

50376  
1987  
313-1

N° d'ordre : 723

50376  
1987  
313-1

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES**

par

Marie-Chantal FABRE

**ASPECTS ECOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES  
DE LA REPRODUCTION SEXUEE CHEZ DEUX  
ESPECES DE SPHAIGNES (BRYOPHYTES) :**  
*SPHAGNUM PALUSTRE L. ET SPHAGNUM FLEXUOSUM*  
**DOZY ET MOLK**

I



*Exemplaire corrigé après avis du jury*

Soutenue le *8 décembre* 1987 devant la Commission d'Examen

S.	JOVET	Professeur au Muséum Paris	Rapporteur
L.	LACOSTE	Professeur au Muséum Paris	Rapporteur
D.	ROBERT	Professeur à l'Université de Paris VI	Rapporteur
R.	SCHUMACKER	Professeur à l'Université de Liège	Rapporteur
Ph.	VERNET	Professeur à l'Université de Lille Flandres Artois	Examineur
E.	VIVIER	Professeur à l'Université de Lille Flandres Artois	Président



DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,  
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,  
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,  
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. E. VIVIER

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCIUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPRES Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANCRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. MESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

A mon très cher père,

Je souhaite que tu puisses trouver en ce travail, le témoignage de toute la confiance et les espoirs que tu as placés en moi. Reçois cet ouvrage avec toute ma reconnaissance, mon amour et mon profond respect.

A la plus affectueuse des mamans,

Je te dédie cette thèse, qu'elle soit pour toi la récompense de tout ce que tu as supporté comme tourments à mon égard. Reçois ce travail comme un modeste cadeau de ma part.

Au début de ce mémoire, j'ai l'agréable devoir de remercier mon Maître le Professeur BONNOT. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et sache que je conserverai un inoubliable souvenir de ces premières années consacrées à l'étude d'un sujet qui m'est cher. Malheureusement son départ a créé un véritable vide scientifique.

A mon directeur de recherche, Monsieur le Professeur LACOSTE.

Pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de Cryptogamie et pour m'avoir permis de continuer cette thèse dans de bonnes conditions, je souhaiterais que ce travail soit le témoignage de ma profonde gratitude ainsi que celui de mon respectueux attachement.

A mon président de jury, Monsieur le Professeur VIVIER.

Pour le grand honneur que vous me faites d'accepter la présidence de cette thèse, veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde reconnaissance. De plus, c'est certainement grâce à vous que j'ai pu trouver l'espoir et le courage nécessaires à l'aboutissement de cette thèse.

A Madame le Professeur JOVET.

J'ai été très touchée de l'intérêt que vous avez porté à mon travail et surtout de l'accueil si chaleureux que vous avez toujours manifesté à mon égard. Soyez remerciée de l'honneur que vous me faites d'être rapporteur de cette thèse. Permettez-moi aussi de joindre à mes sentiments de grande admiration l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur SCHUMACKER, de l'Université de Liège, qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Sa compétence alliée à une grande disponibilité et une grande gentillesse m'ont été précieuses lors de la rédaction de ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et du plaisir de le compter parmi mes juges.

Je remercie Monsieur le Professeur ROBERT d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur VERNET qui a accepté de juger cette thèse. Qu'il soit assuré de mon amitié et de ma profonde gratitude.

Je ne saurais oublier Marie-Claire VERDUS, de l'Université de Lille I et Claude SUIRE de l'Université de Bordeaux qui ont corrigé avec compétence ce travail. Qu'ils soient remerciés de tout coeur pour leurs précieux conseils et leurs avis éclairés dont ils m'ont fait part.

Je tiens tout spécialement à remercier Michel DESCAMPS, Maître de conférences en Biologie Animale. Sa bonne humeur et sa gentillesse sont tellement communicatives qu'elles m'ont permis, à certains moments, de trouver le courage nécessaire pour mener à bien ce travail. Sois assuré de ma profonde amitié.

Je ne saurais citer tous ceux qui, appartenant ou non au laboratoire, m'ont si souvent soutenue tant par l'efficacité de leur concours technique que par leurs encouragements et leurs conseils. Que chacune des personnes concernées trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Enfin, je n'aurais garde d'oublier Michèle MAETIE qui, avec patience et bonne humeur, a dactylographié ce manuscrit. Je lui donnerai le mot de la fin, car c'est elle qui l'aura frappé : merci.

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
TECHNIQUES .....	9
A.- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE .....	10
1. Préparation du matériel .....	10
a) Microscopie électronique à transmission	
b) Microscopie électronique à balayage	
2. Isolement des spermatozoïdes .....	11
B.- CYTOCHIMIE .....	12
1. Mise en évidence des polysaccharides .....	12
2. Mise en évidence des lipides .....	13
a) par des lipochromes	
b) par des tests biochimiques	
3. Mise en évidence des protéines (MONNERON, 1966) .....	14
4. Détection des phosphatases acides .....	14
a) Technique de GOMORI	
b) Méthode de BURSTONE au phosphate de naphтол AS-TR	
5. Détection des oxydo-réductases .....	16
C.- CULTURES .....	17

PREMIERE PARTIE : ECOLOGIE DE <u>S. PALUSTRE</u> .....	18
I.- HISTORIQUE .....	19
II.- RESULTATS .....	19
A.- CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES .....	19
1. Présentation du site d'étude : la tourbière de la sablière du Lièvre.....	20
2. Techniques utilisées pour l'étude de <u>S.</u> <u>palustre</u> .....	22
B.- DONNEES CLIMATIQUES .....	22
1. Températures .....	22
2. Précipitations .....	23
3. Luminosité .....	23
C.- OBSERVATIONS BIOLOGIQUES EFFECTUEES DANS LA NATURE ET ETABLISSEMENT DES CLIMATOGRAMMES .....	24
D.- ELABORATION DU CYCLE BIOLOGIQUE DE <u>S. PALUSTRE</u> REALISE DANS DES CONDITIONS "NORMALES" .....	26
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION .....	28

SECONDE PARTIE : ETUDE STRUCTURALE DU GAMETOPHYTE FEUILLE .....	29
CHAPITRE I: CULTURES A PARTIR DE SPORES: OBTENTION DE PROTONEMAS ET DE GAMETOPHYTES FEUILLES STERILES CHEZ <u>S. PALUSTRE</u> ..	30
I.- HISTORIQUE .....	31
II.- RESULTATS .....	31
A.- ENSEMENCEMENT .....	31
1. Morphologie d'une spore non germée .....	32
2. Germination des spores .....	32
B.- STRUCTURE DES PROTONEMAS, RHIZOIDES ET GAMETOPHYTES FEUILLES .....	33
1. Protonéma .....	33
2. Rhizoïdes .....	34
3. Gamétophyte feuillé .....	34
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION .....	36
CHAPITRE II : COMPARAISON CYTOLOGIQUE DE L'APEX VEGETATIF ET DE L'APEX SEXUALISE DES SPHAIGNES PRELEVEES DANS LA TOURBIERE .....	38
I.- OBSERVATIONS EFFECTUEES CHEZ <u>S. FLEXUOSUM</u> .....	39
A.- ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX VEGETATIF.....	39
B.- ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX SEXUALISE.....	39
1. Plastés .....	39
2. Organites à deux zones concentriques (les O.D.Z.C.).....	40
II.- OBSERVATIONS EFFECTUEES CHEZ <u>S. PALUSTRE</u> .....	41
A.- ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX VEGETATIF .....	41
B.- ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX SEXUALISE .....	42
1. Plastés .....	42
2. Organites à deux zones concentriques (les O.D.Z.C.).....	42
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION .....	42

CHAPITRE III : ETUDE DE L'APPAREIL SECRETEUR MUCIGENE CHEZ <u>S.</u> <u>PALUSTRE</u> .....	44
I.- HISTORIQUE .....	45
II.- RESULTATS .....	46
A.- ETUDE MORPHOLOGIQUE .....	46
B.- ETUDE CYTOLOGIQUE .....	46
1. Etat méristématique .....	46
2. Phase de spécialisation = différenciation ..	48
a) dictyosomes	
b) plastes	
3. Phase fonctionnelle .....	49
C.- ETUDE CYTOCHIMIQUE .....	49
1. Nature chimique du mucilage .....	49
2. Activités sécrétoire et enzymatique .....	50
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION .....	51
 TROISIEME PARTIE : LES ORGANES MALES. L'ANTHERIDIE ET L'EVOLUTION DU TISSU SPERMATOGENE DE <u>S. PALUSTRE</u> .....	54
I.- HISTORIQUE .....	55
II.- RESULTATS .....	56
A.- MORPHOLOGIE GENERALE DE L'ANTHERIDIE .....	56
B.- EVOLUTION ULTRASTRUCTURALE DU TISSU SPERMATOGENE ..	57
1. Spermatogonie .....	57
2. Spermatocytes .....	58
3. Spermatides .....	58
4. Spermatozoïdes .....	61
5. Paroi anthéridienne .....	61
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION .....	61

QUATRIEME PARTIE : LES ORGANES FEMELLES, L'ARCHEGONE DE <u>S. FLEXUOSUM</u> ET DE <u>S. PALUSTRE</u> .....	67
HISTORIQUE DES CHAPITRES I ET II .....	68
CHAPITRE I : LES CELLULES DE L'ARCHEGONE .....	72
I.- RESULTATS .....	73
A.- MORPHOLOGIE GENERALE DE L'ARCHEGONE OBSERVEE AU MICROSCOPE PHOTONIQUE .....	73
B.- ULTRASTRUCTURE DES CELLULES DE L'ARCHEGONE.....	74
1. Pseudopode.....	74
2. Cellules du col.....	74
3. Cellules du canal du col.....	75
4. Cellules de la paroi ventrale. Les cellules du ventre de l'archégone.....	76
a) Développement de réticulum endoplasmique	
b) Elaboration de mucilage	
c) Formation de structures tubulaires	
d) Plastes	
e) Organites à deux zones concentriques (les O.D.Z.C.)	
II.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	80
CHAPITRE II : L'OOSPHERE DE <u>S. PALUSTRE</u> .....	85
I.- RESULTATS .....	86
A.- STADE DU PROGAMETE .....	86
B.- STADE DU GAMETE FEMELLE : INDIVIDUALISATION.....	86
1. Individualisation du gamète.....	86
2. L'oosphère jeune.....	86
3. L'oosphère à un stade plus âgé.....	87
4. L'oosphère mûre.....	87
II.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	88

CINQUIEME PARTIE : LA FECONDATION ET L'EMBRYOGENESE CHEZ <u>S. PALUSTRE</u> .....	90
CHAPITRE I : LA FECONDATION .....	91
I.- HISTORIQUE .....	92
II.- RESULTATS .....	92
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	93
CHAPITRE II : L'EMBRYOGENESE : PREMIERES ETAPES DE L'EMBRYOGENESE ET ULTRASTRUCTURE DE L'EMBRYON.....	95
I.- HISTORIQUE .....	96
II.- RESULTATS .....	96
A.- L'EMBRYON AU STADE A 2 CELLULES.....	96
B.- L'EMBRYON AU STADE A 5 CELLULES.....	98
C.- L'EMBRYON AU STADE A 9 CELLULES.....	98
D.- L'EMBRYON AU STADE A 15 CELLULES.....	98
E.- L'EMBRYON AU STADE A 45 CELLULES.....	99
III.- DISCUSSION ET CONCLUSION .....	99
 RESUME ET DISCUSSION GENERALE.....	101
CONCLUSION GENERALE.....	112
BIBLIOGRAPHIE.....	120

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

Les Sphaignes appartiennent à l'embranchement des Bryophyta, qui est divisé (d'après STOTLER et CRANDAL-STOTLER, 1977) en trois classes : les Hepaticopsida (Hépatiques), les Anthocerotopsida (Anthocérotes) et les Bryopsida (Mousses). Ces dernières, d'après REIMERS, 1954, et d'après VITT, 1984, comprennent la sous-classe des Andreaeidae, la sous-classe des Bryidae et la sous-classe des Sphagnidae ou Sphaignes qui ne renferme que le genre Sphagnum. Mais cette classification n'est pas la seule pronée. Certains auteurs ont intégré les Anthocerotopsida dans les Hepaticopsida (JOVET-AST, 1952) ; d'autres ont séparé les Mousses des Sphaignes et ont proposé deux classes différentes : les Bryopsida et les Sphagnopsida (JOVET-AST, 1952 : EDDY, 1979 et VITT, 1982). Enfin, la position des Andreaeidae est controversée ; ROBINSON, 1971, les range dans la sous-classe des Bryidae.

Les Bryophytes constituent un groupe de plantes de morphologie disparate. Malgré tout, quelles que soient leurs formes, toutes les espèces naissent, croissent et se reproduisent suivant le même processus. Autrement dit, tout ce groupe de plantes est essentiellement caractérisé par son cycle de développement qui présente une alternance régulière de deux phases: le gamétophyte et le sporophyte. En définitive, les Bryophytes sont unies par un cycle sexué identique.

Différentes des autres Mousses par leur aspect, très hygrophiles, les Sphaignes forment des bombements, des coussins, des touffes de tiges dressées pouvant atteindre plusieurs décimètres de longueur. Parfois, elles flottent, mais non libres, à la surface de l'eau. Elles ne sont jamais d'un vert foncé comme la plupart des Mousses et des Hépatiques mais plutôt vert pâle ou colorées de teintes variées. Contrairement aux autres Bryophytes, la tige est dépourvue de rhizoïdes et ne se fixe pas au substrat; elle meurt continuellement par sa base et croît par son sommet. Une coupe transversale de feuille montre qu'elle est constituée de deux types de cellules : les chlorocystes, étroits et chlorophylliens, les hyalocystes, grands, vides de tout protoplasme et munis de fibres et de pores. Les Sphaignes possèdent une capsule qui leur est propre. Seule leur forme arrondie rappelle celle des Hépatiques. De nombreux caractères la distinguent de la capsule des Mousses. En effet, la capsule des Sphaignes est dépourvue de péristome ; l'ouverture est apicale, la columelle est très développée et surmonte un tissu sporogène en dôme. Quand la capsule arrive à maturité, le rameau qui la porte s'allonge en un pseudopode. Ce dernier peut être comparé au pédicelle (=soie) des Mousses ou, par son aspect, peut rappeler le pédicelle de la capsule d'une Hépatique à feuilles (Jungermanniales), par exemple, mais son origine est différente. En effet, le pédicelle des Jungermanniales et celui des Mousses appartiennent au sporophyte ; ils sont l'un et l'autre intercalés entre le pied du sporophyte et la capsule. Le pseudopode d'une Sphaigne appartient au gamétophyte et il est situé sous le pied du sporophyte qu'il supporte.

Enfin, au sein des Sphagnidae divers critères ont été, tour à tour, choisis pour la division infragénérique du genre Sphagnum. L'expérience montre qu'un faisceau de caractères doit concourir à cette classification ; en effet, beaucoup sont bons, mais il n'en est aucun qui conserve la même valeur, dans toute l'étendue du genre.

L'existence ou l'absence d'épaississements spiralés et de pores de la paroi du hyaloderme de la tige a permis à RUSSOW (1889) d'établir deux groupes principaux : les Sphagna Inophloea et les Sphagna Litophloea. Au sein de ces deux groupes, la structure et la disposition des deux types de cellules des feuilles raméales ont conduit à fonder différentes sections. Ainsi on distingue principalement et brièvement :

- chez les Sphagna Inophloea, la seule section Palustria ;
- chez les Sphagna Litophloea, les sections Acutifolia, Cuspidata, Squarrosa, Rigida et Subsecunda.

Les Sphaignes ont fait l'objet de nombreux travaux. Cependant, un certain nombre de controverses se sont établies à leur sujet. Leur aspect particulier, leur mode de vie remarquable, les dépôts qu'elles laissent dans les tourbières, finissant par constituer la tourbe, sont d'autant de points saillants qui ont motivé, depuis longtemps, les recherches de systématiciens, de morphologistes, d'écologistes, de physiologistes et de géologues. Les Sphaignes ont également attiré l'attention de cytologistes, car elles possèdent des caractères microscopiques originaux. Par exemple, se différencient deux types de cellules au niveau des feuilles adultes. ZEPF en 1952, décrit cette différenciation cellulaire chez Sphagnum cymbifolium, travail que nous avons élargi à cinq autres espèces de Sphagnum (FABRE, 1974). A la suite de cette étude structurale des apex végétatifs, il nous a paru intéressant de poursuivre nos recherches en envisageant l'étude de leurs appareils reproducteurs et celle des différents phénomènes qui en découlent, comblant ainsi l'absence de nos connaissances qui existe à propos des Sphaignes.

En effet, les études ultrastructurales des organes sexués des Sphaignes sont assez rares, alors que les Hépatiques et d'autres Mousses ont fait l'objet de nombreuses investigations. Les causes de ce manque de recherche sont probablement liées aux difficultés suivantes :

- les apex sexués femelles ne sont qu'au nombre de 3-4 par plante ; à chaque apex se développent 2 et rarement trois archégonés et seule une oosphère est fécondée par apex ;

- le gamète femelle est une cellule enfermée dans un organe restant longtemps clos ; en conséquence, il est difficile de la fixer pour la microscopie ;

- enfin, la multiplication végétative tient une place importante dans la propagation de ces végétaux ; en effet, une ou deux ramifications latérales d'un même pied permettent à la

plante de se multiplier les années où la fécondation ne peut se réaliser (LANE, 1977 ; WAYTT, 1982).

Dans ce travail nous présentons les résultats ne concernant que deux espèces appartenant à des sections totalement différentes : Sphagnum flexuosum Dozy et Molk. [=S. amblyphyllum (Russow) Zick.](<sup>1</sup>) de la section Cuspidata et Sphagnum palustre L. [=S. cymbifolium Hedw.](<sup>1</sup>) de la section Palustria.

S. flexuosum (pl.I, fig.1). La répartition géographique de cette espèce est circumpolaire avec une tendance subocéanique. S. flexuosum a été récolté près d'Arlon dans une tourbière des Ardennes belges qui a disparu depuis quelques années, et dans la Margeride aux sources de la Seuge (Lozère). Cette espèce se caractérise par de fins rameaux étalés. En conséquence, l'apex est petit et sa dissection, dans le but de localiser les archégones, est difficile.

S. palustre (pl.I, fig.2). Sa répartition est amphiatlantique et amphipacifique. En Europe occidentale, S. palustre est l'espèce la plus commune du genre ; en France, elle croît en plaine comme en montagne où elle atteint 1900 m dans les Pyrénées. Pour notre étude S. palustre a été récolté dans la tourbière de la sablière du Lièvre située à Saint-Amand-les-Eaux (Nord). Nous utilisons cette deuxième espèce pour les 3 raisons suivantes : (1) cette espèce est la plus grande des Sphaignes européennes ; (2) l'extrémité des rameaux des pieds mâles se colorent en orangé lors de la formation des anthéridies ; (3) la disparition de la tourbière des Ardennes belges et l'éloignement de celle de la Margeride nous ont conduit à travailler, pour une grande part, sur S. palustre.

Quelques précisions supplémentaires sont apportées par l'étude entreprise sur S. flexuosum.

## Bref aperçu du cycle annuel de S. palustre

### 1. Le gamétophyte

La spore, haploïde, issue de la méiose germe en émettant un filament court qui produit un protonéma lamellaire (p.6, fig.1) sur lequel se développent d'abord des rhizoïdes. Sur le pourtour du prononéma se différencie un bourgeon qui est à l'origine de la tige feuillée. Celle-ci constitue un gamétophyte feuillé simple ou ramifié. Comme la tige se détruit par la base à mesure qu'elle s'accroît par l'extrémité supérieure, l'ensemble finit par prendre une longueur à peu près constante. Elle se termine par une sorte de "gros bourgeon" constitué de jeunes rameaux denses et serrés, formant la couronne de rameaux courts (cr, fig.2,

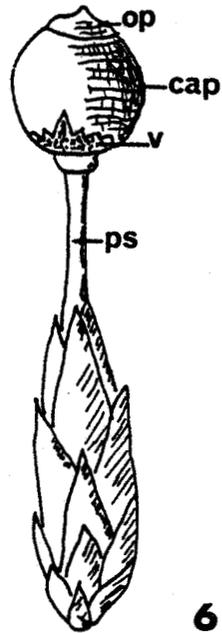
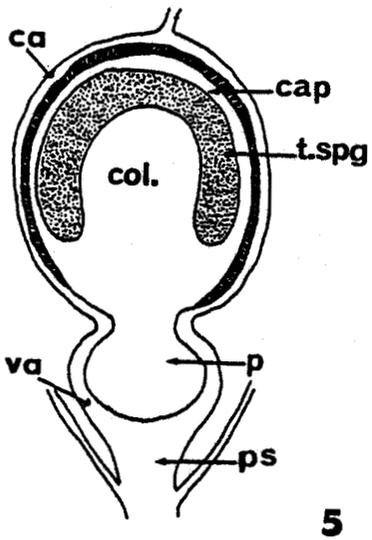
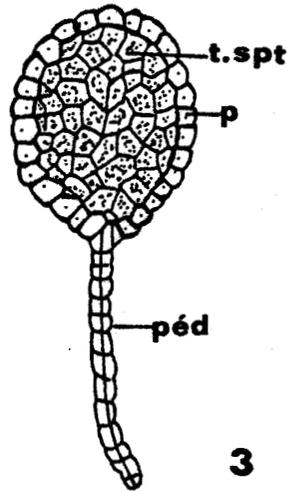
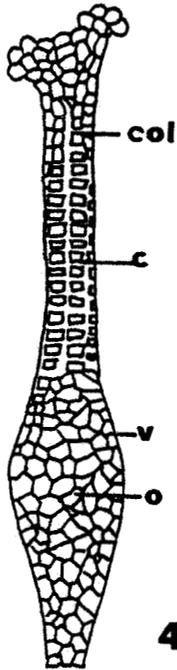
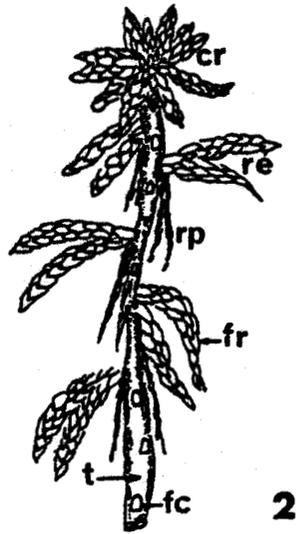
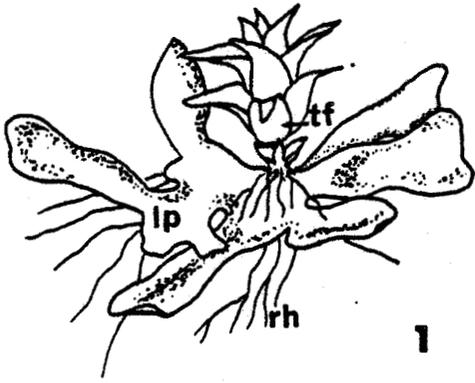
(1) d'après ISOVIITA (1966)

p.6). Sur l'axe prennent naissance des verticilles de rameaux simples. Les uns, nommés rameaux ascendants, sont étalés ; les autres, appelés rameaux pendants, sont plus ténus, et souvent appliqués contre la tige. Sur les deux types de rameaux sont insérées, en spirale, des feuilles raméales habituellement serrées et imbriquées. La tige porte des feuilles caulinaires assez distantes les unes des autres.

S. palustre est une espèce dioïque. Les anthéridies de forme arrondie, naissent à l'aisselle de bractées périgoniales peu différentes des feuilles raméales et sont pédicellées (p.6, fig.3). Les archégonies se développent à partir de la cellule apicale des apex latéraux au milieu de feuilles = bractées périchétiales. Ils sont au nombre de deux, parfois trois. Ils sont lagéniformes comme chez les autres Bryophytes (p.6, fig.4).

## 2. Le sporophyte

Après la fécondation, l'oeuf se segmente et se transforme en un embryon qui reste contenu dans le ventre de l'archégonie, dont les cellules se multiplient alors que le sporophyte se constitue. Il comprend un pied court portant une capsule sphérique verte (=sporogone) (p.6, fig.5). Le jeune sporophyte reste entouré par la paroi archégoniale (calypstre = coiffe) qu'il déchire au cours de sa croissance. La capsule montre, au centre, une columelle très développée surmontée du tissu sporogène en dôme. L'ensemble est entouré par la paroi de la capsule dont les 2/3 inférieurs portent des pseudostomates et au sommet de laquelle s'individualise un opercule. La capsule ne possède pas de péristomes à la différence des Mousses. Quand la capsule arrive à maturité le sommet de l'axe du gamétophyte se développe brusquement formant un pseudopode haploïde nu qui émerge entre les feuilles périchétiales (p.6, fig.6). Puis l'opercule est soulevé et les spores se dispersent.



3. Le cycle sexué de S. palustre  
 Les différentes phases sont schématisées sur la figure 7.

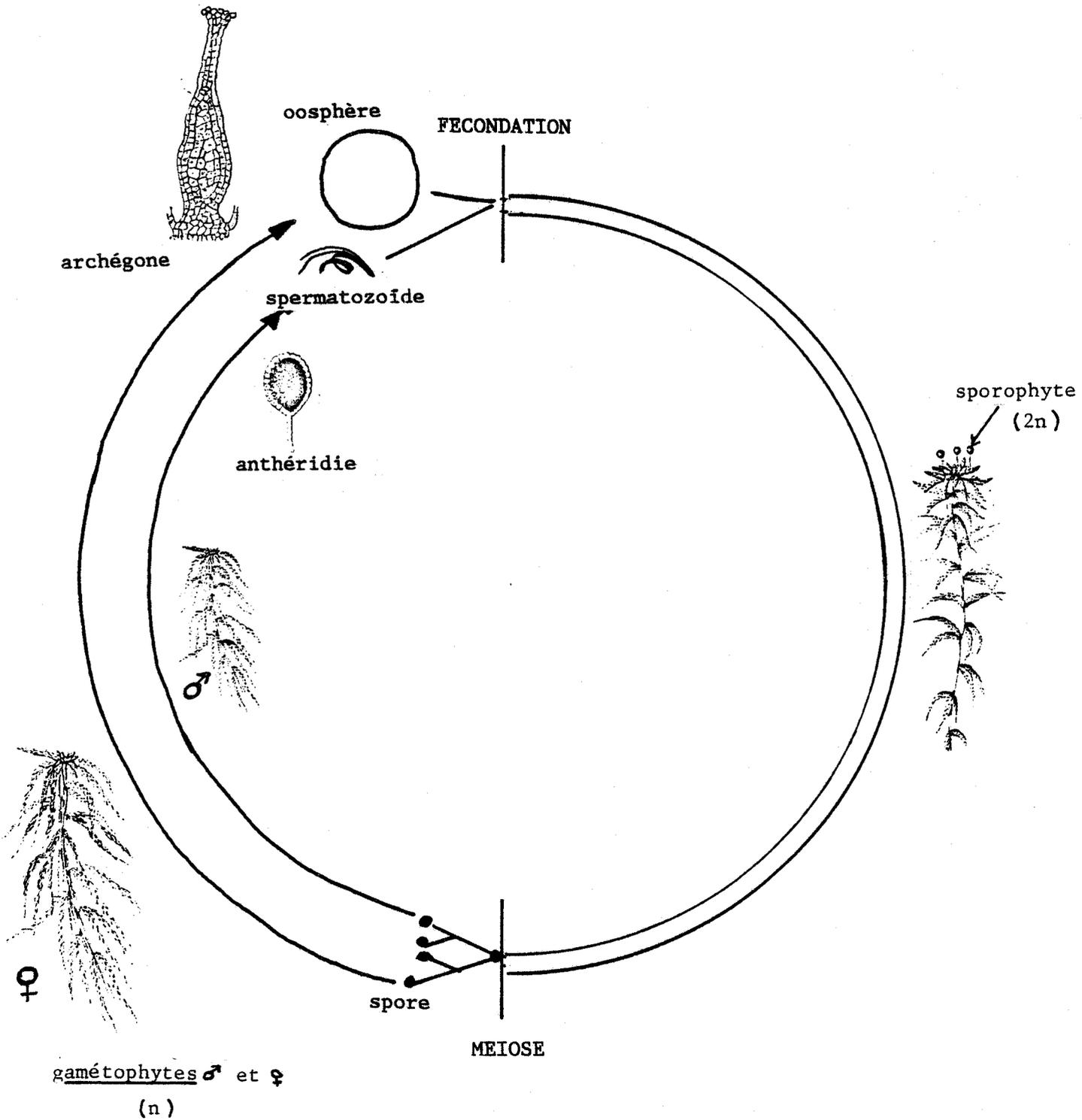


Figure 7 : Cycle sexué de S. palustre

Des observations effectuées régulièrement dans la tourbière de la sablière du Lièvre, de janvier 1981 à janvier 1987, associées aux données climatiques et aux études cytologiques ont permis de préciser les dates des phénomènes essentiels de la biologie de S. palustre.

Aussi nous avons essayé de reconstituer le cycle biologique de S. palustre et nous nous proposons d'en étudier les différentes étapes à l'aide de techniques diverses. L'exposé des résultats comprendra cinq parties ; un historique sera donné au début de chaque chapitre.

I.- Ecologie de S. palustre . L'étude de la plante dans son milieu naturel permet, pour la première fois, d'établir son cycle biologique annuel complet.

II.- Physiologie du développement de S. palustre. Des cultures entreprises à partir d'ensemencements de spores permettent le développement du gamétophyte feuillé. Les différents stades du développement sont étudiés en microscopie photonique et en microscopie électronique.

III.- Structure des organes mâles. L'évolution ontogénique du tissu spermatogène est décrite chez S. palustre.

IV. Structure des organes femelles. L'évolution du tissu archégonial est décrite chez S. flexuosum et chez S. palustre comblant ainsi la lacune qui existe dans la connaissance des Sphaignes.

V.- Fécondation et embryogenèse. Les travaux concernant la spermatogenèse et l'oogenèse conduisent normalement à l'étude de la fécondation et à l'étude de l'embryogenèse ; phénomènes observés pour la première fois en microscopie électronique chez S. palustre.

T E C H N I Q U E S

## A- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

### 1. Préparation du matériel

#### a) Microscopie électronique à transmission

##### α) Double fixation

Les apex végétatifs et les apex femelles de S. flexuosum et de S. palustre sont disséqués sous la loupe binoculaire. A l'aide de pinces fines, les jeunes feuilles qui entourent les apex et gênent la fixation sont retirées. Les apex sont alors immergés dans le mélange suivant : glutaraldéhyde à 0,5 % ou 3 % (10 ml), paraformaldéhyde à 0,5 % ou 1,5 % (10 ml), tampon cacodylate de sodium 0,2 M, pH 7,2 (10 ml).

Cette préfixation a été pratiquée sous vide pour éliminer les bulles d'air, logées entre les feuilles, qui entourent les apex. Elle dure 30 minutes à la température du laboratoire. Le fixateur est alors renouvelé et les objets y séjournent pendant 4 heures à la température ambiante. Après plusieurs lavages à l'aide du tampon cacodylate de sodium, on postfixe pendant 1 heure à 4°C en utilisant le mélange suivant : tétroxyde d'osmium à 2 % dans l'eau bidistillée, tampon cacodylate de sodium (vol/vol).

En ce qui concerne les anthéridies de S. palustre, seule l'extrémité des rameaux où se développent les organes mâles est prélevée. Un maximum de feuilles est également enlevé et l'ensemble est placé dans le même fixateur que précédemment. La suite des opérations est identique.

##### β) Inclusion

L'inclusion est faite dans le mélange de SPURR (1968) dont la composition est la suivante :

- vinyl cyclohexène dioxyde ..... 10 g
- éther dipropylène oxyde du poly 2,3  
propylène diol ..... 7 g
- méthyl 5, isoocényl 6 d'anhydride  
succinique ..... 26 g
- diméthylaminoéthanol ..... 0,4 g

Cette méthode nécessite une déshydratation des tissus dans l'acétone à des degrés de concentrations croissantes (10°, 30°, 50°, 70°, 90°, 100°, 100°, 100°). Chaque bain dure 10 minutes et se pratique sur la glace fondante. Après le dernier bain à 100 % les échantillons restent toute une nuit dans un mélange d'acétone à 100 % et de résine (vol/vol). Le lendemain, un bain dans la résine pure dure 5 heures. L'inclusion définitive se fait dans des gélules qui seront placées dans une étuve à 60°C pendant 24 heures.

##### γ) Coupes

Les coupes semi-fines d'environ 1µm à 2µm d'épaisseur et les coupes ultrafines d'environ 800Å sont obtenues à l'aide d'un

ultramicrotome MT-1, type Porter Blum. Elles sont recueillies à l'aide d'un anneau de matière plastique. Les coupes ultrafines sont déposées sur grilles en nickel pour les observations courantes ou grilles en or pour les digestions enzymatiques.

#### δ) Contrastes

Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle à saturation dans l'alcool éthylique à 50° et par le citrate de plomb (selon REYNOLDS, 1963).

#### ε) Observations

Les coupes sont observées à l'aide des microscopes électroniques suivants : SOPELEM 75 et JEOL (JEM 100CX) fonctionnant sous une tension de 80 KV.

#### b) Microscopie électronique à balayage

La méthodologie suivie est différente selon la nature du matériel biologique.

##### α) Matériel hydraté, exemple : feuilles fraîches

Le matériel est, dans un premier temps chauffé, à 100°C afin d'éliminer les bulles d'air. Puis, les fragments de jeunes rameaux sont fixés au tétroxyde d'osmium à 2 % dans le tampon cacodylate de sodium à 0,2 M, pH 7,2 pendant 30 minutes. Ils sont congelés dans l'azote liquide et montés directement sur pontet puis métallisés à l'or.

##### β) Matériel déshydraté, exemple : les spores

Les capsules, conservées à sec au laboratoire, sont désoperculées et les spores qui en sortent sont directement étalées sur un ruban adhésif double face, collé sur un pontet. L'ensemble est alors métallisé à l'or.

Les objets sont observés à l'aide du microscope électronique JEOL (JEM 100 CX), en utilisant le système pour balayage ASID-4, sous une tension de 20000 volts.

## 2. Isolement des spermatozoïdes

L'isolement des spermatozoïdes est obtenu après avoir ouvert les anthéridies. Deux techniques sont utilisées, la première consiste en une centrifugation des anthéridies, à 1200 g dans de l'eau bidistillée pendant 5 minutes. Le surnageant est prélevé et 10 µl d'eau sont ajoutés au culot. Ce dernier est versé dans une saignée et les spermatozoïdes sont déposés sur grilles recouvertes d'une membrane de formvar non carbonée. La deuxième technique consiste à vider le contenu des anthéridies directement sur la grille. Dans les deux cas, un premier lot est fixé aux vapeurs de tétroxyde d'osmium, qui se répandent dans un cristallisateur ; un deuxième lot subit une coloration négative à l'acide phosphotungstique, à 2 % dans l'eau, à pH 7, pendant 30 minutes. Les gamètes mâles sont directement observés à l'aide d'un microscope électronique.

## B- CYTOCHIMIE

Des études en microscopie photonique sont effectuées soit au moyen de coupes semi-fines à partir de blocs inclus selon SPURR, soit à partir de coupes pratiquées à l'aide d'un microtome à congélation DECIMU.

Des dessins sont réalisés d'après des photographies en couleurs prises au microscope photonique.

Des observations sont également faites à l'aide d'un microscope électronique à transmission.

### 1. Mise en évidence des polysaccharides

#### a) Bleu de toluidine

Des coupes semi-fines sont déposées sur des lames de verre et sont colorées au bleu de toluidine à 0,1 % dans une solution alcoolique à 30 % pendant 10 minutes. La préparation est réalisée au moment de l'emploi. La réaction est basée sur le phénomène de la métachromasie. Le bleu de toluidine colore en rouge violet les mucopolysaccharides tandis que les autres structures sont teintées en bleu (POLICARD et al., 1957).

#### b) Bleu Alcian (ROLAND, 1974)

D'autres coupes semi-fines sont colorées dans le bleu Alcian à 1 % dans HCL 0,5 N (pH 0,5) pendant 1 heure afin de mettre en évidence les polysaccharides acides.

#### c) Rouge de ruthénium (ROLAND, 1974)

Des coupes semi-fines sont traitées par le rouge de ruthénium à 0,5 % dissous dans de l'eau ammoniacquée 0,1 M pendant 1 heure pour la mise en évidence des polysaccharides acides.

#### d) Test de THIERY à la TCH (1967).

Les coupes ultrafines sont placées à la surface d'une solution d'acide periodique à 1 % dans l'eau distillée pendant 40 minutes à la température du laboratoire. Elles sont ensuite lavées par 3 passages de 10 minutes sur de l'eau distillée. Puis elles sont déposées à la surface d'une solution de thiocarbohydrazide (TCH) (0,2 % dans l'acétique acétique à 20 %) pendant 2 heures. Les coupes sont lavées plusieurs fois dans des solutions d'acide acétique de concentrations décroissantes (10 % à 1 %) puis à l'eau distillée. Les coupes sont mises à flotter sur une solution aqueuse de protéinate d'argent à 1 %, pendant 30 minutes à l'obscurité et à la température du laboratoire. La dernière étape consiste en une élimination du protéinate d'argent par 4 passages sur l'eau distillée. Les coupes peuvent alors être montées sur grilles de nickel.

Différents témoins sont réalisés, soit en supprimant le TCH, soit en remplaçant l'acide periodique par de l'eau oxygénée à 10 % pendant 20 minutes.

Les coupes sont observées telles quelles, sans autre contraste.

e) Coloration par le mélange acide chlorhydrique-acide phosphotungstique (THIERY et RAMBOURG, 1974).

Les coupes ultrafines flottent sur une solution d'acide phosphotungstique à 1 % dans l'acide chlorhydrique à 10 % (pH. 0,003) pendant 40 minutes. Elles sont rincées rapidement à l'eau bidistillée et placées sur des grilles en nickel. Les coupes ne sont pas contrastées par l'acétate d'uranyle ni par le citrate de plomb.

f) Coloration par l'acide phosphotungstique-acide chromique (RAMBOURG, 1967).

Les coupes ultrafines sont exposées à l'acide periodique à 1 % dans l'eau distillée puis lavées à l'eau bidistillée. Elles sont alors déposées sur une solution d'acide phosphotungstique à 1 % dans l'acide chromique à 10 % puis on effectue deux passages sur l'eau bidistillée.

Les coupes, recueillies sur des grilles en nickel, ne sont pas contrastées ni par l'acétate d'uranyle ni par le citrate de plomb.

g) Amyloglucosidase.

L'amyloglucosidase, isolée d'Aspergillus niger (produit Sigma, réf.3042), coupe les liaisons  $\beta$  1-4 des glucosides et libère les unités glucose. Elle est utilisée à 0,3 % dans un tampon acétate de sodium pH 4,5 à 45°C. Les digestions, pratiquées sur des coupes ultrafines de tissu fixé à l'OSO<sub>4</sub>, sont blanchies à l'acide periodique à 0,1 % dans l'eau distillée, durent de 1 à 5 heures. Les témoins sont obtenus en faisant subir aux échantillons les mêmes traitements, la seule différence venant de l'absence de digestion par l'amyloglucosidase. Les coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyle suivi du citrate de plomb.

## 2. Mise en évidence des lipides

a) par des lipochromes

Les trois colorants insolubles dans l'eau sont solubilisés par tous les composés hydrophobes, dont les lipides, qu'ils mettent donc en évidence en leur communiquant une coloration.

α) Rouge Soudan III

Les coupes à congélation, obtenues à partir de tissu frais, déposées sur une lame de verre sont colorées dans une solution saturée de Soudan III dans l'alcool éthylique à 70 % pendant 10 minutes.

β) Rouge Soudan IV

D'autres coupes à congélation sont mises en contact avec une solution de Soudan IV dans l'alcool éthylique à 70 % pendant 15 minutes.

### γ) Noir Soudan B

Des coupes à congélation sont traitées par une solution saturée de noir Soudan B dans l'alcool éthylique à 60 % pendant 15 minutes.

#### b) par des tests biochimiques

##### α) Hydrolyse par la lipase.

La lipase, isolée du pancréas de Porc (produit Serva, réf.27960), hydrolyse en particulier les triglycérides. Elle est préparée dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M, pH 7,4. Les concentrations de 0,1 à 0,3 % sont testées au cours de périodes qui s'échelonnent de 1 à 8 heures à 37°C sur des coupes ultrafines de tissus osmiés préalablement et blanchies à l'acide periodique. Les contrôles sont effectués par incubation dans le cacodylate de sodium dépourvu de lipase. Les coupes sont contrastées par les techniques usuelles.

##### β) Action de la phospholipase D.

La phospholipase D, isolée de l'Arachide (produit Serva, réf.32725), est utilisée à 2,5 % dans le tampon cacodylate de sodium 0,2 M, pH 5,6 à 30°C sur des coupes ultrafines obtenues à partir de tissus osmiés préalablement et blanchies à l'acide periodique à 1 %. La durée varie de 1 à 16 heures.

Des tests de contrôle sont pratiqués par incubation dans le tampon cacodylate dans les mêmes conditions de température et de durées. Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

### 3. Mise en évidence des protéines (MONNERON, 1966).

La pronase isolée de Streptomyces griseus (produit Serva, réf. 33635) est utilisée pour l'hydrolyse enzymatique des protéines sur coupes ultrafines de tissus osmiés préalablement et blanchies à l'acide periodique. Ces dernières sont soumises à l'action de la pronase (0,1 % dans de l'eau distillée, pH 7,4, 40°C) s'échelonnant sur des temps compris entre 1 à 3 heures. Les échantillons témoin subissent les mêmes traitements sauf celui mettant en oeuvre la pronase. Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

### 4. Détection des phosphatases acides

Les phosphatases sensu lato sont des enzymes qui catalysent le clivage hydrolytique des éthers-sels phosphoriques. La prise en considération de l'optimum de pH conduit à distinguer des phosphatases acides et des phosphatases alcalines. Seules sont recherchées ici les phosphatases acides, suivant deux techniques: celle de GOMORI, 1952 (GABE, 1968) et celle de BURSTONE (GABE, 1968).

## a) Technique de GOMORI

La capture des ions phosphate est assurée sous forme de phosphate de plomb grâce à l'introduction dans le bain d'incubation de nitrate de plomb. Un lavage élimine l'excès de ce dernier sel et le phosphate de plomb est révélé sous forme de sulfure, brun, en traitant les coupes par une solution de sulfure d'ammonium.

Le matériel est fixé dans du glutaraldéhyde à 5 % et dans du cacodylate de sodium (vol/vol) puis lavé pendant 12 heures, à 4°C dans le tampon de fixation.

Les coupes, de 50µm sont réalisées à l'aide d'un microtome à congélation.

La solution suivante est préparée extemporanément:

- acétate de sodium, 3H <sub>2</sub> O	5,4 g
- acide acétique RP	0,6 mg
- Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,2 g
- eau distillée qsp	1 l

Au moment de l'emploi ajouter 0,3 g du substrat, le β glycérophosphate de sodium, dissous dans 10 ml de la solution ci-dessus.

Les coupes sont laissées dans cette solution à l'étuve à 37°C pendant 1 heure. Elles sont rincées soigneusement à l'eau distillée pendant 30 minutes, à l'acide acétique 2 % pendant 1 minute et à l'eau distillée pendant 1 minute. Elles sont ensuite traitées pendant 2 minutes par la solution de sulfure d'ammonium (2 ml de solution commerciale dans 50 ml d'eau distillée). Les coupes sont abondamment rincées, déshydratées et montées dans l'Entellan (Merck).

Le résultat positif de la réaction se traduit par une coloration brune.

## b) Méthode de BURSTONE au phosphate de naphthol AS-TR

La technique de BURSTONE, considérée maintenant, offre un avantage certain sur la technique de GOMORI utilisant le β glycérophosphate de sodium ; en effet, la réaction de capture et la réaction colorée destinée à la mise en évidence du produit de la réaction primaire se confondent. Le naphthol, mis en liberté, aux lieux d'activité phosphatasique, est précipité par couplage avec le sel de diazonium présent dans le milieu d'incubation. Ce précipité est coloré.

Les coupes, à la congélation, sont incubées à 37°C pendant 1 heure dans le mélange préparé comme suit: dissoudre 4 mg du substrat Naphthol AS-TR-phosphate de Na dans 0,5 ml de N, N'-diméthylformamide ; ajouter 25 ml d'eau distillée, 25 ml de tampon acétate de Na-HCl 0,2 M, pH 5,2, 35 mg d'un sel de

diazonium (Red Violet LB salt) et 2 gouttes de chlorure de manganèse à 10 %, activateur de l'enzyme.

Les coupes sont ensuite rincées à l'eau distillée et montées à l'Entellan (Merck).

Le résultat positif de la réaction se traduit par une coloration rouge foncé.

Des témoins sont réalisés pour les deux techniques en utilisant un inhibiteur spécifique des phosphatases acides. 0,01 M de fluorure de sodium sont ajoutés au milieu d'incubation.

### 5. Détection des oxydo-réductases

Les oxydases catalysent spécifiquement le transfert d'hydrogène moléculaire sur l'oxygène moléculaire.

#### a) Les cytochromes-oxydases

Ces enzymes assurent le transfert de l'hydrogène moléculaire d'un donateur peu spécifique, sur l'oxygène moléculaire.

Une seule technique de mise en évidence est utilisée, celle de BURSTONE, dont la procédure est décrite dans GABE (1968). Le substrat est une amine dont l'oxydation produit des polymères insolubles et capables de fixer des métaux.

Le bain d'incubation est préparé de la manière suivante :

- dissoudre, dans 0,5 ml d'éthanol, 12 mg de paraaminodiphénylamine (variante Blue TR base de SIGMA) et 12 mg de paraméthoxy-p aminodiphénylamine (variante 6 : 8 amino 1, 2, 3, 4 tétrahydroquinoléine).

- ajouter à ce bain d'incubation 35 ml d'eau distillée et 15 ml de tampon Tris HCl, pH 7,4.

- agiter et filtrer.

L'incubation dure 1 heure et se déroule à la température du laboratoire.

Puis les coupes sont traitées, sans lavage, par le mélange suivant :

{	acétate de cobalt	5 g
{	formol à 10 %	50 ml
{	tampon acétate de Na-HCl 0,2 M, pH 5,2	0,5 ml

Le traitement par ce mélange assure la chélation et dure 1 heure.

Enfin les coupes sont lavées à l'eau courante pendant 10 minutes et montées en milieu aqueux.

Le résultat positif de la réaction se traduit par une teinte bleu foncé.

Le contrôle est réalisé par des inhibiteurs tel le cyanure de potassium.

#### b) La succino-déshydrogénase

Cette enzyme catalyse la déshydrogénation de l'acide succinique en acide fumarique. L'hydrogène est transféré sur le ferro-cytochrome. La technique de mise en évidence utilisée est celle de NACHLAS et al., 1958 (GABE, 1968) au nitro-BT.

Les apex sont incubés en masse (à l'obscurité pour éviter la réaction photosynthétique au niveau des chloroplastes) pendant 1 heure dans le mélange suivant.

- solution de nitro-BT à 0,1 %	10 ml
- solution de succinate de sodium 0,2 M	5 ml
- tampon de SORENSEN 0,2 M, pH 7,6	5 ml

Les apex sont ensuite lavés au chlorure de sodium à 9 % pendant 2 minutes.

Des coupes sont réalisées, à la congélation, fixées au formol à 10 % pendant 5 minutes, lavées, déshydratées par l'alcool absolu et montées à l'Entellan (Merck).

Un précipité bleu de formazan indique le résultat positif de la réaction.

#### C - LES CULTURES

Les modifications que nous avons apportées au milieu de culture originel, mis au point par GILLET (1975), sont peu importantes ; en conséquence, nous avons choisi de ne pas les présenter dans ce mémoire. En revanche, la composition du milieu est donnée dans le chapitre I de la seconde partie.

P R E M I E R E P A R T I E

ECOLOGIE DE SPHAGNUM PALUSTRE

## I.- HISTORIQUE

Les travaux effectués sur les stratégies sexuelles des Mousses dans la nature sont rares et même parfois inexacts. Depuis les travaux de ROZE (1874) et d'ARNELL (1875), seule la publication de GRIMME (1903) fournit quelques données phénologiques. HAMANT réalise, en 1954, une étude du cycle biologique de trois espèces de Mnium afin d'éclaircir de nombreux points controversés concernant la reproduction sexuée chez les Mousses. A la suite des recherches effectuées sur le genre Mnium [M.hornum et M.undulatum, (NEWTON, 1972)], HALLET en 1974 présente un tableau précisant la chronologie des différentes phases de la gamétogenèse mâle et de la gamétogenèse femelle de Polytrichum formosum. Il détermine que l'induction de la phase reproductrice mâle doit avoir lieu pendant les jours courts du début de l'hiver et que la sexualisation des gamétophytes femelles se produit sous l'influence des jours longs printaniers. Les recherches récentes de GAUTHIER (1980) et de CLYMO et HAYWARD (1982) font état des conditions écologiques du développement de plusieurs espèces de Sphaignes, mais ces auteurs ne précisent pas les dates des phénomènes essentiels du cycle biologique de ces plantes. Nous nous proposons de décrire le cycle annuel de Sphagnum palustre

Lors des récoltes de S.palustre dans la tourbière de la sablière du Lièvre, située près de Saint-Amand-Les-Eaux (Nord), nous avons remarqué, que certaines années, cette espèce produisait de nombreuses capsules, et que d'autres années, les capsules étaient rares ou absentes. Nous avons donc cherché à déterminer les raisons de l'absence éventuelle de la fécondation. La synthèse des résultats permet de connaître, avec précision, les dates des phénomènes essentiels de son cycle biologique et ainsi de fixer, en vue d'une étude cytologique, les différentes parties de la plante. Les observations du cycle biologique concernant S. flexuosum n'ont pu facilement se poursuivre, car la tourbière où se développe cette espèce se situe en Lozère.

## II.- RESULTATS

### A.- LES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

Les Sphaignes se développent principalement dans les pays tempérés ou froids. En revanche, dans les pays chauds, elles ne se rencontrent que sporadiquement à l'occasion de conditions exceptionnelles. Ainsi le véritable biotope de ces végétaux se situe t-il dans les parties septentrionales de l'hémisphère boréal. D'immenses étendues marécageuses et tourbeuses dans le Nord de l'Europe, de l'Asie et de l'Amérique sont couvertes du moelleux tapis toujours humide des Sphaignes dont les diverses espèces s'y distinguent par leurs nuances particulières de vert, de jaune, de rouge et de brun.

Toutes les espèces communes en Europe sont aussi généralement répandues en Amérique du Nord. C'est le cas de S. palustre qui

fait l'objet de ce chapitre. Cette espèce existe dans la plupart des tourbières françaises, et, malgré sa bonne représentation peu de travaux traitent de sa répartition, de son écologie et de sa biologie dans les conditions naturelles. On sait que S. palustre ne supporte une immersion complète que pendant peu de temps ; ses terrains de prédilection sont les endroits où l'eau est peu profonde.

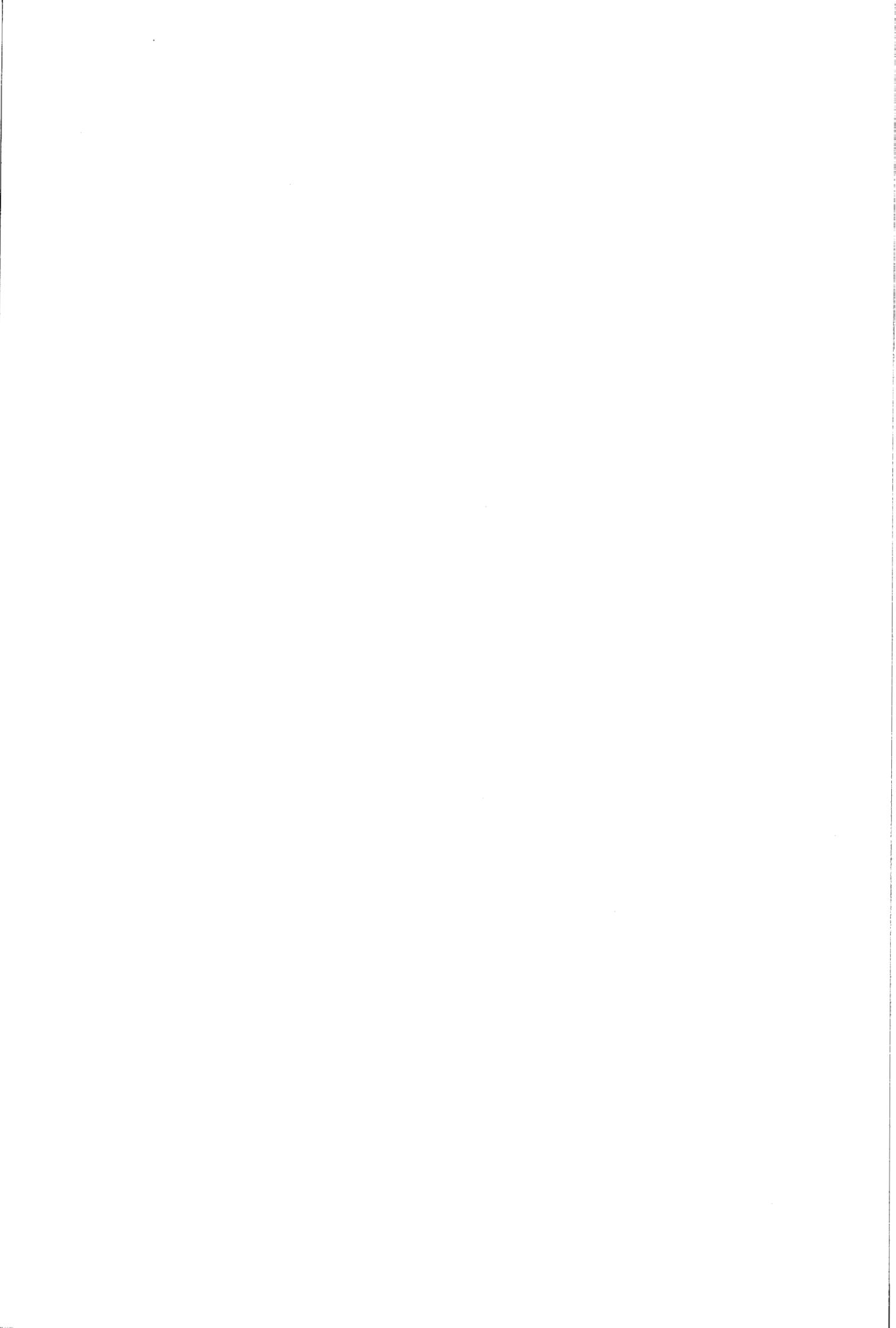
Dans le but de bien comprendre la biologie de S. palustre nous nous proposons de l'étudier dans l'un de ses biotopes naturels.

#### 1. Présentation du site d'étude : la tourbière de la sablière du Lièvre

Les observations ont été réalisées de janvier 1980 à janvier 1987 dans la tourbière de la sablière du Lièvre située dans la forêt domaniale de Raismes Saint-Amand-Wallers devenue Parc régional en 1967. Dans cette formation végétale, le réseau hydrographique présente une pente d'écoulement si faible que les terres marécageuses ou inondables, sont occupées par la forêt.

Cette forêt est installée sur des sables landéniens plus ou moins argileux. Selon le milieu, le type forestier passe de la chênaie-charmaie mésophile à la chênaie sessiliflore acidophile. Cette dernière se développe sur des affleurements de sables acides. La chênaie sessiliflore comprend le cortège acidophile typique, représenté par exemple par Rhamnus frangula, Pteridium aquilinum, Molinia coerulea, Convallaria maialis, et Maianthemum bifolium. L'exploitation des sables a donné naissance à des milieux humides, voire marécageux où se développent, plus précisément, tourbière et lande de la sablière du Lièvre. Ces biotopes particuliers ont toujours été un haut-lieu de la botanique dans le nord de la France ; des générations de botanistes et d'étudiants ont visité ce milieu riche en Drosera rotundifolia, Lycopodium clavatum, Lycopodiella inundata, Erica tetralix et Calluna vulgaris. La sablière du Lièvre a été mise en réserve botanique et zoologique et a été filmée par M. GUILLON montrant ainsi l'intérêt scientifique que leur ont porté tous les biologistes.

C'est dans la partie la plus basse de ce biotope que s'est développée la tourbière dont une partie fait l'objet de cette étude. Depuis l'abandon de l'exploitation des sables, le dynamisme de la végétation a permis la réinstallation d'un type forestier différent du type originel mais appartenant au même essaim d'associations végétales. En effet, le site étudié correspond à ce qu'a décrit TOMBAL (1974). Cet auteur a proposé de dénommer ce groupement Sphagno-Betuletum. En 1978, un travail effectué par MERIAUX, SCHUMACKER, TOMBAL et DE ZUTTERE apporte une contribution plus approfondie à l'étude de ces groupements. En plus de la dominance de Betula pubescens, cet ensemble est caractérisé par la présence et la constance de Sphagnum palustre (n° du relevé : 31). Le nom de Sphagno-palustris-Betuletum pubescentis est donc proposé pour cette association par ces auteurs. La figure 1 p.21 montre en effet que la strate arbustive



constituée essentiellement par Betula pubescens recouvre quasiment les Sphaignes qui forment un tapis presque continu. L'ensemble du groupement occupe environ 1000m<sup>2</sup>. Nous n'avons jamais trouvé d'anthéridies dans les endroits localisés sous les arbustes et a fortiori jamais d'archégonies ni de sporogones. En revanche, une surface d'environ 1,50m<sup>2</sup>, située au centre de la tourbière ne se trouve pas sous le couvert des arbustes. Nous avons observé, dans cette station, des anthéridies et des archégonies ; ce qui se traduit par la formation de sporogones. Seules les Sphaignes présentes en cet endroit (environ 4000 individus) seront étudiées.

## 2) Techniques utilisées pour l'étude de S. palustre

Le groupement ne rassemble qu'une espèce, S. palustre, qui est dioïque. Le sexe des individus sexués demeure difficile à distinguer sur le terrain. Un certain nombre d'individus femelles (porteurs de capsules) sont bagués dès l'apparition des sporogones, c'est-à-dire aux premiers jours de juillet. La bague, s'enfonçant au fur et à mesure de la croissance des Sphaignes, est attachée à un piquet à l'aide d'un fil coloré. Nous pouvons ainsi repérer et récolter facilement les pieds femelles tout au long de l'année après la disparition des sporogones.

Au milieu de septembre, l'extrémité des rameaux où se développent les anthéridies s'enrichit en caroténoïdes et devient orangée. Les individus mâles sont bagués à leur tour et les bagues attachées, elles-aussi, à un piquet par un fil de couleur différente de celle utilisée pour les pieds femelles. La teinte orangée disparaît en février. Grâce aux bagues nous pouvons reconnaître les pieds mâles fin août alors que les anthéridies sont à un stade très jeune, devant l'apparition des caroténoïdes. Le marquage des individus mâles ou femelles, autorise des prélèvements réguliers (période de 8 jours) dans le but d'une étude cytologique qui recouvre toute une année. Cette méthode originale nous a permis :

- de suivre la spermatogenèse et la gamétogenèse femelle en microscopie photonique et électronique dont les résultats seront donnés dans la troisième et la quatrième partie,
- de connaître la période à laquelle se développent les sporogones.

## B- DONNEES CLIMATIQUES

Parallèlement aux mesures effectuées par nous-même dans la tourbière, nous avons utilisé les relevés de températures et de précipitations enregistrés à la station météorologique de Lille-Lesquin.

### 1. Températures

Pour les températures minimales nous avons effectué des enregistrements, pour chaque mois pendant la période du 1/01/1981

au 1/01/1987, à 10 cm du sol, ce qui correspond à la hauteur des coussinets de S. palustre. Pour les températures maximales, seules ont été retenues celles des mois de juillet et d'août (période pendant laquelle se produit la sexualisation). Les températures sont relevées sous abri à 1,50 m au dessus du sol.

La tourbière étant éloignée de 28 km à vol d'oiseau de Lille-Lesquin, nous avons mesuré la température à 10cm au ras des Sphaignes, au cours de chaque prélèvement. Une différence inférieure à 1°C a été notée par rapport aux données climatologiques fournies par la station de Lille-Lesquin. En conséquence, nous admettons que les données relevées à la station de Lille-Lesquin sont valables pour le biotope étudié.

## 2. Précipitations

On sait que le facteur humidité est primordial pour la croissance des Bryophytes. La dessiccation supprime les phénomènes physiologiques essentiels, alors que la réhydratation provoque une reprise importante du métabolisme général. Les sphaignes sont particulièrement sensibles à ces facteurs. Leur développement exige une humidité atmosphérique relativement élevée.

A Saint-Amand S. palustre se développe dans un milieu où le niveau de la nappe phréatique affleure à peu près constamment. Ainsi la base des Sphaignes baigne dans l'eau, au moins pendant une bonne partie de l'année, mais la partie supérieure émerge. Une grande humidité règne donc constamment au niveau des Sphaignes.

L'action de la rosée, des brumes et du brouillard agit dans le même sens. Si l'humidité édaphique et sa constance présentent une grande importance pour la Sphaigne, les précipitations jouent également un grand rôle. En effet, les spermatozoïdes biflagellés chez les Bryophytes ont besoin d'un film d'eau, pour se déplacer et rechercher le col ouvert d'un archégone. Des pluies journalières, même peu abondantes, assurent ce film d'eau.

## 3. Luminosité

La plupart des tourbières à Sphaignes sont des formations héliophiles. Cependant, l'éclairement à la surface du tapis est variable en fonction de la saison et de l'importance de la végétation herbacée et arbustive de la station. Des mesures de luminosité ( $1850 \text{ ergs Cm}^{-2} \text{ Sec}^{-1}$ ) effectuées dans la sablière du Lièvre ont permis de déterminer la quantité de lumière nécessaire pour réaliser des cultures en phytotron. Le facteur lumière intervient certainement au moment de la sexualisation puisque les sphaignes situées sous le couvert des arbustes ne produisent jamais de gamètes ni de sporogones.

C.- OBSERVATIONS BIOLOGIQUES EFFECTUEES DANS LA NATURE ET  
ETABLISSEMENT DES CLIMATOGRAMMES

Les observations réalisées dans la tourbière sont les suivantes :

- Les premières anthéridies apparaissent dès la fin du mois d'août et les spermatozoïdes se différencient en 15 jours.

- Les premiers archégonés se développent à la mi-septembre. Nous observons donc une protandrie qui s'exprime par la formation des organes mâles précédant celle des organes femelles. Au cours d'une même année, se développent environ 40 % d'individus mâles et 8 % d'individus femelles dans la station ensoleillée. Nous constatons que le sexe ratio 1/1 est pratiquement atteint en ce qui concerne les mâles. En revanche, les 42 % d'individus femelles restant, demeurent génétiquement femelles. Il est remarquable que les anthéridies se forment en grande quantité alors que les pieds femelles sont en très petit nombre. Les conditions de différenciation des archégonés sont certainement très difficiles alors que les conditions de formation des anthéridies semblent plus faciles à réaliser.

- L'induction de la phase reproductrice mâle et de la phase reproductrice femelle se produit sous l'influence de la lumière et de la température en juillet et août. Les températures moyennes maximales mesurées à 1,50 m au dessus du sol sont de 22°C pour juillet et de 22,5°C pour août. En fait, la sexualisation nécessite surtout un éclairage énergétique assez élevé que l'on peut observer en juillet et en août.

- L'ouverture des anthéridies se fait progressivement. Dans la majorité des cas, la plupart des anthéridies (90%) s'ouvrent début mars et la totalité de ces dernières ont libéré leurs spermatozoïdes à la mi-mars. Mais l'ouverture des anthéridies peut débuter dès janvier si les conditions climatiques sont favorables ; en particulier s'il y a remontée des températures (exemple : en janvier 1983 et en janvier 1984, environ 10 % des anthéridies avaient éclaté). L'ouverture peut même s'effectuer en novembre de l'année qui précède le développement des capsules comme cela a été le cas pour le mois de novembre 1984 (45 % des anthéridies étaient ouvertes).

- L'embryon se développe début avril et reste enfermé environ 1 mois dans le ventre de l'archégone.

- Dès la troisième semaine de mai apparaissent les premières capsules vertes à pseudopode court. Ces capsules se trouvent encore au sein des feuilles périchétiales (bractées femelles).

- Le moment exact de la méiose n'a pu être déterminé.

- Les capsules mûrissent fin juin. Cette maturation se manifeste par un noircissement de la capsule et par l'allongement du pseudopode.

## FIGURE 2

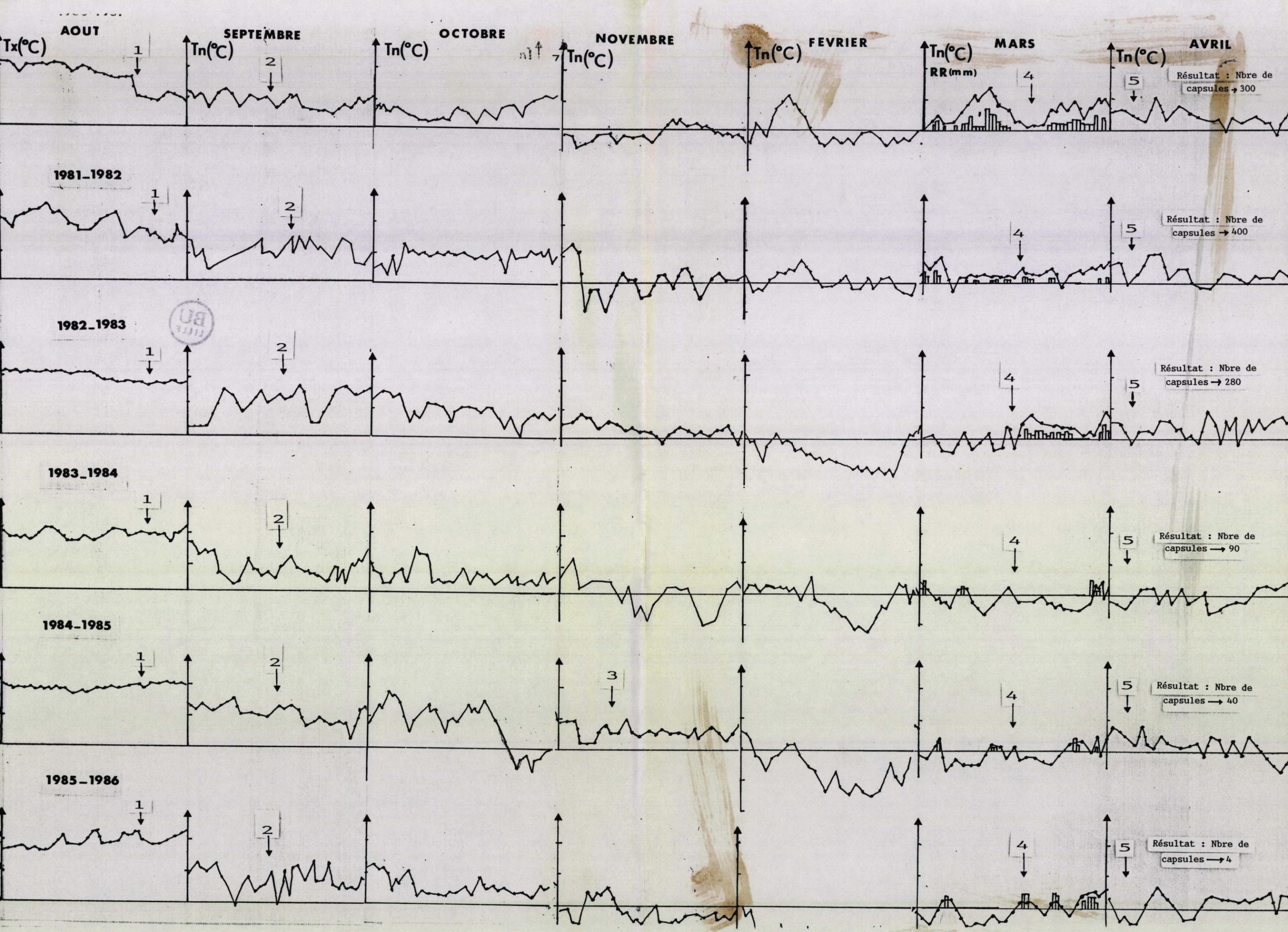
Légendes des climatogrammes

$T_x$  (°C) = TEMPÉRATURES MAXIMALES

$T_n$  (°C) = TEMPÉRATURES MINIMALES

RR (mm) = PRÉCIPITATIONS

- (1) APPARITION DES ANTHÉRIDIES
- (2) APPARITION DES ARCHÉGONES
- (3) DÉBUT D'OUVERTURE DES ANTHÉRIDIES
- (4) OUVERTURE TOTALE DES ANTHÉRIDIES
- (5) EMBRYOGENÈSE



- La dispersion des spores se fait essentiellement en août ; ainsi, début septembre, les capsules sont vides.

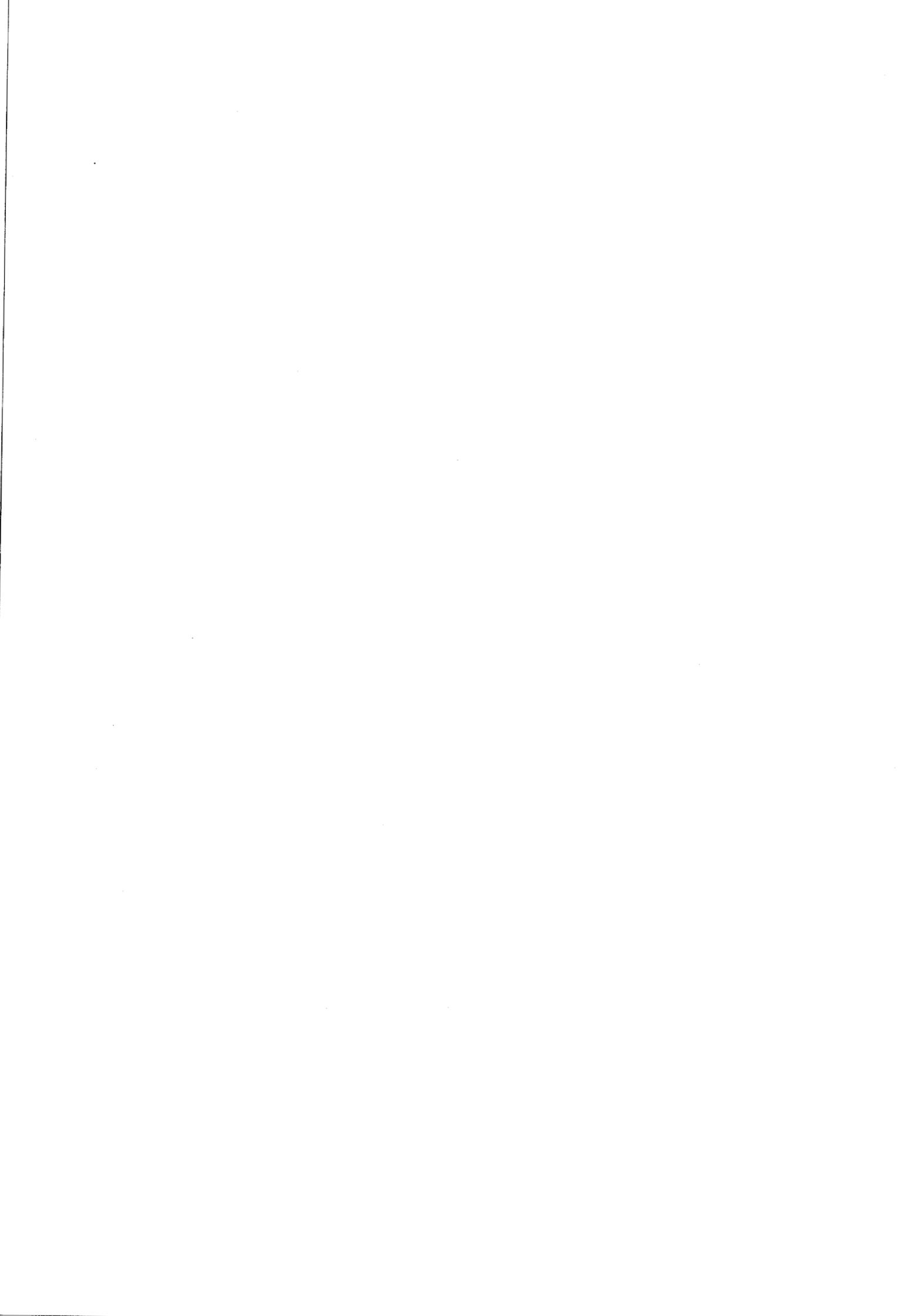
Les relevés climatiques (températures et précipitations) (fig.2, p.25 ) permettent de réaliser des climatogrammes. Les observations effectuées dans la tourbière sont notées sur les courbes de températures. Seuls sont retenus les mois les plus importants fixés en fonction des phénomènes biologiques qui se produisent pour chaque année couvrant la période de 1980 à 1987. Ainsi nous pouvons avoir une idée rapide et synthétique de ce qui se passe dans la tourbière pendant ces 7 années consécutives.

D.- ELABORATION DU CYCLE BIOLOGIQUE DE S.PALUSTRE REALISE DANS DES CONDITIONS DITES NORMALES.

Les observations effectuées dans la nature, reportées sur les climatogrammes, et les données cytologiques montrent les faits suivants :

- fin août apparaissent les organes mâles
- à la mi-septembre se développent les organes femelles
- l'ouverture des anthéridies se fait, pour une grande partie, début mars mais environ 10 % des anthéridies commencent à s'ouvrir dès le début de janvier si les températures sont positives
- le froid de fin janvier et de février stoppe l'ouverture des anthéridies
- les températures des mois de novembre sont en général négatives, mais un cas exceptionnel s'est produit en 1984. En effet, si on analyse les climatogrammes on constate que le mois de novembre 1984 a été relativement chaud (en moyenne 6°C) et qu'aucune gelée n'a été enregistrée. De plus, la quantité de pluie tombée pendant ce mois est assez élevée. 45 % des anthéridies étaient déjà ouvertes ce mois là. Ajoutons que cette observation a été découverte par hasard
- le mois de février est froid. Nous pensons que ce froid est nécessaire et que, suivi d'une certaine quantité de chaleur, la fécondation peut ainsi se réaliser au mois de mars. Des coupes effectuées tous les 3 jours, en mars, montrent en effet des images de fécondation. Des coupes, faites dans des apex femelles prélevés en février montrent que l'oosphère se forme dans le ventre de l'archégone à la fin février et mûrit rapidement.

Le cas exceptionnel observé au mois d'octobre 1984 confirme ces faits. Généralement, les mois d'octobre sont relativement chauds et en 1984 des températures négatives ont été enregistrées la dernière semaine d'octobre. L'ouverture de 45 % d'anthéridies



le mois suivant et l'observation sur des coupes cytologiques montrant un embryon à 3 cellules début décembre, indiquent que la fécondation a eu lieu en novembre (mois chaud cette année là). Cette fécondation s'est bien produite après un coup de froid.

Le cycle biologique de S. palustre a pu être ainsi établi à partir des données climatiques, des observations faites sur le terrain et de celles réalisées à l'aide de la microscopie. La figure 3, page 27, représente le cycle de S. palustre lorsque les conditions climatiques peuvent être considérées comme normales, c'est-à-dire, lorsque la fécondation des oosphères survient en mars.

### III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Le cycle biologique de Sphagnum palustre débute par la différenciation des gamétanges sur les pieds mâles à la fin d'août, puis des gamétanges femelles en septembre et se termine, en août de l'année suivante, par l'émission des spores.

Les observations biologiques associées aux études climatologiques ont permis de déterminer avec précision les dates d'apparition des phénomènes essentiels tels que la maturation des anthéridies et celle des archégonies, la fécondation, l'embryogenèse, la sporogenèse et l'émission des spores au cours du cycle biologique de cette Sphaigne. Seule l'étude de la méiose n'a pu être abordée. En effet, cet événement est probablement fugitif donc difficile à surprendre dans son déroulement. Nous supposons, cependant, que la réduction chromatique aboutissant aux produits de la méiose se situe à la fin de mai ou au début de juin.

Les différentes observations ont permis enfin de déterminer les conditions dans lesquelles la fécondation peut se réaliser. Cette dernière survient suivant les exigences suivantes :

- un mois d'octobre aux températures positives
- un mois de novembre froid (expliqué par le cas atypique)
- un mois de février très froid de l'année suivante
- un mois de mars de l'année suivante chaud et pluvieux : la première condition permet l'ouverture des anthéridies et du col de l'archégone ; la seconde autorise le déplacement des spermatozoïdes vers l'oosphère située dans le ventre de l'archégone.

Enfin, nous avons recherché au cours des mois d'août, septembre et octobre, la présence de protonémas et de jeunes gamétophytes feuillés au sein des touffes de Sphaignes adultes. Malheureusement, il nous a été impossible de trouver ces organes dans un milieu dense où les tiges se transforment en tourbe. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé transitoirement des cultures à partir d'ensemencements de spores.

S E C O N D E   P A R T I E

ETUDE STRUCTURALE DU  
GAMETOPHYTE FEUILLE

## CHAPITRE I

CULTURES A PARTIR DE SPORES : OBTENTION  
DE PROTONEMAS ET DE GAMETOPHYTES  
FEUILLES STERILES

## I.- HISTORIQUE

Certains auteurs ont réalisé des cultures de Sphaignes. L'utilisation du milieu gélosé de KNOOP permet la germination de spores de S. palustre ; BOLD (1948) a utilisé ce milieu pour l'étude de la formation du protonéma, de l'organogenèse du bourgeon gamétophytique et du développement du gamétophyte. L'année suivante, HUREL-PY (1949) publie une étude sur le bouturage de Sphaignes en milieu aseptique, en envisageant la germination de spores de S. fimbriatum, et le bouturage de fragments de cette même espèce sur milieu de KNOOP dilué de moitié. En 1959, COURTEJAIRE cultive S. inundatum sur le milieu de KNOOP dilué quatre fois et précise l'action de chaque mode sur la croissance du gamétophyte de cette espèce.

Des auteurs japonais (NOGUCHI, 1958 ; NEHIRA, 1963 ; NISHIDA et SAITO, 1961) cultivent des spores de plusieurs espèces de Sphagnum et décrivent la germination et la morphologie des protonémas issus de ces spores. En 1972, HINTIKKA étudie les variations morphologiques du gamétophyte de S. fallax en culture aseptique. Tous ces auteurs ont utilisé, pour leurs cultures, des milieux empiriques mis au point pour des végétaux supérieurs dont il font varier les concentrations ioniques. Aussi, en 1975, à partir d'analyses d'eaux de tourbières et d'eaux d'imprégnation de Sphaignes, GILLET a mis au point un milieu minéral synthétique permettant la culture de plusieurs espèces de Sphaignes dans des conditions optimales.

En 1977, RUDOLPH présente un bilan de son expérience de 15 ans de culture de Sphaignes. Il résume surtout des techniques et des résultats sur la chimie et la physiologie des pigments de la paroi cellulaire de S. magellanicum. A notre connaissance, depuis les résultats de RUDOLPH, aucun travail n'a été publié sur les cultures de Sphaignes. Il nous a semblé intéressant de réaliser des cultures et d'étudier, à l'aide de la microscopie photonique et électronique, la germination des spores, la formation du protonéma et le développement du gamétophyte de S. palustre.

## II.- RESULTATS

### A- ENSEMENCEMENT

Les cultures sont entreprises à partir de spores sur un milieu minéral nutritif mis au point par GILLET (1975). Après quelques minimes modifications (augmentation de la teneur en  $\text{CaSO}_4$ , en  $\text{Mg SO}_4$ , de la solution de  $\text{Fe Cl}_3$  et diminution de  $\text{NaCl}$ ) la composition du milieu est la suivante :

$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{NaCl}$	0,5 mg
$\text{KCL}$	20 mg
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	12 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6 mg
solution de $\text{Fe Cl}_3$	1 ml
solution de HELLER (1953)	1 ml
eau distillée	1 l

L'acide chlorhydrique (0,1 N) permet d'ajuster le pH de la solution minérale à 3,5, valeur identique à celle mesurée dans la tourbière. Ce milieu est gélifié à l'aide de  $12\text{g.l}^{-1}$  de Bacto-Agar, puis stérilisé pendant 20 minutes à  $1,59925\text{ Pa}$ . Après cette opération, le milieu est coulé en boîtes de Pétri stériles de 55 mm de diamètre. Le milieu solide est soumis aux U.V. pendant une nuit. Il est ainsi prêt à l'ensemencement des spores.

Les spores utilisées proviennent de sporogones prélevés dans la tourbière près de Saint-Amand-les-Eaux. Les capsules entières sont stérilisées par agitation pendant 5 minutes de la solution suivante :  $\text{HgCl}_2$  (1 g), Tween 80 (1 ml), eau distillée (100 ml). Le Tween 80, agent tensio-actif, permet le mouillage des sporogones, ce qui favorise l'action germicide du  $\text{HgCl}_2$ . Les sporogones sont alors rincés dans trois bains successifs d'eau distillée stérile, séchés, puis désoperculés aseptiquement. Les spores sont dispersées à la surface du milieu gélosé d'une boîte de Pétri. Les boîtes ensemencées sont placées en chambre de culture dans les conditions suivantes : température,  $20^\circ\text{C}$  ; photopériodisme, 14 h de lumière, 10 h d'obscurité ; intensité de l'éclairement au niveau des cultures :  $2000\text{ ergs Cm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  (tubes photoluminescents blanc brillant de luxe) ; humidité 90 %.

### 1. Morphologie d'une spore non germée

En microscopie photonique, lors d'observations vitales, la spore de couleur verte se présente sous l'aspect d'une cellule tétraédrique mesurant environ  $30\ \mu\text{m}$ . Les deux couches de la paroi, nommées exine et intine, se distinguent facilement. Un gros globule lipidique constitue le seul élément cytoplasmique bien visible (pl.II, fig.1).

En microscopie électronique à balayage, la spore, décrite par TONG et VITT (1986), a la forme d'une pyramide dont la face distale est convexe. Le sommet de la pyramide, ou pôle proximal, est tronqué et les trois faces latérales, adjacentes à la face convexe, sont réunies par une crête triradiaire en forme de Y (spore trilète) (pl.II, fig.2). Toute la surface de la spore est ornée d'aspérités.

### 2. Germination des spores

95 % des spores germent dans les conditions de notre culture. Ce pourcentage reste constant avec des spores âgées d'un ou deux ans.

Un gonflement précède la germination des spores qui débute entre le 6ème et le 11ème jour après l'ensemencement. L'exine se rompt au niveau de la crête triradiaire. Par cette ouverture, un tube germinatif s'allonge ; le 15ème jour il se compose de une à deux cellules (pl.II, fig.3). La cellule apicale subit alors une division longitudinale ; après 24 jours de culture, les deux cellules donnent une petite lame de 8-9 cellules (pl.II, fig.4).

Les multiples divisions cellulaires conduisent à la formation d'un protonéma lamellaire unistratifié. A partir des cellules proches de la spore, donc des cellules les plus âgées, naissent des rhizoïdes qui s'allongent du fait des divisions cellulaires transversales et, le plus souvent, obliques. Ces rhizoïdes s'enfoncent dans le substrat gélosé. Comme le protonéma poursuit sa croissance, de nouveaux rhizoïdes sont émis, apparemment au hasard, à partir des cellules marginales (pl.II, fig.5), (culture âgée de 45 jours). Des chloroplastes se différencient dans les rhizoïdes. Les cellules du protonéma sont polygonales et les chloroplastes sont nombreux. Après 2 mois de culture, le protonéma prend une forme polylobée (pl.III, fig.1). Il atteint bientôt quelques millimètres. Après 3 mois de culture, la plupart des protonémas présentent l'ébauche d'un gamétophyte feuillé (pl.III, fig.2). Cette ébauche se forme à la suite de la prolifération d'une cellule marginale et le massif cellulaire engendré évolue en un jeune gamétophyte feuillé (pl.III, fig.3). Dans un petit nombre de cas, 4 ébauches de gamétophytes se différencient par protonéma. A ce stade, les protonémas sont systématiquement repiqués sur des milieux de culture neufs. Des repiquages sont effectués jusqu'à ce que les gamétophytes atteignent 0,5cm de hauteur. A cette taille, ils sont transplantés aseptiquement dans des tubes de Borel stériles contenant des billes de verre et le milieu nutritif compacté par  $6 \text{ g.l}^{-1}$  de gélose (pl.IV, fig.1). Les sphaignes se développent normalement pendant 2 mois. Après ce délai, la croissance commence à ralentir. A 6 mois, les gamétophytes peuvent mesurer 8cm (pl.IV, fig.2). Puis à partir du 9ème mois la croissance ralentit nettement. Les gamétophytes deviennent alors jaunâtres, ce qui leur donne un aspect chlorosé. A ce stade, les gamétophytes feuillés, en fin de phase végétative, devraient être aptes à sexualiser. En fait, dans nos conditions expérimentales cette évolution ne s'est jamais réalisée.

## B.-STRUCTURE DES PROTONEMAS, RHIZOIDES ET GAMETOPHYTES FEUILLES

### 1. Le protonéma

#### a) Le protonéma âgé de 2 mois

Les parois limitant les cellules du protonéma possèdent une lamelle moyenne mince et peu dense aux électrons (pl. V, fig.1). Le plasmalemme réagit positivement au test de THIERY (1967) et se présente, en coupe, sous la forme d'une ligne sinueuse. Le noyau souvent excentré, possède une chromatine très dispersée. Le cytoplasme contient de grandes vacuoles. Les mitochondries, nombreuses et de petites tailles sont disséminées dans la cellule. Leurs crêtes bourgeonnent souvent en petites vésicules dispersées dans la matrice. A ce stade, l'appareil de Golgi est représenté par un nombre réduit de dictyosomes. Dans leur voisinage immédiat, coexistent des vésicules golgiennes réagissant positivement au test de THIERY (1967). De volumineux chloroplastes renferment des plastoglobules et quelques grains d'amidon.

### b) Le protonéma âgé de 4 mois

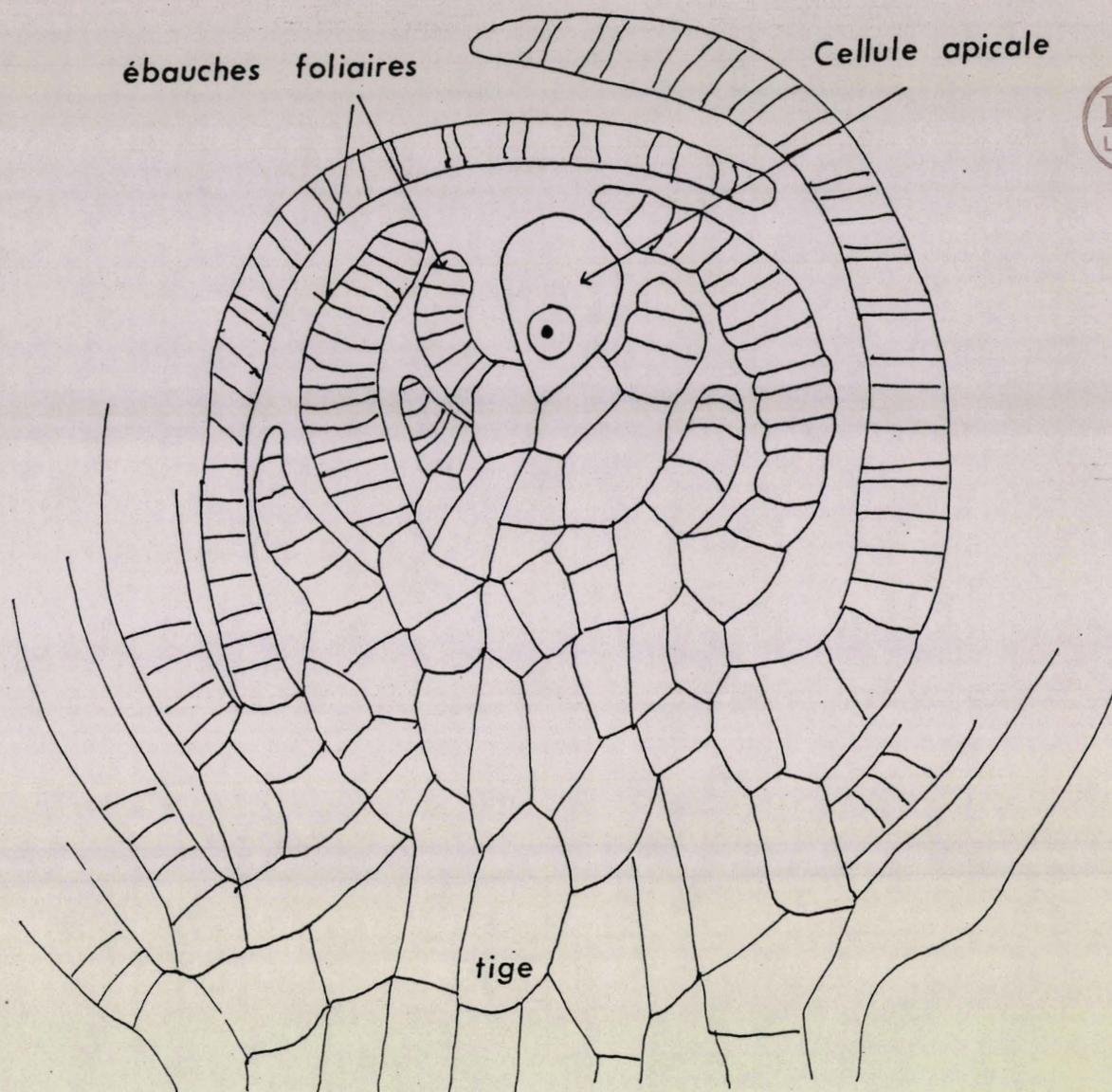
Les parois des cellules s'épaississent (pl.V, fig.2). Les dictyosomes et les vésicules golgiennes deviennent plus abondants que dans les cellules du protonéma de 2 mois. Dans les chloroplastes les thylakoïdes deviennent moins nombreux et les inclusions amylacées plus volumineuses. Le plasmalemme se décolle de la paroi. C'est à ce stade qu'un gamétophyte se développe à partir d'une cellule marginale du protonéma. Ce dernier disparaîtra peu après ; ce fait est confirmé, car nous observons déjà sur la figure 2, planche V un début de dégénérescence des cellules.

### 2. Les rhizoïdes

Les rhizoïdes développés sur les protonémas âgés de 2 mois mesurent environ 400  $\mu\text{m}$  de longueur et sont constitués de grandes cellules incolores mesurant chacune environ 60  $\mu\text{m}$  de longueur. Ces cellules contiennent quelques chloroplastes et sont séparées par des parois transversales obliques. Enfin, les rhizoïdes disparaissent lorsque le gamétophyte atteint 2 cm de hauteur. La figure 1, planche VI, montre la coupe longitudinale de 2 cellules de rhizoïdes en cours de dégénérescence. Deux plastes se reconnaissent encore, mais les autres éléments constitutifs du cytoplasme sont dégradés. A ce stade, un mucilage formé d'un réseau lâche, remplace et envahit progressivement la cellule. Ce fait est visible sur une cellule de protonéma coupée transversalement. Dans cette dernière, le cytoplasme ne figure plus que sous forme de plages à contours irréguliers (pl.VI, fig.2). La substance réticulée mucilagineuse répond très positivement au test de THIERY.

### 3. Le gamétophyte feuillé

Une coupe semi-fine longitudinale, d'un gamétophyte feuillé prélevé dans une culture âgée de 3 mois et demi, montre la présence d'une tige terminée par un apex principal et celle d'un apex latéral secondaire réduit (pl.VII, fig.1). Ces deux apex sont entourés par des primordiums foliaires. L'apex principal, comme l'apex secondaire, procède d'une cellule apicale incluse dans les tissus (schéma p. 35). En effet, la cellule apicale se divise activement et les cellules qui en dérivent donnent naissance aux tissus de la tige et à ceux des feuilles.



Les ébauches foliaires situées près de la cellule apicale sont constituées de cellules toutes semblables dans leur structure : elles forment un tissu homodictyé (pl.VII, fig.2). Peu après, les jeunes feuilles sont le siège d'une différenciation cellulaire en réseau original édifiant un tissu hétérodictyé, constitué par la juxtaposition régulière de chlorocystes et de hyalocystes. L'élaboration de ce réseau original préfigure ce qui est observé dans une feuille adulte qui possède les deux types de cellules (pl.VII, fig.3). Cette différenciation a été étudiée chez différentes espèces de Sphaignes (FABRE, 1974) et chez *S. magellanicum* par HOLCOMBE (1984). Les chlorocystes, en prismes rectangulaires allongés, sont vivants et contiennent de nombreux chloroplastes. Les hyalocystes, plus grands que les cellules précédentes, sont morts et vides de tout élément protoplasmique. Les parois des hyalocystes sont soutenues par des fibril-

les spirales et sont percées de nombreux pores (pl.VII, fig.3 et 4). Chaque hyalocyste forme une plage en S allongé. La formation des fibrilles au niveau des hyalocystes intervient à partir du cytoplasme en dégénérescence (FABRE, 1974). La genèse et la morphologie des pores, pendant la mise en place des fibrilles, ont été précisées en microscopie électronique à balayage (FABRE, 1973). Les cellules des jeunes ébauches foliaires, observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission, sont toutes identiques et possèdent des organites classiques. L'ultrastructure de ces cellules sera décrite plus en détail dans la partie suivante.

### III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Les cultures axéniques, réalisées à partir d'ensemencements de spores sur le milieu minéral synthétique décrit précédemment montrent qu'à 20°C et avec une période d'éclairement de 14h, nous avons pu obtenir, en 8 mois, des gamétophytes feuillés de 8cm de hauteur. Des fixations, effectuées à différents stades de développement de ces gamétophytes nous ont permis d'observer la structure des cellules du protonéma et des ébauches du gamétophyte feuillé. L'abondance de chloroplastes, devenus amylofères dans les cellules du protonéma âgé, indique que ces organites ont un rôle trophique dans le développement du futur gamétophyte.

L'absence de protonémas dans les tourbières, confirmée par CLYMO et DUCKETT (1986), nous empêche de conclure sur le rôle des rhizoïdes qui se développent sur les jeunes protonémas en culture. Nous pouvons seulement penser que ces organes fixent les protonémas sur le substrat gélosé. Des coupes dans le gamétophyte feuillé montrent que l'ontogenèse intervient par l'activité mitotique d'une initiale apicale totipotente. Les organes engendrés et en particulier les feuilles qui possèdent deux sortes de cellules déterminent, à l'intérieur de l'embranchement des Bryophytes, un type morphologique et un type biologique qui caractérisent toutes les Sphaignes. Cependant, il faut noter que les Leucobryales ont également des feuilles formées de deux sortes de cellules, mais ces dernières constituent un tissu moins élaboré que celui observé chez les Sphaignes.

La sexualisation n'a jamais pu être induite chez des Sphaignes en culture. En revanche, des expériences, menées dans le but de connaître le rôle de différents facteurs de l'environnement dans la croissance et la sexualisation de Marchantia polymorpha (Hépatique), ont été réalisées par COURTOY (1964). Cet auteur a pu définir les conditions de sexualisation de cette espèce. Il a surtout accordé une grande importance à la qualité de la lumière. Les thalles de M. polymorpha cultivés sous des lampes à incandescence de 300 watts forment des gamétangiophores, tandis que les plantes cultivées sous tubes Phytor, tubes rouges ou tubes bleus, restent stériles. La comparaison des différents spectres d'émission permet de conclure que les rayons de longueur

d'onde supérieur à  $7000 \text{ \AA}$  sont indispensables et agissent comme stimulateurs de l'induction.

Enfin, le protonéma des Sphaignes peut être comparé avec le prothalle des Filicinées (Ptéridophytes). En effet, chez ces dernières, comme chez les Sphaignes, la spore haploïde germe. Son protoplasme s'imbibe d'eau, se divise et fait éclater l'exospore. Par l'ouverture sort un filament formé de quelques cellules chlorophylliennes disposées bout à bout (prothalle filamenteux) et portant, ça et là, de fines cellules incolores allongées qui sont des rhizoïdes. La croissance du filament est assurée par la multiplication, dans une seule direction, de la cellule terminale. Bientôt les divisions cellulaires se font selon deux directions de l'espace et produisent à l'extrémité du filament une lame dont la face inférieure porte de nombreux rhizoïdes (prothalle lamellaire). Ce prothalle représente comme chez les Sphaignes le gamétophyte, dont la forme lamellaire à dimension modeste est toujours subordonné au sporophyte. Il est constitué aussi par un organe indépendant (par sa chlorophylle) et transitoire comme celui des Sphaignes. Là, s'arrête l'homologie entre protonéma et prothalle car lorsque ce dernier a achevé sa croissance les anthéridies et les archégonies apparaissent généralement sur la face inférieure.

## CHAPITRE II

COMPARAISON CYTOLOGIQUE DE L'APEX  
VEGETATIF ET DE L'APEX SEXUALISE  
DES SPHAIGNES PRELEVEES DANS  
LA TOURBIERE

Les gamétophytes feuillés obtenus en culture n'ayant pas un développement identique à celui observé dans la tourbière, nous les avons récoltés directement dans la station, et nous avons profité de l'occasion pour recueillir des individus femelles.

Afin de déterminer si les processus de sexualisation s'accompagnent de modifications ultrastructurales, des observations sont faites au niveau des cellules dérivées des apex latéraux et de celles des ébauches foliaires, d'une part chez des individus à l'état végétatif, d'autre part chez des individus femelles.

Des comparaisons sont effectuées chez deux espèces : S. flexuosum et S. palustre, afin de savoir si les phénomènes observés chez ces espèces appartenant à deux sections différentes, sont identiques.

## I. - OBSERVATIONS EFFECTUEES CHEZ S. FLEXUOSUM

Les résultats que nous résumons ici ont fait l'objet d'une publication (FABRE et ORCIVAL, 1982).

### A. - ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX VEGETATIF

L'étude concerne des cellules dérivées immédiatement de l'initiale apicale et des cellules d'ébauches foliaires. Chez ces individus à l'état végétatif, le noyau et ses constituants révèlent une ultrastructure habituelle (pl.VIII, fig.1). Les plastes évoluent du stade de proplaste (pl.VIII, fig.1) au stade de plaste qui se manifeste par la formation de granums bien structurés et l'accumulation d'amidon (pl.VIII, fig.2).

### B. - ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX SEXUALISE

#### 1. Les plastes

La sexualisation de l'apex s'accompagne d'une augmentation considérable du nombre des globules osmiophiles intraplastidaux que nous assimilons à des plastoglobules (pl.VIII, fig.3). L'abondance de ces derniers est telle qu'elle peut être utilisée comme critère de reconnaissance.

Nous pouvons en dénombrer jusqu'à une centaine par section de chloroplaste. Ces globules sont groupés en plages localisées dans le stroma. A une époque plus tardive, une autre différence permet de distinguer facilement les apex végétatifs des apex sexualisés. Dans les premiers, les plastes sont disposés selon une orientation privilégiée ; aussi les images obtenues sont-elles celles de plastes bien structurés, alors que, dans les seconds, des éléments globuleux perturbent l'ordonnance des granums à l'intérieur des plastes. Ces éléments correspondent à des vues tangentielles de thylakoïdes (pl.IX, fig.1). Dans ce cas, l'orientation des plastes n'apparaît plus fixée dans une direction privilégiée, comme celle qui prévaut dans les apex

végétatifs. On peut noter que ces changements dans l'orientation des plastes paraissent accompagner un ralentissement de la photosynthèse.

## 2. Les organites à deux zones concentriques (O.D.Z.C.)

La sexualisation s'accompagne de la différenciation d'organites à deux zones concentriques (O.D.Z.C). Ils ne se rencontrent que dans les cellules d'apex sexualisés et dans les cellules des feuilles périchétiales. Ces structures sont originales et, à notre connaissance, n'ont jamais été décrites.

### a) morphologie des O.D.Z.C.

Les O.D.Z.C. se localisent toujours à la périphérie de la cellule. Ils sont limités par une membrane et se caractérisent après contraste par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, par une zone centrale dense aux électrons entourée d'une zone périphérique moins dense aux électrons (pl.IX, fig.2). Les sections de ces organites sont circulaires ou ovales. Certains O.D.Z.C. s'accolent ; des continuités s'établissent au niveau de la substance centrale dense (pl.X, fig.3), ceci laisse supposer l'existence d'ensembles complexes formant des chapelets comprenant jusqu'à une vingtaine d'éléments.

### b) composition chimique des O.D.Z.C.

Divers tests ont été utilisés dans le but de préciser la composition chimique des O.D.Z.C.

- Après un traitement des coupes ultrafines par la pronase (0,1 % dans l'eau, pH 7,4, 1 heure à 40°C), la zone centrale des O.D.Z.C. perd son opacité aux électrons, ce qui témoigne d'une hydrolyse enzymatique efficace (pl.IX, fig.3). La figure 4, planche IX, illustre une coupe témoin ; la zone centrale garde sa densité aux électrons.

- Sur des coupes ultrafines, traitées par la lipase (0,2 %, tampon cacodylate de sodium, pH 7,4, 37°C), on constate au niveau de la zone centrale un début d'hydrolyse après 30 minutes d'action enzymatique (pl. X, fig.1). Si l'incubation se prolonge d'une heure, la zone centrale perd tout contraste aux électrons (pl.X, fig.2). Une coupe témoin indique que la zone centrale conserve son opacité aux électrons après 1h30 d'incubation.

- Un traitement des coupes ultrafines par la phospholipase D (0,2 %, tampon cacodylate de sodium, pH 5,6, 16 heures à 30°C) n'induit aucune modification dans l'opacité aux électrons de la zone dense des O.D.Z.C.. Les coupes témoin ne présentent, a fortiori, aucune altération de ces zones denses.

On note que les trois enzymes, précédemment utilisées, ne semblent avoir aucune action sur la zone périphérique des O.D.Z.C..

- Des coupes semi-fines sont colorées au noir Soudan B. Les O.D.Z.C. apparaissent, à la périphérie des cellules, sous forme de chapelet dont chaque unité globulaire se colore en noir intense.

- Le test de THIERY (1967) appliqué à des coupes ultrafines, est positif au niveau de la zone centrale des O.D.Z.C.. En revanche, la zone périphérique ne réagit que faiblement (pl.X, fig.3).

Le tableau 1 ci-dessous résume les résultats cytochimiques obtenus.

ZONES DES O.D.Z.C.	ENZYMES UTILISEES			TEST DE THIERY
	LIPASE	PRONASE	PHOSPHOLIPASE	
Zone centrale	positif	positif	négatif	positif
Zone périphérique	négatif	négatif	négatif	faiblement positif



Tableau 1 : Résultats des expériences de cytochimie mises en oeuvre pour préciser la composition chimique des O.D.Z.C.

## II.- OBSERVATIONS EFFECTUEES CHEZ S. PALUSTRE

Nous résumons dans cette partie des travaux précédemment publiés (FABRE, 1982).

### A.- ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX VEGETATIF

Le noyau et ses constituants présentent les ultrastructures classiques (pl.XI, fig.1). Les mitochondries possèdent des crêtes sous forme de "vésicules ampoulées" semblables à celles décrites par VIVIER (1966) chez des Protistes. Les dictyosomes sont peu nombreux et émettent des vésicules golgiennes dont le contenu est marqué par le test de THIERY (1967) (pl.XI, fig.1). Les proplastides évoluent en plastides pourvus de granums et d'inclusions amylières. Les plastoglobules sont rares.

## B.- ULTRASTRUCTURE DES CELLULES D'APEX SEXUALISE

### 1. Les plastes

L'abondance de plastoglobules dans les plastes permet de distinguer immédiatement un apex sexualisé d'un apex végétatif (pl.XI, fig.2).

Une autre modification importante caractérise la sexualisation des apex ; elle concerne les systèmes membranaires. En effet, à une certaine période dans l'année, l'ultrastructure des plastes est habituelle : thylakoïdes abondants et granums typiques. Puis, plus tard, dans les plastes âgés, les thylakoïdes, encore abondants, présentent de nombreux éléments globuleux denses aux électrons (pl.XI, fig.2 et 3).

### 2. Les organites à deux zones concentriques (O.D.Z.C.)

Des organites à deux zones concentriques ont déjà été décrits dans le cytoplasme des cellules d'apex sexualisés de S. flexuosum. Les O.D.Z.C. des deux espèces possèdent une ultrastructure semblable, sinon identique (pl.XI, fig.3). Les diverses actions cytochimiques, digestion par la pronase ou la lipase donnent des résultats semblables à ceux obtenus au niveau des O.D.Z.C. de S. flexuosum : zone centrale éclaircie, zone périphérique non modifiée. Un traitement, par la phospholipase D, montre que les deux zones des O.D.Z.C. restent intactes comme celles des O.D.Z.C. de S. flexuosum.

Les deux zones des O.D.Z.C. de S. palustre réagissent au test de THIERY (1967) selon le même mode que celui décrit pour S. flexuosum : zone centrale et zone périphérique respectivement très et peu positive.

## III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude des apex sexualisés de S. flexuosum et de ceux de S. palustre a permis de mettre en évidence des caractères spécifiques de la différenciation des organes reproducteurs des Sphaignes. Nous pouvons citer :

- la formation de nombreux plastoglobules au sein des plastes qui perdent leur orientation privilégiée ;

- l'apparition, à la périphérie du cytoplasme, de chapelets d'organites limités par une membrane et constitués de deux zones concentriques (les O.D.Z.C.). L'hydrolyse de la zone centrale par la lipase et la pronase indique que cette zone est une association de lipides et de protéines. Les résultats de la technique mettant en oeuvre le noir Soudan B sur des coupes semi-fines attestent, aussi, la nature lipidique d'une partie de la zone centrale des O.D.Z.C.. La phospholipase D n'induit aucune modification au niveau des deux zones. La réaction négative

montre que les phospholipides sont peu ou pas représentés au niveau des O.D.Z.C.. Le test de THIERY appliqué sur des ultracoupes révèle que la zone centrale réagit positivement ; ce qui ne pose pas de problème particulier puisque des composés divers qui ne renferment pas d'oses et d'osides réagissent positivement au test de THIERY. Il s'agit de lipides et de condensation protéique (ROLAND, 1974) . En revanche, on peut penser que la zone périphérique, même si elle ne répond que peu positivement au test de THIERY, est de nature glucidique. La zone centrale des O.D.Z.C. contient donc des lipoprotéines et la zone périphérique comprend des glucides.

La présence des O.D.Z.C. dans les cellules dérivées de l'apex et dans les cellules des ébauches foliaires est spécifique de l'état sexué des individus. Nous avons observé également des O.D.Z.C. chez Sphagnum magellanicum. En conséquence, nous proposons d'admettre que ces structures originales sont des organites caractéristiques du genre Sphagnum. La genèse de ces organites est envisagée dans l'étude des cellules de l'archégone.

## CHAPITRE III

ETUDE DE L'APPAREIL SECRETEUR MUCIGENE  
DE S. PALUSTRE

L'observation de coupes longitudinales effectuées dans des apex végétatifs montre la présence de poils sécréteurs bicellulaires situés à l'aisselle des ébauches foliaires. En revanche, des coupes réalisées dans des apex femelles, ne révèlent pas l'existence de poils mucigènes ; mais l'observation de ces coupes indique que les cellules de certaines ébauches foliaires dégèrent et se transforment en mucilage.

## I. - HISTORIQUE

La découverte des poils mucigènes a été attribuée à SCHIMPER (1848). Cet auteur donne des dessins précis de ces poils accompagnant une anthéridie de Polytrichum juniperinum, mais il les appelle "paraphyses". En fait, c'est HEDWIG (1792) qui fut le premier à les figurer. Il représente une anthéridie d'Hypnum viticulosum à côté d'un filament où la morphologie permet de reconnaître aujourd'hui un poil. THURET (1851), au cours de ses recherches chez Polytrichum commune remarque la présence de ces formations stériles à côté des anthéridies.

Toutefois, HEDWIG, SCHIMPER et THURET ont seulement noté la présence de poils spéciaux au voisinage de l'apex fertile mâle. GUMBEL (1854), les découvre chez Amblyodon dealbatus au niveau d'un apex végétatif, à l'aisselle d'une feuille. Plus tard, ces organes seront observés chez la plupart des Mousses. LEITGEB (1869), les trouve chez les Sphagnales. CAMPBELL (1905), les décrit chez Sphagnum palustre. Il découvre à l'aisselle des feuilles raméales des poils bicellulaires qu'il appelle "poils glandulaires". BONNOT (1966), les figure et les photographie chez Thuidium tamariscinum. En 1968 il fait une étude morphogénétique et cytologique importante de ces poils chez différents genres de Bryales. Il montre qu'un poil mucigène est formé d'une cellule basale, courte, évasée vers le haut (BONNOT l'appelle "cellule de séparation ou cellule séparatrice") prolongée par une à vingt cellules à mucilage, rectangulaires, allongées remplies d'un contenu dense hétérogène.

L'origine des poils mucigènes est donnée dans un travail complet concernant l'apex du gamétophyte feuillé des Mousses (BERTHIER, 1971-1972). Cet auteur considère l'émission des poils mucigènes comme un phénomène appartenant à l'organisation primaire de l'apex dans la mesure où elle a lieu dans le jeune segment en croissance au moment même où s'organise le méristème gemmaire. Pour souligner que le système mucigène et sa feuille axillante sont de même origine histogénétique, BERTHIER le désigne comme "homoaxillaire" de cette feuille ; au contraire il désigne le bourgeon latéral comme "hétéroaxillaire".

Une étude cytochimique réalisée par BONNOT et HEBANT (1970) montre la nature polyholosidique de la sécrétion mucigène, au niveau des poils de Polytrichum juniperinum, qui répondent très positivement au test de THIERY. Les différentes méthodes de caractérisation ont démontré des activités liées à diverses

phosphatases et des activités enzymatiques "respiratoires" (HEBANT et BONNOT, 1974) chez plusieurs Polytrichaceae. Une étude similaire est menée par VERDUS et BONNOT (1982) chez Campylopus introflexus et aboutissent aux mêmes résultats que pour les espèces précédentes. Ces poils constituent l'appareil sécréteur du mucilage protecteur de l'apex (BERTHIER, BONNOT, FABRE et HEBANT, 1974). Enfin en 1983, LIGRONE fournit une étude ultrastructurale de la sécrétion au niveau des poils mucigènes chez Timmiella barbuloïdes.

## II.- RESULTATS

### A. ETUDE MORPHOLOGIQUE

La figure 1 pl. XII, représentant une coupe longitudinale d'apex, montre des poils mucigènes unisériés à l'aisselle des feuilles. Ils mesurent de 25 à 35  $\mu\text{m}$  et leur nombre varie de 1 à 3 par feuille. Ils sont constitués de deux cellules. La cellule basale est longue, rectangulaire (pl.XII, fig.2) et présente une paroi d'un type particulier. Cette cellule correspond à ce que BONNOT appelle chez les Mousses "cellule séparatrice". C'est au niveau de cette paroi que se fait la rupture entraînant la chute du poil mucigène après la phase fonctionnelle de ce dernier. Cette cellule basale se prolonge par une autre cellule, (pl.XII, fig.2), en forme de massue qui se remplit d'un contenu dense aux électrons : le mucilage (pl.XII, fig.1 et 3). Celle-ci est la cellule mucigène ou cellule sécrétrice. Toujours ovoïde, elle se termine par un pore (pl.XII, fig.1,2 et 3). Le mucilage est exsudé, pour une grande partie, par ce pore apical, les champignons ayant pénétré par ce pore apical (pl.XVI, fig.3) ; il n'est pas rare d'observer de nombreuses hyphes mycéliennes dans la cellule mucigène. Une coupe pratiquée dans un apex, au niveau d'une feuille après disparition du scalp de sa partie médiane, permet d'observer le niveau d'insertion des poils mucigènes (pl.XII, fig.4). Ces derniers sont axillaires aux feuilles et proviennent du fonctionnement particulier du territoire basiscope du soubassement foliaire.

### B.- ETUDE CYTOLOGIQUE

Une étude en microscopie électronique nous a aidés à identifier les différents constituants cellulaires des poils mucigènes. Elle nous a permis aussi de suivre leur différenciation en relation avec leur spécialisation fonctionnelle. Nous sommes parvenus à saisir et à identifier les stades successifs de cette évolution : état méristématique ou peu différencié, spécialisation cytologique, phase fonctionnelle.

#### 1. Etat méristématique

Les figures 1, 2 et 3, pl. XIII illustrent l'ultrastructure des poils mucigènes jeunes, situés à faible distance de l'apicale initiale caulinaire du gamétophyte feuillé. Une telle

ultrastructure n'est guère différente de cellules d'éléments cellulaires appartenant au méristème caulinaire latéro-apical. La forme de la section des cellules du poil mucigène permet cependant de reconnaître aisément leur appartenance au tissu mucigène (pl.XIII, fig.1).

La paroi d'un poil mucigène est stratifiée (pl.XV, fig.1). On peut distinguer :

- une couche interne cellulosique, représentant la paroi proprement dite où les forts grossissements indiquent une structure microfibrillaire ;

- une couche externe cuticulaire dont l'osmiophilie est en relation vraisemblable avec sa nature lipidique. En outre, il existe une stratification propre à la cuticule, celle-ci comprenant un feuillet externe mince et un interne plus épais, irrégulier.

Le cytoplasme de la cellule mucigène est relativement compact. La densité des ribosomes y est importante (pl.XIII, fig.2) et ces corpuscules se voient souvent réunis en polyribosomes. Les mitochondries sont généralement globuleuses, présentant des crêtes internes ampoulées et ressemblent tout à fait aux mitochondries observées dans les cellules des ébauches foliaires. Des fragments de réticulum endoplasmique lisse sont discernables dans le cytoplasme, localisés souvent au voisinage du noyau et des mitochondries. Les vacuoles, petites, ont un contenu présentant un aspect finement réticulé.

L'appareil de Golgi est présent sous forme de quelques dictyosomes, émettant, par la marge de leurs saccules golgiens, d'innombrables petites vésicules. Les globules lipidiques, denses aux électrons, sont nombreux et disséminés dans tout le cytoplasme. Les plastes présentent une structure interne faiblement différenciée (pl.XIII, fig.3). En effet, les saccules intraplastidaux sont simplifiés, généralement allongés parallèlement au grand axe du plaste, souvent isolés, parfois ramifiés. Des petites vésicules sont présentes dans le stroma.

La paroi séparant la cellule mucigène et la cellule basale est pourvue de plasmodesmes. La cellule basale (ou séparatrice) est allongée (pl.XIV, fig.1). Le noyau est relativement gros, possédant un nucléoplasme homogène. Le cytoplasme renferme plusieurs vacuoles contenant un matériel d'aspect fibrillaire. Aucun dictyosome n'est visible dans le cytoplasme de la cellule basale. Les plastes sont plus volumineux que les plastes observés dans la cellule mucigène. Les thylakoïdes sont mieux représentés et quelques petits plastoglobules denses aux électrons sont dispersés dans le stroma.

La paroi cellulaire est libre, c'est-à-dire directement au contact du milieu extérieur, exactement comme la paroi de la cellule mucigène. Comme elle, cette paroi ne montre jamais de plasmodesmes.

## 2. Phase de spécialisation = différenciation

### a) les dictyosomes

La première manifestation morphologique de la différenciation de la cellule mucigène est le développement considérable de l'appareil de Golgi. Au début de la différenciation de la cellule, les dictyosomes présentent la structure normale des corps de Golgi : empilement d'environ 7 saccules golgiens (pl.XIV, fig.2). Au niveau de la partie concave se trouve la face de formation des saccules ; à la marge des saccules, on distingue une émission de nombreuses vésicules golgiennes ; enfin, à l'opposé de la face de formation, dans la partie convexe, existe la face de maturation où les saccules se résolvent complètement en éléments vésiculaires. A la fin de la phase de différenciation, les dictyosomes sont souvent plus complexes. Ils comportent un nombre approximativement double de saccules et acquièrent de manière concomitante une symétrie bilatérale double. Sur la figure 3, pl.XIV, les dictyosomes 1, 2 et 3 représentent de tels organites où cet aspect est bien visible. Tout se passe comme s'il existait, au niveau médian de l'empilement des saccules, une nouvelle face formatrice. Par l'examen de plusieurs de ces figures, on peut interpréter ces vues comme une duplication de corpuscules golgiens ; c'est grâce à ce phénomène que la cellule mucigène acquiert son exceptionnelle richesse en éléments golgiens.

Différents organites issus de l'évolution morphologique des dictyosomes participent à la constitution figurée du cytoplasme. On reconnaît, sur les différentes micrographies électroniques :

- des vésicules "no coated" prenant naissance par bourgeonnement à la marge de disques golgiens;
- des "coated vesicles" dont la taille est bien inférieure à celle des éléments précédents. Elles sont sphériques, avec un contenu dense aux électrons. La partie externe porte une sorte de feutrage rayonnant dont les éléments paraissent parfois terminés par un minuscule granule.

### b) Les plastes

Au cours de la différenciation de la cellule mucigène les plastes s'allongent parallèlement à l'axe du poil (pl.XIV, fig.4). Au point de vue ultrastructurale, ces plastes comportent les mêmes éléments fondamentaux que les chloroplastes observés au stade précédent, mais avec des modifications qualitatives et quantitatives considérables. Le feuillet interne émet des invaginations en direction de l'intérieur du plaste. Ce fait correspond probablement à la formation de l'un des rares thylakoïdes du plaste. Par suite, de leur réduction, de leur nombre faible et de leur caractère isolé, les thylakoïdes de ces plastes n'édifient pas de véritables granums. Le stroma est dense aux électrons et contient de nombreux petits grains d'amidon peu osmiophiles.

### 3. Phase fonctionnelle

C'est la phase d'élaboration et de sécrétion du mucilage. Les organites commencent à dégénérer à l'intérieur du poil mucigène. Au niveau de la zone apicale, le plasmalemma se décolle de la paroi. Le mucilage sécrété se dépose dans le périplasme, passe à travers la paroi et s'accumule sous la cuticule (pl.XV, fig.1). La cuticule commence à se soulever dans la zone apicale, correspondant sans doute à la région où se situe le pore. Puis les organites ne sont presque plus reconnaissables. On peut discerner encore de gros globules lipidiques et une vacuole centrale contenant quelques lamelles (pl.XV, fig.2). Le mucilage est surtout libéré par le pore apical. Mais il peut aussi se répandre par d'autres endroits de la cellule (pl.XV, fig.2). Cela rappelle de façon frappante le phénomène cytologique décrit par MARTENS sur des étamines (1931) et des pétales (1933) de Tradescantia, sous le nom de "dépouillement cuticulaire spontané".

#### C) ETUDE CYTOCHIMIQUE

L'étude cytochimique constitue une approche de la connaissance chimique du produit sécrété, ainsi que des conditions biochimiques du phénomène sécrétoire.

##### 1 ) Nature chimique du mucilage

Un certain nombre de colorations électives permettent d'observer la substance sécrétée par les cellules mucigènes. Grâce à des tests biochimiques simples, on peut en préciser la nature.

- le bleu de toluidine, colorant la cellule mucigène en rouge violet, montre que le mucilage est en grande partie de nature polysaccharidique ;
- le test de THIERY (1967) confirme la nature polyholosidique du mucilage. En effet, la sécrétion mucigène des Sphagnales répond très positivement à ce test (pl.XV, fig.1) ;
- le rouge de ruthénium colore en rose le mucilage exsudé par la cellule mucigène, indiquant la nature au moins partiellement pectique de ce matériel ;
- l'insolubilité dans l'eau indique que la pectine n'est pas le constituant pectique principal ;
- le mucilage est insoluble dans la potasse diluée froide et la potasse diluée chaude provoque un gonflement, non une dissolution: les acides pectiques ne représentent donc pas le constituant majeur ;
- les acides à froid (HCl ou H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>), avant ou après l'action du KOH, ne dissolvent pas le mucilage qui n'est pas un pectate de Ca;

- ces mêmes acides à chaud dissolvent les cellules mucigènes et le mucilage qui est donc composé de pectine et éventuellement d'hémicelluloses ;

- le bleu Alcian, colorant le mucilage en bleu indique plus précisément que les polysaccharidiques sont acides.

Ainsi, le mucilage émis par la cellule mucigène du poil est constitué de polysaccharides acides.

## 2 ) Activités sécrétoire et enzymatique

En corrélation avec l'évolution figurée de leur ultrastructure, les cellules sécrétrices sont le siège d'une activité métabolique intense, de plus en plus spécialisée vers la fonction sécrétoire.

L'activité métabolique, est décelée, en microscopie photonique, grâce à la mise en évidence de la phosphatase acide par la technique de BURSTONE. Les jeunes poils, situés près de l'apex, montrent une cellule basale à paroi brune nettement distincte. Son contenu cytoplasmique est dépourvu d'activité phosphatasique acide. Celui des cellules mucigènes, en début de sécrétion, est vivement coloré en rouge par le produit de réaction. Les poils au maximum de leur sécrétion (pl.XVI, fig. 1) ont une activité phosphatasique encore plus intense que précédemment. Leur cytoplasme est très coloré. La cellule mucigène réagit en bloc et on ne reconnaît plus aucune structure cellulaire. La paroi, très épaisse, ne montre aucun marquage. Il n'y a pas d'activité phosphatasique non plus au niveau de la cellule séparatrice. Pour être bien sûr que l'enzyme est impliquée, il est nécessaire de procéder à un contrôle par usage d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme. Nous avons employé le fluorure de sodium 0,01 M. Dans ce cas, aucune formation de l'azoïque rouge ne se produit dans la cellule mucigène. Toutefois, quelques rares précipités peuvent s'y manifester (pl.XVI, fig. 2).

La mise en évidence de la phosphatase acide est également décelée par la méthode de GOMORI. Dans la cellule mucigène d'un poil jeune, cette méthode montre des précipités de plomb très abondants qui suggèrent une activité enzymatique importante. Puis lorsque le poil est plus âgé et a atteint sa phase de différenciation, l'intérieur de la cellule mucigène est entièrement coloré en marron foncé (pl.XVI, fig.3). En revanche, la cellule séparatrice et la paroi pectocellulosique de la cellule mucigène ne sont pas colorées.

L'activité respiratoire des poils mucigènes est visualisée par la détection de la cytochrome-oxydase et par celle de la succino-déshydrogénase. Pour la détection de la cytochrome-oxydase, le marquage est léger lorsqu'il s'agit de jeunes poils (pl.XVI, fig.4) alors que des poils âgés réagissent très positivement. L'ensemble du cytoplasme est alors fortement coloré en bleu (pl.XVII, fig.1). Quant à la détection de la

succino-déshydrogénase, la figure 2, planche XVII, montre la réaction positive au niveau des 2 cellules. En revanche, les cellules sénescents ne réagissent pas aux différents tests.

### III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

#### A.- LES VARIATIONS MORPHOLOGIQUES, VALEUR SYSTEMATIQUE

La dissection de l'apex de nombreuses espèces de Bryophytes, effectuée par différents auteurs, permet d'isoler les poils mucigènes. Des coupes longitudinales les montrent in situ localisés à l'aisselle des ébauches foliaires et des feuilles. Leur comparaison fait apparaître une grande diversité morphologique. Cette dernière est en rapport avec des différences se trouvant à la base des grandes coupures systématiques des Bryophytes. Aussi BONNOT (1968) a pu dégager de l'étude descriptive des poils mucigènes des Bryales un certain nombre de conclusions générales qui nous paraissent correspondre à des tendances évolutives à l'intérieur de ce groupe. Elles viennent s'ajouter aux ensembles de caractères morphologiques dont (BONNOT, 1968) admet qu'ils représentent des paliers successifs dans le développement phylogénétique du rameau des Bryales (tissu foliaire eurydictyé primitif par rapport au tissu sténodictyé ; même chose pour le tissu hétérodictyé ; péristomes simples primitifs par rapport aux péristomes doubles ; cléiostocarpie des Phascum et Bruchia dérivée de la stégocarpie des Funaria et Trematodon. En ce qui concerne le tissu mucigène nous pensons que:

- "le caractère multicellulaire des poils est primitif par rapport au caractère paucicellulaire". Ainsi les poils des Mousses à péristomes nématodontes et en particulier ceux des Polytrichales sont très longs, comportant souvent vingt cellules et au-delà, alors que ceux des Hypnales sont très courts, paucicellulaire, chez Thuidium tamariscinum BONNOT (1968) observe souvent trois cellules ; chez Philonotis fontana deux cellules. Chez S. palustre, comme chez S. centrale et S. magellanicum (FABRE, 1974), on a toujours compté deux cellules. Deux caractères évolutifs, l'état paucicellulaire au niveau des poils et la présence du tissu foliaire hétérodictyé, renforcent le point de vue selon lequel les Sphaignes constituent un groupe relativement récent.

- "un volume élevé" de poils mucigènes à l'aisselle des feuilles est primitif par rapport à un nombre faible". Là encore, il y a évolution par réduction. Une photographie réalisée par BONNOT (1968) montre bien, sur une coupe transversale d'apex de Polytrichum formosum, le nombre élevé de poils (jusqu'à vingt et plus) à l'aisselle de chaque feuille juvénile. Chez les Hypnales, au contraire, on n'observe souvent que trois ou quatre poils mucigènes à l'aisselle de chaque feuille. Les Sphaignes, qui possèdent deux à trois poils mucigènes à l'aisselle des feuilles,

se placent également comme les Hypnales dans les groupes les plus évolués. Là aussi il y a eu évolution par réduction ;

- "dans un groupe à poils mucigènes multicellulaires (Mousses à péristomes nématotondes notamment et en particulier les Polytrichales), le caractère ramifié semble primitif par rapport au caractère unisériel". Chez les Sphaignes on observe toujours des poils mucigènes non ramifiés ;

- "la différenciation d'une partie basale séparatrice est un caractère évolué". Chez Thuidium tamariscinum, il existe un type cellulaire particulier : "la cellule séparatrice" (BONNOT, 1968). Il peut y avoir plusieurs (deux ou trois) cellules séparatrices à la base du poil (chez Mnium hornum). Chez les Polytrichum et les Pogonatum, qui appartiennent au phylum ancien des Mousses à péristomes nématodontes, il n'y a pas de cellule séparatrice. Chez Shagnum palustre, S. centrale et S. magellanicum, il existe comme chez les Hypnales, une cellule séparatrice qui entraîne et explique la caducité du poil après sa phase fonctionnelle. La différenciation d'une partie basale séparatrice semble être un caractère évolué. Sur ce point, on peut également considérer les Sphaignes comme appartenant à un groupe évolué.

#### B.- ETUDE CYTOLOGIQUE

L'étude ultrastructurale de l'appareil sécréteur a été effectuée chez plusieurs espèces de Bryophytes (BONNOT, 1968, 1969 ; BONNOT et HEBANT, 1970 ; HEBANT et BONNOT, 1974 ; BERTHIER et al., 1974 ; VERDUS, 1978 ; VERDUS et BONNOT, 1982 et LIGRONE, 1983). Elle y montre une grande constance d'organisation notamment une activité golgienne intense démontrée par le très grand nombre de dictyosomes présents dans les cellules sécrétrices. Il en est de même chez S. palustre. En effet, les dictyosomes prennent un développement considérable, au stade de différenciation du poil, intervenant dans la sécrétion mucilagineuse. Des nombreuses études réalisées chez d'autres groupes végétaux et chez les animaux, montrent que, d'une manière générale, les dictyosomes sont particulièrement abondants dans les cellules sécrétrices et qu'ils participent à la formation de mucilage.

#### C.- ETUDE CYTOCHIMIQUE

Le test de THIERY révèle la nature polyholosidique du mucilage sécrété par la cellule mucigène du poil chez S. palustre. D'autres tests biochimiques montrent que le mucilage est constitué d'un mélange de pectine et d'hémicelluloses. Il présente ainsi la même composition que celui émis par les cellules mucigènes des poils des autres Mousses (BONNOT, 1968) et que celui élaboré par les cellules de l'anneau sporangial de Pottia truncata (WAREHAM et WHITNEY, 1939).

L'application d'autres méthodes démontre des activités liées à des phosphatases acides et des activités enzymatiques

respiratoires. Des résultats identiques étaient déjà observés au niveau des cellules mucigènes des poils chez les Bryales (BERTHIER et al., 1974 ; VERDUS et BONNOT, 1982).

Il n'y a pas de divisions cellulaires : le poil mucigène est un organe fini. Donc il n'y a pratiquement plus de synthèse de cellulose. La quantité totale d'oses solubles provenant de l'hydrolyse de l'amidon est utilisée au niveau des corps de Golgi et fournit les précurseurs des substances pectiques et des hémicelluloses qui sont précisément les constituants majeurs du mucilage.

Ce mucilage, par ses propriétés d'imbibition, joue un rôle biologique important dans la protection de l'apex du gamétophyte feuillé et des jeunes organes qui y sont formés.

T R O I S I E M E      P A R T I E

LES ORGANES MALES. L'ANTHERIDIE  
ET L'EVOLUTION DU TISSU  
SPERMATOGENE DE  
S. PALUSTRE

## I. - HISTORIQUE

De nombreux auteurs ont suivi les étapes de la spermatogenèse chez les Bryophytes à l'aide de la microscopie photonique (HEDWIG, 1782 ; SCHIMPER, 1848 ; LEITGEB, 1869 ; GUIGNARD, 1889 ; IKENO, 1903 ; SCHAFFNER, 1908 ; WILSON, 1911 ; ALLEN, 1912 ; WOODBURN, 1913, 1915 ; MELIN, 1915 ; CHALAUD, 1930, 1931 ; MUHLENDORF, 1930). Presque oubliées pendant une vingtaine d'années, les Bryophytes font l'objet, vers 1950, de nouvelles investigations qui permettent de connaître l'ultrastructure du spermatozoïde. SATO (1951) étudie le gamète mâle de Marchantia polymorpha, puis en 1954 celui de Conocephalum conicum. Il met en évidence un "filamentous appendage" que prolonge le blépharoplaste. A la même époque, EYME et CAPOT (1954) observent des spermatozoïdes de Sphagnum cymbifolium (= S. palustre actuellement) et s'intéressent en particulier à l'insertion des flagelles sur le corps apical. MANTON (1957) s'attache surtout à décrire un système de microtubules, la "fibrous band" dans les spermatozoïdes de Sphagnum sp. En 1980, CAROTHERS et DUCKETT, reprenant les travaux effectués jusqu'à cette date, révèlent les tendances évolutives du développement des spermatozoïdes en comparant des espèces d'Hépatiques, d'Anthocérotes et de Mousses y compris les Sphaignes.

Parallèlement à l'étude du spermatozoïde, des auteurs publient les différentes étapes en ultrastructure, au cours du développement ontogénique, du tissu spermatogène jusqu'au spermatozoïde mûr chez trois espèces [Marchantia polymorpha (KREITNER, 1967) ; Pellia epiphylla (SUIRE, 1970) et Phaeoceros laevis (MOSER, 1970, DUCKETT et al. 1980)]. Certains points attirent leur attention. En effet, au stade spermatide, à la face interne des cinétosomes, se développe un organite complexe : la plaquette stratifiée ou "multilayered structure" (MLS) constituée de 4 couches (S1, S2, S3 et S4). Chez les Bryophytes, la MLS et la base des flagelles constituent le blépharoplaste (CAROTHERS et KREITNER, 1968). Les premières recherches concernant la MLS sont celles de HEITZ (1959, 1960). L'auteur met en évidence (1959) chez Marchantia polymorpha, Preissia quadrata, Sphaerocarpus donnellii et Pellia fabroniana (Hépatiques) un complexe fibrillaire formé de 4 couches (Vierergruppe) ou VG. En 1960, ce même auteur montre que chez les Sphlachnum la MLS est constituée de 3 couches (Driergruppe) ou DG. PAOLILLO (1965), PAOLILLO et al. (1968a) décrivent chez trois espèces de Polytrichum une MLS, constituée de 3 couches, présente dans les jeunes spermatides. A partir de 1967 CAROTHERS et son équipe publient un grand nombre de résultats concernant le développement de la MLS. Afin d'éviter une énumération fastidieuse de publications, nous ne rapportons ici que les principaux travaux. En 1977, ces auteurs fournissent de nouvelles données sur la microanatomie de la structure complexe multistratifiée présente dans les jeunes spermatides chez les Hépatiques Haplomitrium hookeri et Southbya tophacea, ainsi que chez les Mousses Andreaea rothii, Atrichum undulatum, Plagiothecium sylvaticum, Sphagnum palustre et Tetraphis pellucida. Le nombre de microtubules de la languette (S1) et l'organisation stratifiée de la structure à couches multiples

sont comparées chez ces Bryophytes. Haplomitrium, avec ses 57 microtubules, a la languette la plus large décrite chez les Hépatiques ; Tetraphis, avec 38 microtubules, possède la plus large connue chez les Mousses. La structure multistratifiée a généralement quatre couches. Sa présence, moins fréquente à trois couches, est interprétée comme le reflet, probablement transitoire, d'un état particulier du développement. Ces mêmes auteurs poursuivent leurs recherches sur 39 genres de Bryophytes (CAROTHERS et al. 1980). Ils retrouvent des résultats identiques concernant le nombre de microtubules de la languette, et ajoutent que ce sont les Polytrichum qui possèdent la languette la plus petite (10 microtubules). En 1986, RUSHING et al. observent la structure du blépharoplaste chez Thuidium delicatulum. Ces chercheurs pensent que d'après la morphologie et les dimensions de la première couche (S1), le blépharoplaste de Thuidium se rapproche de celui de Funaria et non de celui de Polytrichum ou de Sphagnum. Enfin en 1986, ils réalisent une étude concernant les spermatides chez Notothylas. Ils comparent le blépharoplaste de cette espèce avec celui d'une autre Anthocéroto, Anthoceros et concluent que des différences mineures existent entre les deux espèces (RENZAGLIA et CAROTHERS).

## II.- RESULTATS

Nous résumons, ici, les résultats et les conclusions d'une étude de la spermatogenèse de S. palustre, qui ont déjà fait l'objet d'une publication (FABRE, 1985).

Remarque : la coloration orangée, caractéristique de la sexualisation des rameaux mâles chez S. palustre, n'apparaît pas à l'extrémité de leurs homologues chez S. flexuosum. Une étude similaire à celle entreprise pour la première espèce n'a pu être réalisée pour la seconde.

### A.- MORPHOLOGIE GENERALE DE L'ANTHERIDIE

Chez S. palustre, les anthéridies naissent à l'aisselle de feuilles périgoniales, morphologiquement peu différentes des feuilles raméales. Toutefois, la couleur orangée de l'extrémité des rameaux proches de l'apex, due à la présence de caroténoïdes, permet de les caractériser facilement. La place des anthéridies a été découverte par SCHIMPER (1848) qui affirme qu'une seule anthéridie se développe par feuille. De multiples observations réalisées sur notre matériel indiquent cependant que 3 ou 4 gamétanges mâles peuvent prendre naissance à l'aisselle de chaque feuille (pl.XVIII, fig.1). L'anthéridie mûre a la forme d'un petit ballon. Leur paroi est constituée d'une seule strate de grandes cellules riches en chloroplastes (15 à 20 par cellule) (pl.XVIII, fig. 2).

## B.- EVOLUTION ULTRASTRUCTURALE DU TISSU SPERMATOGENE

### 1. Les spermatogonies

Le tissu spermatogène de la jeune anthéridie se compose de cellules polyédriques (pl.XVIII, fig. 3). Les différents constituants cellulaires sont semblables à ceux qui ont été décrits chez d'autres Bryophytes (SUIRE, 1970 ; CAROTHERS, 1972, 1975). Le noyau occupe souvent une position centrale et son volume est important par rapport à celui de la cellule. Le nucléole apparaît très dense aux électrons et souvent un deuxième petit nucléole l'accompagne (pl.XVIII, fig. 3). Les nombreuses mitochondries deviennent globuleuses et se vésiculisent. Il ne reste alors que quelques crêtes dans une matrice éclaircie. Les ribosomes libres abondent ; le réticulum endoplasmique granulaire, en revanche, est peu représenté. Les modifications successives des plastes permettent de décrire trois étapes dans l'évolution de la spermatogonie.

a) L'étape initiale est caractérisée par la présence de spermatogonies qui contiennent quelques plastes allongés; quatre à cinq plastes sont visibles dans chaque cellule. Ils mesurent 8  $\mu\text{m}$  de longueur et 1 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le stroma, dense aux électrons, renferme quelques petits plastoglobules (pl.XVIII, fig.3). Les plastes possèdent des grains d'amidon. Les thylakoïdes sont associés par 5 ou 6 et orientés longitudinalement suivant le grand axe du plaste.

b) Après plusieurs divisions, les cellules ne montrent plus que deux plastes beaucoup plus volumineux que ceux de la première phase. Ils mesurent 2,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et 11  $\mu\text{m}$  de longueur. Le stroma, peu dense aux électrons, contient des thylakoïdes courts et sinueux ou longs et associés par 2 ou 3. Le stroma présente également des vésicules très claires provenant de la dilatation de quelques lamelles intergranaires. Les plastoglobules sont absents et les inclusions amylicées disparaissent.

c) A la dernière phase, chaque cellule ne possède plus qu'un seul plaste très allongé situé près du noyau (pl.XIX, fig.1 et 2). Le stroma contient des thylakoïdes de nouveau orientés normalement, suivant le plus grand axe du plaste. Les thylakoïdes s'élargissent et donnent naissance à des vésicules (pl.XIX, fig.1). Enfin, ce plaste ne contient toujours pas de réserves amylicées.

Les parois séparant les spermatogonies sont en cours d'édification et l'on peut observer la lamelle moyenne (pl.XIX, fig. 2). Ces parois sont à distinguer de la paroi commune qui entoure les spermatogonies regroupées. L'achèvement des parois conduit à l'individualisation des spermatocytes.

## 2. Les spermatocytes

Un certain nombre de faits caractérise le stade spermatocyte:

- les cellules perdent leur forme polyédrique et deviennent ovales ;
- le plaste, toujours étiré, ne possède plus que quelques thylakoïdes et de nombreuses vésicules peu denses aux électrons ;
- les mitochondries s'étirent (pl.XX, fig. 1) et se groupent toutes en un même endroit de la cellule ; elles contiennent une matrice granuleuse, dense aux électrons, et de nombreuses vésicules claires ; à ce stade elles ont un aspect semblable à celui des mitochondries des cellules des dérivées de l'apicale et des cellules des ébauches foliaires,
- des systèmes membranaires appartenant au réticulum endoplasmique, et des vésicules à contenu dense se trouvent englobés dans un complexe limité par une membrane (pl.XX, fig.1); ces formations rappellent des éléments décrits par ailleurs dans les cellules végétales sous les noms de "Nebenkerns ergastoplasmiques" ou de "corps en écailles" (GAVAUDAN et al. 1960) et chez deux Mousses(SUN, 1963);
- les vacuoles sont abondantes et volumineuses ; ces dernières contiennent des corps multilamellaires ou des globules lipidiques (pl.XX, fig. 1) témoins d'une grande activité lytique ;
- la lamelle moyenne subsiste temporairement, puis finit par disparaître à la suite de la gélification des composés pectiques de la paroi ; cette transformation aboutit à la formation d'un gel hétérogène en contact direct avec le plasmalemma et provoque la disjonction des cellules ;
- deux cinétosomes apparaissent au voisinage du noyau (pl.XX, fig. 2) ; leur présence, à ce stade, est établie pour la première fois chez les Sphaignes ;
- le cloisonnement des spermatocytes donne naissance à deux spermatides dans lesquelles le noyau occupe une place importante.

## 3. Les spermatides

Tous les constituants de la dernière génération des cellules de l'anthéridie subissent des transformations importantes alors que de nouvelles structures s'édifient. Dans la jeune spermatide, les mitochondries sont de petite taille et se rassemblent près du plaste (pl.XXI, fig. 1). Ce dernier possède un stroma dense aux électrons, dans lequel on distingue deux thylakoïdes orientés longitudinalement et quelques vésicules situées près de l'enveloppe plastidale (pl.XXI, fig. 1). Le noyau sphérique et volumineux possède une chromatine homogène. Le nucléole demeure peu osmiophile et son volume a donc décru.

A un stade de différenciation ultérieure, le noyau en position excentrique prend la forme d'un croissant (pl.XXI, fig.2). Le nucléole se fragmente en plusieurs amas granuleux qui disparaissent ultérieurement. Enfin, le noyau se transforme rapidement ; sa chromatine s'organise en un grand nombre de fibrilles courtes (pl.XXII, fig. 1) qui s'allongent progressivement. Puis le nucléoplasme régresse laissant des plages transparentes aux électrons. Le noyau amorce un premier tour de spire et les fibrilles chromatiniennes fusionnent en faisceaux qui se torsadent en écheveaux denses (pl.XXII, fig. 2). En coupe transversale, les fibrilles sont accolées à la membrane interne du noyau, ce qui donne une structure rubanée, pincée en de multiples endroits (pl.XXIII, fig. 1). Le centre du noyau est occupé par un faisceau de fibrilles très denses aux électrons et le nucléoplasme ne forme plus qu'une couronne moyennement dense aux électrons autour de ce faisceau central. Des structures spécifiques à la spermatide se différencient.

Il s'agit :

- du complexe apical,
- de la languette
- du corps basal,

déjà signalés chez les Bryophytes (SUIRE, 1970).

Rappelons, rapidement, les structures de ces ensembles particuliers.

a) Le complexe apical est un ensemble d'organites qui s'agrègent dans la région antérieure de la spermatide. Il comprend la plaquette stratifiée ou MLS, la région antérieure du noyau, le corps mitochondrial apical, les cinétosomes et les portions de flagelles incluses dans le cytoplasme.

La plaquette stratifiée ou MLS s'édifie au voisinage des deux cinétosomes (pl.XXIII, fig. 2) et comporte 3 ou 4 couches de structure différente.

Sur la figure 3, planche XXIII, on peut ainsi décrire :

- une strate  $S_1$  ou couche supérieure constituée de quatorze tubules longitudinaux reliés entre eux, visibles également sur la figure 4, planche XXIII;
- une strate  $S_2$  formée de lamelles parallèles entre elles, obliques par rapport aux tubules  $S_1$  ;  $S_1$  et  $S_2$  sont séparées par une zone claire ;
- une strate  $S_3$  formée de lamelles plus fines que celles de  $S_2$  et orthogonales aux tubules de  $S_1$  ;
- une couche  $S_4$  ou couche inférieure dont la structure n'apparaît pas clairement.

La région antérieure du noyau se déforme en direction des tubules de la couche supérieure de la MLS. Il constitue une sorte de cône s'adaptant à la forme de l'extrémité postérieure de la

mitochondrie (pl.XXIII, fig. 1). Mitochondrie et noyau ne sont alors séparés du plasmalemme que par une fine couche de cytoplasme.

Les mitochondries fusionnent en un seul ensemble, appelé corps mitochondrial apical ; cette fusion devance la différenciation de la MLS. Dès que cette dernière commence à se développer (pl.XXIII, fig. 5) le corps mitochondrial apical s'individualise nettement. Au début de la formation de la MLS, la mitochondrie demeure largement vésiculisée et possède des crêtes dilatées (pl.XXIII, fig. 5). Lorsque la régression de la plaque commence, les crêtes du corps mitochondrial apical se laminent et s'orientent suivant le grand axe de l'organite, le faisant ressembler ainsi à un plaste (pl.XXIII, fig. 1). Cet ensemble mitochondrial apical ressemble alors au "Nebenkern" décrit par ANDRE (1959) dans les spermatides du papillon du chou.

Les cinétosomes apparaissent dès le début du stade spermatocyte (pl.XX, fig. 2). Dans les spermatides, des coupes transversales ont permis de reconnaître deux cinétosomes surmontant la MLS (pl.XXIII, fig. 2). Chacun présente la structure énéanème usuelle. Les triplets de microtubules sont noyés dans une matrice dense aux électrons, la couronne qu'ils forment est séparée de l'axe central par une région dont la structure ressemble à une roue de charette. Au cours des premiers stades de la formation de la MLS, les deux cinétosomes sont proches et situés l'un derrière l'autre. Ils donnent naissance à deux flagelles (pl.XXIII, fig. 6).

b) La languette est, au début de son développement, constituée par la portion des tubules de  $S_1$  de la MLS qui se prolonge en direction postérieure, au-delà des couches  $S_2 - S_3 - S_4$ . Puis elle est formée par l'ensemble des tubules qui persiste lorsque les couches inférieures de la MLS se désorganisent. Enfin, la languette est représentée par une bande tubulaire longue et étroite qui se prolonge au-delà du noyau (pl.XXIV, fig. 3).

c) Dans la spermatide une association s'établit entre le plaste et la mitochondrie. Nous désignons l'ensemble sous le vocable de corps basal (terme utilisé par SUIRE, 1970 dans son étude sur Pellia epiphylla). D'autres auteurs ont nommé différemment ces formations décrites chez des Bryophytes. Par exemple, WILSON (1911) parle de "limosphère". Ce terme a été réutilisé, dans l'étude des ultrastructures de la spermatide de deux Mousses (PAOLLILO, 1965 ; BONNOT, 1967a). Dans notre matériel, le plaste demeure globuleux (pl.XXIII, fig. 1). Son stroma, peu dense aux électrons, comprend quelques thylakoïdes plaqués contre la membrane interne. Le centre du plaste est occupé par un volumineux grain d'amidon qui apparaît dans la spermatide en fin d'évolution. Puis les thylakoïdes disparaissent; il ne reste plus alors que l'inclusion amyliacée (pl.XXIV, fig. 1). Enfin l'ensemble du corps mitochondrial apical, coiffe le plaste devenu amyliifère (pl.XXIV, fig. 2).

#### 4. Les spermatozoïdes

La spermiogenèse se caractérise par la régression de la plupart des structures cytoplasmiques. Chaque cellule contenant le spermatozoïde est entourée d'une coque mucilagineuse épaisse. La chromatine se présente sous un aspect extrêmement condensé (pl. XXIV, fig. 4 et 5). Le diamètre du noyau est inconstant ; il décroît de la région antérieure à la région postérieure. Le noyau est enroulé ; en conséquence, il peut être coupé à différents niveaux (pl. XXIV, fig. 4).

Le cytoplasme du spermatozoïde est réduit (pl. XXIV, fig. 4) ; il est pratiquement dépourvu de ribosomes ; dictyosomes et réticulum endoplasmique n'y sont plus discernables. On peut encore y reconnaître une vacuole et des éléments cellulaires assimilables à des mitochondries (pl. XXIV, fig. 4). En revanche, le plaste amylofère reste bien visible sur toutes les coupes.

La languette de la spermatide persiste dans le spermatozoïde (pl. XXIV, fig. 5). Elle est constituée de microtubules couvrant une partie du noyau qu'elle dépasse formant une longue bande étroite. C'est la "languette définitive". Les deux flagelles, rattachés au corps apical, sont insérés à des niveaux différents (pl. XXV, fig. 1) et sont spiralés.

#### 5. La paroi anthéridienne

La paroi anthéridienne est constituée d'une assise de cellules qui possèdent un grand nombre de plastes. Ces derniers deviennent amylofères (pl. XXV, fig. 2). On remarque également la présence de corpuscules formés de deux zones : une zone centrale dense aux électrons et une zone périphérique plus claire (les O.D.Z.C. Ces O.D.Z.C. ont déjà été remarqués dans les cellules dérivées de l'apicale et dans les cellules des ébauches foliaires sexualisées.

### III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

#### A. LES SPERMATOGONIES

Le tissu spermatogène de la jeune anthéridie présente tous les caractères d'un tissu méristématique. Ses cellules polyédriques se divisent si activement que la cinèse intervient avant que la cytotélière ne soit achevée. Le développement de ce tissu est aussi marqué par des changements affectant les différents organites. Le noyau, sphérique, occupe un volume important dans la cellule et se trouve souvent en position centrale. Mais c'est surtout l'évolution du plastidome qui permet de définir les différents stades de développement des spermatogonies. Dans son étude sur P. epiphylla, SUIRE (1970) reconnaît deux phases : lors de la première phase, la fréquence des bipartitions plastidiales est égale à celle des cloisonnements cellulaires, ce qui a pour but de maintenir le nombre des plastes ; durant la deuxième phase le rythme des bipartitions plastidiales est moins rapide que celui des cloisonnements et le

nombre des plastes est égal à deux par cellule. En parallèle, on note une réduction de leur appareil membranaire interne. Dans notre matériel, nous distinguons trois phases de maturation des plastes. Lors de la première, le nombre initial de plastes est maintenu. Les 2ème et le 3ème phases se définissent, respectivement, par des cellules à 2, puis à 1 plaste. Le stade 2 est bref. La dernière phase a été observée chez les Mousses étudiées par EYME, 1953 et BONNOT, 1967a, alors que chez les Hépatiques les spermatogonies de la dernière génération en contiennent deux (SUIRE, 1970 ; CAROTHERS, 1975). Les spermatogonies de Mousses parviennent donc à un état monoplastidié dès leur dernière génération ; alors que leurs homologues chez les Hépatiques n'accèdent à cet état que dans la spermatide. Cette particularité acquiert donc une importance phylogénétique, puisqu'il permet de séparer les deux classes des Bryophytes.

La vésicualisation des crêtes mitochondriales qui semble être une caractéristique des Hépatiques (SUIRE, 1970 ; CAROTHERS, 1975) et des Anthocérotes (DUCKETT et al. 1980) se retrouve également chez les Mousses (BONNOT, 1968) et chez les Sphaignes. Les cellules spermatogènes se distinguent aussi par l'abondance des ribosomes et le faible développement de l'appareil golgien. Les cellules homologues d'autres Bryophytes partagent ces propriétés (SUIRE, 1970 ; DUCKETT et al., 1980). L'absence des cinétosomes à ce stade est un phénomène général chez les Hépatiques et chez les Mousses.

#### B.- LES SPERMATOCYTES

Les spermatocytes nouvellement différenciés subissent une évolution rapide. Ces cellules perdent leur forme polyédrique tandis que s'accumule un gel intercellulaire. Chez S. palustre, le stade spermatocyte est marqué par la différenciation des cinétosomes. Pour certains auteurs, WILSON (1911) et WOODBURN (1915), ayant étudié les spermatocytes de Mnium hornum et de Mnium affine var. ciliaris en microscopie photonique, toutes les divisions, y compris celle qui fournit les spermatides, ont lieu en l'absence de cinétosomes. D'autres auteurs pensent reconnaître la présence de cinétosomes au cours de la dernière division : ALLEN (1917) chez Polytrichum juniperinum, ARENS (1907) chez P. juniperinum et WALKER (1913) chez P. formosum. Plusieurs auteurs, qui ont étudié en microscopie électronique la spermatogenèse chez diverses Bryophytes ne mentionnent pas la présence de cinétosomes à un stade ontogénique antérieur à celui des spermatides. En revanche, SUIRE (1970) montre que ces cinétosomes sont présents dès le stade spermatocyte chez Pellia epiphylla. Il en est de même chez Marchantia polymorpha (KREITNER et CAROTHERS, 1976) et chez une Fougère Pteridium aquilinum (TOURTE et HUREL-PY, 1967). En 1977, MOSER et al., montrent que chez Phaeoceros laevis (Anthocérote) le cinétosome apparaît juste avant la division du spermatocyte différencié. Toutes les espèces qui viennent d'être mentionnées sont des Hépatiques ou des Anthocérotes. D'après BONNOT (communication personnelle), les cinétosomes apparaissent

au stade spermatide chez les Mousses . Les Sphaignes se singularisent donc par la présence de cinétosomes dès le stade spermatocyte.

### C.- LES SPERMATIDES

Certaines structures observées dans les spermatides de S. palustre ont déjà été rapportées chez plusieurs espèces de Bryophytes : le complexe apical = blépharoplaste des anciens auteurs, la languette et le corps basal . Le problème posé par l'évolution de l'amidon au cours de la spermatogenèse nous semble intéressant car elle diffère de celle des Hépatiques et se rapproche de celle des Mousses.

#### 1. Le complexe apical des spermatides

Des structures identiques au complexe apical ont été décrites dans la spermatide des Characées (TURNER, 1968), des Filicinées, (VAZART, 1964 ; TOURTE et HUREL-PY, 1967) et des Cycadales (NORSTOG, 1968, 1975). Chez toutes les espèces de Bryophytes, les auteurs ont observé une évolution analogue du noyau. Il en est de même chez les Sphaignes, où le noyau d'une spermatide peu évoluée est d'abord volumineux et concave ; puis son diamètre diminue fortement. La région antérieure du noyau se déforme en une sorte d'expansion. Enfin, le contenu nucléaire se condense et le noyau s'effile en formant une spirale sur plusieurs tours.

Le corps mitochondrial apical a été découvert par BONNOT (1967a) chez B. capillare et par PAOLLILLO et al. (1968a) chez P. juniperinum. Chez ces espèces, comme chez S. palustre, la totalité des mitochondries de la spermatide fusionnent et l'extrémité antérieure de l'organite qui résulte de cette fusion s'accrole, dans un premier temps, à la MLS puis s'isole dans un deuxième temps.

Les cinétosomes des spermatides existent chez toutes les Bryophytes actuellement observées. Nous avons noté, chez S. palustre, que les premiers éléments de la cinétide se développent dans les spermatocytes. Cette situation rappelle celle décrite chez les Hépatiques (TURNER, 1966 ; MOSER et KREITNER, 1970). Les flagelles sont au nombre de deux, comme chez toutes les autres Bryophytes ; de ce fait, ils ressemblent beaucoup à ceux des Lycopodiacées, des Sélaginellacées (ROBERT, 1974) et à ceux des Characées (TURNER, 1968).

Les premières investigations sur la plaquette stratifiée ou MLS datent de 1959 (HEITZ) chez des Hépatiques. L'auteur ne met pas en évidence la structure tubuleuse de la couche supérieure mais remarque la structure périodique des deux couches inférieures. Il confirme, en 1960, la structure tripartite de la MLS chez diverses Mousses et Hépatiques. PAOLLILLO (1965) et PAOLLILLO et al. (1968a), retrouvent la MLS organisée en trois strates chez Polytrichum juniperinum. BONNOT (1967a) observe également, dans la spermatide de Bryum capillare, un "complexe fibrillaire" semblable à la MLS précédente. En 1967, CAROTHERS et

KREITNER décrivent dans la spermatide de Marchantia polymorpha une MLS à quatre couches. Cette dernière est à nouveau indiquée par SUIRE (1970) chez P. epiphylla. CAROTHERS et DUCKETT (1977) les avaient déjà observées chez Sphagnum palustre et nous les avons retrouvées (FABRE, 1985).

La MLS est une structure transitoire. Les strates S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> se désorganisent rapidement alors que les tubules de la couche S<sub>1</sub> persistent et constituent la languette.

## 2. La languette des spermatides

La languette est formée d'une seule série de tubules épinucléaires ; son existence n'est pas transitoire puisqu'elle persiste dans le spermatozoïde. PAOLILLO (1965) observe les tubules de la strate S<sub>1</sub> qui se prolongent le long du noyau en une bande étroite qu'il identifie au "filamentous appendage" décrit par SATO (1954) et à la "fibrous band" observée par MANTON (1957) dans les spermatozoïdes de Sphagnum. D'après les études de CAROTHERS et KREITNER (1968) sur Marchantia polymorpha, de PAOLILLO et al. (1968a) sur Polytrichum juniperinum et de SUIRE (1970) sur Pellia epiphylla, de nous-même sur S. palustre (FABRE, 1985), il apparaît que le prolongement des tubules de la couche supérieure de la MLS est un fait général chez les Bryophytes.

Des formations analogues à la languette des Bryophytes existent dans d'autres groupes végétaux ; par exemple, dans la spermatide de Nitella missouriensis (Characées), TURNER (1968) observe une série de tubules entre le noyau et le plasmalemme, mais, dans cette espèce, il n'existe pas de formation comparable à la MLS des Bryophytes. Les recherches de VAZART (1964) et de TOURTE et HUREL-PY (1967) montrent que les complexes observés chez Polypodium vulgare et chez Pteridium aquilinum peuvent être considérés comme analogues à la MLS et à la languette des Bryophytes. Enfin, chez les Cycadales, NORSTOG (1968 et 1975) décrit une structure encore plus complexe que chez les Ptéridophytes et pouvant être, aussi analogue à la languette des Bryophytes.

## 3. Le corps basal des spermatides

Le corps basal, qui correspond à un accollement du plaste et du corps mitochondrial résultant de la coalescence de mitochondries, n'existe que dans les spermatides des Bryophytes. Chez les Hépatiques, l'étude de Pellia epiphylla par SUIRE (1970) semble être la première à rendre compte d'une telle évolution. Chez les Mousses, la formation d'un corps basal a été observée dans les cellules de plusieurs espèces : PAOLILLO (1965) est le premier à décrire la nature mixte du corps basal chez Polytrichum commune. Parmi les Bryophytes P. formosum est la seule espèce où un système biplastidié est décrit (GENEVES, 1967). Chaque plaste y est entouré de mitochondries et les deux formations mixtes se séparent. Les spermatides des Characées sont monoplastidiées, mais TURNER (1968) ne précise pas si le plaste est associé à une ou plusieurs mitochondries. Chez les Filicinées les spermatides

possèdent plusieurs plastes ainsi que le montrent MANTON (1959) chez Pteridium aquilinum et VAZART (1965) chez Polypodium vulgare. Chez ces espèces, les mitochondries ne fusionnent pas et aucune association n'est comparable à celle décrite dans le corps basal des Bryophytes.

Dans notre matériel l'évolution du plaste du corps basal présente également un grand intérêt. Au début de l'évolution du tissu spermatogène, les plastes renferment quelques grains d'amidon. Dans les générations ultérieures de spermatogonies, le nombre de plastes diminue et les inclusions amyloides disparaissent. Dans les spermatocytes, l'unique plaste est anamyle. Dans les jeunes spermatides, le stroma possède deux longs thylakoïdes superposés et l'amidon y est toujours absent. Celui-ci n'est élaboré que lorsque le corps basal s'organise dans les spermatides âgées. La disparition de l'amidon à la fin du stade spermatogonie a été également observée chez d'autres Mousses (EYME, 1953). En revanche, chez les Hépatiques, l'amidon ne disparaît jamais totalement (SUIRE, 1970).

Chez les Mousses et les Sphaignes, l'unique plaste des spermatogonies est capable d'élaborer une réserve amyloide qui sera hydrolysée au cours des stades ultérieurs de la spermatogénèse. Plus étonnante est la capacité de synthèse du plaste du corps basal des spermatides âgées. Nous avançons une hypothèse explicative qui va dans le même sens que celle qui suppose que la mitochondrie apicale fournit aux cinétosomes une énergie suffisante pour que les flagelles assurent le déplacement d'un ensemble cellulaire par ailleurs rigide et relativement lourd. Nous suggérons que le plaste du corps basal de la spermatide a pu, au cours de son évolution complexe, préserver un stock d'enzymes et de précurseurs suffisants pour assurer la synthèse des deux inclusions amyloides, l'ATP lui étant fourni par la mitochondrie qui lui est étroitement accolée.

Chez S. palustre les spermatozoïdes restent séquestrés dans les anthéridies de la mi-septembre à la fin février. Quand les spermatozoïdes sont libérés, ils possèdent toujours deux volumineux grains d'amidon en position postérieure du noyau. L'hydrolyse de l'amidon est supposée fournir l'énergie nécessaire au déplacement des spermatozoïdes vers les oosphères.

#### D.- LES SPERMATOZOÏDES

Au cours de la différenciation de la spermatide en spermatozoïde, le noyau devient extrêmement dense aux électrons. Le réticulum endoplasmique et les systèmes qui en dérivent se désorganisent jusqu'à devenir inexistantes dans le gamète mûr. Le corps basal tend à se dissocier, le corps apical ne se modifie pas, la cinétide et le corps mitochondrial persistent, ainsi que les éléments de la languette définitive. Cette dernière a suscité de nombreux travaux et se retrouve chez toutes les espèces de Bryophytes étudiées (SATO, 1954, 1956 ; DIERS, 1967 ; PAOLILLO et al., 1968b ; SUIRE, 1970). Le nombre des tubules constituant la languette définitive varie avec le niveau considéré et avec

l'espèce (SUIRE, 1970).

Le rôle de la languette est inconnu et on en est réduit à des suppositions.

Q U A T R I E M E   P A R T I E

LES ORGANES FEMELLES. L'ARCHEGONE  
DE S. FLEXUOSUM ET DE  
S. PALUSTRE

**Historique des Chapitres I et II**

Les premières études du gamétange femelle des Bryophytes sont l'oeuvre de SCHIMPER (1848) et de HOFMEISTER (1851). Ces auteurs montrent que les archégonies prennent naissance à partir d'une initiale de l'apex principal. A la suite de ces travaux, d'autres chercheurs s'attachent à l'étude de l'activité mitotique de cette cellule (JANCKEWSKI, 1872 ; LEITGEG, 1874 ; HY, 1884 ; HOLFERTY, 1904 ; CAMPBELL, 1905 ; MOTTE, 1928 et GAVAUDAN, 1930). Il se dégage de leurs travaux la nécessité de distinguer les Mousses des Hépatiques. En effet, le mode de division et la répartition des cellules issues de l'initiale permettent de différencier l'archégonie des Mousses de l'archégonie des Hépatiques.

Chez les Hépatiques en effet, cette cellule superficielle subit d'abord un cloisonnement horizontal donnant naissance à une "cellule basale" et à une "cellule initiale archégoniale". Trois cloisonnements tangentiels de cette dernière engendrent une cellule axiale qui isole à sa partie supérieure une "cellule couvercle". La cellule axiale peut être considérée comme l'initiale de la rangée axiale puisqu'elle donne la cellule centrale, mère de l'oosphère et la cellule primaire du canal ; cette dernière est à l'origine des cellules du canal dont le nombre augmente ensuite par multiplications intercalaires.

Chez les Mousses, la cellule initiale archégoniale fonctionne quelque temps comme initiale à deux faces de clivage et forme un pédicelle. L'initiale fonctionne ensuite sur trois faces et découpe, sur sa face interne, l'initiale de la rangée axiale qui donne la cellule centrale ou progamète et la cellule primaire du canal du col. Le très grand nombre des cellules du canal chez les Mousses (fréquemment 30, parfois près de 80) ne semble pouvoir s'expliquer par les seules divisions (peu nombreuses) de la cellule primaire du canal. Aussi, la plupart des auteurs envisagent-ils la participation d'initiales secondaires du canal détachées par la cellule terminale pour l'édification de cette multitude de cellules du canal. Si quelques désaccords sont apparus sur l'origine de ces nombreuses cellules, les deux types de développement résumés ci-dessus semblent admis par les auteurs, en dépit de la variété des espèces étudiées.

Dans l'archégonie des Hépatiques, le territoire fertile se sépare donc plus précocement que dans l'archégonie des Mousses qui est pourvu d'un pédicelle. La rangée cellulaire axiale de l'archégonie des Mousses s'oppose à celle des Hépatiques par le grand nombre des cellules qui la constitue et par son origine double.

Quelques travaux sont publiés en microscopie photonique sur la structure du gamète (MOTTE, 1928 ; BEARDSLEY, 1931 ; HAMANT, 1954). HAMANT décrit l'oosphère de quelques espèces de Mnium. Le gamète femelle est caractérisé chez ces espèces par l'existence d'un "nucléole cytoplasmique". Au cours de la maturation de l'oosphère, HAMANT observe que le noyau prend un contour amiboïde et que le "nucléole cytoplasmique" déverse sa substance dans le cytoplasme.

En 1974, HALLET décrit la morphogenèse du gamétophyte feuillé de Mousses, et en particulier, la transformation de la région apicale du gamétophyte de Polytrichum formosum pendant la phase reproductrice femelle.

La première étude ultrastructurale du gamète femelle d'une Bryophyte porte sur une Hépatique à thalle Sphaerocarpus donnellii (DIERS, 1965a, 1965b). DIERS signale que la maturation de l'oosphère est caractérisée par une forte augmentation du volume cellulaire et par une augmentation du volume du noyau. Parallèlement, il observe la multiplication des organites et de nombreuses figures de constriction chez les plastes et chez les mitochondries.

Grâce aux techniques cytochimiques, VIAN et al. (1970) étudient la nature des sécrétions mucilagineuses dans le canal du col de l'archégone de Mnium undulatum. Le test de THIERY met en évidence la présence d'un mucilage hydrophile polysaccharidique. Des recherches ultrastructurales de la gamétogenèse femelle chez Marchantia polymorpha sont publiées par ZINSMEISTER et CAROTHERS (1974). Ces auteurs envisagent tous les stades de développement, depuis l'initiale archégoniale jusqu'à la maturation de l'oosphère. Ils montrent que l'oosphère est arrondie, et qu'au cours de la maturation de nombreuses digitations s'évaginent de l'enveloppe nucléaire. Par ailleurs, les plastes ont souvent la forme d'une cupule et les mitochondries jouxtent les plastes. En 1981, une étude détaillée de la gamétogenèse femelle chez deux Bryophytes (Mnium undulatum et Fossombronina angulosa) autorise BAJON-BARBIER à faire ressortir les différents caractères morphologiques et cytochimiques de ces deux espèces appartenant à deux classes distinctes. Cet auteur montre que la différenciation du gamète femelle résulte d'une succession d'évènements cytologiques et physiologiques. Parmi ceux-ci, les plus importants paraissent être: l'isolement de la cellule reproductrice en liaison avec une activité sécrétrice de mucilage ; l'acquisition d'une polarité qui jouera un rôle déterminant dans l'embryogenèse du sporophyte; l'existence d'organites qui représente probablement un stockage de ribonucléoprotéines et de membranes utilisables par l'embryon. L'évolution subie par les autres cellules de la rangée axiale de l'archégone a pour conséquence la création d'un canal. Au cours d'une sécrétion abondante, les cellules sont peu à peu remplacées par les substances mucilagineuses qu'elles élaborent. Les phénomènes qui se déroulent dans le col présentent des similitudes dans les deux espèces envisagées.

L'étude cytologique des Bryophytes paraît d'autant plus délaissée que ce sont récemment développés des travaux sur la gamétogène femelle de nombreuses archégoniates tant chez les Ptéridophytes (BELL et MUHLETHALER, 1962, 1964 ; BELL, 1963, 1969, 1972, 1979, 1980 ; MENKE et FRICKE, 1964 ; TOURTE, 1968, 1970a et b, 1971, 1972, 1974, 1975a et b ; ROBERT, 1969, 1972 a et b ; SIGEE, 1972 ; VOTHI DAO et LAROCHE, 1978), que chez les Gymnospermes (CAMEFORT, 1959 a et b, 1962, 1963, 1964, 1965 a et b, 1967, 1970, 1971 ; CAMEFORT et al., 1973 ; CHESNOY, 1967, 1969, 1971, 1974, 1977 ; CHESNOY et THOMAS, 1969, 1971 ;

GIANORDOLI, 1969, 1973, 1978 ; MOUSSEL, 1972, 1974, 1978), ou les Angiospermes (JENSEN, 1965 ; DIBOLL et LARSSON, 1966 ; VAZART et VAZART, 1966 ; SCHULZ et JENSEN, 1968 ; FAVRE-DUCHARTRE, 1970, 1978 ; VAN WENT, 1970 ; MOGENSEN, 1972 ; NEWCOMB, 1973 ; CASS et KARAS, 1974 ; JALOUZOT, 1975 ; THOMAS, 1975 ; MOGENSEN et al., 1979).

CHAPITRE I

LES CELLULES DE L'ARCHEGONE

## I .- RESULTATS

Les études des différentes parties de l'archégone de S. flexuosum et de S. palustre ont abouti à des observations semblables, sinon identiques. En conséquence, les résultats sont exposés simultanément pour les deux espèces ; ceux qui concernent S. flexuosum ont été publiés (FABRE, 1984).

### A.- MORPHOLOGIE GENERALE DE L'ARCHEGONE OBSERVEE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Le premier archégone s'édifie à partir de l'initiale apicale d'un apex latéral, jamais à partir de celle de l'apex principal. Les deux autres archégonies, qui se forment par la suite, dérivent d'initiales secondaires appartenant à ce même apex latéral. Deux à trois apex latéraux forment éventuellement des archégonies. La morphogenèse de l'archégone de S. palustre et de S. flexuosum n'a pas été suivie, car BRYAN (1915) a décrit, par le menu, le développement de la cellule initiale jusqu'aux cellules de l'archégone chez S. subsecundum.

Les archégonies ont une longueur de 100  $\mu\text{m}$  en moyenne et leur diamètre, au niveau du ventre, varie de 10 à 13  $\mu\text{m}$ . Typiquement, l'archégone de S. flexuosum et celui de S. palustre présentent une morphologie lagéniforme ; le ventre est surmonté d'un col qui s'ouvre, par un orifice, à son extrémité supérieure, lorsque l'archégone est mûr. Il s'attache au gamétophyte par un pédoncule, le pseudopode. Les différentes parties de l'archégone sont formées de cellules dont les caractères structuraux sont en relation avec leur fonction. Lorsqu'il est complètement développé, l'archégone comprend de la base au sommet :

- les cellules formant le pseudopode (pl.XXVI, fig.1 ; pl.XXVII, fig.1) ;

- les cellules du ventre disposées en plusieurs assises, protégeant une cavité (pl.XXVI, fig.1 ; pl.XXVII, fig.1) dans laquelle se trouve, enchassée, l'oosphère (pl.XXVII, fig.2) séparée de la paroi ventrale par un mucilage ;

- les cellules formant le col (pl.XXVI, fig.1 et 2 ; pl.XXVII, fig.1) ; ce dernier est parcouru par un canal axial (pl.XXVI, fig.2) qui provient de la dégénérescence mucilagineuse des cellules du canal du col et de l'unique cellule ventrale du canal.

Avant la pleine maturité de l'oosphère, le canal est fermé par des cellules obturantes (pl.XXVI, fig.2) qui finissent par céder par gélification de leurs lamelles mitoyennes et sous la pression due à l'hydratation du mucilage du canal. Lorsque l'archégone est mature, la présence de mucilage est mise en évidence par le bleu de toluidine (pl.XXVI, fig.1 et pl.XXVII, fig.1). La coloration par le rouge de ruthénium et celle par le bleu Alcian (pl.XXVI, fig.2) indiquent que ce sont des polysac-

charides acides. Les cellules de la paroi ventrale et l'oosphère en coupe transversale sont schématisées sur la figure 3, pl.XXVII.

## B.- ULSTRASTRUCTURE DES CELLULES DE L'ARCHEGONE

### 1. Le pseudopode

Les cellules possèdent un noyau avec un nucléoplasme homogène et un nucléole unique, central et de forme régulière (pl.XXVIII, fig.1). Les plastes, grossièrement ovoïdes, ne contiennent jamais d'amidon. Ils sont surtout localisés à proximité immédiate de l'enveloppe nucléaire, mais il ne s'établit pas entre les deux organites de liaison morphologique comme le signale BONNOT (1967b) à propos des cellules méristématiques du gamétophyte feuillé de Polytrichum formosum. Les mitochondries possèdent des crêtes courtes et dilatées. L'appareil de Golgi est formé de dictyosomes d'aspect usuel donnant un grand nombre de vésicules (pl.XXVIII, fig.1). La paroi pecto-cellulosique est pourvue de nombreux plasmodesmes.

Les cellules plus âgées présentent les mêmes caractéristiques que les cellules d'apex sexualisés. En effet, les plastes possèdent d'abondants plastoglobules (pl.XXVIII, fig.2) ; ce qui permet de reconnaître immédiatement une cellule sexualisée. De plus, le système granulaire se présente souvent sous forme d'éléments globuleux déjà signalés. Il faut aussi noter que le nombre de granums par section est réduit. Dans le cytoplasme se trouvent des organites limités par une seule membrane et caractérisés par une zone centrale, dense aux électrons, entourée d'une zone périphérique plus claire (O.D.Z.C.) (pl.XXVIII, fig.3). Le centre, de nature lipoprotéique, est ici plus développé que dans les stades précoces de sexualisation et occupe presque tout le volume de l'organite.

### 2. Les cellules du col (pl.XXIX, fig.1).

Les cellules du col diffèrent des cellules de la rangée axiale, appelées cellules du canal du col, par leur grande dimension. Dans le noyau circulaire, la chromatine apparaît sous forme de petits amas homogènes. Dans le cytoplasme, les vacuoles ont des formes variées et sont souvent de grande taille. Les chloroplastes sont généralement allongés, parfois sphériques. Ils possèdent un système lamellaire bien développé et contiennent plusieurs plastoglobules. Les mitochondries arrondies, ou en forme de bâtonnets, se localisent de préférence le long du plasmalemma dans la région en regard des cellules axiales. Les crêtes sont irrégulières et forment des vésicules disséminées dans la matrice. Le réticulum endoplasmique est complexe et se présente sous l'aspect de nappes parallèles. On peut reconnaître quelques dictyosomes et des vésicules de sécrétion. Les ribosomes sont abondants. Le plasmalemma dessine un contour sinueux et l'on observe de petites vésicules dans le périplasme. Les cellules participent à la sécrétion mucilagineuse. Elles sont donc

impliquées, comme les cellules du canal, dans le phénomène sécrétoire qui permet l'épaississement des parois longitudinales.

Comme dans tous les tissus sexualisés nous avons retrouvé, dans ces cellules, la présence de corpuscules à deux zones (O.D.Z.C.) en abondance.

### 3. Les cellules du canal du col

Avant la pleine maturité de l'oosphère, le col est clos par des cellules sphériques qui obturent le canal (pl.XXIX, fig.2). La paroi, qui limite ces cellules, est bordée de bourrelets verruqueux de nature inconnue (pl.XXIX, fig.2). Le diamètre du canal, large de 9  $\mu\text{m}$ , est plus grand que celui des archéogones des Ptéridophytes (VO THI DAO et LAROCHE, 1978).

Peu avant leur transformation en mucilage, les cellules du canal du col possèdent des parois minces (pl.XXX, fig.1). Le noyau, situé dans la partie basale des cellules, montre un nucléosplasme clair, caractéristique d'un noyau sur le point de dégénérer (pl.XXX, fig.1). Dans le cytoplasme, l'appareil de golgi matérialise son activité par le bourgeonnement de petites vésicules formant un ensemble de corps multivésiculaires regroupés au sein d'une membrane. Enfin, le cytoplasme contient de volumineux globules lipidiques.

Le premier signe de la sécrétion de substances polysaccharidiques est l'épaississement progressif des parois longitudinales des cellules du canal du col, dont les limites sont sinueuses.

Parallèlement à cet épaississement, des fossettes de sécrétion apparaissent au niveau du plasmalemme (pl.XXX, fig.2), ce qui donne un aspect festonné au contour de la cellule. Des vésicules prennent place dans le périplasma et en particulier dans les fossettes (pl.XXX, fig.3). Ces vésicules situées le long des parois transversales réagissent positivement au test de THIERY (pl.XXXI, fig.1).

Les fossettes se remplissent de matériel polysaccharidique et les substances synthétisées se déposent contre la paroi préexistante.

Puis, au cours de la sécrétion, des saccules de réticulum endoplasmique se développent en bordure du plasmalemme (pl.XXXI, fig.2) et on observe de nombreuses petites vésicules intracytoplasmiques dont le contenu est peu réactif vis à vis du test de THIERY. A ce stade, les dictyosomes sont peu nombreux, ce qui ne permet pas de définir une phase golgienne décrite chez d'autres Bryophytes (VIAN et al., 1970).

Ultérieurement des figures dites "myéliniques" se développent. Elles sont un signe de dégénérescence (pl.XXXI, fig.3). Enfin, les cellules du canal du col se désorganisent : leurs parois transversales disparaissent, les éléments figurés du cytoplasme ne se reconnaissent plus ; le mucilage à trame

fibrillaire envahit progressivement le col de l'archégone (pl.XXXI, fig.4). Au terme de ce processus, toute la cavité du col est occupée par un mucilage à réseau arachnéen hydrophile favorable au déplacement des spermatozoïdes lors de la fécondation (pl.XXXII, fig.1).

#### 4. Les cellules de la paroi ventrale: les cellules du ventre de l'archégone

L'évolution de différents organites cellulaires a été suivie en détail en fonction du temps. La durée de l'étude recouvre trois saisons : de septembre à mars.

##### a) Développement de réticulum endoplasmique et de dictyosomes

Des coupes, réalisées dans les archégonés fixés de septembre à fin décembre, montrent que les cellules des cinq assises formant le ventre possèdent les caractéristiques de cellules jeunes : important volume du noyau, nucléole central constitué de fines granulations denses aux électrons, abondance de ribosomes, parois fines pourvues de nombreux plasmodesmes (pl.XXXII, fig.2).

A la mi-février, l'oosphère se différencie dans la cavité ventrale de l'archégone. A ce moment, réticulum endoplasmique et dictyosomes apparaissent dans les cellules de la paroi ventrale. Le développement de ces complexes survient d'abord dans les cellules de l'assise située contre l'oosphère ; puis il se poursuit dans les cellules des assises de plus en plus externes. Le réticulum endoplasmique lisse prend de l'importance. Il se disperse dans le cytoplasme en formant des petits tubules et des petites vésicules (pl.XXXIII, fig.1). Le réticulum endoplasmique granulaire est également bien représenté, souvent par groupes de 4 à 10 saccules empilés dans les angles formés par la rigidité de la paroi cellulaire (pl.XXXIII, fig.2). Les dictyosomes sont abondants et constitués de quelques saccules qui bourgeonnent des vésicules (pl.XXXIII, fig.3). Le développement de ces deux systèmes d'organites en feuilletés suggère que les cellules du ventre sont sur le point d'acquiescer une activité sécrétrice intense.

##### b) Sécrétion de mucilage

- premier stade de la formation de mucilage lors de la différenciation de l'oosphère.

Les deux types de réticulum et les dictyosomes, présents dans toutes les cellules des assises constituant la paroi ventrale, montrent un développement exceptionnel. Les dictyosomes (pl.XXXIII, fig.3) surtout, engendrent de nombreuses vésicules qui se dispersent dans le cytoplasme (pl.XXXIII, fig.4). L'aspect sinueux de la limite du cytoplasme (pl.XXXIII, fig.3 et 4) est en rapport avec deux processus. D'une part, les multiples vésicules sécrétrices prennent contact avec le bord et leur membrane fusionne avec le plasmalemma. D'autre part, le cytoplasme se rétracte. Des fossettes plus ou moins profondes sont visibles sur

le pourtour cellulaire. Souvent, des groupes de vésicules sont localisés dans ces fossettes et on peut même en observer dans le périplasma. Leur présence dans le périplasma pourrait indiquer un processus d'élimination, par la cellule, des membranes des nombreuses vésicules qui se succèdent. Le contenu de toutes les fossettes est ainsi déversé, peu à peu, contre les parois originelles. A la suite des abondantes sécrétions durant cette période, se développe progressivement une enveloppe épaisse. Elle forme une couche moins dense aux électrons que la paroi d'origine. Elle est constituée d'un enchevêtrement de fibrilles. L'oosphère, à ce stade, est entourée de 5 assises de cellules constituant la paroi ventrale.

- élaboration de mucilage lorsque  
l'oosphère s'isole dans la cavité ventrale

A ce moment, le gamète femelle se trouve enveloppé de mucopolysaccharides. Les cellules de la paroi ventrale, situées contre l'oosphère, dégénèrent les premières et sécrètent du mucilage. Progressivement, les cellules des 4 autres assises élaborent à leur tour du mucilage qui finit par entourer complètement l'oosphère. Le mucilage a une morphologie quasi homogène. Il est formé par un réseau arachnéen régulier. Dans ce dernier, apparaissent de nombreuses plages claires dans lesquelles on reconnaît une légère trame fibrillaire (pl.XXXIV, fig.1).

A la base de la cavité ventrale, sous le mucilage qui vient de s'élaborer, la paroi de quelques cellules se transforme peu à peu en un réseau fibrillaire constitué d'éléments disposés en nappe d'aspect plissé (pl.XXXIV, fig.2).

Des coupes semi-fines, traitées par le bleu de toluidine, montrent que le mucilage est de nature polysaccharidique ; nature confirmée par l'application du test de THIERY sur des coupes ultrafines qui réagissent positivement (pl.XXXVI, fig.1). Le bleu Alcian, colorant le mucilage en bleu sur des coupes semi-fines, indique plus précisément que les polysaccharides sont acides. Ce mucilage contient ainsi une grande partie de matières pectiques que le rouge de ruthénium colore mais il est certain qu'il ne comporte pas que cela. En effet, le développement du réticulum endoplasmique, qui accompagne celui de l'appareil de Golgi dans ces cellules, suggère l'insertion de produits protéiques dans le mucilage. Des coupes soumises à l'action de la pronase montrent par endroits des plages claires digérées par l'enzyme. Cette extraction confirme la présence de molécules protéiques dans le mucilage.

c) Formation de structures tubulaires ou tubules

Des ensembles, formés de structures tubulaires ou tubules, se développent et se mêlent au mucilage (pl.XXXV, fig.1). Ces formations se localisent surtout au niveau des parties latérales de l'oosphère. La plupart des tubules, sectionnés longitudinalement, constituent des faisceaux bien délimités dans

le mucilage. D'autres sont coupés transversalement (pl.XXXV, fig.2). Certains semblent même être fichés dans la paroi (pl.XXXV, fig.1). Les coupes traitées à l'acide chromique et à l'acide phosphotungstique montrent que la paroi des tubules est très dense aux électrons (pl.XXXV, fig.3). Le test de THIERY souligne nettement la membrane des tubules et fait ressortir fortement le réseau de mucilage présent entre les amas de tubules (pl.XXXVI, fig.1). A un grossissement plus élevé (pl.XXXVI, fig.2), les structures tubulaires, coupées transversalement, montrent une section cylindrique : leur diamètre est remarquablement constant. Ces structures sont formées d'une paroi épaisse de 80Å en moyenne, qui entoure un espace axial clair aux électrons. Ces tubules isolés ont effectivement la structure de cylindres creux.

Chaque tubule mesure 500Å de diamètre extérieur et 340Å de diamètre interne. La longueur de chaque faisceau est d'environ 1 µm. Suivant le plan de coupes, on observe, dans l'épaisseur des tubules, des sous-unités ayant une structure granulaire (pl.XXXVI, fig.3).

#### d) les plastes

De septembre à décembre, les plastes possèdent de nombreux granums et quelques grains d'amidon. En janvier, l'amidon disparaît presque complètement et des plastoglobules se mettent en place progressivement dans le stroma. Lors de la formation de l'oosphère, à la mi-février, les plastes prennent la forme d'une petite bouteille ventrue à col court (pl.XXXVII, fig.1). De longues lamelles stromatiques parcourent le plaste et s'écartent parfois en laissant apparaître des plages claires de stroma (pl.XXXVII, fig.1). Les caractéristiques les plus évidentes sont l'absence de granums et l'abondance de plastoglobules. Des petits saccules, ressemblant aux crêtes mitochondriales, se situent souvent aux deux extrémités du plaste (pl.XXXVII, fig.2). A cette époque de l'année, les plastes sont proches des mitochondries. Aucun contact entre l'enveloppe mitochondriale et l'enveloppe chloroplastique n'a été observé ; une mince couche de cytoplasme persiste toujours entre les deux types d'organites (pl.XXXVII, fig.1 et 3).

#### e) les organites à 2 zones concentriques

Les organites à deux zones concentriques (O.D.Z.C.) font leur apparition à une période précise (janvier) de la vie de l'archégone et disparaissent au moment de la fécondation. Il nous a semblé intéressant de déterminer l'origine et le devenir des O.D.Z.C.. Des coupes réalisées régulièrement dans des archégonés depuis septembre jusqu'à mars montrent l'évolution des O.D.Z.C..

#### - observations faites en septembre

Les premières ébauches des archégonés apparaissent à la mi-septembre. Une seule assise de cellules forme le ventre de l'archégone entourant le progamète. Ultérieurement, les cellules se divisent et donnent naissance à plusieurs assises de cellules.

A ce moment, on observe dans le cytoplasme quelques globules de faible densité, localisés préférentiellement le long du plasmalemme, (g, pl.XXXVII, fig.4). On note aussi des amas de taille à peu près identique à celle des globules précités, constitués de petits granules denses aux électrons (ag, pl.XXXVII, fig.4). A un plus fort grossissement, ces amas sont formés de granules denses aux électrons, mais aussi de quelques fibrilles (pl.XXXVIII, fig.1). La structure de ces amas évoque celle des nucléoles (pl.XXXVIII, fig.2). Dans un premier temps, ces amas sont localisés près de l'enveloppe nucléaire ; puis ils migrent vers la périphérie de la cellule (pl.XXXVII, fig.4).

- observations faites en octobre

Les archégonies sont verts et effilés ; ils possèdent distinctement un pseudopode, un ventre et un col. Aucun changement notable, par rapport aux observations faites en septembre, n'intervient au niveau ultrastructural dans les cellules du ventre. Les globules et les amas denses aux électrons sont toujours présents dans le cytoplasme.

- observations faites en novembre

Début novembre, les globules sont plus abondants que dans les cellules des stades précédents (pl.XXXVIII, fig.3). La pronase ne modifie pas l'aspect de ces globules. En revanche, la lipase les hydrolyse complètement en deux heures. De nombreuses vacuoles prennent des formes variées et certaines d'entre elles contiennent des substances denses aux électrons (sd, pl.XXXVIII, fig.3).

Fin novembre, les globules demeurent abondants et prennent souvent l'aspect d'haltères, évoquant une bipartition ou une fusion (pl.XXXIX, fig.1).

- observations faites en décembre et début janvier.

Au cours du mois de décembre, le centre des globules change de densité, il devient clair aux électrons (pl.XXXIX, fig.2). Un traitement par la pronase donne des résultats négatifs. En revanche, la lipase digère en deux heures le centre clair. Après trois heures de traitement par la lipase, le globule est entièrement digéré par l'enzyme. A cette époque, l'abondance de ribosomes ainsi que la présence de mitochondries, près des globules, retiennent l'attention (pl.XXXIX, fig.2).

- observations faites fin janvier et en février.

Fin janvier, les globules possèdent deux zones bien délimitées : une zone centrale dense aux électrons et une zone périphérique claire (pl.XL, fig.1 et 2). Des organites identiques ont déjà été décrits dans les cellules d'apex et dans les cellules d'ébauches sexualisées, nous les avons appelés organites à deux zones concentriques (O.D.Z.C.). Lors de cette étude, des tests cytochimiques, mettant en oeuvre la lipase et la pronase indiquaient la nature lipoprotéique de la zone centrale. L'application du test de THIERY (1967) nous renseignait sur la constitution glucidique de la zone périphérique.

Des coupes effectuées fin janvier, représentant des cellules ventrales dans lesquelles on observe les O.D.Z.C., sont traitées par la méthode de THIERY (pl.XL, fig.1 et 2). Elles montrent également que la zone périphérique des O.D.Z.C. est formée de glucides et que la zone centrale doit également en contenir.

Sur des coupes semi-fines, traitées au Soudan III et au Soudan IV, des organites, situés le long du plasmalemme, se colorent en rouge. Il s'agit des O.D.Z.C. décrits en microscopie électronique. Sur d'autres coupes semi-fines, le noir Soudan B colorent ces organites en noir.

Des coupes fines sont soumises à l'amyloglucosidase, utilisée à 0,3 % dans un tampon acétate, pH 4,5, à 45°C. L'enzyme digère la zone périphérique des O.D.Z.C. selon deux séquences principales. La partie la plus interne est dégradée en 1 heure (pl.XLI, fig.1), mais elle n'est totalement digérée qu'après trois heures d'incubation en présence de l'enzyme (pl.XLI, fig.2). Il faut attendre six heures d'action de l'enzyme pour que la partie la plus externe de la zone périphérique des O.D.Z.C. soit extraite (pl.XLI, fig.3). La zone centrale lipoprotéique ne semble pas affectée par les plus longues digestions. Les coupes témoin conservent les O.D.Z.C. intacts. Des traitements successifs par la lipase, la pronase et l'amyloglucosidase hydrolysent les O.D.Z.C. en totalité.

Début février, le nombre des O.D.Z.C. augmente (pl.XL, fig.2). Fin février, ils sont encore présents, lorsque la jeune oosphère est rattachée aux cellules de la paroi ventrale. Lorsque le gamète femelle s'isole dans la cavité ventrale de l'archégone et devient mature, les O.D.Z.C. commencent à disparaître. La partie centrale de ces derniers peut être libérée dans le cytoplasme (pl.XLI, fig.4) et parfois cette zone se trouve en contact direct avec le plasmalemme accolé à la paroi (pl.XLI, fig.5).

## II- DISCUSSION ET CONCLUSION

L'archégone des Sphaignes diffère peu de celui des Mousses ; en coupe longitudinale, les mêmes types cellulaires fondamentaux sont observés dans tous les appareils femelles. En revanche, ceux des Hépatiques sont quelque peu différents des précédents : ils sont plus trapus et leur forme rappelle celle d'une "cornue" et non celle d'une "bouteille" ; ils ne possèdent ni pédicelle, ni pseudopode. Chez les Ptéridophytes et chez les Gymnospermes on retrouve un plan d'organisation semblable à celui des archégonies de Bryophytes.

De multiples paraphyses sécrétant des mucilages entourent les archégonies et anthéridies des Mousses. Chez les Sphaignes SCHIMPER (1848) aurait trouvé des structures identiques. Mais dans son étude sur S. subsecundum, BRYAN (1915) confirme qu'il n'y a pas de paraphyses ni autour des archégonies, ni autour des anthéridies. Il suggère que les auteurs ont certainement appelé

paraphyses des hyphes mycéliennes de Tilletia sphagni qui abondent autour de l'apex sexualisé. Nos observations sur S. flexuosum et S. palustre sont en accord avec cette hypothèse.

Les cellules du col possèdent du réticulum endoplasmique et des dictyosomes ; ces deux types d'organites participent à la sécrétion du mucilage qui remplira ultérieurement le canal du col. Il existe aussi, dans ces cellules, des organites à deux zones concentriques, les O.D.Z.C., que l'on retrouve dans les autres cellules formant le ventre de l'archégone, dans les cellules de l'apex et dans celles des ébauches foliaires.

Les cellules du canal du col dégénèrent et se transforment entièrement en mucilage. Cette évolution n'est pas identique à celle observée chez d'autres Bryophytes (Mnium undulatum, VIAN et al., 1970) ; Mnium undulatum et Fossombronina angulosa, BAJON, 1981). Chez S. flexuosum et S. palustre, de très rares dictyosomes sont observés dans les cellules du canal du col et ces espèces se distinguent donc par l'absence d'une phase golgienne intervenant habituellement dans les phénomènes de sécrétion.

Quatre éléments caractérisent les cellules de la paroi du ventre.

Le premier est l'abondance des plastoglobules et la présence de granums bien structurés dans les plastes observés en janvier. Dès la mi-février, lors de la formation de l'oosphère, les plastes deviennent ventrus ; les granums disparaissent ; les lamelles stromatiques parcourent les organites sur toute leur longueur ; ces lamelles s'écartent par endroits, ce qui permet d'observer des plages claires de stroma. A cette époque, les plastes sont en contact intime avec de nombreuses mitochondries.

Le deuxième élément est l'important développement du réticulum endoplasmique granulaire et agranulaire ainsi que des dictyosomes, qui précède l'isolement de l'oosphère dans la cavité ventrale. La différenciation et la maturation du gamète femelle s'accompagnent de modifications au niveau des cellules du ventre de l'archégone. La cavité ventrale s'accroît. Elle se remplit de mucilage, formé d'abord par les cellules bordant la cavité, puis par les cellules des autres assises. L'oosphère n'intervient chez Sphagnum palustre que pour une faible part dans la sécrétion du mucilage, contrairement à ce qu'observe BAJON (1981) chez Mnium undulatum et Fossombronina angulosa. Ce mucilage est un mélange de polysaccharides riches en pectines et en molécules protéiques. Cette sécrétion holocrine est élaborée grâce à l'activité du réticulum endoplasmique et des dictyosomes présents dans toutes les cellules du ventre. L'hypertrophie de la cavité ventrale n'est pas due, comme l'a décrit BAJON (1981) chez M. undulatum, à la multiplication des cellules de la paroi ventrale. La cavité ventrale s'agrandit, au contraire, chez S. palustre, du fait de la disparition des cellules ventrales qui se transforment progressivement en mucilage. Le nombre de cellules n'augmente seulement qu'au moment du développement de l'embryon comprenant

21 cellules. En effet, à ce stade, on assiste à une division des cellules de la rangée la plus externe reformant ainsi des assises de cellules qui constitueront une barrière de protection pour l'embryon.

La paroi de quelques cellules situées à la base de la cavité ventrale, sous le mucilage qui vient de s'élaborer, se transforme en un réseau fibrillaire constitué d'éléments en nappe d'aspect plissé. BOUCHET (1980) décrit le même phénomène chez Zebrina pendula (Commélinacées) et l'interprète comme du mucilage condensé.

Le troisième élément est la présence de nombreuses structures tubulaires dans la cavité ventrale. Ces tubules, mélangés aux mucopolysaccharides, posent un problème quant à leur origine et leur devenir. De telles structures ont été observées une fois par BAJON (communication personnelle) autour de l'oosphère de M. undulatum. A notre connaissance, elles ne sont pas connues ni chez les Ptéridophytes, ni chez les Gymnospermes, ni chez les Végétaux supérieurs.

Enfin, le quatrième élément est la présence d'organites à deux zones concentriques (O.D.Z.C. ) ; ils sont limités par une membrane que le test de THIERY souligne et sont situés le long du plasmalemme. Les cellules des cinq assises constituant le ventre de l'archéogone présentent des O.D.Z.C.. Des observations régulières, à des intervalles de 8 jours, de septembre à fin février, ont permis de connaître l'origine et l'évolution des O.D.Z.C. à la suite des résultats des tests cytochimiques. Lors de la différenciation des archéogones, quelques globules apparaissent dans le cytoplasme constituant ces organes. La lipase indique que ce sont des globules lipidiques. Des amas grossièrement sphériques formés de granules et de fibrilles denses aux électrons sont observés simultanément dans le même territoire des cellules. Localisés dans un premier temps près de l'enveloppe nucléaire, puis migrant vers la périphérie de la cellule, nous pensons que ces amas granuleux sont des extrusions nucléaires. D'ailleurs leur structure évoque celle des nucléoles. Les amas disparaissent en décembre. A cette époque, le centre des globules lipidiques devient clair aux électrons. La lipase digère, en deux temps, l'ensemble du globule ; ce qui indique que ces globules lipidiques sont constitués de lipides de nature différente.

Fin janvier, les organites sont formés de deux zones concentriques de constitution chimique différente ; zone centrale lipoprotéique et zone périphérique glucidique. Des protéines s'intègrent probablement aux globules lipidiques dès le mois de décembre ; cette intégration surviendrait au moment où les globules lipidiques changent d'aspect. Le noir Soudan B permet de déduire que les lipides sont des triglycérides. La lipase digérant la partie centrale des organites confirme que cette zone est constituée de triglycérides. Une partie de ces derniers pourrait se convertir en glucides selon une voie métabolique décrite chez les végétaux (WEIL, 1983), elle serait à l'origine de

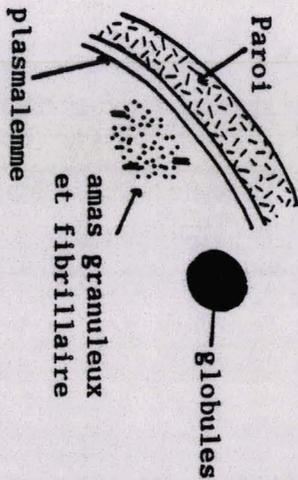
la formation de la zone périphérique. La partie centrale contiendrait des triglycérides non transformés, liés à des protéines. La digestion de la zone périphérique par l'amyloglucosidase prouve qu'elle est riche en polysaccharides puisque l'enzyme coupe spécifiquement les liaisons osidiques  $\alpha$ 1-4- unissant les unités de D-glucose. Les résultats du test de THIERY (1967), même faiblement positifs, confirment aussi la présence de polysaccharides . Nous suggérons qu'il existe deux constituants différents de la zone périphérique, car l'amyloglucosidase la digère, sans ambiguïté, en deux temps et montre que cette zone est formée elle-même de deux couches concentriques.

Les raisons de la disparition des O.D.Z.C. lors de la fécondation ne sont pas connues. Nous avons remarqué, d'une part, que le centre lipoprotéique se répand dans le cytoplasme et que, d'autre part, il peut être expulsé hors de la cellule. C'est à ce moment que les organites disparaissent pour former des réserves trophiques métaboliquement utilisables par l'oeuf et par l'embryon. La zone périphérique glucidique pourrait participer à l'élaboration des sécrétions de mucopolysaccharides localisés autour de l'oosphère, puis autour de l'embryon.

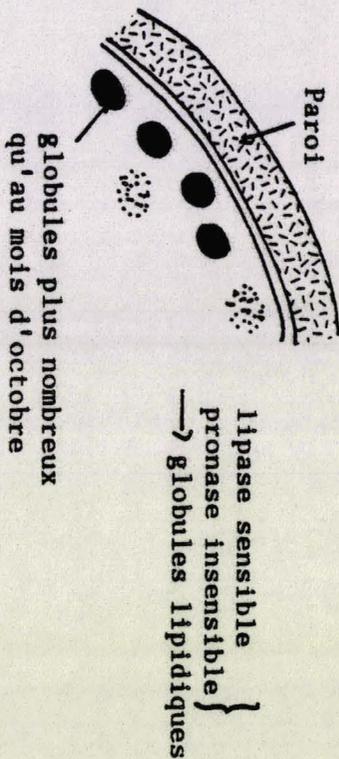
La figure 1, p.84, récapitule l'évolution chronologique de ces organites.

FIG. 1 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'EVOLUTION DES O.D.Z.C.

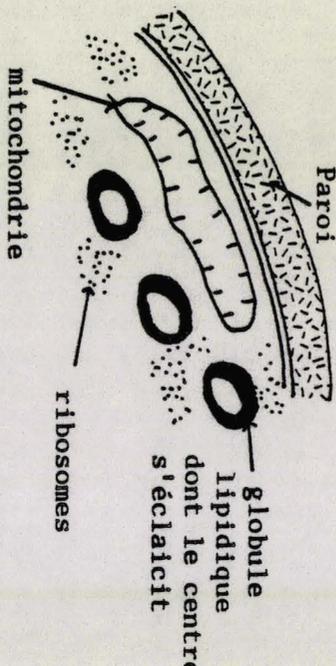
Septembre - Octobre



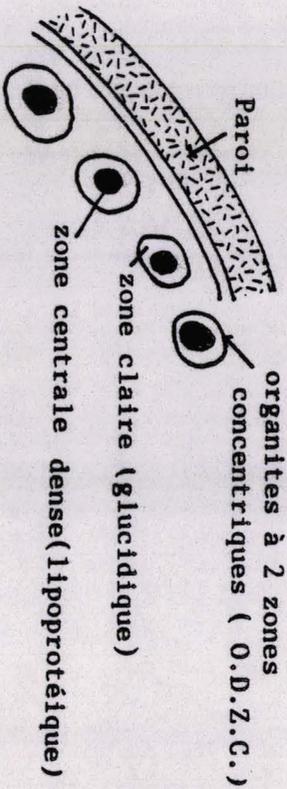
Novembre



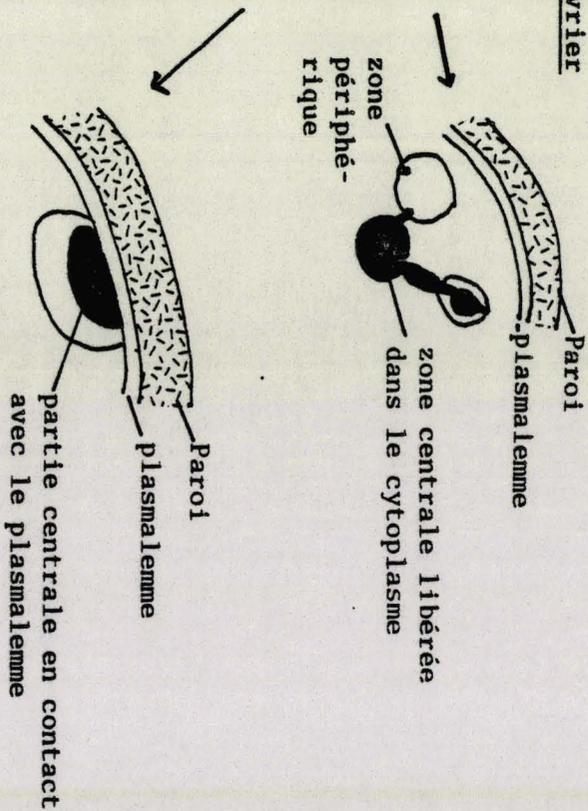
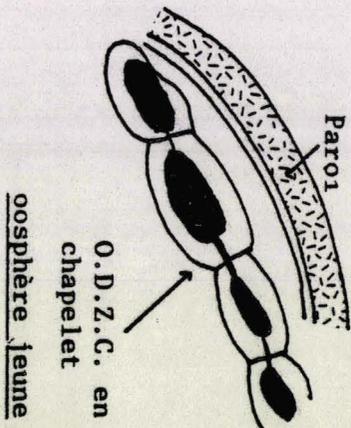
Décembre - Janvier



Fin janvier - début février



Fin février



oosphère en cours de maturation

les O.D.Z.C. commencent à disparaître

CHAPITRE II

L'OOSPHERE DE S. PALUSTRE

## I. - RESULTATS

Nous résumons ici les résultats concernant l'étude de l'oosphère, actuellement sous presse, dans le Journal Canadien de Botanique (FABRE, 1987).

Au centre de la cavité ventrale de l'archégone se niche l'oosphère, nous nous proposons d'en étudier maintenant son origine et sa différenciation.

### A. - STADE DU PROGAMETE

Le progamète possède des caractères qui permettent de le distinguer facilement des autres cellules de l'archégone (pl.XLII, fig.1). Il est de forme singulière ; en section longitudinale, il apparaît allongé et convexe à la base, il mesure, environ 23  $\mu\text{m}$  de longueur sur 10  $\mu\text{m}$  de largeur (pl.XLII, fig.2). Ses fines parois sont traversées par quelques plasmodesmes. Celle qui le sépare de la cellule primaire du canal est rectiligne et à peu près perpendiculaire à l'axe de l'archégone. Le noyau circulaire est beaucoup plus volumineux que celui des cellules du ventre. Les plastes contiennent peu de lamelles et certains montrent de petites plages claires. Les mitochondries, assez abondantes, sont souvent proches des plastes. Le cytoplasme possède également de nombreuses vacuoles et renferme des globules lipidiques localisés préférentiellement à la périphérie du plasmalemme.

### B. - STADE DU GAMETE FEMELLE : INDIVIDUALISATION DE L'OOSPHERE

#### 1) Individualisation du gamète

Après la division asymétrique du progamète, le cytoplasme se trouve inégalement réparti entre l'oosphère et une nouvelle cellule du canal du ventre appelée cellule ventrale. La jeune oosphère, qui dans un premier temps, a une forme semblable à celle du progamète, devient sphérique. Elle contient la plus grande partie des organites que renfermait le progamète originel. La cellule du canal du ventre, plus petite, présente une ultrastructure proche de celle de la jeune oosphère. Les plasmodesmes qui unissaient le progamète âgé aux cellules pariétales ne sont plus visibles. Seuls demeurent bien distincts ceux qui assurent des continuités entre les deux cellules récemment formées.

#### 2) L'oosphère jeune

Les deux cellules, issues du progamète, restent accolées un certain temps ; puis les plasmodesmes disparaissent. La jeune oosphère possède des contours arrondis, ses parois minces restent solidaires des cellules du ventre (pl.XLIII, fig.1). Le noyau central possède un contenu finement granulaire et homogène, il est limité par l'enveloppe nucléaire au contour sinueux.

Le cytoplasme comporte de nombreuses vacuoles, des plastes allongés comme ceux du progamète, bien que plus étroits, des mitochondries disséminées, des dictyosomes en nombre plus élevé que dans le progamète, et enfin des globules lipidiques dispersés.

### 3) L'oosphère à un stade plus âgé.

L'oosphère devient rapidement sphérique (pl.XLIV, fig.1) et se détache progressivement des autres cellules ; elle se retrouve ainsi isolée dans le ventre de l'archégone, entourée de mucopolysaccharides (pl.XXVI, fig.2). Le noyau, au contour un peu plus régulier qu'au stade précédent, possède toujours une chromatine homogène (pl.XXVII, fig.2). Les plastes contiennent des lamelles plus distantes que précédemment et quelques plastoglobules font leur apparition. Le réticulum endoplasmique granulaire prend de l'importance. Ses saccules sont associés en groupes grossièrement parallèles, de préférence situés à la périphérie de la cellule. De nombreuses inclusions lipidiques sont aussi présentes et ont tendance à migrer vers le plasmalemme.

### 4) L'oosphère mûre

Comme la cavité ventrale de l'archégone s'agrandit, le cytoplasme de l'oosphère se rétracte progressivement. On peut alors considérer que l'oosphère est parvenue à maturité. Deux étapes dans cette transformation ont pu être reconnues (pl.XLV, fig.1 et 2). Au cours de la première, le plasmalemme présente des replis, ce qui donne au contour de la cellule un aspect festonné. Les plastes grandissent par rapport à ceux de l'oosphère jeune. Les grains d'amidon sont abondants et de nombreux plastoglobules apparaissent au cours de cette étape (pl.XLV, fig.1). Les mitochondries sont également plus grandes que celles observées au stade précédent. Au cours de la maturation, le réticulum se transforme : des citernes allongées et souvent associées en groupes parallèles, situés à la périphérie de l'oosphère jeune, se fragmentent et finalement se dispersent. Simultanément à l'apparition des corps myéliniques, les vacuoles confluent ; elles contiennent parfois des vésicules de tailles différentes. Les globules lipidiques, fortement osmiophiles, répartis dans les diverses régions du cytoplasme de l'oosphère jeune, migrent à la périphérie de la cellule et se disposent régulièrement contre le plasmalemme. La cellule ventrale présente les mêmes caractéristiques ultrastructurales que celles de l'oosphère.

Au cours de la seconde étape, l'oosphère sphérique s'isole complètement dans la cavité ventrale et perd ses relations avec la cellule ventrale et avec les autres cellules de l'archégone. Le noyau de l'oosphère occupe une position centrale et son contenu est très opaque. L'enveloppe nucléaire présente un contour sinueux à l'image du plasmalemme (pl.XLV, fig.2). Le cytoplasme est bien pourvu en nombreuses petites vésicules, parfois coalescentes, formant des groupes qui alternent avec des ensembles de mitochondries très allongées (pl.XLV, fig.2). Quelques plastes subsistent dans la cellule, mais dans un état

avancé de dégradation ; ils ne possèdent plus que de nombreux petits plastoglobules.

## II.- DISCUSSION ET CONCLUSION

### L'organisation du progamète

Au cours de la croissance de l'archégone, le progamète de S. palustre subit une évolution différente de celle des autres cellules. De forme parallélépipédique il possède un cytoplasme riche en organites. Il ressemble ainsi au progamète de Mnium undulatum (BAJON, 1981). Mais dans le cytoplasme de ce dernier existe un ensemble ressemblant à un nucléole appelé nucléole cytoplasmique qui n'a jamais été observé dans notre matériel. En fait, cette structure est caractéristique du gamète femelle de Mnium et a déjà fait l'objet de descriptions en microscopie photonique dans plusieurs espèces du genre (HOLFERTY, 1904 ; POTTIER, 1921 ; BRYAN, 1927 ; HAMANT, 1954).

### L'organisation de l'oosphère

La différenciation de l'oosphère débute à la mi-février. Il est difficile d'établir, avec précision, la durée de la maturation. Mais ce phénomène doit être assez rapide puisque la fécondation peut se réaliser dès la première semaine de mars.

L'oosphère jeune, de forme polyédrique, possède encore sa paroi, reliée partiellement aux cellules du ventre. Elle possède à ce stade tous les caractères d'une cellule méristématique comme chez les oosphères jeunes de Mnium undulatum et de Fossombronia angulosa décrites par BAJON (1981) et celle de Marchantia polymorpha observée par ZINSMEISTER et CAROTHERS (1974).

L'oosphère à un stade plus avancé se transforme rapidement en une cellule sphérique. Au niveau ultrastructural, le nombre de vacuoles augmente par rapport à ce que l'on observe dans l'oosphère jeune. Le réticulum endoplasmique prend de l'importance et forme des groupes de saccules parallèles situés de préférence à la périphérie de la cellule.

Le noyau n'est jamais multilobé comme chez Marchantia polymorpha, où l'enveloppe nucléaire forme des replis et des lobes, parfois en doigt de gant, au cours de la maturation de l'oosphère (ZINSMEISTER et CAROTHERS, 1974). Quelle que soit sa morphologie, l'enveloppe possède de nombreux pores pendant toute la maturation de l'oosphère.

L'oosphère se trouve assez rapidement emballée de sécrétions polysaccharidiques, semblables à celles qui existent chez d'autres Bryophytes (BAJON, 1981). Mais l'origine de ces polysaccharides, comme nous l'avons déjà mentionné, est différente chez les Sphaignes de celle reconnue chez les autres Bryophytes.

Chez Mnium et chez Fossombronina dans l'oosphère mûre, BAJON (1981) indique la présence d'une polarité nette, se manifestant par le regroupement de petites vacuoles à l'un des pôles. Cette polarité n'est pas aussi évidente chez S. palustre, bien qu'il existe des secteurs cytoplasmiques regroupant des organites de même nature. Certains phénomènes, comme la rotation de l'oosphère au sein du mucilage fluidifié, peuvent intervenir dans ces regroupements. Enfin, on peut aussi suggérer que des organites se déplacent dans le cytoplasme, avant la fécondation. La mise en place de cette polarité jouerait un rôle important dans les premières étapes du développement de l'embryon.

## C I N Q U I E M E      P A R T I E

LA FECONDATION ET L'EMBRYOGENESE  
DE S. PALUSTRE

CHAPITRE I

LA FECONDATION

## I.- HISTORIQUE

Les plus anciennes observations concernant le rapprochement des cellules sexuelles chez les Bryophytes remontent à HOFMEISTER (1851) ; cet auteur voit des gamètes mâles dans le col archégonial de Funaria hygrometrica et ROZE (1872) observe le même phénomène chez un Sphagnum. Une intéressante contribution est faite par ARNEL (1875), elle est relative à une Mousse Discelium nudum ; l'auteur a assisté à la pénétration des spermatozoïdes dans l'archégone, puis à "leur danse" autour de l'oosphère. Chez les Hépatiques, nous possédons des détails plus précis provenant des recherches de KRUCH (1890) sur Riella clausonis, de RICKETT (1923) sur Sphaerocarpus donnellii et surtout de SCHOWALTER sur diverses Hépatiques anacrogynes : Riccardia pinguis (1926), Fossombronia angulosa (1927a), Pellia fabbronia (1927b). D'après l'ensemble de leurs travaux, on peut conclure que le processus de la fécondation n'est pas uniforme chez les Hépatiques et qu'il emprunte plusieurs modalités. En 1954, HAMANT décrit la fécondation, après insémination artificielle chez Mnium hornum, M. punctatum et M. undulatum. Il conclut que la pénétration du gamète mâle peut s'effectuer dans l'oosphère en un point quelconque de la membrane plasmique de cette cellule, cependant, le plus souvent, le gamète femelle est abordé par la surface la plus voisine du canal du col. Les cils pénètrent dans l'oosphère et sont abandonnés dans le cytoplasme au cours de ce stade ; la caryogamie intervient.

A notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise en microscopie électronique chez les Bryophytes concernant la fécondation.

## II.- RESULTATS

Nous résumons ici des travaux, actuellement sous presse dans le Journal Canadien de Botanique (FABRE, 1987), effectués sur Sphagnum palustre.

Après la disjonction des cellules du canal du col et leur transformation en mucilage, les gamètes mâles peuvent s'engager dans le col. Ils parviennent dans la cavité ventrale, pleine, elle aussi, de mucopolysaccharides. Le spermatozoïde pénètre dans l'oosphère au niveau d'une région localisée vers le col. Le gamète mâle traverse le plasmalemme (pl.XLVI, fig.1) du gamète femelle et sa pénétration provoque un cône de dépression du cytoplasme femelle (pl.XLVI, fig.1). En pénétrant dans l'oosphère, le spermatozoïde entraîne les flagelles qui demeurent à proximité du plasmalemme. Il entraîne également une partie des microtubules formant la languette et un fragment de la couche S<sub>1</sub> de la plaquette stratifiée. Ces deux éléments, languette et plaquette stratifiée, sont spécifiques des spermatozoïdes des Bryophytes. Seul, le noyau mâle s'enfonce dans le cytoplasme de l'oosphère ; il n'est pas accompagné des éléments cytoplasmiques du spermatozoïde. La chromatine mâle est très condensée ; son

opacité aux électrons la rend aisément reconnaissable. Le noyau mâle se dés spiralise et reprend la morphologie presque sphérique usuelle. Arrivé au contact du noyau femelle, le noyau mâle s'y accole étroitement (pl.XLVI, fig.2). Les deux noyaux sont alors entourés par une seule enveloppe nucléaire, assez sinueuse et décollée de la chromatine femelle (pl.XLVI, fig.2). On peut remarquer qu'une membrane transitoire sépare les deux noyaux.

Les mitochondries, d'origine femelle, sont rassemblées et leur matrice reste dense aux électrons (pl.XLVI, fig.1). Dans le cytoplasme de l'oosphère fécondée apparaissent aussi de nombreux éléments sphériques de membranes lisses. Ces éléments s'organisent en 5 ou 6 feuilletts oblongs ou sphériques (pl.XLVI, fig.2).

### III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Des prélèvements effectués dans la nature, à des intervalles de trois jours, depuis la mi-février jusqu'à la fin mars, nous ont permis de réaliser trois observations fondamentales .

- La pénétration du spermatozoïde dans l'oosphère ; le spermatozoïde aborde le gamète femelle par la zone en face du col de l'archégone. Le même phénomène est décrit par HAMANT (1954) chez Mnium punctatum, M.undulatum et M.hornum ; mais il précise que le gamète femelle peut être aussi abordé "par les faces latérales et inférieures, bien que la couche de mucilage qui sépare l'oosphère de la paroi y soit souvent fort mince".

- Le stade d'accolement du noyau mâle et du noyau femelle précédant la fusion des deux noyaux : à notre connaissance, cette phase est décrite pour la première fois chez les Bryophytes.

- L'origine des organites du cytoplasme de l'oeuf : compte tenu du nombre réduit d'organites du cytoplasme présents dans le spermatozoïde mature de S. palustre, il est vraisemblable que les organites existant dans l'oosphère fécondée soient en grande partie, sinon totalement, d'origine femelle. Ce fait est confirmé chez des Mousses, Bryum capillare (BONNOT, 1967a), Polytrichum sp. (PAOLILLO, 1974) et chez une Hépatique Sphaerocarpus donnellii (DIERS, 1966). Ces auteurs observent le plaste et les mitochondries du spermatozoïde dans le canal du col archégonial ; en revanche, chez Marchantia polymorpha (PAOLILLO, 1974) le plaste et les mitochondries pénétreraient dans l'oosphère et persisteraient dans le zygote. Quoiqu'il en soit, chez les Bryophytes, même dans les cas où les organites du spermatozoïde seraient intégrés au cytoplasme du zygote, cet apport ne peut être que quantitativement minime, le gamète mâle ne contient en effet qu'un seul plaste et quelques mitochondries.

Chez S. palustre, les spermatozoïdes sont différenciés à la mi-septembre et ne sont libérés que début mars. Déjà, en septembre, les gamètes mâles présentent un volumineux plaste amylofère. Nous pensons que cet amidon sert de réserves aux

spermatozoïdes ; il leur permet d'attendre jusqu'en mars une certaine chaleur pour être libérés et aller rejoindre l'oosphère. De ce fait, l'amidon du plaste serait utilisé avant que la fécondation ne se réalise. Les plastes observés dans l'oosphère fécondée et dans l'embryon seraient alors d'origine femelle.

Au sein des Ptéridophytes, chez Pteridium aquilinum, les mitochondries du gamète mâle semblent s'incorporer au cytoplasme du zygote, mais pas les plastes (TOURTE, (1975b); chez Marsilea vestita en revanche, les plastes et les mitochondries du gamète mâle ne s'incorporent pas au cytoplasme embryonnaire car la plupart de ces organites sont éliminés avant la fusion des gamètes (MYLES, 1975).

Chez les Gymnospermes, la participation du cytoplasme mâle à la constitution du proembryon a été montrée par FAVRE-DUCHARTRE (1956), par GIANORDOLI (1964) et par CAMEFORT (1967). L'apport du cytoplasme mâle dans l'oosphère fécondée est confirmé par CHESNOY (1973) qui indique que, pour l'essentiel, les mitochondries et les plastes du proembryon sont d'origine mâle. GIANORDOLI (1978) mentionne que la transmission des plastes par voie paternelle est la règle chez toutes les familles de Gymnospermes étudiées actuellement ; quant aux mitochondries, elles peuvent être soit essentiellement d'origine paternelle soit d'origine biparentale. Ce fait semble bien caractéristique des Gymnospermes sensu stricto car MOUSSEL (1978) montre que chez une Chlamydosperme Ephedra distachya, les plastes et les mitochondries des proembryons sont essentiellement d'origine femelle.

Chez les Angiospermes, le problème des apports mâle et femelle en plastes et en mitochondries lors de la fécondation n'a été étudié que chez un nombre réduit d'espèces. L'origine uniquement femelle des plastes de l'embryon est évidemment la règle dans tous les cas où la cellule spermatogène est dépourvue de plastes (chez Orchis CHARDARD, 1958 ; chez Endymion ANGOLD, 1968 ; chez Solanum CLAUSCH et GRUN, 1977). Cependant, chez l'Orge, dont le gamète mâle possède des plastes, l'ensemble du cytoplasme spermique semble s'incorporer au cytoplasme de l'oosphère (CASS et JENSEN, 1970) et chez une Oenothère (MEYER et STUBBE, 1974), dont le gamète mâle montre également des plastes, le stock plastidal du zygote est pour environ 1/3 d'origine mâle.

Au sein du règne animal, chez un Tunicien, (URSPRUNG et SCHABTACH, 1965) le spermatozoïde perd ses mitochondries dans l'espace périvitellin avant sa pénétration dans l'oeuf, mais dans la majorité des cas étudiés, aussi bien chez les Invertébrés (PASTEELS, 1965 ; ANDERSON, 1968 ) que chez les Vertébrés (PRESLEY, 1969), les mitochondries du spermatozoïde rassemblées dans la pièce intermédiaire pénètrent dans l'oeuf avec le noyau spermique. Selon ANDERSON, 1968, la plupart des mitochondries mâles dégèrent après leur pénétration. GILES (1980) conclut, dans son étude sur l'espèce humaine, que l'ADN mitochondrial est transmis par la mère.

## CHAPITRE II

L'EMBRYOGENESE. PREMIERES ETAPES DE  
L'EMBRYOGENESE ET ULTRASTRUCTURE  
DE L'EMBRYON

## I. - HISTORIQUE

Peu d'études ont été réalisées concernant la cytologie de l'embryon des Bryophytes. En 1905, CAMPBELL suit le développement de l'embryon chez S. acutifolium. HAMANT (1954) observe différentes étapes de l'embryogenèse chez 3 espèces de Mnium. Récemment, quelques aspects ultrastructuraux du zygote chez une Mousse Physcomitrium cyathicum sont décrits par LAL et al., 1985. Nous nous proposons de suivre à l'aide de la microscopie photonique et de la microscopie électronique les différents stades embryonnaires chez S. palustre comblant ainsi la lacune existant chez les Sphaignes.

## II. - RESULTATS

Les différents stades du développement embryonnaire sont décrits chez S. palustre. Seuls les résultats concernant l'embryon au stade à deux cellules sont publiés dans les Annales de Sciences, de l'Université de Reims (FABRE, 1987).

### A. - L'EMBRYON AU STADE A DEUX CELLULES (fig.1a,p.97)

La première division de l'oeuf donne deux cellules de tailles voisines et qui se superposent : la partie supérieure de la cellule supérieure se termine en pointe recourbée vers le bas ; la cellule inférieure est grossièrement cubique (fig.1, a, p.97). La cellule supérieure possède un noyau volumineux, multilobé ; la chromatine est dispersée (p.97, fig.1a et pl.XLVII, fig.1). Le nucléole central comprend deux zones concentriques : une interne claire et une externe dense aux électrons. Les plastes sont allongés, rectilignes (pl.XLVII, fig.2) ou en forme de croissant. Le stroma reste dense aux électrons ; les lamelles granaires demeurent peu nombreuses, rarement empilées. Les réserves amyliacées prennent la forme de nombreux grains volumineux. D'autres plastes s'étirent et se terminent par une vésicule. Les mitochondries polymorphes, ont l'aspect de filament, de court bâtonnet (pl.XLVII, fig.2) et de cupule (pl.XLVII, fig.3). Ces mitochondries ensèrent des plages cytoplasmiques qui contiennent des ribosomes et parfois du réticulum endoplasmique. Le cytoplasme est riche en ribosomes, à l'état de monosomes ou associés en polysomes, ces particules ribonucléoprotéiques sont associées aux membranes du réticulum endoplasmique. Ce dernier comprend plusieurs types de nappes. Certains sont courts, simples ou ramifiés, formant un réseau dans le cytoplasme. D'autres sont étendus, à peu près parallèles, situés principalement à la périphérie de la cellule (pl.XLVII, fig.2). Enfin, les globules lipidiques, peu osmiophiles, se dispersent.

La cellule inférieure possède un noyau plus petit et plus dense aux électrons que celui de la cellule supérieure. Le cytoplasme se caractérise par une abondance de petites vacuoles localisées à la partie supérieure de la cellule et de deux grosses vacuoles qui, en coupe transversale, se situent de part



et d'autre du noyau (fig.1, a, p.97). A ce stade, l'embryon baigne dans une substance riche en mucopolysaccharides. On retrouve le même type de mucilage à réseau arachnéen que celui qui entoure l'oosphère. Des plages claires remplies de corps vésiculaires sont visibles dans ce réseau. A nouveau, on observe, mélangées au mucilage, des structures tubulaires. Elles se disposent, plus particulièrement sur les zones latérales de l'embryon, comme pour l'oosphère.

#### B.- L'EMBRYON AU STADE A CINQ CELLULES (fig.1b, p.97)

La cellule supérieure ne se modifie pas pendant quelques jours. Elle conserve sa grande taille et sa forme singulière caractérisée par un crochet supérieur. Cette cellule possède un gros noyau multilobé, pourvu d'un nucléole central dense aux électrons. Le stade à cinq cellules résulte de divisions de la cellule inférieure. Les cellules, situées sous la cellule supérieure possèdent un noyau assez volumineux, au contour sinueux et à chromatine régulièrement dispersée. De nombreuses vacuoles entourent le noyau (pl.XLVIII, fig.1). Les quelques mitochondries et les quelques plastes se dispersent dans le cytoplasme. A ce stade, l'embryon est encore entouré de mucopolysaccharides mélangés à des structures tubulaires. Mais ces dernières ne sont plus si nettement assemblées en faisceaux.

#### C.- L'EMBRYON AU STADE A NEUF CELLULES (fig.1c, p.97)

La cellule supérieure ne s'est toujours pas divisée, mais elle a perdu son crochet supérieur, elle s'arrondit et ressemble aux autres cellules. Les vacuoles sont confluentes. Les plastes allongés possèdent de gros grains d'amidon et quelques plastoglobules (pl.XLVIII, fig.2). Les mitochondries sont petites et polymorphes. A ce stade les tubules mélangés au mucilage se dispersent dans la cavité ventrale (pl.XLVIII, fig.3).

#### D.- L'EMBRYON AU STADE A 15 CELLULES (fig.1d, p.97).

La cellule supérieure se divise, à son tour, les cloisons qui résultent de ces divisions sont obliques. A ce stade, les cellules forment un ensemble méristématique d'aspect usuel. Les fines parois sont perforées de nombreux plasmodesmes (pl.XLIX, fig.1). La chromatine est finement granuleuse ; il est fréquent d'observer deux masses nucléolaires, à structure granulaire, de tailles inégales. A ce stade, les proplastes volumineux contiennent plusieurs lamelles stromatiques groupées par 2 ou 3. On n'observe pas encore d'empilements granaires (pl.XLIX, fig.2) et d'abondants petits plastoglobules se disséminent dans le stroma. La répartition des mitochondries est ubiquiste. Le réticulum endoplasmique granulaire prend l'aspect de citernes allongées, associées en feuillets parallèles, situées à la périphérie des cellules. Enfin, les nombreuses vacuoles sont rejetées contre les parois. Au stade à 15 cellules, l'embryon

baigne toujours dans un mucilage hétérogène. Une partie, en effet, se concentre et forme des réseaux à contours irréguliers d'où partent des fibrilles de mucilage (pl.XLIX, fig.3). Les tubules se rassemblent sous forme d'amas constituant des masses sphériques denses aux électrons (pl.XLIX, fig.3). Ces amas de tubules se localisent de préférence le long des parois appartenant aux cellules du ventre (pl.L, fig.1).

#### E.- L'EMBRYON AU STADE A 45 CELLULES (fig.1e, p97)

Le schéma représente un embryon constitué de 45 cellules occupant toute la cavité ventrale. A ce stade, les parois des cellules sont plus épaisses que leurs homologues des embryons plus jeunes. Les proplastes différenciés en chloroplastes, possèdent des granums habituels et de volumineux grains d'amidon (pl.L, fig.2). La présence de nombreux pores nucléaires suggère l'importance des échanges nucléocytoplasmiques (pl.L, fig.2). Le noyau des cellules basales s'aplatit et le nucléole semble se fragmenter (pl.L, fig.3).

### III.- DISCUSSION ET CONCLUSION

L'embryon à deux cellules de S. palustre est constitué d'une cellule supérieure et d'une cellule inférieure de tailles très voisines et de morphologies différentes. Ceci oppose les Sphagnum au Mnium car, dans ce dernier genre, la division de l'oeuf donne deux cellules de tailles inégales et de formes différentes. Ainsi HAMANT (1954) observe "une cellule supérieure subsphérique et une cellule inférieure conique". Un élément nouveau apparaît dans la morphologie du noyau dans les deux cellules formant l'embryon de S. palustre. En effet, cet organite est multilobé, alors qu'un tel aspect n'a jamais été observé dans les stades précédents. En revanche, cette morphologie curieuse a été décrite dans l'oosphère de Marchantia polymorpha par ZINSMEISTER et CAROTHERS (1974).

Au stade à 15 cellules, l'embryon de S. palustre forme un ensemble méristématique que l'on retrouve jusqu'à l'embryon constitué de 45 cellules. A ce stade, on peut reconnaître deux territoires rappelant ceux que CAMPBELL décrit (1905) dans l'embryon au stade à 41 cellules chez S. acutifolium. Cet auteur identifie une région supérieure qui donnera naissance au tissu sporogène et une région inférieure dont les cellules formeront le pied. Ce dernier, encore appelé suçoir, fixe l'embryon dans les tissus du gamétophyte feuillé et facilite sa nutrition. HAMANT (1954) distingue aussi deux ensembles dans l'embryon, au stade à 47 cellules de M. punctatum. Cet auteur rapporte que lorsque l'embryon a atteint la taille de 600 $\mu$ m et qu'il se situe encore dans la cavité ventrale de l'archégone, deux parties sont aisément reconnaissables : le suçoir et le méristème terminal qui est à l'origine de la soie, puis de l'urne. La différenciation de cette dernière est tardive. Il n'en est pas de même chez S. palustre. Enfin à l'opposé de ce qui est connu chez les autres

Mousses, le suçoir chez les Sphaignes disparaît quand le sporophyte est constitué.

Un autre caractère important à souligner est la présence de mucopolysaccharides et de structures tubulaires autour de l'embryon. Dès le stade à deux cellules, l'embryon de S. palustre est isolé des parois des cellules du ventre et baigne entièrement dans le mucilage. HAMANT (1954) observe le même phénomène chez les différentes espèces de Mnium : "à tous moments, dit-il, l'embryon reste libre dans la cavité qu'il creuse". Au stade à 45 cellules, l'embryon de S. palustre remplit toute la cavité ventrale de l'archégone. Seuls les mucopolysaccharides localisés à la base du col subsistent : ils coiffent véritablement l'embryon.

R E S U M E

E T

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

Les résultats acquis au cours de ce travail permettent de rassembler nos observations sous trois rubriques : écologique, physiologique et cytologique ; la première ayant pour dessein de faciliter l'approche des deux autres. En comparant les phénomènes observés avec leurs homologues qui se déroulent dans d'autres groupes végétaux ou animaux, il devient possible de souligner d'éventuelles caractéristiques que se partagent des espèces phylogénétiquement éloignées. Pour différentes raisons présentées au début de ce mémoire, notre étude porte essentiellement sur S. palustre. Quelques précisions supplémentaires sont apportées par l'étude entreprise sur une deuxième espèce, S. flexuosum.

### I.- ASPECT ECOLOGIQUE

Les individus mâles, femelles et végétatifs de S. palustre récoltés à Saint-Amand-Les-Eaux (Nord) présentent une morphologie identique ; en conséquence, il est impossible de les distinguer les uns des autres. Nous avons donc mis au point une méthode afin de repérer facilement, pendant toute l'année, les pieds mâles et les pieds femelles, dans le but de les fixer pour une étude cytologique. Les individus femelles, porteurs de capsules au mois de juillet, sont bagués, et les bagues sont reliées à des fils (rouges) attachés à un piquet. L'extrémité des rameaux des pieds mâles devient orangée à la mi-septembre ; cette coloration disparaît début février. Les individus mâles sont donc bagués en septembre et les anneaux sont reliés à des piquets à l'aide de fils (jaunes).

Lors des récoltes de S. palustre, effectuées de 1980 à 1986, nous avons remarqué, que certaines années, cette espèce produisait de nombreuses capsules, et que d'autres années les capsules étaient rares ou absentes. Nous avons donc cherché à déterminer les causes de l'absence éventuelle de la fécondation. Nous avons ainsi tenté de mettre en évidence les rapports qui existent entre la réalisation de la fécondation et les facteurs climatiques de la tourbière. Des climatogrammes sont élaborés à partir des relevés de températures et de précipitations. Ces données sont rapprochées des observations effectuées dans la tourbière, ces dernières sont notées sur les différentes courbes de températures. La synthèse des résultats, d'origines différentes, a permis d'élucider le cycle biologique de S. palustre et de préciser plusieurs phénomènes importants de la biologie de cette espèce. Nous savons ainsi que les anthéridies apparaissent à la fin d'août et que les archégonies se différencient à la mi-septembre. Nous avons également déterminé les conditions dans lesquelles se déroule la fécondation. Les processus de fécondation présentent les exigences suivantes : (1) un mois de mars chaud et pluvieux ; la première condition permet l'ouverture des anthéridies et celle du col de l'archégonie ; la seconde autorise le déplacement des spermatozoïdes vers l'oosphère située dans le ventre de l'archégonie ; (2) un mois de novembre de l'année précédente plutôt froid empêchant l'ouverture des anthéridies. La fécondation survient en mars et dès avril l'embryon se développe,

ce dernier reste enfermé environ un mois dans le ventre de l'archégone.

A notre connaissance, aucun travail concernant le cycle d'autres Sphaignes n'a été entrepris à ce jour. Les seules comparaisons possibles sont donc effectuées avec les observations faites par HAMANT (1954) chez Mnium hornum, M. punctatum et M. undulatum. Cet auteur montre que les gamètes mâles et les gamètes femelles se développent en février ou en avril suivant les espèces ; qu'un archégone fécondé au printemps fournit un embryon, puis un sporogone qui ne libère ses spores qu'au cours du printemps de l'année suivante ; enfin que la méiose a lieu au printemps pour M. undulatum et M. hornum, en automne pour M. punctatum. Ainsi, en opposition aux trois espèces de Mnium, S. palustre est, apparemment, une plante de jours longs et non de jours courts ; les gamètes se forment en été et non en hiver ; ces mêmes gamètes restent alors inactifs pendant 6 mois ; la fécondation a lieu au printemps ; l'embryon se développe rapidement et la capsule se différencie dès la fin mai ; la dernière originalité est donc la date de la méiose qui survient en juin.

## II.- ASPECT PHYSIOLOGIQUE

La connaissance des principales conditions dans lesquelles S. palustre se développe dans la nature a permis des cultures sur milieu synthétique, effectuées à partir de spores. Le milieu minéral nutritif a été mis au point en modifiant le milieu de GILLET (1975).

En culture axénique à 20°C avec une photopériode de 14h/10h, nous avons pu obtenir en 8 mois des gamétophytes feuillés hauts de 8 cm. Cette technique a permis de fixer pour la microscopie et d'observer à différents moments la structure des protonémas, des rhizoïdes et des ébauches du gamétophyte feuillé. L'ultrastructure de ces organes est décrite pour la première fois chez les Sphaignes. L'abondance des chloroplastes dans les cellules du protonéma indique que ces organites jouent un rôle trophique important dans le développement du futur gamétophyte. Nous avons mis en évidence la présence de mucilage dans les cellules constituant les rhizoïdes. Ces mucopolysaccharides protègent le protonéma et surtout le jeune gamétophyte contre la dessiccation.

Des coupes semi-fines effectuées dans un gamétophyte feuillé montrent que l'ontogenèse intervient par l'activité d'une initiale apicale totipotente. Les primordiums foliaires sont constitués de cellules toutes identiques et forment un tissu dit homodictyé. Les feuilles adultes possèdent deux sortes de cellules, les hyalocystes et les chlorocystes, constituant ainsi un tissu hétérodictyé. Ces feuilles appartiennent à un type morphologique spécial, presque exclusif des Sphagnales parmi les Bryophytes. Une exception doit être faite, cependant, pour les Leucobryacées qui possèdent déjà, des feuilles à structure hétérodictyée mais à un niveau moins élaboré.

La sexualisation n'a pu être induite chez S. palustre. GILLET (1975) a réalisé la culture de deux espèces de Sphagnum : S. nemoreum et S. recurvum à partir d'explantats. Les espèces développent toutes deux quelques sporogones. GILLET admet que la fécondation est intervenue en culture in vitro. Nous proposons que les deux Sphaignes, prélevées dans la nature, possédaient déjà des oosphères fécondées. Cette explication nous paraît évidente. En effet, bien que, S. nemoreum et S. recurvum soient des espèces dioïques, GILLET n'en a repiqué qu'un explantat par tube. Dans cette situation, la fécondation in vitro devient impossible. Il n'est donc pas étonnant que son expérience n'ait pu être répétée. En revanche, des recherches menées sur Marchantia polymorpha par COURTOY (1964) ont permis à cet auteur d'obtenir en culture, sous des lampes à incandescence de 300W, des anthéridiophores et des archégoniophores.

### III.- ASPECT CYTOLOGIQUE

L'étude cytologique des différents organes de S. palustre et de S. flexuosum nous a permis d'apporter quelques résultats fondamentaux concernant le genre étudié.

#### A.- COMPARAISON ENTRE LES CELLULES D'APEX VEGETATIF ET LES CELLULES D'APEX SEXUALISE

La sexualisation n'ayant pu être obtenue en culture, l'étude a été menée sur des prélèvements effectués dans la nature. L'observation des apex végétatifs et celle des apex sexualisés ont permis de mettre en évidence des caractères spécifiques qui apparaissent lors de la différenciation des organes reproducteurs. Nous pouvons citer :

1) La formation de nombreux plastoglobules dans les plastes et le développement, dans ces derniers, d'éléments globuleux assez denses aux électrons ; ces éléments globuleux se mettent en place lorsque les cellules deviennent âgées ;

2) L'apparition, à la périphérie du cytoplasme, d'organites limités par une membrane et constitués de deux zones concentriques de densités différentes aux électrons : les O.D.Z.C.. Le test de THIERY (1967), pour la mise en évidence des polysaccharides, n'est pas précis, comme l'a signalé ROLAND (1974). La digestion de la zone périphérique par l'amyloglucosidase montre que cette zone est de nature glucidique. L'hydrolyse de la zone centrale par la lipase puis par la pronase indique que cette zone contient des lipides et des protéines, mais nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'il y ait aussi de nombreux sucres accrochés aux protéines au niveau de la zone centrale.

En conclusion, la zone centrale des O.D.Z.C. est donc essentiellement constituée de lipides et de protéines et,

peut-être, de quelques glucides et la zone périphérique comprend des glucides.

Présents seulement dans les cellules d'apex sexualisés et dans les cellules d'ébauches foliaires sexualisées, les O.D.Z.C. sont donc un bon critère permettant de caractériser l'état sexué des individus. Observés également au niveau des cellules sexualisées de S. magellanicum, (communication personnelle) nous proposons que ces structures originales soient des organites spécifiques au genre Sphagnum. Les O.D.Z.C. découverts chez les Sphaignes n'ont pas été décrits chez d'autres Bryophytes ni chez d'autres végétaux phylogénétiquement plus éloignés.

Nous avons mis en évidence la présence d'un appareil sécréteur, les poils mucigènes, au niveau des apex végétatifs. En revanche, en ce qui concerne les apex sexualisés, nous avons surtout observé la transformation en mucilage de certaines ébauches foliaires.

Les poils mucigènes, formés de 2 cellules chez les Sphaignes, sont en constante position axillaire aux feuilles, ce qui est une conséquence de son ontogenèse à partir de régions bien déterminées du méristème latéro-apical. Les poils ont une destinée et une fonction particulières par suite de phénomènes de différenciation qui leur sont propres. Le phénomène de sécrétion (essentiellement de polysaccharides acides) a fait l'objet d'une étude, sur le plan morphologique d'abord, puis sur le plan ultrastructural. Il ne fait pas de doute que l'appareil de Golgi joue dans la physiologie de la sécrétion un rôle prééminent. C'est là qu'il atteint son développement maximum et sa diversité morphologique la plus complète. Le fonctionnement des dictyosomes est inséparable de la production de vésicules : vésicules golgiennes qui sont les éléments essentiels de la sécrétion, "coated vesicles" et corps multivesiculaires. La comparaison de nombreux cas de sécrétions animales et végétales fournit un excellent exemple d'unité de fonctionnement élémentaire de la cellule.

Enfin, le dépouillement cuticulaire défini chez les végétaux supérieurs est démontré chez les Bryophytes. Il a la valeur d'un mécanisme d'extériorisation des substances élaborées et, étant donné la généralité de la cutinisation des faces libres des cellules végétales, on devrait retrouver un tel dispositif à différents niveaux de l'échelle végétale.

#### B.- ETUDE DES ORGANES MALES OU ANTHERIDIES

Les premiers cloisonnements du tissu interne de l'anthéridie se succèdent à un rythme rapide et donnent naissance à des spermatogonies ; l'avant-dernière génération, née après une interphase prolongée, forme les spermatocytes ; la dernière génération constitue les spermatides qui se différencient en spermatozoïdes.

L'étude de l'évolution du tissu spermatogène a permis de mettre en évidence plusieurs faits caractéristiques.

Les spermatogonies et les jeunes spermatocytes sont polyédriques ; ceux-ci deviennent ovales avant l'ultime division. Les jeunes spermatides sont hémisphériques et évoluent en un cordon hélicoïdal à la suite de profonds remaniements internes.

Tous les organites cellulaires subissent d'importantes modifications. L'une des phases essentielles de cette évolution ultrastructurale débute dans les spermatocytes avec la différenciation de cinétosomes et se poursuit dans les spermatides, où le développement cinéto-flagellaire conditionne l'évolution du noyau et en partie celle du chondriome. Les diverses transformations se répercutent sur la morphologie générale de la cellule.

Les résultats concernant le noyau, le vacuome, le réticulum endoplasmique, les mitochondries, le corps basal et le complexe apical ne sont pas repris ici ; leur évolution, en effet, est identique à celle observée chez les autres Bryophytes (SUIRE, 1970 ; CAROTHERS, 1973, 1975). En revanche certains organites présentent un intérêt suffisant pour être repris dans cette discussion.

#### a) les plastes

Les premières divisions du massif anthéridial concernent des cellules pluriplastidiées. Le nombre de plastes diminue au cours de l'évolution des spermatogonies. L'avant-dernière génération de ces cellules n'hérite que de deux plastes volumineux contenant des thylakoïdes courts et sinueux, et d'autres thylakoïdes longs, associés par 2 ou 3. Le stroma présente des vésicules très claires aux électrons, provenant de la dilatation de quelques lamelles intergranaires. A ce stade, les inclusions amylicées disparaissent. A la dernière étape, chaque spermatogonie ne possède plus qu'un seul plaste allongé, situé près du noyau. Les thylakoïdes, comme précédemment, donnent naissance à des vésicules et le plaste ne contient toujours pas d'amidon. Cette phase à un plaste a aussi été observée chez les Mousses étudiées par EYME (1953) et par BONNOT (1967a), alors que chez les Hépatiques, les cellules contiennent deux plastes à la dernière génération (SUIRE, 1970 ; CAROTHERS, 1975). Les cellules de la lignée mâle chez les Mousses atteignent donc un état monoplastidié dès la spermatogonie, alors que leurs homologues chez les Hépatiques ne l'atteignent pas avant la spermatide. Ce détail prend donc quelque importance dans un contexte phylogénétique, puisqu'il permet de séparer les deux classes de Bryophytes. Ce plaste unique participe à la formation du corps basal au stade spermatide, et devient totalement amylicifère lors de la différenciation du spermatozoïde. A tous les stades de son évolution, son système de membranes internes demeure rudimentaire et il se désorganise dans les spermatides.

La distribution des thylakoïdes dans le plaste des spermatides varie considérablement d'une espèce à l'autre

(DUCKETT, 1975b ; DUCKETT and CAROTHERS, 1979). Les thylakoïdes sont hautement structurés dans le plaste du spermatozoïde mobile des Sphagnum. Ceci serait une reminiscence des corps prolamellaires observés dans les plastes des Angiospermes placés à l'obscurité (GUNNING and STEER, 1977).

La disposition et le nombre de grains d'amidon dans le plaste des spermatozoïdes des Bryophytes sont des caractères permettant de distinguer aussi les différents taxons (DUCKETT et al., 1983). D'abondants grains d'amidon sont présents dans le plaste des spermatozoïdes des Mousses et dans celui des Hépatiques. En revanche, nous n'en comptons que deux chez les Sphaignes.

#### b) les cinétosomes et la cinétide

Les cinétosomes existent dans les spermatides de toutes les espèces de Bryophytes. Nous avons noté leur présence chez S. palustre dès le stade spermatocyte. Cette situation rappelle celle décrite chez les Hépatiques (TURNER, 1966 ; MOSER et KREITNER, 1970). Les flagelles sont au nombre de deux chez S. palustre, comme chez toutes les autres Bryophytes ; cet état biflagellé des cellules mâles se retrouve chez les Characées (TURNER, 1968), chez les Lycopodes et chez les Sélaginelles (ROBERT, 1974) alors que chez les autres Ptéridophytes les spermatozoïdes sont multiflagellés. Les spermatozoïdes ciliés nagent jusqu'au col de l'archégone ; la fécondation a donc lieu obligatoirement au sein de l'eau aussi bien chez les Bryophytes que chez les Ptéridophytes. La présence des cinétosomes semble présupposer l'évolution du noyau et d'une partie des mitochondries ; ils induisent vraisemblablement la formation de tubules et de diverses structures, en particulier celle de la plaquette stratifiée ou M.L.S.

### C.- ETUDE DES ORGANES FEMELLES OU ARCHEGONES

#### 1) Les cellules de l'archégone (exceptée l'oosphère)

L'étude des cellules de l'archégone a permis de dégager plusieurs points particuliers aux Sphaignes.

##### a) les cellules du canal du col

On sait depuis longtemps que les cellules axiales du col dégèrent lorsque l'oosphère se différencie (CHALAUD, 1928 ; HAMANT, 1954). Les techniques cytochimiques en microscopie électronique ont permis d'étudier, de façon précise, l'évolution de ces cellules. La sécrétion de mucilage est caractérisée par l'existence de phases successives dont une est marquée par l'activité golgienne importante chez les Bryophytes étudiées (VIAN et al., 1970 chez Mnium undulatum et BAJON, 1981 chez M.undulatum et Fossombronia angulosa). En revanche, les cellules du canal du col des Sphaignes se distinguent par l'absence de cette phase golgienne. Nous avons retenu, essentiellement, une

grande activité de synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, et au niveau de petites vésicules cytoplasmiques provenant probablement du réticulum.

b) les cellules du col

Les cellules du col possèdent de nombreux saccules de réticulum endoplasmique granulaire et quelques dictyosomes. Ces deux types d'organites participent aussi à la sécrétion de mucilage qui remplit ultérieurement le canal du col. Il existe dans ces cellules des organites à deux zones concentriques, les O.D.Z.C., que l'on a déjà observés dans les cellules d'apex sexualisés et dans les cellules d'ébauches foliaires sexualisées.

c) les cellules du ventre

Les cellules du ventre sont caractérisées par :

- l'abondance de plastoglobules et par la présence d'éléments globuleux dans les plastes ;

- le grand développement de réticulum endoplasmique (granulaire et agranulaire) et de dictyosomes, qui précède l'isolement de l'oosphère dans la cavité ventrale ; ces deux types d'organites contribuent lors de la différenciation du gamète femelle, à l'élaboration du mucilage qui remplit toute la cavité ventrale ; ce sont donc les cellules ventrales qui sont à l'origine de la sécrétion du mucilage et non l'oosphère, comme cela a été démontré par BAJON (1981) chez Mnium undulatum et Fossombronia angulosa ; la présence de mucilage dans la cavité ventrale est vraisemblablement nécessaire à la survie des gamètes mâles et du gamète femelle dépourvus de paroi. La pénétration du spermatozoïde peut s'effectuer en plusieurs points de l'oosphère (SCHOWALTER, 1927a; HAMANT, 1954) ; il est donc probable que le mucilage permet au gamète femelle divers mouvements de rotation dans la cavité ventrale. Ainsi, la direction des premières divisions pourrait demeurer constante, quel que soit le lieu d'entrée du spermatozoïde.

- chez les espèces étudiées par BAJON (1981), l'hyper-trophie du ventre de l'archégone est due à la multiplication des cellules de la paroi ventrale. Chez les Sphaignes, les assises de cellules du ventre dégénèrent progressivement et élaborent le mucilage qui remplit toute la cavité ventrale. Il ne reste alors, que la première assise de cellules du ventre de l'archégone, lors de la maturation de l'oosphère. Ce n'est, qu'au stade de l'embryon à 21 cellules, que la première rangée de cellules se divise pour reformer des cellules qui protégeront l'embryon.

- les structures tubulaires, au sein du mucilage, posent le problème de leur origine et de leur devenir. Elles ont été observées occasionnellement chez M.undulatum par BAJON (communication personnelle) et semblent n'exister ni chez les autres Bryophytes, ni chez les autres Archégoniates.

- des organites à deux zones concentriques, les O.D.Z.C., existent également dans toutes les cellules du ventre. Ces

organites sont limités par une membrane que le test de THIERY souligne et sont situés à la périphérie du cytoplasme. La zone centrale, dense aux électrons, contient des lipides et des protéines ; la zone périphérique, plus claire aux électrons que la précédente, est riche en glucides ; le traitement par l'amyloglucosidase précise la nature polysaccharidique de ces glucides. Des observations régulières, de septembre à fin février, ont permis de suivre l'évolution des O.D.Z.C.. Ces organites disparaissent au moment de la fécondation. Nous supposons que la zone centrale et une partie de la zone périphérique constituent des réserves trophiques, utilisables par l'oeuf et par l'embryon. Nous avons accordé de l'importance aux O.D.Z.C., car, ce sont des organites originaux spécifiques des Sphaignes et parce qu'ils nous ont permis de caractériser l'état sexué de la plante.

## 2) L'oosphère

La maturation de l'oosphère comprend deux étapes principales:

- la première étape correspond au progamète

Le progamète subit une évolution différente des autres cellules de l'archégone. De forme spécifique, le progamète possède un cytoplasme riche en organites et son volume s'accroît rapidement. Ces caractéristiques le font ressembler au progamète de Sphaerocarpus donnellii décrit par DIERS (1965a), et à celui de Mnium undulatum étudié par BAJON (1981). Malgré la présence de nombreuses mitochondries dans le progamète de S. palustre nous n'avons jamais observé une abondance de ces organites semblable à celle mentionnée chez M. undulatum par BAJON (1981), chez Pteridium aquilinum (Ptéridophyte) par TOURTE (1975), chez une Gymnosperme, Pinus laricio, par CAMEFORT (1962) et chez les ovocytes d'oursins par BRUSLE, (1972).

- la deuxième étape correspond à la différenciation de l'oosphère

L'évolution de l'oosphère se distingue par plusieurs caractères.

L'oosphère s'isole totalement dans la cavité de l'archégone. En général, les gamètes femelles libres sont peu fréquents dans le règne végétal. En revanche, chez les Bryophytes (DIERS, 1965a; ZINSMEISTER et CAROTHERS, 1974 ; BAJON, 1981), chez les Algues (PICKETT-HEAPS, 1975) et chez certaines Ptéridophytes (Pteridium, TOURTE, 1974 ; Marsilea, MYLES, 1978), l'oosphère mûre est une cellule presque sphérique sans liaison avec les cellules de l'archégone. Il en est de même en ce qui concerne l'oosphère de S. palustre. Le gamète femelle subit une transformation au cours de sa maturation. D'abord polyédrique, à parois minces, il devient presque sphérique et totalement dépourvu de paroi ; progressivement, les organites se répartissent d'une façon différente. L'oosphère, prête à être fécondée, acquiert une polarité. La distribution non aléatoire des organites dans le cytoplasme de l'oosphère a été signalée dans plusieurs espèces végétales : chez Fucus (BRAWLEY et al., 1976), chez Chara (PICKETT-HEAPS, 1975), chez Selaginella (ROBERT, 1972), chez Biota (CHESNOY, 1971), chez

des Angiospermes (CASS et KARAS, 1974; MOGENSEN, 1972), et dans les ovocytes des espèces animales (exemple bien connu des ovocytes d'Amphibiens). Chez S. palustre cette polarité n'est pas aussi évidente que dans les exemples précédents. Elle s'exprime par un regroupement de vésicules qui alternent avec des ensembles de mitochondries. Ce gradient cytoplasmique joue probablement un rôle dans le devenir des deux cellules issues de la première division de l'oeuf.

A aucun moment de l'évolution de l'oosphère nous n'avons observé des organites à deux zones concentriques (O.D.Z.C.).

#### D.- LA FECONDATION

Nos observations ultrastructurales permettent de distinguer trois phénomènes dans la fécondation chez S. palustre:

##### 1) la pénétration du spermatozoïde

Le gamète mâle aborde le gamète femelle par la surface située vers le col de l'archégone ; en pénétrant dans l'oosphère, le spermatozoïde entraîne les flagelles, qui demeurent à proximité du plasmalemma, et un fragment de la couche  $S_1$  de la M.L.S..

2) L'accolement des noyaux mâle et femelle juste avant leur fusion.

3) l'origine des mitochondries et des plastes de l'oeuf ; compte-tenu du nombre réduit des organites du cytoplasme présents dans le spermatozoïde mature, il est vraisemblable que les organites existant dans l'oosphère fécondée soient en grande partie d'origine femelle.

#### E.- L'EMBRYOGENESE

L'embryon, au stade à deux cellules, est constitué d'une cellule supérieure et d'une cellule inférieure de tailles voisines et de morphologies différentes. Ceci oppose les Sphagnum aux Mnium. Dans ce dernier genre, la division de l'oeuf donne naissance à deux cellules de dimensions inégales et de forme semblable (HAMANT, 1954).

Chez S. palustre, après la fécondation, le noyau émet des lobes ; nous n'avons jamais observé une telle morphologie dans les oosphères jeunes et dans les oosphères matures. La cellule supérieure ne se modifie pas pendant quelques jours. Elle conserve sa grande taille et sa forme particulière, caractérisée par un crochet supérieur. Elle ne se divise qu'à partir du stade à 15 cellules ; c'est-à-dire après que la cellule inférieure ait donné naissance par divisions successives aux 14 autres cellules. Au stade à 15 cellules, l'embryon constitue un ensemble méristématique qu'il conserve jusqu'au stade à 45 cellules. A ce moment, on peut reconnaître deux territoires rappelant ceux que

CAMPBELL (1905) décrit dans l'embryon au stade à 41 cellules chez S. acutifolium. Cet auteur identifie une région supérieure qui donnera naissance au tissu sporogène et une région inférieure qui formera le pied ou suçoir. HAMANT (1954) chez 3 espèces de Mnium détermine aussi deux régions aisément reconnaissables : le suçoir et le méristème terminal qui est à l'origine de la soie puis de l'urne. A l'opposé de ce qui est connu chez les autres Mousses, le suçoir, chez les Sphaignes, disparaît quand le sporophyte est constitué et la soie est absente. En revanche, il se forme, dès que la capsule est mature, un pseudopode d'origine gamétophytique et non sporophytique, comme le pied et la soie.

L'embryon baigne entièrement dans un mucilage dans lequel on observe des structures tubulaires. A aucun moment l'embryon ne se trouve en contact direct avec les cellules de l'archégone. HAMANT (1954) décrit le même phénomène chez les trois espèces de Mnium étudiées ; le mucilage contient probablement des substances nourricières pour l'embryon.

C O N C L U S I O N  
G E N E R A L E

Les Bryophytes paraissent, par leur morphologie variée, représenter un ensemble de plantes hétérogènes. Les systématiseurs éprouvent, en effet, de nombreuses difficultés à établir une classification. Le problème posé par le genre Takakia renforce cette idée de complexité. Les Takakiales viennent d'être isolés des Hépatiques auxquelles ils appartenaient. CRANDALL-STOTLER (1986) a créé un embranchement nouveau, totalement différent de celui des Bryophytes : les Takakiophyta. Cet auteur démontre que ces derniers possèdent un méristème et non une cellule apicale comme celle que l'on observe chez les Bryophyta.

Pourtant, les Bryophytes constituent un groupe homogène, uni par leur cycle sexué où il y a alternance de générations et où le sporophyte est dépendant du gamétophyte (STEWART, 1983). Le stade gamétophyte se révèle être très important et les auteurs sont d'accord pour donner une place primordiale aux gamètes mâles et femelles.

L'étude de la spermatogenèse et de l'oogenèse apparaît donc comme l'un des problèmes fondamentaux de la biologie cellulaire.

#### I. - GAMETOGENESE CHEZ LES BRYOPHYTES ET COMPARAISON AVEC D'AUTRES ARCHEGONIATES

L'architecture du gamète mâle des Bryophytes est maintenant bien établie. Des études comparatives ont déjà eu un impact considérable sur la systématique, non seulement chez les Bryophytes (BROWN, CAROTHERS et DUCKETT, 1983 ; CAROTHERS, BROWN et DUCKETT, 1983 ; CAROTHERS et DUCKETT, 1978, 1979, 1980 ; DUCKETT et CAROTHERS, 1979), mais aussi chez toutes les plantes contenant les chlorophylles a et b (DUCKETT et CAROTHERS, 1982).

Par contraste, leur oogenèse n'a guère progressé depuis les premières descriptions effectuées en microscopie électronique (DIERS, 1965a et b, 1966 ; ZINSMEISTER et CAROTHERS, 1974 ; BAJON, 1981 ; LAL et BELL, 1977 ; FABRE, 1984, 1987).

##### 1) La gamétogenèse mâle

Les cellules spermatogènes ou spermatogonies des Bryophytes possèdent tous les caractères de cellules méristématiques. Le seul fait significatif qui distingue les différentes générations de spermatogonies est le nombre de plastides. A la fin du stade spermatogonie, la cellule est uniplastidiée chez les Mousses et les Sphaignes, alors qu'elle est biplastidiée chez les Hépatiques. En revanche, un seul plaste sera présent dans tous les spermatozoïdes des Bryophytes. Ce phénomène a été observé au cours de la sporogenèse chez beaucoup de Bryophytes (NEIDHART, 1979) mais n'a jamais été remarqué chez les Ptéridophytes.

Les spermatides possèdent deux centrosomes identiques au-dessus desquels apparaît la M.L.S. formée de quatre strates (centrosomes et M.L.S. constituant le blépharoplaste).

Initialement, les microtubules de la couche la plus externe ( $S_1$ ) ou languette sont de même longueur que les trois autres couches. Puis, la languette s'étend au-delà du noyau et donne la languette définitive, lors de la différenciation de la spermatide en spermatozoïde. La languette, chez les Sphagnum comme chez les Mousses, se termine à l'extrémité postérieure du noyau, alors que chez les Hépatiques, elle s'étend au-dessus du plaste.

Deux caractères étaient considérés comme caractères de base pour l'étude comparative des Bryophytes (CAROTHERS et DUCKETT, 1978) :

- Le nombre de strates de la M.L.S., 3 chez les Mousses et 4 chez les Hépatiques ;

- La largeur maximale de la languette en tenant compte du nombre des microtubules.

Mais il est apparu que la M.L.S. constituée de 3 couches représentait un état de développement transitoire. Ce caractère a donc été éliminé par CAROTHERS et DUCKETT, 1980. Cependant, le fait que la M.L.S. soit également formée de 4 couches chez les Lycopodium (CAROTHERS, ROBBINS et HAAS, 1975), chez les Equisetum (DUCKETT et BELL, 1977), chez les Fougères, comme Dryopteris (DUCKETT, 1975a) et Ceratopteris (DUCKETT, KLEKOWSKI et HICKOK, 1979) ainsi que chez Zamia (Cycadales) (NORSTOG, 1974), indique qu'il s'agit d'un caractère de diagnostic pour les Archégoniates.

Dans toutes les cellules des anthéridies de Bryophytes, le noyau sphérique au stade de spermatogonie, s'enroule en hélice au stade spermatozoïde. En même temps, la chromatine se condense et le nucléoplasme disparaît.

Les différences taxonomiques concernant la forme des spermatozoïdes des Bryophytes sont déterminées grâce aux dimensions de leur noyau. Les plus petits noyaux (0,2  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont observés chez Polytrichum (PAOLILLO et al., 1968b) et Ceratodon. Hookeria et Tetraphis montrent les noyaux les plus gros avec 0,55  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les noyaux des spermatozoïdes de Sphagnum palustre mesurent 0,5  $\mu\text{m}$ .

Il est intéressant de noter l'étroite corrélation entre le diamètre du noyau et la largeur de la languette chez les Mousses. Ce rapport a été observé aussi entre les spermatozoïdes des différents phylums des Ptéridophytes (DUCKETT et BELL, 1977). Une analyse aux rayons X incite à penser que la taille du noyau est en relation avec la concentration du DNA. Les contenus du DNA par cellule chez les quatre Bryophytes suivantes (Marchantia polymorpha, Riccia sp., Mnium sp. et Sphagnum sp.) sont, d'une part, proches de la limite supérieure trouvée chez les Algues

		<u>SPORES</u>	<u>PROTONEMA</u>	<u>TIGE</u>				<u>FEUILLES</u>				
				rhizoïdes	symétrie	hyaloderme + pores	capitulum (touffe coronale)	forme	couleur	nervures	nombre de strates	cellules
HEPATIQUES	à thalle	élatères	en lame	+	dorsiventrals	-	-	aplatie	verte qqfois marron	-	unistraste	1 type de cellules chlorophyl- liennes
	à feuilles	élatères	rhizoïdes unicellulaires		bilatérale	-	-					
ANTHOCEROTES		élatères	en lame			-	-					
MOUSSES		exine : 1 couche parfois 1 externe mince pas élatères	filaments  rhizoïdes cloisonnés	+	radiale	-	-	aplatie	verte	+	unistrate et pluri- strate	1 type de cellules chlorophyl- liennes sauf chez Leucobryacées
SPHAIGNES		exine: 2 couches dont l'externe très épaisse pas d'élatères	en lame  rhizoïdes cloisonnés	-	radiale	+	+	cupuliforme	diffé- rentes couleurs	-	unistrate	2 types de cellules hyalo- cystes et chlo- rocystes

fibrilles et pores	<u>GAMETOPHYTE</u>	<u>MODE DE RAMIFICATION DES RAMEAUX GROUPEES EN FAISCEAUX</u>	<u>PROPAGULES</u>	<u>SPOROPHYTE</u>			ouverture capsule	<u>CYTOLOGIE</u>
				développement	pédicelle	columelle		
	thalle		+	dans l'archégone	+	rare	par valve	oléocorps
-	tige feuillée	-	+			-		
	thalle				-	+	par valve	
sauf chez Leucobryacées	tige feuillée	-	+	sort bien avant la maturation	+	+	apicale opercule péristome	
+	tige feuillée	+	-	dans le ventre de l'archégone	-	+	apicale opercule pas de péristome	O.D.Z.C. chez les individus sexués

première fois par SCHIMPER (1848) comme conclusion de sa remarquable monographie de ces plantes. Mais, ce même auteur abondonnait cette idée quelques années plus tard et reclassait les Sphaignes parmi les Mousses.

JOVET-AST (1952) écrit dans un ouvrage sur les Muscinées : "les Sphaignes diffèrent des Mousses par des caractères trop nombreux et trop importants pour qu'il soit possible de les classer avec les Mousses".

En 1979, EDDY sépare les Mousses des Sphaignes et en fait deux classes : les Bryopsida et les Sphagnopsida. Partageant l'opinion de ces auteurs, nous proposons d'élever aussi au rang de classe les Sphaignes, au même titre que les Mousses.

Le tableau p.116 récapitule les caractères principaux des différents groupes des Bryophytes. Les Sphaignes ont, d'une part, des affinités avec les Hépatiques, et, d'autre part, avec les Mousses. Cependant, des particularités originales n'appartiennent qu'aux Sphaignes.

- La morphologie spéciale du gamétophyte feuillé des Sphaignes et ses couleurs variées les séparent nettement des Mousses ;

- L'existence de deux types de cellules hautement spécialisées (les chlorocystes et les hyalocystes) au niveau des feuilles des Sphaignes, les distingue des Mousses. Il faut cependant mentionner la présence de deux sortes de cellules chez les Leucobryacées (Dicranales évoluées), mais leur degré de perfection n'atteint pas celui des cellules observées chez les Sphaignes.

Les pores formés au niveau des parois des hyalocystes des feuilles ou des tiges caractérisent les Sphaignes (RUSSOW, 1889 ; FABRE, 1974). La présence de pores est un fait biologique important. Ainsi se trouve accentuée la convergence remarquable entre les hyalocystes des Sphaignes et les éléments xylémiens peu différenciés. En effet, ce sont des cellules en voie d'allongement, munies d'épaississements internes spiralés, siège de la formation de perforations puis, mortes et vides de tout contenu protoplasmique. Sur le plan physiologique, et de façon passive, elles jouent un rôle dans le transit de l'eau. On peut ne voir, dans ces faits, que de simples convergences, mais elles n'en sont pas moins un argument confirmant le caractère évolué du type Sphagnum; c'est à cette conclusion qu'arrive également BERTHIER (1972), à partir d'un raisonnement morphogénétique bien différent.

- La formation d'un appareil sécréteur évolué, observé chez les Sphaignes, les différencie nettement des Mousses. La morphologie et les caractères évolutifs sont décrits dans la discussion du troisième chapitre de la deuxième partie.

- L'absence de propagules chez les Sphaignes est également un indice qui les isole des Hépatiques, des Anthocérotes et des Mousses.

- Au niveau cellulaire, des organites à deux zones concentriques, de densités différentes et de nature glucido-lipoprotéique, caractérisent l'état sexué des Sphaignes ; ils en sont l'apanage exclusif.

- Dans la cavité ventrale de l'archégone des Sphaignes, ce n'est pas l'oosphère qui élabore le mucilage comme cela se produit chez les Mousses, mais ce sont les cellules du ventre qui dégèrent et qui sécrètent ce mucilage.

- Le pseudopode supportant la capsule d'une Sphaigne n'est absolument pas l'équivalent de la soie que surmonte la capsule d'une Mousse et d'une Andreaea. Le pseudopode est d'origine gamétophytique alors que la soie est d'origine sporophytique.

- Les capsules des Sphaignes ne possèdent pas de péristomes à la différence de la majorité des Mousses.

- De récentes investigations sur le spermatozoïde mature de Sphagnum (MILLER, non publiées à cette date) révèlent des caractères nouveaux jamais détectés chez les autres Bryophytes :

. durant le stade final du gamète, une gaine de fibres apparaît sous la membrane plasmique ;

. la disposition des deux corps basaux des centrosomes change énormément pendant la maturation des gamètes ;

. la perte de la partie centrale de chaque centrosome permet d'isoler les Sphaignes des Mousses (DUCKETT et al., 1983) ;

. la structure des thylakoïdes dans les plastes des spermatides et le nombre réduit d'inclusions amyliées dans le plaste du spermatozoïde renforcent encore cette différence entre Mousses et Sphaignes.

L'ensemble de ces caractères originaux, y compris certaines de nos observations confirment donc et amplifient les propositions faites par les auteurs qui rangent les Sphaignes dans une classe à part au sein des Bryophyta (JOVET -AST, 1952 ; EDDY, 1979 et VITT, 1982).

### III.- PERSPECTIVES

Le développement des résultats obtenus dans ce travail pourrait s'envisager sur cinq plans principaux.

1) Il serait intéressant de comparer le cycle de développement de S. palustre, que nous avons établi dans une tourbière du

Nord de la France, à celui qui pourrait se dérouler au sein d'une tourbière située dans un tout autre contexte écophysiological (différences de latitude et d'altitude).

2) Il serait intéressant, aussi, de rechercher le moment exact où s'effectue la méiose et d'étudier les premières étapes de la sporogénèse.

3) La mise au point des cultures de Sphaignes pourrait être effectuée à partir de spores. Ces cultures seraient suivies en conditions strictement contrôlées dans des phytotrons. Ce travail nécessiterait un développement laborieux afin d'obtenir une sexualisation des apex femelles et des apex mâles.

4) La production d'une grande quantité d'apex sexualisés nous permettrait un fractionnement cellulaire conduisant à l'obtention d'une grande quantité d'organites à deux zones concentriques (les O.D.Z.C.), organites intéressants car, étant l'une des manifestations de la sexualisation des individus ; puis d'en faire une analyse chimique, seul moyen d'en connaître précisément la composition.

5) L'étude de la zone de transfert au niveau du jeune sporophyte pourrait nous donner des indications précieuses sur le phénomène de parasitisme du sporophyte sur le gamétophyte.

B I B L I O G R A P H I E

- ALLEN C.E., 1912.- Cell structure, growth and division in the antheridium of Polytrichum juniperinum. Arch. F. Zellforsch., 8, 121-188.
- ALLEN C.E., 1917.- The spermatogenesis of Polytrichum juniperinum Ann. of Bot., 31, 269-291.
- ANDERSON W.A., 1968.- Structure and fate of paternal mitochondrion during early embryogenesis of Paracentrotus lividus. J.Ultrastruct.Res. 24, 311-321.
- ANDRE J., 1959.- Etude au microscope électronique de l'évolution du chondriome pendant la spermatogenèse du Papillon du Chou, Pieris brassicae. Ann. Sc. Nat. Zool. Biol. an., 12è série, 1, 283-307.
- ANGOLD R.E., 1968.- The formation of the generative cell in the pollen grain of Endimyon non-scriptus (L.). J.Cell.Sci., 3, 573-578.
- ARENS P., 1907.- Zur spermatogenese der Laubmoose. Inaugural dissertation, Bonn.
- ARNELL H.W., 1875.- An observation of the fecundation of Mosses. Rev. Bryol. 2, 114-115.
- BAJON-BARBIER C. 1981. Etude cytophysiologique de la gaméto-genèse femelle chez deux Bryophytes : 1 Mousse Mnium undulatum Hedw., 1 Hépatique Fossombronia angulosa (Dicks) Raddi. Thèse, Paris VI, 143 p.
- BEARDSLEY M.L., 1931.- The cytology of Funaria flavicans with special reference to fertilization. Ann. Missouri Bot. Gard., 18, 509-541.
- BELL P.R., 1963.- the cytochemical and ultrastructural peculiarities of the fern egg. J.Linn.Soc., Bot., 58, 353-359.
- BELL P.R., 1969.- The cytoplasmic vesicles of the female reproductive cells of Pteridium aquilinum. Z. Zellforsch., 96, 49-62.
- BELL P.R., 1972.- Nucleocytoplasmic interaction in the eggs of Pteridium aquilinum maturing in the presence of thiouracil. J.Cell. Sci., 11, 739-755.
- BELL P.R., 1979.- Demonstration of succinic dehydrogenase in mitochondria of fern egg cells at electron microscope level. Histochemistry, 62, 85-91.
- BELL P.R., 1980.- Nucleocytoplasmic interaction during maturation of the egg of the fern Histiopteris incisa (Thunb.) J.Smith. Ann. Bot., 45, 475-481.

- BELL P.R. and K. MUHLETHALER, 1962.- The fine structure of the cells taking part in oogenesis in Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. J. Ultrast. Res., 7, 452-466.
- BELL P.R. and K. MUHLETHALER, 1964.- Evidence for the presence of desoxyribonucleic acid in the organelles of the egg cells of Pteridium aquilinum. J.Mol.Biol., 8, 853-862.
- BERTHIER J., 1971-1972.- Recherches sur la structure et le développement de l'apex du gamétophyte feuillé des Mousses. Rev.Bryol. et Lichenol., 38, 421-550.
- BERTHIER J., 1972.- Etude descriptive et expérimentale de l'organisation du gamétophyte feuillé des Mousses. Thèse d'Etat, Clermont-Ferrand, 112p.
- BERTHIER J., BONNOT E.J., FABRE M.Ch. et Ch. HEBANT, 1974.- L'appareil sécréteur des Bryales : données morphologiques, ultrastructurales et cytochimiques. Soc.Bot.Fr., Coll. Bryologie, 97-100.
- BOLD H.C., 1948.- The prothallium of Sphagnum palustre L.. The Bryol. 51, 55-63.
- BONNOT E.J., 1966.- Poils mucifères et paraphylles chez Thuidium tamariscinum (Hedw.) B.S.G. Rev. Bryol. Lichénol., 34, 331-335.
- BONNOT E.J., 1967a.- Le plan d'organisation fondamentale de la spermatide de Bryum capillare (L.) Hedw. C.R.Acad.Sci., 265, 958-961.
- BONNOT E.J., 1967b.- Relations structurales nucléoplastidales dans les cellules méristématiques du gamétophyte feuillé de Polytrichum formosum Hedw. C.R.Acad.Sci. 264, 2555-2558.
- BONNOT E.J., 1968.- Contributions à la connaissance structurale de l'apex du gamétophyte feuillé des Bryales. Thèse d'Etat, Dijon, 273p.
- BONNOT E.J., 1969.- Ultrastructure des cellules sécrétrices de l'apex de la tige feuillée des Bryales. XIè congrès int. bot., Seattle. Abstr. p.78.
- BONNOT E.J. et C. HEBANT, 1970.- Précisions sur la structure et le fonctionnement des cellules mucigènes de Polytrichum juniperum Willd. C.R.Acad.Sc.Paris, 271, 53-55.
- BOUCHET P., AUDRAN J.C. et H. BOBICHON, 1980.- Etude morphologique et ultrastructurale des trichomes d'une Commélinacée : Zebrina pendula Schnitzl. Bull. Soc. Bot. Fr., 132, 115-122.

- BRAWLEY S.H., WETHERBEE R. et R.S. QUATRANO, 1976.- Fine structural studies of the gametes and embryo of Fucus vesiculosus L. (Pheophyta). II. The cytoplasm of the egg and young zygote. J.Cell.Sci., 20, 255-271.
- BROWN R.C., CAROTHERS Z.B. and J.G. DUCKETT, 1983.- Comparative spermatogenesis in the Sphaerocarpaceae. II. Blepharoplast structure in Geothallus tuberosus Campb. Bryologist, 30, 1233-1246.
- BRUSLE J., 1972.- Les infrastructures germinales femelles précoces (gonocytes, ovogonies et ovocytes. I.). Ann. Biol., 11, 501-571.
- BRYAN G.S. 1915. The archegonium of Sphagnum subsecundum. Bot. Gaz. 59, 40-56.
- BRYAN G.S. 1927. Abnormal sex organs of Mnium medium. Bot. Gaz. 84, 89-101.
- CAMEFORT H., 1959a.- Sur la nature cytoplasmique des inclusions dites "vitellines" de l'oosphère du Pinus laricio (var. austriaca) : étude en microscopie électronique. C.R.Acad.Sci., 248, 1568-1570.
- CAMEFORT H., 1959b.- Structure des filaments de chromatine du noyau de l'oosphère chez le Pinus laricio Poir. (var. austriaca) : étude en microscopie électronique. C.R. Acad. Sci. 249, 1790-1792.
- CAMEFORT H., 1962.- L'organisation du cytoplasme dans l'oosphère et la cellule centrale du Pinus laricio Poir. (var. austriaca). Ann. Sci. Nat. Bot., 12<sup>e</sup> série, 3, 265-291.
- CAMEFORT H., 1963.- L'évolution des plastes pendant la croissance et la différenciation du gamète femelle des Pins. J. Microscopie, 2, 26-27.
- CAMEFORT H., 1964.- Observations sur la structure des chromosomes et des nucléoles de l'oosphère de Pins. C.R.Acad.Sci., 259, 4335-4338.
- CAMEFORT H., 1965a.- Une interprétation nouvelle de l'organisation du protoplasme de l'oosphère des Pins. Dans "Travaux dédiés à L. Plantefol", Masson et Cie, 407-436.
- CAMEFORT H., 1965b.- L'organisation du protoplasme dans le gamète femelle, ou oosphère, du Ginkgo biloba L. J. Microscopie, 4, 531-546.
- CAMEFORT H., 1967.- Observations sur les mitochondries et les plastes de la cellule centrale et de l'oosphère du Larix decidua Mill. (Larix europea D.C.). C.R. Acad. Sci., 265, 1293-1296.

- CAMEFORT H., 1970.- Particularités structurales du gamète femelle chez le Cryptomeria japonica D. Don. Formation de complexes plastes-réticulum pendant la période de maturation du gamète. C.R. Acad.Sci., 271, 49-52.
- CAMEFORT H., 1971.- Sur l'évolution de l'appareil vacuolaire dans la cellule centrale et l'oosphère du Cryptomeria japonica D. Don. (Taxodiaceés). Ann. Univ. et A.R.E.R.S., 9, 16-21
- CAMEFORT H, ESCAIG J. et J. SCHAEFFER., 1973.- Essai d'analyse de la structure cristalline des inclusions protéiques contenues dans le gamète femelle du Larix decidua et des Picea asperata, P.glauca, P.smithiana à l'aide d'une platine d'observation goniométrique. J. Microscopie, 17, p. 32a.
- CAMPBELL D.H., 1905.- The structure and development of mosses and ferns. Ed.2, London Balfour trad., 1-228.
- CAROTHERS Z.B., 1972.- Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. III.- Continuity between plasma membrane and nuclear envelope in androgonial cells of Blasia. J. Cell Biol., 52, 273-282.
- CAROTHERS Z.B., 1973.- Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. IV.- On the blepharoplast of Blasia. Amer.J.Bot. 60, (8), 819-828.
- CAROTHERS Z.B., 1975.- Comparative studies on spermatogenesis in Bryophytes in J.G. Duckett and P.A. Racey, Ed. Biology of the male gamete. Academic Press, New-York, 71-84.
- CAROTHERS Z.B., BROWN R.C. and J.C. DUCKETT., 1983.- Comparative spermatogenesis in the Sphaerocarpaceae. I. Blepharoplast structure : Sphaerocarpus et Riella. Bryologist. 86, 2, 97-105.
- CAROTHERS Z.B. and J.G. DUCKETT, 1977.- A comparative study of the multilayered structure in developing bryophyte spermatozoids. Congrès intern.bryol. Bordeaux, 21-23, Bryophytorum Bibliotheca, 13.
- CAROTHERS Z.B. and J.G. DUCKETT, 1978.- A comparative study of the multilayered structure in developing bryophyte spermatozoids. In. C. Suire (eds.), Congrès International de Bryologie. Bryophytorum bibliotheca, 13, 95-112.
- CAROTHERS Z.B. and J.G. DUCKETT, 1979.- Spermatogenesis in the systematics and Phylogeny of the Hepaticae and Anthocerotae. In clarck GCS, Duckett J.G. (ed). "Bryophyte systematics". Systematics association special volume 14. London, Academic Press, 425-445.
- CAROTHERS Z.B. and J.G. DUCKETT, 1980.- The Bryophyte spermatozoid : a source of a new phylogenetic information. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 107, 281-297.

- CAROTHERS Z.B. and G.L. KREITNER, 1967.- Ultrastructural morphology of the spline-basal complex in the spermatid of Marchantia polymorpha. Amer. J. Bot., 54, 635
- CAROTHERS Z.B. and G.L. KREITNER, 1968.- Studies of spermatogenesis in the Hepaticae. II. Blepharoplast structure in the spermatid of Marchantia. J. Cell. Biol., 36, 603-616.
- CAROTHERS Z.B., ROBBINS R.R. and D.L. HAAS, 1975.- Some ultrastructural aspects of spermatogenesis in Lycopodium complanatum. Protoplasma, 86, 339-350.
- CASS D.D. and W.A. JENSEN, 1970.- Fertilization in Barley. Am. J. of Bot., 57, (1), 62-70.
- CASS D.D. and J. KARAS, 1974.- Ultrastructural organization of the egg of Plumbago zeylanica. Protoplasma, 81, 49-62.
- CHALAUD G., 1928.- Le cycle évolutif du Fossombronia pusilla Dum. Rev. gén. Bot., 41, 1-291.
- CHALAUD G., 1930.- Les derniers stades de la spermatogenèse chez les Hépatiques. Ann. bryologici, 3, 41-50.
- CHALAUD G., 1931.- La spermatogenèse chez Lunnaria cruciata L. Dum. Travaux cryptogamiques dédiés à Louis Mangin. Paris, 113-126.
- CHARDARD R., 1958.- L'ultrastructure des grains de pollen d'Orchidées. Rev. Cytol. Biol. Vég., 19, 224-236.
- CHESNOY L., 1967.- Nature et évolution des formations dites "astéroïdes" de la cellule centrale de l'archégone de Juniperus communis L. Etude en microscopie photonique et électronique. C.R. Acad. Sc. Paris, 264 : 1016-1019.
- CHESNOY L., 1969.- Sur la participation du gamète mâle à la constitution du cytoplasme de l'embryon chez le Biota orientalis Endl. Rev. Cytol. et Biol. vég., 32, 273-294.
- CHESNOY L., 1971.- Etude cytologique des gamètes, de la fécondation et de la proembryogenèse chez le Biota orientalis Endl. Observations en microscopie photonique et électronique. I. Le gamète femelle. Rev. Cytol. et Biol. Vég., 34, 257-304.
- CHESNOY L., 1973.- Sur l'origine paternelle des organites du proembryon du Chamaecyparis lawsoniana. Caryologia, suppl., Vol.25, 223-232.
- CHESNOY L., 1974.- Evolution de l'activité respiratoire des mitochondries au cours de la maturation du gamète femelle du Biota orientalis (Cupressacées). C. R. Acad. Sci., 278, 727-730.

- CHESNOY L., 1977.- Etude cytologique des gamètes, de la fécondation et de la proembryogenèse ; transmission du cytoplasme du gamète mâle au proembryon. Rev. Cytol. et Biol. Vég., 40, 293-396.
- CHESNOY L. et M.J. THOMAS, 1969.- Sur la présence de mitochondries Feulgen positives dans la zone périnucléaire du gamète femelle du Pseudotsuga menziesi (Mirb) Franco. Etude cytochimique et ultrastructurale. C.R.Acad.Sci. 268, 55-58.
- CHESNOY L. et M.J. THOMAS, 1971.- Electron microscopic studies on gametogenesis and fertilization in Gymnosperms. Phytomorphology, 21, 50-63.
- CLAUSCH R.P. and P.GRUN., 1977.- Changes in plastid and mitochondrion content during maturation of generative cells of Solanum (Solanaceae). Am. J. Bot., 64, (4), 377-383.
- CLYMO R.S. and J.G. DUCKETT, 1986.- Regeneration of Sphagnum. New Phytol., 102, 589-614.
- CLYMO R.S. and P.H. HAYWARD, 1982.- The ecology of Sphagnum in Bryophyte ecology. Edited by A.J.E. SMITH, 229-289.
- COURTEJAIRE J., 1959.- Action de quelques milieux nutritifs sur le développement de Sphagnum inundatum Warnst. Rev. Bryol. lichénol., 28, 218-222.
- COURTOY R., 1964.- Contribution à l'étude de la croissance et de la sexualisation chez Marchantia polymorpha L. cultivé en milieu conditionné. Mémoire de Licence. Univ. de Liège
- CRANDALL-STOTLER B., 1986.- Morphogenesis, developmental anatomy and bryophyte phylogenetics : contraindications of monophyly. J. Bryol., 14, 1-23.
- DIBOLL A.G. and D.A. LARSON, 1966.- An electron microscopic study of the mature megagametophyte in Zea mays. Amer. J. Bot., 53, 391-402.
- DIERS, L. 1965a. Elektronenmikroskopische Beobachtungen zur Archegoniumentwicklung des Lebermooses Sphaerocarpus donnellii Aust. Die Entwicklung des jungen Archegons bis zum Stadium der fertig ausgebildeten sekundären Zentralzelle. Planta. 66, 165-190.
- DIERS L., 1965b. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Eizellbildung und Eizellreifung des Lebermooses Sphaerocarpus donnellii Aust. Z. Naturforsch. 20, 795-801.

- DIERS L., 1966.- On the plastids, mitochondria and other cell constituents during oogenesis of a plant. J. Cell Biol., 28, 527-543.
- DIERS L., 1967.- Der Feinbau des Spermatozoids von Sphaerocarpus donnellii Aust. Planta, 72, 119-145.
- DIERS L., 1970.- Origin of plastids : cytological results and interpretation including some genetical aspects. In P. Miller (ed.), control of Organelle Development. Society for experimental Biology Symposium, 24, 129-145. University Press, Cambridge.
- DUCKETT J.G., 1975a.- Spermatogenesis in pteridophytes. In J.G. Duckett and P.A. Racey (eds.), The Biology of the Male Gamete. Biol. J. Linn. Soc., 7, Suppl.1, 97-127. Academic Press Inc, London.
- DUCKETT J.G., 1975b. An ultrastructural study of the differentiation of antheridial plastids in Anthoceros laevis L. Cytobiologie, 10, 432-448.
- DUCKETT J.G. and P.R. BELL, 1977.- An ultrastructural study of the mature spermatozoid of Equisetum. Philos. Trans. Roy. Soc. London, B. Biol. Sci., 277, 131-158.
- DUCKETT J.G. and Z.B. CAROTHERS, 1979.- Spermatogenesis in the systematics and phylogeny of the Musci. In G.C.S. Clarke and J.G. Duckett (eds.), Bryophyte Systematics. Systematics Association Special Volume 14, 384-423. Academic Press Inc, London.
- DUCKETT J.G. and Z.B. CAROTHERS, 1982.- The assembly of flagella during spermatogenesis in land plants. In W.B. Amos and J.G. Duckett (eds.), Eukaryotic and Prokaryotic Flagella. Society for Experimental Biology Symposium, 35, 533-561. University Press, Cambridge.
- DUCKETT J.G., CAROTHERS Z.B. and C.C.J. MILLER, 1983.- Gametogenesis. Schuster R.M. (ed.). New manual of bryology, 1, 233-259. Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, Japan.
- DUCKETT J.G., CAROTHERS Z.B. and J.W. MOSER., 1980.- Ultrastructural studies of spermatogenesis in the Anthocerotales. III. Gamete morphogenesis : From spermatogenous cell through midstage spermatid. Gamete Research, 3, 149-167.
- DUCKETT J.G., KLEKOWSKI E.J., J.R. and L.G. HICKOK, 1979.- Ultrastructural studies of mutant spermatozoids in ferns. I. The mature nonotile spermatozoid of mutation 230 X in Ceratopteris thalictroides (L) Brongn. Gamete Research, 2, 317-343.

- EDDY A., 1979.- Taxomy and evolution of Sphagnum. Systematics Association Special Volume n°14, "Bryophyte Systematics", edited by G.C.S. Clarke and J.G. Duckett, Academic Press, London and New-York, 109-121.
- EYME J., 1953. Recherches cytologiques sur les Mousses. Thèse Bordeaux. 166p.
- EYME J. et L. CAPOT, 1954.- Sur la structure de l'anthérozoïde de Sphagnum cymbifolium Ehrh. examiné au microscope électronique C.R. Acad. Sc. Paris, 238, 1336-1338.
- FABRE M.Ch., 1973.- Etude en microscopie électronique à balayage de la porosité des hyalocystes de quelques Sphaignes (Sphagnum div.sp., Bryophytes, Sphagnales). C.R. Acad. Sc. Paris, 276, 513-516.
- FABRE M.Ch., 1974.- Contribution à l'étude structurale et cytochimique des Sphaignes de la section Palustria L. Thèse 3è cycle, Lille, 98 p.
- FABRE M.Ch., 1982.- Modifications ultrastructurales des cellules de l'apex de Sphagnum palustre (L.) lors de la formation des archégones. Bull. Soc. Bot. N. France, 35, 15-18.
- FABRE M.Ch. et J. ORCIVAL, 1982.- Données ultrastructurales sur les apex végétatif et sexualisé de Sphagnum flexuosum Dozy et Molk. C.R. Acad. Sc. Paris, 294, 1073-1080.
- FABRE M.Ch., 1984. Aspects structuraux des cellules de l'archégone de Sphagnum flexuosum Dozy et Molk. Ann. Sc. Nat. Bot. Paris, 13è série, 6, 93-110.
- FABRE M.Ch., 1985. La spermatogenèse chez Sphagnum palustre L. Ann. Sc. Nat. Bot. Paris, 13è série, 7, 77-101.
- FABRE M.Ch., 1987.- Ultrastructure de l'embryon bicellulaire de Sphagnum palustre L. Ann. Sci. Univers. Reims et de l'A.R.E.R.S., 23, 4p.
- FABRE M.Ch., 1987.- Etude de l'archégone de Sphagnum palustre L. I. La gametogenèse et la fécondation (sous presse in J. Can. Bot.). 10p.
- FAVRE-DUCHARTRE M., 1956.- Contribution à l'étude de la fécondation chez Cephalotaxus. C. R. Acad. Sci., 243, 1349-1352.
- FAVRE-DUCHARTRE M., 1970.- Des ovules aux graines. Masson Ed., Paris.
- FAVRE-DUCHARTRE M., 1978.- Oogenèses chez les Angiospermes et autres plantes ovulées. Rev. Cytol. et Biol. vég., 1, 79-95.
- GABE M., 1968.- Techniques histologiques. Masson et Cie (ed.).

- GAUTHIER R., 1980.- La végétation des tourbières et les Sphaignes du parc des Laurentides, Quebec. Etudes écologiques. 3, 634p.
- GAVAUDAN P., 1930.- Recherches sur la cellule des Hépatiques. Thèse, Paris in the botanist, série 22, 105-294.
- GAVAUDAN P., POUSSEL H. et M. GUYOT, 1960.- Production expérimentale dans la cellule végétale anoxique de "nebenkerns" ergastoplasmiques. C.R.Acad. Sc. Paris, 250, 4029-4031.
- GENEVES L., 1967.- Sur le groupement des plastes et des mitochondries pendant la différenciation du spermatozoïde de Polytrichum formosum (Bryacées). C.R.Acad.Sci., 265, 1679-1682.
- GIANORDOLI M., 1964.- Recherches cytologiques sur la spermatogenèse, la fécondation et la proembryogenèse du Sciadopitys verticillata, C.R. Acad. Sc., 259, 3327-3330.
- GIANORDOLI M., 1969.- Observations sur l'organisation du cytoplasme et sur la présence de lamelles annelées dans la cellule centrale du Sciadopitys verticillata (Sieb. Zucc.) Rev. Cytol. et Biol. vég., 32, 183-202.
- GIANORDOLI M., 1973.- Etude ultrastructurale et cytochimique de l'oosphère mûre chez le Sciadopitys verticillata. Caryologia, 25, 135-150.
- GIANORDOLI M., 1978.- Gamétogenèses mâles et femelles ; mise en contact des gamètes et formation du cytoplasme proembryonnaire chez trois Gymnospermes, Sciadopitys verticillata, Cephalotaxus drupacea, Taxus baccata. Etude ultrastructurale et cytochimique. Thèse, Reims, 276p.
- GILES R.E., BLANC H., CANN H.N. and D.O. WALLACE, 1980.- Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A. Genetics, 77, 6715-6719.
- GILLET M., 1975.- Contribution à l'écophysiologie des Sphaignes. Essai de mise au point et d'application d'un milieu synthétique adapté à la culture in vitro de quelques espèces du genre Sphagnum L. D.E.A., Lille, 42p.
- GRIMME A., 1903.- Uber die Blüthezeit deutscher Laubmoose und die Entwicklungsdauer ihrer Sporogone. Hedwigia. 42, 1-75.
- GUIGNARD L., 1889.- Développement et constitution des anthérozoïdes. II. Muscinées. Rev. Gén. Bot., 1, 63-70.
- GUILLOM M., BONNOT E.J., DURCHON M., VIVIER E., DUBOIS Th., ANGELI N., FABRE M.C. et M. GOULLIART, 1974.- La Sablière du Lièvre, réserve scientifique. Film 16 mm, couleurs. Durée 18mn (OFRATEME) C.N.D.P. Service du film de recherche scientifique Paris.

- GUNNING B.E.S. and H.W. STEER, 1977.- Ultrastructure and the Biology of Plant Cells. Edward Arnold, London.
- HALLET J.N., 1974.- Morphogenèse du gamétophyte feuillé du Polytrichum formosum Hedw. II. Etude histochimique, histoautoradiographique et cytophotométrique de la région apicale pendant la phase reproductrice. Ann. Sci. Nat. Bot., 15, 321-388.
- HAMANT, C. 1954.- Recherches cytologiques sur la reproduction chez quelques espèces du genre Mnium. Thèse, Toulouse, 116p.
- HEBANT C. et E.J. BONNOT, 1974.- Histochemical studies on the mucilage secreting hairs of the apex of the leafy gametophyte in some Polytrichaceous mosses. Z. Pflanzenphysiol., 72, 213-219.
- HEDWIG J., 1782.- Fundamentum Historiae Naturalis Muscorum frondosorum concernens eorum flores, fructus, seminale propagationem..., 112p. Leipzig.
- HEITZ E., 1959.- Elektronenmikroskopische Untersuchungen über zwei auffallende strukturen an der Geisselbasis der Spermatischen von Marchantia polymorpha, Preissia quadrata, Sphaerocarpus Donnellii, Pellia Fabroniana (Hepaticae). Ztsch Naturforsch., 14, 399-401.
- HEITZ E., 1960.- Über die Geisselstruktur sowie die Dreiergruppe in den spermatischen der Leber. und Laubmoose. Proceed Europ. Reg. conf. Electr. Microsc. 2, 934-937.
- HELLER R., 1953.- Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég., 14, 1-223.
- HINTIKKA V., 1972.- Variation in gametophyte morphology of Spagnum fallax in aseptique culture. Ann. Bot. Fennici, 9, 91-96.
- HOFMEISTER W. 1851.- Vergleichende Untersuchungen der Keimung, Entfaltung und Fruchtbildung höherer Kryptogamen. Leipzig.
- HOLCOMBE J.W., 1984.- Morphogenesis of branch leaves of Sphagnum magellanicum Brid., Journ. Hattori Bot. Lab., 57, 179-240.
- HOLFERTY G.M. 1904. The archegonium of Mnium cuspidatum. Bot. Gaz. 37 : 106-126.
- HUREL-PY G., 1949.- Sur le bouturage des Sphaignes en milieu aseptique. Bull. Soc. Bot. Fr., 96, 31-32.
- HY F., 1884.- Recherches sur l'archégone et le développement du fruit des Muscinées. Ann. Sci. Nat. Bot., 18, 105-206.

- IKENO D.S., 1903.- La formation des anthérozoïdes chez les Hépatiques. C.R. Acad. Sc., 136, 628-629.
- ISOVIITA P., 1966.- Studies on Sphagnum L. I.: Nomenclatural revision of the European taxa. Ann. Bot. Fennici, 3, 199-264.
- JALOUZOT M.F., 1975.- Aspects ultrastructuraux du sac embryonnaire d'Oenothera lamarckiana. C.R. Acad. Sci., 281, 1305-1308.
- JANCKEWSKI E., 1872.- Vergleichende Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte des Archegoniums. Bot. Zeit., 22, 402-417.
- JENSEN W.A., 1965.- The ultrastructure and composition of the egg and central cell of cotton. Amer. J. Bot., 52, 781-797.
- JOVET-AST S., 1952.- Muscinées. Cryptogamie, 93p.
- KREITNER G.L., 1967.- Ultrastructural aspects of spermatid-spermatozoid transformation in Marchantia polymorpha. Amer. J. Bot., 54, 635.
- KREITNER G.L. and Z.B. CAROTHERS., 1976.- Studies of spermatogenesis in the Hepaticae V. Blepharoplast development in Marchantia polymorpha. Amer. J. Bot., 63, (5), 545-557.
- KRUCH O., 1890.- Appunti sullo sviluppo degli organi sessuali e sulla fecondazione della Riella clausonis. Malpighia, 4, 403-423.
- LAL H. and P.R. BELL, 1977.- Aspects of the differentiation of the egg of the moss Physcomitrium coorgense Broth. Ann. Bot., 41, 127-131.
- LAL H., KAUR G. et E. CHAUHAN, 1985.- Some aspects of zygote ultrastructure in the moss Physcomitrium cyathicarpum, Cryptogamie, Bryol. Lichenol., 6, 213-218.
- LANE D.M., 1977.- Extend of vegetative reproduction in eleven species of Sphagnum from northern Michigan. Michigan Bot., 16, 83-89.
- LEITGEB H., 1869.- Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Pflanzenorgane. III. Wachstum des Stämmchens und Entwicklung der Antheridien bei Sphagnum. Sitz ber. Kaiserl Akad Wiss. math. naturwiss. Kl., 59, 294-320.
- LEITGEB H., 1874.- Untersuchungen über die Lebermoose. O. Deitstung's Buchanlung Ed., 1-144.
- LIGRONE R., 1983.- Ultrastructure of mucilage-secreting hairs in Timmiella barbuloïdes (Pottiales, Musci). Giornale Bot. Ital., 117-168.

- MANTON I., 1957.- Observations with the electron microscope on the cell structure of the antheridium and spermatozoid of Sphagnum, J. Exp. Bot., 8, 382-400.
- MANTON I., 1959.- Observations on the microanatomy of the spermatozoid of the bracken fern (Pteridium aquilinum). J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 413-418.
- MARTENS P., 1931.- Dépouillement cuticulaire et phénomènes osmotiques dans les poils staminaux de Tradescantia. Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique., 64, 108-111.
- MARTENS P., 1933.- Dépouillement cuticulaire spontané sur les pétales de Tradescantia. Bull. Soc. roy. Bot. Belgique, 66, 58-64.
- MELIN E., 1915.- Die sporogenese von sphagnum squarrosum (Pers.) Nehteinigen Bemerkungen über das Antheridium von Sphagnum acutifolium (Ehrh.) Svensk. Bot. Tidsk., 9, 261-293.
- MENKE W. et B. FRICKE., 1964.- Beobachtungen über die Entwicklung der Archegonien von Dryopteris filix-mas. Z. Naturforschg., 19, 520-524.
- MERIAUX J.L., SCHUMACKER R., TOMBAL P. et P. DE ZUTTERE., 1978.- Contribution à l'étude des boulaies à Sphaignes dans le Nord de la France, l'Ile-de-France et les Ardennes. Coll. phytos., 7, Sols tourbeux, Lille, 477-494.
- MEYER B. and W. STUBBE., 1974.- Das zahlenverhältnis von mütterlichen und väterlichen plastiden in der zygoten von Oenothera erythrosepala Bordas (syn. Oe. lamarckiana). Ber. Deutsch. Bot. Ges., 87, 29-38.
- MOGENSEN H.L., 1972.- Fine structure and composition of egg apparatus before and after fertilization in Quercus gambelii: the functional ovule. Amer. J. Bot., 59, 931-941.
- MOGENSEN H.L. et H.K. SUTHAR., 1979.- Ultrastructure of the egg apparatus of Nicotiana tabacum (Solanaceae) before and after fertilization. Bot. Gaz., 140, 168-179.
- MONNERON A., 1966.- Utilisation de la pronase en cytochimie ultrastructurale. J. Microsc., 5, 583-596.
- MOSER J.W., 1970.- An ultrastructural study of spermatogenesis in Phaeoceros laevis subsp. carolinianus. Ph. D. Diss., University of Illinois, Urbana.
- MOSER J.W. and G.L. KREITNER., 1970.- Centrosome structure in Anthoceros laevis and Marchantia polymorpha. J. Cell. Biol., 44, 454-458.

- MOSER J.W., DUCKETT J.G. and Z.B. CAROTHERS., 1977.- Ultrastructural studies of spermatogenesis in the Anthocerotales. I. The blepharoplast and anterior mitochondrion in Phaeoceros laevis : early development. Amer. J. Bot., 64, 1097-1106.
- MOTTE J., 1928.- Contribution à la connaissance cytologique des Muscinées. Ann. Sc. Nat. Bot., 10, 293-543.
- MOUSSEL B., 1972.- Etude en microscopie électronique des cols archégoniaux de l'Ephedra distachya L., C.R. Acad. Sci., 274, 3372-3374.
- MOUSSEL B., 1974.- Etude histologique, cytochimique et ultrastructurale des réserves du gamétophyte femelle de l'Ephedra distachya L. au cours de l'oogenèse et de la proembryogenèse. Rev. Gén. Bot., 81, 315-334.
- MOUSSEL B. 1978.- Participation des éléments cytoplasmiques mâles et femelles à l'élaboration du cytoplasme proembryonnaire chez l'Ephreda distachya L. Bull. Soc. Bot. Fr., Actualités botaniques, 1-2 : 227-231.
- MUHLDORF A., 1930.- Uber die Gestalt und den Bau der Spermien von Sphagnum. Beih. Z. Bot. Centralbl., 47, 169-191.
- MYLES D.G., 1975.- Structural changes in the sperm of Marsilea vestita before and after fertilization in "Biology of the males gametes", Biol. Journ. of the Linn. Soc. Suppl. 1, vol.7, 129-134.
- MYLES D.G., 1978.- The fine structure of fertilization in the fern Marsilea vestita. J. Cell Science, 30, 265-281.
- NEHIRA K., 1963.- The germination of spores in Musci 1. Sphagnum imbricatum (Hornsch.) Russ., Andreaea fauriei Besch. and Dicranum caesium Mitt. Hikobia, 3, 288-294.
- NEIDHART H.V., 1979.- Comparative studies of sporogenesis in bryophytes. In G.C.S. Clarke and J.G. Duckett (eds.), Bryophyte Systematics. Systematics Association Special Volume 14, 251-280. Academic Press Inc., London.
- NEWCOMB W., 1973.- The development of the embryo sac of sun flowers Helianthus annuus before fertilization. Can. J. Bot., 51, 863-878.
- NEWTON E.M., 1972.- An investigation of photoperiod and temperature in relation to the life cycles of Mnium hornum Hedw. and Mnium undulatum Sw. (Musci) with reference to their histology. Bot. J. Linn. Soc., 65, 189-209.
- NISHIDA Y. et S. SAITO., 1961.- Studies of the germination of the spores in some mosses. II. Diphyscium foliosum and Sphagnum cuspidatum. Bot. Mag. Tokyo, 74, 91-97.

- NOGUCHI A., 1958.- Germination of spores in two species of Sphagnum. J. Hattori bot. Lab., 19, 71-75.
- NORSTOG K., 1968.- Fine structure of the spermatozoid of Zamia: observations on the microtubule system and related structures. Phytomorphology, 18, 350-356.
- NORSTOG K., 1974.- Fine structure of the spermatozoid of Zamia : the Vierergruppe. Amer. J. Bot., 61, 449-456.
- NORSTOG K., 1975.- The motility of cycad spermatozoids in relation to structure and function. In: Duckett S. G. Racey P.A. (ed.) : the biology of the male gamete. Biol. J. Linn. Soc. 7, suppl.1, London, Academic Press, 135-142.
- PAOLILLO D.J., 1965.- On the androcyte of Polytrichum, with special reference to the Dreiergruppe and the limosphere (Nebenkern). Canadian J. Bot., 43, 669-676.
- PAOLILLO D.J., 1974.- Motile gametes of plants. In "Dynamics aspects of plant ultrastructure", Robards (A.W.) Ed., Mc Graw Hill Co., England, 504-531.
- PAOLILLO D.J., KREITNER J.L. and J.A. REIGHARD., 1968a.- Spermatogenesis in Polytrichum juniperinum I. The origin of the apical body and the elongation of the nucleus. Planta, 78, 226-247.
- PAOLILLO D.J., KREITNER G.L. and J.A. REIGHARD, 1968b.- Spermatogenesis in Polytrichum juniperinum II.- The mature sperm. Planta, 78, 248-261.
- PASTEELS J.H., 1965.- Aspects structuraux de la fécondation vus au microscope électronique. Arch. Biol., 76, 463-509.
- PICKETT-HEAPS J.D., 1975.- Green algae : structure, reproduction and evolution in selected genera. Sinauer Associates, Sunderland Massachussets.
- POLICARD A., BESSIS M. et M. LOCQUIN, 1957.- Traité de microscopie. Masson et cie (ed.). Paris.
- POTTIER J., 1921. Observations sur les masses chromatiques du cytoplasme de l'oosphère chez Mnium undulatum et Mnium punctatum. C.R. Acad. Sc. Paris. 173: 445-448.
- PRESLEY R., 1969.- Some electron microscope observation on the fate of the sperm tail in rat and mouse ova. J. Anat. 104, 581-600.

- RAMBOURG A., 1967.- Détection des glycoprotéines en microscopie électronique : coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. C.R. Acad. Sc., 265, 1426-1428.
- REIMERS H., 1954.- Bryophyta, Moose. In "A. Engler's Syllabus der Pflanzen-familien (H. Melchior and E. Werdermann, eds) Twelfth edition, 218-268. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- RENZAGLIA K.S. and Z.B. CAROTHERS., 1986.- Ultrastructural studies of spermatogenesis in the Anthocerotales. IV. The blepharoplast and mid stage spermatid of Notothylas. J. Hattori Bot. lab., 60, 97-104.
- REYNOLDS E.S., 1963.- The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208.
- RICKETT H.W., 1923. Fertilization in Sphaerocarpus. Ann. J. Bot. 37, 225-259.
- ROBERT D., 1969.- Evolution de quelques organites cytoplasmiques au cours de la maturation de l'oosphère de Selaginella kraussiana A. Br. C.R. Acad. Sci., 268, 2775-2778.
- ROBERT D., 1972a. Le gamétophyte femelle de Selaginella kraussiana (Kunze). A. Br. III. Ultrastructure et développement des archégonés. Rev. Cytol. et Biol. Vég. 35, 165-242.
- ROBERT D., 1972b.- Le gamétophyte femelle de Selaginella denticulata (L.) Spring. Rev. Cytol. et Biol. vég., 35, 243-280.
- ROBERT D., 1974.- Etude ultrastructurale de la spermiogénèse, notamment de la différenciation de l'appareil nucléaire chez le Selaginella kraussiana (Kunze) A. Br. Ann. Sc. Nat. Bot., 15, 65-118.
- ROBINSON H., 1971.- A revised classification for the orders and families of mosses. Phytologia, 21, 289-293.
- ROLAND J.C., 1974.- Cytochimie des polysaccharides végétaux : détection et extraction sélectives. J. Micros., 21, 233-244.
- ROZE E., 1872.- De la fécondation chez les Cryptogames supérieurs et en particulier chez les Sphaignes. Bull. Soc. Bot. Fr. 19, 91-103.
- ROZE E., 1874.- De l'utilité de faire connaître l'époque de la fécondation chez les Mousses. Rev. Bryol., 1, 2-3.

- RUDOLPH H., 1977.- 15 Jahre Kultur von Sphagnen unter definierten Bedingungen : eine Übersicht über Resultate, Probleme und Perspektiven. Intern. Congress Bryology, Bordeaux. J. Cramer, Bryophytorum Bibliotheca, 13, 279-309.
- RUSHING A.E. and Z.B. CAROTHERS., 1986.- Comparative studies of spermatogenesis in the Bryopsida. III. Blepharoplast morphology in Thuidium delicatulum. The Bryologist, 89, 144-151.
- RUSSOW E., 1889.- Sphagnologische Studien. Sitz. Dorpat Nat. ges. 9, 94-113.
- SATO S., 1951.- Electron microscopical studies on reproductive cells of plant II. Structure of spermatozooids of Marchantia polymorpha and Isoetes japonica. Cytologia, 16, 153-163.
- SATO S., 1954.- On the filamentous appendage, a new fine structure of the spermatozoid of Conocephalum conicum, disclosed by means of the electron microscope. J. Hattori Bot. Lab., 12, 113-115.
- SATO S., 1956.- The filamentous appendage in the spermatozooids of Hepaticae as revealed by the electron microscope. Bot. Mag., 69, 435-438.
- SCHAFFNER J.H., 1908.- The centrosomes of Marchantia polymorpha. Ohio Nat., 9, 383-388.
- SCHIMPER W.P., 1848.- Recherches anatomiques et morphologiques sur les Mousses. Mem. Soc. Hist. Nat. Strasbourg. 92p.
- SCHULZ R. et W.D. JENSEN., 1968.- Capsella embryogenesis : the egg, zygote and young embryo. Amer. J. Bot., 55, 807-819.
- SHOWALTER A.M., 1926.- II. Fertilization in Riccardia pinguis. Ann. J. Bot. 40, 713-726.
- SHOWALTER A.M., 1927a.- III. Fertilization in Fossombronia angulosa. Ann. J. Bot. 41, 37-46.
- SHOWALTER A.M., 1927b.- IV. Fertilization in Pellia fabbroniana. Ann. J. Bot. 41, 409-417.
- SIGEE D.C., 1972.- The origin of cytoplasmic DNA in the mature egg cell of Pteridium aquilinum. Protoplasma, 75, 323-334.
- SPURR A.R., 1968.- A low viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. J. Ultrastr. Res., 26, 31-43.
- STEWART W.N., 1983.- Paleobotany and the evolution of plants. Cambridge University Press. 405p.

- STOTLER R.E. and B. CRANDALL-STOTLER, 1977.- A checklist of the liverworts and hornworts of North America, Bryologist, 80, 405-428.
- SUIRE C., 1970.- Recherches cytologiques sur deux Hépatiques : Pellia epiphylla (L.) Corda (Metzgériale) et Radula complanata (L.) Dum. (Jungermanniale) ergastome, sporogénèse et spermatogénèse. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Bordeaux, 392p.
- SUN C.N., 1963.- Fine structure of the spermatozoid of two mosses with special reference to the so-called "Nebenkern". Protoplasma, 58, 663-666.
- THIERY J.P., 1967.- Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J.Microsc., 6, 987-1018.
- THIERY J.P. et A. RAMBOURG., 1974.- Cytochimie des polysaccharides. J.Microsc., 21, 225-232.
- THOMAS M.J., 1975.- Apports de la cytologie et de la cytochimie à l'étude du développement embryonnaire chez les Phanérogames. Ann. Biol., 14, 293-352.
- THURET G., 1851.- Recherches sur les zoospores et les anthéridies des Cryptogames. II. Ann.Sc.nat.Bot., 3ème série, 16, 22-29.
- TOMBAL P., 1974.- Diagnose phytocoenologique des forêts proclimaciques acidiphiles de la région de Paris. Coll. Phytos., 3. Les forêts acidiphiles, Lille, 301-309.
- TONG C. and D.H. VITT, 1986.- Spore surface structure of Sphagnum. Nova Hedwigia, 43, 1-2.
- TOURTE Y., 1968.- Observations sur le comportement du noyau, des plastes et des mitochondries au cours de la maturation de l'oosphère du Pteridium aquilinum L. . C. R. Acad. Sci., 266, 2324-2326.
- TOURTE Y., 1970a.- Evolution des structures nucléolaires au cours de la gamétogénèse femelle du Pteridium aquilinum. Bull. Soc. Bot. Fr., 117, 199-208.
- TOURTE Y., 1970b.- Nature, origine et évolution d'enclaves cytoplasmiques particulières au cours de l'oogénèse chez le Pteridium aquilinum (L.). Rev. Cytol. et Biol. vég., 33, 311-324.
- TOURTE Y., 1971.- Quelques aspects cytologiques infrastructuraux au cours de la fécondation chez le Pteridium aquilinum L. C.R. Acad. Sc. Paris. 272, 1236-1239.

- TOURTE Y., 1972.- Les sécrétions mucilagineuses dans l'organe reproducteur femelle d'une fougère : étude infrastructurale. J. Microscopie, 15, 377-394.
- TOURTE Y., 1974.- Gamétogenèse et fécondation chez une fougère, étude particulière des infrastructures. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 233p.
- TOURTE Y., 1975a.- Etude ultrastructurale de l'oogenèse chez une Pteridophyte : le Pteridium aquilinum (L.) Kühn. I. Evolution des structures nucléaires. J. Microscopie, 22, 87-108.
- TOURTE Y., 1975b.- Etude infrastructurale de l'oogenèse chez une Pteridophyte. II. Evolution des mitochondries et des plastes. J. Microscopie Biol. Cell., 23, 301-316.
- TOURTE Y. et G. HUREL-PY., 1967.- Ontogénie et ultrastructure de l'appareil cinétique des spermatozoides de Pteridium aquilinum, C.R.Acad.Sc., 265, 1289-1292.
- TURNER F.R., 1966.- Changes in cellular organization during spermatogenesis. Ph D. diss. University of Texas, Austin.
- TURNER F.R., 1968.- An ultrastructural study of plant spermatogenesis. Spermatogenesis in Nitella. J. Cell. Biol., 37, 370-393.
- URSPRUNG H. and E. SCHABTACH., 1965.- Fertilization in tunicates: Loss of the paternal mitochondrion prior to sperm entry. J. Exp. Zool., 159, 379-384.
- VAN WENT J.L., 1970.- The ultrastructure of the egg and central cells of Petunia. Acta Bot. Neerl., 19, 313-322.
- VAZART J., 1964.- Données sur le développement et l'infrastructure de l'appareil cinétique dans les spermatides de Polypodium vulgare. C.R.Acad.Sc., 259, 631-634.
- VAZART J., 1965.- Régression des chloroplastes et modifications de leur infrastructure dans l'anthéridie du Polypode. Rev. Cytol. Biol. Vég., 28, 1-14.
- VAZART B et J. VAZART., 1966.- Infrastructure du sac embryonnaire du Lin (Linum usitatissimum L.). Rev. Cytol. et Biol. Vég., 29, 251-266.
- VERDUS M.C., 1978.- Etude ultrastructurale des propagules de Campylopus introflexus (Hedw.) Brid. (Bryopsida, Dicranales). Bull.Soc.Bot.N.Fr., 31, 33-40.
- VERDUS M.C. et E.J. BONNOT., 1982.- Sécrétion mucigène chez Campylopus introflexus (Hedw.) Brid. (Bryopsida). Bull. Soc. Bot.Fr., Actual. Bot., 129, 47-51.

- VIAN B., BARBIER C. et D. REIS-CREPIN., 1970.- Données sur l'élaboration et l'évolution des mucilages dans le col de l'archégone de Mnium undulatum. C.R.Acad.Sci., 271, 1978-1981.
- VITT D.H., 1982.- Sphagnopsida et Bryopsida. In : S.P. Parker (ed). Synopsis and classification of living organisms, 1, 307-336. Mc Graw-Hill Book Co., New-York.
- VITT D.H., 1984.- Classification of the Bryopsida. In : R.M. Schuster (ed), New manual of bryology, 2 : 696-759. Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, Japan.
- VIVIER E., 1966.- Variations ultrastructurales du chondriome en relation avec le mode de vie chez les Protozoaires. 6th. Int. Congres.Electr.Microse, Kyoto, 247-248.
- VO THI DAO et J.LAROCHE., 1978.- Etude ontogénique de l'appareil reproducteur femelle de l'Equisetum arvense. I. Archégone très jeune. Rev. Cytol. et Biol. Vég., 1, 59-78.
- WALKER N., 1913.- An abnormal cell-fusion in the archegonium and on spermatogenesis in Polytrichum. Ann. of Bot., 27, 115-123.
- WAREHAM R.T. and J.B. WHITNEY., 1939.- The annulus of Pottia truncata (Hedw.) Föhrn. Bryologist, 42, 106-108.
- WAYTT R., 1982.- Population ecology of Bryophytes. Journ. Hattori. Bot. Lab., 52, 179-198.
- WEIL J.H., 1983.- Biochimie générale. Masson éd., 470 pages.
- WILSON M., 1911.- Spermatogenesis in the Bryophyta. Ann. of Bot., 25, 415-457.
- WOODBURN W.L., 1913.- Spermatogenesis in Blasia pusilla. Ann.of Bot., 27, 93-101.
- WOODBURN W.L., 1915.- Spermatogenesis in Mnium affine var. ciliaris, Ann. of Bot., 29, 441-456.
- ZEPF E., 1952.- Über die Differenzierung des Sphagnum Blattes. Zeitschr. Bot., 40, 87-118.
- ZINSMEISTER D.D., and Z.B. CAROTHERS. 1974.-The fine structure of oogenesis in Marchantia polymorpha, Amer. J. Bot. 61, 499-512.