

50376
1972
182

50376
1972
182

MEMOIRE présenté à la FACULTE DES SCIENCES de l'UNIVERSITE de LILLE

en vue de l'obtention

du DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES DE SCIENCES NATURELLES

par

Andrée SORLIN - ALIAMUS

=====
=====



Répartition de l'acide ribo-nucléique R N A

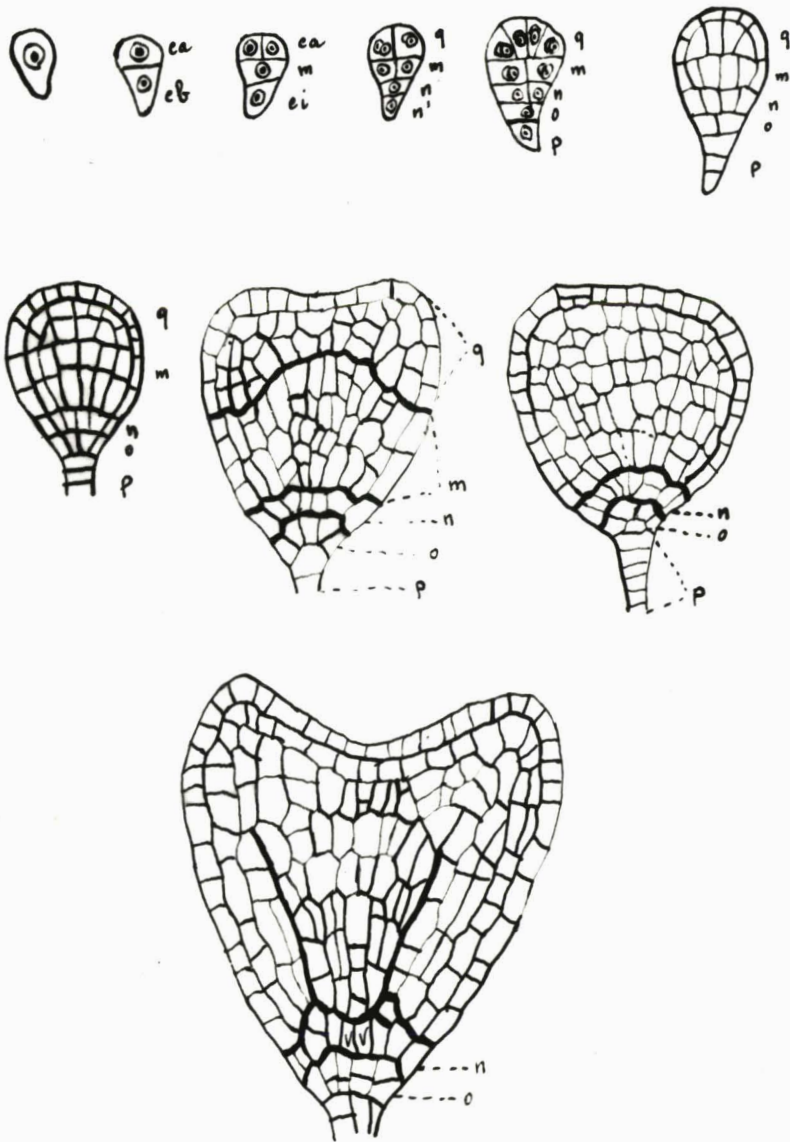
dans l'embryon d'Hélianthus annuus au cours de son développement

=====
=====

soutenu le 15 Décembre ?
,

I.- Introduction.

L'embryologie d'*Hélianthus annuus* est bien connue grâce aux travaux de Souèges sur les Composés (*Senecio vulgaris*) et à ceux de Guttenberg sur *Helianthus annuus*. Voici les principaux stades de développement décrits par ces auteurs ainsi que les destinées des différents étages organisateurs de l'embryon.



- Dans l'étage q, les éléments voisins de l'axe donnent le point végétatif de la tige. Les éléments éloignés sont à l'origine des cotylédons.

- Dans l'étage m naissent l'hypocotyle et initiales du cylindre central de la racine.

- Les cellules axiales de l'étage n donnent les initiales de périlème. Ses cellules externes forment les parties latérales de la coiffe.

- Dans l'étage o se différencie la portion centrale de la coiffe ou columelle.

- L'étage p donne le suspenseur.

La localisation de l'acide ribo-nucléique (R.N.A.) au cours du développement va nous permettre de mettre en évidence l'activité organogène de ces différents étages de l'embryon. Caspersson et Brachet ont en effet démontré que R.N.A. est directement lié à la synthèse des protéines vivantes : il est localisé principalement dans les nucléoles et le cytoplasme des cellules (dans les microsomes et le chondriome) et se trouve en abondance dans les organes qui synthétisent beaucoup de protéines pour leur croissance ou leur multiplication. Le contenu en R.N.A. du nucléole est lié à l'importance de synthèse des protéines dans la cellule. Les cellules et tissus différenciés ont un contenu plus bas en R.N.A. et un nucléole beaucoup moins important (sauf certains types de cellules sécrétrices).

Pour mettre en évidence la distribution du R.N.A. dans les coupes de tissu, on utilise généralement la méthode de Brachet : coloration par le mélange pyronine-vert de méthyle. Cette méthode a été utilisée dans la recherche sur la distribution du R.N.A. : par A. Lance, par exemple, dans l'apex des tiges, par Clowes dans le méristème radiculaire et tout récemment par P. Rondet dans l'embryogénèse de *Lens culinaris* L.

Nous avons utilisé pour détecter les acides nucléiques dans nos préparations, la coloration au bleu de toluidine. Des recherches exécutées au laboratoire d'Anatomie et de Cytologie végétales de l'Université de Varsovie ont démontré que, dans certaines conditions, on obtient une coloration spécifique des acides nucléiques.

Par ce colorant l'acide désoxyribonucléique (D.N.A.) se colore orthochromatiquement en bleu verdâtre et le R.N.A. métachromatiquement en bleu violet. La nuance de la coloration du R.N.A. dépend du fixateur : après des mélanges fixateurs contenant l'acide chromique, par exemple le Graf que nous avons utilisé, l'effet métachromatique est moins marqué qu'après

une fixation au formol ou au carnoy.

II.- Matériel - Méthodes.

Nous disposons d'ovules contenant des embryons à des différents stades de développement : depuis l'oosphère non fécondée, jusqu'à l'embryon presque mûr possédant une part des ébauches foliaires.

La fixation est effectuée dans une modification du fixateur de Navachine renfermant l'acide chromique, l'acide acétique et le formol en pourcentage respectif de 0,4 - 0,5 - 20 (CrAFe, 4-0,5-20). La pénétration du fixateur est facilitée par un séjour de 15 min. sous une pompe à vide. La durée de fixation est de 1 à 3 jours. Puis il faut effectuer les manipulations suivantes : Rinçage à l'eau distillée pendant une demi-heure - déshydratation par les alcools (5%-10%-20%-30%-40%-50%-60%-70%-80%-96%-absolu) puis élimination de l'alcool par le xylène et inclusion à la paraffine. Le matériel inclus est débité au microtome, en coupes de 7 μ d'épaisseur suivant un plan de section bien déterminé : nous connaissons l'orientation de l'embryon à l'intérieur de l'ovule qui est plat. Les cotylédons se développent dans le plan de l'ovule. Nous pouvons donc faire des coupes parallèles ou perpendiculaires au plan des cotylédons.

Coloration :

Le bleu de toluidine a une affinité spécifique pour les acides nucléiques dans certaines conditions, notamment à PH bas (2 à 4). Dans ces conditions au contraire, les protéines contenues dans la préparation ne fixent pas le colorant. Nous avons utilisé une solution tampon de Mc Ilvaine (acide citrique-phosphate disodique à PH 3,4.

Voici la technique de coloration :

- passage au xylène, puis dans les alcools en série décroissante jusqu'à l'eau distillée.
 - rinçage dans une solution tampon ph=3;4.
 - coloration au bleu de toluidine à 0,3 % ph=3,4, pendant une heure à 32°.
 - après avoir épongé l'excès de colorant sur la lame, passage dans 3 solutions-tampon successives à ph=3,4 pendant 10 min.
 - rinçage à l'eau distillée pendant 5 min.
 - séchage délicat des coupes avec du papier buvard.
 - déshydratation à l'alcool butylique tertiaire pendant 2 heures à la température de 32°.
- xylène-baume du Canada.

La spécificité de la coloration du R.N.A. par le bleu de toluidine, dans les conditions décrites, est confirmée par des préparations de contrôle qui sont colorées après une dissolution préalable des acides nucléiques par une hydrolyse dans l'acide trichloro-acétique (TCA). Le procédé est le suivant : avant la coloration on hydrolyse des préparations dans TCA à 5% pendant 15 min. à 90°, puis on les lave dans trois bains d'alcool à 70°, dans l'eau distillée, et après un rinçage rapide dans le tampon PH=3,4, on suit le procédé de coloration déjà décrit : Dans ces conditions, le cytoplasme et le noyau sont incolores.

Les microphotographies ont été exécutées à l'aide d'un microscope "Zétopan" Reichert-Vienne (objectif plan 10x et 40 x
oculaire plan 5x

Appareil photographique "Exalta" Film Agfa-Isopan FF

Filtre jaune.

Le grossissement des photographies présentées dans le travail est de 105x et 500x.

III.- Observations.

A) Description de l'ovule non fécondé.

Comme chez tous les composés, dans la cavité ovarienne, nous ne trouvons qu'un seul ovule. Cet ovule est anatropé, unitégumenté et tenuinucellé. Le nucellus se désorganisant rapidement, le sac embryonnaire est en contact direct avec la couche cellulaire interne du tégument ovulaire. Celle-ci se différencie par une élongation radiale des cellules et forme un endothélium qui limite le sac embryonnaire,

Cette situation générale nous est présentée photo N° 1. Nous remarquons aussi sur cette photo que le sac embryonnaire est divisé en deux parties :

- une partie micropylaire contenant les synergides,

l'oosphère,

la cellule initiale de l'albumen.

- une partie chalazienne occupée par les 2 antipodes.

Les photos 2 - 3 - 4 nous montrent en détail ces différents composants

- les synergides (photo 3) sont deux cellules pyriformes accolées.

Leur extrémité micropylaire est étroite, elle remplit complètement l'entrée du sac embryonnaire et présente sur sa portion externe latérale un crochet de fixation. Le cytoplasme de cette extrémité est très basophile et contraste avec le reste de la synergide qui est pâle. Le noyau se trouve dans la partie médiane, il n'a qu'un petit nucléole. A la partie chalazienne de la cellule, nous avons une large vacuole.

- l'oosphère est accroché au point de rétrécissement des synergides par son bord saillant qui pénètre dans des sillons correspondants des synergides. Comme chez ces dernières, le cytoplasme situé au point de fixation est basophile. Un gradient cytoplasmique en R.N.A. se manifeste ici aussi, mais il est inverse de celui des synergides. Dans l'oosphère, le cytoplasme est concentré à la partie chalazienne où il est très dense et très basophile, tandis qu'à la moyenne, il est fortement vacuolisé et très faiblement coloré.

Le noyau est très distendu, peu chromophile, il baigne dans le cytoplasme au pôle apical et possède un énorme nucléole très riche en R.N.A. (voir photos 2 et 4).

- la cellule initiale de l'albumen occupe le reste de la portion micropylaire du sac : son noyau se caractérise de la même façon que celui de l'oosphère : volumineux, peu chromophile, à nucléole unique très important et très coloré. Il se situe juste sous l'oosphère. Il est entouré par un cytoplasme basophile très vacuolisé, plus dense au voisinage des synergides.

- la portion chalazienne du sac est occupée par les deux antipodes superposées à cytoplasme très basophile, fortement vacuolisée et plurinuclée, la multiplication des noyaux se faisant au cours du développement du sac embryonnaire.

- l'endothélium présente des cellules à cytoplasme très coloré. Les tissus ovulaires, au contraire, ont un cytoplasme très faiblement coloré mais autour du sac embryonnaire on constate une dégénérescence des couches cellulaires du tégument de l'ovule. C'est là que l'endothélium puise les aliments nécessaires à la nutrition du sac puis de l'embryon. Les parois cellulaires ont, dans cette portion désorganisée, une coloration métachromatique très forte.

B) Après la fécondation.

La photo 6 permet de nous rendre compte des changements apportés par la fécondation. Le tube pollinique pénètre dans le sac embryonnaire en détruisant une synergide : le cytoplasme de cette cellule devient alors très basophile, il est bourré d'acides nucléiques. Ceci est bien visible sur la photo, à gauche de l'oosphère. La 2ème synergide est intacte (photo 7). Nous l'observerons encore dans le stade de l'embryon octocellulaire (photo 9) puis il semble qu'elle est vite digérée.

L'oosphère présente les mêmes caractères qu'avant la fécondation (gradient cytoplasmique en R.N.A. croissant du pôle micropylaire au pôle chalazien, noyau énorme situé dans la portion apicale, gros nucléole très coloré). Il est en période de repos et se prépare à la première division.

Le noyau primaire de l'endosperme provenant de la fécondation du noyau secondaire, a déjà subi une première division. Nous pouvons observer à droite de

l'oeuf, le 1^{er} noyau fils volumineux et contenant deux nucléoles très basophiles entouré d'une portion cytoplasmique très riche en R.N.A. A gauche de l'oeuf, la tache de cytoplasme très colorée indique l'emplacement du 2^{ème} noyau fils que nous trouvons dans la coupe suivante et qui possède les mêmes caractéristiques morphologiques que le 1^o.

Le développement de l'albumen débute donc dans la partie micropylaire du sac embryonnaire. Il est, à son origine du type nucléaire, la 1^o division n'étant pas suivie par la formation de cloison. Au stage correspondant à l'embryon bicellulaire, nous avons 16 noyaux de l'albumen et pas de parois cellulaires. Les noyaux sont encore libres mais il est probable que la formation de l'albumen cellulaire a lieu dans les mitoses suivantes, car dès l'embryon tétracellulaire, nous observons un début de cloisonnement entre les noyaux de l'endosperme. C'est ce que nous montre la photo 9 : à gauche de l'embryon s'individualise une cloison dans l'albumen. A partir de ce moment, l'albumen, qui n'occupait que la partie micropylaire du sac, va remplir petit à petit la partie chalazienne. Dans les photos 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16, nous assistons à cette progression. La photo 21 nous présente un stade encore plus avancé, mais il est à remarquer que le cytoplasme est plus dense, plus riche en R.N.A. dans la partie micropylaire et sur les bords externes de l'endosperme lieux de multiplication intense des cellules.

Au stade représenté par la photo 24, l'albumen n'a pas encore occupé le volume entier du sac, à la partie chalazienne, nous trouvons encore quelques noyaux libres.

Chez les embryons beaucoup plus avancés (photo 52) la basophilie de l'albumen diminue notablement. Les nucléoles qui étaient pendant tout le développement assez importants ont beaucoup diminué. Cependant le contraste entre les deux extrémités du sac et entre les bords et la partie centrale est toujours visible; tandis qu'autour de l'embryon, il y a début de digestion. On peut encore trouver quelques mitoses dans les 2 ou 3 assises qui tapissent le sac embryonnaire.

Pendant le développement de l'embryon, le volume occupé par l'albumen augmente. Parallèlement, nous avons un accroissement des tissus ovulaires, principalement par allongement cellulaire et une croissance de l'endothélium du sac surtout par mitoses. Le cytoplasme des cellules endothéliales est toujours basophile.

Les antipodes ne sont pas modifiées par la fécondation. Pendant le développement de l'embryon, leur volume augmente. Mais cette augmentation n'est pas

accompagnée de divisions cellulaires ou de multiplications de noyaux. Le cytoplasme formant une mince couche pariétale autour d'une grande vacuole centrale, perd sa basophilie. La photo 13 permet de nous rendre compte de l'aspect de ces antipodes quand l'embryon est sphérique. Nous les retrouvons pendant tout le développement au stade à deux primordia foliaires, elles ne sont pas encore dégénérées mais présentent alors un cytoplasme faiblement coloré et des noyaux très colorés. Sans aucun doute, cette persistance des antipodes à noyaux multiples nous suggère qu'elles doivent jouer un rôle biologique important, peut-être une fonction nourricière qui compléterait celle de l'assise spécialisée différenciée dans le tégument de l'ovule.

C) Localisation du R.N.A. dans l'embryon,
au cours de son développement.

Le gradient en R.N.A. croissant de l'extrémité micropylaire à l'extrémité chalazienne, observé dans l'oeuf se retrouve dans les premiers stades du développement.

Comme nous avons vu précédemment l'oosphère fécondé a son R.N.A. concentré au pôle apical. A la première division de segmentation, il y a répartition inégale de cet R.N.A. entre les deux cellules filles. La cellule apicale C_a et la cellule basale C_b issues de la première segmentation se partagent le R.N.A. contenu dans le cytoplasme du zygote mais C_a en reçoit plus que C_b qui a sa portion micropylaire presque incolore, excepté le point de fixation.

Dans l'embryon tétracellulaire, représenté par la photo 9, nous avons maintenant deux cellules apicales juxtaposées intensément colorées, tandis que C_b distribue inégalement son cytoplasme basophile entre m et ci. La séparation entre ces deux étages, non visible sur la photo, est parfaitement nette sur la préparation correspondante et se situe à travers de la tache sombre seule indiquée sur la photo. Nous avons ici encore une répartition inégale du R.N.A. : la cellule m a son cytoplasme entièrement basophile, tandis que dans la cellule ci, seule la partie chalazienne est très colorée, la partie moyenne destinée à donner le suspenseur est très pâle. La portion micropylaire, point de fixation du jeune embryon aux synergides, est relativement colorée : caractère que nous avons déjà observé dans l'oosphère.

Quand tous les étages de l'embryon sont différenciés, q m et n qui donneront la partie la plus importante de l'embryon sont très basophiles. L'étage o destiné à donner la coiffe, est moins coloré. L'étage p qui est à l'origine du suspenseur est plus pâle. Tout ceci se vérifie sur les photos 10 - 11 et 12.

Il est évident qu'à partir de ce stade, la répartition du R.N.A. dans l'embryon ne peut plus être la conséquence d'une distribution inégale du cytoplasme basophile lors des divisions cellulaires comme dans les premières divisions de segmentation que nous avons décrites. Nous aurons maintenant un métabolisme spécifique dans les différentes parties de l'embryon : au fur et à mesure du développement, nous allons assister à une nouvelle répartition du R.N.A. en liaison avec l'apparition et le fonctionnement des différents territoires organogènes de l'embryon. Dès le stade suivant, apparaît le début de différenciation de ces territoires. Observons l'embryon représenté sur les photos 13 et 14. Le dermatogène est très fortement coloré, faiblement vacuolisé, surtout dans les étages q et m. En comparaison avec la photo précédente, ce sont ces deux étages qui se sont le plus développés : q se segmente, dans sa partie axiale nous avons déjà trois assises de cellules superposées; dans l'étage m, après des divisions périclines, on constate une forte croissance axiale et des divisions transversales. Ces changements sont accompagnés d'une vacuolisation du cytoplasme, ce qui contraste avec l'aspect de l'étage n qui ne comprend qu'une seule assise de cellules peu vacuolisées. Sur la photographie, les deux cellules centrales de cet étage sont très nettes. Mais si l'aspect du cytoplasme diffère dans les trois étages précédemment décrits, l'intensité de la coloration est la même tandis qu'elle s'affaiblit dans o et p. L'extrémité bicellulaire de la portion micropylaire du suspenseur est ici encore très colorée.

Les photos suivantes 15 et 16 nous montrent un embryon arrivé à peu près au stade de développement que le précédent mais coupé dans un plan perpendiculaire. Si nous comparons ces deux formes, nous constatons que la répartition du R.N.A. dans les différentes portions de l'embryon est la même : q et m sont vacuolisés et contrastent avec n. Tous trois ont une même intensité de coloration tandis que o et p sont plus pâles. Dans ce dernier exemple, ce qui est remarquable, c'est la partie apicale du dermatogène qui devient la plus intensément colorée.

Ce caractère se retrouve dans l'embryon un peu âgé (photos 17 à 20). La coupe a été exécutée dans un plan comparable à celui représenté par les photos 13 / 14, ce qui nous permet d'établir une correspondance entre les différents étages des deux embryons. Nous avons ici un stade plus âgé mais encore avant l'initiation des cotylédons. La limite entre les étages q et m est encore bien nette ici : m qui engendre l'hypocotyle et la plus grande partie de la racine s'allonge fortement. Il comprend maintenant quatre assises de cellules vacuolisées à noyaux en pleine activité mitotique. Il est bien délimité de l'étage n, qui est unisériel, faiblement vacuolisé. L'étage o à l'origine de la coiffe reste pâle.

Le dermatogène est toujours fortement coloré et peu vacuolisé, surtout dans la

partie apicale; Mais ici sous ce dermatogène, dans l'assise sous-épidermique de l'étage q, à l'apex même de l'embryon nous observons un groupe de grandes cellules d'aspect tout à fait différent des cellules environnantes et surtout de celles du dermatogène sous-jacent.

Ces cellules apicales ont leur cytoplasme faiblement basophile, un grand noyau peu chromophile à nucléole petit. Elles sont bien visibles dans les photos 18 - 19 - 20 qui représentent trois coupes successives du même embryon.

Ce groupe de cellules se retrouve au stade suivant : photos 21/22. Au pôle apical de l'embryon, dans l'assise sous-épidermique se distinguent 6 cellules plus pâles que leurs voisines, leur noyau est gros, peu chromophile, il renferme un petit nucléole.

Cette coupe a été exécutée dans un plan perpendiculaire à celui des cotylédons. De chaque côté de l'apex de cet embryon se différencient donc les ébauches cotylédonaires précédées comme nous le voyons ici, par une accentuation de la teneur en R.N.A. dans le dermatogène de l'étage q et dans l'assise sous-jacente.

Dans l'embryon plus âgé, nous voyons naître les soulèvements cotylédonaires (photo 23) tandis que l'apex se dessine de plus en plus nettement :

dans l'axe de l'étage q on distingue un groupe de cellules composé de :
une assise de 4 cellules du dermatogène très basophiles
deux assises sous-jacentes également tétracellulaires à cytoplasme dense et basophile.

Ces trois assises cellulaires possèdent des noyaux peu chromophiles dont les nucléoles sont au moins quatre fois plus petits que celui des cellules environnantes.

Dans tout le reste du corps embryonnaire, les nucléoles sont très grands, excepté dans la future coiffe et le suspenseur si nous comparons ce nouvel aspect de l'apex avec celui que nous avons décrit dans les stades plus jeunes (photos 17/20) il semble que ce groupe de cellules ^{sous}épidermiques dérive par division récente des grandes cellules à cytoplasme pâle, observées à l'apex de l'embryon (photos 18/20).

La répartition générale du R.N.A. dans ces deux embryons est la même qu'au stade précédent. Dans la photo 23 l'étage n est bien caractérisé par l'arrangement de ses cellules et la densité de leur cytoplasme. -o- est toujours faiblement coloré.

Au cours des étapes suivantes du développement, nous assistons à l'évolution de l'apex, à l'allongement de l'hypocotyle, ce qui conduit à un allongement général de l'embryon. Parallèlement se développent les cotylédons.

Étudions d'abord ces différentes transformations dans les photos 24/25
26/27 28/29 31/32.

La photo 25 nous montre un apex constitué comme chez le dernier embryon étudié, d'une assise de cellules du dermatogène et de deux assises cellulaires sous-jacentes mais d'un cytoplasme plus dense, plus coloré que précédemment, à noyau plus chromophile.

A un stade plus avancé (photos 26/27) l'apex s'allonge axialement par divisions périclines dans la deuxième assise sous-épidermique. La coloration du dermatogène sus-jacent s'affaiblit.

La photo 29 qui est une coupe faite dans un plan perpendiculaire, nous montre le même processus d'allongement apical tandis que dans la photo 32, il semble que ce soit maintenant la troisième assise sous-épidermique apicale, issue du dédoublement de la deuxième assise, qui est le siège de divisions périclines.

Cela aboutit à la formation d'un meristème médullaire qui provient donc de la deuxième assise sous-épidermique au stade représenté par la photo 23. Au-dessus ~~de ce meristème~~, on voit au centre de l'apex un massif de cellules appartenant au dermatogène et aux deux assises sous-jacentes qui se différencie des cellules environnantes par son cytoplasme très faiblement vacuolisé, ses noyaux peu chromophiles à petit nucléole (photo 32).

En même temps, les cellules de l'étage n continuent à s'allonger axialement, se divisent transversalement et donnent naissance à l'hypocotyle. Les cotylédons se développent et, à leur partie terminale, le dermatogène est beaucoup plus basophile que dans tout le reste de l'embryon (photo 35).

A ce stade, l'aspect de la racine est représenté par la photo 30. Le plérôme et le périblème sont bien délimités. Ils ont des cellules à cytoplasme basophile et fortement vacuolisé, ce qui fait un contraste avec le groupe central de l'étage n (soi-disant cellules initiales de l'écorce) qui est moins basophile mais qui a un cytoplasme très dense.

Sous ce groupe, dans la partie centrale de la coiffe, on constate le début de la formation de la columelle par divisions transversales tandis que sur les bords de la coiffe on trouve des divisions périclines. Malgré ce signe d'activité mitotique, le cytoplasme des cellules de la coiffe est faiblement basophile, leurs nucléoles sont petits.

Dans l'embryon un peu plus âgé, à la croissance longitudinale de l'apex s'ajoute une croissance horizontale, dans un plan parallèle à celui des cotylédons. C'est aussi le plan de section de l'embryon représenté photo 33 et de celui que nous avons étudié photos 28/29. Dans la portion apicale (photo 33), nous constatons

de nombreuses mitoses tangentielle dans l'épiderme et l'assise sous-épidermique. Dans l'assise sous-jacente s'individualise un groupe de cellules déjà divisées périclinalement, à cytoplasme fort basophile. Leur position réciproque nous indique qu'elles ont une origine commune. La division périclinale de ces cellules aboutit à la formation du méristème médullaire.

Après son expansion axiale et horizontale, l'apex subit un appauvrissement général en R.N.A. surtout dans les deux assises cellulaires sous-épidermiques, moins marqué dans le dermatogène. Il semble que cette perte du R.N.A. se fasse en plusieurs étapes. Elle débute dans la première assise sous-épidermique et se poursuit ensuite dans les assises voisines comme nous l'indiquent les photos 34/35 où les deux premières assises ^{sous}épidermiques sont surtout transformées : leur cytoplasme a de petites vacuoles, il est faiblement coloré, leur noyau est plus gros et peu chromophile, leurs nucléoles sont petits. Sous cet apex apparaissent des cellules du méristème médullaire de l'hypocotyle. Elles sont plus basophiles que les cellules apicales mais plus pâles que l'extrémité radiculaire et les cotylédons.

A ce stade, la racine a achevé une étape suivante dans l'organisation de son méristème, par l'individualisation des cellules initiales de la columelle et par l'activité des cellules initiales du plérome et de la partie latérale du périblème (photo 36). L'activité de ces centres générateurs est soulignée par une forte basophilie du cytoplasme alors qu'entre eux, on trouve les cellules centrales de l'étage n peu actives, plus pâles. Cette évolution dans l'organisation du méristème radiculaire est évidente quand on compare cette photo 36 avec un stade plus jeune représenté photo 30 particulièrement dans la coiffe, où nous avons auparavant un début de développement par multiplication cellulaire dans tout l'étage o. Maintenant nous constatons l'individualisation d'un centre générateur de la coiffe indiqué sur la photo 36 par les deux cellules axiales adjacentes, fortement colorées.

Dans un embryon un peu plus âgé, l'appauvrissement en R.N.A. des cellules de l'apex est encore plus important, ce que montrent les photos 38 et 39. Le dermatogène apical s'est recoloré depuis le stade représenté par la photo 35 mais les deux premières assises sous-épidermiques, sont encore plus transformées. Leurs cellules augmentent de taille, contiennent de grandes vacuoles, un noyau encore agrandi et presque incolore, un nucléole très petit. Il y a ici accentuation des caractères observés dans les photos 34/35, ceci non seulement pour l'apex mais aussi pour l'ensemble de l'embryon : la moelle hypocotyle est plus développée et plus pâle ainsi que la base des cotylédons, tandis que leur partie extrême est très colorée. L'extrémité radiculaire est aussi basophile, et l'on voit se dessiner des arcs plus riches en R.N.A., se dirigeant du bord du cylindre central de la racine vers l'apex à travers les cellules médullaires. Ce sont les futurs cordons procambiaux bien visibles sur la photo 38.

En somme, depuis le début du développement (dès le stade représenté par la photo 17) nous avons assisté à une transformation de l'apex : d'abord individualisation du territoire apical (photos 17/20 - 22/25) puis croissance en hauteur et en largeur, accompagnée de l'allongement de l'axe hypocotylé, puis repos des cellules apicales (photos 35 - 38/39). Dans les photos 38/39, il semble que l'apex a atteint le repos maximum juste avant la formation des ébauches foliaires, tandis que se développent les cotylédons, la racine et les cordons procambiaux. Ces cellules apicales ont perdu leurs caractères méristématiques, elles ont de grandes vacuoles, un grand noyau peu chromophile avec un petit nucléole, quatre fois plus petit que dans toutes les autres parties de l'embryon. Leur cytoplasme réagit plus sensiblement que celui des autres cellules à la fixation (les rétrécissements cellulaires sont visibles seulement à la partie apicale dans la photo 39).

Ensuite nous assisterons à une différenciation des cellules apicales, à une reprise progressive de l'activité méristématique qui amènera à la formation des primordia foliaires. Comme nous allons l'observer dans les photos suivantes, cette reprise progressive de l'activité mitotique est marquée par une réapparition du R.N.A. dans la région apicale (photo 40 par exemple, où nous avons un retour de la basophilie dans la deuxième assise sous épidermique). La photo 41 nous montre dans l'apex d'un embryon un peu plus âgé, coupé dans un plan perpendiculaire au précédent. Dans les photos 42/43 le centre de l'apex n'a pas encore été touché par la différenciation mais ce groupe de cellules pâles bien que pauvres en R.N.A. est le siège de mitoses.

La première conséquence de ces divisions nombreuses va être l'accroissement transversal et longitudinal de la région apicale, dans le plan des cotylédons (photos 44/45) et dans le plan perpendiculaire (photo 46). En même temps commence à se former le soubassement foliaire par divisions périclines dans la deuxième assise sous-épidermique et les suivantes. L'apex est alors très riche en R.N.A. Dans la photo 47, le développement de l'apex est encore plus important.

Sur toutes ces photos, se dessinent nettement à travers la moelle les arcs des futurs cordons procambiaux qui se dirigent vers les futures ébauches foliaires.

A ce stade, la racine a l'aspect indiqué par la photo 48. On voit très bien les initiales du périlème, petit groupe de cellules moins colorées que les initiales du plérome. Les colonnes qui forment la columelle sont bien nettes.

Après s'être élargi, épaissi, l'apex donne naissance aux primordia foliaires. Les photos 50- 51 - 52/53-54-55/56 montrent les étapes successives de la formation des ébauches foliaires.

Nous observons :

1°) la structure de l'apex au moment de la naissance de la première paire de primordia. Il semble constitué de deux assises tunicales et d'un massif cellulaire sous-jacent que nous pouvons peut-être homologuer au corpus. Sous ce corpus se trouve le méristème médullaire.

2°) le fonctionnement de l'apex : l'initiation foliaire a lieu sur les bords de l'aire apicale. Les primordia naissent à partir de divisions périclines et transversales dans le sous-épiderme. Le dermatogène ne produit que des divisions transversales, il agrandit sa surface au fur et à mesure que se développent les primordia. Les bords de l'aire apicale où naissent les feuilles, sont plus riches en R.N.A. que le centre de l'apex où l'on remarque dans toute la série de photographies, un groupe de cellules au repos, un cytoplasme faiblement basophile, un noyau peu chromophile, à petit nucléole. Mais il semble que dans ces cellules centrales peu actives et peu basophiles, le R.N.A. réapparaît ensuite. Cette réapparition est liée à la reprise de l'activité mitotique. C'est ce que nous montre la photo 51 : dans la 2° assise tunicale, la position des cellules filles nous indique qu'elles dérivent de deux mitoses périclines dans cette deuxième assise. Celle-ci fournit donc des cellules au tissu sous-jacent c'est à dire au corpus. Une situation analogue est représentée par la photo 54.

Le dernier stade étudié est celui des photos 55/56. Les primordia foliaires sont déjà bien formées, des cordons procambiaux arrivent jusqu'à elles. Au centre de l'apex, nous avons un groupe de cellules inactives (sur la photo nous ne voyons qu'une seule cellule).

Dans l'ensemble de l'embryon, la répartition du R.N.A. est caractéristique : les parties les plus colorées sont les primordia foliaires, les cordons procambiaux, l'apex de la racine, le bord externe des cotylédons et de l'axe hypocotylé tandis que la moelle est plus pâle.

L'extrémité de la racine est représentée par la photo 49, nous observons d'abord une nette délimitation du plérome grâce à la forte basophilie de ses initiales. Sur cette photo, qui représente une coupe strictement axiale, on voit très bien les complexes cellulaires à origine commune dans le plérome, le péri-cycle, le dédoublement dans l'écorce interne et la limite entre l'écorce externe et la partie latérale de la coiffe. Les soi-disant initiales du péri-blème non actives sont peu basophiles et ont un grand noyau peu chromophile.

L'embryon mûr a été étudié aussi mais il présente une coloration déficiente inexplicable. Les cellules bourrées d'inclusions se colorent mal; ce dernier stade demande de nouvelles recherches.

IV - Conclusion.

Dans la partie descriptive de notre travail, nous avons étudié l'organisation du sac embryonnaire mûr, le développement de l'albumen, et, particulièrement, le développement de l'embryon jusqu'à la formation des premières ébauches foliaires; en suivant la répartition du R.N.A.

Depuis une vingtaine d'années, grâce aux recherches histo-chimiques de Brachet sur les animaux, grâce à celles de Buvat, Lance, Rondet, sur les végétaux, on sait que la distribution du R.N.A. dans un organe ou un tissu, dans l'embryon, dans l'apex de tige ou le méristème de la racine, a une valeur significative. Elle indique une synthèse intense des protéines précédant ou accompagnant l'activité méristématique et organogène ou liée à une fonction sécrétrice. Une distribution inégale du R.N.A. dans le cytoplasme d'une seule cellule est aussi significative. Par exemple; le gradient polaire de l'oeuf d'amphibiens révèle des différences dans l'organisation et le fonctionnement à l'intérieur de l'oeuf et mène à une différenciation polaire de l'embryon.

Nos recherches sur le sac embryonnaire non fécondé, ont démontré une très grande teneur en R.N.A. dans l'endothélium, ce qui indique sans doute sa fonction sécrétrice et digestive. Elles ont démontré une différenciation polaire dans les synergides, leur extrémité étant plus riche en R.N.A. et un gradient polaire très accentué dans l'oosphère. La cellule initiale de l'albumen ne présente pas, avant la fécondation, de gradient polaire dans la distribution du R.N.A. cytoplasmique, mais elle montre une polarité dans la répartition du cytoplasme, la partie chalazienne étant plus richement vacuolisée. Après la fécondation, c'est l'albumen qui commence son développement le premier par divisions libres des noyaux dans la partie micropylaire de l'initiale de l'albumen riche en cytoplasme. Son développement ultérieur est polarisé dirigé vers la partie chalazienne. C'est au cours des premières mitoses qu'apparaît un gradient cytoplasmique en R.N.A., décroissant de la partie micropylaire à la partie chalazienne. Ce gradient se maintient pendant tout le développement de l'albumen. Il semble que son installation se fait sous l'influence des noyaux au cours des ^{premières} étapes du développement de l'albumen, ce qu'indique la photo 6. Dans une étape ultérieure, s'installe dans l'endosperme un nouveau gradient, le gradient radial : le R.N.A. décroît de l'assise externe vers le centre de l'albumen. Ses assises externes montrent une prolifération cellulaire intense. En somme, en suivant la répartition du R.N.A. au cours du développement de l'albumen, nous pouvons constater l'installation d'un gradient polaire et l'apparition d'un gradient radial qui indiquent son mode de croissance.

L'oosphère, à l'inverse de la cellule initiale de l'albumen, a un gradient polaire très net dans la distribution de son R.N.A. cytoplasmique. Après la fécondation, pendant les premières divisions de segmentation, on constate les conséquences de cette différenciation polaire : une distribution inégale du R.N.A. Nous pouvons suivre pas à pas cette distribution et constater que la partie apicale de l'embryon reçoit la majeure partie du cytoplasme riche en R.N.A. L'étude de la répartition du R.N.A. au cours des premières divisions de segmentation montre clairement le caractère "différenciateur" de cette division. La différenciation fondamentale des principaux territoires de l'embryon, qui se conserve pendant tout le développement est donc liée à la répartition du R.N.A. du zygote.

Tous les changements significatifs dans la répartition du R.N.A. au cours du développement ultérieur révèlent des différences d'activité des diverses parties de l'embryon. Ils sont liés à la différenciation des territoires organogènes et aux variations dans l'activité de ces territoires : les premières manifestations du développement des cotylédons sont indiquées par l'apparition du R.N.A. dans le dermatogène latéral et l'assise sous-jacente où ont lieu les premières mitoses de l'initiation cotylédonnaire. La croissance des cotylédons est soulignée par une quantité de R.N.A. assez élevée à leurs extrémités. L'individualisation des cordons procambiaux est annoncée par deux arcs basophiles qui traversent l'hypocotyle à l'emplacement des futurs cordons déjà avant l'initiation des primordia foliaires. Le développement de la racine que nous avons suivi depuis les premiers stades montre l'organisation progressive du méristème radiculaire : l'activité des centres générateurs nous est révélée par la basophilie de leur cytoplasme. Après délimitation des territoires respectifs du plérome et du périblème, après leur développement sans participation de cellules initiales, on constate l'individualisation de ces cellules initiales du plérome et des parties latérales du périblème, bien caractérisées par leur richesse en R.N.A. et génératrices des complexes cellulaires à origine commune que nous avons observé dans le plérome. Nous avons remarqué en même temps l'installation du centre générateur de la columelle.

Enfin cette méthode de recherches nous a révélé les fluctuations remarquables du point végétatif au cours de l'embryogénèse. Les premiers changements dans la répartition du R.N.A. à l'apex de l'embryon indiquent la différenciation du centre apical que l'on constate déjà avant l'initiation des cotylédons/ Cela se manifeste par l'apparition d'un petit groupe de cellules singulières à cytoplasme faiblement basophile, à grand noyau peu chromophile, avec un petit nucléole. La différenciation de ces cellules apicales précède la première

étape de l'activité apicale qui a lieu lors du développement des cotylédons. Elle se traduit par la formation du méristème médullaire, par la croissance de l'aire apicale, aux dépens de ce complexe cellulaire apical constitué par le dermatogène et les deux assises sous-jacentes dont le cytoplasme s'est enrichi en R.N.A. Après son élargissement et la première étape du développement de la moelle, avant l'initiation des soubassements foliaires, l'apex présente un deuxième appauvrissement en R.N.A., surtout dans les deux premières assises cellulaires sous-épidermiques; leurs cellules ont un cytoplasme à grandes vacuoles, faiblement coloré, un noyau très gros peu chromophile, un nucléole petit. L'apex est au repos, tandis que s'ébauchent les cordons procambiaux, que se développent les cotylédons.

Puis une nouvelle onde d'activité l'envahit, les cellules apicales se différencient, présentent un regain d'activité mitotique, leur contenu en R.N.A. augmente. L'apex s'élargit et donne naissance aux ébauches foliaires. Cette nouvelle étape nous est révélée par une concentration du R.N.A. sur les bords de l'aire apicale; au centre, immédiatement après l'initiation de la première ^{paire} de feuilles, nous constatons une troisième diminution du contenu en R.N.A.

Toutes ces variations dans le contenu apical en R.N.A. au cours du développement de l'embryon, nous montrent donc les fluctuations dans l'activité de l'apex; elles nous montrent aussi l'état singulier que présentent les cellules apicales à certaines étapes du développement: déficience remarquable en R.N.A. et aussi, noyau énorme, peu chromophile. L'aspect de ce noyau est comparable à celui du noyau de l'oosphère avant la fécondation. Quelle est la signification exacte de cet état singulier? Cela demande de nouvelles recherches.

Bibliographie.

- 1) Brachet J. 1957 - Biochemical cytology, Academic Press New York.
- 2) Buvat R. 1952 - Structure, evolution et fonctionnement du méristème apical de quelques dicotylédones.
Ann. de Sc. Nat. Bot. II^o Série 13, 199-300.
- 3) Clowes, F.A.L. 1956- Nucleic acids in root apical meristems of Zea New Phytologist 55: 29-34.
- 4) Gifford, JR, E.M. 1954 - The shoot apex in angospermes.
Bot. Rev. 20 : 477-529.
- 5) Guttenberg; V.H.J, Burmeister und HJ. Brossel 1955.
Studien über die Entwicklung des Wurzelvegetationspunktes der Dikotyledones II Planta, 46 : 179-222.
- 6) Lance A/1957 Recherches cytologiques sur l'évolution de quelques méristèmes apicaux et sur ses variations provoquées par des traitements photo-périodiques.
Ann. des Sc. Nat. Bot. II^o Série 18: 91-421.
- 7) Lison L. 1953 - Histochimie et cytochimie animales.
2nde ed. Gauthiers-Villars, Paris.
- 8) Maheshwari P. 1950 - An introduction to the embryology of angiosperms Mc.Graw-Hill, New-York.
- 9) Rondet P. 1958 - Répartition et signification des acides ribonucléiques au cours de l'embryogénèse chez Lens culinaris L.C.R.A.C.S. Paris 246.2396-2399.
- 10) Souèges R. 1937.
Les lois du développement-Hermann & Cie - Paris.
Souèges R. 1939 - Embryologie et classification.
Essai d'un système embryologique.
Partie générale. Hermann & Cie Paris.
Souèges R. 1948 - Embryologie & Classification.
Essai d'un système embryogénique.
Partie spéciale : 1^o période du système.
Hermann & Cie - Paris.
- 11) Vazart B. 1958. Différenciation des cellules sexuelles & fécondation chez les phanérogames.
Springer-Verlag. Wien.

NOMENCLATURE DES PHOTOGRAPHIES.

- 1 - L'ovule avant la fécondation - Vue générale du sac embryonnaire et de ses constituants.
- 2 - L'oosphère non fécondé.
- 3 - Coupes successives du même sac embryonnaire avant la fécondation.
- 40- 3) les deux synergides sous lesquelles se distingue l'oosphère.- la cellule initiale de l'albumen séparé des antipodes par une cloison.
 4) l'oosphère non fécondé.
- 5/6 - Début du développement après la fécondation. L'albumen a deux noyaux, le zygote est en période de repos.
- 7 - Après la fécondation - La 2^o synergide est intacte.
- 8/9 - Embryon tétracellulaire - 1^o cloisonnement dans l'albumen.
- 10/11 - Tous les étages générateurs de l'embryon sont constitués.
- 12 - Embryon sphérique - L'albumen envahit l'extrémité chalazienne.
- 13/14-15/16- Embryons arrivés au même stade de développement, coupés dans deux plans perpendiculaires.
Début de différenciation des territoires organogènes de l'embryon : basophilie plus forte dans le dermatogène apical.
Dans l'endosperme nous observons un gradient polaire et l'installation du gradient radial.
- 17/18/19/20 - Coupes successives d'un même embryon avant la formation des cotylédons.
1^o étape de l'individualisation de l'apex : présence dans l'assise sous-épidermique d'un groupe de grandes cellules à état singulier.
- 21/22 - Coupe exécutée dans le plan perpendiculaire à celui des cotylédons. La formation des ébauches cotylédonnaires est annoncée par une basophilie plus accentuée de chaque côté de l'apex. Celui-ci est caractérisé par un groupe de six cellules sous-épidermiques spéciales.
- 23 - Formation des soubassements cotylédonnaires.
L'apex se dessine plus nettement.
- 24/25 - Embryon en forme de coeur.
L'apex comprend (une assise de cellules du dermatogène;
 (deux assises sous-jacentes.
- 26/27 - Début de l'allongement axial de l'apex. Divisions péricleines dans la deuxième assise sous-épidermique.
- 28/29 - Même stade - Coupe perpendiculaire à la précédente.
- 30 - Aspect de la racine au stade du premier allongement apical.
- 31/32 - Formation du méristème médullaire par division dans la 3^o assise cellulaire sous-épidermique.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur HOCQUETTE

de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.