

50376  
1981  
144

N° d'ordre : 903

50376  
1981  
144

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE**

par

Véronique ROGER



**ETUDE BIOCHIMIQUE ET HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE  
DE LA NEOFORMATION DE BOURGEONS SUR DES  
FRAGMENTS DE RACINE D'ENDIVE (*Cichorium intybus* L.)  
CULTIVES "IN VITRO"**

Soutenue le 7 octobre 1981, devant la Commission d'Examen

R. BOURIQUET	Président
A. DHAINAUT	Examinateur
A. KOVOOR	Examinateur
J. VASSEUR	Rapporteur

Je remercie Monsieur le Professeur BOURIQUET  
qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui me fait  
l'honneur de présider cette thèse.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur VASSEUR  
qui a dirigé ce travail avec efficacité.

Monsieur le Professeur DHAINAUT et Monsieur  
KOOVOOR ont accepté de juger ce travail, qu'ils en soient  
vivement remerciés.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur DUBOIS  
pour son aide lors de la réalisation de la partie photographique  
de cette thèse, à Madame BONNET qui m'a initiée à la technique  
d'autoradiographie, à Madame MAËS et à tous ceux qui ont  
participé à ce travail.

-----

# TABLE DES MATIERES

o o o o

INTRODUCTION.....	1
HISTORIQUE .....	2
1) Les études physiologiques .....	2
2) Les études histologiques .....	6
3) Les études biochimiques .....	10
<u>I TECHNIQUES</u> .....	15
A) MATERIEL VEGETAL ET REALISATION DES CULTURES	15
B) TECHNIQUES HISTOLOGIQUES .....	16
1) Préparation des coupes .....	16
2) Colorations .....	16
C) TECHNIQUES HISTO AUTORADIOGRAPHIQUES .....	17
D) TECHNIQUES BIOCHIMIQUES .....	19
1) Marquages isotopiques .....	19
a) incorporation de précurseurs radioactifs .....	19
b) mesure de la radioactivité .....	20
2) Extraction des acides nucléiques totaux et des protéines .....	20
3) Méthodes de mesure des constituants biochimiques .....	20
a) dosage spectrophotométrique des aci- des nucléiques .....	20
b) dosage de l'ADN à la diphénylamine .	21
c) dosage des protéines .....	21
4) Extraction et fractionnement des dif- férentes catégories d'ARN .....	21
a) méthode d'extraction .....	21
b) purification des extraits .....	23
c) gradients de saccharose .....	26
<u>II RESULTATS</u>	
A) RECHERCHE D'UN MILIEU NUTRITIF FAVORABLE AU BOURGEONNEMENT .....	27

B) ETUDES HISTOLOGIQUE ET HISTOAUTORADIOGRAPHIQUE ..	30
1) Activation cellulaire et initiation des organes .....	31
2) Conclusion .....	35
C) ETUDE BIOCHIMIQUE .....	36
1) Croissance des cultures .....	36
2) Métabolisme de l'ADN .....	37
3) Métabolisme de l'ARN .....	39
a) évolution des ARN totaux au cours de la culture .....	39
b) analyse qualitative de l'incorporation d'uridine- <sup>3</sup> H dans les différentes catégories d'ARN .....	42
4) Métabolisme des protéines .....	45
5) Conclusion .....	47
III DISCUSSION .....	51
BIBLIOGRAPHIE .....	62

## ABREVIATIONS UTILISEES

A D N	:	Acide désoxyribonucléique
A I A	:	Acide indolyl-acétique
A P C	:	Acide perchlorique
A R N	:	Acide ribonucléique
A R Nm	:	Acide ribonucléique messenger
A.S.	:	Activité spécifique
° c	:	degré centigrade
° C	:	degré Celsius
Ci, mCi, uCi	:	Respectivement Curie, millicurie et microcurie
c.p.m.	:	coups par minute
CsSO <sub>4</sub>	:	sulfate de césium
D Nase	:	Desoxyribonucléase
D.O.	:	Densité optique
E D T A	:	Ethylène diamine tétracétate de sodium
g.	:	Accélération due à la pesanteur
K C N	:	Cyanure de potassium
Kin.	:	Kinétine
nm	:	Nanomètre
R Nase	:	Ribonucléase
S	:	Unité Svedberg
S.D.S.	:	Sodium dodecylsulfate
t r.min. <sup>-1</sup>	:	Tour par minute
v/v	:	Volume/volume.

## I N T R O D U C T I O N

Toutes les cellules d'un végétal possèdent en principe l'équipement génétique nécessaire à la reconstitution de la plante entière mais de multiples corrélations peuvent empêcher l'expression anarchique des potentialités du génome et, au cours du développement, une séquence ordonnée de l'organogenèse s'établit.

Sous l'action de divers stimulus, comme par exemple l'interruption de corrélations entre les organes, des cellules différenciées sont capables d'exprimer des potentialités jusqu'alors réprimées. Dans ce contexte, la méthode de culture "in vitro" des tissus, grâce à la rigueur de ses conditions expérimentales, peut être utilisée avec profit pour suivre les transformations subies par les cellules.

L'étude de la néoformation, spontanée ou non, de bourgeons végétatifs peut alors être un moyen favorable pour préciser nos connaissances sur les séquences qui mènent d'une cellule quiescente à une structure organisée. C'est dans cet esprit que nous avons abordé ce travail.

## H I S T O R I Q U E

En raison de leur intérêt tant pratique que fondamental, les phénomènes de régénération ont donné lieu à de très nombreuses publications. Il est néanmoins possible de les grouper en fonction de leur centre d'intérêt, en études morphogénétiques, histologiques et biochimiques.

Nous rappellerons donc les faits essentiels les mieux établis, et les principales interprétations auxquelles ils ont donné lieu.

### 1) Les études physiologiques

Les manifestations callogènes ou organogènes des cultures de tissus peuvent être spontanées ou provoquées par des substances stimulantes. Dès 1939, WHITE signale que le fait de cultiver des tissus tumoraux de l'hybride de Nicotiana glauca x N. langsdorffii en milieu liquide provoque la néoformation des bourgeons. De 1940 à 1942, GAUTHERET montre que des fragments de tissus d'Orme, de Peuplier et de Sureau donnent des bourgeons et que si ces néoformations ont lieu en présence de faibles concentrations d'auxine, elles sont inhibées par les fortes concentrations.

A partir de ces travaux, SKOOG et ses collaborateurs ont abordé le problème de la régulation des phénomènes de morphogenèse. En 1948, SKOOG et TSUI pensent qu'il s'agit d'un contrôle chimique et mettent en évidence l'effet stimulateur de l'adénine. Peu après, MILLER et Coll. (1956) découvrent un dérivé de l'adénine, la 6-fur-

furylaminopurine, à laquelle ils donnent le nom de kinétine.

SKOOG et MILLER (1957) en expérimentant sur les tissus de Tabac émettent alors l'hypothèse d'un contrôle hormonal de la multiplication cellulaire et de la formation des organes ; le rapport cytokinine/auxine orientant la néoformation, soit vers la formation de racines, soit vers celle de bourgeons.

Depuis, la régulation de l'organogenèse a suscité de nombreuses recherches effectuées sur des tissus très variés. L'action de substances très diverses, de différents extraits de tissus végétaux et de liquides biologiques a été étudiée. Une vue d'ensemble de leurs effets a donné lieu à de nombreuses mises au point (PREVOT, 1939 ; GAUTHERET, 1959, 1965 ; CHAMPAGNAT, 1961 ; NITSCH, 1967 ; BUTENKO, 1968 ; SKOOG, 1970 ; BIGOT, 1971 ; HUNAUULT, 1973, 1974, 1975 ; TRAN THANH VAN, 1977 ; THORPE, 1978 a, b). Bien que le mode d'action des substances utilisées soit souvent mal connu, on sait néanmoins orienter le développement des tissus vers une organogenèse racinaire ou caulinaire, ou le limiter à une simple prolifération cellulaire. De plus, bien qu'il ne soit pas possible de généraliser l'hypothèse de SKOOG et MILLER sur la régulation des phénomènes d'organogenèse par un équilibre auxine-kinétine, elle est souvent vérifiée et présente l'avantage d'expliquer, de manière simple, les potentialités des tissus par des gradients d'hormones endogènes.

Sous cet aspect, les tissus d'Endive réagissent comme les tissus de Tabac utilisés par SKOOG et ses collaborateurs. Les



fragments de racine d'Endive sont d'ailleurs connus depuis longtemps pour leur capacité à produire spontanément des bourgeons (GAUTHERET, 1941, 1959 ; VASIL et HILDEBRANDT, 1966 ; GWOZDZ et SZWEYKOWSKA, 1967, 1969b). Des travaux ont montré (WARMKE et WARMKE, 1950) que la régénération d'organes est sous la dépendance de la teneur en auxine endogène des tissus. Avec la mise en évidence des cytokinines dans les tissus d'Endive (VARDJAN et NISTCH, 1961), il est apparu que les phénomènes d'organogenèse sont sous la dépendance d'un équilibre auxine-cytokininique (GWOZDZ et SZWEYKOWSKA, 1967).

La formation des bourgeons ne peut toutefois pas se ramener à ce seul équilibre ; d'autres facteurs peuvent modifier l'efficacité des hormones ; par exemple, les conditions lumineuses (BOURIQUET, 1966 ; LEGRAND, 1974), les éléments minéraux (GWOZDZ et SZWEYKOWSKA, 1969b), les sucres (GWOZDZ et SZWEYKOWSKA, 1969a ; LEFEBVRE, 1977), l'acide gibbérellique (BESEMER et Coll., 1969 ; VASSEUR, 1978) ou l'éthylène (LEFEBVRE, 1977). Le bourgeonnement serait donc davantage le résultat d'interactions complexes entre les facteurs endogènes et exogènes, stimulants ou inhibiteurs.

De plus, le moment d'application de ces différents facteurs joue un rôle important. Ainsi, la prolifération des tissus de moelle de Tabac exige la présence d'une cytokinine et d'une auxine mais les deux substances ne sont pas indispensables pendant toute la culture. Les cytokinines ne sont utiles dans le milieu de culture que pendant 1 ou 2 jours, l'auxine, par contre, doit être présente conti-

nuellement ; la séquence inverse ne produit qu'une croissance faible (NITSCH et BUI DANG HA, 1967 ; NITSCH et LANCE-NOUGAREDE, 1967).

Ces auteurs pensent qu'au moment de l'activation de gènes, provoquée par le prélèvement des explantats, une cytokinine serait indispensable pour "conditionner" les tissus et les rendre capables de se diviser. L'action des cytokinines sur la division cellulaire avait d'ailleurs déjà été soulignée (PATAU et Coll., 1957 ; OLSZEWSKA, 1959) ; cette substance agirait au niveau de l'ADN (NITSCH, 1967) et entraînerait une activation de synthèses nucléolaires (OLSZEWSKA, 1959 ; NITSCH, 1967 ; GIFFORD et NITSCH, 1969) puis la production d'ARN de transfert ainsi que des ribosomes nécessaires aux synthèses protéiques. L'auxine interviendrait alors dans cette dernière phase car elle produit souvent une forte augmentation de l'ARN ribosomal, ce qui suggère que la régulation hormonale se déroule par étapes successives et s'oriente sous l'effet de substances variées au cours des différents stades du développement. Toutefois, si l'ordre dans lequel les substances hormonales interviennent est important, les résultats varient avec la nature des tissus, leur origine, leur état physiologique ainsi que leurs conditions de culture. Les régulateurs de croissance doivent donc être appliqués aux cellules, non seulement à la bonne concentration, mais aussi dans un ordre convenable, au moment approprié et dans des conditions de culture précises. Selon SKOOG (1970), ces substances agiraient en modulant l'expression des gènes déréprimés lors de l'excision des explantats, en permettant l'orientation du métabolisme dans une voie plutôt que dans une autre, sans affecter la nature mais seulement l'équilibre des produits formés.

En fait, si l'on accepte l'idée de la totipotence des cellules végétales, on peut se demander pourquoi certaines espèces ne produisent jamais d'organes "in vitro" ; cela est sans doute dû au fait que toutes les conditions n'ont pas été réunies et cela montre que le mécanisme de la régulation des phénomènes d'organogenèse au niveau cellulaire est insuffisamment connu.

## 2) Les études histologiques

L'excision d'un fragment d'organe, puis sa mise en culture, entraînent de nombreuses modifications dans l'activité cellulaire, décelables au niveau ultrastructural. Ces remaniements font partie d'un ensemble qui aboutit à la division cellulaire et, dans certains cas, à la formation d'organes.

L'examen histologique des tissus et l'utilisation de techniques histochimiques permettent de distinguer les étapes caractéristiques de la différenciation organogène. Quels que soient les tissus utilisés, tous les travaux montrent une mise en place rapide de la division cellulaire, puis la formation d'ilôts méristématiques de type primaire; ceci a été décrit :

- dans le cas de la caulogenèse, chez: Begonia hiemalis (MIKKELSEN et SINK, 1978), Begonia rex (BIGOT, 1971 ; CHLYAH et TRAN THANH VAN, 1975), Nicotiana tabacum (THORPE et MURASHIGE, 1970 ; MAEDA et THORPE, 1979), Oryza sativa (NAKANO et MAEDA, 1979), Peperomia

griseo-argentea (BIGOT et BRULFERT, 1968), Petunia inflata (HANDRO et Coll., 1973) et Pseudotsuga menziesii (CHEAH et CHENG, 1978)

- dans le cas de la rhizogenèse, chez: Azukiá angularis (MITSUHASHI et Coll., 1978), Larix sp. (JOHN, 1978) Petunia inflata (HANDRO et Coll., 1973), Phaseolus aurea (BLAZICH et HEUSER, 1979) Phaseolus vulgaris (OPPENCOORTH, 1978) et Pinus radiata (SMITH et THORPE, 1975)

- dans le cas de l'organogenèse florale, chez: Nicotiana tabacum (AGHION-PRAT, 1965 ; DIEN et TRAN THANH VAN, 1974).

La formation des bourgeons passe donc par des étapes successives ; tout d'abord on note, avant la mitose, des modifications intracellulaires ; en particulier, les nucléoles enflent, se vacuolisent, et leur nombre par noyau diminue. Ces observations ont été faites sur divers tissus (GIFFORD et NITSCH, 1969 ; BIGOT, 1971 ; VASIL, 1973 ; TRAN THANH VAN et DIEN, 1975 ; WILLIAMS et JORDAN, 1980). Puis, survient une division assez générale des cellules, parmi lesquelles certaines se différencient. BUVAT (1945, 1948) a été le premier à étudier en détail, sur des tissus d'Endive et de Carotte, ce phénomène de différenciation. Il décrit les modifications cytologiques subies par la cellule et plus particulièrement par son noyau. Il observe en effet des groupes de petites cellules au cytoplasme dense et au noyau volumineux à forte colorabilité, qui se distinguent ainsi

aisément des cellules environnantes. Ces cellules forment ensuite un amas compact qui dans le cas d'un futur bourgeon, pourra différencier une assise épidermique et des ébauches foliaires.

Toutes les études histologiques concernant l'origine des bourgeons révèlent que si le processus de formation reste le même, la localisation varie en fonction de l'espèce considérée. Les bourgeons peuvent provenir de différents types de tissus et s'y former superficiellement ou en profondeur. Dans le cas de Cichorium intybus, BUVAT (1945) puis CAMUS (1949) ont montré que les bourgeons étaient formés superficiellement mais pouvaient également avoir une origine plus profonde, en particulier au niveau du cambium, des cellules périvasculaires et même parfois du phloème. Des observations similaires ont été faites ensuite par STERLING (1951) chez le Tabac.

De manière générale, les bourgeons résultent de la division accrue d'un petit groupe de cellules. Toutefois, ils proviennent quelquefois d'une seule grande cellule du phloème qui a subi un recloisonnement (BUVAT, 1945).

Dans certains cas, les organes peuvent se former à partir de tissus ou de cellules "cibles" prédéterminées et aptes à produire une réaction organogène immédiate après un retour à un état dédifférencié. Il en est ainsi, par exemple, à partir de la cellule basale des poils glanduleux de Begonia rex (BIGOT, 1971, 1976) ou des tissus épidermiques ou sous-épidermiques chez Nautilocalyx lynchei (TRAN THANH VAN et DRIRA, 1971 ; HA NGOC et TRAN THANH VAN, 1979)

et Torenia fournieri (CHLYAH , 1974).

L'utilisation du microscope électronique a permis ensuite de préciser les transformations de la structure cellulaire. Les résultats obtenus montrent essentiellement que la variation de la proportion des régions granulaire et fibrillaire du noyau, l'apparition d'une zone claire à l'intérieur du nucléole, la dispersion de la chromatine, la formation de polyribosomes dans le cytoplasme et l'altération de la morphologie des mitochondries traduisent une activité intense (GIFFORD et NITSCH, 1969 ; ROSE et SETTERFIELD, 1971 ; VASIL, 1973 ; JALOUZOT, 1976 ; DELTOUR et Coll., 1979). De nombreuses hypothèses ont été émises sur le rôle joué par la vacuole nucléolaire. Elle interviendrait selon de BARSY et Coll. (1974), BYRNE et SETTERFIELD (1977) et MORENO-DIAZ DE LA ESPINA et Coll. (1980) dans le transport de certaines substances du nucléole et plus précisément de certains ARN. La plupart des auteurs acceptent cependant l'idée d'une corrélation entre les modifications de l'aspect ultrastructural du nucléole, sa vacuolisation et la synthèse d'ARN. L'emploi de traceurs radioactifs a rendu possible la localisation de sites de synthèses cellulaires et les études dynamiques. L'autoradiographie après incorporation d'uridine tritiée a montré qu'effectivement les cellules activées sont le siège d'une synthèse importante d'ARN (de BARSY et Coll., 1974 ; BYRNE et SETTERFIELD, 1977). D'autre part, l'utilisation de thymidine tritiée a permis à BIGOT (1971) de mettre en évidence le rôle privilégié joué par la cellule basale du poil

glanduleux de Begonia rex et à PATAU et Coll. (1957), à NITSCH (1967) chez Nicotiana tabacum ainsi qu'à JALOUZOT (1976) chez Cicer arietinum de montrer que le traumatisme dû à l'excision provoquait une modification de l'activité nucléaire, ce qui se traduit par une incorporation importante du traceur dans les noyaux donc par une synthèse active d'ADN.

Ces travaux sur la localisation tissulaire des synthèses d'ADN, la détermination cinétique des divisions cellulaires (DIEN et TRAN THANH VAN, 1974 ; BROSSARD, 1975 ; TRAN THANH VAN et DIEN, 1975 ; CHLYAH, 1978) et la mise en évidence de la compartimentation de la synthèse d'ARN (de BARSY et Coll., 1974 ; BYRNE et SETTERFIELD, 1977 ; COHEN et CROTTY, 1979 ; SHININGER, 1980) apportent donc de nombreuses précisions sur la régulation de l'expression génique.

### 3) Les études biochimiques

Des travaux réalisés sur des matériels très divers ont permis de décrire les évènements cellulaires et moléculaires qui surviennent lors de la stimulation du métabolisme, provoquée par l'excision et la mise en culture, que les tissus présentent d'ailleurs ultérieurement ou non des phénomènes d'organogenèse. On observe une augmentation de la respiration (LEAVER et KEY, 1967 ; THORPE et MEIER, 1972 ; KING et CHAPMAN, 1973), de la quantité d'ATP (THORPE, 1978a), des taux d'ADN, d'ARN et de protéines (GUILLOT, 1966 ; YEOMAN et AITCHISON, 1973 ; WATANABE et IMASEKI, 1973 ;

1976 ; BCUNIOLS, 1977 ; BYRNE et SETTERFIELD, 1977 ; OPPENOORTH , 1979 ; OBA et Coll., 1978), de la formation des polysomes (LEAVER et KEY, 1967 ; YEOMAN et AITCHISON, 1973 ; JALOUZOT, 1976) ou encore une activation de divers systèmes enzymatiques comme les peroxydases (LEGRAND et VASSEUR, 1972 ; BROSSARD, 1975 ; GASPAR et Coll. , 1977 ; TANAKA et URITANI, 1977 ; THORPE et Coll., 1978 ; NAKANISHI, 1979), les invertases (MATSUSHITA et URITANI, 1974 ; TANAKA et URITANI, 1979) et les enzymes associées à la synthèse de polyphénols (TANAKA et URITANI, 1977) ou d'ADN (WATANABE et IMASEKI, 1977 a et b).

Quelques chercheurs se sont intéressés plus particulièrement à suivre l'évolution des acides nucléiques et des protéines lors du passage de cellules de l'état quiescent à un état activé. Ainsi, LACHARME et STEIMAN (1970) décrivent, après le repiquage de tissus de Daucus carota et avant la première division, les processus de formation et de dégradation de l'ARN qui précèdent de quelques heures les modifications métaboliques de l'ADN. De même, sur des fragments d'hypocotyles issus de la germination de graines de Cicer arietinum, JALOUZOT (1971) observe des faits similaires, c'est-à-dire dans un ordre chronologique, la synthèse d'ARN, de protéines puis d'ADN, elle-même suivie du déclenchement des mitoses. Plus récemment, à partir de protoplastes de Nicotiana tabacum, GIGOT et Coll. (1977) ont montré qu'une synthèse d'ARN et de protéines accompagnaient également le phénomène de dédifférenciation.



D'autre part, des synthèses d'acides nucléiques ont pu être associées au processus de différenciation, par exemple lors de la formation de racines chez Lycopersicum esculentum (GUILLOT, 1966), de bourgeons par des fragments de feuilles étiolées de Cichorium intybus (VASSEUR, 1978), d'embryons dans les suspensions cellulaires de Daucus carota (SENGUPTA et RAGHAVAN, 1980) et lors de la germination chez Zea mays (VAN DE WALLE et Coll., 1976) et Raphanus sativus (ASPART et Coll., 1980 ; DELSENY, 1977). En outre, en utilisant des cultures de cotylédons de Pseudotsuga menziesii, HASEGAWA et Coll. (1979) puis YASUDA et Coll. (1980) ont trouvé que les tissus producteurs de bourgeons synthétisent des protéines de faible poids moléculaire. Selon ces chercheurs, ce serait l'évènement biochimique le plus précoce susceptible d'être associé à la différenciation de bourgeons.

Dans certains cas, il a été montré que les tout premiers évènements détectables avant la duplication de l'ADN consistent en des synthèses de différentes classes d'ARN puis de protéines ; leur analyse permettant de mieux comprendre la séquence de réactivation. De telles études ont permis de détecter la formation d'ARN de haut poids moléculaire puis d'ARN ribosomiaux et solubles au cours des premières heures de la culture de tissus de Daucus carota (LACHARME et STEIMAN, 1970) ainsi que l'existence précoce d'une synthèse d'ARN messenger suivie de la production massive d'ARN ribosomiaux lors des premières étapes de la dédifférenciation des cellules de moelle

de Tabac (PARENTI et Coll., 1977). Par ailleurs, JALOUZOT (1976) a observé, chez Cicer arietinum, des synthèses successives d'ARN à caractère messager, d'ARN ribosomiaux puis de protéines nucléaires non histoniques, elles-mêmes suivies d'une stimulation de classes plus larges de protéines. De même, SATO et Coll. (1978, 1980) signalent la formation très précoce d'ARN polyadénylé suivi de la production d'ARN ribosomiaux en réponse à l'excision de fragments de Solanum tuberosum.

Tout ceci indique que les ARN et les protéines totales nouvellement synthétisés correspondent en fait à des synthèses successives de différentes classes de molécules, qui constituent une succession d'évènements caractéristiques de l'activation. Certains travaux ont cependant montré que le premier évènement moléculaire détectable immédiatement après le bouleversement de l'activité métabolique des cellules était une synthèse d'ADN. Une telle synthèse très précoce a été mise en évidence après une modification de l'environnement des cellules par blessure (NITSCH, 1967 ; KUPILA et THERMAN, 1971 ; SIMARD, 1971 ; JALOUZOT, 1976 ; BROECKAERT et VAN PARIJS, 1978) ou par traitement hormonal (DELSENY, 1977). Selon GUILLE et Coll. (1968) ce serait un ADN satellite riche en G + C qui pourrait coder pour la synthèse des ARN ribosomiaux cytoplasmiques. Les avis semblent cependant assez partagés car si JALOUZOT (1976) et HASE et Coll. (1979) suggèrent la duplication de régions localisées du génome, sans toutefois pouvoir établir leur rôle, DELSENY (1977)

propose la possibilité d'une contamination bactérienne.

En ce qui concerne ces problèmes de dédifférenciation et d'organogenèse, la majeure partie des observations constitue néanmoins un ensemble assez hétéroclite de résultats obtenus à partir de matériels divers. Il n'est donc pas possible de proposer une interprétation générale satisfaisante.

Les méthodes que nous avons employées ne diffèrent pas fondamentalement de celles de nos prédécesseurs mais nous les avons utilisées sur le même matériel biologique et nous avons pris soin de décrire précisément les évènements histologiques et cytologiques avant d'entreprendre une investigation biochimique.

Nous avons abordé, dans le cadre de ce travail, un problème morphologique précis : la caulogenèse. Après avoir décrit le matériel biologique et les techniques expérimentales utilisées, nous précisons les conditions favorables à la formation des bourgeons et déterminons ensuite les modifications histologiques qui accompagnent l'apparition de ces bourgeons. Il est alors possible d'essayer de définir au niveau cellulaire et moléculaire, au moyen de techniques histoautoradiographiques et d'analyses biochimiques, les évènements qui accompagnent l'entrée en mitose des cellules et l'orientation de leur différenciation vers la formation de bourgeons.

## I T E C H N I Q U E S

### A) MATERIEL VEGETAL ET REALISATION DES CULTURES

Le présent travail a été réalisé sur des racines tubérisées d'Endive (Cichorium intybus L, var. Witloof) conservées à la température de 4°C, en sachets plastiques.

Les racines sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium à  $140\text{g l}^{-1}$ , pendant 25 min., puis rincées par 3 bains successifs dans de l'eau stérile. Des explantats de 6 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur sont alors prélevés, à l'aide d'un trocart, selon la technique de MARGARA et Coll. (1966) préconisée par LEFEBVRE (1977). Nous n'avons utilisé que la partie médiane de la racine, éliminant la pointe et le collet, afin d'éviter les variations dues au gradient d'hormones endogènes (WARMKE et WARMKE, 1950 ; VARDJAN et NITSCH, 1961).

Après leur prélèvement, les explantats sont placés horizontalement sur un milieu nutritif contenu dans des fioles de Fourneau. Ce milieu qui comprend les macro- et microéléments de la solution de HELLER (1953), éventuellement additionné de glucose, est solidifié par de la gélose (6‰), puis stérilisé par autoclavage à 110°C pendant 25 min..Après ensemencement, les tissus sont placés durant 30 jours dans une pièce maintenue à 24° et éclairée en permanence.

## B) TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

L'étude des tissus a été réalisée au microscope photonique selon les techniques décrites par LANGERON (1949).

### 1) Préparation des coupes

Les fragments de racines sont fixés pendant 24 h dans un mélange F.A.A. (formaldéhyde ; acide acétique, éthanol à 95°C ; 10/5/85 v/v). Les 30 premières minutes du traitement sont effectuées sous vide, afin de permettre une meilleure pénétration du fixateur. Les explantats sont ensuite rincés pendant 24 h à l'eau courante et subissent une deshydratation par des bains successifs d'éthanol et de xylène, avant d'être inclus dans de la paraffine. Ils sont finalement débités en coupe de 10 µm d'épaisseur qui seront déparaffinées avant de subir les différentes colorations.

### 2) Colorations

Ces colorations ont pour but essentiel la mise en évidence des acides nucléiques. Nous avons utilisé :

- la coloration de Feulgen (LISON, 1960) pour la mise en évidence des zones à activité mitotique intense (hydrolyse 12 min, coloration 24 h, ADN coloré en rouge).

- le mélange pyronine-vert de méthyle (BRACHET, 1953) pour mettre en évidence les zones riches en ARN (coloration : 3 h, ARN coloré en rose, ADN coloré en bleu).

- la double coloration safranine-fast green pour les observations histologiques.

(safranine : 4 h, fast green 4min., ADN coloré en rouge, paroi et cytoplasme colorés en vert, paroi lignifiée colorée en rouge).

### C) TECHNIQUES HISTO AUTORADIOGRAPHIQUES

Après des temps variables de culture, les explantats sont mis à incuber, à 24°C et à la lumière, dans un milieu nutritif liquide constamment agité, contenant le précurseur tritié et éventuellement quelques gouttes de tween pour faciliter l'incorporation.

Des essais préalables ont été effectués afin de déterminer le temps d'incubation permettant une incorporation satisfaisante, accompagnée d'un bruit de fond relativement peu important.

Pour analyser l'ARN, nous avons incubé les tissus pendant 2 h en présence d'uridine-<sup>3</sup>H (réf. TMM 85 B ; A.S.: 25mCi.mM<sup>-1</sup>) à la concentration de 20 µCi.ml<sup>-1</sup>; cette incubation est suivie d'une chasse de 15 min. par l'uridine non radioactive à 10 mg.l<sup>-1</sup>. Quelques lames témoins subissent un traitement de contrôle par une solution d'acide perchlorique à 1 % pendant 18 h à 4°C afin d'éliminer l'ARN.

Pour l'ADN, nous avons choisi deux temps d'incubation, 2 h ou 6 h, en présence de thymidine-<sup>3</sup>H (réf. TMM 79 B; A.S.: 25mCi.mM<sup>-1</sup>) à la concentration de 20 µCi.ml<sup>-1</sup>:

Pour les protéines, le temps d'incubation est de 2 h en présence de leucine- $^3\text{H}$  (réf. TMM 117 A ; A.S.:1 Ci.mM $^{-1}$ ) à la concentration de 20  $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$ .

Quel que soit le précurseur utilisé, après un lavage à l'eau courante, les fragments sont fixés par le mélange F.A.A., rincés, deshydratés et inclus dans de la paraffine. Les coupes de 10 $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont collées sur des lames gélatinées.

Après le déparaffinage, les coupes de tissus contenant de la thymidine tritiée sont traitées par une solution d'acide perchlorique à 1 % pendant 20 min. à 4°C, afin d'extraire les nucléotides solubles.

Les lames sont ensuite recouvertes, à l'obscurité, par de l'émulsion photographique (ILFORD K5) diluée de moitié. Après une exposition de 4 à 6 jours, elles sont passées dans le révélateur (KODAK D19 b), fixées par une solution de thiosulfate de sodium à 30 % et colorées pendant 2 min. dans le bleu d'azur B à 0,1 %.

Sur les autoradiogrammes obtenus à l'aide de la thymidine- $^3\text{H}$ , nous avons dénombré les noyaux marqués sur une surface déterminée et nous avons comparé les valeurs obtenues à différents stades de la culture. Mais, d'une manière générale, nous n'avons utilisé l'histoautoradiographie que pour préciser qualitativement les résultats des analyses biochimiques.

#### D) TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

Les variations du métabolisme des acides nucléiques et des protéines au cours de la culture sont étudiées à l'aide de marquages isotopiques, suivis de l'extraction et du dosage de ces macromolécules.

##### 1) Marquages isotopiques

###### a) incorporation de précurseurs radioactifs

Les tissus, environ 25 fragments, prélevés après des temps variables de culture, sont mis à incuber à 24°C et à la lumière dans le milieu nutritif agité, contenant un des précurseurs radioactifs suivants :

- Thymidine-<sup>3</sup>H (réf. TMM 79 B ; A.S. 25 mCi.mM<sup>-1</sup>) à la concentration de 12,5 µCi.ml<sup>-1</sup>.

- Uridine-<sup>3</sup>H (réf. TMM 85 B ; A.S. : 25 mCi.mM<sup>-1</sup>) à la concentration de 12,5 µCi.ml<sup>-1</sup>.

- Uridine-<sup>14</sup>C (réf. CMM 213 ; A.S. : 57,8 mCi.mM<sup>-1</sup>) à la concentration de 3 µCi.ml<sup>-1</sup>.

- Leucine-<sup>3</sup>H (réf. TMM 117 A ; A.S. : 1 Ci.mM<sup>-1</sup>) à la concentration de 12,5 µCi.ml<sup>-1</sup>.

Les tissus traités sont ensuite rincés à l'eau, afin d'éliminer l'excès de précurseur radioactif, puis congelés à l'azote liquide.



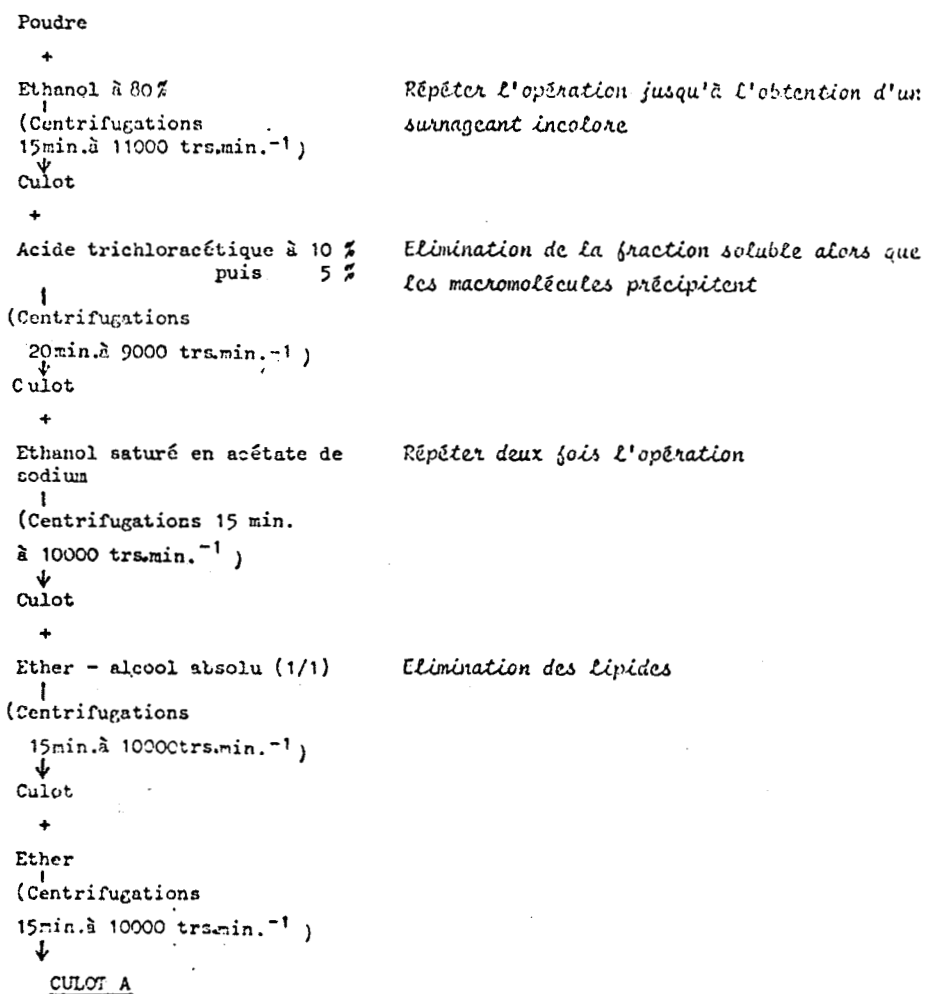


Fig. 1 : Schéma du mode de préparation de la poudre végétale en vue de l'extraction des acides nucléiques et des protéines.

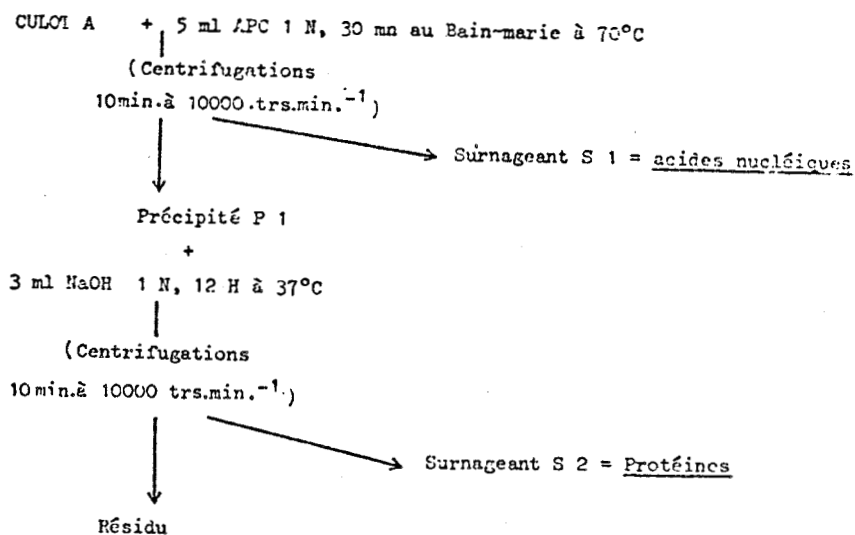


Fig. 2 : Schéma de l'extraction des acides nucléiques et des protéines selon la méthode de SCHNEIDER (1945)

L'incorporation des précurseurs radioactifs pouvant être modifiée par une perméabilité variable des cellules au cours de la culture, nous avons vérifié que les valeurs exprimées ne sont pas modifiées par l'activité du pool des composés acido-solubles.

### b) Mesure de la radioactivité

La radioactivité est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Intertechnique "ABAC"-SL 40) sur des parties aliquotes de 0,2 à 1 ml, prélevées à partir des solutions d'acides nucléiques et de protéines, auxquelles on ajoute de 2 à 8 ml d'un mélange de scintillation (Aqua Luma - Société Lumac).

### 2) Extraction des acides nucléiques totaux et des protéines

Les tissus congelés sont broyés dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre. Des lots de 2 g subissent à 4°C une première préparation en vue de l'extraction proprement dite (Fig. 1).

La seconde opération permet d'extraire, puis de séparer les acides nucléiques et les protéines. Cette étape peut être réalisée selon trois procédés différents qu'il est difficile de choisir à priori, car la validité des résultats dépend essentiellement des tissus utilisés. Une analyse comparative (BLONDEL, 1979) nous a amenée à retenir la méthode de SCHNEIDER (Fig. 2) qui, par hydrolyse au moyen d'acide perchlorique à chaud, libère de l'ADN et de l'ARN.

### 3) Méthodes de mesure des constituants biochimiques

#### a) dosage spectrophotométrique des acides nucléiques

La densité optique est mesurée à la longueur d'onde de 260 nm sur un

spectrophotomètre différentiel (LERES SL 40). Une unité de densité optique mesurée dans ces conditions au moyen d'une cuve de 1 cm de trajet lumineux, représente l'équivalent de  $40 \mu\text{gl}^{-1}$  d'acides ribonucléiques.

b) dosage de l'ADN à la diphénylamine

L'ADN est dosé selon la méthode de BURTON (1956). Le réactif se compose de :

| - Acétaldehyde puriss à 2 % dans l'eau (1 ml)  
| - 1,5 g de diphénylamine dans 100 ml d'acide acétique  
additionné de 1,5 ml d'acide sulfurique(200 ml).

A 2 ml de ce réactif, on ajoute 1 ml de la solution à doser et on laisse la coloration s'établir pendant 20 h à 30°C et à l'obscurité.

L'intensité de la coloration est alors déterminée au spectrophotomètre à 600 nm. L'étalonnage est effectué à l'aide d'un ADN commercial (ADN de thymus de veau).

c) dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la technique de LOWRY et Coll. (1951) telle qu'elle a été décrite par VASSEUR (1978).

4) Extraction et fractionnement des différentes catégories d'ARN

a) méthode d'extraction

Pour être valable, une méthode d'extraction doit répondre à un certain nombre d'exigences . Elle doit permettre :

- l'obtention de molécules à structures aussi voisines que possible de celles présentes dans la cellule.

- l'action des enzymes intracellulaires doit être totalement inhibée.

- l'ARN extrait doit être dépourvu de protéines.

Dans ces conditions, on obtient un ARN natif, exempt de dégradation et représentant les différentes classes d'ARN. Une des méthodes les plus employées consiste à extraire les ARN cytoplasmiques par le phénol à 4°C et les ARN nucléaires à la température de 60°C.

(SCHERRER et DARNELL, 1962). Toutefois, étant donné le risque d'aggrégation des molécules d'ARN ribosomal aux températures élevées, nous avons préféré ne travailler qu'à 4°C mais en utilisant un milieu d'extraction à pH alcalin qui permet un bon rendement en ARN messager (BRAWERMAN et Coll., 1974). La méthode est la suivante :

Les fragments de racine, à raison de 15 à 20 g de matière fraîche, sont congelés dans l'azote liquide, broyés au mortier, puis mis en présence d'un tampon Tris-HCl (50 mM), pH 9,0 contenant de l'acétate de Mg (5 mM), du NaCl (100 mM) et un inhibiteur des ribonucléases le S.D.S. (1 %) à raison de 1 ml.g<sup>-1</sup> de tissu frais. Le mélange est homogénéisé par 3 passages de 15 secondes chacun dans un homogénéiseur de type "Ultra Turrax" à la vitesse de 15000 trs.min.<sup>-1</sup>, puis agité pendant 25 min. à 4°C en présence d'un volume égal d'une solution phénolique composée de : phénol (100 g), 8-hydroxyquinoléine (0,1 g), méta crésol (14 g) et Tampon Tris -HCl, pH 9,0 (25 ml).

Après 5 min. de centrifugation à 5000 g, la phase phénolique est éliminée. On répète l'opération par adjonction de la solution

phénolique, puis la phase aqueuse est à nouveau déprotéinisée par un mélange chloroforme (99 %) alcool isoamylique (1 %) et précipitée pendant une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  par deux volumes d'alcool absolu en présence d'une solution amenée à 0,15 M en acétate de sodium.

Une centrifugation de 30 min. à 10000 g permet de recueillir le précipité qui est ensuite dissout dans un tampon Tris (10 mM), pH 9,0, contenant de l'acétate de Na (100 mM) et de l'EDTA- $\text{Na}_2$  (10 mM), puis précipité à nouveau. Ces opérations de précipitation-dissolution sont répétées en moyenne 4 fois.

Les acides nucléiques dissouts dans un tampon Tris-HCl (20 mM), pH 7,2, NaCl (10 mM) et acétate de Mg (5 mM) sont alors soumis à l'action de la désoxyribonucléase (BOEHRINGER MANNHEIM, réf. 15469) à raison de 5  $\mu\text{g}$  pour 100  $\mu\text{g}$  d'acides nucléiques pendant 30 min. à  $4^{\circ}\text{C}$ . Celle-ci est ensuite éliminée par deux déprotéinisations successives par le mélange chloroforme - alcool isoamylique. Les ARN sont finalement repris dans un tampon Tris-HCl (10 mM), pH 7,5 contenant de l'EDTA (10 mM), du KCN (10 mM) et un inhibiteur des nucléases : le polyvinyl sulfate de potassium ( $20 \text{ mg.l}^{-1}$ ) et conservé précipité sous alcool en présence de NaCl (0,15 M) au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### b) purification des extraits

Les extraits obtenus selon la méthode décrite présentent souvent une coloration verte due à la présence de contaminants chlorophylliens qui rendent difficile l'évaluation quantitative précise des ARN et qui se signalent, en lumière ultra-violette, par des rapports de densité optique, à différentes longueurs

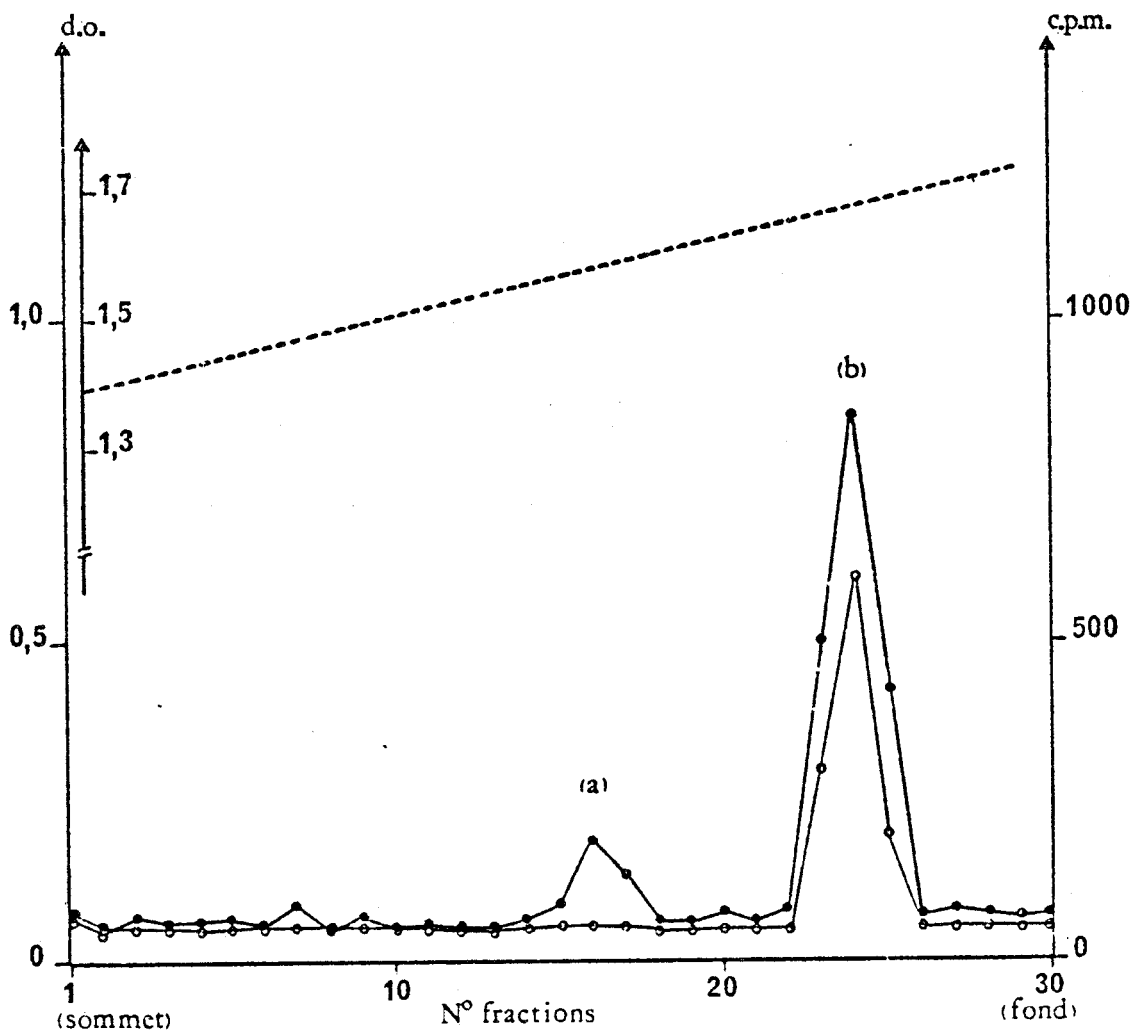


Fig. 3 :: Centrifugation en gradient de  $\text{CsSO}_4$  des APN extraits de tissus cultivés pendant 84 heures et incubés pendant 2 heures dans une solution d'uridine- $^3\text{H}$  (A.S.25  $\text{mCi} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) à  $12,5 \mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Des fractions de 150  $\mu\text{l}$  sont collectées ; on détermine leur densité optique (—●—) à 260 nm et leur radioactivité (—○—). La pente du gradient est donnée à partir des deux densités extrêmes.



d'onde, assez faibles : 260/280 de 1,31 à 1,57, et 260/230 de 1,18 à 1,43. Ces contaminants, qu'ils soient liés à la présence de chlorophylle ou de composés polyphénoliques toujours abondants dans les tissus de plantes, s'associent avec les acides nucléiques pour former des complexes qu'il est difficile ensuite de dissocier (NEWBURY et POSSINGHAM, 1977) et qui co-précipitent en présence d'alcool. Comme par ailleurs un certain nombre de solvants organiques tels que l'éther éthylique ou le chloroforme ne permettent d'éliminer qu'une partie de ces substances, nous avons essayé de purifier nos extraits par l'utilisation de gradients de densité ou par tamisage moléculaire.

α ) gradient de densité en Cs SO<sub>4</sub>  
.....

La centrifugation isopycnique en gradient de sulfate de césium est effectuée de la manière suivante : 200 µg environ d'ARN sont dissouts dans 4,5 ml d'une solution tamponnée (Tris-HCl 10 mM, pH : 7,2 ; polyvinyl sulfate de potassium 20 µg.ml<sup>-1</sup> ; NaCl 100 mM) de CsSO<sub>4</sub> de densité moyenne égale à 1,57 g.ml<sup>-1</sup>. La centrifugation est réalisée à 25°C, dans un rotor SW 50-1 à 33000trs.min<sup>-1</sup> pendant 48 heures.

Le profil d'élution obtenu après la détermination de la densité optique des différentes fractions, montre deux pics distincts : (Fig. 3) :

- l'un (a), situé à une densité apparente (moyenne de trois déterminations) de 1,58 g.ml<sup>-1</sup>, est constitué de matériel

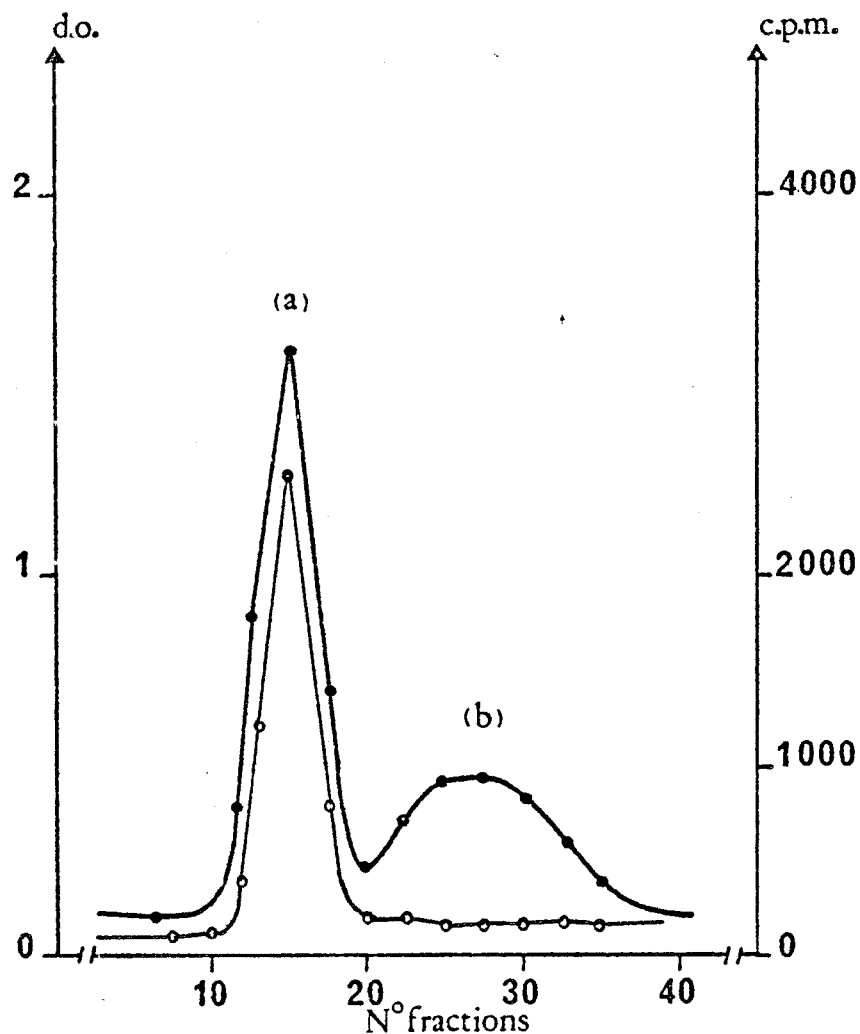


Fig. 4 : Profil d'exclusion sur Sephadex G 50 (40 cm x 1 cm  $\varnothing$ ) des acides ribonucléiques extraits des tissus cultivés pendant 84 heures et incubés pendant 2 heures en présence d'uridine- $^3\text{H}$  (A.S. : 25 Ci.mM $^{-1}$ ) à 12,5  $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$ . La solution d'ARN (0,5 ml) est déposée au sommet de la colonne qui est alors éluee par un tampon Tris-HCl (10 mM), pH 7,8 contenant 20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de polyvinyl sulfate de potassium, 10 mM d'EDTA et de 0,02 % d'azide de sodium. On collecte les fractions de 2 ml dont on détermine la densité optique à 260 nm (—●—) et la radioactivité (—○—).





non nucléique et présente une coloration verte .

- l'autre (b) situé à une densité moyenne de  $1,67 \text{ g.ml}^{-1}$  rassemble les ARN et la radioactivité qui leur est associée. Le spectre d'absorption en lumière ultraviolette de ces ARN ne signale pas la présence de contaminations importantes.

β )filtration sur Sephadex G 50

.....

Le profil d'absorption à la sortie de la colonne de Sephadex G 50 montre également 2 pics : (Fig. 4)

- le premier (a) n'est pas contaminé par des pigments colorés, rassemble l'essentiel de la radioactivité de l'extrait et présente un spectre d'absorption en lumière ultra-violette caractérisé par des rapports de densité optique à différentes longueurs d'onde : 260/280 et 260/230, qui sont toujours égaux ou supérieurs à 2, signe d'un degré de pureté satisfaisant.

- le second (b) présente une coloration verte et rassemble la plupart des pigments chlorophylliens. Cependant, lorsque les extraits sont effectués à partir d'explantats prélevés tout au début de la culture, ils ne sont pas contaminés par ces pigments. On observe alors la présence d'une substance qui absorbe fortement en lumière ultraviolette, présente un maximum vers 240 - 245 nm et s'apparente vraisemblablement aux composés phénoliques dont les tissus de plantes sont toujours très riches.

γ) conclusion

.....

Les gradients de densité en  $\text{CsSO}_4$  et la filtration sur Sephadex G 50 permettent donc de purifier correctement les ARN extraits des tissus de racines d'Endive. Compte tenu cependant de la grande rapidité (1 heure en moyenne) de la purification par passage sur Sephadex G 50, c'est ce procédé que nous avons utilisé ultérieurement de manière systématique.

c) gradients de saccharose

Des fractions d'environ 150 à 200  $\mu\text{g}$  d'ARN en solution dans 200  $\mu\text{l}$  maximum de tampon Tris-HCl (20 mM), pH 7,5 contenant de l'EDTA (10 mM), du NaCl (50 mM) et du SDS (0,2 %) sont déposées sur des gradients de saccharose de 5 à 20 %. Les gradients sont réalisés au moyen de l'appareil de BRITTEN et ROBERTS (1960) relié par une pompe péristaltique à un système de remplissage automatique des tubes de centrifugation (Buchler "auto-densiflow"). Les tubes de nitrate de cellulose de 5 ml sont ensuite soumis durant 3 heures à une centrifugation à 50 000 trs.min<sup>-1</sup> (Ultracentrifugeuse Beckman modèle L, Rotor 3W 65).

Le fractionnement des gradients est réalisé automatiquement par un dispositif ISCO. La densité optique des différentes fractions est mesurée sur spectrophotomètre à 260 nm et leur radioactivité est évaluée.

## II            R E S U L T A T S

### A) RECHERCHE D'UN MILIEU NUTRITIF FAVORABLE AU BOURGEONNEMENT

Les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" sont capables de produire des organes de façon spontanée, en l'absence de tout apport exogène de substances de croissance. Dans cette étude, nous avons voulu réaliser une condition expérimentale qui ne permette la formation que de bourgeons, ceci de façon homogène et reproductible, afin d'effectuer les études histologiques et biochimiques.

Nous sommes partie d'un milieu minéral simple constitué des macro- et microéléments de la solution de HELLER (1953) auxquels on ajoute du fer et nous avons étudié l'influence de la taille des explantats, de substances hormonales et de certains composés organiques tels que le glucose.

Nous avons choisi d'utiliser des explantats de petite taille car l'étude de la formation des organes nécessite l'utilisation d'un système simple et homogène, dans lequel les phénomènes de corrélations sont réduits au minimum. De plus, un tel système pourra favoriser l'analyse des effets produits par les changements des conditions externes ainsi que par l'apport des substances exogènes.

AIA ML <sup>-1</sup> \ Kin. ML <sup>-1</sup>	0	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
0	0,8	0,5	0,6	0,3	0,2
10 <sup>-7</sup>	0	0,4	0,4	0,3	0,7
10 <sup>-6</sup>	0	0,10	0	0	0
10 <sup>-5</sup>	0	0,10	0,10	0	0
10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0	0

**TABLEAU I** : Action conjuguée de l'acide indolylacétique (AIA) et de la kinétine (Kin.) sur le bourgeonnement des fragments de racines d'Endive cultivés en présence de 2 % de glucose.

AIA ML <sup>-1</sup> \ Kin. ML <sup>-1</sup>	0	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
0	0,2	0,5	0,4	0,1	0,2
10 <sup>-7</sup>	0,4	0,6	0,5	0,1	0,1
10 <sup>-6</sup>	3,8	3,6	3,7	3,5	1,5
10 <sup>-5</sup>	6,8	5,7	5,0	3,5	2,2
10 <sup>-4</sup>	4,4	6,5	5,7	5,6	1,2

**TABLEAU II** : Action conjuguée de l'acide indolylacétique (AIA) et de la kinétine (Kin.) sur la rhizogenèse de fragments de racines d'Endive cultivés en présence de 2 % de glucose.

Les résultats sont exprimés en nombre moyen d'organes par explantat.

En nous inspirant des travaux de LEFEBVRE (1977), nous avons utilisé un milieu nutritif contenant 2 % de glucose et dépourvu de phytohormones, sur lequel nous avons mis en culture des fragments de 2 mm d'épaisseur et de 6 mm ou 8 mm de diamètre. Dans ces conditions, tous les explantats produisent à la fois des bourgeons et des racines et nous avons finalement retenu les plus petits pour lesquels les phénomènes de polarité sont supprimés. Sur de tels explantats, nous avons ensuite vérifié les effets conjugués de l'auxine et de la kinétine sur la production des organes (Tableaux I et II).

Comme nous pouvions nous y attendre, l'auxine inhibe la formation des bourgeons (Tableau I) et favorise celle des racines (Tableau II). Bien que de manière beaucoup plus faible, la kinétine exerce également un effet inhibiteur sur le bourgeonnement mais réduit par contre l'effet de l'auxine (Tableau I). En outre, cette cytokinine diminue la production de racines pour des concentrations supérieures à  $10^{-6}$  M.l<sup>-1</sup> et modère l'effet stimulant de l'acide indolylacétique sur la rhizogenèse (Tableau II).

Les sucres pouvant également jouer un rôle important dans les phénomènes d'organogenèse, nous avons examiné l'action de différentes concentrations en glucose, sur la production

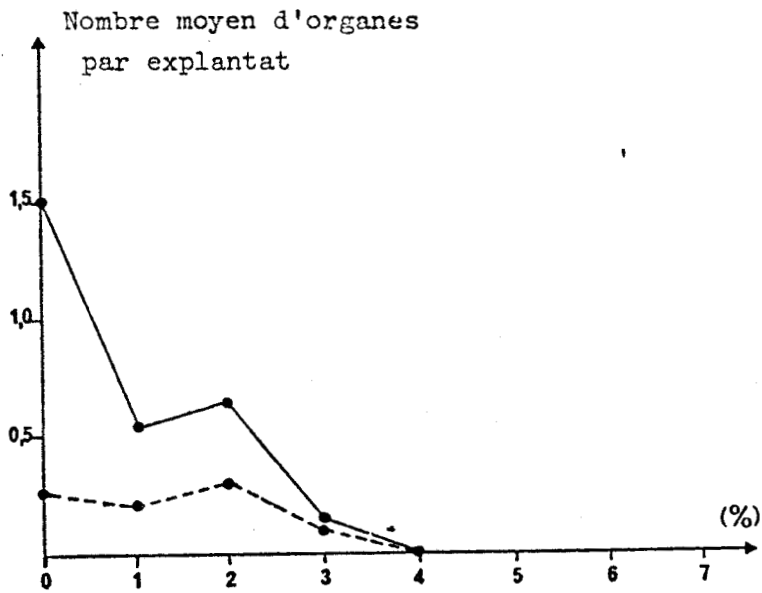


Fig. 5 : Action du glucose sur la production de bourgeons (—●—) et de racines (-●-) par des explantats de racine d'Endive cultivés sur un milieu dépourvu de substances hormonales.

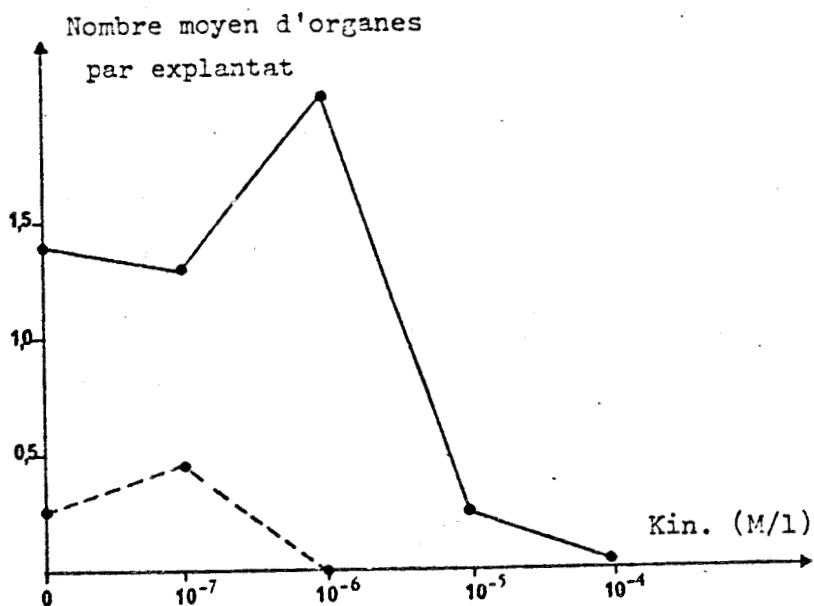


Fig. 6 : Action de la kinétine sur le bourgeonnement (—●—) et la rhizogenèse (-●-) de fragments de racines d'Endive cultivés sur un milieu dépourvu de sucre.

des organes. Ce sucre s'est montré inhibiteur de la formation des bourgeons (Fig. 5); au-delà de 3 %, l'inhibition est d'ailleurs totale et les tissus brunissent et se nécrosent. Le glucose diminue également la production de chlorophylle et réduit la formation de racines pour des concentrations supérieures à 2 %.

L'examen de ces différents résultats fait ressortir que l'intensité du bourgeonnement la plus élevée est obtenue en l'absence de phytohormones, lorsque le glucose est présent dans le milieu à la concentration de 2 % (Tableau I). Ce résultat apparaît normal si l'on considère l'action classiquement inhibitrice de l'auxine sur la formation des bourgeons mais il l'est moins en ce qui concerne la kinétine. C'est pourquoi, puisque le glucose inhibe la formation des bourgeons (Fig. 5), nous avons testé l'efficacité de la kinétine en l'absence de sucre.

Dans ces conditions (Fig. 6), le nombre de bourgeons néoformés en présence de kinétine est optimal à la dose de  $10^{-6} \text{ ML}^{-1}$ ; au-delà, des phénomènes d'inhibition se manifestent et à la dose de  $10^{-4} \text{ ML}^{-1}$  les manifestations organogènes cessent totalement.

Le milieu contenant de la kinétine  $10^{-6} \text{ ML}^{-1}$  est donc, dans nos conditions expérimentales, non seulement le plus favorable à la formation des bourgeons mais il empêche également la formation des racines. En outre, la réponse organogène des

tissus est constante lors d'expériences successives réalisées tout au long de la période de conservation des racines d'Endive et elle est très homogène dans les différents lots expérimentaux.

Les tissus sont compacts et très chlorophylliens, surtout au niveau de la zone génératrice. La chlorophylle est visible à la surface des explantats dès le 3ème jour de culture et les bourgeons apparaissent vers le 8ème jour (Planche I).

#### B) ETUDES HISTOLOGIQUE ET HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE

Il nous a semblé important de suivre avec précision le déroulement de l'évolution des tissus à l'intérieur des explantats, afin de mieux interpréter les modifications biochimiques observées au cours de l'activation et la différenciation des cellules.

Les bourgeons apparaissent entre le 8ème et le 10ème jour de la culture mais auparavant, le métabolisme des cellules est profondément modifié pour permettre une reprise de l'activité mitotique et la formation de nodules méristématiques. C'est à ces premières étapes que nous nous sommes plus particulièrement intéressée.

Une étude préliminaire réalisée par les méthodes histologiques classiques, nous a permis de suivre la mise en place des mitoses, l'apparition des premiers méristèmes primaires et leur différenciation en bourgeons. Nous avons ensuite utilisé la technique d'histoautoradiographie, afin de situer les périodes



de synthèse de constituants macromoléculaires, tels que l'ADN, l'ARN et les protéines, visualisés dans les cellules par la présence de grains d'argent. En particulier, nous nous sommes attachée à localiser ces synthèses au cours de la culture, en fonction de l'évolution histologique des explantats.

L'étude histoautoradiographique des ARN et des protéines a toutefois été réalisée en tenant compte des résultats obtenus par les analyses biochimiques et sera donc exposée ultérieurement (Chapitre C). Nous avons considéré l'histoautoradiographie comme une technique de localisation des synthèses dont l'aspect quantitatif est du domaine de l'analyse biochimique.

L'ADN a été traité de manière différente car la mitose et la synthèse d'ADN (phase S) permettent de définir le cycle cellulaire. Nous avons donc réuni ces deux catégories de résultats expérimentaux afin de mieux rendre compte de la chronologie et de l'aspect dynamique des événements considérés.

#### 1) Activation cellulaire et initiation des organes

Nous avons situé l'entrée des cellules en phase "S" grâce à l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des noyaux et nous avons suivi les modifications cytologiques subies par les tissus au cours des premiers jours de culture.

Au moment de la mise en culture, les explantats se composent de phloème, de cambium et de xylème. Les noyaux des cellules sont de petite taille ; il sont souvent collés

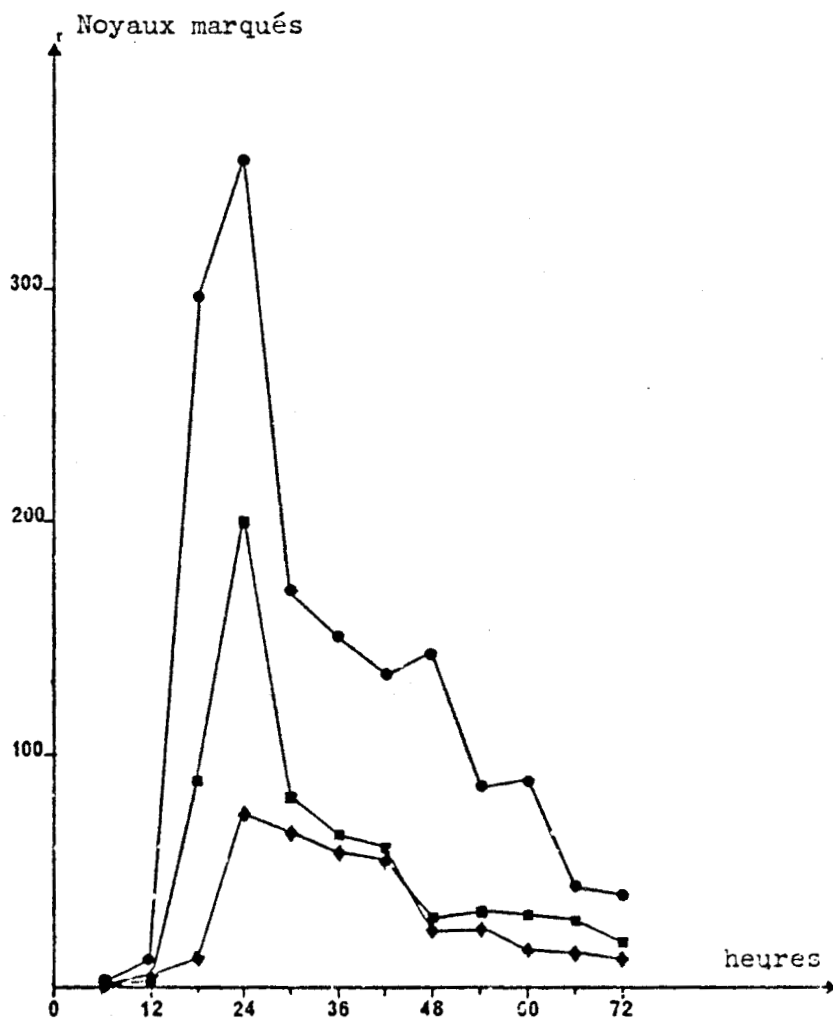


Fig. 7 : Evolution au cours de la culture de la densité de noyaux marqués sur une surface de coupe, en fonction de leur situation au sein de fragments de racines d'Endive : dans les premières couches cellulaires périphériques ( —●— ), dans le xylème et le phloème ( —■— ) et au niveau de l'assise génératrice ( —◆— ). Avant leur prélèvement, les tissus ont été mis à incuber pendant 6 heures dans une solution contenant  $20 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$  de thymidine- $^3\text{H}$  (A.S. :  $25 \text{mCi.mm}^{-1}$ )

Temps (heures)	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Index mitotique	0	0	0	4,6	6	12,4	7,5	6,3	6,4
Index de marquage		0	4	32	34,4	33	18,4	8,4	3,2

TABLEAU III : Evolution de l'index mitotique et du % de noyaux marqués au cours des premières heures de culture.

Les comptages ont été effectués sur 500 cellules environ et les résultats sont exprimés en %.

contre la paroi des cellules, contiennent généralement plusieurs nucléoles de taille réduite et leur nucléoplasme est très coloré (Planche II, Fig. 1). A cet instant, aucun méristème primaire n'est visible.

Durant les 10 premières heures de culture, aucune synthèse nette n'est détectable (Planche II, Fig. 2), le noyau est encore de petite taille et souvent plurinucléolé, toutefois, il tend à occuper une position centrale dans la cellule.

Après 12 heures de culture, nous constatons à la périphérie de l'explantat et au niveau du cambium, une réactivité nucléaire et nucléolaire qui consiste en une réduction du nombre de nucléoles par noyau ainsi qu'en une augmentation de la taille des deux organites (Planche II, Fig. 3). A ce moment, les premières synthèses sont visibles sur les bords du fragment (Planche II, Fig. 4).

Après 18 heures de culture, les synthèses s'étendent; elles se produisent également au niveau de la zone génératrice, essentiellement au point de rencontre des éléments vasculaires et du liber (Planche II, Fig. 5-6). C'est à ce stade qu'apparaissent les premières divisions cellulaires (Planche III, Fig. 1) à la périphérie des explantats.

A la 24<sup>ème</sup> heure, le nombre de noyaux ayant incorporé de la thymidine tritiée est maximum (Fig. 7) (Planche II, Fig. 7 et 8) et 6 heures plus tard, la densité des figures de mitose

observées est optimale (Tableau III) (Planche III , Fig. 2 à 6) ; dès lors, la synthèse d'ADN se ralentit progressivement et les noyaux contenant de la thymidine tritiée se trouvent alors essentiellement au niveau de la zone génératrice (Planche IV, Fig. 1 et 2).

D'une manière générale, la plus forte densité de noyaux synthétisant l'ADN se situe au niveau du cambium, principalement à ses extrémités, mais aussi à la périphérie du fragment, à 2 ou 3 couches cellulaires du bord de l'explantat.

La situation de ces noyaux et les recloisonnements (divisions périclines) traduisent à ce moment une activité de cicatrisation (Planche IV, Fig. 3). L'assise cicatricielle qui en résulte est mise en place au bout de 2 à 3 jours de culture (Planche IV, Fig. 4 ; Planche VIII, Fig. 1) : elle est formée de quelques couches cellulaires qui isolent la zone de blessure dont les cellules sont nécrosées. Toutefois, cette assise ne s'étendra pas.

Au niveau du cambium, des trachéïdes néoformées s'entourent d'une zone génératrice pour former des faisceaux cribrovasculaires aux 3ème et 4ème jours de la culture, ces faisceaux ont une disposition inverse; en effet, le liber est à l'extérieur, au contact du tissu préexistant qui est constitué par un parenchyme vasculaire (Planche IV, Fig. 5 et 6 ; Planche VIII, Fig. 2).

C'est au 3ème jour de la culture que se forment, au

bord de l'explantat, des îlots de petites cellules isodiamétriques présentant nettement un caractère de cellules méristématiques primaires : noyau et nucléole très volumineux et fortement colorables (Planche V, Fig. 1 et 2 ; Planche VIII, Fig. 3) ; on observe au niveau de ces noyaux des synthèses d'ADN (Planche VII, Fig. 1). Ces îlots cellulaires proviennent soit de plusieurs cellules différenciées, soit plus rarement, d'une seule cellule recloisonnée (Planche V, Fig. 3) mais il est à noter qu'aucune cellule spécialisée particulière n'est à l'origine des méristèmes. Le futur épiderme de ces méristèmes caulinaires est visible dès le 4<sup>ème</sup> jour de culture (Planche V, Fig. 4) puis au 5<sup>ème</sup> jour ce sont les initiums foliaires et l'apex caulinaire qui se différencient (Planche V, Fig. 6). La surface des explantats présente alors quelques nettes protubérances puis les tissus se déchirent et les premiers bourgeons apparaissent à l'extérieur des tissus vers le 8<sup>ème</sup> jour de culture.

Nous avons constaté, lors de cette étude, que l'organogénèse est plus précoce sur le bord des explantats et gagne progressivement le centre. L'initiation ne se fait donc pas au même moment pour tous les bourgeons. De plus, en comparant le nombre de méristèmes contenus dans les explantats et le nombre de bourgeons développés, nous constatons qu'une certaine proportion de méristèmes reste inhibée à l'intérieur des tissus.

En ce qui concerne la situation des méristèmes, nos

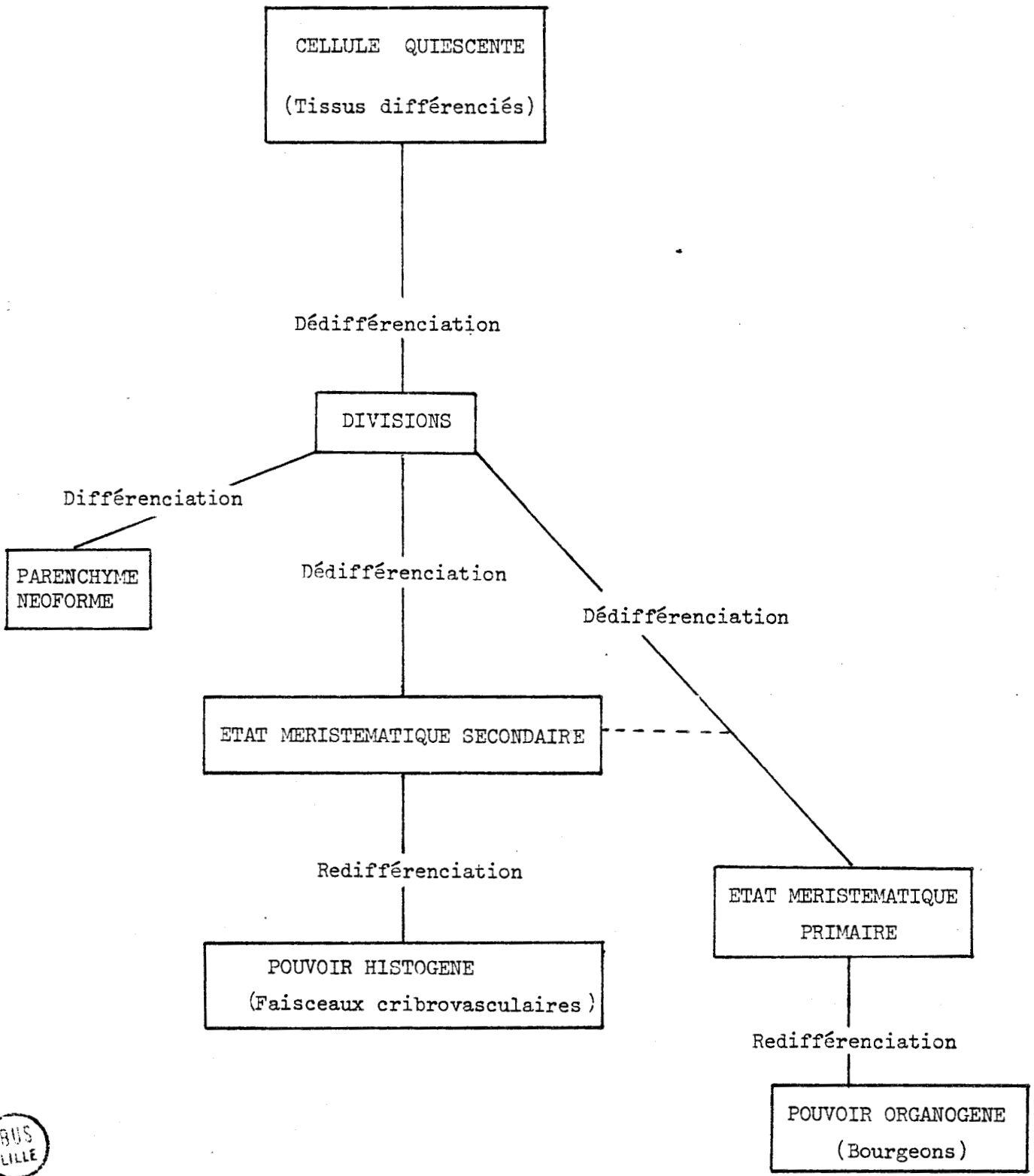


Fig. 8 : Potentialités cellulaires des tissus de racine d'Endive au cours de la culture "in vitro".

BUS  
LILLE

observations confirment celles de BUVAT (1945) ; en effet, on les trouve essentiellement au contact des trachéïdes et, à proximité de la section, dans le parenchyme libérien et au niveau de la zone génératrice (Planche V, Fig. 5).

## 2) Conclusion

C'est donc au cours des trois premiers jours de culture que se décide le devenir des tissus puisque c'est durant cette période qu'ont lieu l'activation cellulaire et l'initiation des organes.

La synthèse des acides nucléiques est détectée dans un premier temps par une modification de la structure et de la colorabilité du noyau et du nucléole et plus particulièrement par une incorporation intense de thymidine-<sup>3</sup>H.

Nous avons pu constater qu'après une synthèse d'ADN importante, de la 18<sup>ème</sup> à la 24<sup>ème</sup> heure de culture, survient, vers la 30<sup>ème</sup> heure, une vague de mitoses.

La localisation des premières synthèses et des premières divisions à la périphérie des explantats permet de supposer l'existence d'un stimulus mitotique dû à la blessure, qui serait responsable, en particulier, de la formation d'une assise cicatricielle. Ce stimulus s'étend ensuite à la totalité du tissu. Le phénomène d'activation gagne alors surtout les cellules de la zone génératrice qui, étant donné leur état indifférencié, constituent une cible préférentielle.

D'autre part, la formation des méristèmes représente une seconde étape importante où ceux-ci sont le siège de synthèses accrues qui aboutissent à la formation des bourgeons. Au cours de cette période, l'influence du milieu de culture est déterminante puisque c'est en fonction de l'équilibre hormonal que s'établit l'orientation de l'organogenèse:

L'évolution de l'ensemble des cellules s'effectue donc selon le schéma proposé par NITSCH et LANCE-NOUGAREDE (1967) pour les cellules de moelle de Tabac et que nous avons adapté (Fig. 8) à notre matériel.

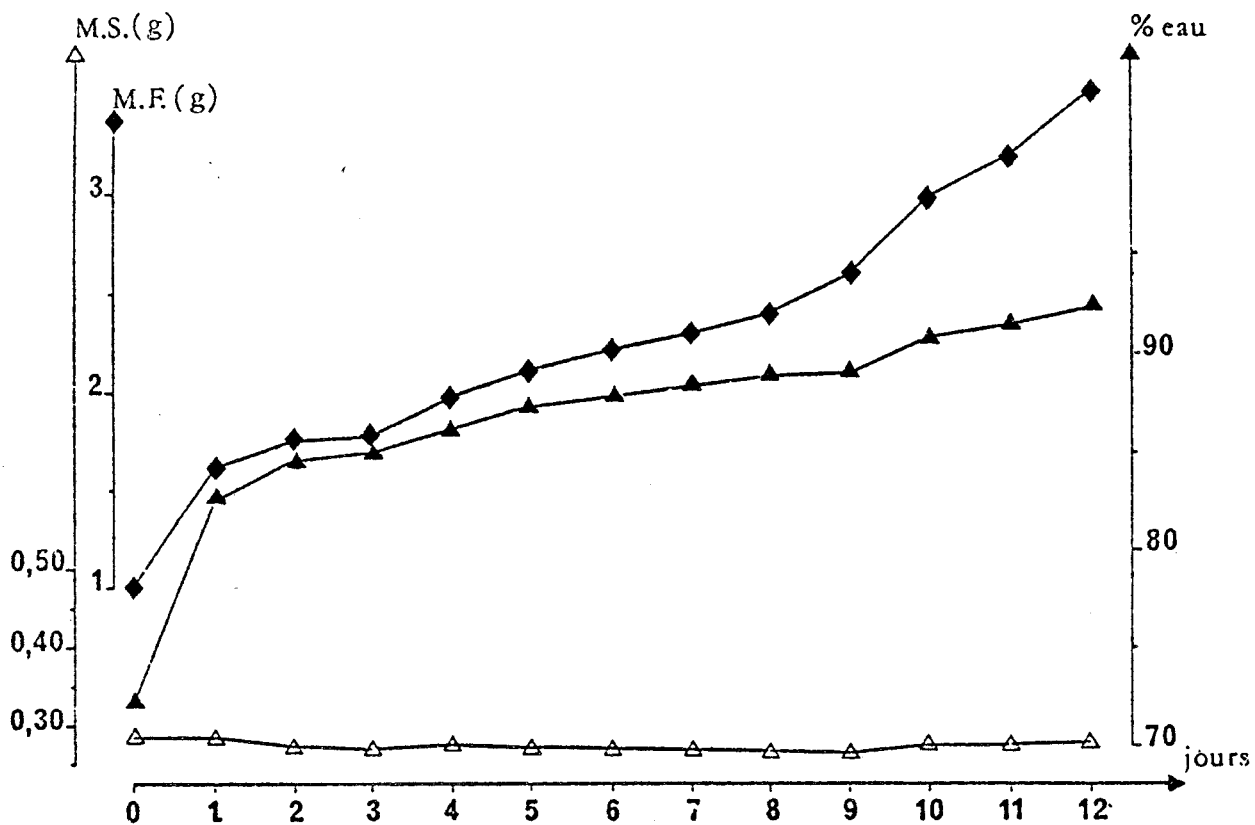
### C) ETUDE BIOCHIMIQUE

Les nombreuses modifications cytologiques observées précédemment suggérant l'existence de transformations métaboliques importantes, nous avons suivi l'évolution des acides nucléiques et des protéines ainsi que l'incorporation de précurseurs dans ces macromolécules. Les phénomènes mis en évidence grâce à l'autoradiographie ont été analysés quantitativement par l'emploi de techniques biochimiques.

#### 1) Croissance des cultures

Dès le premier jour de culture, on assiste à une importante entrée d'eau dans les tissus. Le phénomène se régularise ensuite et ne reprend de manière plus intense qu'au moment





**Fig. 9 :** Variations du pourcentage en eau (—▲—) et des poids de matière fraîche (—◆—) et de matière sèche (—△—) au cours de la culture "in vitro" de fragments de racines d'Endive.



de l'apparition des bourgeons. Pendant ce temps, le poids de matière sèche reste, au contraire, pratiquement constant (Fig. 9). Si l'on tient compte du fait que, comme nous le verrons plus loin, les tissus sont le siège de synthèses importantes d'acides nucléiques et de protéines, on ne peut expliquer la constance du poids de matière sèche que par des dégradations qui ont lieu simultanément et qui intéressent vraisemblablement, en grande partie, les glucides.

## 2) Métabolisme de l'ADN

Dans le chapitre précédent, nous avons suivi l'entrée des cellules en phase "S" puis la progression de celles-ci jusqu'à la division cellulaire. Ces divisions, qui s'effectuent de façon partiellement synchrone, constituent notre principal point de repère au cours de cette étude. Nous avons, en effet, voulu réaliser une analyse quantitative afin d'évaluer globalement l'ADN présent dans les tissus et de déterminer son activité de synthèse.

L'ADN a donc été extrait des explantats à divers stades de leur culture et analysé ; les résultats confirment ceux obtenus par autoradiographie et situent le début des synthèses vers la 12<sup>ème</sup> heure (Fig. 10). Cette synthèse est ensuite fortement stimulée pour atteindre son maximum vers la 30<sup>ème</sup> heure ; au-delà, il y a diminution des taux de synthèse qui s'accroît rapidement après 48 heures de culture.

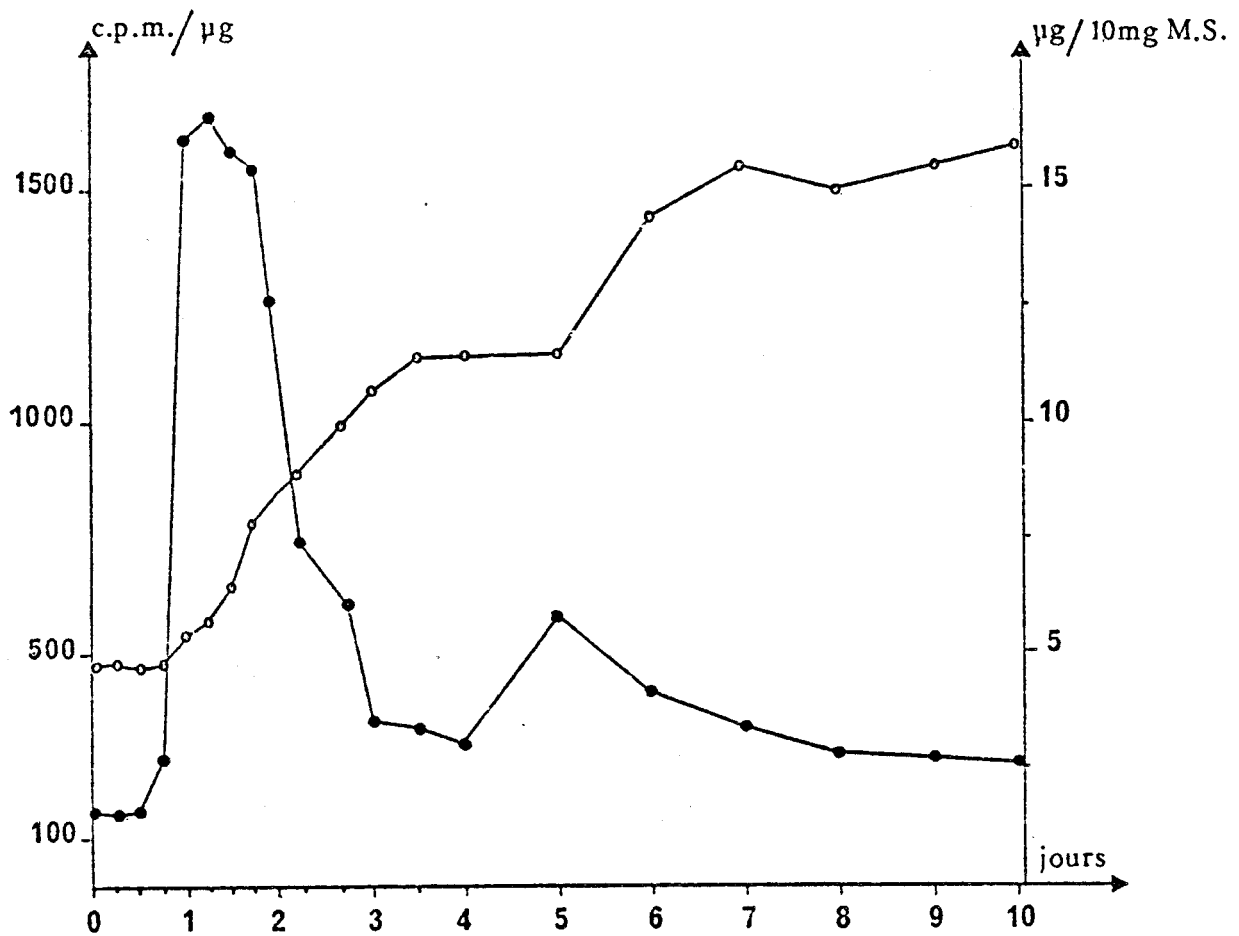


Fig. 10 : Métabolisme de l'ADN en fonction du temps de culture.

Avant le prélèvement pour analyse, les tissus ont été mis à incuber pendant 2 heures en présence d'une solution de thymidine-<sup>3</sup>H (A.S. : 25 mCi.mM<sup>-1</sup>) à 12,5 µCi.ml<sup>-1</sup>.

Les résultats sont exprimés en µg d'ADN/10 mg M.S. (—○—) et en c.p.m. µg<sup>-1</sup> d'ADN (—●—).

Au cours des trois premiers jours de culture, la quantité d'ADN présente dans les tissus a plus que doublé, l'augmentation la plus nette se produit au cours du 2ème jour, c'est-à-dire au moment de la division cellulaire.

Lors de la formation des méristèmes primaires, nous avons trouvé une assez faible activité de synthèse de l'ADN suivie d'une augmentation relativement rapide et importante de la quantité d'ADN. La faible ampleur des synthèses détectées à ce moment peut être due au fait qu'elles ne concernent qu'une assez petite proportion de cellules mais également au fait qu'elles prennent le relais des synthèses qui se produisent au niveau des zones cicatricielles, et génératrices et qui sont, elles, en diminution constante.

L'étalement dans le temps de l'apparition des méristèmes et le nombre important de cellules ne participant pas au phénomène d'organogenèse contribuerait donc à masquer ou à atténuer certains événements.

Nous avons également noté que le pourcentage de cellules en mitose (index mitotique) est inférieur au pourcentage des cellules présentant des noyaux marqués, tels que nous avons pu le calculer par autoradiographie (Tableau III), ce qui permet de supposer qu'un certain nombre de cellules doit présenter un phénomène d'endopolyploïdisation. Il semble, en effet, que toutes les cellules qui synthétisent l'ADN ne subissent pas obligatoirement la mitose.

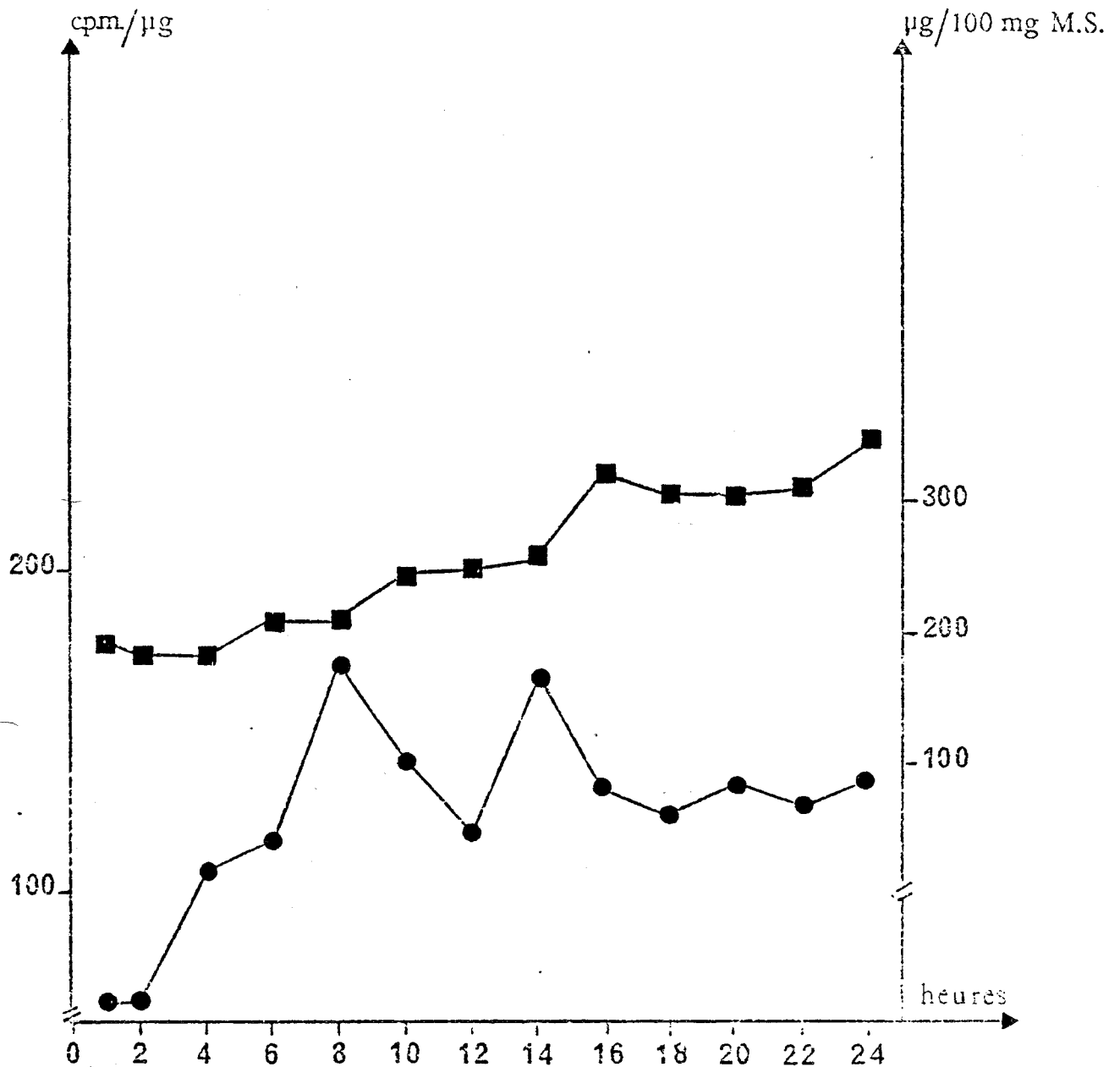


Fig. 11 : Evolution de la teneur en ARN ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg M.S.}$  ; —■—) et de son activité spécifique ( $\text{c.p.m.}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  d'ARN ; —●—) au cours des premières 24 heures de la culture. Avant le prélèvement, les tissus ont été mis à incuber pendant 1 heure, dans une solution contenant  $12,5 \cdot \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'uridine- $^3\text{H}$  (A.S. :  $25 \text{ mCi}\cdot\text{mM}^{-1}$ ).



Nous retenons donc deux moments importants dans le métabolisme de l'ADN : l'un se situe vers la 30ème heure et correspond à la phase "S" qui précède la mitose, et l'autre vers le 4ème jour et correspond à l'initiation des méristèmes.

### 3) Métabolisme de l'ARN

#### a) Evolution des ARN totaux au cours de la culture

Lors des premières 24 heures de culture des explantats, la cinétique d'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H (Fig. 11) montre l'existence d'une synthèse précoce d'ARN, qui débute dès la 4ème heure et comprend deux phases distinctes :

- la première, dont l'activité optimale se situe vers la 8ème heure, ne modifie pas la quantité d'ARN ; notons cependant que, tout au début de la culture, survient une légère diminution, vraisemblablement due à des phénomènes de dégradation liés au prélèvement et à la mise en culture des tissus.

- la seconde, dont le pic de synthèse apparaît vers la 14ème heure s'accompagne par contre d'une faible augmentation des ARN totaux.

A la suite de ces modifications précoces, on observe (Fig. 12) une importante stimulation de la synthèse d'ARN qui s'amplifie à partir du 2ème jour et dont le maximum se situe vers la 84ème heure, c'est-à-dire au moment de la formation des

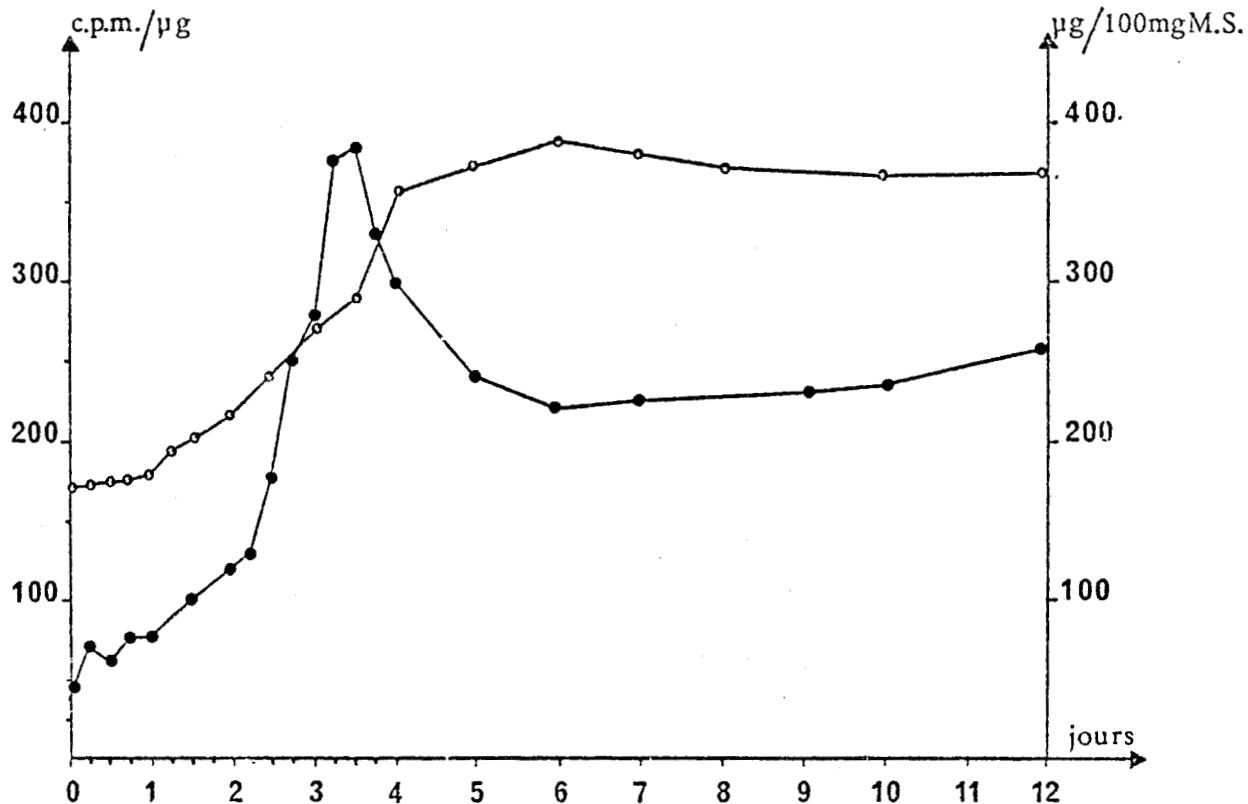


Fig. 12 : Métabolisme de l'ARN en fonction du temps de culture.

Avant le prélèvement, les tissus ont été mis à incuber pendant 2 heures dans une solution contenant de l'uridine-<sup>14</sup>C (A.S. : 57,8 mCi.mM<sup>-1</sup>) à la dose de 3 µCi.ml<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en µg d'ARN/100mg M.S. (—○—) et en c.p.m..µg<sup>-1</sup> d'ARN (—●—).

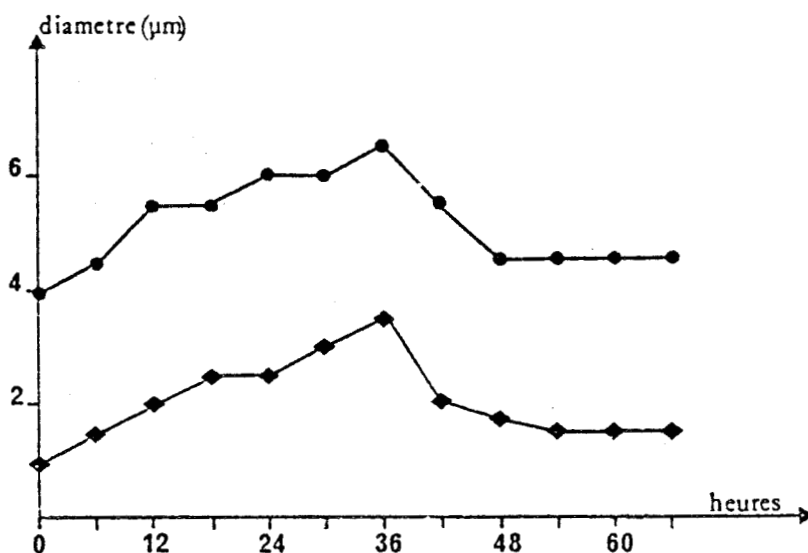


Fig. 13 : Evolution de la taille moyenne des noyaux et des nucléoles (—●—, —◆—) au cours des 3 premiers jours de culture.

BPE  
LILLE

méristèmes primaires. A cette synthèse fait suite une augmentation régulière de la quantité globale d'ARN qui se stabilise à partir du 4ème jour tandis que les synthèses se ralentissent.

L'étude histoautoradiographique nous apporte un certain nombre de renseignements supplémentaires. Deux heures après l'excision, les noyaux sont encore de petite taille et possèdent plusieurs nucléoles. Après incorporation d'uridine- $H^3$ , des grains d'argent sont cependant déjà visibles au niveau de la chromatine et, en nombre plus important, au niveau du nucléole (Planche VI, Fig. 1). Cette incorporation s'accroît lors des deux heures suivantes (Planche VI, Fig. 2). Parallèlement, on observe quelques modifications cytologiques qui traduisent l'activité précoce des cellules : en particulier, l'accroissement des volumes nucléaires et nucléolaires (Fig. 13), la réduction du nombre de nucléoles et l'apparition des vacuoles à l'intérieur de ces derniers. Ces phénomènes, que nous constatons encore sur nos coupes après la vague de divisions, seraient le signe d'une stimulation cellulaire (LACHARME et STEIMAN, 1970 ; VASIL, 1973).

A la 8ème heure, l'incorporation des radioéléments s'effectue de façon prépondérante dans le nucléole (Planche VI, Fig. 3), ce qui indiquerait une synthèse prédominante de précurseurs d'ARN ribosomiaux. Puis, jusqu'à la 20ème heure environ, c'est la chromatine qui présente la plus grande activité (Planche VI, Fig. 4). Parallèlement, et dès la 8ème



heure, on assiste à une forte augmentation de l'incorporation du radioélément au niveau du cytoplasme.

Après le 1er jour de culture, les trois compartiments cellulaires continuent d'être le siège de synthèses.

A l'image de ce qui se produit pour l'ADN, les phénomènes sont surtout nets au niveau de la zone génératrice et à la périphérie des explantats.

Au moment de la formation des méristèmes primaires, vers le 3ème jour de culture, on observe également une incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H au niveau des nucléoles des cellules méristématiques (Planche VII, Fig. 2) ; cela vient donc s'ajouter aux synthèses qui se produisent dans l'ensemble des tissus et peut peut-être expliquer la stimulation, brutale de l'activité spécifique observée à ce moment (Fig. 12).

Ces résultats nous amènent à faire quelques remarques. Tout d'abord, nous constatons que la transcription débute très rapidement et qu'elle peut se définir en 3 périodes : 0 - 8 H, 8 - 14 H, 14 - 84 H, cette dernière période étant caractérisée par la formation des méristèmes entre le 2ème et le 3ème jour. On peut alors se demander si les ARN produits à ces différents moments correspondent à des molécules identiques. En effet, la période 0 - 8 H est caractérisée par la synthèse importante d'ARN au niveau du nucléole et avec une intensité moindre dans la chromatine, la période 8 - 14 H par des synthèses cytoplasmiques et nucléoplasmiques, accompagnées d'une augmentation des taux d'ARN

et la 3ème période par des synthèses généralisées auxquelles s'ajoutent des synthèses nucléolaires visibles dans les cellules des méristèmes néoformés.

b) Analyse qualitative de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H dans les différentes catégories d'ARN

Afin de savoir si les ARN synthétisés après 8, 14 et 84 heures (Fig. 11 et 12) correspondent bien, comme le suggère l'analyse autoradiographique, à des molécules différentes, nous avons suivi l'évolution des diverses catégories d'ARN au cours de la culture. Nous avons aussi analysé les tissus prélevés après 4 heures de culture, puisque l'autoradiographie révèle déjà une synthèse d'ARN (Planche VI, Fig. 2). Nous nous sommes cependant limitée à mettre en évidence les ARN à renouvellement rapide et pour cela, nous avons utilisé un temps de marquage court. Dans tous les cas, les tissus ont été incubés pendant 30 min. en présence d'Uridine-<sup>3</sup>H. Les ARN ont ensuite été extraits, purifiés, puis analysés sur gradient. Comme cela est classique avec les tissus de plante, nous désignerons les ARN ainsi séparés par leur coefficient de sédimentation : ARN 4-5 S, 18 S et 25 S.

On constate, que de façon générale, (Fig. 14) une incorporation de 30min. correspond à une répartition hétérodispersée de la radioactivité dans les ARN. Dans les tissus témoins (0 h) la radioactivité est très faible et concerne essentiellement des molécules qui sédimentent vers 4-5 S et 18 S. Dès la 4ème heure de culture, le marquage s'intensifie et intéresse des classes plus variées de molécules, de 4-5 S à 25 S. Ensuite,

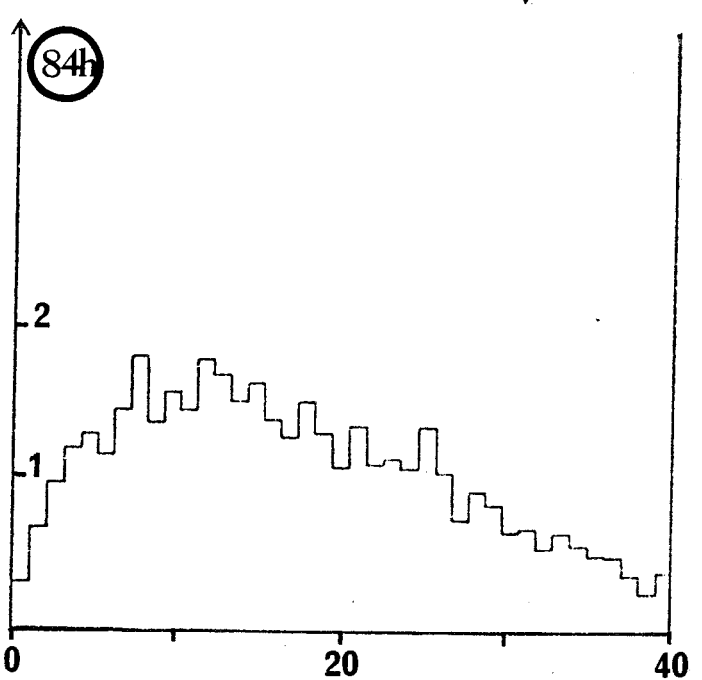
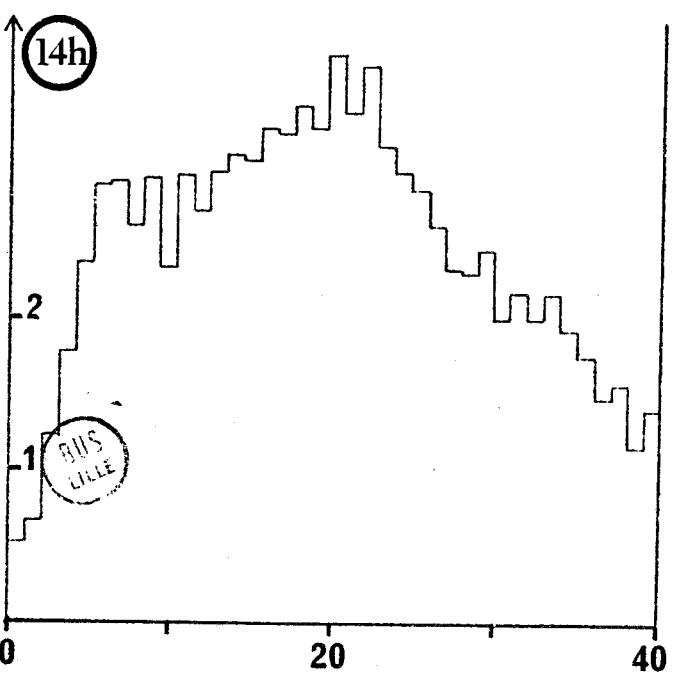
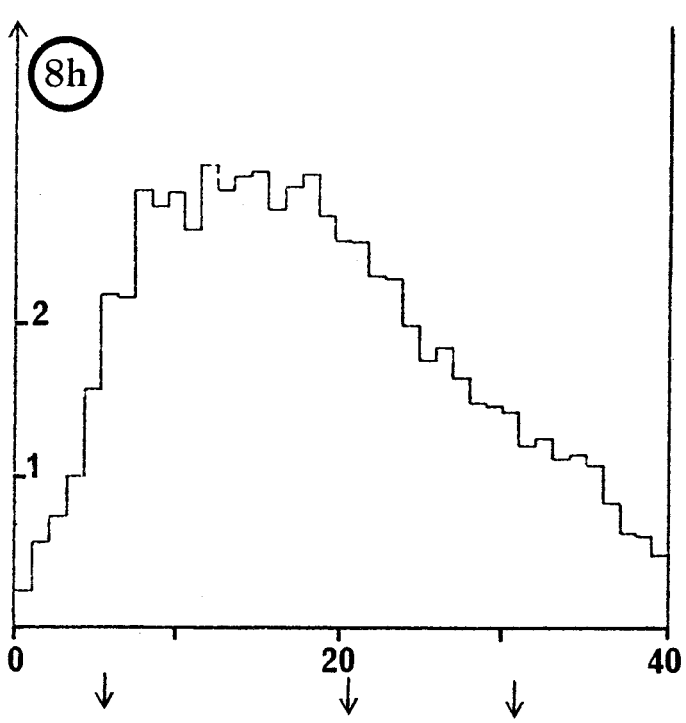
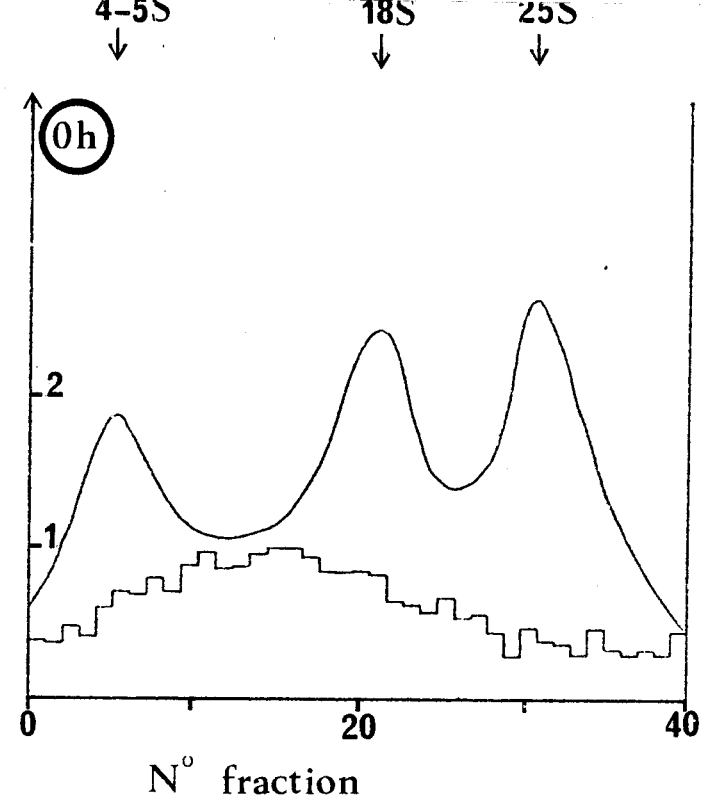
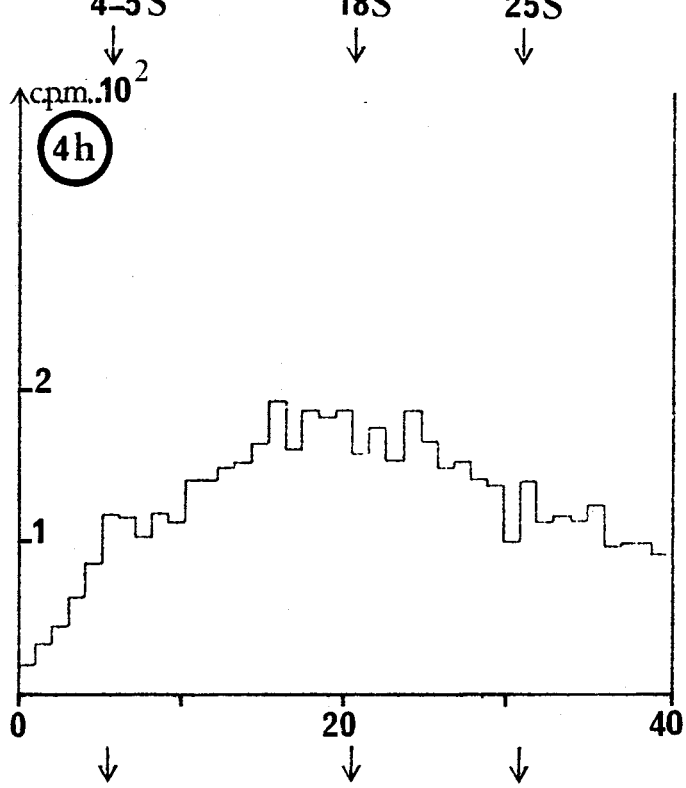


Fig. 14 : Apparition d'ARN à renouvellement rapide dans les explantats de racines d'Endive à différents moments de la culture (0, 4, 8, 14 et 84 heures).

Les tissus ont été mis à incuber pendant 30 minutes en présence d'uridine-<sup>3</sup>H (A.S. : 25 mCi.mM<sup>-1</sup>) à 12,5 µCi.ml<sup>-1</sup>.

200 µg d'ARN sont déposés à la surface d'un gradient linéaire de saccharose (5 à 20 %) et la centrifugation est réalisée pendant 3 heures à 50000 trs. min.<sup>-1</sup>.

Nous avons représenté en abscisse la radioactivité des fractions en c.p.m. 10<sup>2</sup>, et en ordonnée le numéro des fractions. La fraction 0 correspondant au sommet du gradient.

Pour les ARN extraits des tissus avant leur ensemencement (0 h) nous avons fait figurer, pour exemple, le profil d'élution en densité optique. Nous nous sommes ensuite limitée sur les autres graphiques, à signaler les constantes de sédimentation observées, par des flèches (↓)

la radioactivité augmente nettement. Après 8 heures de culture, l'incorporation est prépondérante dans les fractions légères et moyennes du gradient. A la 14ème heure, le phénomène s'amplifie et le profil de radioactivité met en évidence une incorporation préférentielle du précurseur radioactif au sein de molécules sédimentant vers 18 S. De plus, on observe un marquage important au sein de fractions plus légères et plus lourdes du gradient. Enfin, après 84 heures, la polydispersion est toujours importante, mais l'intensité de l'incorporation est plus faible et les ARN synthétisés sont représentés en grande partie par des molécules de faible poids moléculaire.

La comparaison de ces différents profils nous apporte un certain nombre de renseignements.

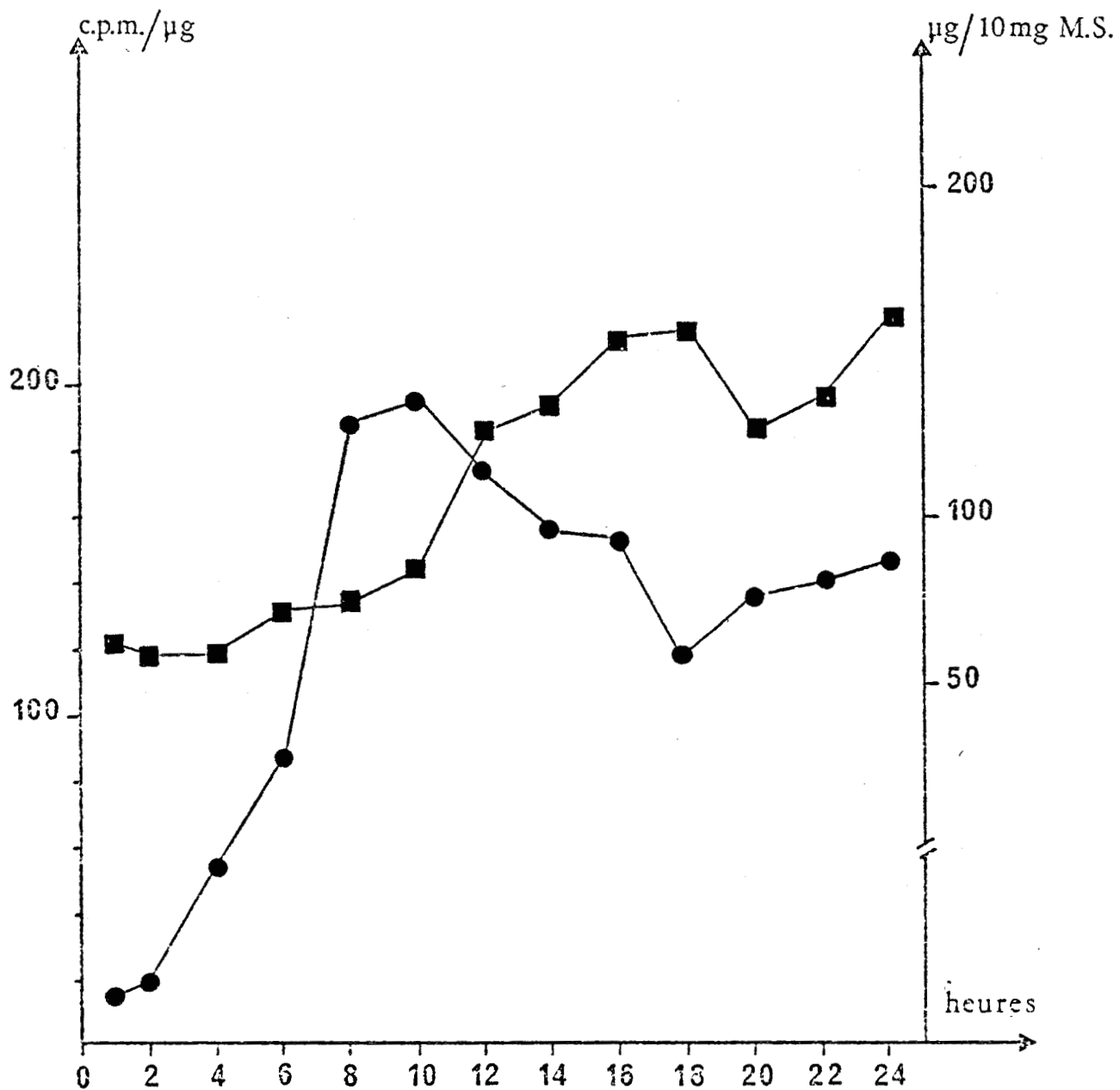
La distribution polydispersée de la radioactivité sur les gradients de saccharose, compte tenu du temps de marquage court, peut suggérer la présence d'ARN à propriétés messagères.

Dès la 4ème heure de culture, la synthèse de ces ARN est nettement amorcée et le phénomène s'accroît au cours de la culture. A la 14ème heure, on observe l'apparition de classes d'ARN beaucoup plus variées qui présentent une activité de synthèse plus élevée.

L'incorporation du précurseur radioactif à la 84<sup>ème</sup> heure de culture est faible, bien que correspondant pourtant à une période pendant laquelle l'activité de synthèse de l'ARN total est la plus importante (Fig. 11). Ceci s'explique cependant par la faible durée d'incorporation (30 min.) qui ne permet pas d'apprécier la formation des ARN stables 18 S et 25 S, dont la synthèse prédomine vraisemblablement durant cette période.

Enfin, les synthèses nucléolaires décelées par l'autoradiographie, en particulier à la 8<sup>ème</sup> et à la 84<sup>ème</sup> heure de culture, laissent supposer la présence de précurseurs d'ARN ribosomiaux à renouvellement rapide. Il ne nous a cependant pas été possible de mettre en évidence ces précurseurs de poids moléculaire très élevé (>25 S) dans les fractions lourdes des gradients de densité.

A la 84<sup>ème</sup> heure, le petit nombre de cellules concernées peut expliquer la très faible quantité de ces précurseurs et la difficulté de les déceler. Cette interprétation est cependant moins acceptable à la 8<sup>ème</sup> heure puisque nous avons observé de très nombreuses cellules dont les nucléoles sont marqués. Cela nous a donc amené à mettre en cause la technique d'extraction utilisée qui ne permet pas d'obtenir cette catégorie de molécules. Des observations identiques ont d'ailleurs été réalisées par ZOILY-FODIL (1979) à partir de tissus de Parthenocissus



**Fig. 15** : Evolution de la teneur en protéines ( $\mu\text{g}/10 \text{ mg M.S.}$  —■—) et de leur activité spécifique ( $\text{c.p.m.}\mu\text{g}^{-1}$  protéines —●—) au cours des premières 24 heures de la culture. Avant le prélèvement, les tissus ont été mis à incuber pendant 1 heure dans une solution contenant  $12,5 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$  de leucine- $^3\text{H}$  (A.S. :  $1 \text{ Ci.mM}^{-1}$ )



tricuspidata ; l'absence d'ARN d'origine nucléaire dans les extraits pouvant être due au broyage des tissus ainsi qu'à la technique d'extraction proprement dite. En effet, si l'extraction à pH : 9,0 et à 4°C que nous avons utilisée, présente l'avantage de limiter l'activité nucléasique, elle ne permet l'obtention essentiellement que d'ARN d'origine cytoplasmique (DELSENY, 1977 ; VASSEUR, 1978).

Quoiqu'il en soit, l'analyse des ARN confirme les observations histoautoradiographiques et traduit une mise en place rapide des synthèses qui s'étendent ensuite et se diversifient.

#### 4) Métabolisme des protéines

Comme la synthèse protéique doit subir de profonds bouleversements au cours du passage de l'état quiescent à l'état réactivé, nous avons suivi son évolution au moyen de l'incorporation de leucine-<sup>3</sup>H.

Le premier jour de culture correspond à la période de latence précédant les premières divisions ; c'est une étape critique car elle est caractérisée par des fluctuations importantes de l'incorporation du précurseur radioactif. L'incorporation débute en effet très rapidement et s'accroît de façon presque linéaire jusqu'à la 10ème heure ; elle s'infléchit ensuite et remonte à nouveau, quoique plus faiblement, vers la 20ème heure (Fig. 15). Au cours des jours suivants et jusqu'à la formation des méristèmes primaires, survient une stimulation de la synthèse beaucoup plus importante qu'auparavant ; elle est en effet 5 fois supérieure à celle mesurée après 24 heures



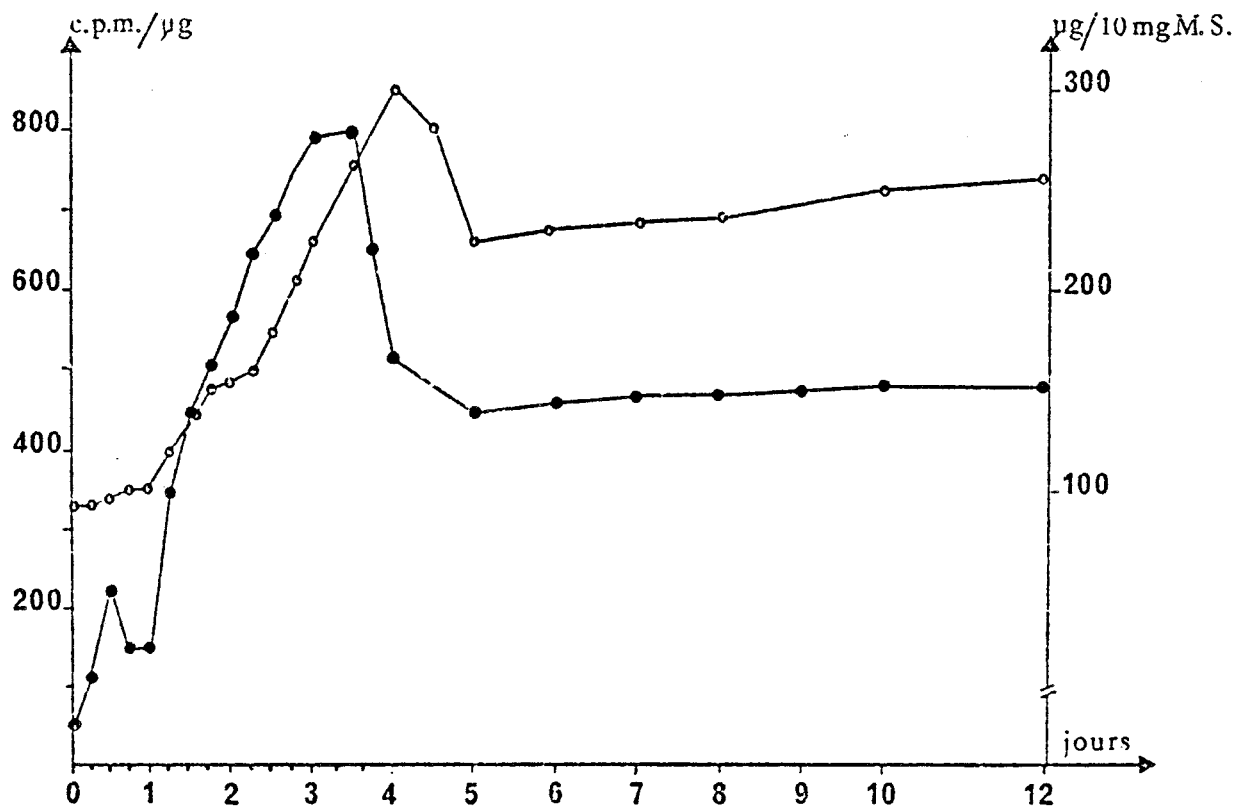


Fig. 16 : Métabolisme des protéines en fonction du temps de culture. Avant le prélèvement, les tissus ont été mis à incuber pendant 2 heures dans une solution contenant de la leucine-<sup>3</sup>H (A.S. : 1 Ci.mM<sup>-1</sup>) à la dose de 12,5 µCi.ml<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en µg de protéines/10 mg M.S. (—○—) et en c.p.m. µg<sup>-1</sup> de protéines (—●—).

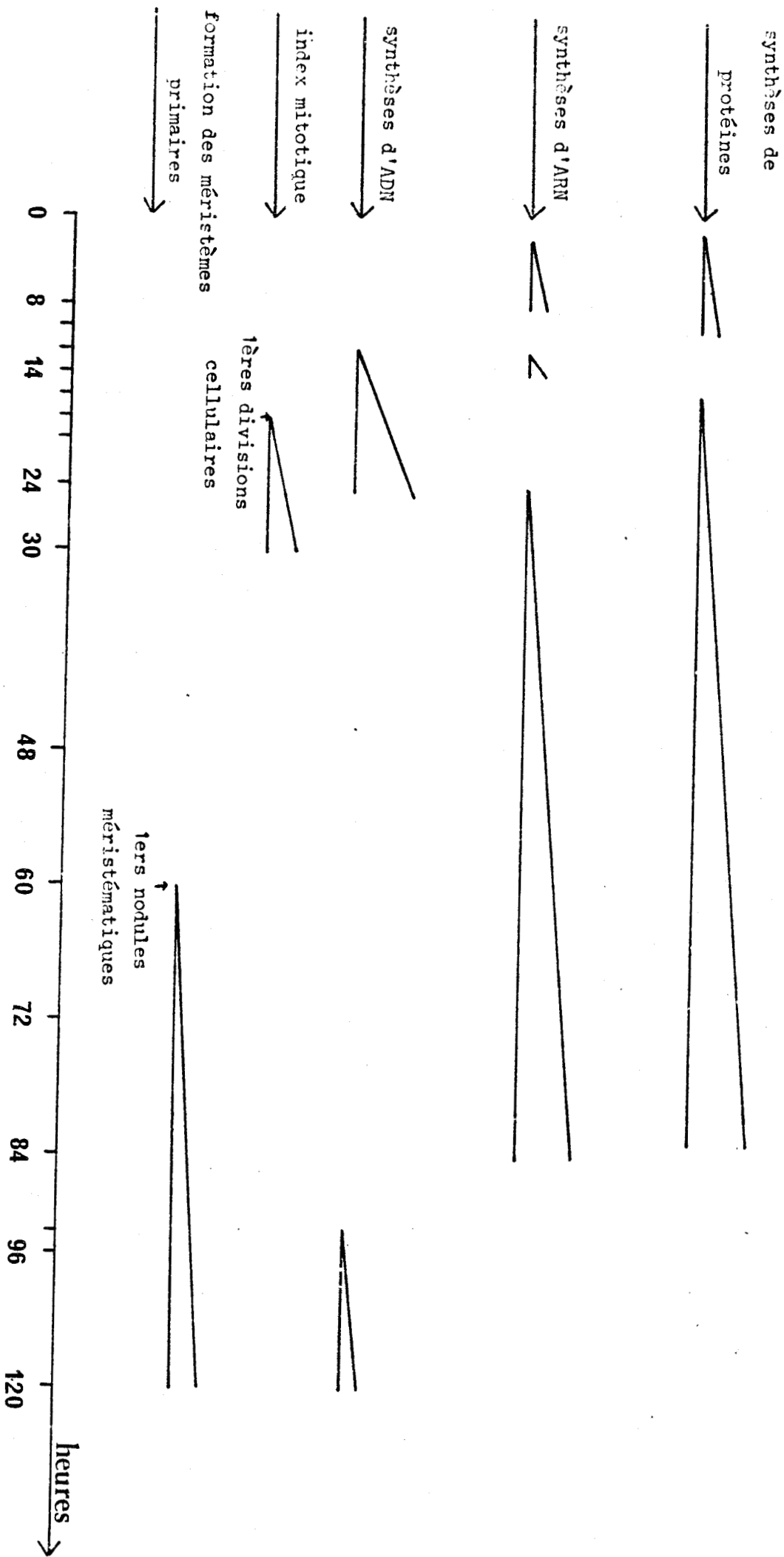


de culture (Fig. 16).

En ce qui concerne le taux de protéines totales à l'intérieur des tissus, on observe une augmentation régulière succédant à une légère diminution au début de la culture, qui correspond vraisemblablement à la dégradation des protéines préexistantes (Fig. 15 et 16).

On peut se demander si les protéines produites séquentiellement au cours du premier jour jouent un même rôle. Il serait alors intéressant, en tenant compte du fait qu'elles puissent réguler l'activité génique nécessaire à la réactivation, de tenter de déterminer quelles sont celles, nucléaires ou cytoplasmiques, qui interviennent en premier lieu. Nous avons donc essayé de localiser les protéines dont la synthèse est stimulée. Cependant, l'autoradiographie ne nous a pas permis de juger de l'activité de protéogénèse des cellules. En effet, lors du traitement des coupes, une fraction des protéines solubles est éliminée au cours des différents bains nécessaires à la fixation et à la deshydratation. De plus, nous n'avons pas pu déceler de différence nette entre les différents tissus et le marquage périnucléaire masque le marquage spécifique du noyau. Nous avons cependant noté que l'incorporation commence très tôt, vers la 2ème heure (Planche VI, Fig. 5) et augmente ensuite rapidement, à la fois dans le cytoplasme et les noyaux (Planche VI, Fig. 6) et les synthèses observées sont plus importantes au niveau des nodules méristématiques (Planche VII, Fig. 3) ; mais les précisions apportées par cette technique ne vont guère au-delà de ces observations.

Le métabolisme des protéines peut donc, lui aussi, être divisé en deux périodes : l'une précède la mitose et présente



**Fig. 17** : Schéma récapitulatif des événements mis en évidence au cours de la culture "in vitro" de fragments de racines d'Endive. On a seulement représenté la stimulation des événements: (< )

un pic d'activité qui suit de très près un pic de synthèse d'ARN, et l'autre précède et accompagne la formation des organes. De manière générale, nous avons constaté que le taux et l'activité spécifique des protéines subissent des variations assez voisines de celles de l'ARN.

##### 5) Conclusion

En comparant l'évolution histologique des explantats au cours de la culture aux modifications métaboliques qui se produisent au sein des tissus depuis leur excision jusqu'à l'apparition des bourgeons (Fig. 17), nous pouvons distinguer deux périodes :

La première, de la mise en culture jusqu'à la 30ème heure, où l'index mitotique est maximal, constitue une période d'activation pendant laquelle les cellules passent d'un état quiescent à un état propice à la multiplication. On assiste tout d'abord au démarrage précoce de la transcription et à une stimulation importante de la synthèse protéique nécessaire à la mise en place de la phase "S", puis aux mitoses ultérieures. Nous avons cependant remarqué que la protéogenèse commence très faiblement avant le début de la synthèse d'ARN (Fig. 11 et 12), ce qui peut impliquer la présence d'ARN messagers fonctionnant sur des ribosomes préexistants. L'histoautoradiographie nous a par ailleurs permis de préciser que la synthèse d'ARN s'effectue préférentiellement au niveau du nucléole ,

l'intensité de marquage étant beaucoup plus faible au niveau de la chromatine. De plus, comme pendant ce temps il n'y a pratiquement pas d'augmentation de la teneur en ARN, on peut supposer, ou bien que les phénomènes n'intéressent qu'un très petit nombre de molécules, ou bien qu'elles sont dégradées rapidement.

Après cette première vague de synthèses, on observe, au début de la duplication de l'ADN, une nouvelle stimulation de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H dans le noyau mais elle s'accompagne cette fois d'une incorporation importante du radionucléide dans le cytoplasme. Le fractionnement des ARN sur gradient de densité, après un temps de marquage court, permet de mettre en évidence des ARN polydispersés vraisemblablement de nature messagère. De plus, si ces ARN sont nettement plus importants au cours de la seconde phase de synthèse, ils semblent être également qualitativement différents comme en témoigne l'apparition de molécules de poids moléculaires plus variés. Il se produit donc, après la mise en culture, deux synthèses successives d'ARN qui correspondent vraisemblablement à la formation de macromolécules différentes, qu'il n'est d'ailleurs pas possible de rattacher à des sites tissulaires différents.

Ces résultats suggèrent qu'il existe une relation entre les synthèses d'ARN, de protéines et la division cellulaire ; ces modifications métaboliques donnent aux cellules la possibilité de se multiplier, ce qui implique des bouleversements

importants au niveau de la régulation des gènes.

La seconde période débute vers la 30ème heure et s'accompagne d'une diminution de l'incorporation du précurseur dans l'ADN ; elle se poursuit par la formation, vers la 60ème heure, des méristèmes primaires et à ce moment se produit une nouvelle stimulation de la synthèse d'ADN nécessaire à l'édification des organes. Cette étape est caractérisée par d'importantes synthèses d'ARN et de protéines qui continuent encore après l'apparition des premiers méristèmes organogènes. Ces modifications jouent certainement un rôle important dans la préparation et la réalisation des phénomènes d'organogenèse, mais aussi, dans la formation des faisceaux cribrovasculaires qui apparaissent en même temps que les nodules méristématiques. On peut d'autre part remarquer que l'augmentation des quantités d'ADN (Fig. 10) et d'ARN (Fig. 12) au cours de cette période correspond chronologiquement à celle que nous avons détectée par les méthodes histochimiques au niveau des méristèmes primaires.

L'histoautoradiographie nous amène toutefois à faire, au cours de cette 2ème période, une distinction entre les synthèses qui se produisent dans tous les tissus et que l'on détecte à la fois au niveau des noyaux, des nucléoles et du cytoplasme, et celles qui se produisent dans les méristèmes et que l'on observe uniquement au niveau du nucléole. Dans le



premier cas, les synthèses qui intéressent l'ensemble des tissus peuvent correspondre à l'élaboration des constituants nécessaires à la multiplication des cellules et à leur croissance mais aussi à la préparation de la formation des méristèmes primaires. Dans ce second cas, il pourrait s'agir, en plus, de synthèses nécessaires à la différenciation des méristèmes en bourgeons et qui serviraient ensuite à l'élaboration de protéines spécifiques.

L'ensemble des résultats montre que les deux périodes que nous avons arbitrairement séparées peuvent s'imbriquer l'une dans l'autre. S'il semble, en effet, évident que les informations nécessaires à l'accomplissement des mitoses sont transmises lors des premières heures de la culture, il est par contre difficile de préciser quand commencent les synthèses nécessaires aux manifestations organogènes. En effet, ces synthèses peuvent n'avoir lieu qu'après les premières divisions cellulaires mais il est également possible que les mécanismes de dérégulation des gènes correspondants soient mis en place dès la début de la culture.

### III DISCUSSION

Les tissus de la racine d'Endive, comme ceux des organes tubérisés de nombreuses plantes, sont dans un état dormant qui peut être rompu par simple excision. La culture "in vitro" de ces tissus permet la division des cellules et, dans certains cas, la production d'organes : racines et/ou bourgeons.

Notre étude a consisté à analyser les processus d'activation cellulaire et de néoformation de bourgeons. Son but était d'élucider le mécanisme d'expression des potentialités cellulaires ; il nous fallait cependant, pour la réaliser, déterminer des conditions expérimentales stables et homogènes. Pour cela, après avoir vérifié que les capacités organogènes des tissus d'Endive varient en fonction de certains facteurs et de l'équilibre hormonal (auxine-kinétine) tel qu'il a été défini pour les tissus de Tabac (SKOOG et MILLER, 1957), nous avons utilisé un milieu nutritif contenant les éléments minéraux de la solution de HELLER et de la kinétine  $10^{-6}$  M.l<sup>-1</sup> ; ce milieu de culture limitant les phénomènes d'organogenèse à la néoformation de bourgeons.

Sur ce milieu, les explantats verdissent rapidement dès le 3ème jour de culture ; ceci est dû en partie à la présence de la kinétine dont l'un des rôles (à la lumière) serait d'augmenter l'activité des chloroplastes (PEAUD-LENOEL et Coll., 1972).



Nous avons également pu constater qu'au cours de la culture, la teneur en eau des tissus et leur poids de matière fraîche augmentent régulièrement, alors que le poids de matière sèche reste constant ; dans le même temps, le taux des acides nucléiques et des protéines s'accroît ; il doit donc être compensé, soit par la dégradation des composés de faible poids moléculaire soit par celle des polysaccharides. Par ailleurs, tout apport de glucose dans le milieu de culture s'est révélé inhibiteur de la formation des bourgeons et même rapidement toxique. THORPE (1978b), dans le cas de tissus de Tabac, pense d'ailleurs que l'inhibition de l'organogenèse par les sucres serait de nature osmotique. Il est donc vraisemblable qu'il existe une réserve endogène en polysaccharides. Chez les tissus de Tabac, par exemple, la formation des organes nécessite l'hydrolyse des réserves d'amidon des cellules (ROSS et Coll., 1973 ; BROSSARD, 1975 ; THORPE, 1978a et b). Or, les réserves des tissus de racine d'Endive sont sous forme d'inuline, il faut donc supposer qu'une autre voie métabolique est empruntée pour fournir aux cellules les molécules énergétiques indispensables. Cette voie permettrait l'hydrolyse de l'inuline qui provoquerait l'augmentation de la pression osmotique intracellulaire et par conséquent, l'entrée d'eau massive dans les cellules.

L'étude histologique réalisée au cours de la culture de ces explantats nous a permis de distinguer deux périodes.

La première correspond à une phase d'activation cellulaire; elle débute dès l'excision des explantats et se poursuit jusqu'à la 30ème heure de culture , c'est-à-dire jusqu'au moment où l'index mitotique est maximal, les premières divisions étant observées dès la 18ème heure. La seconde est une phase de préparation à la différenciation organogène et serait limitée, à la 60ème heure, par l'apparition des premières cellules méristématiques.

La phase d'activation cellulaire se caractérise par une exaltation du métabolisme qui intéresse d'abord les cellules périphériques, puis se généralise à l'ensemble des tissus. Ceci corrobore les observations faites par YEOMAN et AITCHISON (1973), JALOUZOT (1978), SATO et Coll.(1978) et WIELGAT et KAHL (1979), pour qui l'excision serait en partie responsable de cette stimulation du métabolisme. Le stimulus dû à la blessure a déjà été étudié à plusieurs reprises ; NITSCH (1967) parle d'une dérégulation de certains gènes qui mettent en route, lors du prélèvement, une chaîne d'évènements physiologiques. D'autre part, le rôle des produits de la blessure, après l'autolyse des cellules, a été suggéré (MINOCHA, 1979b), ainsi que celui des changements de la pression osmotique au sein des tissus (KAHL, 1973 ; THORPE, 1978b).

Nous avons également noté que dès la reprise de l'activité cellulaire, la structure du noyau et du nucléole

se modifie; on observe en particulier la présence de vacuoles nucléolaires, qui ont d'ailleurs suscité de nombreuses questions. Certains auteurs ont en effet cherché à établir une relation entre la structure du nucléole, le processus de vacuolisation nucléolaire et la synthèse de précurseurs d'ARN ribosomiaux. A l'aide d'études ultrastructurales et autoradiographiques, ils ont établi que ces vacuoles joueraient un rôle dans le transport et le stockage des précurseurs d'ARN ribosomiaux (de BARSY et Coll., 1974 ; KAHL, 1974 ; BYRNE et SETTERFIELD, 1977 ; MORENO-DIAZ de la ESPINA, 1980). Il faut signaler que dans notre cas, l'apparition de telles vacuoles correspond à une intense activité de synthèse du nucléole. D'autre part, HERLAN et Coll. (1980) et WILLIAMS et JORDAN (1980) pensent que la taille du noyau serait liée à la sortie des ARN nucléaires vers le cytoplasme.

On admet que la régulation génique nécessite la mise en route de la transcription pendant le phénomène d'activation cellulaire, ceci implique une activité RNA-polymérasique importante et donc une disponibilité, au niveau de la chromatine, des sites de transcription. La dérégulation de la chromatine pourrait se faire alors par élimination d'histones (MICHAUX-FERRIERE, 1978) ce qui, selon INNOCENTI et BITONTI (1979) expliquerait les modifications subies par le noyau ainsi que la présence d'histones, parfois remarquée à l'extérieur du noyau, durant cette période (GIFFORD et NITSCH, 1969 ; VASIL, 1973).

L'examen des résultats obtenus au cours de la première phase, nous incite à penser que la stimulation précoce des synthèses serait en fait une réponse à l'excision et à la mise en culture et pourrait contribuer à la préparation des divisions.

Nous avons retrouvé la succession très classique des évènements biochimiques liés à l'activation cellulaire : c'est-à-dire une synthèse précoce d'ARN spécifiques, qui permet celle des protéines de structure et des protéines enzymatiques nécessaires à la duplication de l'ADN puis à la division. On peut d'ailleurs établir un parallèle entre la séquence des évènements qui surviennent après une excision et/ou une mise en culture (JALOUZOT, 1976 ; GIGOT et Coll., 1977 ; MAC LEOD et Coll., 1979 ; MINOCHA, 1979a et b ; MINOCHA et DIBONA, 1979) et celle qui suit la levée de dormance avant la germination (VAN DE WALLE et Coll., 1976 ; DELSENY, 1977 ; SERAFINI et FRACASSINI et Coll., 1980). Dans les deux cas, on observe la même série de faits liés à la réaction cellulaire, bien que les facteurs d'activation ainsi que l'état physiologique des tissus soient au départ très différents.

Un autre fait a également retenu notre attention ; au début de la culture, que ce soit par des méthodes histologiques ou biochimiques, nous n'avons jamais décelé de synthèses très précoces d'ADN, telles qu'elles ont été signalées par

certain auteurs bien avant la phase "S". En effet, soit dès l'excision (NITSCH, 1967 ; SIMARD, 1971), soit 6 heures après (JALOUZOT, 1976), un nombre important de noyaux peut incorporer de la thymidine-<sup>3</sup>H, ce qui a été interprété soit comme un phénomène d'endoréplication (GUILLE et Coll., 1968 ; BROEKAERT et VAN PARIJS, 1978 ; HASE et Coll., 1979), soit comme une amplification de certains gènes dont les produits passeraient ensuite dans le cytoplasme lors d'étapes spécifiques de la différenciation (PARENTI et Coll., 1973 ; SCHAFER et Coll., 1978). Certains auteurs enfin ont même invoqué une contamination bactérienne (DELSENY 1977). Toutefois, bien qu'ayant effectué des analyses autoradiographiques toutes les deux heures, nous n'avons pas pu observer de phénomène similaire.

La phase organogène commence ensuite vers la 30ème heure de culture et aboutit à la formation des bourgeons. Les synthèses d'ARN et de protéines subissent une forte stimulation qui atteint son amplitude optimale au moment de la formation des premiers méristèmes. Elles diminuent ensuite, puis se stabilisent à un niveau qui reste assez important puisque son intensité est environ 10 fois supérieure à celle observée au début de la culture, ce qui suggère une activité liée au développement des bourgeons. Nous avons également pu montrer l'implication directe des ARN et des protéines dans la formation des nodules méristématiques par l'incorporation d'uridine <sup>3</sup>-H et de leucine <sup>3</sup>-H ainsi que par l'observation de l'intense coloration

des méristèmes par les méthodes histochimiques permettant la détection des ARN. De telles synthèses accompagnant la formation des organes ont été signalées auparavant par GUILLOT (1966) chez la Tomate, par JALOUZOT (1976) chez le Pois chiche ainsi que par VASSEUR (1978) dans le cas de tissus de feuilles étiolées d'Endive ; on les retrouve également lors de l'embryogenèse des suspensions cellulaires de Carotte (FUJIMURA et Coll., 1980 ; SENGUPTA et RAGHAVAN, 1980). Par ailleurs, quelques chercheurs (HASEGAWA et Coll., 1979 ; YASUDA et Coll., 1980) ont pu mettre en évidence l'augmentation de protéines de faibles poids moléculaires associée aux stades précoces de la formation de bourgeons chez Pseudotsuga menziesii et qui n'existent pas dans les cultures ne produisant pas d'organes. WANNER et RAGHAVAN (1979) signalent d'autre part que la formation de bourgeons induits par la kinétine sur des protonémas de Microdus miquelianus n'entraîne qu'une augmentation très faible de la quantité de protéines. Ces protéines sont toutefois nécessaires à l'initiation des organes, puisque le chloramphénicol qui empêche leur synthèse, supprime l'organogenèse. Les études histochimiques réalisées par THORPE et MURASHIGE (1970) sur des tissus de Tabac, révèlent que la formation des bourgeons s'accompagne de la production de substances de nature enzymatique, notamment de peroxydases qui ont été également détectées par des méthodes biochimiques, aussi bien sur ces tissus (THORPE et Coll., 1978b ; THORPE et GASPAR, 1978) que sur ceux d'Endive (LEGRAND, 1974).

Après avoir essayé de distinguer les événements caractéristiques de l'activation cellulaire de ceux liés à la phase organogène, nous avons tenté de déterminer le rôle de la transcription. En fait, on pouvait se demander si la synthèse accrue d'ARN à des moments précis, traduisait la transcription de nouveaux gènes devenant fonctionnels ou si elle n'était le reflet que d'une augmentation générale du métabolisme nucléique avec une stimulation de toutes les classes moléculaires d'ARN. Nous avons pu montrer sur gradient de saccharose, la présence d'ARN polydispersés qui témoigne de l'existence d'ARN à propriétés vraisemblablement messagères, tout au début de la culture puis ultérieurement, la représentation de molécules de poids plus variés. Ces premiers résultats renforcent donc l'idée qu'un contrôle au niveau transcriptionnel peut être un des moyens d'orienter les cellules vers tel ou tel état. Dans leurs cultures, LACHARME et STEIMAN (1970), FRASER (1975), JALOUZOT (1976), PARENTI et Coll. (1977) et SHININGER (1980) ont également observé des synthèses successives d'ARN après la coupure : formation d'ARN à caractère messager puis, plus tardivement, d'ARN ribosomiaux.

La formation des bourgeons sur les explantats de racines d'Endive dépend d'un équilibre entre un grand nombre de facteurs physicochimiques dont font partie les hormones.

On peut alors se demander si ce mécanisme de la différenciation organogène débute dès la phase d'activation ou s'il est lié de manière plus spécifique à la deuxième étape que nous avons considérée comme une phase de préparation à l'organogenèse.

On peut également se demander quand se détermine le devenir des nodules méristématiques en bourgeons. Pour THORPE (1978b) les nodules méristématiques seraient des structures plastiques qui évolueraient en fonction de la balance en régulateurs de croissance. Dans ce cas, le déterminisme morphogène se produirait donc après la formation des cellules méristématiques. Nous ne savons pas s'il en est de même pour les tissus de racines d'Endive. Des expériences de transplantation d'explantats d'un milieu favorable à la formation des bourgeons sur un autre capable de favoriser la formation de racines pourrait peut-être apporter des éléments de réponse.

En outre, nous avons essayé d'évaluer l'importance de la phase d'activation sur les phénomènes d'organogenèse. Des explantats cultivés pendant 24 heures sur un milieu ne permettant que la formation de cals (BLONDEL, 1979), ont été transférés sur un milieu favorable au bourgeonnement. Nous n'avons observé aucune modification dans l'apparition des bourgeons. On peut alors se demander si l'organogenèse n'est pas indépendante des conditions de début de culture, c'est-à-dire de la phase d'activation. Il n'est cependant pas possible de tirer des conclusions définitives de cette expérience



isolée que pourrait compléter l'emploi d'inhibiteurs spécifiques à des moments précis de la culture.

L'analyse histologique des tissus au cours de leur culture a permis de situer l'apparition des premières divisions vers la 18ème heure, et celle des premières cellules méristématiques vers la 60ème heure. Dans les deux cas, ils apparaissent d'abord à la périphérie des explantats, ce qui a déjà été montré chez Phaseolus aureus (BLAZICH et HEUSER, 1979) et Petunia inflata (HANDRO et Coll., 1973). La blessure, au moment de la mise en culture, provoquerait un stimulus qui se propage des bords du fragment vers le centre, ainsi que le montre la propagation des synthèses d'ADN par l'autoradiographie. Nous pensons également qu'elle entraînerait, dans l'activité des cellules, un décalage qui se répercuterait tout au long de la culture ; à cela s'ajoute l'intense activité des cellules au niveau de la zone cicatricielle, ce qui les rendrait, plus tard, plus réceptives à une induction morphogène.

Au terme de ce travail, il nous paraît maintenant possible d'utiliser les tissus de racines d'Endive comme un modèle d'analyse des processus de dédifférenciation et de différenciation cellulaire.

Les faits essentiels que nous retiendrons concernent, d'une part, l'établissement de la séquence des événements histologiques caractéristiques de l'activation cellulaire et de la dif-

férenciation organogène et d'autre part, les modifications du métabolisme nucléique et protéique qui leur sont liées. Notre travail a cependant mis l'accent sur un certain nombre de points qui nécessiteront des développements ultérieurs. Ainsi, il pourrait être intéressant de suivre l'évolution des sucres intracellulaires et, en particulier, de l'inuline dont l'hydrolyse doit correspondre à la mise en place, activation et/ou synthèse, d'un système enzymatique qu'il faudrait situer par rapport aux étapes que nous avons définies. En ce qui concerne le processus de mise en route de l'activation après un état quiescent, il serait souhaitable de préciser le rôle exact de la blessure et celui de la mise en culture puis d'essayer de mieux cerner par des expériences de transplantation ou d'applications ponctuelles d'inhibiteurs métaboliques, le démarrage du processus de différenciation organogène.

De même, il serait nécessaire de reprendre, de manière beaucoup plus précise, la détermination de la nature des ARN synthétisés au cours des différentes étapes du phénomène d'organogenèse ; ce qui demanderait d'ailleurs de choisir une méthode d'extraction qui permette de mettre en évidence les ARN présents dans le noyau. Enfin, il est possible d'envisager la détection de protéines qui soient spécifiques du processus de différenciation organogène.

# BIBLIOGRAPHIE

- AGHION-PRAT D., 1965.- Essai d'une interprétation physiologique des étapes de l'organogenèse florale "de novo" chez Nicotiana tabacum L., Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 11, 243-246.
- ASPART L., COOKE R., MICHAUX-FERRIERE N., DELSENY M., 1980.- Ribosomal RNA synthesis in imbibing radish (Raphanus sativus) embryo axes. Planta, 148, 17-23.
- BESSEMER J., HARDEN U., REINERT J., 1969.- Der Einfluss von Kinetin und Gibberellinsäure auf die Organ-bildung "in vitro" kultivierten Blättern von Cichorium intybus L..Z. Pflanzen-physiol., 60, 123-134.
- BIGOT C., 1971.- Analyse de quelques facteurs du bourgeonnement sur des fragments foliaires, en particulier chez un clone de Begonia rex Putz. Thèse Clermont-Ferrand, 274 p.
- BIGOT C., 1976.- Quelques aspects de la néoformation des bourgeons en relation avec la nature des tissus mis en culture. 101ème Congrès Nat. Soc. Savantes, Lille, 1, 371-382.
- BIGOT C., BRULFERT J., 1968.- Dynamique de l'apparition naturelle des néoformations de racines et de bourgeons à partir de feuilles isolées de Peperomia griseo-argentea Yunker. C. R. Acad. Sci. Paris, 267, 1586-1588.
- BLAZICH F.A., HEUSER C.W., 1979.- A histological study of adventitious root initiation in mung bean cuttings. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 104, 63-67.
- BLONDEL V., 1979.- Analyse morphogénétique du développement "in vitro" des tissus de la racine d'Endive (Cichorium intybus L.) D.E.A. Lille, 66 p.
- BOUNIOIS A., 1977.- Différenciation florale "in vitro" chez Cichorium intybus L. Modifications du métabolisme aminé et protéique. Actes du 102ème Cong. Nat. Soc. Savantes Limoges, I, 259-272.
- BOURIQUET R., 1966.- Action de la lumière sur le développement des tissus de feuilles d'Endive cultivés "in vitro". Photochem. Photobiol., 5, 381-395.
- BRACHET J., 1953.- The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. Quart. J. Microscop. Sci., 94, 1-10.
- BRAWERMAN G., MENDECKI J., LEE S.Y., 1974.- A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. Biochemistry, 11, 637-641.

- BRITTEN R.J., ROBERTS R.B., 1960.- High-resolution density gradient sedimentation analysis. *Science*, 131, 32-33.
- BROECKAERT D., VAN PARIJS R., 1978.- Reassociation characteristics of DNA synthesized in wounded pea seedlings. *Z. Pflanzenphysiol.*, 89, 169-184.
- BROSSARD D., 1975.- Recherches sur les néoformations naturelles ou provoquées des bourgeons végétatifs. Thèse Paris, Masson Edit., 227 p.
- BURTON K., 1956.- A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62, 315-323.
- BUTENKO R.G., 1968.- Plant tissue culture and plant morphogenesis. Chailakhyan Edit. (Moscou), 291 p.
- BUVAT R., 1945.- Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. Thèse Paris, 228 p.
- BUVAT R., 1948.- Monographie cytologique des tissus de Chicorée. *Rev. Cytol. Cytophysiol. Vég.*, X, Fasc. 1-4.
- BYRNE H., SETTERFIELD G., 1977.- Activation of ribosomal and messenger RNA synthesis in excised Jerusalem artichoke tuber slices. *Planta*, 136, 203-210.
- CAMUS G. 1949.- Recherche sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogénèse. *Rev. Cytol. Biol. Vég.*, 11, 1-195.
- CHAMPAGNAT P., 1961.- Differentiation. Formation des racines et des bourgeons. *Encycl. Plant Physiol.*, 14, 839-908.
- CHEAH K.T., CHENG T.Y., 1978.- Histological analysis of adventitious bud formation in cultured douglas fir cotyledon. *Amer. J. Bot.*, 65, 845-849.
- CHLYAH H., 1974.- Inter-tissue correlations in organ fragments : organogenetic capacity of tissues excised from stem segments of *Torenia fournieri* (Lind) cultured separately "in vitro". *Plant Physiol.*, 54, 341-348.
- CHLYAH H., 1978.- Intercellular correlations : relation between DNA synthesis and cell division in early stages of "in vitro" bud neoformation. *Plant Physiol.*, 62, 482-485.

- CHLYAH A., TRAN-THANH VAN M., 1975.- Differential reactivity in epidermal cells of Begonia rex excised and grown "in vitro". Physiol. Plant., 35, 16-20.
- COHEN D., CROTTY W.J., 1979.- <sup>3</sup>H-uridine incorporation in the premitotic stage of rhizoid cell differentiation in Pteris vittata L. Amer. J. Bot., 66, 179-182.
- DE BARSY Th., DELTOUR R., BRONCHART R., 1974.- Study of nucleolar vacuolation and RNA synthesis in embryonic root cells of Zea mays. J. Cell. Sci. 16, 95-112.
- DELSENY M., 1977.- Recherches sur le métabolisme de l'ADN et des ARN messagers au cours de la germination des graines. Thèse Montpellier, 212 p.
- DELTOUR R., GAUTIER A., FAKAN J., 1979.- Ultrastructural cytochemistry of the nucleus in Zea mays embryos during germination. J. Cell Sci., 40, 43-62.
- DIEN N.T., TRAN THANH VAN M., 1974.- Differentiation "in vitro" et "de novo" d'organes floraux directement à partir des couches minces de cellules de type épidermique de Nicotiana tabacum. Etude au niveau cellulaire. Can. J. Bot., 52, 2319-2324.
- FRASER R.S.S., 1975.- Synchronous cell division in cultured explants of Jerusalem artichoke tubers : the effects of 5-Fluorouracil on messenger RNA synthesis and the induction of cell division. J. Exptl. Bot., 26, 555-568.
- FUJIMURA T., KOMAMINE A., MATSUMOTO H., 1980.- Aspect of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Physiol. Plant., 49, 255-260.
- GASPAR Th., SMITH D., THORPE T.A., 1977.- Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogénèse. C. R. Acad. Sci. Paris, 285, 327-330.
- GAUTHERET R.J., 1941.- Sur le repiquage de cultures de tissus d'Endive, Topinambour et Salsifis. C. R. Acad. Sci., 212, 317-318.
- GAUTHERET R.J., 1959.- La culture des tissus végétaux - techniques et réalisations. Masson Edit., Paris, 863 p.
- GAUTHERET R.J., 1966.- Factors affecting differentiation of plant tissues grown "in vitro". Dans : "Cell différenciation and morphogenesis", North Holland publishing Cie Edit. (Amsterdam) 55-95.

- GIFFORD E.M. Jr., NITSCH J.P., 1969.- Responses of tobacco pith nuclei to growth substances. *Planta*, 85, 1-10.
- GIGOT C., PHILIPPS G., HIRTH L., 1977.- Evènements biochimiques accompagnant les étapes initiales de la dédifférenciation des protoplastes de Tabacs en culture. Dans "La culture des tissus et des cellules des végétaux". Masson Edit. (Paris).
- GUILLE E., QUETIER F., HUGUET T., 1968.- Etude des acides desoxy-ribonucléiques des végétaux. Formation d'un ADN nucléaire riche en G + C lors de la blessure de certaines plantes supérieures. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 266, 836-838.
- GUILLOT A., 1966.- Relation entre rhizogenèse et variations de la teneur des tissus en acides nucléiques dans les boutures de jeunes plantes étiolées de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 263, 358-361.
- GWOZDZ E., SZWEYKOWSKA A., 1967.- The effect of kinetin and IAA on the organogenesis in root explants of *Cichorium intybus*. *Bull. Soc. Amis Sci. Poznan*, D VIII, 3-9.
- GWOZDZ E., SZWEYKOWSKA A., 1969a.- The effect of IAA on growth, organogenesis and protein synthesis in explants of *Cichorium* roots. *Bull. Soc. Amis Sci. Poznan*, D VIII, 3-9.
- GWOZDZ E., SZWEYKOWSKA A., 1969b.- The effect of some nutritional factors on the organogenesis in root explants of *Cichorium intybus*. *Bull. Soc. Amis Sci. Poznan*, 11-18.
- HANDRO W., RAO P.S., HARADA H., 1973.- A histological study of the development of buds, roots, and embryos in organ cultures of *Petunia inflata* R. Fries. *Ann. Bot.*, 37, 817-821.
- HA NGOC K.A., TRAN THANH VAN M., 1979.- Capacité caulogène de cellules de cal issues de couches cellulaires minces de type épidermique de ramifications florales de *Nicotiana tabacum* cv. Wisc. 38. *Physiol. Plant.*, 46, 203-207.
- HASE Y., YAKURA K., TANIFUJI S., 1979.- Differential replication of satellite and main band DNA during early stages of callus formation in carrot root tissue. *Plant and Cell Physiol.*, 20, 1461-1469.
- HASEGAWA D.M., YASUDA T., CHENG T.Y., 1979.- Effect of auxin and cytokinin on newly synthesized proteins of cultured douglas fir cotyledons. *Physiol. Plant.*, 46, 211-217.

- HELLER R., 1953.- Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro". Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég., 14, 1-223.
- HERLAN G., GIESE G., WUNDERLICH F., 1980.- "In vitro" ribosomal ribonucleoprotein transport upon nuclear expansion. Biochemistry, 19, 3960-3966.
- HUNAUULT G., 1973.- Influence de diverses concentrations d'acide 2,4 dichlorophenoxyacétique et de benzyladenine sur la croissance des tissus d'Asperge (Asparagus officinalis) cultivés "in vitro". C. R. Acad. Sci.Paris, 276, 3135-3138.
- HUNAUULT G., 1974.- Influence de l'éclaircissement et de la teneur du milieu de culture en cytokinines sur la formation, la croissance et l'organogenèse du cal d'Asperge (Asparagus officinalis L.). C. R. Acad. Sci.Paris, 278, 1849-1852.
- HUNAUULT G., 1975.- Influence de différents milieux de culture sur la croissance de tissus d'Asperge (Asparagus officinalis L.) cultivés "in vitro". C. R. Acad. Sci.Paris, 280, 2661-2664.
- INNOCENTI A.M., BITONTI M.B., 1979.- Histones/DNA ratio in young and old root meristems of Triticum durum caryopses. Caryologia, 32, 441-448.
- JALOUZOT R., 1971.- Etude du métabolisme des acides nucléiques et des protéines au cours de l'initiation des racines adventives. Planta, 97, 16-27.
- JALOUZOT R., 1976.- Etude de l'activation cellulaire lors de l'initiation de racines adventives par traumatisme. Thèse Reims, 242 p.
- JOHN A., 1978.- An anatomical study of root initiation in stem cuttings of hybrid larch. New Phytol., 81, 111-116.
- KAHL G., 1973.- Genetic and metabolic regulation in differentiating plant storage tissue cells. Bot. Rev., 39, 274-299.
- KAHL G., 1974.- Metabolism in plant storage tissue slices. Bot. Rev., 40, 260-313.
- KING B., CHAPMAN J.M., 1973.- Non coordinate synthesis and methylation of t-RNA following excision of plant tissue. Planta 114 ; 227-238 .
- KUPILA S., THERMAN E., 1971.- First DNA synthesis around sterile and crown gall inoculated wounds in Vicia faba. Physiol. Plant., 24, 23-26.

- LACHARME J., STEIMAN R., 1970.- Métabolisme des acides nucléiques dans les tissus de Daucus carota L. au cours des premières heures de leur mise en culture "in vitro". C. R. Acad. Sci. Paris, 271, 1178-1181.
- LANGERON M., 1949.- Précis de microscopie. Masson Edit. (Paris), 1430 p.
- LEAVER C.J., KEY J.L., 1967.- Polyribosome formation and RNA synthesis during aging of carrot-root tissue. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1338-1344.
- LEFEBVRE R., 1977.- Influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement des tissus de racine d'Endive (Cichorium intybus L.) Rev. Cyt. Biol. Vég., 40, 185-291.
- LEGRAND B., 1974.- Influence des conditions d'éclairement sur la néoformation des bourgeons par les tissus de feuilles d'Endive cultivés in vitro et sur l'activité peroxydasique de ces tissus. C. R. Acad. Sci., 278, 2425-2428.
- LEGRAND B., VASSEUR J., 1972.- Evolution de l'acide ribonucléique, des protéines et de l'activité peroxydasique au cours de la culture "in vitro" de fragments de feuilles d'Endive (Cichorium intybus L. var. Witloof). C. R. Acad. Sci., 275, 357-360.
- LISON L., 1960.- Histochimie et cytochimie animales. Gauthiers-Villars Edit. (Paris), 842 p.
- LOWRY O.H. ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951.- Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MAC LEOD A.J., MILLS E.D., YEOMAN M.M., 1979.- Seasonal variations in the pattern of RNA metabolism of tuber tissue in response to excision and culture. Protoplasma, 98, 343-354.
- MAEDA E., THORPE T.A., 1979.- Shoot histogenesis in tobacco-callus cultures. In Vitro, 15, 415-424.
- MARGARA J., RANCILLAC, M., BOUNIOLS A., 1966.- Recherches expérimentales sur la néoformation des bourgeons inflrescentiels ou végétatifs "in vitro" à partir d'explantats d'Endive (Cichorium intybus L.). Ann. Physiol. Vég., 8, 285-305.



- MATSUSHITA K., URITANI I., 1974.- Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases. *Plant Physiol.*, 54, 60-66.
- MICHAUX-FERRIERE N., 1978.- Les protéines nucléaires basiques dans le méristème caulinaire de l'Isoeta setacea au cours de son cycle annuel. *Phytomorphology*, 28, 58-73.
- MIKKELSEN E.P., SINK K.C., 1978.- Histology of adventitious shoot and root formation on leaf-petiole cuttings of Begonia x hiemalis fotsch "Aphrodite peach". *Scientia Horticulturæ*, 8, 179-192.
- MILLER C.O., SKOOG F., OKUMURA F.S., VON SALTZA M.H., STRONG F.M. 1956.- Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 1375-1380.
- MINOCHA S.C., 1979a.- Abscissic acid promotion of cell division and DNA synthesis in Jerusalem artichoke tuber tissue cultured "in vitro". *Z. Pflanzenphysiol.*, 92, 327-339.
- MINOCHA S.C., 1979b.- The role of auxin and abscissic acid in the induction of cell division in Jerusalem artichoke tuber tissue cultured "in vitro". *Z. Pflanzenphysiol.*, 92, 431-441.
- MINOCHA S.C., DIBONA S., 1979.- Effect of auxin and abscissic acid on RNA and protein synthesis prior to the first cell division in Jerusalem artichoke tuber tissue cultured "in vitro". *Z. Pflanzenphysiol.*, 92, 367-374.
- MITSUHASHI-KATO M., SHIBAOKA H., SHIMOKORIYANA M., 1978.- Anatomical and physiological aspects of developmental processes of adventitious root formation in Azuki cuttings. *Plant and Cell Physiol.*, 19, 393-400.
- MORENO-DIAZ de la ESPINA S., MEDINA F.J., RISUENO M.C., 1980.- Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 22, 724-729.
- NAKANISHI S., 1979.- Peroxydases et bourgeonnement de fragments de racines d'Endive (Cichorium intybus L.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 289, 695-698.

- NAKANO H., MAEDA E., 1979.- Shoot differentiation in callus of Oryza sativa L. Z. Pflanzenphysiol., 93, 449-458.
- NEWBURY H.J., POSSINGHAM J.V., 1977.- Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. Plant Physiol., 60, 543-547.
- NITSCH J.P., 1967.- Physiologie de la division cellulaire chez les cultures de tissus de Nicotiana. Dans : "Les cultures de tissus de plantes" Colloques Nat. C.N.R.S., n° 920, Strasbourg, 131-141.
- NITSCH J.P., BUI DANG HA D., 1967.- Effet de l'ordre d'application de l'acide indolyl-3-acétique et de la kinétine sur la division cellulaire. C. R. Acad. Sci., 264, 288-291.
- NITSCH J.P., LANCE-NOUGAREDE A., 1967.- L'action conjuguée des auxines et des cytokinines sur les cellules de moelle de Tabac : étude physiologique et microscopie électronique. Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 13, 81-118.
- OBA K., FURUSE K., URITANI I., 1978.- Synthesis of RNA in tissue discs of sweet potato roots after cutting or mercuric chloride treatment. Plant and Cell Physiol., 19, 741-747.
- OLSZEWSKA M.J., 1959.- Etude autoradiographique de l'influence de la kinétine sur l'incorporation d'adénine dans les cellules du méristème racinaire d'Allium cepa. Exptl. Cell Research, 16, 193-201.
- OPPENORTH J.M., 1978.- The influence of colchicine on initiation and early development of adventitious roots. Physiol. Plant., 42, 375-378.
- OPPENORTH J.M., 1979.- Influence of cycloheximidine and actinomycine D on initiation and early development of adventitious roots. Physiol. Plant., 47, 134-138.
- PARENTI R., BUIATTI M., DURANTE M., GERI C., GIORGI L., MONNI A.L., 1977.- Dati preliminari sulla sintesi degli RNA durante la prime fasidi sdifferenziazione del midollo di Nicotiana glauca. Atti Ass. Genet. Ital., 22, 217-218.

- PARENTI R., GUILLE E., GRISVARD J., DURANTE M., GIORGI L., BUIATTI M., 1973.- Transient DNA satellite in dedifferentiating pith tissue. *Nature New Biol.*, 246, 237-239.
- PATAU K., DAS N.K., SKOOG F., 1957.- Induction of DNA synthesis by kinetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith tissues. *Physiol. Plant.*, 10, 949-966.
- PEAUD-LENOEL C., JOUANNEAU J.P., TANDEAU de MARSAC N., 1972.- Bases moléculaires de l'activité des cytokinines. *Bull. Soc. Bot. Fr., Mémoires*, 161-172.
- PREVOT, 1939.- Les facteurs de la morphogenèse des bourgeons de néoformation chez Begonia rex. *Assoc. Fr. Avancement Sci.*, 63, 611-619.
- ROSE R.J., SETTERFIELD G., 1971.- Cytological studies on the inhibition by 5-fluorouracil of ribosome synthesis and growth in Jerusalem artichoke tuber slices. *Planta*, 101, 210-230.
- ROSS M.K., THORPE T.A., COSTERTON J.W., 1973.- Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *Amer. J. Bot.*, 60, 788-795.
- SATO T., ISHIZUKA M., WATANABE A., IMASEKI H., 1980.- The synthesis and properties of polysomal RNA in potato tuber slices during the early stage of aging. *Plant and Cell Physiol.*, 21, 137-147.
- SATO T., WATANABE A., IMASEKI H., 1978.- RNA synthesis in the early stage of aerobic incubation of potato tuber discs. *Plant and Cell Physiol.*, 19, 609-616.
- SCHAFFER A., BLASCHKE J.R., NEUMANN K.H., 1978.- On DNA metabolism of carrot tissue cultures. *Planta*, 139, 97-101.
- SCHERRER K., DARNELL J.E., 1962.- Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from Hela cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 486-490.
- SCHNEIDER W.C., 1945.- Phosphorus compounds in animal tissues. I. extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161, 83-89.
- SENGUPTA C., RAGHAVAN V., 1980.- Somatic embryogenesis in carrot cell suspension. *J. Exptl. Bot.*, 31, 247-268.

- SERAFINI-FRACASSINI D., BAGNI N., CIONINI P.G., BENNICI A., 1980.- Polyamines and nucleic acids during the first cell cycle of Helianthus tuberosus tissue after the dormancy break. Planta, 148, 332-337.
- SHININGER T.L., 1980.- Biochemical and cytological analyses of RNA synthesis in kinetin-treated pea root parenchyma. Plant Physiol., 65, 838-843.
- SIMARD A., 1971.- Initiation of DNA synthesis by kinetin and experimental factors in tobacco pith tissues "in vitro". Can. J. Bot., 49, 1541-1549.
- SKOOG F., 1970.- Aspect of growth factor interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. Dans "Les cultures de tissus de plantes". Colloques internationaux du CNRS, n° 193, Strasbourg, 115-135
- SKOOG F., MILLER C.O., 1957.- Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "in vitro". Symp. Soc. Exptl. Biol., 11, 118-131.
- SKOOG F. et TSUI C., 1948.- Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured "in vitro". Am. J. Bot., 35, 782-787.
- SMITH D.R., THORPE T.A., 1975.- Root initiation in cuttings of Pinus radiata seedlings. J. Exptl. Bot., 26, 193-202.
- STERLING C., 1951.- Origin of buds in tobacco stem segment cultured "in vitro". Amer. J. Bot., 38, 761-767.
- \* TANAKA Y., URITANI I., 1977.- Polarity of production of polyphenols and development of various enzyme activities in cut-injured sweet potato root tissue. Plant Physiol., 60, 563-566.
- TANAKA Y., URITANI I., 1979.- Effect of auxin and other hormones on the metabolic response to wounding in sweet potato roots. Plant and Cell Physiol., 20, 1555-1564.
- THORPE T.A., 1978a.- Physiological and biochemical aspects of organogenesis "in vitro". Dans "Frontiers of plant tissue culture", 49-58.
- THORPE T.A., 1978b.- Regulation of organogenesis "in vitro". Dans "Propagation of higher plants through tissue culture" 87-100 (Univ. Tennessee).

- THORPE T.A., GASPAR T., 1978.- Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus. *In Vitro*, 14, 522-526.
- THORPE T.A., MEIER D.D., 1972.- Starch metabolism, respiration, and shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.*, 27, 365-369.
- THORPE T.A., MURASHIGE T., 1970.- Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can. J. Bot.*, 48, 277-285.
- THORPE T.A., TRAN THANH VAN M., GASPAR T., 1978.- Isoperoxydases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation "in vitro". *Physiol. Plant.*, 44, 388-394.
- TRAN THANH VAN M., 1977.- Regulation of morphogenesis. Dans : "Plant tissue culture and its biotechnological application". Barz, Reinhard and Zenk, Edit.,
- TRAN THANH VAN M., DIEN N.T., 1975.- Etude au niveau cellulaire de la différenciation "in vitro" et "de novo" de bourgeons végétatifs, de racines ou de cal à partir de couches minces de cellules de type épidermique de Nicotiana tabacum Wisc. 38. *Can. J. Bot.*, 53, 553-559.
- TRAN THANH VAN M., DRIRA A., 1971.- Definition of a simple experimental system of directed organogenesis "de nuevo" : organ neof ormation from epidermal tissue of Nautilocalyx lynchei. Colloques internationaux CNRS, n° 193, Strasbourg, 169-176.
- VAN DE WALLE C., BERNIER G., DELTOUR R., BRONCHART R., 1976.- Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of maize embryo. *Plant Physiol.*, 157, 632-639.
- VARDJAN M., NITSCH J.P., 1961.- La régénération chez Cichorium endivia L. : étude des auxines et des "kinines" endogènes. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 108, 363-374.
- VASIL I.K., 1973.- Morphogenetic, histochemical and ultrastructural effects of plant growth substances "in vitro". *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 164, 58-71.
- VASIL I.K. and HILDEBRANDT A.C., 1966.- Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. Cichorium endivia. *Amer. J. Bot.*, 53, 860-869.
- VASSEUR J., 1978.- Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'Endive (Cichorium intybus L.) en fonction de critères physiologiques et biochimiques. Thèse Lille, 240 p.

- WANNER L.A., RAGHAVAN V., 1979.- The role of protein synthesis in bud initiation on the protonema of a moss. *Z. Pflanzenphysiol.*, 93, 11-21.
- WARMKE, H.E., WARMKE G.L., 1950.- The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from root cuttings of Taraxacum and Cichorium. *Amer. J. Bot.*, 37, 272-280.
- WATANABE A., IMASEKI H., 1973.- Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in potato tuber tissue by cutting. *Plant Physiol.*, 51, 772-776.
- WATANABE A., IMASEKI H., 1976.- Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in potato tuber slices. Role of protein synthesis. *Plant Physiol.*, 57, 568-571.
- WATANABE A., IMASEKI H., 1977a.- Enhancement of DNA polymerase activity in potato tuber slices. *Plant and Cell Physiol.*, 18, 849-858.
- WATANABE A., IMASEKI H., 1977b.- Studies on enzymes involved in DNA synthesis and thymine nucleotide formation in potato tuber slices. *Plant and Cell Physiol.*, 18, 859-868.
- WHITE P.R., 1939.- Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, 66, 507-513.
- WIELGAT B., KAHL G., 1979.- Enhancement of polyribosome formation and RNA synthesis of gibberellic acid in wounded potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, 64, 863-866.
- WILLIAMS L.M., JORDAN E.G., 1980.- Nuclear and nucleolar size changes and nuclear pore frequency in cultured explants of Jerusalem artichoke tubers (Helianthus tuberosus L.). *J. Exptl. Bot.*, 31, 1613-1619.
- YASUDA T., HASEGAWA P.M., CHENG T.Y., 1980.- Analysis of newly synthesized proteins during differentiation of cultured douglas fir cotyledons. *Physiol. Plant.*, 48, 83-87.
- YEOMAN M.M., AITCHISON P.A., 1973.- Growth patterns in tissue (callus) cultures. Dans: "Plant tissue culture and cell culture", 11, Street Edit., (London), 242-268.
- ZOILY-FOCDIL Y., 1979.- Recherches sur les conditions d'utilisation et la physiologie des protoplastes de coléoptiles d'Avena sativa B. et de crown gall de Parthenocissus tricuspidata L. Contribution à la mise au point d'un modèle expérimental d'étude des relations nucleocytoplasmiques. Thèse Paris, 172 p.

PLANCHES

HORS

TEXTE

P L A N C H E I

LA CULTURE "IN VITRO" DE FRAGMENTS DE RACINES D'ENDIVE.

---

Explantats (6 mm Øx2 mm) avant leur mise en culture (a), et après 30 jours de culture (b).

*Le milieu nutritif comporte les éléments minéraux de la solution de HELLER, et de la kinétine ( $10^{-6}$  g.l<sup>-1</sup>). Dans ces conditions, les bourgeons apparaissent sur les explantats dès le 8ème jour de culture.*





LILLE

OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES ET HISTOAUTORADIOGRAPHIQUES (Thymidine-<sup>3</sup>H) RÉALISÉES AU COURS DES PREMIÈRES 24 HEURES DE CULTURE.

Observations cytologiques

Fig. 1 : Observation des cellules avant la mise en culture : les noyaux sont de petite taille et présentent souvent plusieurs nucléoles.

Fig. 3 : Observation des cellules après 12 heures de culture : on peut noter que les volumes nucléaires et nucléolaires sont déjà importants.

*coloration par la safranine et le fast green.*

Etude de l'incorporation de la thymidine-<sup>3</sup>H

Fig. 2 : Coupe réalisée après 6 heures de culture : l'incorporation au niveau des noyaux est encore très faible.

Fig. 4 : Coupe réalisée après 12 heures de culture : l'incorporation de la thymidine-<sup>3</sup>H est visible à la périphérie de l'explantat.

Fig. 5 : Coupe réalisée après 18 heures de culture : le marquage augmente de façon importante à la périphérie de l'explantat.

Fig. 6 : Coupe réalisée après 18 heures de culture : le marquage est intense au niveau de la zone génératrice.

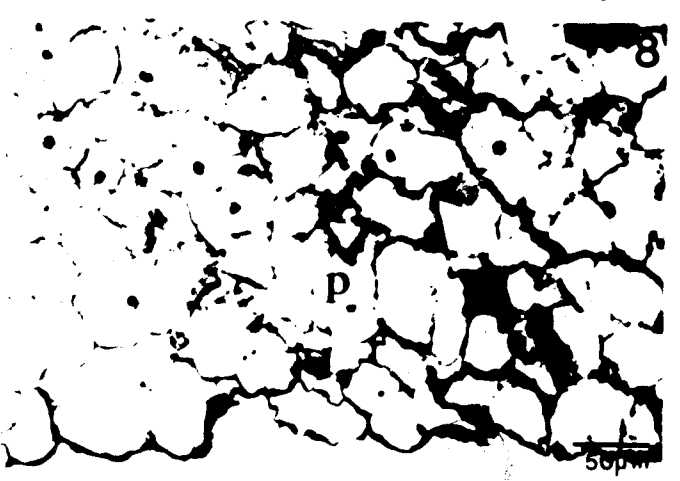
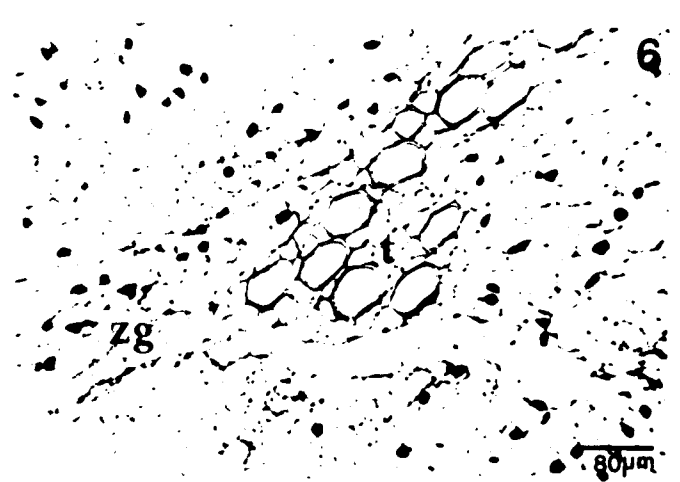
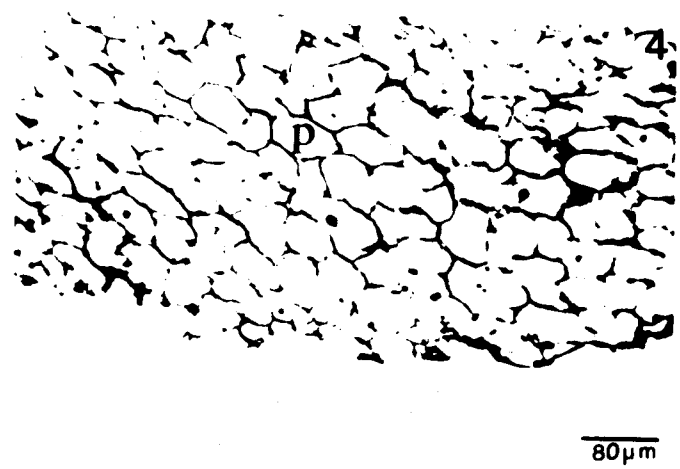
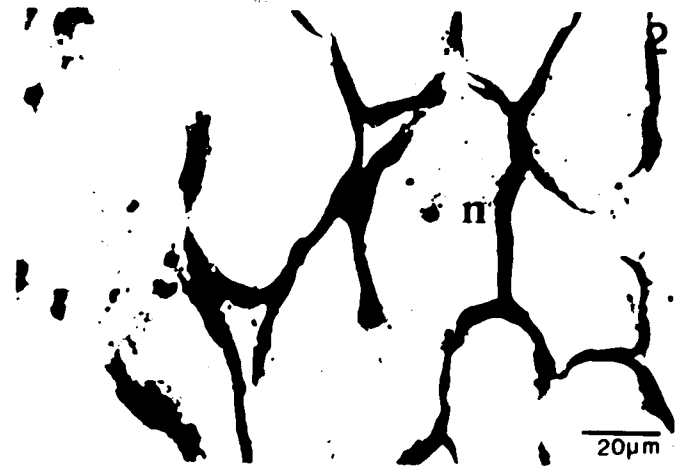
Fig. 7 : Coupe réalisée après 24 heures de culture : on peut observer que le nombre de noyaux ayant incorporé la thymidine-<sup>3</sup>H est maximum au niveau de la zone génératrice.

Fig. 8 : Coupe réalisée après 24 heures de culture : le nombre de noyaux ayant incorporé la thymidine-<sup>3</sup>H est maximum à la périphérie de l'explantat.

*coloration par le bleu d'azur*

Avant leur prélèvement, les explantats ont été mis à incuber pendant 6 heures en présence de thymidine-<sup>3</sup>H (A.S. : 25 mCi.ml<sup>-1</sup>) à 20 µCi.ml<sup>-1</sup>.

n : noyau ; nu : nucléole ; p : parenchyme ; zg : zone génératrice.



P L A N C H E    I I I

OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES DE FIGURES DE MITOSE.

---

Fig. 1 : Observation de la 1ère figure de mitose après 18 heures de culture, à la périphérie de l'explantat.

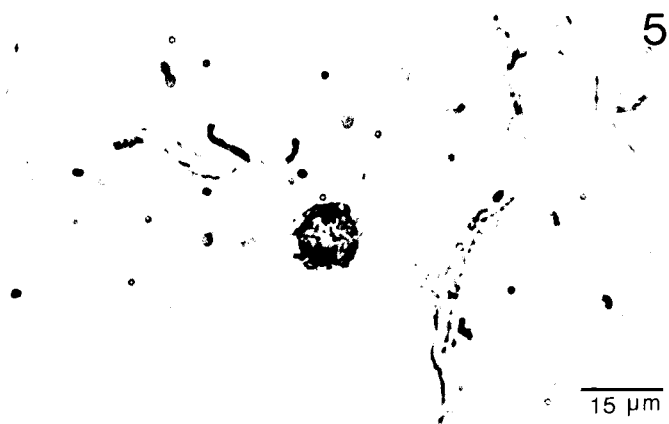
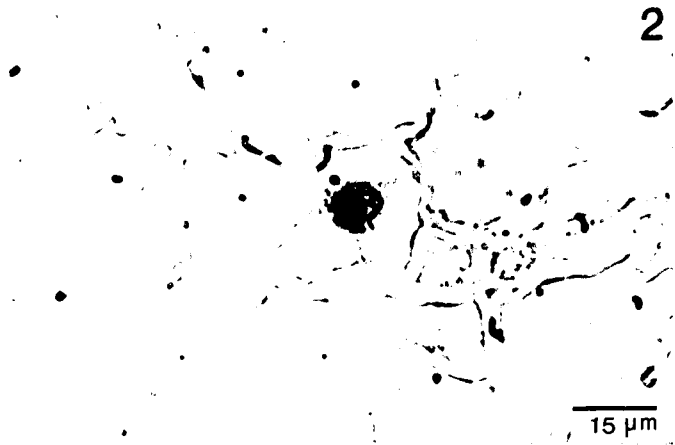
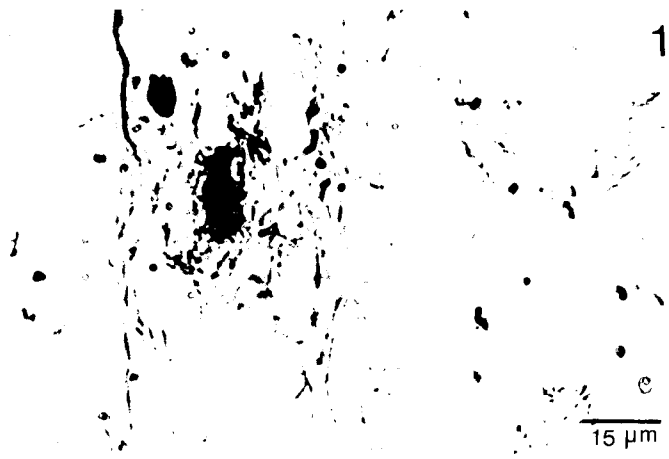
Fig. 2 à 6 : Observation de différentes phases de la mitose sur des coupes d'explantats cultivés pendant 30 heures (période d'activité mitotique optimale).

Fig. 2 :        prophase

Fig. 3 à 5 : anaphase

Fig. 6        : télophase

*coloration de Feulgen*



P L A N C H E    I V

OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES ET HISTO AUTORADIOGRAPHIQUES (Thymidine-<sup>3</sup>H)  
REALISEES APRES L'APPARITION DES PREMIERES DIVISIONS CELLULAIRES.

Persistance de l'incorporation de la thymidine-<sup>3</sup>H, en particulier au niveau  
de la zone génératrice

Fig. 1 : Coupe réalisée après 36 heures de culture

Fig. 2 : Coupe réalisée après 78 heures de culture.

*coloration par le bleu d'azur*

*Avant leur prélèvement, les tissus ont été mis à incuber pendant 6 heures  
dans une solution de thymidine-<sup>3</sup>H (A.S. : 25 mCi.mM<sup>-1</sup>) à 20 µCi.ml<sup>-1</sup>.*

Formation de l'assise cicatricielle

Fig. 3 : Après 30 heures de culture, on observe l'apparition de divisions péricli-  
nes et de noyaux incorporant la thymidine-<sup>3</sup>H, à quelques couches cellulaires  
du bord de l'explantat.

*coloration par le bleu d'azur*

Fig. 4 : Assise cicatricielle après 78 heures de culture

*coloration de Brachet*

Formation de faisceaux cribrovasculaires

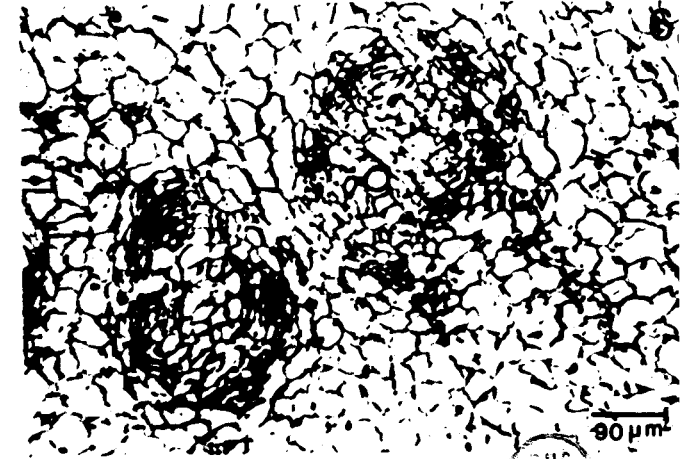
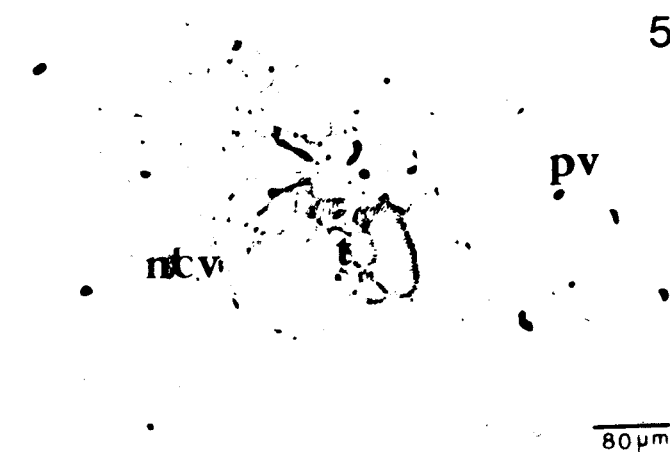
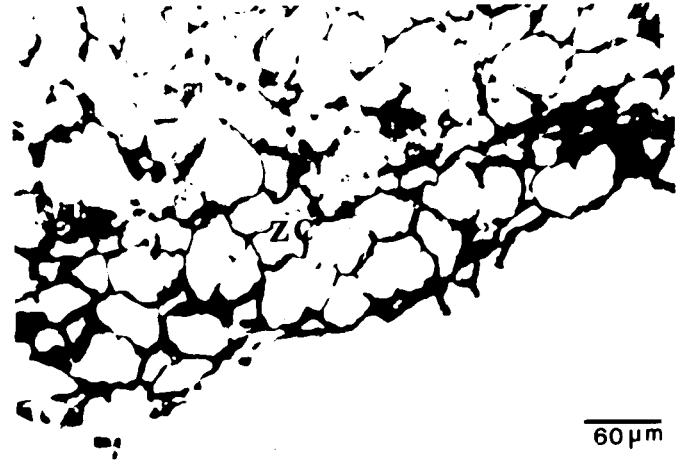
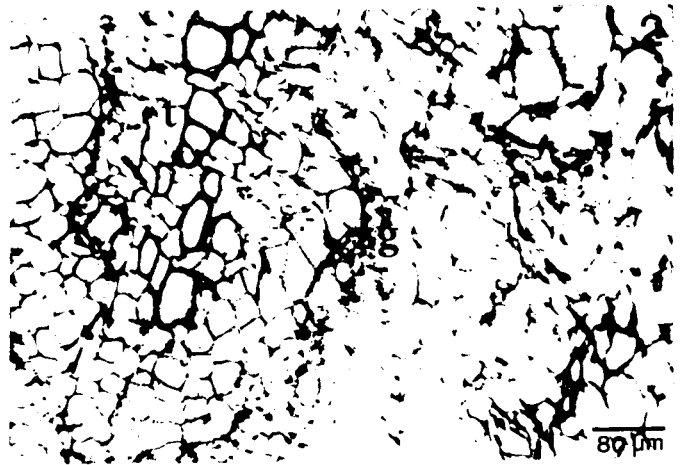
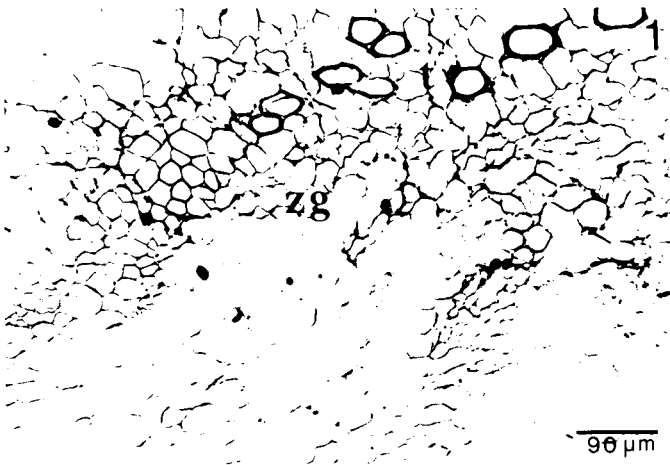
Fig. 5 : Formation de faisceaux cribrovasculaires au niveau de la zone génératri-  
ce après 3 jours de culture.

*coloration de Brachet*

Fig. 6 : Faisceaux cribrovasculaires après 6 jours de culture

*coloration par la safranine et le fast green*

ncv : faisceaux cribrovasculaires ; pv : parenchyme vasculaire  
zc : zone cicatricielle ; zg : zone génératrice.



P L A N C H E V

ETUDE HISTOLOGIQUE DE LA DIFFERENCIATION ORGANOGÈNE

Fig. 1 et 2 : Apparition des premières cellules méristématiques à la périphérie de l'explantat entre le 2ème et le 3ème jour de culture.

Fig. 1 : Observation de cellules méristématiques au contact de trachéides à la 72ème heure de culture.

Fig. 2 : Observation de cellules méristématiques dans le parenchyme libérien à la 72ème heure de culture.

*coloration par la safranine et le fast-green*

Fig. 3 : Cellule recloisonnée observée au 4ème jour de culture

*coloration de Brachet*

Fig. 4 : Formation d'un épiderme au niveau d'un méristème. Après 4 jours de culture, on peut noter une nette discontinuité entre la région frontale et les tissus adjacents.

*coloration par la safranine et le fast-green*

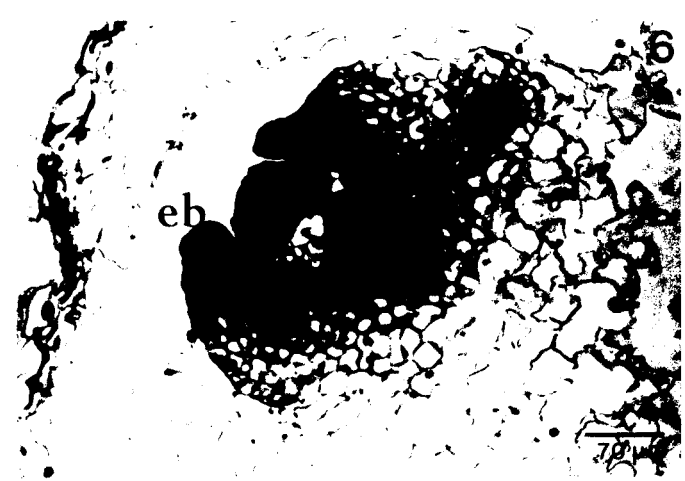
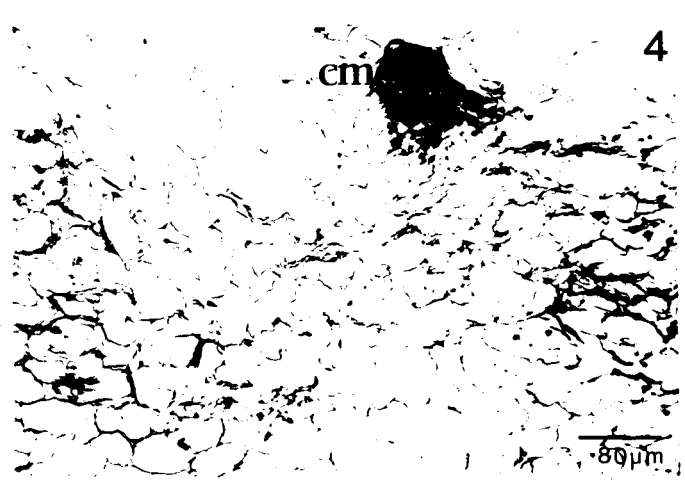
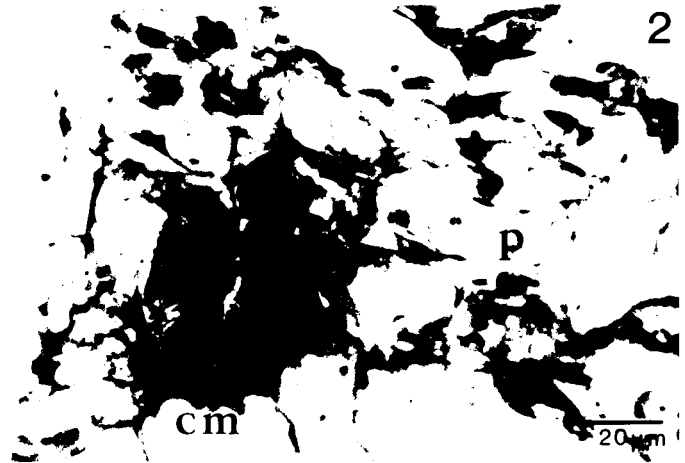
Fig. 5 : Méristème formé au contact de trachéides, après 5 jours de culture.

*coloration de Brachet*

Fig. 6 : Observation des ébauches foliaires et de l'apex caulinaire du futur bourgeon après 5 jours de culture

*cm : cellules méristématiques ; cr : cellule recloisonnée ; eb : ébauche foliaire ; p : parenchyme ; t : trachéide ; zg : zone génératrice.*





OBSERVATION HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE (URIDINE-<sup>3</sup>H ET LEUCINE-<sup>3</sup>H) REALISEE  
 AU COURS DES PREMIERES 24 HEURES DE CULTURE.

Etude de l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H.

Fig. 1 : Incorporation très précoce de l'uridine-<sup>3</sup>H après 2 heures de culture, qui se produit surtout dans le nucléole et la chromatine

Fig. 2 : Après 4 heures de culture, l'incorporation a augmenté dans le nucléole et la chromatine.

Fig. 3 : Après 8 heures de culture : la densité des grains d'argent augmente de manière importante au niveau des nucléoles et du cytoplasme

Fig. 4 : Après 14 heures de culture, l'incorporation a lieu dans les trois compartiments cellulaires : nucléole et surtout chromatine et cytoplasme.

Etude de l'incorporation de la leucine-<sup>3</sup>H

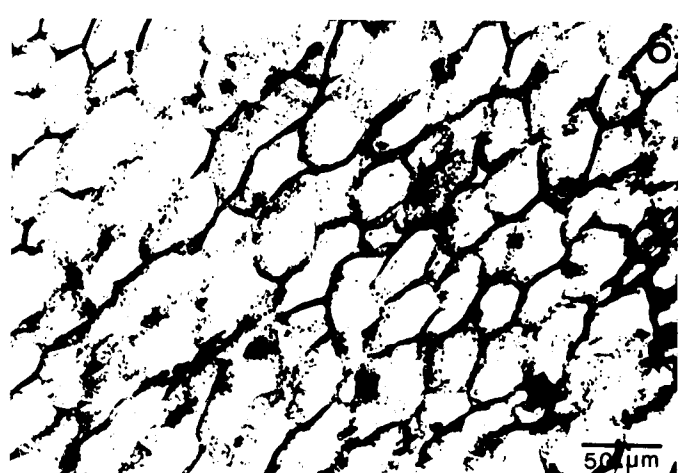
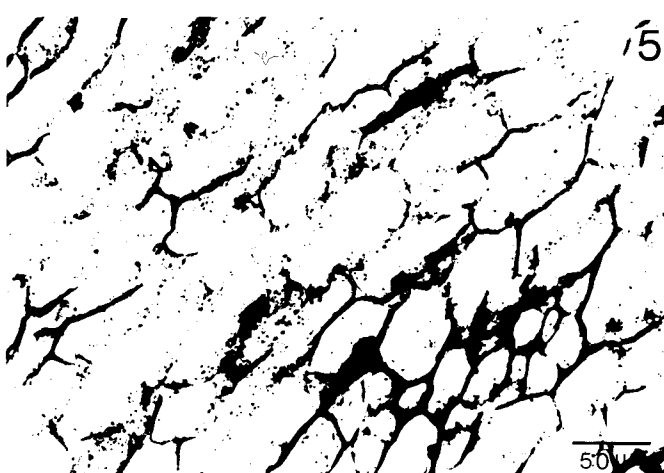
Fig. 5 : Coupe réalisée dans un explantat cultivé pendant 2 heures : l'incorporation très précoce est visible dans le cytoplasme, et au niveau des noyaux.

Fig. 6 : Coupe réalisée dans un explantat cultivé pendant 4 heures : le taux d'incorporation a nettement augmenté.

*coloration par le bleu d'azur*

*Avant leur prélèvement, les tissus ont été mis à incuber pendant 2 heures dans une solution contenant de l'uridine-<sup>3</sup>H (A.S. : 25 mCi.mM<sup>-1</sup>) à 20 µCi.ml<sup>-1</sup> ou de la leucine-<sup>3</sup>H (A.S. : 1 Ci.mM<sup>-1</sup>) à 20 µCi.ml<sup>-1</sup>.*

*n : noyau.*



2005  
11/28

P L A N C H E V I I

ETUDE HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'INCORPORATION DE RADIOELEMENTS AU NIVEAU  
DES MERISTEMES PRIMAIRES.

---

Fig. 1 : Incorporation de la thymidine-<sup>3</sup>H dans les noyaux d'un méristème  
d'une culture âgée de 4 jours.

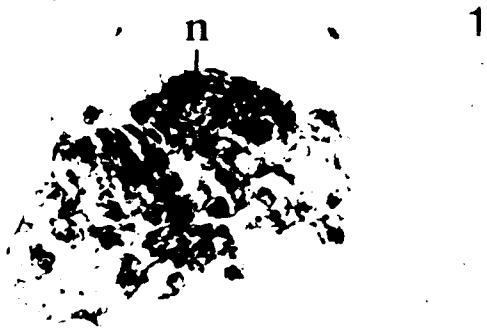
Fig. 2 : Incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H dans les cellules d'un méristème d'une  
culture âgée de 4 jours. La radioactivité est localisée essentiellement au  
niveau du nucléole.

Fig. 3 : Incorporation de la leucine-<sup>3</sup>H dans les cellules d'un méristème primaire  
d'une culture âgée de 4 jours.

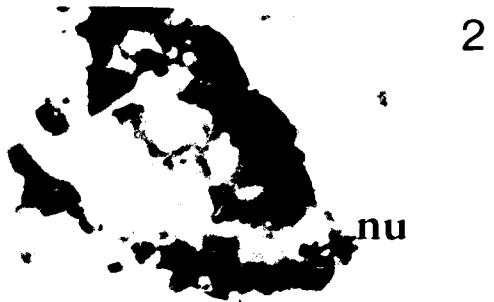
*coloration par le bleu d'azur*

Avant leur prélèvement, les explantats ont été mis à incuber pendant 1 heure  
dans une solution contenant de la thymidine-<sup>3</sup>H (A.S. : 25 mCi ml<sup>-1</sup>) à 20 µCi ml<sup>-1</sup>,  
de l'uridine-<sup>3</sup>H (A.S. : 25 mCi.ml<sup>-1</sup>) à 20 µCi.ml<sup>-1</sup>, ou de leucine (A.S. : 1 Ci  
mM<sup>-1</sup>) à 20 µCi.ml<sup>-1</sup>.

n : noyau ; nu : nucléole.



50 μm



10 μm



P L A N C H E    VIII

REPRESENTATION DE QUELQUES TRANSFORMATIONS HISTOLOGIQUES AU COURS DE LA CULTURE "IN VITRO" DES TISSUS D'ENDIVE.

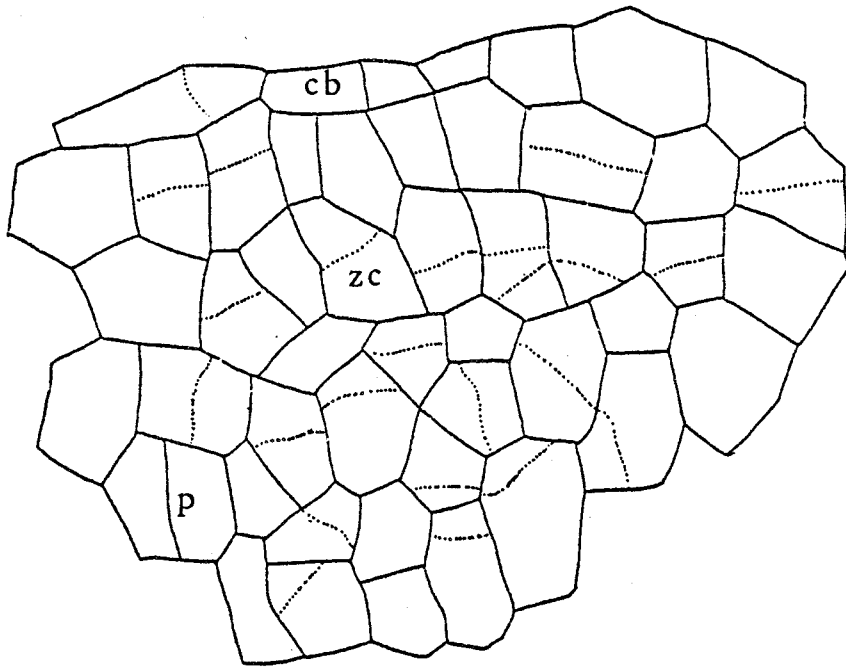
---

Fig. 1 : Formation de la zone cicatricielle après 48 heures de culture.

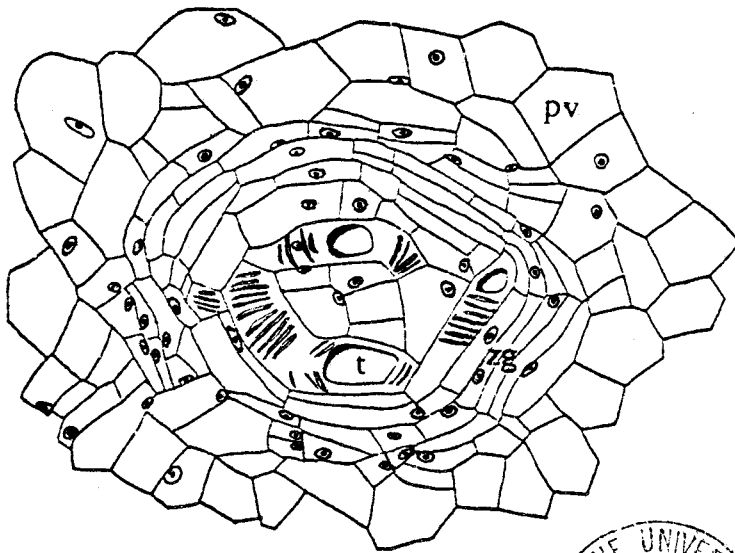
Fig. 2 : Faisceau cribrovasculaire formé après 4 jours de culture.

Fig. 3 : Cellules méristématiques apparues au contact de trachéides, après 4 jours de culture.

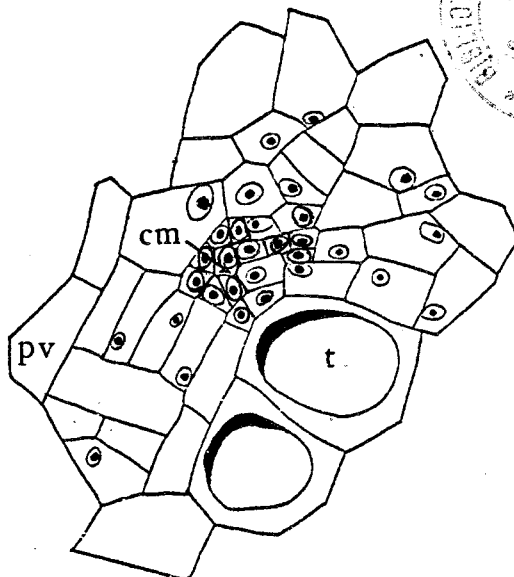
*cb* : cellules du bord de l'explantat ; *cm* : cellules méristématiques ; *p* : parenchyme ; *pv* : parenchyme vasculaire ;  
*t* : trachéide ; *zc* : zone cicatricielle ; *zg* : zone génératrice.



1



2



3

