est pas moins importante. Paradoxalement, les mécanismes conduisant à l'utilisation des réserves au cours du développement des embryons somatiques n'ont, à notre connaissance, jamais été étudiés, au moins en ce qui concerne le métabolisme lipidique. L'étude de ce problème particulier nous a permis de mettre en évidence que les embryons somatiques sont incapables d'utiliser leurs réserves et qu'ils ne se comportent pas comme le font leurs homologues zygotiques en cours de germination.

Nous avons en effet observé que, dès les premiers jours qui suivent l'imbibition germinative, l'embryon zygotique est soumis à un flux important de molécules glucidiques en provenance de l'albumen. Au cours de cette première phase de la germination les embryons zygotiques sont donc extrêmement tributaires des substances nutritives apportées par les tissus avoisinants. Cet événement précoce se concrétise par une augmentation importante des réserves amylacées et lipidiques dans les embryons, dès la percée de la radicule. L'augmentation rapide des réserves embryonnaires, et notamment de la quantité d'amidon, au cours des premières phases de la germination (Doman *et al.*, 1982 ; Reibach et Benedict, 1982) est un phénomène bien connu. Ce mécanisme permettrait de réguler l'accumulation de substances osmotiquement actives au niveau de l'embryon (Chapman et Galleshi, 1985).

Simultanément à cette accumulation massive d'amidon et de triglycérides, l'embryon zygotique de Vigne, en cours de conversion en plantule, développe les activités enzymatiques nécessaires à leur utilisation. On observe alors l'apparition des activités malate synthase et isocitrate lyase, indicatrices du fonctionnement du cycle du glyoxylate et, en conséquence, d'une néoglucogenèse. Les réserves triglycéridiques et amylacées disparaissent rapidement de l'axe hypocotylé, mais elles continuent de s'accumuler massivement dans les cotylédons. A cette étape de la germination, nous avons montré que les cotylédons ont un double statut : ils constituent à la fois un réservoir pour les

précurseurs fournis par l'albumen et une source de métabolites carbonés pour la jeune plantule en croissance.

Deux programmes apparemment contradictoires semblent donc être simultanément activés lors de la germination des embryons zygotiques de Vigne : l'un conduit à la synthèse et à l'accumulation de réserves amylacées et lipidiques, l'autre conduit à la dégradation et à l'utilisation de ces mêmes réserves.

Par contre, pour les embryons somatiques de Vigne, ces phénomènes de synthèse et d'hydrolyse simultanées ne se produisent pas. Il est pourtant intéressant de noter que, dès le stade T+, les embryons somatiques présentent certaines analogies de comportement avec les embryons zygotiques en cours de germination. Nous avons en effet observé une forte augmentation de la quantité d'amidon et de lipides de réserves qui s'accumulent massivement au niveau de l'hypocotyle et des cotylédons. De plus, nous avons mesuré une activité malate synthase relativement importante, mais l'activité isocitrate lyase s'est révélée négligeable. Ces activités enzymatiques, insuffisantes et fugaces, ne permettent pas l'utilisation des réserves et, au stade géant, les embryons sont littéralement gorgés de triglycérides et d'amidon qu'ils sont incapables de métaboliser.

Cette dérégulation métabolique, qui n'avait pas encore été signalée dans la littérature, constitue vraisemblablement l'une des manifestations les plus marquantes du développement tératologique des embryons somatiques. Ces embryons sont, après le stade torpille, capables d'exprimer le programme de synthèse et d'accumulation de réserves ; ils sont par contre dans l'impossibilité d'activer le programme qui permet la dégradation et l'utilisation de ces réserves.

On peut s'étonner de trouver, dans les embryons somatiques de Vigne, une activité malate synthase élevée en absence d'activité isocitrate lyase. Cependant, on notera que la synthèse de la malate synthase est universelle au cours du développement des graines oléagineuses, en l'absence de l'activité isocitrate lyase (Miernyk *et al.*, 1979), activité qui n'apparaît qu'après l'imbibition germinative suivant la dessiccation (Kermode et Bewley, 1985) ou la levée de dormance (Li et Ross, 1990). Cette situation est donc similaire à celle observée dans les embryons somatiques de Vigne, qui sont incapables d'exprimer toutes les fonctions nécessaires à la germination.

De même, la persistance de l'amidon, dans les embryons somatiques de Vigne au stade géant, peut s'expliquer par l'absence de dessiccation. En effet, dans les embryons zygotiques de Soja (Adams et Rinne, 1980), l'activité amylasique nécessaire à la

dégradation des réserves amylacées ne s'exprime que dans les embryons ayant subi une phase de dessiccation.

IV.1.3. LES EMBRYONS SOMATIQUES SONT RICHES EN POLYAMINES

Les embryons somatiques de *V.vinifera* cv Grenache noir sont globalement caractérisés, par comparaison avec leurs homologues zygotiques, par une forte teneur en polyamines et notamment par un rapport Put / Spd élevé. Des études, réalisées sur la Carotte (Montague *et al.*, 1978 ; Feirer *et al.*, 1984 ; Mengoli *et al.*, 1989) mais aussi sur des espèces ligneuses (El Hadrami *et al.*, 1989 a et b), ont aussi montré que la formation des embryons somatiques est étroitement corrélée avec une forte teneur en polyamines.

Chez la Vigne, c'est principalement à partir du stade T+, et quel que soit le critère de référence adopté (par mg de matière sèche, par mg de protéine ou par embryon), que les teneurs en putrescine, spermidine et spermine augmentent remarquablement. Ce stade du développement correspond au début de la période de croissance anarchique et indéfinie, qui caractérise les embryons somatiques. Ce comportement anormal pourrait être comparé à celui des tumeurs végétales (Audisio *et al.* 1976 ; Bagni et Serafini-Fracassini, 1979), dans lesquelles les teneurs en polyamines, et particulièrement celles de la putrescine et de la spermidine, sont anormalement élevées. Il faut aussi souligner que la putrescine apparaît en réponse à de nombreux stress, tels que des déficiences en potassium (Klinger *et al.*, 1986) et en magnésium (Smith, 1984), ou des excès d'ion ammonium (Le Rudulier et Goas, 1975). Nous pouvons ainsi penser que, cultivés sur un milieu minéral inapproprié, les embryons somatiques pourraient se trouver en condition de stress et réagiraient par une accumulation de polyamines.

Nous avons également remarqué que, bien que toujours plus élevé que dans les embryons zygotiques, le rapport Put / Spd a tendance à diminuer du stade globulaire au stade géant. La diminution de ce rapport est due à un accroissement plus important de la quantité de spermidine que de putrescine, bien que la teneur en spermidine reste toujours inférieure à celle de la putrescine. Dans des cultures embryogènes de Carotte, la teneur en spermidine a aussi été signalée comme étant plus faible que celle de putrescine (Feirer *et al.*, 1984) ; mais, pour le même type de culture (Montague *et al.*, 1978), une quantité plus importante de spermidine que de putrescine a aussi été rapportée. Cependant, dans les deux cas, les différentes étapes de l'embryogenèse n'ont pas été séparées et le sens de variation des deux types de polyamines reste donc difficilement interprétable. De fait, dans des embryons somatiques de Carotte, séparés en fonction de leur stade de développement

(Mengoli *et al.*, 1989), la teneur en putrescine est plus élevée que celle de la spermidine au stade cordiforme, et ces valeurs sont inversées au stade torpille.

Contrairement aux embryons somatiques, les embryons zygotiques de Vigne présentent une faible teneur en polyamines et ils possèdent un rapport Put / Spd environ égal à 1. Ces deux paramètres ne sont d'ailleurs pas modifiés après la germination. Les quantités de putrescine, de spermidine et de spermine sont respectivement 22 fois, 2,5 fois et 1,5 fois plus faibles dans les embryons zygotiques après stratification que dans les embryons somatiques au stade torpille.

Nous pouvons donc mettre en relation le comportement tératologique des embryons somatiques de Vigne et leur teneur anormalement élevée en polyamines. En fait, il a été montré que des traitements qui diminuent la teneur en polyamines, tel que l'utilisation d'inhibiteurs de l'ornithine décarboxylase (Mengoli *et al.*, 1989), ou des traitements qui modifient le rapport Put / Spd, tel que l'addition de spermidine (Altman *et al.*, 1990), augmentent le taux de conversion en plantule des embryons somatiques.

Il reste toutefois à déterminer si la teneur élevée en polyamines est directement responsable du faible taux de conversion en plantule des embryons somatiques, ou au contraire si elle ne représente qu'une réaction secondaire.

IV.1.4. LES EMBRYONS SOMATIQUES SONT PAUVRES EN ABA ET EN AIA ENDOGENES

La grande quantité d'embryons, somatiques ou zygotiques, indispensable pour effectuer des dosages d'hormones endogènes, a sûrement constitué le facteur limitant dans ce type d'étude, ce qui explique la relative rareté des données disponibles.

Au cours du développement des embryons somatiques de *V. vinifera* cv Grenache noir, les teneurs en ABA et en AIA libres (par mg de matière fraîche) diminuent rapidement jusqu'au stade torpille puis elles se stabilisent à un faible niveau de base. Inversement, les quantités totales de ces deux hormones, par embryon, augmentent au cours du développement embryonnaire, ce qui indique que les embryons conservent la capacité de synthétiser ces deux régulateurs de croissance.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Rajasekaran *et al.* (1982) sur l'hybride Gloryvine (*V. vinifera* X *V. rupestris*). Ils diffèrent sensiblement de ceux

rapportés par Kamada et Harada (1981) pour la Carotte, qui observent un pic de teneur en ABA vers le milieu de la période du développement des embryons somatiques. Cependant, dans ce dernier cas, les mesures ont été réalisées sur des cultures mal synchronisées, présentant un mélange d'amas cellulaires et d'embryons somatiques aux différents stades de leur dévelopement ; les résultats sont donc difficilement exploitables.

Chez la Vigne, les teneurs en substances de croissance ne sont pourtant maximales qu'aux stades globulaire et cordiforme et, dès les stades ultérieurs, les embryons somatiques sont caractérisés, en comparaison avec leurs homologues zygotiques, par leurs faibles teneurs en hormones endogènes. En effet, aux stades torpille, T+ et géant, les teneurs en ABA et en AIA sont toujours beaucoup plus faibles que celles mesurées dans les embryons zygotiques dormants, après stratification ou ayant germé. Tout comme les embryons androgénétiques de Chou (Taylor D.C. *et al.*, 1990) et les embryons somatiques de Céleri (Al-Abta et Collin, 1979), il est donc probable que les embryons somatiques de Vigne soient incapables d'accumuler des régulateurs de croissance dans des quantités suffisantes pour être physiologiquement actives.

Pour les embryons zygotiques, il semble bien établi (Thomas, 1975 ; Buvat, 1989 ; Hole *et al.*, 1989 ; Piaggesi *et al.*, 1991) que les régulateurs de croissance endogènes peuvent être synthétisés au niveau du suspenseur, de l'embryon lui-même et des tissus extra-embryonnaires (téguments de l'ovule, restes du nucelle, albumen). La part respective de ces différentes sources potentielles varie en fonction de l'étape du développement et de l'espèce considérée.

Nous pouvons penser que, dans les jeunes embryons somatiques, le suspenseur possède une activité biosynthétique élevée et qu'il est une source active d'ABA et d'AIA, à l'origine des importantes teneurs hormonales enregistrées dans les embryons globulaires. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant les techniques d'immunocytochimie (Heilmann *et al.*, 1980 ; Hartung *et al.*, 1981 ; Knox, 1982 ; Sossountzov *et al.*, 1988), malgré les nombreuses restrictions auxquelles elles sont soumises. De même, la chute brutale des teneurs hormonales, à partir du stade torpille, pourrait être interprétée en tenant compte de la dégénérescence fonctionnelle du suspenseur et de l'absence d'albumen ou de tissus ovulaires, qui représentent souvent une source importante d'ABA (Hole *et al.*, 1989) en fin d'embryogenèse.

L'ABA est indispensable à une morphogenèse normale (Ackerson, 1984 ; Williams et Tsang, 1991) au cours des toutes premières phases de l'embryogenèse. Le

développement des embryons somatiques jeunes de Vigne, riches en régulateurs de croissance, peut donc être considéré comme un signe de leur autonomie hormonale.

Par contre, nous avons signalé dans le premier chapitre de ce travail, que l'ABA intervient aussi dans l'inhibition de la germination précoce des embryons zygotiques. Il est alors tentant de faire la relation entre le développement tératologique des embryons somatiques et leur relative pauvreté en ABA et en AIA en fin d'embryogenèse. D'ailleurs, une adjonction d'AIA exogène au milieu de culture des embryons somatiques de Vigne (Bouquet, comm. pers.) diminuerait leur aspect tératologique.

IV.2. Les causes de la tératologie

Les données que nous avons accumulées permettent de présenter un schéma précis et cohérent de l'évolution histophysiologique des embryons somatiques et zygotiques de Vigne au cours de leur développement (tab. XV) en soulignant similitudes et différences.

Nous avons ainsi montré que, jusqu'au stade torpille, l'évolution des embryons somatiques est comparable, sinon similaire, à celle des embryons zygotiques. Ces deux types d'embryons passent par les mêmes stades (proembryon ; stades globulaire, cordiforme et torpille), ils acquièrent précocement une polarité et ils accumulent les mêmes types de réserves. Il semble donc bien établi que les grandes fonctions, nécessaires au développement des embryons zygotiques, s'expriment aussi au cours de l'évolution des embryons somatiques. Les données de Crouch (1982), réalisées sur le Chou, sont en accord avec ces observations.

Cependant, à la différence de leurs homologues zygotiques, les embryons somatiques expriment, de façon précoce, un certain nombre de fonctions caractéristiques de la germination : ils subissent une différenciation cellulaire prononcée (lignification, subérification, accumulation de tannins), ils accumulent des réserves, ils possèdent une activité malate synthase et leur radicule se développe.

Toutefois, d'autres fonctions, non moins nécessaires à la germination, ne sont pas représentées : les réserves ne sont pas utilisées (pas d'activité isocitrate lyase ni de dégradation de l'amidon) et le méristème caulinaire ne montre aucune capacité organogène. Cette "germination incomplète" des embryons somatiques conduit finalement à la formation de structures géantes et tératologiques, incapables d'évoluer en jeunes plantules.

Tableau XV : Similitudes et différences enregistrées au cours des embryogenèses zygotique et somatique et des premières étapes de la germination chez *Vitis vinifera* L. cv Grenache noir

Similitudes	Différences
Embryogenèse jusqu'au stade torpille	
. Polarité précoce	. Origine : union de 2 gamètes haploïdes une cellule somatique diploïde
. Présence d'un suspenseur	
. Similarité des étapes morphologiques du développement - proembryon - embryon globulaire cordiforme torpille	. Gigantisme des embryons somatiques à toutes les phases du développement et - accumulation de tannins - subérification superficielle précoce - présence de polyphénols pariétaux - absence de symétrie bilatérale - tératoloie cotylédonaire - prolifération anarchique des cellules protodermiques
. Mise en place précoce et simultanée des méristèmes apicaux	
. Accumulation des mêmes types de réserves : amidon et lipides	
. Hydrolyse de l'amidon au stade torpille	
. Blocage du cycle cellulaire au niveau du méristème caulinaire au stade torpille	. Absence d'arrêt du développement des embryons somatiques au stade torpille et . Conservation d'une forte teneur en eau (pas de dessiccation) . Fortes teneurs en polyamines ; rapport Put/Spd élevé . Faibles teneurs en AIA et en ABA
Premières étapes de la germination	
. Développement de l'appareil racinaire	. Différenciation et disparition des cellules du méristème caulinaire des embryons somatiques et . Absence d'hydrolyse de l'amidon et des lipides . Absence d'activité isocitrate lyase . Exacerbation de la subérification des cellules superficielles et du dépôt de substances polyphénoliques pariétales . Poursuite de la prolifération des cellules protodermiques . Faible taux de conversion en plantule
. Accumulation nouvelle d'amidon et de lipides cotylédonaires	
. Présence d'une activité malate synthase se manifestant uniquement au stade T+ pour les embryons somatiques	
. Lignification des éléments conducteurs	
. Mise en place d'un revêtement subérifié externe	
. Accumulation de tannins	
. Teneurs en eau élevées	

Nous avons plusieurs fois comparé ce comportement avec la germination précoce décrite pour les embryons zygotiques immatures. Ces deux phénomènes semblent en effet tout à fait similaires et nous avons mentionné qu'ils pourraient être liés, en première analyse, à l'absence de phase de dessiccation et (ou) à une teneur insuffisante en ABA en fin d'embryogenèse. Par analogie avec le développement zygotique, il apparaît en tout cas clairement que l'évolution tératologique des embryons somatiques est due, au moins en grande partie, à leur immaturité.

A ce niveau de la discussion il est donc nécessaire de rappeler ce que représente la phase de maturation embryonnaire et d'insister sur son importance ainsi que sur les mécanismes qui la contrôlent.

IV.2.1. L'IMPORTANCE DE LA PHASE DE MATURATION

La phase de maturation représente l'étape finale du développement au cours de laquelle l'embryon acquiert une maturité physiologique qui lui permettra de se développer en plantule normale (Rosenberg et Rinne, 1986).

Les études récentes de l'équipe de Galau (Galau *et al.*, 1986, 1987, 1991 ; Hughes et Galau, 1989, 1991), réalisées en grande partie sur le Coton, indiquent que cette étape tardive de l'embryogenèse zygotique peut être divisée en cinq phases successives. En raison de l'intérêt de ce modèle, nous présenterons chacune de ces cinq phases et c'est à la lumière de ces conceptions nouvelles que nous discuterons des événements tardifs de l'embryogenèse somatique de la Vigne.

- la première phase est qualifiée de phase de ***maturation*** proprement dite, elle commence dès la fin de l'activité mitotique de l'embryon. Au cours de cette étape une accumulation active de réserves (Goldberg *et al.*, 1989) est enregistrée. L'embryon atteint sa taille maximale, ses poids de matière fraîche et sèche sont aussi les plus importants et son potentiel hydrique diminue (Galau *et al.*, 1991).

- la seconde phase est qualifiée de période de ***post-abscission***. Elle est initiée par la rupture des communications entre l'ovule et la plante mère. Cette étape du développement est caractérisée par une transcription active de gènes de type Lea (Late Embryogenesis Abundant) (Galau *et al.*, 1986, 1987, 1991), probablement impliqués dans la résistance à la dessiccation (Harada *et al.*, 1989 ; Skriver et Mundy, 1990).

- la troisième phase correspond à une courte période de ***prédessiccation***. L'activité transcriptionnelle chute brutalement.

- la quatrième phase est initiée par la ***dessiccation*** qui affecte la graine. La teneur en eau diminue rapidement et l'embryon atteint son poids de matière fraîche minimal.

- la dernière phase correspond à l'état quiescent de l'***embryon à maturité***, à l'intérieur de la graine sèche.

Au niveau moléculaire, Galau *et al.* (1991) ont pu identifier plusieurs classes d'ARN messagers, caractéristiques d'étapes clefs de la fin de l'embryogenèse zygotique. Ils définissent ainsi le programme de maturation (MAT), le programme de post-abscission (PA) et le programme de germination (GRM) (fig. 46). Selon ces auteurs (fig. 46 a), lorsque l'ovule est relié à la plante mère, un facteur régulateur d'origine maternelle (FM) active l'expression du programme de maturation et inhibe celle du programme de post-abscission. L'abscission de l'ovule (fig. 46 b) provoque une perte du facteur maternel de maturation et elle s'accompagne donc d'une inhibition du programme MAT et d'une activation du programme PA. Ce deuxième programme serait régulé par une concentration critique de l'une de ses protéines. Lorsqu'il est terminé et que les gènes Lea ont été transcripts, trois événements se succèdent : - la prédessiccation, au cours de laquelle la capacité de germer est acquise mais non exprimée, - la dessiccation et enfin - l'imbibition qui active sélectivement les gènes impliqués dans le programme de germination.

Par contre, les embryons zygotiques excisés de la graine et cultivés *in vitro* au cours de l'étape de maturation perdent aussitôt leurs ARN messagers de type MAT et expriment simultanément les programmes PA et GRM. Cette dérégulation au niveau moléculaire se traduit par une évolution tératologique et un très faible taux de conversion en plantule (Hughes et Galau, 1991) ; elle correspond tout à fait à un phénomène de germination précoce (Adams et Rinne, 1980 ; Finkelstein et Crouch, 1984 ; Rosenberg et Rinne, 1986). C'est donc l'expression continue et simultanée des programmes PA et GRM qui serait inhibitrice de la conversion en plantule des embryons zygotiques immatures.

Ce modèle interprétatif peut tout à fait être appliqué aux embryons somatiques de Vigne. En effet, ces embryons peuvent être considérés comme étant continuellement en condition de post-abscission et ils présentent une teneur en eau importante et constante. Ainsi, en absence du facteur maternel de maturation, les embryons somatiques seraient dans l'impossibilité d'exprimer le programme de maturation, mais ils activeraient au contraire le programme de post-abscission. De plus, le programme de germination serait

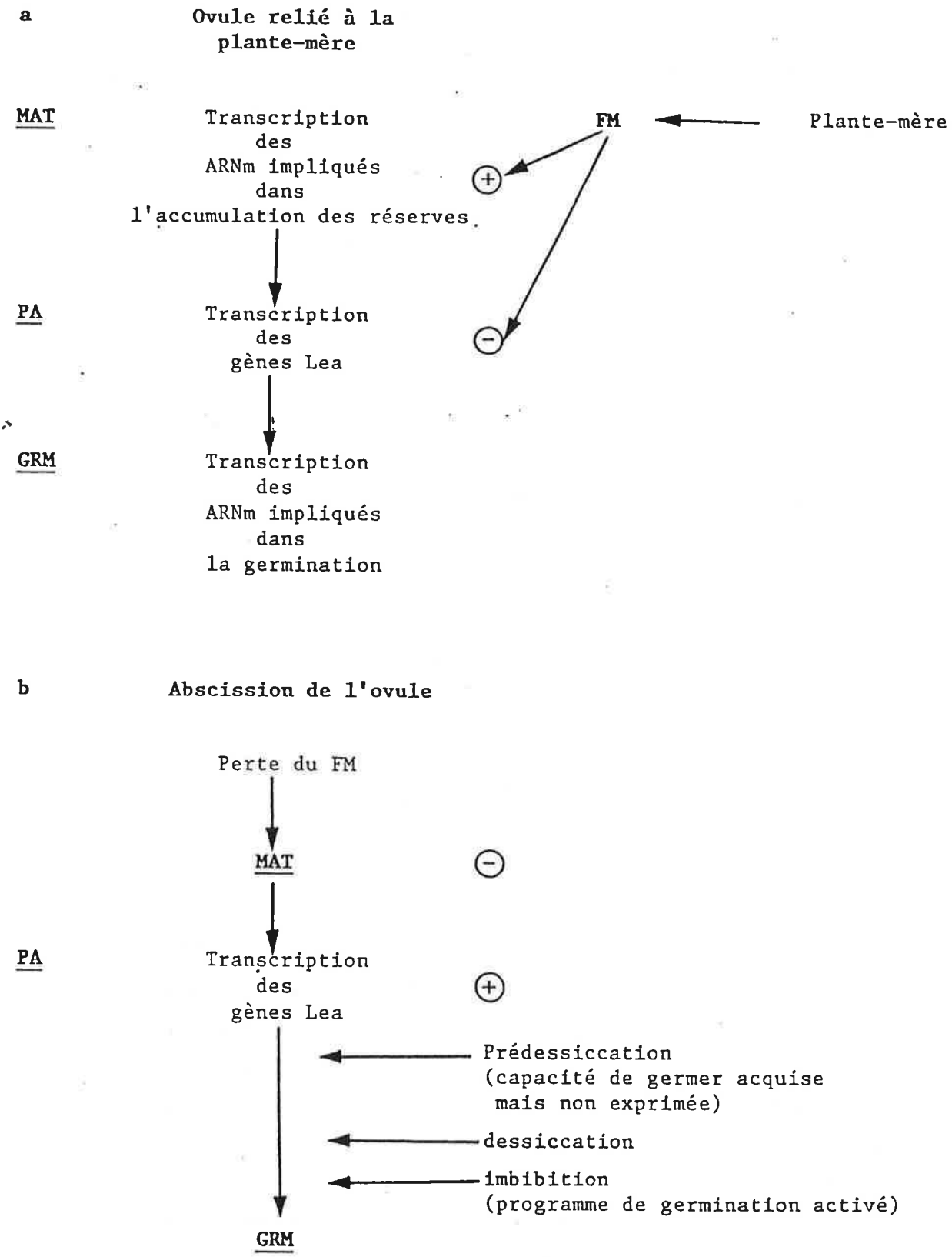


Figure 46. Etapes clefs de la fin de l'embryogenèse zygotique et schématisation des trois programmes successifs MAT (maturation), PA (post-abscission) et GRM (germination) conduisant à la germination. a : ovule relié à la plante-mère et intervention du facteur maternel FM ; b : abscission de l'ovule, expression du programme PA et intervention des étapes de prédessiccation, dessiccation et imbibition conduisant au programme de germination, GRM. Schémas originaux établis d'après les résultats de Galau *et al*, 1991.

aussi induit par leur forte teneur en eau, d'ailleurs identique à celle des embryons zygotiques en cours de germination. Ce comportement se traduit, comme nous l'avons vu, par une germination précoce et une évolution tératologique.

Les mécanismes impliqués dans le contrôle des événements tardifs de l'embryogenèse sont encore mal connus. Selon Xu *et al.* (1990), l'inhibition de la germination précoce au cours du développement des embryons zygotiques *in ovulo*, résulterait d'une conjonction d'effets physiques, nutritionnels, hormonaux et osmotiques. Les parts respectives de ces différents facteurs sont cependant inconnues et elles sont sujettes à controverse.

Il est largement reconnu que la germination précoce d'embryons zygotiques immatures, cultivés *in vitro*, peut être inhibée par une addition d'ABA (Ackerson, 1984 ; Galau *et al.*, 1991 ; Kim et Janick, 1991 ; Xu *et al.*, 1990). Ce traitement diminue aussi parfois la tératologie des embryons somatiques (Fujii *et al.*, 1990) et il peut améliorer leur taux de conversion en plantule (Ammirato, 1977 ; Kamada et Harada, 1981 ; Dunstan *et al.*, 1988). Par ailleurs, on connaît des mutants vivipares de Maïs (Hole *et al.*, 1989 ; Robichaud et Sussex, 1986), insensibles à l'ABA, dont les embryons germent précocement à l'intérieur de la graine. Ces observations permettent de penser que l'ABA pourrait être un inhibiteur de la germination précoce et il est souvent considéré comme tel (Finkelstein *et al.*, 1985 ; Williams et Tsang, 1991 ; Xu et Bewley, 1991), même si son mode d'action n'a été jusqu'ici étudié que sur quelques modèles. Ainsi, dans des protoplastes de Riz transformés par un gène de Blé (Marcotte *et al.*, 1988), c'est en agissant directement au niveau du promoteur que l'ABA stimulerait la transcription de ce gène.

Quel que soit son mode d'action, il est aujourd'hui bien établi (Barratt et Clark, 1991 ; Goldberg *et al.*, 1989 ; Skriver et Mundy, 1990 ; Galau *et al.*, 1991 ; Williams et Tsang, 1991) que l'ABA régule l'accumulation d'ARN messagers et de protéines en fin d'embryogenèse zygotique chez le Pois, le Soja, le Maïs et le Coton. Certains des gènes stimulés par l'ABA codent pour des protéines de réserve (Crouch et Sussex, 1981 ; Finkelstein *et al.*, 1985), d'autres appartiennent à une classe particulière de gènes de type Lea (Hughes et Galau, 1991 ; Skriver et Mundy, 1990 ; Williams et Tsang, 1991), mais dans la majorité des cas les gènes régulés par l'ABA en fin d'embryogenèse codent pour des protéines dont la nature et la fonction sont encore inconnues.

Les études de Galau *et al.* (1991), réalisées sur des embryons zygotiques immatures cultivés *in vitro*, indiquent que l'ABA ne stimule pas la transcription des ARN messagers associés au programme de maturation, mais qu'il augmente l'expression du programme de

post-abscission, déjà induit par l'excision, et qu'il inhibe l'expression du programme de germination. Ainsi les embryons immatures traités par de l'ABA perdent les symptômes morpho-histologiques de la germination précoce mais, dans l'impossibilité de terminer leur programme de post-abscission et d'initier leur programme de germination, ils restent incapables de se développer en plantules.

Pourtant, Hughes et Galau (1991) insistent sur le fait que l'ABA n'est certainement pas un régulateur direct des programmes de maturation ou de post-abscission à la fin de l'embryogenèse. Ils indiquent en effet que l'ABA est peut être nécessaire pour l'initiation du programme MAT et pour celle des programmes suivants, mais qu'il ne serait pas nécessaire à leur maintien. C'est donc avant l'étape de maturation que l'ABA interviendrait.

Parallèlement aux effets de l'ABA, l'influence de la pression osmotique sur le développement embryonnaire a souvent été étudiée (Welbaum *et al.*, 1990 ; Wilen *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1990 ; Xu et Bewley, 1991). En effet, tout comme l'ABA, une augmentation de la pression osmotique du milieu de culture inhibe la germination précoce des embryons zygotiques immatures (Finkelstein et Crouch, 1986 ; Xu *et al.*, 1990 ; Hughes et Galau, 1991) et favorise un développement harmonieux des embryons somatiques (Anandarajah et Mc Kersie, 1990 ; Guedira *et al.*, 1990). De même, au niveau moléculaire (Galau *et al.*, 1991), les effets de l'ABA et d'un haut potentiel osmotique semblent identiques ; les embryons activent leur programme PA et inhibent leur programme GRM. Ce comportement, peut-être essentiel au cours du développement embryonnaire *in situ*, n'est en tout cas pas suffisant pour acquérir la capacité de germer.

En fait il semblerait que, *in vitro*, le traitement le plus efficace, pour promouvoir un développement embryonnaire harmonieux et pour obtenir un taux de "germination" élevé, soit une dessiccation. Ce traitement inhibe la germination précoce et favorise la conversion en plantule des embryons zygotiques immatures (Dasgupta et Bewley, 1982 ; Rosenberg et Rinne, 1986 ; Galau *et al.*, 1991), mais aussi celle des embryons somatiques (Gray, 1989 ; Senaratna *et al.*, 1989 ; Wetzstein *et al.*, 1989). Il a de plus été montré (Galau *et al.*, 1991 ; Hughes et Galau, 1991) que la dessiccation d'embryons zygotiques immatures s'accompagne d'abord transitoirement d'une transcription des gènes de type Lea (programme PA) et d'une inhibition du programme de germination. Dans un second temps, elle conduit à un blocage de l'activité transcriptionnelle et elle inhibe finalement tous les programmes de développement. Après réimbibition, les embryons se comportent alors comme des embryons zygotiques parvenus à maturité ; ils activent leur programme de germination et ils évoluent normalement en plantule.

Pourtant, il faut souligner que la dessiccation n'est pas, *in situ*, nécessaire à l'inhibition de la germination précoce ou à l'acquisition de la capacité de germer (Finkelstein et Crouch, 1984). Des embryons zygotiques, excisés au stade de prédessiccation, qui n'ont donc pas encore traversé la phase de dessiccation, se développent normalement en plantules lorsqu'ils sont cultivés *in vitro* (Hughes et Galau, 1991) ; ils se comportent donc comme des embryons à maturité après l'imbibition germinative. Par ailleurs, dans les fruits frais et les baies (Welbaum *et al.*, 1990), telles que les grains de raisin, les embryons se développent à teneur en eau élevée sans germination précoce ; la dessiccation peut intervenir ultérieurement, mais elle n'est pas nécessaire pour une germination normale.

A la lumière des données précédentes, nous pouvons donc interpréter le comportement des embryons somatiques de Vigne parvenus en fin de développement. Comme en témoignent les examens histologiques et les études biochimiques sur les activités enzymatiques, les symptômes de la germination précoce sont de toute évidence liés à l'expression, au moins partielle, du programme GRM. En l'absence du facteur maternel de maturation, nous pouvons penser que le programme MAT n'est pas induit et que le programme PA n'est pas inhibé. L'expression simultanée et continue de ces deux programmes (PA et GRM), empêche l'embryon d'évoluer normalement en plantule, l'expression des divers programmes devant obligatoirement intervenir de façon séquentielle.

IV.2.2. LA CULTURE *IN VITRO* : SOURCE DE TERATOLOGIE

Dans le précédent chapitre nous avons insisté sur les mécanismes qui contrôlent les dernières phases de l'évolution des embryons somatiques et zygotiques. Pourtant, il ne faut pas croire que le modèle que nous avons présenté peut, à lui seul, rendre compte de la tératologie des embryons somatiques de Vigne. Pour expliquer l'évolution anormale des embryons somatiques, il est également nécessaire d'appréhender les facteurs physico-chimiques qui gouvernent le développement embryonnaire dans son ensemble, c'est-à-dire des toutes premières étapes de la segmentation jusqu'aux stades tardifs de l'embryogenèse.

C'est par le biais de la culture *in vitro* d'embryons zygotiques isolés, qu'un certain nombre de paramètres influençant le développement embryonnaire ont pu être reconnus. Parmi ceux-ci, la composition minérale et organique du milieu de culture semble très importante (Monnier, 1988 a et b) et sa qualité influence fortement la morphogenèse des

embryons. C'est cette seconde cause de la tératologie que nous allons maintenant envisager.

Il est généralement admis (Wardlaw, 1968 ; Steeves et Sussex, 1989) que la culture *in vitro* d'embryons zygotiques excisés de l'ovule est d'autant plus difficile à réaliser que les embryons sont jeunes. Ainsi, la survie et l'évolution *in vitro* de zygotes isolés n'ont jamais pu être obtenues et il est très difficile de cultiver des proembryons possédant moins d'une trentaine de cellules (Monnier, 1988 a). Les embryons somatiques de Vigne obtenus *in vitro* sont donc certainement fortement tributaires de substances, nutritives ou hormonales, fournies par le cal au sein duquel ils se développent.

De même, les embryons zygotiques prélevés au stade globulaire ont un taux de survie assez faible et ils évoluent très souvent de façon tératologique (Wardlaw, 1968) : ils présentent un retard de l'initiation cotylédonaire et ils deviennent donc plus volumineux *in vitro* qu'*in situ*, leurs cotylédons sont souvent multiples ou en forme d'entonnoir et une croissance de la radicule sans organogenèse caulinaire est très souvent observée. Ces aspects morphologiques de la tératologie sont donc manifestement tout à fait comparables à ceux que nous avons décrits pour les embryons somatiques de Vigne.

Nous pouvons donc affirmer que la culture *in vitro* des embryons zygotiques et somatiques est, en elle-même, une source de tératologie.

Pour limiter l'évolution tératologique des embryons zygotiques cultivés *in vitro*, de nombreux procédés ont été proposés. Nous pouvons en particulier indiquer qu'une addition d'AIA et de kinétine au milieu de culture (Raghavan et Torrey, 1964) améliore la survie et diminue nettement la tératologie et la germination précoce des embryons zygotiques prélevés au stade globulaire. Toutefois, le mode d'action de ces hormones est inconnu et leurs effets peuvent être mimés par une addition de saccharose en forte concentration (Raghavan et Torrey, 1964) ou par une addition de mannitol ou d'hydrolysat de caséine (Wardlaw, 1968 ; Steeves et Sussex, 1989). Selon Steeves et Sussex (1989), le rôle bénéfique de l'hydrolysat de caséine serait lié à une augmentation de l'osmolarité du milieu de culture et à une amélioration de sa qualité nutritive. Nous noterons que l'hydrolysat de caséine améliore aussi souvent la quantité et la qualité des embryons somatiques de Vigne (Lebrun, 1987 ; Bouquet *et al.*, 1987).

En fait, il semble bien établi (Monnier, 1988 a et b) que les exigences nutritionnelles et osmotiques des embryons zygotiques cultivés *in vitro* varient en fonction de leur stade de développement. Ainsi, l'exigence de fortes concentrations en saccharose diminue du

stade globulaire au stade torpille. De même, une forte concentration en fer diminue la survie des embryons zygotiques au stade globulaire mais améliore leur évolution à partir du stade cordiforme ; le calcium, par contre, augmente la survie et diminue la tératologie des embryons zygotiques quel que soit leur stade de développement.

La culture *in vitro* des embryons zygotiques excisés à des stades précoces permet donc d'étudier et de définir quelques facteurs influençant la morphogenèse embryonnaire. Ces facteurs sont probablement sensiblement différents selon les espèces considérées, mais ils sont par contre certainement identiques pour les embryons zygotiques et somatiques d'une même espèce. Paradoxalement, les protocoles mis au point pour la culture d'embryons zygotiques n'ont, à notre connaissance, jamais été testés pour les embryons somatiques. Pourtant, comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe IV.1.3., il est possible que les fortes teneurs en polyamines, que nous avons observées dans les embryons somatiques de Vigne, soient le reflet de conditions de culture inappropriées et qu'elles provoquent, en retour, une croissance anarchique et une forte tératologie des embryons somatiques.

IV.3. Les remèdes

Le travail que nous avons réalisé permet d'affirmer que le développement tératologique des embryons somatiques de Vigne est dû à un phénomène de germination précoce.

Dans le cadre restreint de cette thèse nous n'avons pas pu tester des techniques capables d'augmenter le taux de conversion en plantule des embryons somatiques. Cependant, nous pouvons proposer un protocole général qui pourrait servir de base pour des études plus systématiques.

Il faut tout d'abord souligner qu'il est important d'intervenir avant le stade T+. C'est en effet à partir de cette étape du développement que les symptômes de la germination précoce apparaissent et que les cellules de la gemmule commencent à perdre leurs caractéristiques méristématiques.

Il sera, dans un premier temps, nécessaire de tester l'influence d'une addition d'ABA au milieu de culture des embryons somatiques parvenus en tout début de stade torpille. En effet, comme nous l'avons déjà noté, dans les embryons somatiques de Vigne, la teneur en ABA endogène diminue progressivement du stade globulaire au stade géant. Au contraire,

au cours du développement zygotique, la teneur en ABA passe par une valeur maximale, juste avant la phase de maturation et cette forte teneur en ABA paraît indispensable pour stimuler l'expression de certains gènes, au cours des dernières phases de l'embryogenèse zygotique (Quatrano, 1988 ; Zeevaart, 1988). Un traitement par de l'ABA exogène, appliqué à des embryons somatiques parvenus en début de stade torpille, devrait donc améliorer leur maturation et inhiber leur germination précoce. La concentration en ABA à utiliser et la durée du traitement restent à déterminer.

A la suite de ce traitement par de l'ABA exogène, une dessiccation, qui serait donc réalisée en fin de stade torpille, permettrait sans doute d'augmenter le taux de conversion en plantule des embryons somatiques, après une réimbibition.

Une attention particulière devra aussi être portée au choix du milieu de culture proprement dit. Il pourrait être profitable de réaliser l'étape d'expression sur un milieu riche en saccharose, dont le potentiel osmotique diminuerait progressivement. Par ailleurs, pour l'étape de germination suivant la dessiccation, des essais préliminaires, que nous avons réalisés sur des embryons zygotiques excisés à maturité de la graine, nous conduisent à proposer le milieu de Galzy (1969 a), milieu qui est peu minéralisé et qui est riche en calcium et en potassium. D'autre part, ce milieu de germination doit mimer les conditions rencontrées par l'embryon zygotique en cours d'imbibition germinative, qui reçoit des sucres solubles à partir de l'albumen. Une addition de saccharose ou de glucose sera donc nécessaire.

Par contre, l'augmentation du taux de conversion en plantule des embryons somatiques de Vigne, parfois rapportée après traitement par la BAP (Krul, 1985 ; Lebrun, 1987), nous paraît devoir être discutée. En effet, les embryons utilisés lors du traitement par cette hormone sont relativement âgés et il est fort probable qu'ils soient, à ce stade, dépourvus de méristème caulinaire. La BAP, généralement utilisée pour induire la néoformation de bourgeons (Margara, 1982), exercerait vraisemblablement son action sur des cellules caulinaires ayant perdu leurs caractéristiques méristématiques mais retrouvant secondairement, sous l'action de l'hormone, de nouvelles potentialités organogènes. Dans ces conditions, il s'agirait d'une régénération par caulogenèse plutôt que d'une amélioration de la capacité germinative des embryons somatiques.

La séquence de traitements que nous proposons comme base de travail (ABA - dessiccation - réimbibition) n'est pas des plus simples, mais il ne faut pas oublier que le développement embryonnaire est un phénomène complexe régi par des facteurs multiples. Nous pensons que les exigences des embryons somatiques sont similaires à celles de leurs

homologues zygotiques et c'est donc en essayant de mimer au plus près les conditions rencontrées par les embryons zygotiques qu'une meilleure maîtrise de l'embryogenèse somatique pourra être obtenue. Les protocoles de dessiccation ont également l'avantage d'induire un état de quiescence, favorable à une conservation de longue durée des embryons somatiques et nécessaire à la confection de semences artificielles.

IV.4. Conclusion

Le développement tératologique des embryons somatiques de Vigne, souvent constaté, n'avait jusqu'ici jamais été étudié. Pourtant, comme nous l'avons indiqué en introduction de ce travail, les traitements capables d'améliorer le taux de conversion en plantule des embryons somatiques, bien que nombreux et variés (*cf.* tab. V, p. 21), sont généralement empiriques, peu reproductibles et leurs modes d'action sont loin d'être maîtrisés. C'est donc avec le double objectif d'identifier les causes de la tératologie et de proposer des moyens moins empiriques d'amélioration, que nous avons réalisé cette thèse.

Pour ce travail, il nous a semblé judicieux d'effectuer une comparaison entre l'embryogenèse somatique et zygotique. C'est, à notre connaissance, la première fois qu'une telle démarche est adoptée de façon systématique.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les embryons somatiques de Vigne expriment précocement des fonctions caractéristiques de la germination. L'expression de ce programme de germination est cependant incomplète et elle ne permet pas une morphogenèse apicale normale. Les données bibliographiques nous ont alors appris qu'un tel type de comportement, connu sous le nom de "germination précoce", caractérise aussi les embryons zygotiques immatures cultivés *in vitro*. Nous avons donc attribué le développement tératologique des embryons somatiques de Vigne à leur immaturité, c'est-à-dire à un déroulement incomplet des dernières phases de l'embryogenèse.

Cette constatation nous a conduit à étudier les mécanismes qui contrôlent la maturation embryonnaire. Nous avons alors pu montrer que la germination précoce, qui affecte les embryons somatiques, peut tout à fait être intégrée au modèle récent présenté par l'équipe de Galau (Galau *et al.*, 1986, 1987, 1991 ; Hughes et Galau, 1989, 1991) pour les embryons zygotiques. Ce modèle postule que, pour les embryons zygotiques, l'acquisition de la capacité de germer nécessite l'expression séquentielle de programmes génétiques déterminés, au cours des dernières phases de l'embryogenèse. Les mécanismes intervenant dans le contrôle de ces différentes étapes sont encore mal compris, mais

l'importance d'un facteur d'origine maternelle, dont la nature est inconnue, semble primordiale. Il est fortement probable que ce facteur soit absent des cultures d'embryons somatiques.

La mise en évidence de cette similitude de comportement nous a donc permis de définir l'une des principales causes de l'évolution tératologique des embryons somatiques de Vigne, mais aussi de proposer un protocole susceptible d'améliorer leur taux de conversion en plantule. Les objectifs que nous nous étions fixés ont donc été atteints.

IV.5. Perspectives de recherches

Ce travail ne représente qu'une étape, certes nécessaire, mais non suffisante pour la compréhension et la maîtrise de l'embryogenèse *in vitro*. Il est en effet clair que les examens histo-cytologiques et biochimiques que nous avons réalisés doivent être complétés par une étude approfondie des mécanismes régulateurs qui contrôlent le développement embryonnaire et qui permettent à l'embryon d'acquérir la capacité de germer. Cette nouvelle phase ne pouvait cependant être engagée que nanti d'une connaissance précise de la morphogenèse embryonnaire.

Il semble que, comme pour d'autres systèmes (Nougarède, 1990 ; Taylor M. *et al.*, 1990), les événements morphologiques caractéristiques de l'embryogenèse requièrent seulement des réajustements mineurs (Choi et Sung, 1984 ; Goldberg *et al.*, 1989) par rapport au programme génique existant au niveau des cellules non embryogènes. Ainsi, si environ 20 000 gènes sont exprimés au cours du développement embryonnaire, seulement quelques centaines d'entre eux sont spécifiques des embryons.

Pour affiner ces données, nous isolerons les ARN messagers transcripts au cours des phases de l'embryogenèse zygotique et somatique, nous effectuerons leur traduction *in vitro*, puis nous séparerons les polypeptides obtenus par électrophorèse bidimensionnelle. Cette démarche nous permettra de disposer de marqueurs protéiques, spécifiques des diverses phases des deux types d'embryogenèse.

En un second temps, nous nous intéresserons plus spécialement aux dernières phases de l'embryogenèse zygotique et somatique, phases au cours desquelles l'embryon acquiert la capacité de germer. Comme précédemment, nous isolerons les ARN messagers des phases de maturation, de post-abscission et de germination des embryons zygotiques. Ces divers ARN messagers serviront de base pour la constitution de banques d'ADNc. A partir

de ces gènes, marqueurs d'étapes précises du développement embryonnaire zygotique, des hybridations ADN - ARN, en utilisant des ARN extraits d'embryons somatiques, mettront en évidence les similitudes et (ou) les différences de l'expression génique pour les deux types d'embryogenèse.

Par les mêmes techniques, nous devrons également étudier, pour les embryons somatiques, l'influence de l'ABA, fourni par voie exogène, sur l'expression des programmes tardifs de l'embryogenèse.

Enfin, il serait intéressant d'examiner les mécanismes régulateurs associés à l'expression du programme de germination. Nous avons en effet indiqué précédemment que la germination précoce des embryons somatiques ne s'accompagne que d'une expression partielle du programme de germination. Il est donc nécessaire de déterminer les raisons qui provoquent une activation ou une inhibition sélective de certains gènes associés à la germination.

La Vigne a été un modèle particulièrement satisfaisant pour la comparaison des deux types d'embryogenèse et pour la compréhension des facteurs responsables de la tératologie des embryons somatiques. Ce système, par ses réponses bien tranchées, nous a permis de dégager un schéma général du développement embryonnaire somatique qui peut désormais être appliqué à d'autres systèmes.

Pourtant, la taille réduite des embryons zygotiques de Vigne et la présence de téguments très durs peuvent constituer un obstacle pour la réalisation du programme précité. Nous avons donc déjà envisagé la possibilité de substituer à la Vigne une plante se cultivant et fructifiant facilement en serre, possédant un cycle court et des embryons zygotiques volumineux et pour laquelle les embryons somatiques, fortement tératologiques, présentent les symptômes morphologiques de la germination précoce, semblables à ceux que nous avons décrits pour la Vigne. Ce modèle "idéal" sera un cultivar de Soja.

Résumé

Les embryons somatiques de Vigne, obtenus *in vitro* à partir de cals d'anthères, sont tératologiques et n'évoluent que rarement en plantule. Ils proviennent de cellules uniques de l'assise mécanique de l'anthère et des assises superficielles du cal ; un suspenseur est précocement formé. Le développement des embryons somatiques est étudié par comparaison avec celui des embryons zygotiques du même cultivar. Des examens histocytologiques et histochimiques en lumière blanche et en fluorescence, des études biochimiques, des dosages cytométriques de l'ADN nucléaire (*in situ* et en flux), des dosages de substances de croissance (polyamines, acide abscissique et auxine) révèlent similitudes et différences au cours des deux types d'embryogenèse. Les embryons somatiques évoluent, jusqu'au stade torpille, comme les embryons zygotiques. Ils possèdent un méristème caulinaire et un méristème racinaire. Le méristème caulinaire est bloqué en phase G_{0-1} ou G_{0-2} et le méristème racinaire est fonctionnel. Ce fonctionnement racinaire est associé à des caractéristiques n'apparaissant qu'après la germination des embryons zygotiques (lignification, subérification des assises superficielles, accumulation de réserves cotylédonaires). Cette "germination précoce" s'accompagne d'une morphogenèse tératologique (prolifération cellulaire anarchique de surface, malformations cotylédonaires). L'amidon et les triglycérides ne sont pas utilisés ; l'activité isocitrate lyase est nulle et l'activité malate synthase très faible. Les teneurs en polyamines et les activités ornithine décarboxylase et arginine décarboxylase sont très importantes à toutes les phases de l'embryogenèse somatique ; le rapport putrescine / spermidine est anormalement élevé. Par contre, pour un même stade, les teneurs en auxine et en acide abscissique libres sont beaucoup plus faibles que celles des embryons zygotiques. Les causes de ce comportement sont analysées. Des méthodes permettant de promouvoir un développement normal et d'augmenter le taux de conversion en plantule sont proposées.

Bibliographie

Ackerson, R.C., 1984. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. J. Exp. Bot, 35, 414-421.

Adams, C.A. et Rinne, R.W., 1980. Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. Intern. Rev. Cytol., 68, 1-8.

Al-Abta, S. et Collin, H.A., 1979. Endogenous auxin and cytokinin changes during embryoid development in celery tissue cultures. New Phytol., 82, 29-35.

Aleith, F. et Richter, G., 1990. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspension. Planta, 183, 17-24.

Alizadeth, S. et Mantell, S.H., 1991. Early cellular events during direct somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solanum aviculare* Forst. Ann. Bot., 67, 257-263.

Alleweldt, G., 1979. L'amélioration des vignes résistantes aux champignons et au phylloxéra. Bulletin de l'O. I. V. (Office international de la vigne et du vin), 52, 691-699.

Altman, A., Nadel, B.L., Falash, Z. et Levin, N., 1990. Somatic embryogenesis in celery : induction, control and changes in polyamines and proteins. Dans Progress in plant cellular and molecular biology. H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas et J. Van Aartrijk éds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 454-459.

Ammirato, P.V., 1977. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. Interactions of abscisic acid, zeatin, and gibberellic acid. Plant Physiol., 59, 579-586.

Ammirato, P.V., 1983. Embryogenesis. Dans Handbook of plant cell culture, Vol. 1. W. R. Sharp, D.A. Evans, P. V. Ammirato et Y. Yamada éds, Mc Millan, New York, p. 82-123.

Ammirato, P.V., 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. Dans Plant tissue and cell culture. C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett et D. D. Biesboer éds, Alan R. Liss Inc., New York, p. 57-81.

Ammirato, P.V., 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter, I.A.P.T.C., 57, 2-16.

Anandarajah, K. et Mc Kersie, B.D., 1990. Enhanced vigour of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. Plant Science, 71, 261-266.

Audisio, S., Bagni, N. et Serafini-Fracassini, D., 1976. Polyamines during the growth *in vitro* of *Nicotiana glauca* R. Grah. habituated tissue. Z. Pflanzenphysiol., 77, 146-151.

Avjioglu, A. et Knox, B., 1989. Storage lipid accumulation by zygotic and somatic embryos in culture. Ann. Bot., 63, 409-420.

Bagni, N., 1986. The function and metabolism of polyamines in plants. Acta Horticulturae, 179, 95-103.

Bagni, N. et Serafini-Fracassini, D., 1979. Polyamines and plant tumors. Ital. J. Biochem., 28, 392-394.

Banerjee, S. et Gupta, S., 1976. Embryogenesis and differentiation in *Nigella sativa* leaf callus *in vitro*. Physiol. Plant., 38, 115-120.

Barbier, M. et Bessis, R., 1988. Effets de différents facteurs contribuant à l'amélioration de l'isolement de protoplastes à partir de feuilles de Vigne (*Vitis vinifera* L.). Bull. Soc. Bot. Fr., 135, 251-261.

Baribault, T.J., Skene, K.G.M. et Scott, S., 1989. Genetic transformation of grapevine cells. Plant Cell Reports, 8, 137-140.

Baribault, T.J., Skene, K.G.M., Cain, P.A. et Scott, N.S., 1990. Transgenic grapevines : regeneration of shoots expressing β-glucuronidase. J. Exp. Bot., 41, 1045-1049.

Barlass, M. et Skene, K.G.M., 1978. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. Vitis, 17, 335-340.

Barratt, D.H.P. et Clark, J.A., 1991. Proteins arising during the late stages of embryogenesis in *Pisum sativum* L. Planta, 184, 14-23.

Bayliss, M.W., 1980. Chromosomal variation in plant tissue culture. Intern. Rev. Cytol., 11A, 113-144.

Beevers, H., 1975. Organelles from castor bean seedlings : biochemical roles in gluconeogenesis and phospholipid biosynthesis. Dans Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids. T. Galliard et E .I. Mercer éds, Academic Press Inc., p. 287-300.

Benbadis, A., 1973. Analyse des aptitudes embryogènes de divers types de cellules isolées de *Daucus carota* L. Soc. Bot. Fr., Mémoires, Coll. Morphologie, 223-234.

Bergounioux, C., Perennes, C., Brown, S.C., Sarda, C. et Gadal, P., 1988. Relation between protoplast division, cell-cycle stage and nuclear chromatin structure. Protoplasma, 142, 127-136.

Bessis, R. et Labroche, C., 1985. Callogenèse et régénération chez le Pinot, le Chardonnay et le Gamay. Coll. "Amélioration de la vigne et culture *in vitro*", Paris, avril 1985, Moët-Hennessy éd., p. 127-134.

Bhaskaran, S., Neumann, A.J. et Smith, R.H., 1988. Origin of somatic embryos from cultured shoot tips of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. In Vitro Cell. Dev. Biol., 24, 947-950.

Biggs, A.R., 1984 a. Boundary-zone formation in peach bark in response to wounds and *Cytospora leucostoma* infection. Can. J. Bot., 62, 2814-2821.

Biggs, A.R., 1984 b. Intracellular suberin : occurrence and detection in tree bark. IAWA Bulletin n.s., 5, 243-248.

Black, M., 1983. Abscisic acid in seed germination and dormancy. Dans Abscisic acid. F. T. Addicott éd., Praeger Publishers, New York, p. 331-363.

Borkird, C., Choi, J.H., Jin, Z.H., Franz, G., Hatzopoulos, P., Chorneau, R., Bonas, U., Pelegri, F. et Sung, Z.R., 1988. Developmental regulation of embryonic genes in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6399-6403.

Bouquet, A. et Branchard, M., 1988. Culture *in vitro* de la vigne. Biofutur, octobre 1988, 20-22.

Bouquet, A., Piganeau, B. et Lamaison, A.M., 1982. Influence du génotype sur la production de cals, d'embryoïdes et de plantes entières par culture d'anthères *in vitro* dans le genre *Vitis*. C. R. Acad. Sci., 295, Série III, 569-574.

Bouquet, A., Danglot, Y. et Lamaison, A.M., 1985. Amélioration génétique des porte-greffes de vigne par culture *in vitro*. Coll. "Amélioration de la vigne et culture *in vitro*", Paris, avril 1985, Moët Hennessy éd., p. 145-159.

Bouquet, A., Fallot, J., Lebrun, L. et Mauro, M.C., 1987. Influence de quelques facteurs sur la production et le développement d'embryons somatiques obtenus par culture d'anthères *in vitro* chez *Vitis vinifera*. Coll. "Physiologie de la vigne", Bordeaux, juin 1986, O.I.V. éd., p. 31-37.

Boussaïd, M. et Espagnac, H., 1988. Néoformation sur cals de cotylédons cultivés *in vitro* chez une Légumineuse du sud tunisien : *Hedysarum carnosum* Desf. Bull. Soc. Bot. Fr., 134 , 337-345.

Bradbeer, J.W., 1988. Seed dormancy and germination. Blackie and Son éds, Glasgow and London, 146 pp.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annal. Biochem., 72, 248-254.

Bray, L., 1990. Conséquences métaboliques et cellulaires du stress de salinité chez des vitroplants de *Populus trichocarpa* X *deltoides* cv Hunnegem. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 138 pp.

Breton, A.M. et Sung, Z.R., 1982. Temperature-sensitive carrot variants impaired in somatic embryogenesis. Dev. Biol., 90, 58-66.

Bronner, R., 1975. Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissues. Stain Technol., 50, 1-4.

Brown, S.C., 1984. Analysis and sorting of plant material by flow cytometry. Physiol. Végét., 22, 341-349.

Brown, S.C. et Bergounioux, C., 1988. La biologie végétale. Dans La Cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique. P. Métézeau éd., MDSI/Mc Graw-Hill, Paris, p. 153-164.

Brown, S.C., Bergounioux, C., Tallet, S. et Marie, D., 1991. Flow cytometry of nuclei for ploidy and cell cycle analysis. Dans Practical guide to plant cellular and molecular technics. I. Potrykus et I. Negrutiu éds, Birkaüser, Zurich, sous presse.

Brown, S.C., Jullien, M., Coutos-Thévenot, P., Muller, P. et Renaudin, J.P., 1986. Present development of flow cytometry in plant biology. Biology of the Cell, 58, 173-178.

Brunori, A., 1967. Relationship between DNA synthesis and water content during ripening of *Vicia faba* seeds. Caryologia, 20, 333-338.

Brunori, A. et d'Amato, F., 1967. The DNA content of nuclei in the embryo of dry seeds of *Pinus pinea* and *Lactuca sativa*. Caryologia, 20, 153-161.

Bryant, J.A., 1985. Seed physiology. Edward Arnold éd., The Camelot Press, 78 pp.

Buchheim, J.A., Colburn, S.M. et Ranch, J.P., 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. Plant Physiol., 89, 768-775.

Buvat, R., 1989. Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 581 pp.

Chapman, J.M. et Galleshi, L., 1985. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. VI- The production of starch. Ann. Bot., 55, 29-34.

Chée, R.P. et Cantliffe, D.J., 1988. Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomea batatas* Poir. In Vitro Cell. Dev. Biol., 24, 955-958.

Chen, L.J. et Luthe, D.S., 1987. Analysis of proteins from embryogenic and non embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. Plant Science, 48, 181-188.

Cheng, Z.M. et Reisch, B.I., 1989. Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis* X *labruscana* "Catawba". Plant Cell Reports, 8, 403-406.

Chibbar, R.N., Shyluk, J., Georges, F., Mallard, C.S. et Constabel, F., 1988. Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. J. Plant Physiol., 133, 367-370.

Choi, J.H. et Sung, Z.R., 1984. Two-dimensional gel analysis of carrot somatic embryo proteins. Plant Mol. Biol. Rep., 2, 19-25.

Choinski, J.S. et Trelease, R.N., 1978. Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. II- Glyoxysomal enzyme development in embryos. Plant Physiol., 62, 141-145.

Clowes, F.A.L., 1978. Origin of quiescence at the root pole of pea embryos. Ann. Bot., 42, 1237-1239.

Cooper, T.G. et Beevers, H., 1969. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. J. Biol. Chem., 244, 3507-3513.

Cornu, D. et Geoffrion, C., 1990. Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze. Bull. Soc. Bot. Fr., 137, 25-34.

Cottignies, A., 1974. Les critères nucléaires d'une dormance vraie et totale dans le point végétatif du *Fraxinus excelsior* L. Planta, 120, 171-179.

Cottignies, A., 1981. Influence de la fixation dans l'étude densitométrique de l'ADN nucléaire. Z. Pflanzenphysiol., 103, 379-391.

Crouch, M.L., 1982. Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. Planta, 156, 520-524.

Crouch, M.L. et Sussex, I.M., 1981. Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. Planta, 153, 64-74.

Cruz, G.S., Canhoto, J.M. et Abreu, M.A.V., 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. Plant Science, 66, 263-270.

Dasgupta, J. et Bewley, J.D., 1982. Desiccation of axes of *Phaseolus vulgaris* during development as a switch from a development pattern of protein synthesis to a germination pattern. Plant Physiol., 70, 1224-1227.

Davidson, D., 1991. Cell division. Dans Plant physiology, a treatise. Vol. X : Growth and development, p. 341-436.

De Laat, A.M.M., Göhde, W. et Vogelzang, M.J.D.C., 1987. Determination of ploidy of single plants and plant population by flow cytometry. Plant Breeding, 99, 303-307.

De Vries, S.C., Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, H.D., Thomas, T.L. et Van Kammen, A., 1988. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. Planta, 176, 196-204.

Dixon, G.H. et Kornberg, H.L., 1959. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. Biochem. J., 72, 3 P.

Dodds, J.H. et Robert, L.W., 1985. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, 232 pp.

Doman, D.C., Walker, J.C., Trelease, R.N. et Moore, B.D., 1982. Metabolism of carbohydrate and lipid reserves in germinated cotton seeds. Planta, 155, 502-510.

Dörffling, K. et Tietz, D., 1983. Methods for the detection and estimation of abscisic acid. Dans Abscisic acid. F. T. Addicott éd., Praeger Publishers, New York, p. 23-77.

Dubois, T., Guedira, M., Dubois, J. et Vasseur, J., 1990. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium* : is callose an early marker? Ann. Bot., 65, 539-545.

Dubois, T., Guedira, M., Dubois, J. et Vasseur, J., 1991. Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. Protoplasma, 162, 120-127.

Dubos, P., 1986. L'or du vin. Science et Vie, n° spécial : La vigne et le vin, 146, 140-153.

Dunstan, D.I., Bekkaoui, F., Pilon, M., Fowke, L.C. et Abrams, S.R., 1988. Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. Plant Science, 58, 77-84.

Dure, L.S., 1975. Seed formation. Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 259-278.

Dutta, C.P. et Appelqvist, L.A., 1991. Lipids and fatty acid patterns in developing seed, root, and tissue culture initiated from embryos of *Daucus carota* L. Plant Science, 75, 177-183.

Dutta, C.P., Appelqvist, L.A., Günnarsson, S. et Von Hofsten, A., 1991. Lipid bodies in tissue culture, somatic and zygotic embryo of *Daucus carota* L. : a qualitative and quantitative study. Plant Science, 78, 259-267.

El Hadrami, I., Michaux-Ferrière, N., Carron, M.P. et d'Auzac, J., 1989 a. Les polyamines, facteur limitant possible de l'embryogenèse somatique chez l'*Hevea brasiliensis*. C. R. Acad. Sci. Paris, 308, Série III, 205-211.

El Hadrami, I., Carron, M.P. et d'Auzac, J., 1989 b. Variabilité clonale du potentiel embryogène chez *Hevea brasiliensis* ; relation avec les polyamines (PA) et les peroxydases (PO) des cals. C. R. Acad. Sci. Paris, 308, Série III, 299-305.

Evans, D.A. et Sharp, W.R., 1986. Applications of somaclonal variation. Bio-Technology, 4, 528-532.

Evans, P.T. et Malmberg, R.L., 1989. Do polyamines have roles in plant development ? Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40, 235-269.

Fallot, J., 1988. Stratégie pour l'obtention de somaclones de vigne tolérants à *Eutypa lata*. Coll. "Les stratégies de sélection face aux technologies modernes", Paris, septembre 1988, Moët Hennessy - Louis Vuitton éds, p. 13.

Fallot, J., Mauro, M.C., Ambib, C., Nef, C., Lelièvre, J.M., Buis, R., Barthou, H., Philippe, I., Albertini, L. et Petitprez, M., 1985. Amélioration de *Vitis vinifera* var Cabernet Sauvignon. Méthodes d'évaluation précoce de la variabilité. Coll. "Amélioration de la vigne et culture *in vitro*", Paris, avril 1985, Moët Hennessy éd., p. 83-99.

Faure, O., 1990. Embryons somatiques de *Vitis rupestris* et embryons zygotiques de *Vitis sp.* : morphologie, histologie, histochimie et développement. Can. J. Bot., 68, 2305-2315.

Faure, O., Mengoli, M., Nougarède, A. et Bagni, N., 1991. Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. J. Plant Physiol., 138, 545-549.

Favre, J.M., 1977. Premiers résultats concernant l'obtention *in vitro* de néoformations caulinaires chez la vigne. Ann. Amélior. Plantes, 27, 151-169.

Feirer, R.P., Mignon, G. et Litvay, J.D., 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. Science, 223, 1433-1435.

Feirer, R.P., Conkey, J.H. et Verhagen, S.A., 1989. Triglycerides in embryogenic conifer calli : a comparison with zygotic embryos. Plant Cell Reports, 8, 207-209.

Finkelstein, R.R. et Crouch, M.L., 1984. Precociously germinating rapeseed embryos retain characteristics of embryogeny. Planta, 162, 125-131.

Finkelstein, R.R. et Crouch, M.L., 1986. Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seed. Plant Physiol., 81, 907-912.

Finkelstein, R.R, Tenbarge, K.M., Shumway, J.E. et Crouch, M.L., 1985. Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. Plant Physiol., 78, 630-636.

Fransz, P.F. et Schel, J.H.N., 1991. An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. Can. J. Bot., 69, 858-865.

Franzmann, L., Patton, D.A. et Meinke, D.W., 1989. *In vitro* morphogenesis of arrested embryos from lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. Theor. Appl. Genet., 77, 609-616.

Fujii, J.A.A., Slade, D., Oslen, R., Ruzin, S.E. et Redenbaugh, K., 1990. Alfafa somatic embryo maturation and conversion to plants. Plant Science, 72, 93-100.

Fujimara, T. et Komamine, A., 1982. Molecular aspects of somatic embryogenesis in a synchronous system. Proc. 5th Intl. Cong. "Plant tissue and cell culture", p. 105-106.

Fujimara, T., Komamine, A. et Matsumoto, H., 1980. Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Physiol. Plant., 49, 255-260.

Gabe, M., 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris, 1113 pp.

Galau, G.A., Bijaisoradat, N. et Hughes, D.W., 1987. Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis-abundant mRNAs and storage protein mRNAs : coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. Dev. Biol., 123, 198-212.

Galau, G.A., Hughes, D.W. et Dure III, L., 1986. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. Plant Mol. Biol., 7, 155-170.

Galau, G.A., Jakobsen, K. et Hughes, D.W., 1991. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. Physiol. Plant., 81, 280-288.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. et Firoozabady, E., 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science, 220, 1049-1051.

Galston, A.W. et Kaur-Sawhney, R., 1990. Polyamines in plant physiology. Plant Physiol., 94, 406-410.

Galzy, R., 1964. Techniques de thermothérapie des viroses de la vigne. Ann. Epiphyties, 15, 245-256.

Galzy, R., 1969 a. Remarques sur la croissance de *Vitis rupestris* cultivé *in vitro* sur différents milieux nutritifs. Vitis, 8, 191-205.

Galzy, R., 1969 b. Recherches sur la croissance de *Vitis rupestris* Scheele sain et court-noué cultivé *in vitro* à différentes températures. Ann. Phytopathol., 1, 149-166.

Galzy, R., 1972. La culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris*. C. R. Acad. Sci. Paris, 274, 210-213.

Galzy, R., 1977. Recherche d'un milieu minéral permettant la culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris* comportant trois ébauches foliaires. Dans La culture des tissus et des cellules des végétaux. R. J. Gautheret éd., Masson, Paris, p. 134-146.

Garcia, A.M., 1962. Studies on DNA in leucocytes and related cells of mammals. II- On the Feulgen reaction and the two-wavelengths microspectrophotometry. Histochimie, 3, 178-194.

Gautheret, R.J., 1938. La culture des tissus végétaux. Sciences, 20, 57-71.

Germani, E., Clain, E., Florin, B. et Benbadis, M.C., 1987. Cycle cellulaire dans le méristème de la racine séminale de *Vigna radiata*. Bull. Soc. Bot. Fr., 134 (2), 133-144.

Goldberg, R.B., Barker, S.J. et Perez-Grau, L., 1989. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. Cell, 56, 149-160.

Gonthier, R. et Francis, D., 1989. Changes in the pattern of cell division in the shoot and root meristems of *Lolium perenne* during the transition from vegetative to floral growth. J. Exp. Bot., 40, 285-292.

Gray, D.J., 1989. Synthetic seed for clonal production of crop plants. Dans Recent advances in the development and germination of seeds. R. B. Taylorson éd., Plenum Press, New York, p. 29-45.

Gray, D.J. et Mortensen, J.A., 1987. Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* "Microsperma". Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 9, 73-80.

Gresshoff, P.M. et Doy, C.H., 1974. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. Z. Pflanzenphysiol., 73, 132-141.

Griffiths, G. et Harwood, J.L., 1991. The regulation of triacylglycerol biosynthesis in cocoa (*Theobroma cacao* L.). Planta, 184, 279-284.

Gros, F., 1990. L'Ingénierie du vivant. O. Jacob éd., Paris, 237 pp.

Guedira, M., Dubois, T., Dubois, M. et Vasseur, J., 1990. Influence du saccharose sur le rendement, la morphologie et le développement des embryons somatiques chez *Cichorium*. C. R. Acad. Sci. Paris, 310, Série III, 453-459.

Guellec, V., David, C., Petit, A., Tempé, J. et Branchard, M., 1988. Transformation par *Agrobacterium* de la vigne (*Vitis vinifera* L.). Coll. "Les stratégies de sélection face aux technologies modernes", Paris, septembre 1988, Moët Hennessy - Louis Vuitton éds, p. 42.

Guellec, V., David, C., Branchard, M. et Tempé, J., 1990. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20, 211-215.

Guillaumin, D., 1980. La pratique du microscope électronique à balayage en biologie. Masson, Paris, 124 pp.

Haccius, B., 1973. Les premiers stades des embryons végétaux zygotiques et somatiques sont-ils différents ou non ? Soc. Bot. Fr:, Mémoires, Coll. Morphologie, 201-206.

Hakman, I., Stabel, P., Engstrom, P. et Eriksson, T., 1990. Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). Physiol. Plant., 80, 441-455.

Hallet, J.N., 1972. Morphogenèse du gamétophyte feuillé du *Polytrichum formosum* Hedw. I- Etude histochimique, histoautoradiographique et cytophotométrique du point végétatif. Ann. Sci. Nat. Bot., Paris, 12ème Série, 13, 19-118.

Halperin, W., 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Amer. J. Bot., 53, 443-453.

Halperin, W., 1967. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. J. Ultrastructure Research, 18, 428-443.

Hammatt, N. et Davey, M.R., 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). J. Plant Physiol., 128, 219-226.

Harada, J.J., Delisle, A.J., Baden, C.S. et Crouch, M.L., 1989. Unusual sequence of an abscisic acid-inducible mRNA which accumulates late in *Brassica napus* seed development. Plant Mol. Biol., 12, 395-401.

Harris, P.J. et Hartley, R.D., 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the *Gramineae* by ultraviolet fluorescence microscopy. Nature, 259, 508-510.

Hartung, W.B., Heilmann, B. et Gimmler, H., 1981. Do chloroplasts play a role in abscisic acid synthesis ? Plant Sci. Lett., 22, 235-242.

Heilmann, B., Hartung, W. et Gimmler, H., 1980. The distribution of abscisic acid between chloroplast and cytoplasm of leaf cells and the permeability of the chloroplast envelope for abscisic acid. Z. Pflanzenphysiol., 97, 67-78.

Hidalgo, L., Garcia de Lujan, A. et Benitez Sidon, I., 1985. Etat actuel de la sélection clonale et du matériel de multiplication de la vigne en Espagne. Bulletin de l'O.I.V., 58, 362-376.

Hirabayashi, T., 1985. Somatic embryogenesis from leaf tissues of grape. Coll. "Amélioration de la vigne et culture *in vitro*", Paris, avril 1985, Moët Hennessy éd., p. 511-512.

Hirabayashi, T., Kozaki, I. et Akihama, T., 1976. *In vitro* differentiation of shoots from anther callus in *Vitis*. Hortscience, 11, 511-512.

Hock, B. et Beevers, H., 1966. Development and decline of the glyoxylate cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Effects of dactinomycin and cycloheximide. Z. Pflanzenphysiol., 55, 405-414.

Hodgson, J., 1990. Somaclonal variation. Making the transition to applied technology. Bio-Technology, 8, 714.

Hole, D.J., Smith, J.D. et Cobb, B.G., 1989. Regulation of embryo dormancy by manipulation of abscisic acid in kernels and associated cob tissue of *Zea mays* L. cultured *in vitro*. Plant Physiol., 91, 101-105.

Horemans, S., Van Onckelen, H.A. et De Greef, J.A., 1986. Longitudinal gradients of indole-3-acetic acid and abscisic acid in the hypocotyl of etiolated bean seedlings. J. Exp. Bot., 37, 1525-1532.

Horgan, R., 1988. Hormone analysis. Dans Plant hormones and their role in plant growth and development. P. J. Davies éd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 222-239.

Huang, A.H.C., 1987. Lipases. Dans The biochemistry of plants. Vol. 9, Lipids : structure and function. P. K. Stumpf éd., Academic Press Inc., London, p. 91-119.

Hughes, D.W. et Galau, G.A., 1989. Temporally modular gene expression during cotyledon development. Genes Dev., 3, 358-369.

Hughes, D.W. et Galau, G.A., 1991. Developmental and environmental induction of Lea and LeaA mRNAs and the postabscission program during embryo culture. Plant Cell, 3, 605-618.

Huglin, P., 1986. Biologie et écologie de la vigne. Payot-Lausanne, Paris, 372 pp.

Jensen, W.A., 1962. Botanical histochemistry. Principles and practice. Freeman and Co., San-Francisco, London, 408 pp.

Jensen, W.A., 1963. Cell development during plant embryogenesis. Brookhaven Symposia in Biology, 16, 179-202.

Joersbo, M., Andersen, J.M., Okkels, F.T. et Rajagopal, R., 1989. Isoperoxydases as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. Physiol. Plant., 76, 10-16.

Kamada, H. et Harada, H., 1981. Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. Plant Cell Physiol., 22, 1423-1429.

Kermode, A.R. et Bewley, J.D., 1985. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. II- Post-germinative enzyme production and soluble protein synthetic pattern changes within the endosperm of *Ricinus communis* L. seeds. J. Exp. Bot., 36, 1916-1927.

Kim, Y.H. et Janick, J., 1991. Abscisic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of celery somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 24, 83-89.

Kindl, H., 1987. β-oxydation of fatty acids by specific organelles. Dans The biochemistry of plants. Vol. 9, Lipids : structure and function. P. K. Stumpf éd., Academic Press Inc., London, p. 31-52.

Klinger, S., Martin-Tanguy, J. et Martin, C., 1986. K-nutrition, growth bud formation, and amine and hydroxycinnamic-acid amide contents in leaf explants of *Nicotiana tabacum* variety Xanthi n.c. cultivated *in vitro*. Plant Physiol., 82, 561-565.

Knobloch, I., Kahl, G., Landré, P. et Nougarède, A., 1989. Cellular events during wound periderm formation in *Dioscorea bulbifera* L. bulbils. Can. J. Bot., 67, 3090-3102.

Knox, R.B., 1982. Methods for locating and identifying antigens in plant tissues. Dans Immunocytochemistry, Vol. 1. G. R. Bullock et P. Petrusz éds, Academic Press, London. p. 205-238.

Komamine, A., Matsumoto, M., Tsukahara, M., Fujiwara, A., Kawahara, R., Ito, M., Smith, J., Nomura, K. et Fujimara, T., 1990. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures : physiology, biochemistry and molecular biology. Dans Progress in plant cellular and molecular biology. H. J. J. Nijkamp, L.H. W. Van der Plas et J. Van Aartrijk éds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 307-313.

Kozma, P., 1970. Génétique et amélioration de la vigne. Bulletin de l'O.I.V. (Office international de la vigne et du vin), 43, 704-732.

Kriedemann, P. et Beevers, H., 1967. Sugar uptake and translocation in the castor bean seedlings. I- Characteristics of transfer in intact and excised seedlings. Plant Physiol., 42, 161-173.

Krul, W.R., 1985. Somatic embryo induction, expression and development : a general model. Coll. "Amélioration de la vigne et culture *in vitro*", Paris, avril 1985, Moët Hennessy éd., p. 101-120.

Krul, W.R. et Mowbray, G.H., 1983. Grapes. Dans Handbook of plant cell culture, Vol. 2. W. R. Sharp, P. V. Ammirato et Y. Yamada éds, Mc Millan, New York, p. 396-434.

Krul, W.R. et Worley, J.F., 1977. Formation of adventitious embryos in callus cultures of "Seyval", a french hybrid grape. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 102, 360-363.

Kunce, C.M., Trelease, R.N. et Doman, D.C., 1984. Ontogeny of glyoxysomes in maturing and germinated cotton seeds. A morphometric analysis. Planta, 161, 156-164.

Lance, A., 1957. Recherches cytologiques sur l'évolution de quelques méristèmes apicaux et sur ses variations provoquées par des traitements photopériodiques. Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de Paris et Ann. Sci. Nat. Bot., 11ème Série, 18, 91-421.

Langeron, M., 1949. Précis de microscopie. Masson et Cie, Paris, 5ème édition. 1430 pp.

Larkin, P.J. et Scowcroft, W.R., 1981. Somaclonal variation. A novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60, 197-214.

Lebrun, L., 1987. Etude de l'embryogenèse somatique *in vitro* chez la vigne (*Vitis sp.*) et application à la sélection de plantes tolérant de fortes concentrations en chlorure de sodium. Thèse de Doctorat en Sciences, Université d'Orsay, 145 pp.

Lebrun, L. et Branchard, M., 1987. Embryogenèse "indéfine" chez *Vitis sp.* cultivé *in vitro*. Coll. "Physiologie de la vigne", Bordeaux, juin 1986, O.I.V. éd., p. 38-41.

Lee, N. et Wetzstein, H.Y., 1988. Protoplast isolation and callus production from leaves of tissue-cultured *Vitis spp.* Plant Cell Reports, 7, 531-534.

Le Page-Degivry, M.T., Barthe, P. et Garello, G., 1990. Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. Plant Physiol., 92, 1164-1168.

Leprince, O., Bronchart, R. et Deltour, R., 1990. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. Plant, Cell and Environment, 13, 539-546.

Le Redulier, D. et Goas, G., 1975. Influence des ions ammonium et potassium sur l'accumulation de putrescine chez les jeunes plantules de *Soja hispida* Moench, privées de leurs cotylédons. Physiol. Vég., 13, 125-136.

Li, L. et Ross, J.D., 1990. Starch synthesis during dormancy breakage in oilseed of *Corylus avellana*. Ann. Bot., 66, 507-512.

Lison, L., 1960. Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars, Paris, 842 pp.

Litz, R.E. et Conover, R.A., 1982. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. Plant Science Letters, 26, 153-158.

Long, J., 1970. Aspects de la viticulture en France. Bulletin de l'O.I.V. (Office international de la vigne et du vin), 43, 733-743.

Luthra, R., Munshi, S.K. et Sukhija, P.S., 1991. Relationship of carbohydrate metabolism with lipid biosynthesis in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. J. Plant Physiol., 137, 312-318.

Marcotte, W.R., Bayley, C.C. et Quatrano, R.S., 1988. Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. Nature, 335, 454-457.

Margara, J., 1982. Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. INRA éd., Paris, 262 pp.

Martins, A., 1985. Les travaux de sélection massale et clonale et leur rôle dans l'amélioration de la viticulture portugaise. Bulletin de l'O.I.V. (Office international de la vigne et du vin), 58, 352-361.

Marty, D., 1988. La tomate dans tous ses états. Biofutur, 72, 43-48.

Mauro, M.C., Nef, C. et Fallot, J., 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon. Plant Cell Reports, 5, 377-380.

Maury, E.A., 1983. Soignez-vous par le vin. Les caractéristiques de tous les vins et leurs vertus thérapeutiques. Collection Marabout Service, Editions Universitaires, Paris. 203 pp.

Mc William, A.A., Smith, S.M. et Street, M.E., 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). Ann. Bot., 38, 243-250.

Mendelsohn, M.L., 1958. The two wavelengths method of microspectrophotometry. II-A set of tables to facilitate the calculations. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 415-424.

Mengoli, M., Bagni, N., Luccarini, G., Nuti-Ronchi, V. et Serafini-Fracassini, D., 1989. *Daucus carota* cell cultures : polyamines and effect of polyamine biosynthesis inhibitors in the preembryogenic phase and different embryo stages. J. Plant Physiol., 134, 389-394.

Mestre, J.C. et Guignard, J.L., 1973. La polarité du zygote et la symétrisation du proembryon chez les Angiospermes. Soc. Bot. Fr., Mémoires, Coll. Morphologie., 127-136.

Miernyk, J.A., Trelease, R.N. et Choinski, J.S., 1979. Malate synthase activity in cotton and other ungerminated oilseeds. A survey. Plant Physiol., 63, 1068-1071.

Monnier, M., 1988 a. Culture d'embryons et d'ovules. Dans Culture de cellules, tissus et organes végétaux. J. P. Zrÿd éd., Presses Polytechniques Romandes, p. 105-118.

Monnier, M., 1988 b. Embryogenèse zygotique et somatique. Dans Culture de cellules, tissus et organes végétaux. J. P. Zrÿd éd., Presses Polytechniques Romandes, p. 119-134.

Montague, M.J., Armstrong, T.A. et Jaworski, E.G., 1979. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. II- Changes in arginine decarboxylase activity. Plant Physiol., 63, 341-345.

Montague, M.J., Koppenbrink, J.W. et Jaworski, E.G., 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I- Changes in intracellular content and rate of synthesis. Plant Physiol., 62, 430-433.

Moore, T.C., 1989. Biochemistry and physiology of plant hormones. Second edition, Springer Verlag, New-York, Heidelberg, Berlin, London, Tokyo, Hong-Kong, 330 pp.

Moreau, R.A. et Huang, A.H.C., 1977. Gluconeogenesis from storage wax in the cotyledons of jojoba seedlings. Plant Physiol., 60, 329-333.

Morel, G., 1944 a. Sur le développement de tissus de vigne cultivés *in vitro*. C. R. Soc. Biol., 138, 62.

Morel, G., 1944 b. Action de l'acide indole-β-acétique sur la croissance des tissus de vigne. C. R. Soc. Biol., 138, 93.

Mullins, M.G., 1966. Test-plants for investigation of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. Nature, 209, 419-420.

Mullins, M.G., 1985. Amplification of clonal variation in the grapevine : progress and prospects. Coll. "Amélioration de la vigne et culture *in vitro*", Paris, avril 1985, Moët Hennessy éd., p. 63-71.

Mullins, M.G. et Srinivasan, C., 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of grapevine (cv Cabernet Sauvignon) by apomixis *in vitro*. J. Exp. Bot., 27, 1022-1030.

Mullins, M.G., Tang, F.C.A et Faccioti, D., 1990. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines : transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. Bio-Technology, 8, 1041-1045.

Murashige, T. et Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.

Nagl, W., 1990. Translocation of putrescine in the ovule, suspensor and embryo of *Phaseolus coccineus*. J. Plant Physiol., 136, 587-591.

Naylor, A.W., 1984. Functions of hormones at the organ level of organization. Dans Encyclopedia of plant physiology, New serie, Vol. 10, Hormone regulation of development. T. K. Scott éd., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo, p. 172-218.

Netzer, M.H. et Branchard, M., 1988. Utilisation de l'embryogenèse somatique pour l'obtention de porte-greffes de vigne résistants à la chlorose calcaire. Coll. "Les stratégies de sélection face aux technologies modernes", Paris, septembre 1988, Moët Hennessy - Louis Vuitton éds, p. 55.

Nitsch, J.P. et Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 163, 85-87.

Nobécourt, P., 1937. Cultures en série de tissus végétaux sur milieu artificiel. C. R. Acad. Sci., 205, 251-253.

Norreel, B., 1973. Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique. Soc. Bot. Fr., Mémoires, Coll. Morphologie, 71-98.

Norreel, B., 1975. Etude physiologique, cytochimique et ultrastructurale de l'embryogenèse somatique chez le *Daucus carota* L. et de l'androgenèse chez le *Nicotiana tabacum* L. et le *Datura innoxia* Mill. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 164 pp.

North, G., 1991. Cell cycle. Starting and stopping. Nature, 351, 604-605.

Nouaille, C. et Pétiard, V., 1988. Semences artificielles : rêves et réalités. Biofutur, 67, 33-38.

Nougarède, A., 1967. Experimental cytology of the shoot apical cells during vegetative growth and flowering. Intern. Rev. Cytol., 21, 203-351.

Nougarède, A., 1990. Current research in the area of flowering in the group of "Cytologie expérimentale et morphogenèse végétale" at the University Pierre and Marie Curie, Paris. Flowering Newsletter, 9, 8-16.

Nougarède, A., Di Michele, M.N., Rondet, P. et Saint-Côme, R., 1990. Plastochrone, cycle cellulaire et teneurs en ADN nucléaire du méristème caulinaire de plants de *Chrysanthemum segetum* soumis à deux conditions lumineuses différentes, sous une photopériode de 16 heures. Can. J. Bot., 68, 2389-2397.

Nougarède, A. et Rembur, J., 1976. Le RNA cytoplasmique dans le point végétatif du *Chrysanthemum segetum* L. Concentration, teneur par cellule et synthèse. Ann. Sci. Nat. Bot., 12ème Série, 17, 159-186.

Nougarède, A. et Rondet, P., 1982. Rhizogenèse adventive dans l'épicotyle du pois : initiation et structuration de la racine. Can. J. Bot., 60, 261-280.

Nougarède, A., Rondet, P. et Rembur, J., 1982. Effets comparés de la fusicoccine, de la kinétine et de l'ablation de l'axe principal sur le bourgeon cotylédonaire du pois nain. Can. J. Bot., 60, 210-218.

Nougarède, A., Tepfer, S.S. et Tepfer, M., 1973. Les bourgeons au cours de l'état pérennant chez le *Phytolacca decandra* L. Modalités de conservation du plant durant l'hiver et reprise de l'activité printanière. C. R. Acad. Sci. Paris, 276, Série D, 957-960.

Nougarède, A., Rondet, P. et Rembur, J., 1987. Effet d'un traitement par l'acide abscissique sur la division cellulaire, les teneurs en ADN et l'élongation du bourgeon cotylédonaire des plants de pois décapités. Can. J. Bot., 65, 907-915.

Opik, H., 1965. Respiration rate, mitochondrial activity and mitochondrial structure in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. during germination. J. Exp. Bot., 16, 667-682.

Opik, H., 1966. Changes in cell fine structure in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. during germination. J. Exp. Bot., 17, 427-439.

Ornstein, L., 1952. The distributional error in microspectrophotometry. Lab. Invest., 1, 250-262.

Patau, K., 1952. Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. Chromosoma, 5, 341-362.

Patton, D.A et Meinke, D.W., 1990. Ultrastructure of arrested embryos from lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. Amer. J. Bot., 77, 653-661.

Pence, V.C. et Caruso, J.L., 1988. Immunoassay methods of plant hormone analysis. Dans Plant hormones and their role in plant growth and development. P. J. Davies éd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 240-256.

Phillips, R.L., Kaeppler, S.M. et Peschke, V.M., 1990. Do we understand somaclonal variation ? Dans Progress in plant cellular and molecular biology. H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van der Plas et J. Van Aartrijk éds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 131-141.

Piaggesi, A., Perata, P., Vitigliano, C. et Alpi, A., 1991. Level of abscisic acid in integuments, nucellus, endosperm, and embryo of peach seeds (*Prunus persica* L. cv Springcrest) during development. Plant Physiol., 97, 793-797.

Pitto, L., Lo Schiavo, F., Giuliano, G. et Terzi, M., 1983. Analysis of the heat-shock protein pattern during somatic embryogenesis of carrot. Plant Mol. Biol., 2, 231-237.

Poethig, R.S., 1988. Heterochromatic mutations affecting shoot development in maize. Genetics, 119, 959-973.

Pollister, A.W., Swift, H. et Rasch, E., 1969. Microphotometry with visible light. Dans Physical techniques in biological research, Vol. 3, Part. C, Cells and tissues. A. W. Pollister éd., Academic Press, New York and London, p. 201-251.

Prado, E. et Berville, A., 1990. Induction of somatic embryo development by liquid culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Science, 67, 73-82.

Prinsen, E., Rüdelsheim, P. et Van Onckelen, H., 1991. Extraction, purification and analysis of endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid. Dans A laboratory guide for cellular and molecular plant biology. I. Negrutiu et G. Gharti éds, Birkauser Verlag, p. 175-185.

Quatrano, R.S., 1988. The role of hormones during seed development. Dans Plant hormones and their role in plant growth and development. P. J. Davies éd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 494-514.

Radojevic, L., 1980. Embryogenèse somatique et androgenèse chez certaines espèces ligneuses. Bull. Soc. Bot. Fr., 127, 99-107.

Raghavan, V., 1983. Biochemistry of somatic embryogenesis. Dans Handbook of plant cell culture, Vol. 1. W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato et Y. Yamada éds, Mc Millan, New York, p. 655-671.

Raghavan, V. et Torrey, J.G., 1964. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture. Plant Physiol., 39, 691-699.

Rajasekaran, K. et Mullins, M.G., 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. J. Exp. Bot., 30, 399-407.

Rajasekaran, K. et Mullins, M.G., 1983. The origin of plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. Am. J. Enol. Vitic., 34, 108-113.

Rajasekaran, K., Vine, J. et Mullins, M.G., 1982. Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis* : changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. Planta, 154, 139-144.

Raj-Bhansali, R., 1990. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in pomegranate. Ann. Bot., 66, 249-253.

Rajnchapel-Messaï, J., 1989. Vers une maîtrise de la morphogenèse des vitroplants. Biofutur, décembre 1989, 45-50.

Redenbaugh, K., Paasch, B.D., Nichol, J.W., Kossler, M.E., Viss, P.R. et Walker, K.A., 1986. Somatic seeds : encapsulation of asexual plant embryos. Bio-Technology, 4, 797-801.

Reibach, P.H. et Benedict, C.R., 1982. Biosynthesis of starch in proplastids of germinating *Ricinus communis* endosperm tissue. Plant Physiol., 70, 252-256.

Reinert, J., 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. Naturwissenschaften, 45, 344-345.

Reisch, B.I., Aldwinckle, H.A. et Roberts, M.H., 1985. Embryogenesis from petiole cultures of "Horizon" grape. *In vitro* grape shoot tip mutagenesis. Coll. "Amélioration de la vigne et culture *in vitro*", Paris, avril 1985, Moët Hennessy éd., p. 161-170.

Rembur, J., 1972. Etude cytophotométrique des variations des teneurs en ADN nucléaire dans le point végétatif jeune du *Xanthium pennsylvanicum* Wallr., Ambrosiacées, au cours d'un plastochrone. C. R. Acad. Sci. Paris, 275, Série D, 903-906.

Rembur, J., 1978. Méristèmes caulinaires et cellules en suspension. Acides nucléiques, protéines nucléaires basiques et cycles cellulaires. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 189 pp.

Rembur, J. et Nougarède, A., 1987. Microspectrophotometric measurements of DNA by automated computerized scanning in cycling cells of the *Chrysanthemum segetum* shoot apex. Protoplasma, 136, 183-190.

Rest, J.A. et Vaughan, J.G., 1972. The development of protein and oil bodies in the seed of *Sinapis alba* L. Planta, 105, 245-262.

Rives, M., 1965. La germination des graines de vigne. I- Essais préliminaires. Ann. Amélior. plantes, 15, 79-91.

Rives, M., 1984. L'amélioration des plantes. La Recherche, 155, 752-766.

Rives, M., 1986. Les origines du vignoble. Science et Vie, 156, 12-19.

Roberts, D.R., Flinn, B.S., Webb, D.T., Webster, F.B. et Sutton, B.C.S., 1990 a. Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. Physiol. Plant., 78, 355-360.

Roberts, D.R., Sutton, B.C.S. et Flinn, B.S., 1990 b. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. Can. J. Bot., 68, 1086-1090.

Robichaud, C. et Sussex, I.M., 1986. The response of viviparous-1 and wild type embryos of *Zea mays* to culture in the presence of abscisic acid. J. Plant Physiol., 126, 235-242.

Robie, C.A. et Minocha, S.C., 1989. Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. I- The effects of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine. Plant Science, 65, 45-54.

Rondet, P., 1961. Répartition et signification des acides ribonucléiques au cours de l'embryogenèse chez *Myosorus minimus*. C. R. Acd. Sci. Paris, 253, 1725-1727.

Rondet, P., 1962. L'organogenèse au cours de l'embryogenèse chez l'*Alyssum maritimum* Lamk. C. R. Acad. Sci. Paris, 255, 2278-2280.

Rosenberg, L.A. et Rinne, R.W., 1986. Moisture loss as a prerequisite for seedling growth in soybean seeds (*Glycine max* L. Merr.). J. Exp. Bot., 37, 1663-1664.

Rosenberg, L.A. et Rinne, R.W., 1987. Changes in seed constituents during germination and seedling growth of precociously matured soybean seeds (*Glycine max*). Ann. Bot., 60, 705-712.

Sautter, C. et Hock, B., 1982. Fluorescence immunohistochemical localization of malate dehydrogenase isoenzymes in watermelon cotyledon. Plant Physiol., 70, 1162-1168.

Schatt, E., Landré, P. et Nougarède, A., 1985. Etat nucléaire des méristèmes du pois dans la graine sèche ; imbibition et reprise du cycle cellulaire. Can. J. Bot., 63, 2200-2208.

Schwartz, D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, 318 pp.

Senaratna, T., Mc Kersie, B.D. et Bowley, S.R., 1989. Desiccation tolerance of alfafa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. Influence of abscisic acid, stress pretreatment and drying rates. Plant Science, 65, 253-259.

Sengupta, C. et Raghavan, V., 1980. Somatic embryogenesis in carrot cell suspension. I- Pattern of protein and nucleic acid synthesis. J. Exp. Bot., 31, 247-258.

Shimizu, J.I., 1985. Cell regeneration and division of grape mesophyll protoplasts. J. Plant Physiol., 119, 419-424.

Skriver, K. et Mundy, J., 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. Plant Cell, 2, 503-512.

Smith, D.L. et Krikorian, A.D., 1988. Production of somatic embryos from carrot tissues in hormone-free medium. Plant Science, 58, 103-110.

Smith, D.L. et Krikorian, A.D., 1989. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. Amer. J. Bot., 76, 1832-1843.

Smith, D.L. et Krikorian, A.D., 1990. pH control of carrot somatic embryogenesis. Dans Progress in plant cellular and molecular biology. H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van der Plas et J. Van Aartijk éds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 449-453.

Smith, J.A., Kraus, M.R., Borkird, C. et Sung, Z.R., 1988. A nuclear protein associated with cell division in plants. Planta, 174, 462-472.

Smith, T.A., 1984. Putrescine and inorganic ions. Adv. Phytochem., 18, 7-54.

Smith, T.A., 1985. Polyamines. Ann. Rev. Plant Physiol., 36, 117-143.

Sossountzov, L., Sotta, B., Maldiney, R. et Miginiac, E., 1988. Application de techniques immunocytochimiques à la localisation des phytohormones. Bull. Soc. Bot. Fr., 135, 45-61.

Srinivasan, C. et Mullins, M.G., 1980. High-frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. Scientia Horticulturae, 13, 245-252.

Stamp, J.A. et Meredith, C.P., 1988. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. Scientia Horticulturae, 35, 235-250.

Stamp, J.A., Colby, S.M. et Meredith, C.P., 1990. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis spp.*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 22, 127-133.

Steeves, T.A. et Sussex, I.M., 1989. Patterns in plant development. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Sydney, 388 pp.

Steward, F.C., Mapes, M.O. et Mears, K., 1958. Growth and organized development of cultured cells. II- Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot., 45, 705-708.

Szegedi, E. et Haydu, Z., 1988. Transformation de segments de tige et des disques de feuilles de la vigne par *Agrobacterium tumefaciens*. Coll. "Les stratégies de sélection face aux technologies modernes", Paris, septembre 1988, Moët Hennessy - Louis Vuitton éds, p. 68.

Taylor, D.C., Weber, N., Underhill, E.W., Pomeroy, M.K., Keller, W.A., Scowcroft, W.R., Willen, R.W., Moloney, M.M. et Holbrook, L.A., 1990. Storage-protein regulation and lipid accumulation in microspore embryos of *Brassica napus* L. Planta, 181, 18-26.

Taylor, M., Francis, D., Rembur, J. et Nougarède A., 1990. Changes to proteins in the shoot meristem of *Silene coeli-rosa* during the transition to flowering. Plant Cell Physiol., 31, 1169-1176.

Tchang, F., Robert, D. et Mazliak, P., 1980. Utilisation des réserves lipidiques et formation de glyoxysomes et d'étioplastes dans les cotylédons de tournesol (*Helianthus annuus* L.). Physiol. Vég., 18, 117-130.

Theodoropoulos, P.A. et Roubelakis-Angelakis, K.A., 1990. Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free axenic shoot cultures of *Vitis vinifera* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20, 15-23.

Thomas, M.J., 1975. Apports de la cytologie et de la cytochimie à l'étude du développement embryonnaire chez les Phanérogames. Ann. Biol., 14, 293-351.

Thomas, T.L. et Wilde, D., 1987. Analysis of carrot somatic embryo gene expression programs. Dans Plant tissue and cell culture. C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett et B. B. Biesboer éds, Alan R. Liss Inc., New York, p. 83-93.

Tillberg, E., 1983. Levels of endogenous abscisic acid in achenes of *Rosa rugosa* during dormancy release and germination. Physiol. Plant., 58, 243-248.

Timmers, A.C.J., De Vries, S.C. et Schel, J.H.N., 1989. Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). Protoplasma, 153, 24-29.

Titus, D.E. et Becker, W.M., 1985. Investigation of the glyoxysome-peroxysome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy. J. Cell Biol., 101, 1288-1299.

Tolbert, N.E., 1981. Metabolic pathways in peroxysomes and glyoxysomes. Ann. Rev. Biochem., 50, 133-157.

Trelease, R.N., Becker, W.M., Gruber, P.J. et Newcomb, E.H., 1971. Microbodies (glyoxysomes and peroxysomes) in cucumber cotyledons. Correlative biochemical and ultrastructural study in light- and dark-grown seedlings. Plant Physiol., 48, 461-475.

Trigiano, R.N. et Conger, B.V., 1987. Regulation of growth and somatic embryogenesis by proline and serine in suspension cultures of *Dactylis glomerata*. J. Plant Physiol., 130, 49-55.

Vallade, J., 1976. Contribution à la connaissance des problèmes fondamentaux de l'embryogenèse chez les Angiospermes. Recherches sur le *Petunia hybrida* Hort. et quelques autres espèces. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Dijon, 244 pp.

Vallade, J., Alabouvette, J. et Chabbert, A.M., 1987. Le développement de l'embryon zygotique chez *Vitis vinifera* L. Vitis, 26, 215-224.

Van Onckelen, H.A., Caubergs, R., Horemans, S. et De Greef, J.A., 1980 a. Metabolism of abscisic acid in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. and its correlation to germination and α-amylase activity. J. Exp. Bot., 31, 913-920.

Van Onckelen, H.A., Horemans, S. et De Greef, J.A., 1980 b. Abscisic acid metabolism during early stages of development of plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Joint DPGRG and BPGRG Symposium "Aspects and Prospects of Plant Growth Regulators", Monograph 6, 19-26.

Vasil, V., Lu, C.Y. et Vasil, I.K., 1985. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). Protoplasma, 127, 1-8.

Vermylen-Guillaume, M., 1969. Quelques aspects de la structure d'embryons de carotte (*Daucus carota* L.) obtenus *in vitro*. Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique, 102, 181-195.

Vigil, E.L., 1970. Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. J. Cell Biol., 46, 435-454.

Vilaplana, M. et Mullins, M.G., 1989. Regeneration of grapevines (*Vitis spp.*) *in vitro* : formation of adventitious buds on hypocotyls and cotyledons of somatic embryos. J. Plant Physiol., 134, 413-419.

Wardlaw, C.W., 1968. Morphogenesis in plant. A contemporary study. Methuen and Co. Ltd., London, 451 pp.

Welbaum, G.E., Tissaoui, T. et Bradford, K.J., 1990. Water relation of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). III- Sensitivity of germination to water potential and abscisic acid during development. Plant Physiol., 92, 1029-1037.

Wetherell, D.F., 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 3, 221-227.

Wetzstein, H.Y., Ault, J.R. et Merkle, S.A., 1989. Further characterization of somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan (*Carya illinoensis*). Plant Science, 64, 193-201.

White, Ph.R., 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Amer. J. Bot., 26, 59-64.

Wilde, H.D., Nelson, W.S., Booij, H., De Vries, S.C. et Thomas, T.L., 1988. Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. Planta, 176, 205-211.

Wilen, R.W., Mandel, R.M., Pharis, R.P., Holbrook, L.A. et Moloney, M.M., 1990. Effects of abscisic acid and high osmoticum on storage protein gene expression in micospore embryos of *Brassica napus*. Plant Physiol., 94, 875-881.

Williams, B. et Tsang, A., 1991. A maize gene expressed during embryogenesis is abscisic acid-inducible and highly conserved. Plant Mol. Biol., 16, 919-923.

Williams, E.G. et Maheswaran, G., 1986. Somatic embryogenesis : factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Ann. Bot., 57, 443-462.

Wyndaele, R., Van Onckelen, H., Christiansen, J., Rudelsheim, P., Hermans, R. et De Greef, J., 1985. Dynamics of endogenous IAA and cytokinins during the growth cycle of soybean crown gall and untransformed callus. Plant Cell Physiol., 26, 1147-1154.

Xu, N. et Bewley, J.D., 1991. Sensitivity to abscisic acid and osmoticum changes during embryogenesis of alfafa (*Medicago sativa*). J. Exp. Bot., 42, 821-826.

Xu, N., Coulter, K.M. et Bewley, J.D., 1990. Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfafa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. Planta, 182, 382-390.

Zatyko, J.M., Kiss, F. et Szalay, F., 1981. Induction of adventive embryony in cultured ovules of black currant (*Ribes nigrum* L.). Hort. Res., 21, 99-101.

Zeevaart, J.A.D., 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 39, 439-473.

Zimmerman, J.L., Apuya, N., Darwish, K. et O'Carroll, C., 1989. Novel regulation of heat-shock genes during carrot somatic embryo development. Plant Cell, 1, 1137-1146.

Zou, C.J. et Li, P.F., 1981. Induction of pollen plants of grape (*Vitis vinifera* L.). Acta Botanica Sinica, 23, 79-81.

Communications personnelles :

Bouquet, A. : Directeur de Recherches INRA. Station de Recherches Viticoles, Domaine du Chapitre, 34750 Villeneuve-les-Maguelonne.

Côme, D. : Professeur. Université Pierre et Marie Curie, 4, place Jussieu, T. 53, 75252 Paris Cedex 05

Dupré, F. : Grandes Huileries Métropolitaines. 61 Bd. Rabatau, 13267 Marseille.

Mauro, M.C. : Service des Vignes. Moët et Chandon. 20, Av. de Champagne, 51200 Epernay.