

5
gen 20107083

50376
1996
95

Numéro d'ordre : 1694

THESE

présentée à

l'Université des Sciences et Technologies de Lille

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN GENIE ENZYMATIQUE, BIOCONVERSION ET MICROBIOLOGIE

par

Anne-Sophie ROBATCHE CLAIVE-BLERVACQ

MARQUEURS PRECOCES DES PREMIERES DIVISIONS
EMBRYOGENES CHEZ LE *CICHORIUM* HYBRIDE '474':
IMPLICATION DU CYTOSQUELETTE.



Soutenue le 19 Janvier 1996 devant la commission d'examen :

M. J. VASSEUR
Me A.M. LAMBERT
Me. N. MICHAUX-FERRIERE

Professeur, Université de Lille
Professeur, IBMP-CNRS, Strasbourg
Chargée de Recherches, BIOTROP-
CIRAD, Montpellier
Directeur de Recherches, INRA, Orléans
Maître de conférences, Université de Lille

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur

Je remercie Mr le Professeur VASSEUR de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de physiologie cellulaire et morphogenèse végétale. Je lui suis gré de m'avoir proposé un sujet de recherche intéressant et original.

Je souhaite remercier :

- Mme le Professeur LAMBERT qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur. Je la remercie également de sa disponibilité, de ses conseils et de ses encouragements,
- Mme MICHAUX-FERRIERE d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.
- Mr CORNU d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

Je remercie Mr et Mme DUBOIS de leur confiance, de leur soutien et de l'intérêt constant qu'ils ont manifesté au cours de cette étude. J'exprime toute ma reconnaissance à Mme DUBOIS pour sa disponibilité et ses discussions fructueuses, pour son enthousiasme, sa curiosité qu'elle m'a fait partagés dès le DEUG et pendant l'élaboration de ce travail. Je remercie plus particulièrement Mr DUBOIS d'avoir accepté la tâche ingrate d'examineur, et d'avoir essayer de me transmettre sa rigueur scientifique, tant écrite qu'orale, dans la présentation de ce mémoire.

Je tiens également à remercier Mr HILBERT de m'avoir guidée dans les techniques d'électrophorèse monodimensionnelle et d'électrotransfert de gel 1D.

J'exprime mes remerciements à Mr ROSETO et à Mme GOBERT pour m'avoir accueillie au début de cette thèse, à la Division d'Immuno-Cytologie Appliquée (UTC, Compiègne) .

Je souhaite remercier Mme SCHMIT et tous les membres de l'équipe de Mme LAMBERT (IBMP-CNRS, Strasbourg) pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette étude et surtout pour leur accueil chaleureux.

Je tiens également à remercier :

- Mr et Mme SCRIVE, Mr SALPERWYCK pour la qualité de leurs travaux photographiques,
- tous les membres du personnel AITOS du laboratoire et des bâtiments d'enseignement pour leur aide amicale.

Mes remerciements s'adressent aussi à Claudine S., Dominique, Stéphane D. et Theeshan, ainsi qu'à Catherine, François L., François W., Stéphane H. et Eric pour leur aide, leurs conseils et leurs encouragements, et tous nos éclats de rire à l'heure des repas. Un grand merci à Anne et Catherine pour leurs conseils portant sur les Northern blots, et plus particulièrement à Catherine pour ses conseils en électrophorèse bidimensionnelle. Merci à Christophe V. et Robert R. pour leur disponibilité et leurs conseils sur les sondes ARNs et la culture bactérienne.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à ma famille et à ma belle-famille, et tout particulièrement à mon mari, pour leur soutien, leur confiance et leurs encouragements, et de m'avoir permis de poursuivre d'aussi longues études.

Merci à tous de m'avoir supportée pendant ces années passées au laboratoire.

INTRODUCTION	1
1. EMBRYOGENESE SOMATIQUE	2
1.1 Principe et définitions de l'embryogenèse somatique	2
1.2 Embryogenèse somatique chez le <i>Cichorium</i> hybride '474' ...	4
1.3 Les glycoprotéines liées à l'embryogenèse	6
2. MODE DE DIVISION DES CELLULES EMBRYOGENES	7
2.1 Dans un système unicellulaire	7
2.2 Dans un système pluricellulaire	8
3. LE CYTOSQUELETTE.....	10
3.1 Rôle du cytosquelette dans la perception des stimuli exogènes	10
3.2 Les tubulines.....	11
3.3 L'actine.....	12
3.4 Polymérisation de la tubuline et de l'actine	14
5. LA MITOSE	18
5.1 Le cycle cytosquelettique	18
5.2 Inhibition des microtubules	26
6. CONTEXTE DE L'ETUDE	29

MATERIEL ET METHODES	31
1. MATERIEL VEGETAL	31
1.1 <i>Cichorium</i> hybride '474'.....	31
1.2 <i>Cichorium</i> cv.'206' et cv. 'Flash'	31
2. METHODES DE CULTURE <i>in vitro</i>	32
2.1 Obtention des embryons somatiques à partir de feuilles	32
2.2 Culture de feuilles en présence d'inhibiteurs	33
3. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES	34
3.1 Coloration des noyaux par des fluorochromes	34
3.2 Coupes en paraffine.....	35
3.3 Coupes semi-fines en résine de méthacrylate	35
3.4 Coupes en congélation	36
3.5 Immunomarquages	37
4. TECHNIQUES D'ANALYSES BIOCHIMIQUES	38
4.1 Electrophorèse mono-dimensionnelle en condition dénaturante	38
4.2 Electrophorèse bi-dimensionnelle	44
5. METHODE D'EXTRACTION DES ARNs TOTAUX DE FEUILLES ET ANALYSE DES ARNs α TUBULINE.....	46
5.1 Extraction des ARNs totaux	46

5.2 Migration des ARNs en gel d'agarose.....	47
5.3 Transfert des ARNs sur une membrane de nylon.....	47
5.4 Hybridation des ARNs α tubuline	48

RESULTATS.....	50
-----------------------	-----------

1^{ère} Partie: MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE SYNCHRONISATION DE LA PREMIERE DIVISION EMBRYOGENE	50
1. VARIATION DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE DU MILIEU DE CULTURE.....	51
2. UTILISATION DU GLYCEROL COMBINEE AU SACCHAROSE	54
3. CONCLUSIONS	56

2^{ème} Partie: CARACTERISATION DES DIVISIONS CELLULAIRES AU COURS DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE	57
1. REACTIVATION DE CELLULES MESOPHYLLIENNES COMPETENTES	57
2. LA PREMIERE MITOSE DES CELLULES EMBRYOGENES.....	61
2.1 Localisation des cellules embryogènes dans le tissu.....	62
2.2 Description du cycle nucléaire	62
2.3 Description du cycle cytosquelettique	64
2.4 Essais d'immunomarquage du réseau microtubulaire dans d'autres cellules foliaires	72
2.5 Conclusions.....	75
3. LES MITOSES EMBRYONNAIRES	75
3.1 Description des divisions embryonnaires.....	75
3.2 Description du cycle cytosquelettique	77
4. VARIATIONS ELECTROPHORETIQUES DE L'ACTINE ET DES TUBULINES	82
4.1 Variations quantitatives de l'actine.....	82
4.2 Variations quantitatives des tubulines.....	84
4.3 Essai de quantification du taux de la β tubuline en chemiluminescence.....	88
4.4 Essai de séparation des isotypes de tubulines	90
4.5 Variations des taux de transcription des ARNs α tubuline... ..	100
4.6 Conclusions.....	101
5. CONCLUSIONS	102

3^{ème} Partie: EFFETS DE LA CAFEINE ET DU VERAPAMIL SUR L'INDUCTION ET L'EXPRESSION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE 104

1. EFFETS DE LA CAFEINE SUR LA REACTIVATION CELLULAIRE DES CELLULES MESOPHYLLIENNES COMPETENTES.....	105
2. EFFETS DE LA CAFEINE SUR LES MITOSES EMBRYONNAIRES.....	109
2.1 Addition de caféine dans l'une ou l'autre phase de culture ..	109
2.2 Addition de la caféine pendant toute la culture	117
2.3 Influence de la caféine sur le nombre et le type de structures embryonnaires.....	118
2.4 Conclusions.....	120
3. VARIATIONS DE L'ACTINE ET DES TUBULINES EN PRESENCE DE CAFEINE.....	121
3.1 Variations quantitatives de l'actine.....	122
3.2 Variations quantitatives des tubulines.....	122
3.3 Conclusions.....	124
4. VARIATIONS DE L'ACTINE ET DES TUBULINES EN PRESENCE DE VERAPAMIL	124
4.1 Variations quantitatives de l'actine.....	124
4.2 Variations quantitatives des tubulines.....	126
4.3 Conclusions.....	126
5. CONCLUSIONS	127

4^{ème} Partie: RECHERCHE DE MARQUEURS CORRELES A L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE 128

1. LES GLYCOPROTEINES INTRATISSULAIRES	129
1.1 Variabilité des glycoprotéines	129
1.2 Effets de la caféine et du vérapamil.....	131
1.3 Effets d'inhibiteurs de la glycosylation	134
1.4 Conclusions.....	137
2. LA CALLOSE, MARQUEUR PRECOCE DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DANS LES RACINES ?	138
2.1 Influence du milieu et des conditions de culture	140
2.2 Relation callose-cytosquelette	142
2.3 Conclusions.....	143
3. CONCLUSIONS	144

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	145
Réactivation cellulaire et compétence à l'embryogenèse somatique ...	145

Synchronisation de la première division des cellules embryogènes	146
Caractérisation de la première division embryogène	151
Mode de division du proembryon	155
Les glycoprotéines et la MEC	157

BIBLIOGRAPHIE	158

ANNEXES	179

Abréviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
AMP	Adénosine mono phosphate
AMPPD	3- (2'-siproadamantane)-4-methoxy-4-3" phosphryloxy)-phenyl-1,5-dioxethane
ANA	Acide naphtalène acétique
ARN	Acide ribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthydiium
BPP	Bande préprophasique
CE	Cellule embryogène
ConA	Lectine Concanavaline A
dCTP	Deoxy cytosine triphosphate
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
dNM	Déoxynojirimycine
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetra acetate
EGTA	Ethylene glycol tetra acetate
eS	Embryon somatique
ES	Embryogenèse somatique
FAA	Formol / Ethanol / Acide acétique
FITC	Fluoresceine iso thiocyanate
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
IEF	Iso électro focalisation
kDa	Kilodalton
MEC	Matrice extra-cellulaire
Mfs	Microfilaments
MOPS	3-[morpholino] propanesulfonic acid
MSB	Microtubule stabilizing buffer
Mts	Microtubules
MtsPN	Microtubules péri-nucléaires
PBS	Phosphate buffer saline
PDA	Piperazide diacrylamide
PIPES	Piperazine-N,N'-bis [2-ethanesulfonic acid]
PM	Poids moléculaire exprimé en kilodalton
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PVP	Poly vinyl pyrrolidone
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SNMts	Sites de nucléation des microtubules
SSC	Saline sodium citrate
SSPE	Tampon sodium saline phosphate EDTA
TBS	Tris buffer saline
TCA	Trichloro acetic acid
TE	Tampon tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N' tetramethyl-ethyl-ethylene-diamine
TM	Tunicamycine
TRITC	Tetramethyl-rhodamine isothiocyanate

Tris
TTBS

Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane
Tween tris buffer saline

UV

Ultra violet

2iP

2 isopentenyladénine

Figures et schémas :

Fig. 1	p 3	Origine cellulaire des embryons somatiques.
Fig. 2	p 10	Schéma d'un microtubule.
Fig. 3	p 11	Schéma d'un microfilament.
Fig. 4	p 14	Schéma d'interprétation des étapes de polymérisation des microtubules et microfilaments.
Fig. 5	p 18	Le cycle cytosquelettique des différents éléments.
Fig. 6	p 19	Comparaison des cycles microtubulaires animaux et végétaux.
Fig. 7	p 22	Schéma de la mise en place du phragmosome en pré-prophase.
Fig. 8	p 23	Schéma de la mise en place de la bande pré-prophasique.
Fig. 9	p 33	Schéma des expériences menées avec la caféine (5 mM)
Fig. 10	p 37	Principe de la méthode d'immuno-détection indirecte.
Fig. 11	p 52	Nombre d'embryons somatiques induits en fonction de la concentration en saccharose du milieu de culture.
Fig. 12	p 53	Répartition des embryons induits par différentes concentrations de saccharose par classes de taille.
Fig. 13	p 55	Répartition des embryons induits en présence de 30 mM ou 360 mM de saccharose par classes de taille.
Fig. 14	p 83	Immunodétection de l'actine et évolution quantitative.
Fig. 15	p 87	Immunodétection des tubulines et évolution quantitative.
Fig. 16	p 89	Immunodétection de la β tubuline et évolution quantitative.
Fig. 17	p 92	Gels 2D selon le type d'IEF. Immunodétection des tubulines sur des membranes de gels 2D.
Fig. 18	p 94	Représentation schématique de la zone putative des isotypes de tubulines.
Fig. 19	p 101	Hybridation des ARNs α tubuline et évolution quantitative.
Fig. 20	p 118	Répartition des structures embryonnaires induites par l'addition séquentielle de caféine.
Fig. 21	p 121	Immunodétection de l'actine et des tubulines de feuilles traitées par la caféine.

Fig. 22	p 123	Effets de la caféine sur l'évolution quantitative de l'actine et des tubulines.
Fig. 23	p 125	Effets du vérapamil sur l'évolution quantitative de l'actine et des tubulines.
Fig. 24	p 132	Glycoprotéines intratissulaires.
Fig. 25	p 133	Effets de la caféine et du vérapamil sur les glycoprotéines intratissulaires.
Fig. 26	p 135	Répartition des embryons au cours d'une culture de feuilles en présence de différentes concentrations de tunicamycine par classes de taille.
Fig. 27	p 136	Effets de la déoxynojirimycine sur le développement des embryons.
Fig. 28	p 141	Evolution du nombre de CE callosiques en fonction des milieux et des conditions de culture des racines.
Fig. 29	p 152	Représentation schématique des modes de divisions embryogènes.

Tableaux :

Tab 1	p 9	Origine et mode de division des CE lors d'une ES au sein d'un tissu foliaire.
Tab 2	p 27	Effets d'inhibiteurs de l'interaction microtubules-nucléotides.
Tab 3	p28	Effets de certains agents chimiques et de régulateurs de croissance sur les microtubules.
Tab 4	p29	Effets de certains agents physiques sur la disposition des microtubules.
Tab 5	p 95	Evolution des polypeptides des zones A et B au cours de la culture.
Tab 6	p 111	Taille et surface nucléaire des structures induites au cours de l'ES de feuilles de l'hybride '474'.
Tab 7	p 119	Répartition des types de structures embryonnaires induites en présence de 5 mM de caféine.
Tab 8	p 119	Tests statistiques de Student.
Tab 9	p 130	Caractéristiques (nombre et PM) des glycoprotéines révélées chez différentes sources de chicorées et différents organes.
Tab 10	p 130	Répartition des différentes glycoprotéines révélées chez différentes sources de chicorées et différents organes.

Tab 11	p 142	Tests statistiques de Student.
Tab 12	p 143	Influence des conditions de culture sur le nombre de CE callosiques.

Planches photos :

PI 1	p 58	Réactivation cellulaire des cellules compétentes.
PI 2	p 60	Localisation des structures embryonnaires.
PI 3	p 63	Cycle nucléaire de la CE dans les tissus.
PI 4	p 66 et 69	La bande préprophasique des CE.
PI 5	p 71	Cycle microtubulaire des CE.
PI 6	p 74	Autres réseaux microtubulaires foliaires.
PI 7	p 76	Les mitoses embryonnaires.
PI 8	p 78 et 80	Réseau microtubulaire des embryons.
PI 9	p 85	Immunodétection des tubulines et évolution quantitative.
PI 10	p 96 à 99	Gels 2D colorés par le nitrate d'argent: évolution des isotypes de tubulines.
PI 11	p 107	Effets de la caféine sur la réactivation cellulaire.
PI 12	p 110	Effets de la caféine sur le noyau et le nucléole.
PI 13	p 113	Effets de la caféine sur les divisions embryonnaires.
PI 14	p 116	Réactivation et divisions dans les cellules épidermiques.
PI 15	p 117	Effets de la caféine sur le développement des eS.
PI 16	p 139	Callose et ES racinaire.

Liste des Annexes :

Annexe 1	Composition du milieu d'induction des embryons somatiques.
Annexe 2	Composition du milieu de développement des embryons.
Annexe 3	Composition du milieu d'induction de l'embryogenèse dans les feuilles.
Annexe 4	Composition du tampon MSB.
Annexe 5	Protocoles et composition des solutions d'immunodétection.
Annexe 6	Composition du tampon de lyse.
Annexe 7	Composition des gels de polyacrylamide.
Annexe 8	Composition du tampon de Laemmli
Annexe 9	Protocole et composition des solutions pour l'électro-transfert.
Annexe 10	Coloration des gels par le nitrate d'argent.
Annexe 11	Composition des gels d'iso-électrofocalisation.
Annexe 12	Marqueurs de poids moléculaire.

Annexe 13 Composition des tampons de migration des ARNs.

Annexe 14 Protocole de migration des ARNs.

Annexe 15 Composition des tampons et conditions d'hybridation.

Annexe 16 Composition du bleu d'aniline (callose).

INTRODUCTION

Les chicorées (*Cichorium*) appartiennent à la famille des Astéracées et sont subdivisées en 3 espèces européennes: *C. endivia*, *C. intybus* et *C. spinosum*. Les deux premières espèces possèdent un intérêt agronomique. Ainsi, *C. endivia* est utilisée comme salade (scarole, chicorée frisée). *C. intybus* comprend de nombreuses variétés dont certaines sont employées comme sources de chicorées à café (racines de la var. *sativum* Biskoff), dans la production d'endives (bourgeon étioilé de la var. *folisum* Biskoff), ou pour leurs feuilles (var. *silvestre*; Trévise, Pain de Sucre, Castelfranco ...) (LONGLY et LOUANT, 1987; LETEINTURIER et al., 1991; VASSEUR et al., 1995).

VASIL et al. (1964) puis VASIL et HILDEBRANDT (1966) ont été les premiers à révéler les potentialités embryogènes de cals issus d'embryons zygotiques de *C. endivia*. L'utilisation d'explants racinaires a permis à HEIRWEGH et al. (1985) d'obtenir des embryoïdes capables de se développer en plantules. Mais dans ces deux cas, les embryons somatiques (eS) produits nécessitaient la formation préalable d'un cal.

Les premiers travaux de notre laboratoire sur l'embryogenèse somatique (ES) chez *Cichorium* ont été publiés en 1988. Parmi les différents génotypes testés, seuls deux ont été capables de produire des eS: *C. intybus* var. Magdebourg cv.'1106' et *C. hybride* '474' (*C. intybus* var. *sativum* x *C. endivia* var. *latifolia*). Les premiers résultats portèrent sur l'obtention d'eS à partir d'organes reproducteurs tels que les anthères ou les styles (DUBOIS et al., 1988; GUEDIRA et al., 1989). Par la suite, les racines et les feuilles de vitroplantes âgées de 2-3 mois se sont révélées particulièrement aptes à l'ES (GUEDIRA et al., 1990; DUBOIS et al., 1991). Ces travaux s'intègrent dans l'étude de la différenciation des cellules compétentes à l'ES et dans la recherche de marqueurs précoces (prédictifs) de cette potentialité.

Ces dernières années, les progrès réalisés dans l'étude du cytosquelette montrent que ce dernier joue un rôle majeur dans tous les processus morphogénétiques. En effet, cette structure tridimensionnelle, composée de 3 réseaux (actine, tubulines, filaments intermédiaires), se modifie en fonction des stimuli endogènes ou exogènes. Ces bouleversements contribuent à la mise en place de nouvelles configurations cytosquelettiques qui orienteront la croissance et la forme de la cellule.

Il nous a donc paru intéressant d'observer les modifications qui s'opèrent dans les cellules végétales compétentes à l'ES, autant d'un point de vue cytologique que biochimique. En effet, la dédifférenciation de telles cellules induit

une réorganisation du cytosquelette qui leur permettront de s'engager dans le cycle cellulaire mitotique: lors de la première division embryogène.

Le rappel bibliographique qui suit se rapportera à l'ES, évènement singulier qui, à notre connaissance, n'est décrit que chez les Spermaphytes. Notre étude se focalisera sur l'aspect dynamique de l'induction de la première division embryogène et de l'élément qui en est une de ses clés: le cytosquelette.

1. EMBRYOGENESE SOMATIQUE

1.1 Principe et définitions de l'embryogenèse somatique

L'embryon est une structure bipolaire avec un pôle caulinaire et un pôle racinaire. Il en existe deux types: les embryons zygotiques issus de la fusion de deux gamètes et les eS issus de la dédifférenciation d'une cellule cible. Le départ du programme de développement de l'embryon zygotique est une conséquence des changements dus à la fécondation. La différenciation des cellules embryogènes procède d'un programme pré-établi.

L'état totipotent des cellules somatiques végétales ayant la compétence de réinitier tout un programme de développement à travers l'embryogenèse dite somatique est un phénomène biologiquement remarquable. Mais seul un nombre limité de cellules ont un tel potentiel, celui-ci variant en fonction des espèces, du génotype ou du tissu. En dépit d'un grand nombre d'observations empiriques de ces ts des tissus et des cellules variés, les bases moléculaires et cellulaires de ce mode de développement sont peu connues. Pourtant, comme le signale MONNIER (1988) l'embryogenèse somatique pourrait être une alternative intéressante à la propagation d'individus haploïdes, transformés, homozygotes auto-incompatibles ou hybrides.

Les eS suivent les mêmes stades du développement que les embryons zygotiques. Toutefois, d'un point de vue morphogénétique, les premières divisions sont difficiles à observer et ne sont peut-être pas identiques à celles de l'embryon zygotique. L'eS peut avoir pour origine (Fig. 1) (MAHESWARAN et WILLIAMS, 1985; MICHAUX-FERRIERE et SCHWENDIMAN, 1992) :

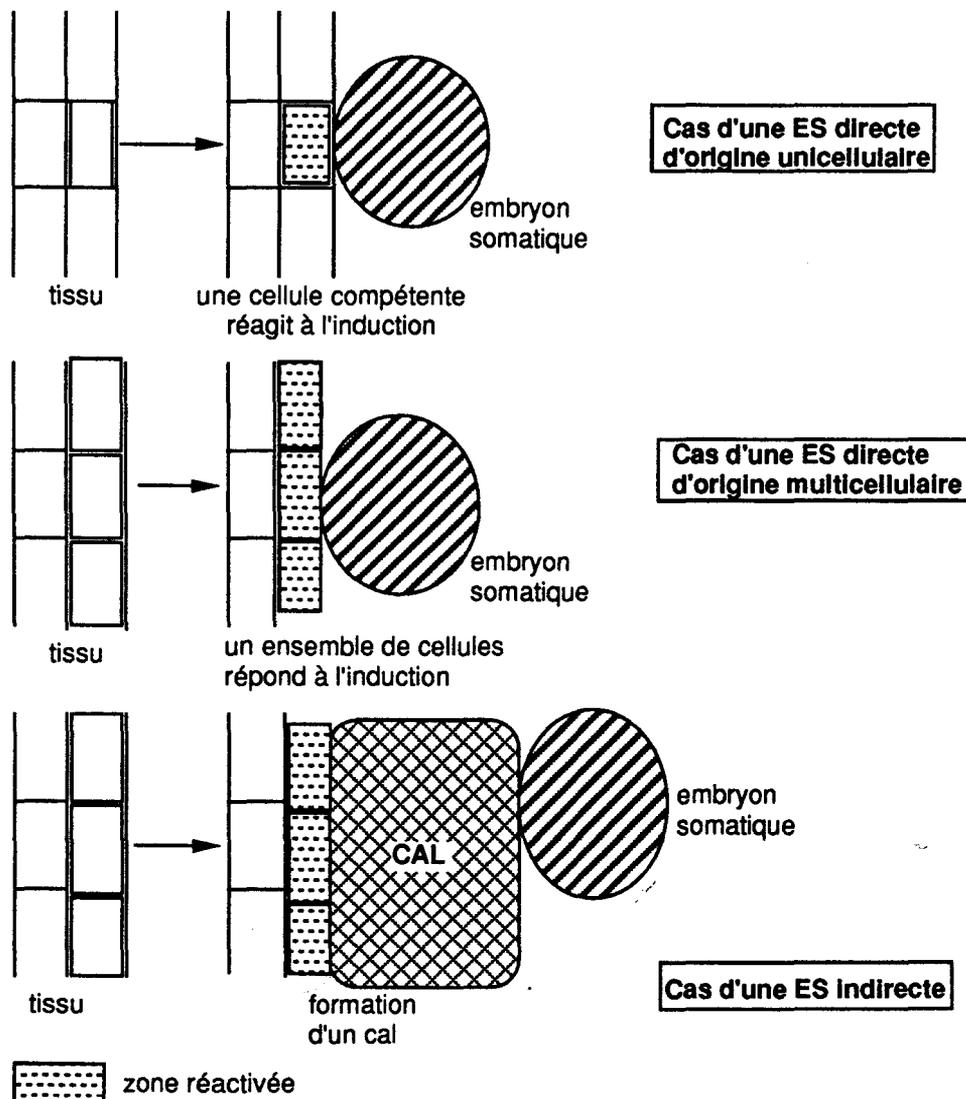


Figure 1 : Ontogénie des embryons somatiques: origine directe ou indirecte, uni- ou multicellulaire (d'après MAHESWARAN et WILLIAMS, 1985).

- une seule et unique cellule qui, sous l'effet d'une induction (au moyen d'hormones, de combinaisons physico-chimiques telles que agitation, température, lumière...), se divise et forme un eS : **ES directe unicellulaire**,

- plusieurs cellules (ou masse pro-embryogénique) issues d'un cal (ensemble de cellules indifférenciées en prolifération) : **ES indirecte multicellulaire** ou d'un tissu : **ES directe multicellulaire**.

L'initiation de la synthèse de l'ADN et la mitose sont des événements clés de la compréhension de la réactivation du cycle cellulaire considérée comme un prérequis pour une induction embryogène (DUDITS et al., 1991). Elles sont accompagnées d'une altération de l'expression des gènes, et subséquemment, par des changements des fonctions cellulaires.

1.2 Embryogenèse somatique chez le *Cichorium* hybride '474'

1.2.1 Embryogenèse somatique à partir de tissus végétatifs ou d'organes reproducteurs

Chez cet hybride, l'ES a pu être induite au sein de tissus variés. L'étude cytologique a démontré l'origine directe et unicellulaire des eS obtenus. L'embryogenèse peut être observée sur :

- des styles (DUBOIS et al., 1988),
- des anthères (GUEDIRA et al., 1989),
- des racines (GUEDIRA et al., 1990),
- des feuilles (DUBOIS et al., 1991),

Une température élevée (35 °C) est le facteur physique le plus important pour induire la formation des eS. L'obscurité et l'agitation orbitale sont aussi des facteurs favorables. Après une dizaine de jours, les eS se détachent plus ou moins facilement en fonction de la nature des explants utilisés, et sont alors visibles à l'oeil nu.

Dans les feuilles, les premières modifications cytologiques apparaissent dès le troisième jour de culture dans le milieu inducteur. Les cellules cibles ayant répondu au stimulus sont reconnaissables sur des coupes au moyen d'une coloration safranine - fast green, et sont alors appelées cellules embryogènes (CE). Ces cellules sont les seules à se diviser (DUBOIS et al., 1991; ROBATSCH-CLAIVE et al., 1992). Lorsque les feuilles sont blessées, une accumulation de telles CE peut se faire dans une zone de moins de 1 mm de part et d'autre des blessures pratiquées perpendiculairement à la nervure (DECOUT et al., 1994).

1.2.2 Détermination de marqueurs de l'embryogenèse somatique

Sur les CE, des spots de callose (β -1,3-D-glucane) sont mis en évidence, au moyen de bleu d'aniline sous microscopie UV. Ces spots peuvent fusionner et former une fine couche callosique, limitant ainsi les corrélations entre la CE et les cellules voisines (DUBOIS et al., 1990). La callose a aussi été mise en évidence autour des CE de *Trifolium* (MAHESWARAN et WILLIAMS, 1985). CARAFA et PIZZOLONGO (1990) ont émis l'hypothèse que la callose serait une barrière régulant les flux moléculaires des cellules de l'embryon de *Cytinus*.

Au cours de l'ES dans les feuilles de l'hybride '474', deux protéines acides de 38 kDa sont détectées lors de l'induction, et persistent durant la formation des eS (HILBERT et al., 1992). Des changements des diagrammes protéiques apparaissent dès le troisième jour de culture dans les feuilles cultivées en présence de glycérol (BOYER et al., 1993). Une étude des polyamines libres a été réalisée chez cet l'hybride '474'; celles-ci augmentent jusqu'au 5^{ème} jour de l'induction (avant transfert) puis diminuent jusqu'au 10^{ème}. Chez une autre lignée non embryogène, aucune baisse n'est observée. L'inhibition de la voie de synthèse utilisant l'arginine décarboxylase réduit l'embryogenèse. Celle-ci est restaurée par l'addition de putrescine. La voie de l'ADC serait donc privilégiée lors de l'induction embryogène chez '474' (SAUDEMONT, 1992). Dans ce type d'inhibition, l'expression des protéines est aussi modifiée (HELLEBOID et al., 1995).

1.2.3 La matrice extra-cellulaire des embryons somatiques

Les eS de racines de *Cichorium* hybride '474' rompent les tissus et émergent en surface du tissu racinaire. En microscopie électronique à balayage, les eS globulaires dépourvus de protoderme présentent à leur surface une matrice extracellulaire (MEC) de nature lipo-glycoprotéique (DUBOIS et al., 1990 ; DUBOIS et al., 1992). Des observations en microscopie électronique à transmission montrent l'interrelation entre le réseau fibrillaire et le cytosquelette (VERDUS et al., 1993). DUBOIS et al., (1991) ont également démontré qu'une lectine (*Dolichos biflorus* agglutinin) se fixe, de façon spécifique, sur les cellules embryogènes et les cellules des proembryons. Or, chez certaines cellules animales, des protéines de surface de la MEC, qui jouent un rôle dans l'adhésion et la reconnaissance des cellules, sont liées au cytosquelette (RUOSLATHI et PIERSCHBACHER, 1987). Une telle MEC a été décrite chez des cals embryogènes de *Citrus* (BELKOURA,

communication personnelle), de *Pinus nigra* (JASIK et al., 1995), de *Drosera rotundifolia* et de *Zea mays* (SAMAJ et al., 1995).

1.3 Les glycoprotéines liées à l'embryogenèse

1.3.1 Types de glycoprotéines pariétales

Trois classes majeures de glycoprotéines structurales pariétales sont actuellement étudiées et sont distinguées selon leur taux d'acides aminés en hydroxyproline, en proline (CASSAB et VARNER, 1988; DONNELLY et al., 1993; KIELISZWESKI et LAMPORT, 1994; SMALLWOOD et al., 1994; VERA et al., 1994) ou en glycine; ces dernières sont différenciellement exprimées selon les organes (CONDIT et al., 1990). Chez les plantes, la MEC est située à la surface cellulaire et comporte, en plus des protéines citées auparavant, des protéines riches en arabino-galactanes (KIELISZWESKI et al., 1992) dont l'expression est régulée de façon spatio-temporelle (SCHINDLER et al., 1995). Des modifications pariétales des résidus glycaniques ont été décrites au cours de l'ES. Ainsi, PENNELL et al. (1992) ont mis en évidence un épitope glycanique reconnu par l'anticorps JIM8, à partir de suspensions cellulaires embryogènes de carotte. Le marquage s'estompe dès que la CE entre en mitose.

1.3.2 Inhibition de la glycosylation

Les glycoprotéines pariétales font l'objet de nombreuses recherches, notamment au niveau de leur glycosylation. Des antibiotiques ont ainsi été testés, en particulier la tunicamycine (TM) isolée de *Streptomyces lysosuperificus*. Son utilisation affecte le transfert de la chaîne glycanique aux extrémités NH₂ des protéines dont la synthèse n'est pas modifiée (De VRIES et al., 1988).

La TM a été surtout employée sur des suspensions cellulaires de carotte. L'addition de 1 µg.ml⁻¹ au milieu de culture n'inhibe pas la différenciation des cellules alors qu'elle bloque, de façon réversible, le développement des embryons somatiques à différents stades. La TM n'affecte pas le processus embryogène mais interfère avec les processus de développement (LO SCHIAVO et al., 1986). La réversibilité a pu aussi s'obtenir par l'addition dans le milieu de culture de protéines extracellulaires correctement glycosylées notamment une peroxydase de 38 kDa (CORDEWENER et al., 1991). Une modification de ces glycoprotéines

entraîne un blocage de l'embryogenèse somatique ($2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de TM) sans affecter les cellules non différenciées en prolifération (De VRIES et al., 1988).

Par ailleurs, l'emploi de déoxynojirimycine (dNM, inhibiteur de la glycosylation en - O -) à 1 mM, dans les cals de carotte, conduit à l'obtention d'embryons somatiques anormaux. Mais aucune réversion n'a été possible (De VRIES et al., 1988).

2. MODE DE DIVISION DES CELLULES EMBRYOGENES

2.1 Dans un système unicellulaire

2.1.1 Embryogenèse somatique à partir de protoplastes et de suspensions cellulaires

Des protoplastes issus de suspensions cellulaires de *Picea glauca* ont été étudiés. Ils forment des amas où les microtubules (Mts) de la zone embryonnaire sont corticaux et parallèles, alors que les cellules du pseudo-suspenseur se divisent rarement et ont des Mts transverses. Ainsi, il y a établissement d'une polarité conduisant à la formation d'un embryon, lors de la détermination d'une zone embryonnaire et de l'obtention d'un suspenseur (FOWKE et al., 1990). Une telle polarité causée par une division asymétrique avait déjà été rapportée par DIJAK et SIMMONDS (1988) dans les protoplastes de *Medicago sativa*. TAUTORUS et al. (1992) ont comparé la morphologie des réseaux microtubulaires de suspensions cellulaires embryogènes (*Picea mariana*) et non-embryogènes (*Pinus banksiana*). La suspension embryogène montre de nombreuses divisions au contraire du témoin. La première division de la CE est asymétrique, et les cellules filles présentent un réseau de Mts désordonnés.

Par contre, chez des suspensions cellulaires de *Triticum aestivum*, une ES indirecte a été obtenue; les premières divisions des CE au sein de ce microcal sont symétriques (VASIL et al., 1990).

2.1.2 Embryogenèse somatique à partir de microspores

Il est possible d'induire une embryogenèse à partir de microspores de *Brassica* avec un rendement de 70 %. Seule une température de 32 °C permet l'obtention d'eS par une première division symétrique issue d'une réorientation du réseau de Mts. Les Mts auraient donc un rôle primordial dans les changements liés à l'état embryogène (HAUSE et al., 1993). Pourtant peu de différences dans les diagrammes protéiques ont été observées, de même qu'au niveau des isotypes des protéines du cytosquelette (CORDEWENER et al., 1994). L'aptitude à l'ES peut être liée à la position du noyau des microspores dans le cycle cellulaire. Ainsi, il semble nécessaire que la cellule végétative se divise avant l'initiation de l'embryon (BINAROVA et al., 1993). La compétence à l'ES peut aussi dépendre du type d'explant; ainsi, chez le maïs, seuls les cals durs issus de microspores produisent des eS (PRETOVA et al., 1993).

2.2 Dans un système pluricellulaire

L'ES est très souvent associée à des phénomènes organogènes (bourgeon, racine) simultanés, et/ou, séparés, dont les voies sont gouvernées par une modification de la balance hormonale, des conditions d'éclairement ou de température. Quels que soient le mode d'ES (directe ou indirecte) et l'ontogénie des eS (origine uni- ou pluricellulaire) (Fig. 1), deux sites majeurs sont le siège de l'ES: la couche épidermique et/ou sous-épidermique ainsi que les cellules périvasculaires. Dans la plupart des cas (Tableau 1), les explantats correspondent souvent à des structures foliaires jeunes (cotylédons, feuilles jeunes). Les premières divisions sont observées après une période de culture très variable (1 à 52 jours), ainsi que les plans de divisions des premières mitoses.

Matériel végétal	Zone(s) concernée(s)	Durée d'induction	Mode de division	Références
origine unicellulaire des eS				
<i>Dendrathermagra nudiflora</i>	épid/ss épide de nervure centrale	52 jours	anticlines puis non définies	MAY et TRIGIANO, 1991
<i>Cichorium</i> hybride '474'	toutes	3 à 7 jours suivant les milieux de culture	anticlines puis périclines <u>pour les 1ers eS</u>	DUBOIS et al., 1991 BLERVACQ et al., 1995a
origine multicellulaire des eS				
<i>Pisum sativum</i>	épid/ss épide de cotylédon	3-4 jours	anticlines puis non orientées	TETU et al., 1990
<i>Helianthus annuus</i>	épid/ss épide +2-3 couches internes de cotylédon	dès 1 ^{er} jour	péricline, oblique ou anticline puis non orientées	BRONNER et al., 1994
<i>Camellia japonica</i>	parenchyme sous épidermique de cotylédon	minimum 14 jours	non définies	PEDROSO et PAIS, 1993
<i>Stylosanthes scabra</i>	cellules autour du futur faisceau vasculaire de cotylédon	28 jours	péricline (obtention d'une file de cellule) puis anticline	DORNELAS et al., 1992
ES indirecte				
<i>Coffea arabica</i>	cellules péri-vasculaires proches de l'excision	5 jours	périclines puis non orientées	MICHAUX-FERRIERE et al., 1987
<i>Picea glauca</i> <i>Picea mariana</i>	épiderme de cotylédon	28 à 42 jours suivant les milieux	asymétriques pour l'eS issu du cal	LELU et BORNMAN, 1990

Tableau 1 : Embryogenèse somatique à partir de feuilles: localisation et mode de division des structures induites.

3. LE CYTOSQUELETTE

3.1 Rôle du cytosquelette dans la perception des stimuli exogènes

Les changements morphogénétiques spécifiques requièrent une coordination entre les signaux de l'environnement, la réponse cytoplasmique et le développement de la paroi. Selon NAGAI (1993), CYR (1994) et CYR et PALEVITZ (1995), la réaction à un stimulus est composée d'une chaîne d'au moins trois éléments :

- la perception du stimulus qui inclut des interactions directes, physiques ou chimiques, entre le stimulus et des récepteurs moléculaires;
- la transduction dans le système de réception, avec des modifications séquentielles de ce changement conduisant à un système effectif spécifique;
- la réponse finale et sa mise en oeuvre par un système effectif.

Des cellules peuvent réagir à cet environnement par une modification caractéristique de leur élongation ou du déroulement de leur développement. Par exemple, l'organisation d'un renforcement des microfibrilles celluloses de la paroi détermine la polarité caractéristique du phénomène de turgescence des cellules en expansion et donc de la morphogenèse cellulaire (SEAGULL, 1989).

Lors de la mise en culture d'un explant *in vitro*, il existe un signal de blessure. GOODBODY et LLOYD (1990) l'ont étudié sur des fragments de feuilles de *Tradescantia*. Ce signal se transmet environ sur l'équivalent d'un cercle d'une distance de 4 diamètres cellulaires. Au delà de cette distance, chaque point de blessure est séparément encerclé par des cellules en division. Si ces points sont proches, leurs cercles d'action fusionnent. Des courants ioniques semblent être impliqués dans ce phénomène. La blessure pourrait induire un courant interne, composé d'un influx de calcium qui se focaliserait sur le site mis en cause. HUSH et al. (1990) suggèrent que si le taux de calcium cytosolique augmente, un gradient intracellulaire de calcium pourrait servir à déterminer une nouvelle polarité, probablement *via* des effets sur le réseau des Mts.

L'actine a un rôle crucial lors d'un choc ou d'une blessure. Une réorientation parallèle du réseau est alors rapidement induite chez les plantes, et s'effectue

avant même la migration traumatotactique du noyau vers la paroi adjacente à la blessure. L'investigation des mécanismes régulant ces changements dynamiques de l'actine, en termes d'espèces moléculaires protéiques et de leur mode de fonctionnement, semble importante si l'on veut comprendre les chaînes de transduction impliquées dans les mouvements induits par un stimulus dans de telles cellules.

La position spatiale des Mts est importante: ils sont proches du plasmalemme qui est le siège de la synthèse de cellulose. Les Mts seraient localisés près de ces sites et des connexions entre ces deux éléments ont d'ailleurs été observées par de nombreux auteurs (SEAGULL, 1989; JUNG et WERNICKE, 1990; GIDDINGS et STAEHELIN, 1991). L'analyse des fractions membranaires de *Nicotiana* a même permis de déceler l'existence d' α tubuline (LAPORTE et al., 1993, SONESSON et WIDELL, 1993).

3.2 Les tubulines

Le microtubule est une sorte de conduit d'un diamètre extérieur de 25 à 28 nm et intérieur de 15 nm, mais de longueur variable. Il est, en fait, constitué de 13 protofilaments ayant chacun 4-5 nm (Fig. 2).

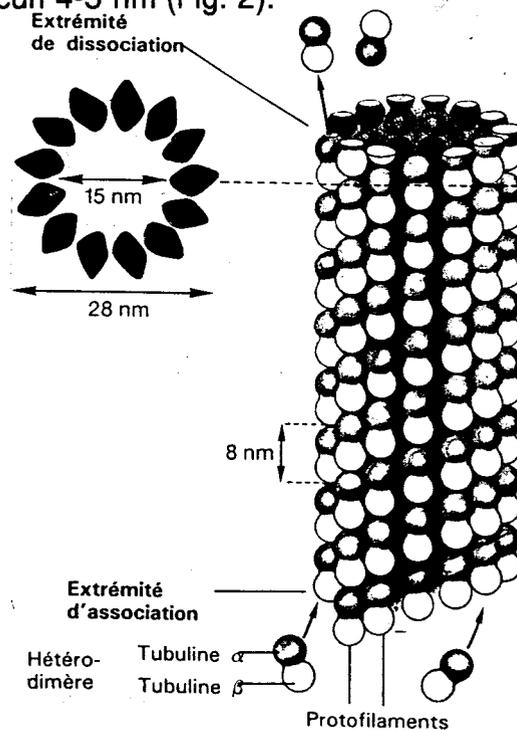


Figure 2 : Microtubule. A droite: modèle tridimensionnel d'un microtubule et de l'agencement des sous-unités de tubulines. A gauche: coupe schématisique d'un microtubule (LÜTTGE et al., 1992).

Chaque protofilament résulte de la polymérisation d'hétérodimères stables d' $\alpha\beta$ tubulines (taille \pm 8 nm) ne comportant pas de liaison covalente.

La tubuline est une protéine globulaire, ou ellipsoïdale qui, sous forme hétérodimère $\alpha\beta$, constitue la sous-unité protéique des Mts. Trois isoformes de tubuline ont été décrites: l'alpha tubuline, la bêta tubuline et la gamma tubuline (OAKLEY et OAKLEY, 1989; OAKLEY, 1992 et 1994; LIU et al., 1993 et 1994; PALEVITZ et al., 1994). Chaque isoforme comporte plusieurs isotypes. Leurs poids moléculaires (PM) sont compris entre 52 et 58 kDa (LIU et al., 1993 et 1994). L' α et la β tubuline ont 35 à 40 % d'homologies entre elles. Une cinquantaine d'acides aminés ont été déterminés parmi les 500 que renferme chacune de ces molécules. La γ tubuline possède 30% d'homologie avec les formes α et β . Cette γ tubuline est peu représentée dans le règne animal et pourrait jouer un rôle dans la nucléation des Mts (JOSHI et al., 1992; OAKLEY, 1992; JULIAN et al., 1993)

Le site d'accrochage des anticorps anti- α ou β tubuline se situe à l'extrémité carboxy-terminale. Ainsi, le site de l'anticorps YOL 1/34 (commercialisé par SERA Lab.) comprend neuf acides aminés en position α 414-422, alors que son homologue YL1/2 a son site compris entre β 120-150. Le DM1A (commercialisé par SIGMA) réagit sur un site α 426-450, où les acides aminés 426 à 430 présentent un intérêt particulier pour la réaction. L'extrémité amino-terminale semble être moins accessible aux enzymes et aux anticorps. L'anticorps DM1B (SIGMA) se lie sur une région comprise entre β 416 et 430. Les anticorps anti-tubulines commercialisés par AMERSHAM se complexent au niveau de la zone α 339-390 et β 339-417 (BREITLING et LITTLE, 1986; SERANO et al., 1986).

La tubuline possède un site de forte affinité pour un cation divalent (Mg^{++}) et pour un nucléotide phosphate : la guanosine di- ou triphosphate (GDP, GTP). Par ailleurs, elle a des sites qui ne seront fonctionnels qu'après une étape dite d'activation (PANTALONI, 1989). La dimérisation résulte d'un contact entre deux extrémités amino-terminales et deux extrémités carboxy-terminales (FOSKET et MOREJOHN, 1992).

3.3 L'actine

L'actine est une protéine globulaire de 42 à 45 kDa qui constitue la sous-unité protéique des microfilaments (Mfs). Ces sous-unités se polymérisent sous

une forme hélicoïdale dont le pas varie de 5,1 à 5,9 nm selon le degré de compaction (Fig. 3). Elle peut être présente sous plusieurs isoformes (MEAGHER et Mc LEAN, 1990). Elle a une forte affinité pour le Mg^{++} ainsi que pour l'adénosine di- ou triphosphate (ADP, ATP). Comme la tubuline, certains de ses sites doivent être activés pour être fonctionnels (PANTALONI, 1989). Mais elle présente plus de variabilité que cette dernière.

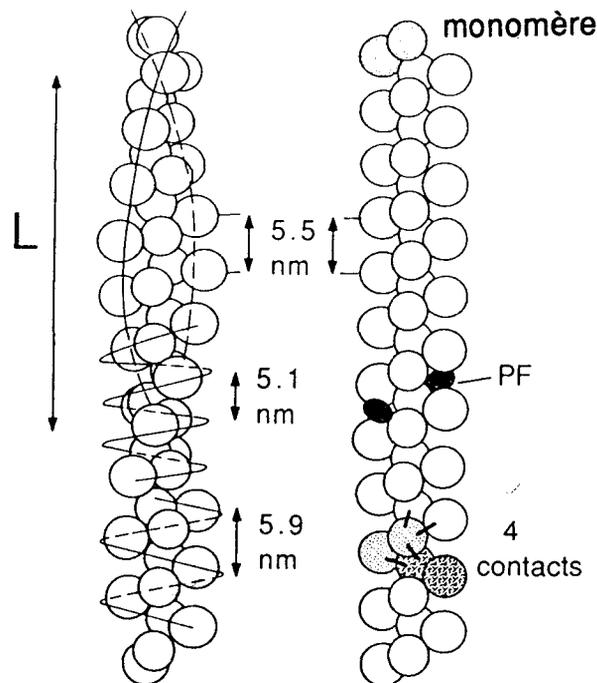


Figure 3: Arrangement des monomères de 43 kDa et de leurs deux domaines structuraux au sein des microfilaments (Mfs). (a) Vue latérale d'un microfilament. Des hélices variées peuvent être dessinées en passant par des points équivalents entre chaque monomère; trois hélices de différents pas sont indiquées. La plus superficielle de 5,9 nm d'écartement, qui est aussi une hélice gauche ainsi que celle de 5,1 nm, qui est une hélice droite, sont constantes mais les deux autres peuvent varier de façon significative ($L=36-40$ nm). (b) Arrangement des sous-unités en deux rubans non enroulés avec les deux grandes hélices droites. Si, comme le suggère la formation cristalline, le domaine interne forme un cœur unique hélicoïdal, le domaine externe serait principalement responsable de la forme de la F-actine. Des contacts sont possibles entre les domaines des monomères; ils sont indiqués par des barres noires entre des sous-unités voisines. Chaque monomère semble être en contact avec au moins 4 domaines différents de monomères voisins. La position où la molécule de proline (PF) est insérée dans l'arrangement cristallin est indiquée (AMOS et AMOS, 1991).

Sa structure varie en fonction des rôles qu'elle exerce dans la cellule. Elle peut se présenter sous forme de F-actine, elle constitue alors des polymères les Mfs, ou sous forme de G-actine (monomère).

3.4 Polymérisation de la tubuline et de l'actine

Pour qu'il y ait polymérisation des tubulines en Mts, ou de l'actine en Mfs, il faut réunir un certain nombre de conditions. La polymérisation comporte quatre phases principales (Fig. 4): l'activation, la nucléation, l'élongation, et l'état d'équilibre, qui peut être stationnaire avec régulation en boucle (PANTALONI, 1989).

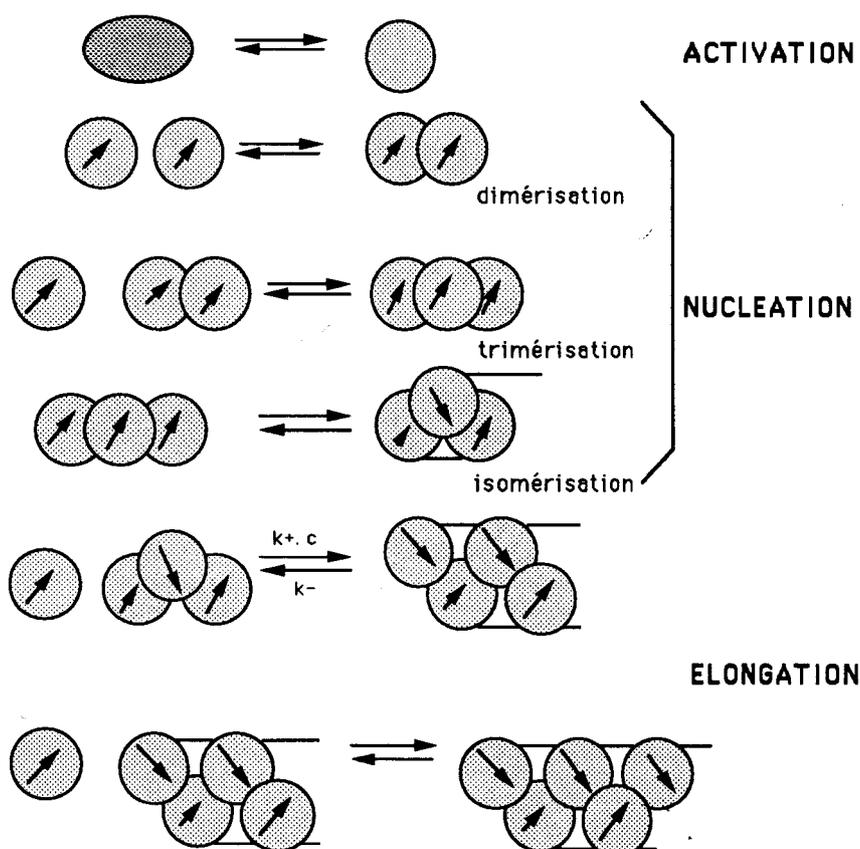


Figure 4: Schématisation des différentes étapes de polymérisation des microtubules et des microfilaments (d'après PANTALONI, 1989).

3.4.1 L'activation

Différentes conditions physico-chimiques sont nécessaires pour activer le monomère, afin qu'il devienne polymérisable. Il faut un pH proche de la neutralité, la présence de nucléotide triphosphate (ATP ou GTP), de cations Mg^{++} et :

- pour l'actine , une force ionique élevée (0,1 M KCl)
- pour la tubuline, une température supérieure à 30°C.

Les monomères entrent alors en interaction avec leur voisin par leurs aires de plus forte affinité et forment ainsi des oligomères linéaires.

3.4.2 La nucléation

C'est l'étape où apparaît le premier élément de structure hélicoïdale du polymère, c'est à dire, un site d'élongation formé de deux sous-unités voisines et non plus d'une seule. Cette étape peut être considérée comme une étape d'isomérisation. La nucléation est une réaction exothermique (FOSKET et MOREJOHN, 1992).

Chez les animaux et les végétaux inférieurs, les Mts émergent du centrosome durant l'interphase ou la mitose (AMOS et AMOS, 1991). Mais les végétaux supérieurs sont acentriolaires. Différentes études ont alors été entreprises pour déterminer le site de nucléation des Mts. La surface nucléaire semble être une bonne candidate (FALCONER et al., 1988; MOLE-BAJER et al., 1990; LAMBERT et al., 1991; STAIGER et LLOYD, 1991; CHEVRIER et al., 1992; LIU et PALEVITZ, 1992; LAMBERT, 1993; SCHMIT et al., 1994; STOPPIN et al., 1994). De la tubuline exogène a pu être intégrée à ce niveau dans les cellules de *Tradescantia* (ZHANG et al., 1990) et chez *Haemanthus* (VANTARD et al., 1990). Toutefois, étant donné la dissociation entre les étapes de nucléation et d'organisation, il serait préférable d'employer le terme de sites de nucléation des Mts (SNMts) (LAMBERT, 1993; LAMBERT et LLOYD, 1994). Malgré la codistribution des Mts et des Mfs, il est plus difficile de déterminer le site de nucléation de l'actine (SCHMIT et LAMBERT, 1990). Chez *Dictyostelium discoideum*, la ponticuline semblerait être une bonne candidate pour cette initiation de la nucléation (LUNA et al., 1984; SCHWARTZ et LUNA, 1986 et 1988; SHARIFF et LUNA, 1990; CHIA et al., 1993)

3.4.3 L'élongation

L'élongation est une étape plus connue pour les Mts. Une sous-unité monomérique se fixe à l'extrémité d'association du polymère, et engendre à son tour un site identique à celui qu'elle vient d'occuper. La polymérisation se propage jusqu'à ce que l'appauvrissement en monomères du milieu entraîne un ralentissement de la vitesse de polymérisation. On atteint alors un état d'équilibre. Cet état est un état dynamique où les oligomères continuent à se lier et à perdre des sous-unités à l'extrémité de dissociation.

3.4.4 Régulation de la polymérisation des Mts par le calcium

Le calcium (Ca^{++}) peut être impliqué dans les réponses issues d'une modification de la température. A basse température, les membranes plasmiques des plantes sensibles passent d'un état physique normal (flexible) à un état de transition de type gel. De tels changements affectent la perméabilité, qui induit une perturbation de la balance ionique intracellulaire. WOODS et al. (1984) suggèrent qu'un effet rapide de telles températures sur la cyclose et sur la structure cytoplasmique pourrait causer une décompartmentation des ions Ca^{++} intracellulaires, aboutissant ainsi à un dépassement de la concentration calcique critique.

Les systèmes de signaux intracellulaires qui impliquent des réarrangements des éléments cytosquelettiques sont souvent en relation avec un changement du taux de Ca^{++} libre. Celui-ci, en temps normal est d'environ $0,1 \mu\text{M}$. Le Ca^{++} est excellent comme messenger car il agit en se diffusant dans le cytoplasme. Les éléments du cytosquelette sont sensibles à l'augmentation du Ca^{++} . Des taux élevés peuvent conduire à leur désassemblage par des mécanismes variés incluant l'attaque des Mfs par des protéases spécifiques ou non, activées par le Ca^{++} . Ainsi à haute concentration ($>10^{-6} \text{ M}$), les Mts peuvent aussi se dépolymériser. L'augmentation du taux de Ca^{++} peut interagir avec la calmoduline et les protéines associées aux Mts (CYR, 1991).

3.5 Autorégulation des ARNm de tubulines

Le premier niveau de régulation consiste en l'activation d'un ou plusieurs membres des petites familles multigéniques qui codent pour chaque sous-unité.

Le deuxième niveau est le taux de protéines obtenues qui doit être suffisant afin d'autoréguler l'ARNm. Une telle autorégulation a déjà été rapportée chez des plantes (CLEVELAND et al., 1981; CYR et al., 1987). Les modifications des taux de tubulines pourraient résulter d'une évolution dans l'efficacité de la transcription de l'ARNm selon CLEVELAND et al. (1981), ou des variations dans son abondance. Le contrôle serait cytoplasmique et pourrait concerner la maturation des ARNs.

La synthèse d' α tubuline serait apparemment contrôlée par des changements sélectifs d'ARN. Mais le site qui confère l'autorégulation est beaucoup moins connu que celui de la β tubuline (CLEVELAND et THEODORAKIS, 1994). Par ailleurs, certains transcripts sont accumulés de façon différentielle suivant les organes et leur phase de développement (DOLFINI et al., 1993).

Une diminution du taux de l'ARNm- β tubuline, en réponse à l'élévation des sous-unités de tubuline, devrait résulter d'une altération de la stabilisation des ARNm cytoplasmiques (CARON et al., 1985; PITTENGER et CLEVELAND, 1985). La séquence responsable de cette instabilité serait localisée au niveau du premier exon (YEN et al., 1988), mais des nucléases associées aux ribosomes interagissent aussi au niveau de la relation peptide-ARNm (CLEVELAND et THEODORAKIS, 1994).

CYR et al. (1987) ont étudié les modulations d'expression des protéines et des ARNms, lors du développement des embryons somatiques, issus de suspensions cellulaires de carotte. Au moment de l'initiation des cellules, leurs taux sont faibles, mais ils augmentent fortement après le stade globulaire. L'étude des ARNm les ont conduits à cette conclusion: la formation des Mts au cours de l'embryogenèse précoce est contrôlée par d'autres facteurs que la quantité de monomères présents. La formation des Mts, lors des stades ultérieurs, serait coordonnée avec les changements de la transcription du gène tubuline et de la taille du stock d'hétérodimères disponibles.

5. LA MITOSE

5.1 Le cycle cytosquelettique

Deux évènements majeurs sont caractéristiques des végétaux supérieurs (Fig. 5): la formation d'une bande préprophasique (BPP) et le développement d'un fuseau bipolaire acentriolaire.

	Interphase	Premitosis		Prophase	Prometaphase	Metaphase	Anaphase	Telophase/ early interphase
		Premitotic nuclear migration	PPB and phragmosome formation					
Transition points		Mitotic induction	DNA replication		*			
Chromatin								
Microtubules								
F-actin								
Cytoplasmic streaming	+STR	+STR	+STR	+STR	STR?	-STR	-STR	+STR
IF Antigens								

Figure 5 : Le cycle cytosquelettique de cellules vacuolisées des plantes supérieures. Les différents éléments impliqués dans ce cycle sont décrits au cours des phases de mitose. Le flux cytoplasmique est représenté par +STR s'il y en a, et -STR dans le cas contraire. * indique la rupture de l'enveloppe nucléaire. IF correspond à la troisième classe des éléments du cytosquelette: les filaments intermédiaires (STAIGER et LLOYD, 1991).

5.1.1 Interphase

Les cellules somatiques ont une période de réplication nucléaire de l'ADN ou phase S précédée et suivie d'une phase sans réplication (G_1 et G_2). La mitose occupe en fait peu de temps dans le cycle cellulaire. De nombreuses différences sont observées entre les cycles cellulaires animaux et végétaux (Fig. 6):

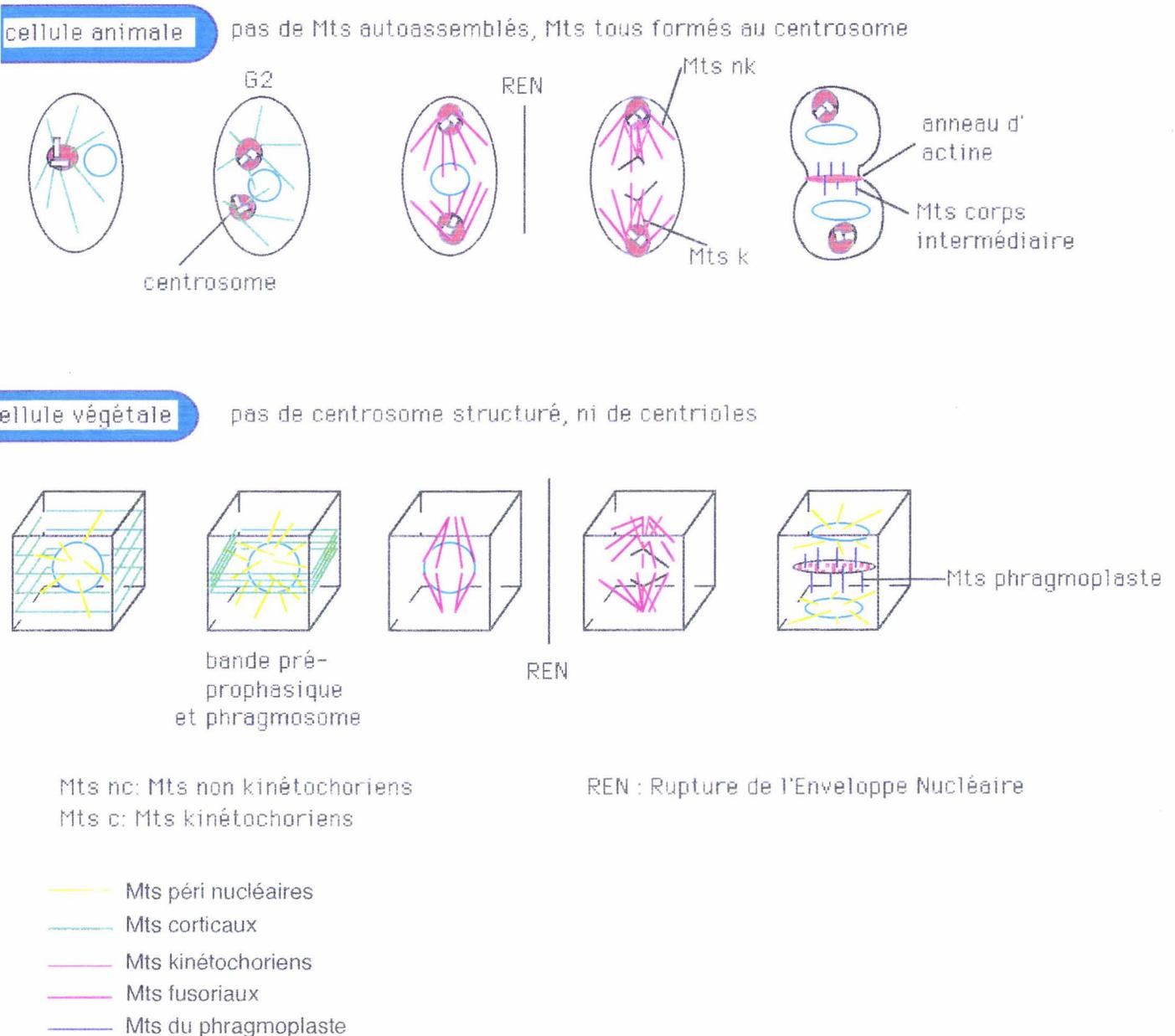


Figure 6 : Comparaison des cycles cellulaires animal et végétal. Evolution des types de microtubules au cours des phases de la mitose (d'après LAMBERT A.M., communication personnelle).

Les Mts corticaux sont longs au cours de l'interphase et s'accollent à la membrane avec laquelle ils forment des liaisons (WICK et al., 1981; LAMBERT et LLOYD, 1994). Ils ont tendance à être hélicoïdaux, avec une orientation prédominante dans le sens de l'élongation cellulaire. D'autres Mts, dits péri-nucléaires, rayonnent de la surface nucléaire vers la membrane plasmique et la paroi. Ils seront remplacés, lors de la mitose par des Mts plus courts qui formeront le fuseau (LAMBERT et al., 1991). La γ tubuline est localisée de manière ponctuelle avec les Mts corticaux (McDONALD et al., 1993), et s'accumule autour du noyau lorsque la BPP se forme (LIU et al., 1993).

Dans les cellules interphasiques, la F-actine est mise en évidence dans le cytoplasme et se place le long de l'axe des cellules. A ce moment, les Mts et les Mfs ne sont pas codistribués (LLOYD et al., 1985; ELEFTHERIOU et PALEVITZ, 1992). Parfois, la F-actine forme des trabécules radiales qui interagissent avec les Mts. La rupture du réseau de Mfs semble commencer du cytoplasme vers la zone nucléaire (SEAGULL, 1989). Récemment, CLEARY (1995) a montré que la F-actine marque le site de la future division tout au long de la mitose.

5.1.2 Migration nucléaire et formation de la bande préprophasique

5.1.2.1 Réactivation nucléaire et comportement des Mts

L'entrée en mitose se définit, morphologiquement, par une condensation des chromosomes répliqués, alors que l'enveloppe nucléaire n'est pas encore brisée. La taille du noyau, la structure de la chromatine et le type de progression dans le cycle cellulaire semblent être régulés par la nature dynamique du cytosquelette (BALUSKA et BARLOW, 1993). Un choc thermique induit des transformations rapides et réversibles de la structure de la chromatine, en association à des variations de transcription des ARNs. Ces modifications de la chromatine sont nécessaires dans la reprogrammation des activités cellulaires (CREMONINI et al., 1992).

La migration du noyau au site de la division est un prérequis pour la mitose chez les plantes. Ce mouvement prémitotique est une figure normale de division dans les cellules vacuolisées, non blessées. Ce type de migration utilise les Mts (GUNNING et HARDHAM, 1982; MEINDL, 1983). La migration nucléaire peut être la conséquence d'une blessure (par exemple, la mise en culture d'un explant). Elle est alors qualifiée de traumatotactique et implique plus particulièrement les Mfs.

L'utilisation d'un système vidéo, après caryocinèse, a permis de montrer que chaque noyau migrait de façon indépendante. Ce mouvement intervient à des degrés variables *via* des "liens" transvacuolaires (GOODBODY et LLOYD, 1990).

Les Mfs peuvent être responsables du maintien de la position du noyau (TRAAS et al., 1987; VENVERLOO et LIBBENGA, 1987).

Les Mts sont près de l'enveloppe nucléaire au moment où la chromatine se condense; ils sont particulièrement concentrés au niveau de la région de l'enveloppe, donnant naissance au fuseau. La BPP est à la fin de sa formation et va alors commencer à se désintégrer (GUNNING et WICK, 1985). A la fin de la pré-prophase, les Mts sont toujours en contact étroit avec l'enveloppe nucléaire (Mts périnucléaires, MtsPN). Ils commencent à s'organiser et à s'aligner. Leur densité au stade de la BPP diminue de façon concomitante à cette réorganisation (WICK et DUNIEC, 1984). Cette association entre le noyau et les Mts a aussi été citée par d'autres auteurs (LLOYD, 1989; LAMBERT et al., 1991; PALEVITZ, 1991; LAMBERT et LLOYD, 1994; STAIGER et LLOYD, 1991), ces MtsPN seraient, en fait, des marqueurs du stade de la phase G₂.

Chez des cellules n'ayant pas de paroi telles que celles de l'albumen d'*Haemanthus*, des MtsPN ont leur plus grande densité avant la mitose (SCHMIT et al., 1983). Ainsi, les composants des MtsPN sont capables de se réorganiser et d'être redistribués lors de la mitose, et ce, sous le contrôle des processus de régulation du cycle cellulaire (LAMBERT et LLOYD, 1994). De tels processus, mettant en jeu des cascades de phosphorylations, ont été découverts récemment chez les plantes (TRAAS et al., 1992).

Enfin, la γ tubuline s'accumule autour du noyau et forme une coiffe polaire de laquelle s'irradient les Mts du fuseau précoce (LIU et al., 1993). Elle est aussi localisée le long des Mts corticaux de la cellule végétative du pollen (PALEVITZ et al., 1994).

5.1.2.2 *Le phragmosome*

Pendant la migration du noyau, la membrane cytoplasmique forme des liens transvacuolaires, rayonnant autour du noyau. Cette architecture cytoplasmique équatoriale apparaît en fin de G₂ et s'appelle le phragmosome (FLANDERS et al.,

1990; LLOYD, 1991). Cette structure est impliquée dans la formation du plan de division (Fig. 7):

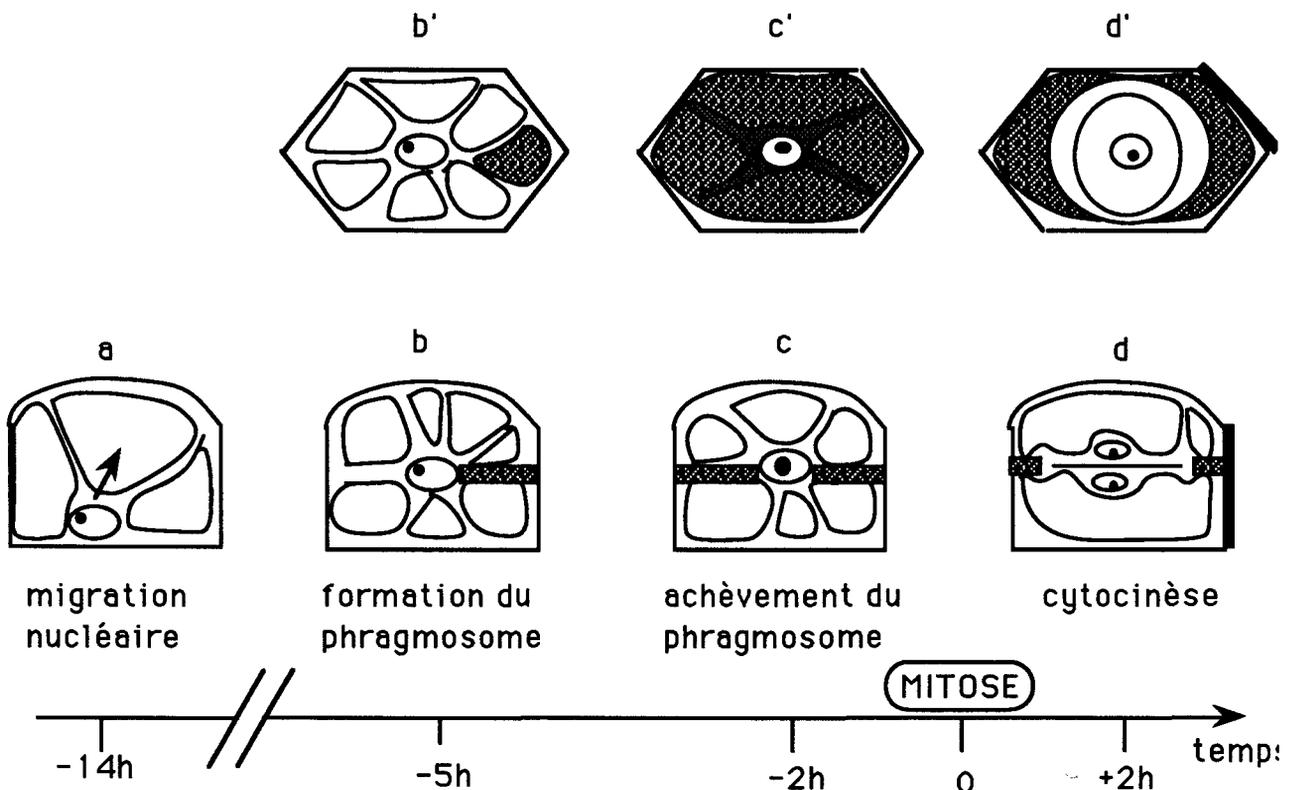


Figure 7 : Représentation schématique des stades successifs du développement normal en relation avec le temps du cycle cellulaire. (a-d) vues latérales. (b'-d') vue dans le plan de division. (a) migration du noyau. (b-b') le noyau central est suspendu par des liens cytoplasmiques transvacuolaires, formation du phragmosome (zone grisée). (c-c') le noyau pré-mitotique dans un phragmosome péricline, les parties plus denses indiquent une zone plus mince du phragmosome. (d-d') cytokinèse péricline, formation du phragmoplaste et de la plaque cellulaire (d'après VEVERLOO et LIBBENGA, 1987).

Sa formation est presque simultanée avec celle d'une bande de Mts, et ce, avant la mitose. Son importance a été étudiée par VEVERLOO et LIBBENGA (1987) sur des cellules vacuolisées de *Nautilocalyx*. Les liens cytoplasmiques, transvacuolaires, semblent être importants dans le maintien de la position nucléaire centrale du noyau et la localisation de la future paroi.

5.1.2.3 La bande pré-prophasique

L'évènement majeur reste la formation d'une BPP, spécifique aux plantes. La BPP est un ensemble de Mts corticaux et de Mfs qui forment un anneau situé,

dans la majorité des cas, au centre de la cellule autour du noyau lors de la formation du phragmosome (Fig. 8). Elle est présente brièvement dans les cellules en division, notamment celles constituant un tissu organisé plutôt qu'une structure désordonnée (FOSKET et MOREJOHN, 1992). Cette BPP préfigure le futur site de division; elle apparaît en phase G₂ et marque la fin de l'interphase (MINEYUKI et GUNNING, 1990). La durée de la phase G₂ peut atteindre 2 heures (MINEYUKI et GUNNING, 1988; GUNNING et SAMMUT, 1990). La BPP ne régule pas la migration prémitotique du noyau chez les cellules de tabac BY-2. En effet, l'application d'aphicodiline, un inhibiteur de l'ADN polymérase α , supprime la BPP, sans modifier la migration du noyau (KATSUTA et al., 1990). Cette BPP ne se développera que si la totalité de l'ADN est déjà répliquée (MIZUTANI et al., 1993).

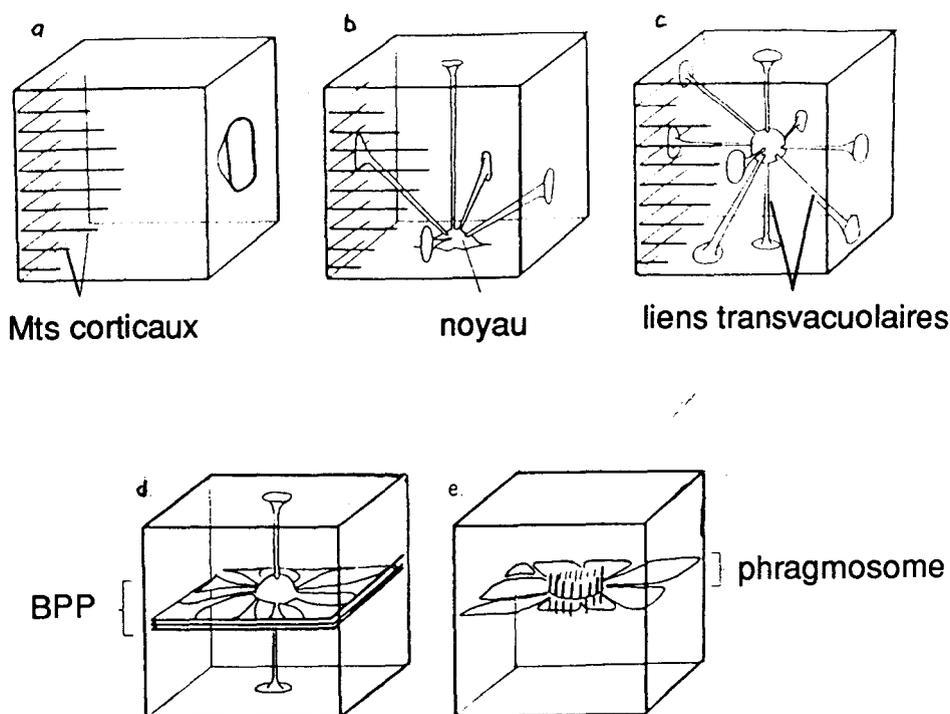


Figure 8 : Modèle de l'implication du cytosquelette dans la formation du plan de division. **a.** Dans les cellules vacuolisées quiescentes, le noyau est maintenu dans le cytoplasme cortical. Le cytosquelette interphasique cortical (partiellement représenté) contient des Mts et de l'actine, avec des liens d'actine très fins (non montrés) dans le sub-cortex. **b.** En réponse à une blessure, le noyau migre vers le centre. Le noyau est intimement associé avec des Mts qui apparaissent essentiels pour cette migration traumatotactique (phase I). **c.** En préparation de la mitose, le noyau peut aussi migrer vers le centre de la cellule et est suspendu par des trabécules cytoplasmiques contenant des Mts. **d.** Le cytosquelette cortical se réorganise et forme une bande pré-prophasique. Les trabécules qui rayonnaient autour du noyau s'alignent sur un plan. Elles fusionnent et forment alors le phragmosome. **e.** En métaphase, les Mts cytoplasmiques se sont dépolymérisés, laissant un anneau d'actine marquer le plan de division. Ces filaments s'insinuent dans le cortex. Plus tard, le phragmoplaste s'étend alors que les vésicules de la plaque cellulaire fusionnent jusqu'aux parois (FLANDERS et al., 1990; LLOYD, 1991).

Dans les cellules vacuolisées, la F-actine forme des liens radiaux et aurait un rôle stratégique dans l'organisation de la BPP (LLOYD et TRAAS, 1988; FLANDERS et al., 1990; LLOYD, 1991; ELEFTHERIOU et PALEVITZ, 1992). Une réorganisation de ce réseau commence et les Mfs s'orientent parallèlement à la BPP (ELEFTHERIOU et PALEVITZ, 1992).

HUSH et al. (1990) ont étudié le réseau microtubulaire induit par des blessures sur des racines de pois. En interphase, le réseau de Mts entreprend une réorientation et passe de la forme transverse à un plan parallèle, à la surface de la blessure (2 à 5 heures après le choc). Une telle réorientation affecte aussi les Mfs dont le rôle est plus controversé (HUSH et OVERALL, 1992). GORST et al. (1986) utilisent l'index BPP comme marqueur du potentiel d'une suspension cellulaire de carotte à former des embryons somatiques. Toutefois, RÖS et al. (1991) estiment que la présence d'une BPP est le reflet d'une orientation de la croissance d'une cellule sans que son appartenance à un tissu n'interfère. En effet, des BPPs diffuses peuvent se former même dans les cellules isolées. Par contre, l'orientation de cette BPP serait directement ou indirectement contrôlée par l'environnement, par exemple par les cellules voisines, ce qui organiserait, par la suite, une croissance coordonnée comme dans un tissu.

5.1.3 Prophase

Les chromosomes se condensent et s'individualisent. L'incorporation de tubuline exogène pendant la prophase a montré une augmentation de la capacité de nucléation des Mts (VANTARD et al., 1990). L'assemblage du fuseau bipolaire acentriolaire autour du noyau est achevé, formant ainsi des centres pseudo-astériens qui conduiront progressivement à la formation des pôles fusoriaux (SCHMIT et al., 1983). Ces différents phénomènes impliquent des interactions régulées par des protéines associées aux Mts. La rupture soudaine de l'enveloppe nucléaire permet la capture des Mts fusoriaux par les kinétochores. Toutefois, des analyses en microscopie confocale ont permis de détecter de très fins Mts, pénétrant très tôt dans le noyau prophasique. Ceci suggère que la dégradation de l'enveloppe nucléaire est graduelle. Les composants des kinétochores végétaux auraient, par ailleurs, des épitopes communs avec ceux des animaux (MOLE-BAJER et al., 1990).

5.1.4 Métaphase

La séparation des chromosomes qui s'opère implique d'abord l'orientation bipolaire des kinétochores fils et par la suite le désassemblage des fibres kinétochoriennes. La γ tubuline est localisée préférentiellement au niveau des fibres du kinétochore, et éventuellement aux pôles en métaphase et en anaphase. Elle semble être exclue des extrémités "+" des Mts de la plaque métaphasique et de la plaque cellulaire (LIU et al., 1993; PALEVITZ et al., 1994). Les Mfs sont présents entre le plan équatorial du fuseau mitotique et le cortex cellulaire (LLOYD et TRAAS, 1988).

5.1.5 Anaphase

A cette étape, une régulation de l'élongation des Mts permet la migration des chromosomes de l'équateur aux pôles. Les Mts polaires, en dépit de leur régulation en longueur, induisent la création de forces antagonistes qui stabilisent ces pôles. Les Mfs sont alors sous forme de faisceau linéaire parallèle à l'axe du fuseau (SCHMIT et LAMBERT, 1990).

5.1.6 Télophase et début d'interphase

La γ tubuline est mise en évidence au niveau du phragmoplaste (LIU et al., 1993). Au moment où le phragmoplaste aide au dépôt de la nouvelle paroi, la F-actine est alors codistribuée avec les Mts tout au long des phases amenant à la cytokinèse (LLOYD et al., 1985). Après la cytokinèse, le réseau de Mfs se reforme de la zone nucléaire vers le cytoplasme cortical (SEAGULL, 1989). Cette zone nucléaire est aussi enrichie en MtsPN (LAMBERT et LLOYD, 1994).

5.1.7 Le phragmoplaste

Le phragmoplaste est généralement observé au niveau où se situait la BPP en préprophase. Il est constitué de plusieurs éléments: de filaments intermédiaires (AMOS et AMOS, 1991), et de Mts courts et dirigés de manière opposée qui forment une sorte de palissade (LLOYD et al., 1985 ; BROWN et LEMMON, 1991 a, b). Les Mts sont nucléés aux pôles fusoriaux à partir du stock de tubuline soluble (VANTARD et al., 1990; ZHANG et al., 1990). De nouveaux sites d'assemblage se

trouvent sur cette plaque équatoriale et se greffent sur des fragments de Mts pré-existants (LAMBERT et LLOYD, 1994). Des éléments membranaires (issus du réticulum endoplasmique et de vésicules), et la plaque cellulaire en cours d'expansion, peuvent aussi faire partie du phragmoplaste (SEAGULL, 1989).

Pendant la formation du phragmoplaste, l'actine s'accumule le long d'un anneau où s'opère un assemblage actif de nouveaux petits filaments (PALEVITZ, 1987; SCHMIT et LAMBERT, 1990). La direction de l'expansion du phragmoplaste serait contrôlée par des Mfs. Ils pourraient aider le mouvement des vésicules contenant les matériaux nécessaires à la formation de la nouvelle paroi (LLOYD et al., 1985), ce qui peut suggérer la présence de protéines de type dynamine (ASADA et al., 1991). De plus, ces Mfs connectent la périphérie du phragmoplaste à l'enveloppe cellulaire (KAKIMOTO et SHIBAOKA, 1987). Tout ceci suggère donc une corégulation entre la polymérisation de la F-actine et de la tubuline au cours des phases du cycle cellulaire précédant la cytokinèse (LLOYD et TRAAS, 1988).

5.2 Inhibition des microtubules

Les principaux inhibiteurs de l'interaction nucléotide-tubuline sont repris dans le Tableau 2 ; d'autres agents chimiques et régulateurs de croissance sont cités dans le Tableau 3. Les facteurs physiques sont, eux, décrits dans le Tableau 4.

Types chimiques	Sources	Effets sur les Mts	Références
<p><u>Maytansinoïdes</u></p> <p>- maytansine</p> <p>- trewiasine</p>	<p><i>Maytenus</i> <i>Puterlikia</i> <i>Trewia nudiflora</i></p>	<p>analogues à la colchicine</p>	<p>VAUGHAN et VAUGHN, 1988</p>
<p><u>Podophyllo-toxine</u></p>	<p><i>Podophyllum peltatum</i></p>	<p>inhibiteur compétitif colchicine</p>	<p>CORREIA, 1991 VAUGHN et al., 1987</p>
<p><u>Alcaloïdes</u></p> <p>- vinblastine</p> <p>- vincristine</p> <p>- colchicine</p> <p>- colcémide</p>	<p><i>Catharanthus rosea</i> <i>Colchicum autumnale</i></p>	<p>- orientation multidirectionnelle des chromatides</p> <p>- blocage des sites de nucléation</p> <p>- seuils de sensibilité différents</p> <p>- diminution de la synthèse de tubuline</p>	<p>SAFA et al., 1987</p> <p>MOREJOHN et al., 1987,</p> <p>UTRILLA et al., 1989</p> <p>CLEVELAND et al., 1981</p>
<p><u>Diterpène</u></p> <p>- taxol</p>	<p><i>Taxus brevifolia</i></p>	<p>stabilise les Mts, action réversible</p>	<p>MOREJOHN et FOSKET, 1984</p> <p>COLLINS et VALLEE, 1987</p> <p>MOREJOHN, 1991</p> <p>BOKROS et al., 1993</p>
<p><u>Méthylxanthine</u></p> <p>caféine</p>	<p><i>Coffea</i> <i>Theobroma</i> <i>Camellia</i></p>	<p>- inhibe la maturation de la plaque cellulaire</p> <p>- production de stomates aberrants multinucléés</p>	<p>HEPLER et BONSIGNORE (1990)</p> <p>GALATIS et APOSTOLAKOS (1991)</p>

Tableau 2 : Principaux inhibiteurs des microtubules (Mts) agissant sur l'interaction tubuline / nucléotide.

Agents et régulateurs de croissance	Effets sur les microtubules corticaux	Références
Glycérol	- accrochage tubuline-glycérol réversible - stabilise les Mts	ZABRECKY et COLE, 1979 CAPLOW et SHANKS, 1987
Calcium	dépolymérisation	SCHLIWA et al., 1981 PANTALONI, 1989 CYR, 1991
Auxine	réorientation transversale	ZANDOMENI et SCHOPFER, 1993
Cytokinine	réorientation longitudinale	SAUNDERS, 1986
Acide gibbérélique	réorientation transversale	MITA et KATSUMI, 1986 ISHIDA et KATSUMI, 1992
Ethylène	réorientation longitudinale	STEEN et CHADWICK, 1981 LANG et al., 1982 ROBERTS et al., 1985
Acide abscissique	réorientation longitudinale	ISHIDA et KATSUMI, 1992 SAKIYAMA et SHIBAOKA, 1990

Tableau 3 : Effets d'agents chimiques et de régulateurs de croissance sur la disposition des microtubules (Mts).

Agents	Effets sur les microtubules	Références
<u>Température :</u> - 0 °C, froid - température ambiante	- dépolymérisation - restauration des Mts	INOUE, 1981 CARTER et WICK, 1984 OKAMURA et al., 1993 ZHANG et al., 1990 MURATA et WADA, 1991
<u>Gravité :</u> - mise à l'horizontale - centrifugation	- Mts // vecteur de tropisme - la BPP est séparée du noyau	BLANCAFLOR et HASENSTEIN, 1993 MURATA et WADA, 1989
<u>Lumière :</u> - UV (280 nm) - rouge	- fragmentation - disposition aléatoire	STAXEN et al., 1993 ZANDOMENI et SCHOPFER, 1993
<u>Pression osmotique :</u>	- rupture des ponts avec la membrane	WILLIAMSON, 1991

Tableau 4 : Effets de certains facteurs physiques sur les microtubules (Mts).

6. CONTEXTE DE L'ETUDE

Les différents travaux effectués au laboratoire concernent la physiologie de la différenciation des cellules lors du phénomène d'ES. La plupart des expériences ont été menées chez le *Cichorium* hybride '474'. Il ne s'agit pas d'une plante d'un intérêt agronomique important, mais elle nous offre la possibilité d'établir un système d'étude de l'ES où les eS se développent directement sans l'intervention d'un cal. Nos objectifs sont de déterminer la nature et la régulation des événements précoces de l'ES d'un point de vue cytochimique et moléculaire. Cette approche est liée au concept que la morphogenèse chez les plantes découle de la régulation spatio-temporelle de gènes (RACUSEN et SCHIAVONE, 1990), et à notre

hypothèse de travail: la formation d'eS *in vitro* pourrait être une réponse à des stress (blessure, concentrations hormonales, conditions de culture...) qui activeraient le programme embryogène (VASSEUR et al., 1995).

Ainsi, le travail qui m'a été confié concerne l'étude des premières divisions embryogènes. L'établissement d'un système d'ES particulier a donc été nécessaire afin de pouvoir séparer la phase d'induction embryogène (dédifférenciation) de la phase d'expression (mitoses). La mise en place d'une telle technique de culture *in viro* constitue **la première partie des résultats**.

La plupart des auteurs étudient ces divisions embryogènes dans des systèmes cellulaires de type suspensions cellulaires, protoplastes ou microspores. L'originalité de ce travail réside dans la caractérisation de la première division embryogène et sa mise en place dans les tissus foliaires. **La deuxième partie des résultats** portera donc sur ces aspects; ils seront traités autant d'un point de vue cytologique que biochimique.

L'interdépendance fonctionnelle des diverses configurations cytosquelettiques observées lors de la mitose reflète un enchaînement précis à respecter. Un dysfonctionnement de l'une de ces étapes altère l'ensemble du processus morphogénétique. Ceci nous a conduit à utiliser un inhibiteur spécifique de la cytokinèse, la caféine, pour étudier les modifications qu'il provoque sur les séquences mitotiques embryonnaires. Ces effets seront décrits **au cours d'une troisième partie**.

La morphologie et le mode de croissance peuvent être régulés par la présence de glycoprotéines impliquées dans l'interaction paroi squelettique-membrane (et éventuellement avec la MEC végétale). Par conséquent, nous avons étudié les glycoprotéines intratissulaires qui sont exprimées au cours du processus embryogène, ainsi que leurs variations en présence d'inhibiteurs. Celles-ci feront l'objet d'**une quatrième partie**.

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL VEGETAL

1.1 *Cichorium* hybride '474'

Les vitroplants sont obtenus à partir d'une embryogenèse somatique induite sur des racines de vitroplants de l'hybride '474' : *Cichorium intybus* L. var. *sativum* x *Cichorium endivia* L. var. *latifolia*. Les racines sont mises en culture dans un flacon contenant 20 ml d'un milieu d'induction défini dans l'annexe 1. La culture est conduite selon les conditions suivantes : 35°C, agitation orbitale 70 rpm, à l'obscurité.

Au bout de 10 jours de culture des racines dans du milieu liquide, sous agitation, à la lumière (12h / jour) et à la température de 24 °C / 12 h (20 °C / 12 h), les premiers eS se détachent spontanément et sont prélevés au fond du flacon. Ils sont ensuite transférés dans un milieu de Heller modifié (Annexe 2) liquide pendant 3-4 jours pour favoriser le développement de la racine puis sur ce même milieu solide.

Après sélection sur leur capacité germinative, les embryons somatiques au stade cotylédonnaire sont repiqués individuellement en tubes (160x22mm) contenant du milieu de Heller modifié gélosé et cultivés en salle de culture.

Les vitroplants de l'hybride '474' tétraploïde sont issus d'une fusion de protoplastes mésophylliens par le polyéthylèneglycol (RAMBAUD et al., 1992). Après division sur un milieu liquide élaboré par RAMBAUD et al. (1990), les microcals régénèrent des bourgeons. Les plantules sont maintenues sur un milieu de développement gélosé (Annexe 2).

1.2 *Cichorium* cv.'206' et cv. 'Flash'

Des akènes issus de plantes non embryogènes (*C. intybus* L. var. *foliosum*, encore appelées chicorées Witloof) désignées sous les appellations cv. '206' et cv. 'Flash' sont sélectionnés, puis aseptisés selon le protocole suivant :

- 20 min de trempage dans du chlorure mercurique à 0,1%
- 3 rinçages à l'eau distillée stérile : 5-10-15 min
- séchage sur du papier filtre stérile

Les akènes sont alors mis à germer sur du milieu de développement gélosé, en tube (Annexe 2).

2. METHODES DE CULTURE *IN VITRO*

2.1 Obtention des embryons somatiques à partir de feuilles

Les travaux de GUEDIRA et al. (1990) nous ont permis de comprendre l'importance de la source carbonée (le saccharose) lors du processus embryogène dans les racines de l'hybride '474'. Un nombre élevé d'embryons somatiques de même taille a été obtenu en augmentant la concentration en saccharose du milieu de culture. Nos expérimentations se sont alors appuyées sur ces données et nous avons appliqué une méthode semblable aux feuilles en considérant à la fois la concentration en saccharose du milieu inducteur et le potentiel osmotique ainsi engendré.

- **exp 1** : sur la concentration de saccharose : 30, 120 ou 360 mM pendant 7 jours de culture dans le milieu d'induction (défini dans l'Annexe 1).

- **exp 2** : sur l'association glycérol (330 mM) + saccharose (30 mM). En effet, l'ensemble de ces sources correspond à un potentiel osmotique comparable à celui engendré par une concentration de 360 mM de saccharose (Annexe 3). Après 5 jours de culture, un transfert des explants s'effectue sur le même milieu dépourvu de glycérol.

Ainsi, au cours des expériences suivantes, les feuilles de vitropolants âgés de 6 semaines sont prélevées puis découpées en 3 fragments (basal, médian, distal). Les explants sont déposés dans un flacon contenant 20 ml du milieu d'induction (Annexe 3), pendant 5 jours. Après un rapide séchage sur du papier filtre, les explants sont déposés dans un flacon contenant 20 ml du même milieu dépourvu de glycérol. Les conditions de culture sont les mêmes que celles décrites précédemment, c'est-à-dire : 35 °C, agitation orbitale et obscurité.

Dans le cadre d'une analyse des protéines, neuf fragments foliaires sont induits. Le contenu de deux flacons est prélevé quotidiennement (du 1^{er} au 8^{ème} jour puis au 12^{ème} jour de culture). Les explants foliaires de chaque flacon sont ensuite congelés indépendamment et immédiatement sous azote liquide et stockés à -80°C.

2.2 Culture de feuilles en présence d'inhibiteurs

Au cours de la culture des feuilles de l'hybride '474' diploïde, des inhibiteurs sont ajoutés au milieu de culture. La caféine (Sigma) est un inhibiteur de la maturation de la plaque cellulaire (cytocinèse). Sa présence séquentielle dans le milieu de culture permet de caractériser ses effets au cours de la mise en place des mitoses des CE (et, par conséquent, de la réorganisation du cytosquelette), et sur la capacité embryogène. Trois types d'expérimentations sont réalisées (Fig. 9) :

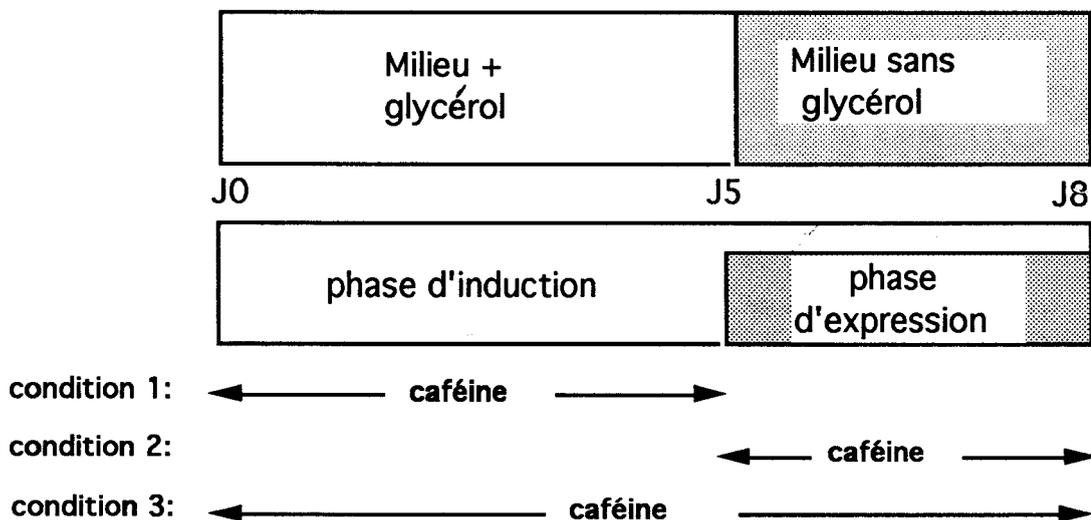


Figure 9 : Représentation schématique du protocole utilisé pour l'étude des effets de la caféine sur l'induction et l'expression de l'ES. La caféine (5 mM) est ajoutée de façon séquentielle aux différents milieux de culture décrits dans l'Annexe 3.

Le vérapamil (Sigma) est un inhibiteur des canaux calciques. Des travaux précédents avaient montré son action inhibitrice sur la potentialité embryogène chez *Cichorium* (DUMINY, 1993). Il est ajouté pendant les deux phases de culture (soit 8 jours) à 100 µM.

La tunicamycine (Sigma) ou la déoxinojirimycine (Sigma) sont des inhibiteurs de la glycosylation en N- ou O- des protéines pariétales. Ils sont

employés à différentes concentrations dans le cadre d'une étude des glycoprotéines intratissulaires. Ils sont ajoutés pendant 12 jours de culture dans le milieu dépourvu de glycérol.

3. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

Dans le cadre d'une analyse des structures induites lors de l'ES, nous avons effectué des coupes de tissus foliaires inclus en paraffine ou en résine de méthacrylate. Nous avons aussi étudié la réorganisation du cytosquelette en immunocytologie. De ce fait, nous avons testé différents protocoles d'inclusion et/ou de résine afin de déterminer les conditions optimales pour réaliser cet immunomarquage.

3.1 Coloration des noyaux par des fluorochromes

Les fragments foliaires sont prélevés après 5+2 jours de culture (J5+2), découpés en pièces de 3 x 1 mm, puis fixés dans du tampon phosphate (PBS: Na₂HPO₄ 16 mM, NaH₂PO₄ 4 mM, NaCl 150 mM; pH 7,2 ou 5,5 pour les enzymes) additionné de 3,7% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 1 heure en chambre humide. Après trois rinçages de 10 minutes dans du PBS, les fragments subissent deux digestions ménagées successives :

- 0,15% pectinase (®Caylase 345, Cayla, Toulouse), pendant 30 minutes à 30°C
- 0,8% cellulase (®Caylase M2, Cayla, Toulouse), pendant 30 minutes à 30°C.

Les enzymes sont dilués dans du PBS pH 5,5.

Après ces digestions, la fluorescence de la chlorophylle est réduite par l'action de 0,1% NaHB₄ dans PBS, 3 fois 10 minutes.

La chromatine des noyaux est alors mise en évidence par une solution au 1/10000 ème de Hoechst 33258 (Sigma) ou de 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma) dans PBS pendant 10-15 minutes. Les échantillons sont alors disposés sur lames poly-lysiniées, puis montés dans du Citifluor (type AF2 dans du glycérol) ou dans un mélange PBS/ Glycérol (1/1, v/v). L'observation se fait avec un

microscope Olympus BH-12 muni des filtres UV ($\lambda = 334\text{nm}$). Les préparations sont conservées à 4 °C à l'obscurité.

3.2 Coupes en paraffine

Un fragment foliaire de chaque lot prélevé quotidiennement est fixé dans du FAA (formol 6,5%; acide acétique 3,5%, éthanol 50% qsp 500 ml H₂O). Après redécoupage, le fragment subit une déshydratation dans une série d'éthanol de force croissante. La phase dans l'éthanol absolu se fait en ajoutant des billes absorbant les traces d'eau (Molecular sieves, Sigma).

Les fragments sont déposés au fond d'un moule rempli de paraffine de point de fusion 53-55°C (Merck). Les blocs ainsi obtenus sont débités en coupes sériées de 8 μm puis les coupes sont collées par une solution de gélatine (0,1 %) sur des lames. Après séchage, les coupes déparaffinées (xylène, 40 min minimum) sont colorées par :

- la safranine à 0,1% dans une solution éthanol/ eau (1/1, v/v), pendant 1 nuit
- le fast green à 0,5% dans l'éthanol absolu pendant 1 seconde.

Les coupes sont montées dans du baume du canada.

3.3 Coupes semi-fines en résine de méthacrylate

3.3.1 Résine hydrophile

Un très petit fragment de chaque lot (3 x 6 mm) est utilisé. Après fixation dans le FAA, le fragment foliaire est déshydraté, puis mis en contact avec la résine JB4 (Polyscience, Allemagne) pour infiltration pendant 1 nuit. Le fragment est alors déposé verticalement dans une gélule. Après addition du durcisseur, la résine se polymérise en anaérobiose. La gélatine des gélules est retirée avec des pinces après une heure de polymérisation. Les blocs sont gardés à l'abri de la poussière. Ils sont débités en coupes de 2-3 μm sur un ultratome (Porterblum MT1). Chaque coupe est déposée sur une goutte d'eau additionnée d'ammoniaque pour faciliter son déplissage, puis les lames sont séchées dans une étuve à 54 °C. Certaines coupes sont colorées directement avec une solution aqueuse de bleu de toluidine (0,5%) puis montées dans de l'Entellan (Merck). D'autres sont observées en contraste interférentiel dit de Nomarski.

3.3.2 Résine hydrophobe

Le protocole employé est celui de GUBLER (1989) modifié par BASKIN et *al.* (1992) et A.-C. SCHMIT (IBMP - Strasbourg, communication personnelle). Les échantillons sont fixés dans un tampon piperazine-N,N'-bis [2-ethenesulfonic acid] (PIPES) (50 mM) contenant de la PFA 3,7% pendant 2 h. Après 3 lavages de 10 minutes dans du tampon PIPES (100 mM) + dithiothreitol (DTT) 1mM, le matériel est déshydraté dans une série d'éthanol de force croissante, dans de la glace et sous hotte. Chaque bain d'éthanol contient 1 mM de DTT. Le dernier bain d'éthanol absolu contient 10 mM de DTT et des billes déshydratantes (Molecular sieves, Sigma). L'infiltration du mélange de résine se fait progressivement, en éliminant l'éthanol absolu jusqu'à arriver à une infiltration de mélange pur. Le mélange est le suivant :

Butylméthacrylate (Merck)	8V
Méthylméthacrylate	2V
Initiateur C (benzoïne éthyl éther, Aldrich)	0,5%
DTT	10 mM.

Les échantillons sont alors transférés dans des gélules placées à 4°C. La polymérisation se déroule pendant au moins 6 heures sous UV à 4°C. La résine est éliminée par le dépôt d'une goutte d'acétone.

3.4 Coupes en congélation

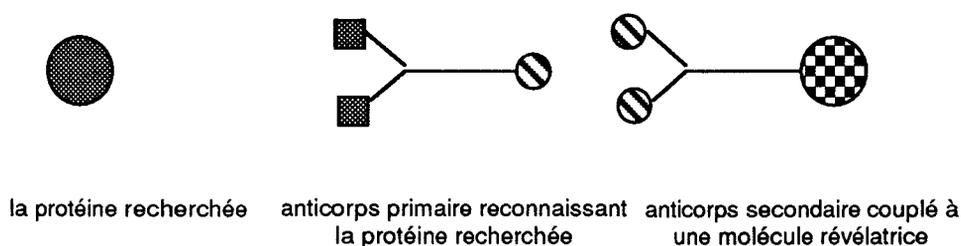
De telles coupes ont été réalisées lors d'un immunomarquage de glycoprotéines intratissulaires probablement liées à la MEC. Des fragments sont fixés ou non selon le type de marquage ultérieur. Certains sont préalablement plongés dans de l'azote liquide avant l'inclusion. Les fragments sont déposés au fond d'un moule tapissé de Tissue Tek (Scientific, Naperville, USA) puis en sont recouverts entièrement. Le moule est plongé dans de l'azote liquide. Après la prise en masse, le moule est gardé à -20°C. Les coupes se font sur un cryostat Frigocut de Reichert-Jung à -23°C. Elles sont collectées sur des lames préalablement traitées selon la méthode décrite par PAPPAS (1971). Les lames sont stockées à -20°C.

3.5 Immunomarquages

3.5.1 Sur des coupes

Le principe de l'immunomarquage est basé sur une technique indirecte illustrée dans la Fig. 10. Pour chaque type d'expérience, une série de témoins est réalisée de façon à révéler une éventuelle réaction aspécifique de l'anticorps primaire ou secondaire. Les témoins consistent à substituer l'anticorps primaire par du sérum normal de l'hôte (le plus souvent du sérum de souris pour des anticorps monoclonaux, et du sérum de lapin pour le polyclonaux), ou à l'omettre .

Eléments permettant la mise en évidence de protéines par la méthode d'immuno-localisation indirecte



Principe de détection de la protéine recherchée

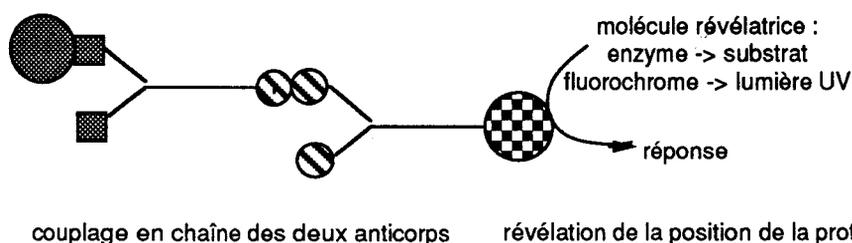


Figure 10: Schéma représentant le principe de la technique indirecte d'immunomarquage.

L'immunomarquage de coupe en paraffine et semi-fine s'est déroulé selon le protocole décrit par BASKIN et al. (1992). Après l'élimination de la paraffine ou de la résine, les coupes sont réhydratées dans du PBS puis les sites sont saturés. Après chaque incubation avec les anticorps, les coupes sont rincées pendant 30 min (CLEARY et HARDHAM, 1989).

L'observation se fait avec un microscope Olympus BH-12 muni des filtres d'excitation suivants : $\lambda = 334$ nm pour le Hoechst, $\lambda = 405$ nm pour le couplage de l'anticorps secondaire avec la fluoresceine isothiocyanate (FITC) et $\lambda = 546$ nm pour le couplage avec la tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) ou la rhodamine.

3.5.3 Dans les protoplastes mésophylliens

L'immunomarquage du réseau microtubulaire s'est déroulé selon les protocoles décrits par KENGEN et De GRAAF (1991) et WANG et al. (1991).

3.5.3 Dans les feuilles

Pour ces expériences, des feuilles de l'hybride '474' tétraploïde sont employées. Après fixation des explants dans du tampon de type microtubule stabilizing buffer (MSB) (Annexe 4), l'immunomarquage s'est effectué selon le protocole de HUANG et SHERIDAN (1994), et les modifications apportées sont décrites dans l'Annexe 5.

4. TECHNIQUES D'ANALYSES BIOCHIMIQUES

4.1 Electrophorèse mono-dimensionnelle en condition dénaturante

4.1.1 Préparation des extraits protéiques

Les échantillons sont d'abord finement broyés dans de l'azote liquide, puis la poudre est reprise dans 2 ml de tampon de précipitation des protéines (trichloroacetic acid (TCA) 10 g + β mercaptoéthanol 0,07 % + acétone qsp 100 ml, 4°C). L'ensemble est alors laissé à -20°C pendant au moins 45 min. Après une centrifugation (30000 g / 4°C / 20 min), le culot est repris dans 2 ml de tampon de précipitation sans TCA. L'ensemble est mélangé puis est laissé une nuit au congélateur.

Après une seconde centrifugation (30000 g / 4°C / 20 min), le culot est séché sous hotte pendant au moins deux heures. La poudre est ensuite reprise dans du tampon de lyse (ZIVY, 1986) (Annexe 6) à raison de 60 μ l ou 30 μ l de tampon par mg de matière sèche. Le tout est laissé 2 h à température ambiante. Après avoir mélangé, le surnageant est récupéré après une centrifugation (30000 g / 20°C / 20 min). L'extrait est aliquoté et conservé à -80°C. Le dosage des protéines s'est fait de plusieurs manières. Deux méthodes ont été employées pour chaque extrait protéique. Celles-ci sont basées sur une révélation colorimétrique des protéines. Pour cela deux kits (Biorad) ont été utilisés, l'un est de type BRADFORD (1976)

(lecture à $\lambda = 595$ nm), l'autre permet de doser les protéines en limitant les interactions avec les tampons (lecture à $\lambda = 750$ nm).

4.1.2 Migration des protéines

L'électrophorèse monodimensionnelle dénaturante (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ou SDS-PAGE) sépare les protéines selon leur poids moléculaire (PM). Les protéines sont dissociées en leurs sous-unités, sous l'action dénaturante du β mercaptoéthanol et du SDS, détergent anionique. Les molécules de SDS masquent les charges propres des protéines et leur confèrent une même charge négative. Sous l'influence d'un champ électrique, les polypeptides migrent uniquement en fonction de leur masse moléculaire relative, dans le gel de polyacrylamide qui sert de tamis moléculaire.

Le matériel utilisé comporte des mini-cuves (Biorad) reliées à un générateur. Après avoir monté les plaques de verre (10 x 9 cm, épaisseur du gel 1 mm), un gel de séparation à 10 ou 13% d'acrylamide selon les expériences (Annexe 7) est coulé puis un film d'eau distillée est déposé à la surface du gel. Après polymérisation, un gel de concentration de 2,5 ou 4% d'acrylamide est coulé au niveau d'un peigne. Une fois polymérisé, le peigne est enlevé et les puits ainsi obtenus sont remplis de tampon de migration de HOCHSTRASSER et al. (1988) (Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane ou Tris 50 mM, Glycine 384 mM, SDS 0,1 %).

Pendant ce temps, les échantillons décongelés, sont préparés à l'électrophorèse en microtube Eppendorf de 1,5 ml. Pour un volume d'extrait, 3 volumes de tampon de LAEMMLI (1970) (Annexe 8) sont ajoutés. L'ensemble est laissé au repos quelques minutes avant d'être déposé dans les puits du gel de concentration.

Des marqueurs de masse connue sont ajoutés de façon à déterminer les masses moléculaires des protéines recherchées. La distance de migration est alors mesurée pour chacun des marqueurs et une courbe est tracée (courbe de régression logarithmique grâce au logiciel Cricket Graph sur matériel Apple, ou utilisation de papier semi-logarithmique).

La migration des protéines dans le gel de séparation se déroule dans les conditions suivantes : 200 V, 300 mA, 30-45 minutes. Le tampon utilisé est

composé de Tris (50 mM), de Glycine (384 mM) et de SDS (0,1 %). Après la séparation, le gel est démoulé puis préparé :

- soit pour un marquage immunologique (immuno-empreinte électrophorétique), auquel cas il est déposé dans du tampon d'électrotransfert de TOWBIN et al. (1979) (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, méthanol 20 %, à 4 °C).
- soit pour une coloration argentique, auquel cas il est déposé dans le mélange suivant : éthanol 50 % / acide acétique 12 % / formaldéhyde 0,05 %.

4.1.3 Electrotransfert sur membrane

Afin de tester la qualité du transfert et d'optimiser l'analyse des membranes, deux types de support ont été utilisés.

4.1.3.1 Sur membrane de nitrocellulose

Le matériel employé consiste en une mini-cuve placée à 4°C et possédant des modules spéciaux. Les éléments du module sont alors disposés en fonction du sens de l'électrophorèse. Celle-ci vise à transférer les protéines du gel (pôle cathodique) sur la membrane (pôle anodique) par des liaisons non covalentes.

Le transfert se fait à 100 V / 1h en chambre froide dans du tampon d'électrotransfert selon TOWBIN et al. (1979) (cf § 4.1.2) . En effet, ce transfert dégage de la chaleur par effet Joules, d'où une augmentation de la température du tampon. Or, il est nécessaire de ne pas dépasser 20-22 °C afin d'optimiser le passage des protéines sur la membrane de nitrocellulose de 0,45 µm. Après le transfert, les membranes sont mises dans du tampon Tris Buffer saline ou TBS (Tris 50 mM + NaCl 0,9 %, pH 7,4) + polyvinyl pyrrolidone (PVP) soluble 2 %, pendant une nuit, sous agitation, afin de saturer les sites non occupés par des protéines.

Ce protocole subit des modifications si le nombre de protéines est élevé (comme en gel 2D) ou si une bonne résolution de l'immuno-empreinte est nécessaire (révélation d'isotypes). Pour cela, deux types de modifications ont été envisagées. La première découle d'une communication personnelle du Pr P. J. SHAW (John Innes Inst., Norwich, UK). L'électrotransfert se déroule à un voltage réduit de 60-80 V pendant 5 h. La deuxième découle de celle de FUKUDA et

IWATA (1986). Les protéines sont transférées pendant 14 heures à 30-40 V / 150-200 mA.

4.1.3.2 Sur membrane de polyvinylidène difluoride

Après électrophorèse monodimensionnelle, les gels sont rincés :

- 3 x 20 min dans H₂O distillée
- 30 min dans une solution 50 mM acide borique + 1% SDS

La membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) est préparée par une étape d'équilibration dans du méthanol (5 min) puis de l'eau distillée (5 min). Le transfert se fait selon les conditions suivantes : 60V / 260 mA / 4°C pendant 3 heures. La membrane est ensuite préparée pour l'immuno-empreinte.

4.1.4 Immuno-empreinte électrophorétique

Les différentes étapes sont reprises dans l'Annexe 9. L(es)' anticorps primaire(s) choisi(s) sont dilué(s) au 1/2000ème. L'anticorps secondaire (anticorps - couplé à une phosphatase alcaline) est mis dans les mêmes conditions que le(s) premier(s).

Les témoins suivants sont faits :

- le premier anticorps est remplacé par le serum normal (pré-immun)
- lorsqu'il s'agit d'une lectine couplée à la phosphatase alcaline, un témoin négatif doit être fait selon NIEDZ et *al.* (1991). Le site glycanique reconnu par la lectine est mis en présence d'un substrat compétitif (comme l' α méthyl-D-Mannose) si la lectine est la concanavaleine A. D'autre part, un témoin sera effectué en présence des substrats de la phosphatase alcaline sans primo-incubation avec la lectine, de façon à détecter les activités enzymatiques endogènes éventuelles.

4.1.5 Révélation des bandes immunolocalisées

4.1.5.1 Par la phosphatase alcaline

Les éléments de la révélation sont les suivants :

- p nitro blue tetrazolium chloride (NBT) à raison de 30 mg dans 1 ml de diméthyl formamide (DMF) à 70 % pour 100 ml de tampon carbonate pH 9,8 (40 mM NaCO₃ , 1 mM MgCl₂),
- 5 bromo 4 chloro 3 indolyl phosphate toluidine salt (BCIP) à raison de 15 mg dans 1 ml de DMF pour 100 ml de tampon carbonate.

Dès que la solution est prête, la membrane est immergée puis laissée au repos. L'arrêt de la réaction se fait dans de l'eau distillée pendant quelques minutes. La membrane est séchée dans du papier de type sopalin et gardée à l'obscurité. Une photo sur film Kodak est immédiatement faite.

4.1.5.2 Par chémiluminescence

La membrane est équilibrée 2 fois 2 min dans du tampon B3 (Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, pH 9,5). Dans une boîte de Pétri en verre, on met 12 ml de B3 + 120 µl de 3-((2'-siproadamantane)-4-methoxy-4-3" phosphoryloxy)-phenyl-1,5-dioxethane (AMPPD) (soit 1/100ème) pendant 5-7 min. L'AMPPD (Boehringer) a été utilisé pour la première fois par ALLEFS et *al.* (1990). Ce substrat en contact avec l'enzyme, émet une luminescence captée par le film. Cette expérience est faite pour tester le seuil de sensibilité et sa répétabilité en comparaison avec la méthode de révélation NBT + BCIP.

La membrane humide est déposée dans du film Saran. En chambre noire, le tout est mis dans une cassette muni d'un film photographique Kodak. La cassette est alors mise à 32°C pendant une heure pour l'impression. Le film est alors fixé puis révélé avec les solutions Kodak fournies par Sigma.

4.1.6 Révélation des protéines par le nitrate d'argent

Cette révélation est celle définie par BLUM et *al.* (1987) (Annexe 10).

4.1.7 Révélation des glycoprotéines

Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, les glycoprotéines portant un résidu α -méthyl-D-Mannose sont révélées par une lectine: la concanavaleine A (E.Y. Lab, Flobio) ou conA. Cette lectine est issue de *Canavalia ensiformis*. Il s'agit d'une molécule tétramérique dont la spécificité concerne les résidus α -mannose, α -glucose et l' α -N acétyl glucosamine. Elle marque les glycanes liés aux fonctions N- ou O- des protéines.

La conA couplée à la phosphatase alcaline est ajoutée au tampon TBS-PVP 1 % + 0,1 % Triton au 1/2000ème. Après trois rinçages de 10 min, la réaction enzymatique se déroule en présence du mélange NBT + BCIP. La coloration est photosensible, aussi une photographie est rapidement faite et les membranes sont gardées à l'obscurité.

4.1.8 Digitalisation des membranes et traitement de l'image

Le matériel informatique est constitué de produits Apple® Mac Intosh. Les membranes sont digitalisées sur un scanner MicroTek Color Gray (300 dpi) connecté à un Macintosh LCII puis traitées par le logiciel NIH-1.56 fourni par le Dr W. RASBAND (Bethesda, MD, USA).

Les mesures se font par rapport à la surface et au niveau de gris de l'unité d'image qui est le pixel. L'intégrale obtenue permet d'avoir une aire polypeptidique exprimée en pixel. Les protéines ainsi quantifiées représentent le stock de protéines sous forme monomérique (extraction dénaturante). On ne peut donc pas distinguer la part des monomères libres (ou solubles), des monomères probablement inclus dans une structure protéique tertiaire ou ceux constituant un polymère. De telles mesures sont effectuées à partir d'un minimum de 3 répétitions (membranes).

Les valeurs obtenues sont transcrites sous forme de tableaux puis représentées par une courbe ou un histogramme. L'aire polypeptidique est exprimée en pourcentage d'une densité de base de 100 à J_0 (considérée comme témoin).

4.2 Electrophorèse bi-dimensionnelle

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de deux paramètres indépendants: leur charge électrique et leur poids moléculaire. L'iso-électrofocalisation (IEF) permet de séparer les protéines selon leur pHi. Pour cela des ampholytes (Biorad) sont employées afin de créer un gradient de pH. Les protéines dénaturées vont migrer jusqu'à atteindre la zone du gradient de pH où leur charge nette s'annule. Dans la deuxième dimension, les protéines seront séparées en présence de SDS et en fonction de leur PM.

4.2.1 Iso-électrofocalisation en condition équilibrée

Après avoir coulé le gel de focalisation dans les capillaires (diamètre de 1 mm) (O'FARRELL, 1975) (Annexe 11), et après leur polymérisation, ceux-ci sont stockés à 4 °C. Une solution de NaOH 20 mM (solution cathodique) est mise sous agitation sous vide pendant 40 min. Pendant ce temps, les capillaires sont munis d'une cupule et d'un joint, puis introduits à leur place sur le module. Par ailleurs, une solution de H₃PO₄ 10 mM (solution anodique) est mise sous agitation sous vide pendant 40 min.

Dix µl de tampon de lyse et 10 µl de tampon de lyse dilué au demi sont déposés au sommet de chaque gel de façon à ne faire aucune bulle entre le sommet du gel et celui de la cupule. La cupule est alors remplie de soude (20 mM) ainsi que la partie supérieure de la cuve. La partie inférieure de la cuve est remplie avec la solution d'acide (10 mM).

Une préfocalisation permet d'établir un gradient de pH. Elle se déroule de la manière suivante :

- | | | |
|----------|-------|---|
| - 10 min | 200 V | |
| - 25 min | 300 V | |
| - 15 min | 400 V | avec les limites suivantes: 300 mA, 3W. |

La solution cathodique est ensuite éliminée dans la partie supérieure du gel ainsi que dans les capillaires. L'extrait est déposé sur la surface en veillant à n'emprisonner aucune bulle. Du bleu de bromophénol (0,05%) est ajouté à l'échantillon afin de suivre la migration dans le capillaire. L'extrait protéique est recouvert par 10 µl de tampon de lyse et 10 µl de tampon de lyse dilué au demi dans de l'eau.

L'IEF se poursuit de la manière suivante :

- 10 min 500 V
- 5 h 30 750 V (limites: 300 mA, 3W)

Les capillaires sont démoulés au moyen d'une seringue dans un microtube Eppendorf contenant 500 µl de tampon d'équilibration (Tris 0,5 M-pH 6,8; SDS 2,3 %)+ 50 µl de bleu de bromophénol. Ils seront conservés à -80 °C. Les boudins décongelés sont ensuite déposés au sommet d'un gel de séparation afin de subir une électrophorèse monodimensionnelle. Les protéines seront alors séparées selon leur PM.

Des témoins standards (Annexe 12) sont aussi déposés dans des capillaires de façon à déterminer des repères pHi-PM.

4.2.2 Iso-électrofocalisation en condition non équilibrée

Le principe de cette méthode est de séparer les protéines en deux dimensions, mais au cours de l'IEF, la migration s'effectuera du pH anodique vers le pH cathodique. Pour cela, il est nécessaire d'inverser les positions de la soude et de l'acide dans la cuve. La partie supérieure de la cuve est donc remplie d'acide, et la partie inférieure, de soude. Par ailleurs, le sens du courant électrique est aussi inversé.

Une solution de 20 mM de soude est mise sous agitation sous vide ainsi qu'une solution d'urée 5 M. Par ailleurs une solution d'acide phosphorique 10 mM est préparée. Les échantillons sont directement déposés à la surface des capillaires. Ils sont éventuellement dilués dans de l'urée (volume final 15-20 µl). De l'urée est ensuite ajoutée (20 µl), puis la solution d'acide. Aucune préfocalisation n'est nécessaire.

L'IEF se déroule en faisant une gamme très progressive de voltage croissant de 100 à 800 V (par palliers de 100-150 V). Le temps de chaque étape est compris entre 20 et 45 min. Le total du voltage passé est d'au moins 1800 V. Les conditions limites en mA et Watt sont conservées.

5. METHODE D'EXTRACTION DES ARNs TOTAUX DE FEUILLES ET ANALYSE DES ARNs α TUBULINE

Ces expériences sont effectuées sur des feuilles de l'hybride '474' diploïde cultivées dans le milieu décrit dans l'Annexe 3, et selon les conditions de culture précédemment définies. Deux méthodes d'extraction ont été testées afin de déterminer la plus performante (temps, pureté et qualité des ARNs, migration et hybridation).

5.1 Extraction des ARNs totaux

L'extraction des ARNs requiert des précautions particulières en ce qui concerne les conditions dans lesquelles sont réalisées les manipulations. Etant facilement dégradés par des ribonucléases qui peuvent se trouver sur la verrerie ou la peau, tout le matériel est traité pendant une nuit dans de l'eau ultrapure (système Millipore) additionnée de diéthyl pyrocarbonate (DEPC) utilisé à 0,01 %. L'ensemble du matériel est ensuite autoclavé à 110 °C pendant 20 minutes. Les embouts de pipettes, les microtubes Eppendorf sont également autoclavés; l'utilisation de gants est indispensable.

5.1.1 Première méthode d'extraction

La composition des tampons et les protocoles sont explicités par SAMMBROOK et al. (1989). Les feuilles sont réduites en poudre avec de l'azote liquide dans un mortier refroidi. La poudre est reprise dans du tampon isothiocyanate de guanidium (4 M). Le protocole suivi par la suite est celui de CHURCH et GILBERT (1984). Son principe réside en des déprotéinisations successives au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (24/24/1, v/v/v) puis une précipitation des ARN au chlorure de lithium (2 M final).

5.1.2 Deuxième méthode d'extraction

Cette méthode a été décrite par CHIRWING (1979). Les feuilles congelées sont broyées dans l'azote liquide, la poudre est alors reprise dans le tampon suivant : isothiocyanate de guanidium 4 M + 0,83 ml acétate de sodium 3 M pH 6.0 + 0,83 ml β mercaptoéthanol, qsp 100 ml avec H₂O stérile traitée au DEPC.

Après centrifugation (15 000 g, 4 °C, 15 min), le surnageant est déposé sur un gradient de chlorure de césium (CsCl 5,7 M + 0,83 ml acétate de sodium 3 M pH 6.0, qsp 100 ml avec H₂O stérile traitée au DEPC). Les échantillons subissent alors une ultra-centrifugation (125 000 g, 20 °C, 21 h).

Le culot est repris dans 150 µl d'acétate de sodium (0,3 M). L'ensemble est alors transféré dans un microtube Eppendorf auquel on ajoute 750 µl d'éthanol absolu, puis est mis une nuit à -20 °C pour précipiter.

5.1.3 Quantification des ARNs totaux

Après centrifugation (10 000 g, 4 °C, 5 min), le culot est dissous dans 300 µl d'eau ou de Tampon TE (Annexe 13), puis son contenu en ARN est dosé au spectrophotomètre. Une unité d'absorbance à 260 nm (A₂₆₀) correspond à 40 µg d'ARN / ml d'extrait (MANIATIS et al., 1982). La présence de polysaccharides dans l'extrait d'ARN est estimée à 230 nm (A₂₃₀), tandis que l'absorbance à 280 nm (A₂₈₀) reflète les contaminations protéiques. Les rapports A₂₆₀ / A₂₃₀ et A₂₆₀ / A₂₈₀ doivent être proches de 2 pour que l'échantillon soit de bonne qualité.

5.2 Migration des ARNs en gel d'agarose

La cuve et le peigne sont nettoyés avec une solution contenant 0,1 % de SDS de façon à éliminer toute trace de ribonucléases (port de gants obligatoire). Les solutions nécessaires sont définies dans l'Annexe 6. Les étapes du protocole sont décrites dans l'Annexe 14. Trois répétitions sont réalisées pour chaque hybridation.

5.3 Transfert des ARNs sur une membrane de nylon

Le transfert (Northern blot) consiste à transférer les ARNs sur une membrane par capillarité. La membrane de nylon Hybond.N (Amersham) est préalablement trempée dans de l'eau stérile puis dans du tampon SSC 10 x (Annexe 13). Du papier Whatmann n°3 MM est préparé de la même façon.

5.4 Hybridation des ARNs α tubuline

5.4.1 Hybridation des ARNs par une sonde radioactive

Une étape de préhybridation est d'abord nécessaire. Elle se déroule dans un four à hybridation à 65°C dans des tubes épais spéciaux pour la radioactivité dans un tampon de préhybridation (Annexe 15). Pour l'hybridation, le kit Quick Prime de Pharmacia contenant de l'ADN polymérase T7 est employé. L'activité de [α ³²P] dCTP est à 3000 Ci / mmol.

Cinquante nanogramme de sonde sont dilués dans 34 μ l de tampon TE (Annexe 6). L'ensemble est dénaturé 5 min à 100°C puis 5 min dans la glace. La solution suivante est ajoutée à la préparation dénaturée:

solution de réaction du kit	10 μ l	
ADN polymérase T7 du kit	1 μ l	
[α ³² P] dCTP	4 μ l	qsp 50 μ l H ₂ O

L'ensemble est mélangé et centrifugé (centrifugeuse de paillasse) dans le matériel strictement réservé à cet usage afin de limiter les contaminations. Le tout est laissé incubé 40 min à 37 °C. La réaction est arrêtée avec 2 μ l d'EDTA 0,5 M. La sonde est alors purifiée sur une colonne de Séphadex G50 coulée dans une miniseringue stérile de 2 ml. L'échantillon est chargé sur la colonne. La colonne est ensuite centrifugée (800 g, 20 °C, 4 min), et l'échantillon est récupéré dans un microtube Eppendorf.

Les sondes ainsi synthétisées avec la [α ³²P] dCTP sont mises en contact pendant au moins une nuit avec la membrane préhybridée dans le même tampon. Celle-ci est alors lavée dans un tampon de lavage (5 % SDS, 4 % Na₂HPO₄ 0,5 M). Le premier lavage est rapide, les autres ont une durée de 15 min. Le passage du compteur Geiger permet d'avoir une idée sur la position de l'hybridation, des zones d'attachement non spécifique et de la quantité de radioactivité restante (minimum 3000 cpm).

5.4.2 Source de la sonde α tubuline

Il s'agit d'une sonde α tubuline issue d'une banque d'ADNc de *Glycine max* fournie par BORKIRD et SUNG (1985).

MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE SYNCHRONISATION DE LA PREMIERE DIVISION EMBRYOGENE

Cette première partie présente les principaux résultats qui ont conduit à la mise au point d'une méthode de culture en deux étapes successives, permettant une relative synchronisation des premières divisions dans les feuilles intactes du *Cichorium* hybride '474'. L'objectif de ce travail est de rechercher des marqueurs cytologiques des mécanismes inducteurs de l'embryogenèse somatique chez cet hybride. Leur caractérisation cyto- et biochimique ainsi que leur apparition au cours de l'induction nécessitent une séparation des différentes étapes de l'ES afin de pouvoir associer chaque déterminant avec une phase particulière du processus. De ce fait, une méthode de culture séquentielle est donc obligatoire. Plusieurs phases successives sont généralement observées: l'induction des cellules compétentes, le déclenchement des premières mitoses et le développement des embryons.

Les travaux concernant la synchronisation de l'ES considèrent surtout les différents stades morphologiques du développement des eS et non les étapes précoces, c'est-à-dire la différenciation des cellules compétentes et la première mitose des CE. WETHERELL (1984) a montré qu'une plasmolyse de courte durée, engendrée par l'apport de saccharose ou de sorbitol (1 M), provoque la synchronisation de l'ES d'une culture cellulaire de carotte; le glycérol plasmolyse aussi les cellules, mais son action sur la synchronisation n'est pas rapportée. Pourtant, le glycérol est utilisé fréquemment lors de l'induction de l'ES chez *Citrus*, où il peut constituer la seule source carbonée du milieu (DENG et al., 1990), et induire une relative synchronisation (GAVISH et al., 1988). De plus, le glycérol peut être métabolisé et incorporé dans les fractions glucidiques et lipidiques (McDONALD et AP REES, 1983).

Dans les racines de *Cichorium*, une augmentation de la concentration en saccharose (de 15 à 360 mM) favorise la production d'eS, mais aux fortes concentrations, leur développement est perturbé (GUEDIRA et al., 1990). La nature des sucres a aussi été testée. Ainsi, le glucose, le fructose, le maltose, le saccharose et le raffinose améliorent le rendement en eS issus de styles, alors que ceux issus des anthères se développent mieux en présence de maltose ou de saccharose (COUILLEROT et al., 1992). Nous nous sommes donc inspirés de ces

travaux pour définir à la fois les milieux et les conditions de culture adéquates favorisant la synchronisation des premières divisions.

Les paramètres que nous avons retenus pour cette analyse sont les suivants :

- la quantification du nombre d'eS induits: celle-ci est réalisée à partir d'analyses de coupes de feuilles induites (nombre ramené par mm² de feuille),
- la répartition des eS par classes de taille: celle-ci s'établit en fonction du nombre de cellules embryonnaires comptées par eS dans le plan de coupe.

Cette répartition des eS s'effectue selon le type de structures observées. Cela nous a permis de définir les différentes classes de taille suivantes:

classes de taille	Types de structures / plan de coupe
0	cellule embryogène
1	eS constitué de 2 cellules
2	eS constitué de 3-5 cellules
3	eS constitué de 6-9 cellules
4	eS constitué de 10-20 cellules
5	eS constitué de plus de 20 cellules

La synchronisation des premières divisions des CE se caractérise par la présence de nombreux eS répartis dans la même classe de taille comparativement aux autres classes.

1. VARIATION DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE DU MILIEU DE CULTURE

Les travaux précédents de GUEDIRA et al. (1990) ont montré que le saccharose était la meilleure source carbonée et qu'il favorisait une relative synchronisation du développement des eS formés dans les racines. Aussi avons-nous testé différentes concentrations de saccharose lors de l'induction de l'ES de feuilles cultivées dans le milieu de culture décrit dans l'Annexe 1.

Le nombre moyen d'eS varie en fonction de la concentration en saccharose du milieu de culture. Les résultats sont rassemblés dans la Figure 11.

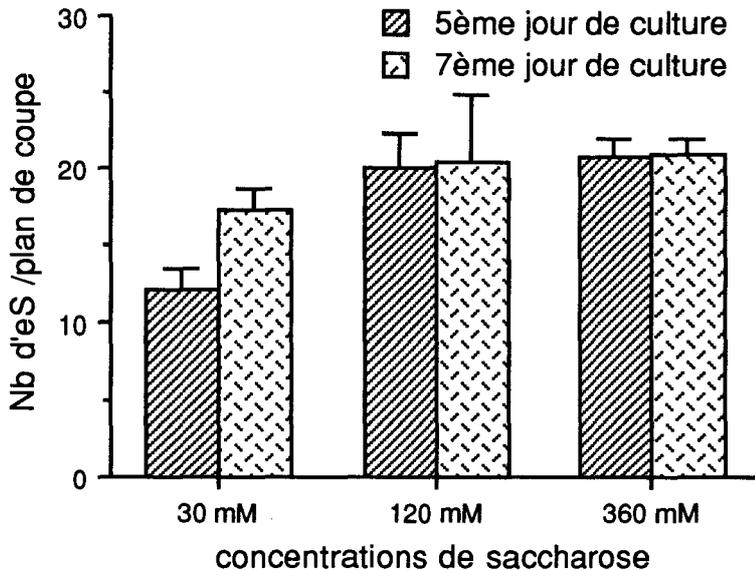


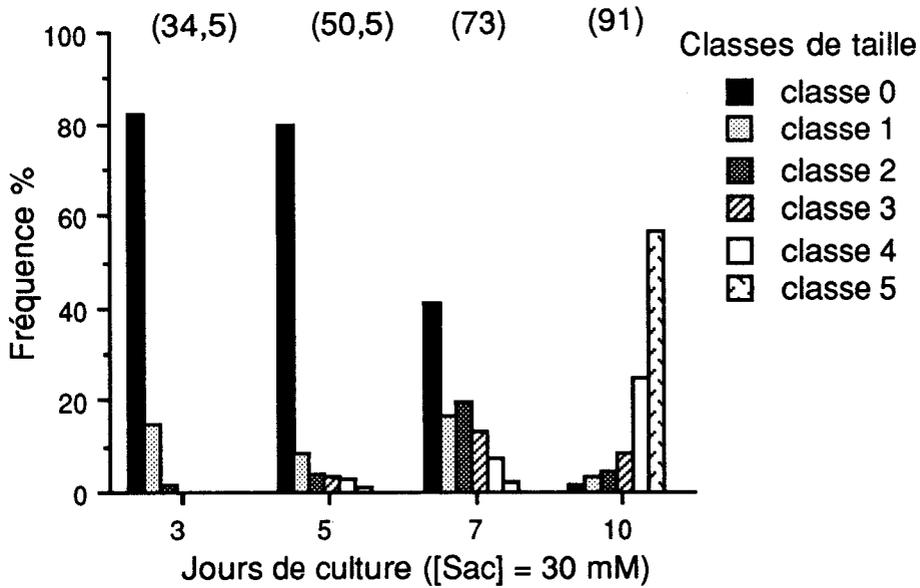
Figure 11: Evolution du nombre d'embryon en fonction de différentes concentrations de saccharose. Nombre par mm² de feuilles.

On constate qu'au 5^{ème} jour de culture, ce nombre augmente de façon significative lorsque la concentration passe de 30 à 120 mM (test de Student $t_S=18,93$; $P<0,01$), alors qu'aucune différence notable n'est observée entre les doses 120 et 360 mM. Après 7 jours de culture, l'effet de la teneur en sucre est comparable. Entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour de culture, le nombre d'eS n'augmente que dans les feuilles cultivées en présence de la plus faible concentration en saccharose testée. On peut donc en conclure que l'induction se prolonge jusqu'au 7^{ème} jour pour cette dernière condition de culture; le nombre d'eS produits est pourtant plus important dans les conditions 120 et 360 mM, mais l'induction cesse au 5^{ème} jour.

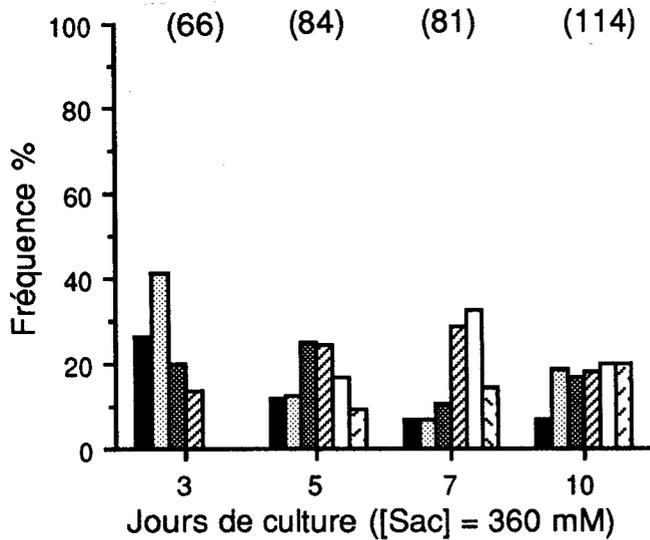
La répartition des eS par classes de taille a donné les résultats décrits dans la Figure 12. Les comptages ont été réalisés sur trois séries indépendantes de 20 lames. Après 5 jours de culture dans le milieu contenant 30 mM de saccharose, la classe 0 (CE) est la plus représentée avec 80 % des effectifs et on observe déjà des eS plus grands et répartis dans les autres classes. A partir du 7^{ème} jour, toutes les classes sont représentées (Fig. 12A). En présence de 120 mM, la distribution des eS s'effectue selon une courbe de Gauss. Dans le milieu le plus riche (360 mM), la répartition des eS est plus homogène (Fig. 12B).

Figure 12: Evolution de la répartition des embryons somatiques par classes de taille (exprimée en %) au cours de la culture, en fonction de la concentration en saccharose du milieu. Fréquence moyenne déterminée à partir de 3 séries de 20 lames. Le nombre d'eS.10 mm⁻² est indiqué entre parenthèses. **A:** 30 mM, **B:** 360 mM.

A: Milieu de culture contenant 30 mM de saccharose



B: Milieu de culture contenant 360 mM de saccharose



L'augmentation de la concentration en saccharose du milieu d'induction permet d'obtenir un plus grand nombre d'eS. Cependant, la plupart d'entre eux ont des difficultés à se développer; pour les teneurs élevées en sucre, le nombre d'eS de la classe 5 varie peu entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour de culture. Ceci pourrait être provoqué par une pression osmotique élevée. Des contrôles effectués sur des feuilles entières au 9^{ème} jour de culture, confirment ce blocage. Contrairement aux résultats de GUEDIRA et al. (1990) sur les racines, l'application de 360 mM ne provoque pas une synchronisation de l'induction puisque la plupart des classes de tailles sont représentées après 3 jours de culture. Elle n'induit pas, non plus, une synchronisation du développement.

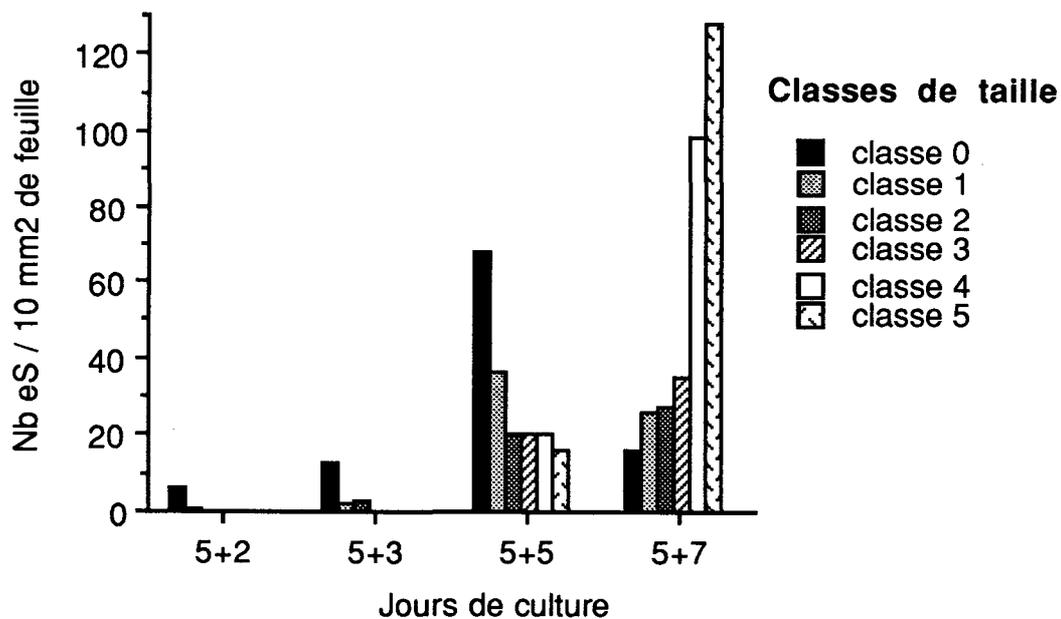
2. UTILISATION DU GLYCEROL COMBINEE AU SACCHAROSE

Chez des cultivars de *Citrus*, GAVISH et al. (1988) ont observé une relative synchronisation de l'ES en remplaçant le saccharose par du glycérol. Chez *Citrus*, le glycérol est souvent utilisé comme source carbonée (BEN HAYYIM et NEUMANN, 1983; VU et al., 1993). Nous avons alors utilisé la combinaison de sources carbonées suivante, saccharose (30 mM) + glycérol (330 mM), dont la pression osmotique est comparable à celle d'une solution de saccharose 360 mM. Ce prétraitement des feuilles s'est déroulé pendant une période courte de 5 jours dite phase d'induction. Les feuilles sont ensuite transférées dans un milieu dépourvu de glycérol (mais contenant du saccharose 30 mM); cette seconde phase de culture est appelée phase d'expression.

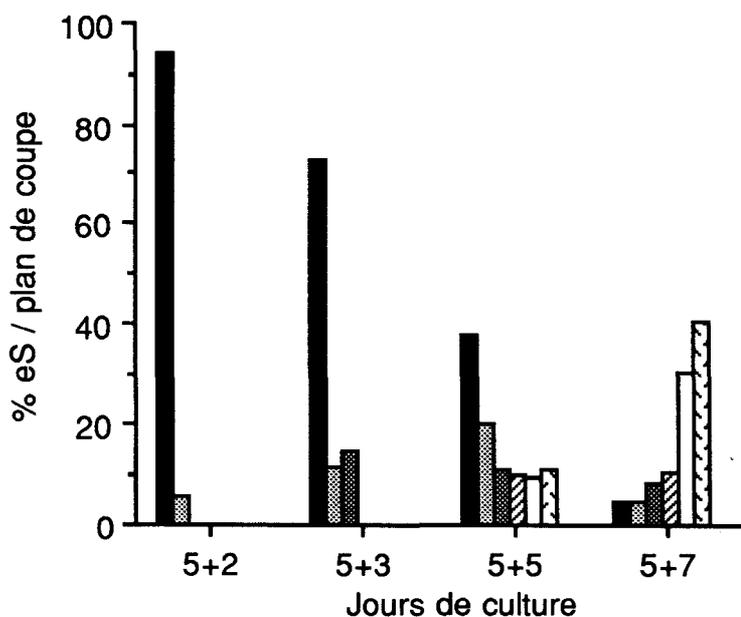
Ce prétraitement provoque l'induction d'un grand nombre d'eS. La répartition des eS par taille, montre que 3 jours après le transfert (J5+3), 73,2 % des structures embryonnaires représentent des CE (classe 0) (Fig. 13A et 13B). Ces embryons sont viables et sont capables de germer. On note la présence de CR et de CE après 7 jours de transfert. Ces cellules ont probablement été induites après le transfert dans le milieu d'expression.

Figure 13: Evolution de la répartition des embryons après le transfert des feuilles dans un milieu dépourvu de glycérol (phase d'expression). Nombre ou fréquence moyens déterminés à partir de 3 séries de 20 lames **A:** Répartition du nombre d'embryons par classes de taille. **B:** Répartition (exprimée en %) des embryons par classes de taille.

A:



B:



3. CONCLUSIONS

L'utilisation d'une faible concentration en saccharose (30 mM) permet d'obtenir des CE dès le 3^{ème} jour de culture mais le nombre de cellules concernées est faible. L'application d'un prétraitement de 5 jours (glycérol 330 mM + saccharose 30 mM) puis le transfert des explants dans un milieu de même composition mais dépourvu de glycérol déclenche les premières divisions. La première division embryogène est observée après 36-48 h de transfert. Aussi, il nous a été possible de déterminer deux phases de culture. La première phase en présence de glycérol (**phase d'induction**) permet la dédifférenciation des cellules compétentes en CE dont l'état semble bloqué. Le transfert des feuilles sur le milieu dépourvu de glycérol (**phase d'expression**), provoque les divisions et le développement normal des eS. Ce système de culture permet donc d'obtenir une méthode de culture synchronisant la première division embryogène. Cette technique devrait faciliter la recherche de marqueurs cytologiques et biochimiques, ainsi que l'analyse de la réorientation de l'expression des séquences géniques impliquées.

CARACTERISATION DES DIVISIONS CELLULAIRES AU COURS DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

Cette deuxième partie concerne l'étude de la réactivation des cellules compétentes et de leur division jusqu'à la formation des proembryons.

Dans un premier temps, les évènements précoces de l'embryogenèse somatique au niveau des feuilles seront étudiés d'un point de vue cytologique et immunocytologique (réseau microtubulaire du cytosquelette). Dans un second temps, de telles modifications seront aussi analysées par immunolocalisation des différentes tubulines et de l'actine.

Ces études sont effectuées dans des fragments foliaires induits dans les conditions de culture permettant la synchronisation des premières divisions: après 5 jours de culture dans un milieu comportant 330 mM de glycérol et 30 mM de saccharose, les fragments sont transférés dans le milieu d'expression dépourvu de glycérol. Des échantillons sont prélevés au cours de la culture.

1. REACTIVATION DE CELLULES MESOPHYLLIENNES COMPETENTES

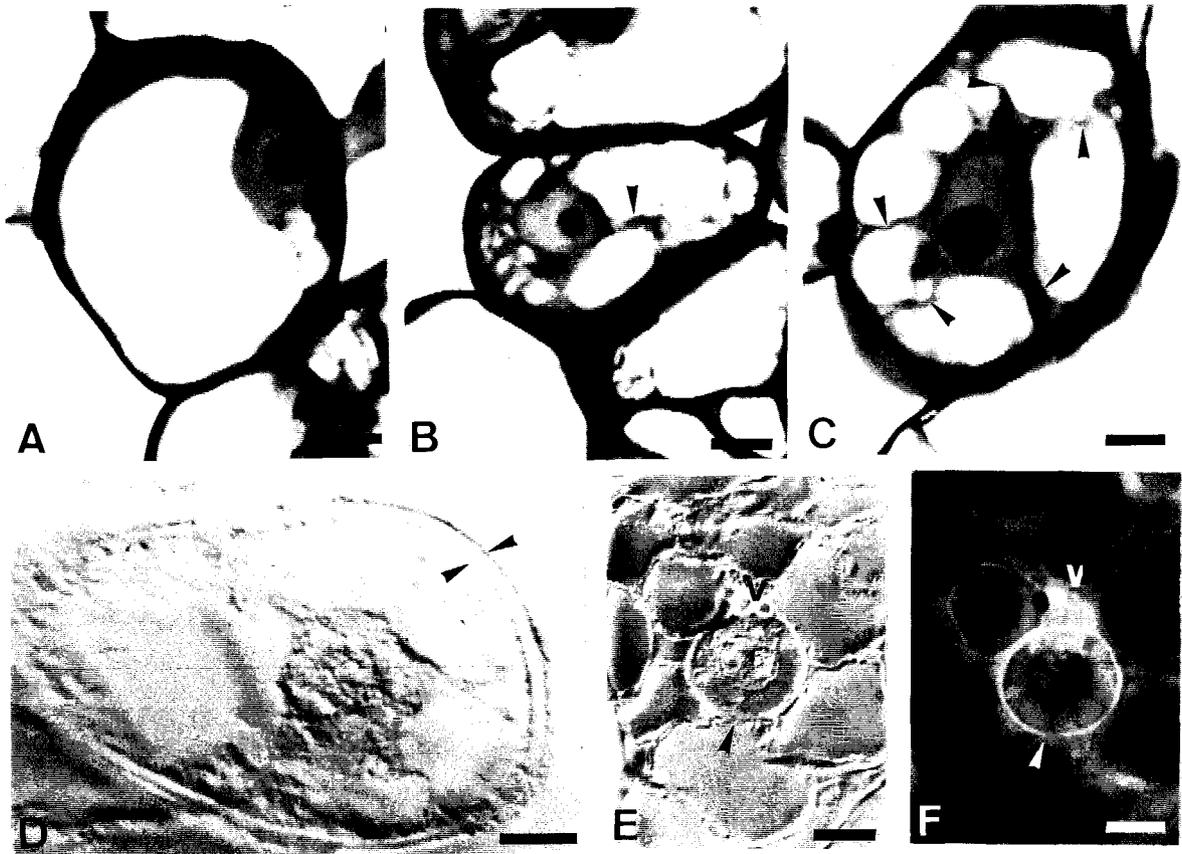
Cette étude s'est effectuée sur des coupes semi-fines de fragments foliaires prélevés après 5+3 jours de culture.

Les cellules non réactivées présentent des chloroplastes dans le cytoplasme pariétal (environ 10-15 / coupe de cellule). Leur noyau est rarement apparent parce qu'il est aplati contre le plasmalemme.

Les feuilles prélevées possèdent des cellules mésophylliennes différenciées qui ont une fonction photosynthétique. Mais au cours de l'induction embryogène, il est possible de détecter rapidement (dès J₃) des cellules dont le noyau subit des modifications. Celui-ci, qui était lenticulaire et pariétal, s'arrondit. L'enveloppe nucléaire devient bien visible avec la coloration par la safranine.

Planche 1

Réactivation des cellules mésophylliennes compétentes, Caractérisation des cellules embryogènes.



- A** Cellule mésophyllienne en cours de réactivation, le noyau s'arrondit et un nucléole actif est visible (flèche).
- B** Cellule réactivée, le noyau commence à migrer vers le centre de la cellule. Un réseau de trabécules cytoplasmiques se forme et se densifie (flèches).
- C** Cellule embryogène située dans le mésophylle. Le noyau central, muni d'un gros nucléole très actif, est maintenu par des trabécules cytoplasmiques (flèches).
- D** Cellule embryogène située dans le mésophylle, la paroi s'épaissit (flèches).
- E** Cellule embryogène (flèche) située à proximité d'un faisceau vasculaire (v).
- F** Observation sous UV de la cellule embryogène Fig. E: mise en évidence de la fluorescence cellulosique (flèche).

Coupes semi-fines de feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes.
Coloration: bleu de toluidine (A, B, C)
Observation : contraste interférentiel de Nomarski (D, E) ou UV (F)
Barre = 10 μm , sauf E et F, barre = 20 μm

Un nucléole grossit suggérant une augmentation de synthèse d'ARNr (Pl. 1A). Le noyau devient volumineux (diamètre $>14 \mu\text{m}$) et occupe environ 10 % de la surface cellulaire du plan de coupe. De telles cellules sont appelées **cellules réactivées** ou CR.

Le cytoplasme se densifie et des liens transvacuolaires (ou trabécules) émergent du cytoplasme périnucléaire. Le noyau se décolle du plasmalemme et commence à migrer vers le centre de la cellule (Pl. 1B). Parfois, il emmène avec lui quelques chloroplastes.

Le nombre de trabécules cytoplasmiques augmente et la vacuole se fragmente en plus petites unités. L'architecture équatoriale cytoplasmique, analogue à un phragmosome, semble maintenir le noyau dans une position centrale (Pl. 1C). Il occupe désormais 25 % de la surface cellulaire en coupe, pour un diamètre compris entre 14 et 18 μm . Les nucléoles occupent 3 à 5 % de la surface nucléaire en coupe. Les chloroplastes ne sont plus visibles par la suite. Cet état cellulaire correspond au stade dit de la **cellule embryogène** ou CE. La paroi de telles CE est plus épaisse que celle des cellules mésophylliennes (Pl. 1D et 1E). Elle est particulièrement fluorescente lorsqu'elle est observée sous ultraviolet (UV) (Pl. 1F).

Les premières CR et CE sont observées près des faisceaux conducteurs, tant au niveau des vaisseaux xylémiens que phloémiens (Pl. 2A et 2B). De nombreux proembryons peuvent ainsi s'y développer et être très facilement détectés par une coloration de leur noyaux par le Hoechst (Pl. 2C).

Planche 2
Localisation périvasculaire des premières structures embryonnaires

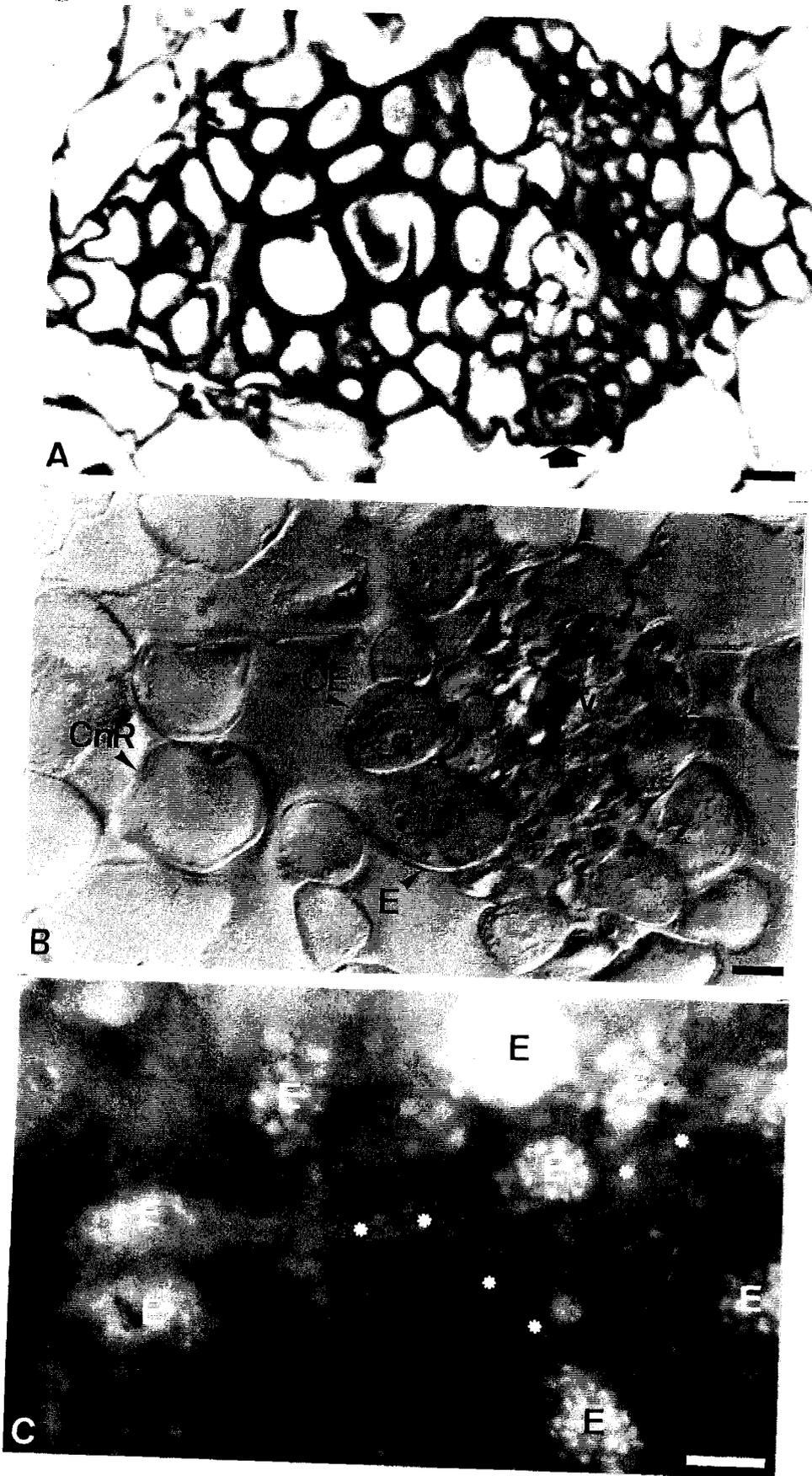


Planche 2

Localisation périvasculaires des premières structures embryonnaires

- A** Coupe en paraffine de feuilles induites (J5). Les premières CE (flèche) apparaissent près des faisceaux vasculaires (v).
- B** Coupe semi-fine de feuille observée en contraste interférentiel (J5+2). Une CE et un embryon (E) sont présents près des faisceaux vasculaires (v). Une cellule mésophyllienne non réactivée (CnR) possède un petit noyau accolé au plasmalemme.
- C** Observation en UV d'un limbe de feuille induite (J5+5), dont les noyaux sont colorés au Hoechst. De nombreux embryons (E) sont détectés près des nervures symbolisées par * *.

Feuilles de *Cichorium* hybride '474' diploïdes
Barre = 20 µm, sauf C, barre = 100 µm.

D'autres sites cellulaires peuvent permettre aux embryons de se développer. Une réactivation fréquente de cellules mésophylliennes éloignées des faisceaux vasculaires est décelée, mais elle intervient un peu plus tardivement. Quelques cellules épidermiques semblent, elles aussi, compétentes. Elles peuvent se réactiver et se différencier en proembryons.

2. LA PREMIERE MITOSE DES CELLULES EMBRYOGENES

Après avoir subi une digestion enzymatique ménagée, les explants sont disséqués manuellement. La mise en évidence de la chromatine des CE est réalisée au moyen du fluorochrome Hoechst (observation sous UV).

2.1 Localisation des cellules embryogènes dans le tissu

L'étude de la différenciation de cellules mésophylliennes compétentes est plus aisée sur des coupes de feuilles. La recherche de CE *in situ* est plus difficile, du fait du matériel employé qui est constitué de plusieurs couches cellulaires. La prédisposition des cellules périvasculaires à répondre en premier à l'induction embryogène nous permet d'avoir une base "topographique" lors de la recherche des CE en cours de division (Pl. 2). Pour étudier les modalités de la première division embryogène, nous avons plus particulièrement observé les cellules périvasculaires.

2.2 Description du cycle nucléaire

2.2.1 La transition interphase/ prophase

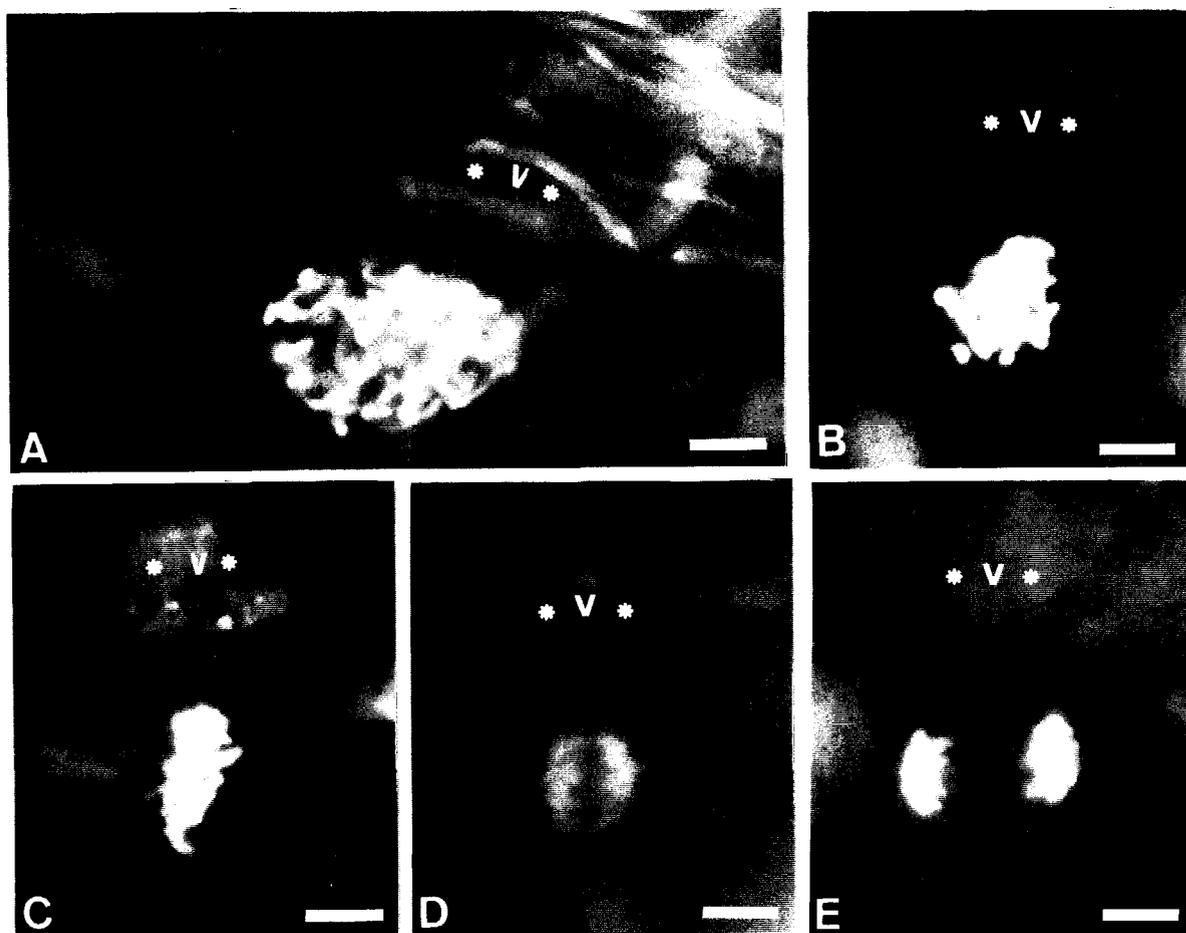
Lorsque la CE progresse dans le cycle cellulaire et atteint la phase G₂, l'ADN est déjà dupliqué (phase S). En préprophase, la chromatine se condense progressivement en formant des chromocentres très fluorescents (granulations blanches dans le noyau interphasique, coloré par le Hoechst) alors que l'enveloppe nucléaire existe encore. Les chromosomes apparaissent au cours de la prophase sous la forme de fins nucléofilaments nettement délimités. La surface nucléaire moyenne atteint alors 95 μm^2 (Pl. 3A). Les paires de chromatides se forment et se joignent à une région contenant des zones d'ADN répétées (hétérochromatine non transcribable) appelées centromères. Les chromosomes poursuivent leur individualisation et deviennent plus épais.

2.2.2 Prémétaphase et métaphase

L'enveloppe nucléaire s'est rompue, libérant ainsi les chromosomes. La condensation chromatinienne s'accroît, et ces chromosomes très épais commencent à s'aligner sur un même plan (Pl. 3B). Des forces opposées induisent alors la migration des chromosomes du centre de la cellule vers les pôles. Cette migration semble être plus ou moins ordonnée, mais les chromosomes s'orientent de façon à ce que chacun de leurs kinétochores soient en regard des pôles. Les chromosomes sont à ce moment sur une zone équidistante de chacun des deux pôles. C'est la métaphase. Le plan métaphasique est généralement anticline par rapport aux faisceaux vasculaires (Pl. 3C): 95 % des 45 métaphases observées

présentent un plan équatorial anticline par rapport à l'orientation des éléments vasculaires proches des cellules en divisions.

Planche 3
La première division embryogène:
Caractérisation du plan de division dans le tissu



- A** Milieu de la prophase: les chromosomes sont visibles sous forme de nucléofilaments encore assez fins.
- B** Prémétaphase: les chromosomes, plus épais, commencent à s'aligner au niveau de la plaque équatoriale.
- C** Métaphase: la plaque métaphasique est anticline par rapport aux faisceaux vasculaires.
- D** Anaphase: les deux lots de chromosomes commencent à migrer vers les pôles opposés.
- E** Télophase: les noyaux fils se reforment. Le plan anticline est maintenu. L'axe des faisceaux vasculaires est symbolisé par '*v*'.

Feuilles de *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J5+2
Coloration: Hoechst
Barre = 10 μ m

2.2.3 Anaphase et télophase

Les chromosomes se séparent et sont tractés vers les pôles opposés. Le plan précédemment défini est confirmé lors de l'anaphase (100 % des 27 anaphases observées) (Pl. 3D).

En télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme autour de chaque lot de chromosomes (Pl. 3E). La chromatine se décondense. La division nucléaire est suivie normalement par la partition du cytoplasme en deux cellules, contenant chacune un noyau fils. Ce plan de partition correspond à celui précédemment observé (95 % des 18 télophases). Il a aussi été mis en évidence dans des racines induites.

2.3 Description du cycle cytosquelettique

Contrairement aux nombreux protocoles, exposés lors des publications concernant l'immunomarquage du réseau microtubulaire, plusieurs problèmes sont apparus dans notre démarche:

- le matériel végétal employé est constitué d'un tissu et non de cellules plus ou moins isolées telles que des suspensions cellulaires, des protoplastes ou des microspores;
- le type d'explant, en l'occurrence les feuilles, présente des fluorescences parasites provoquées par la chlorophylle;
- les CE sont situées dans le tissu près des vaisseaux xylémiens ou phloémiens;
- enfin, aucune contrainte trop importante d'origine mécanique ou enzymatique ne doit intervenir sous peine de détruire le réseau;
- la présence de glycérol altère fortement la qualité du marquage et celle des Mts observés.

Aussi avons-nous choisi de travailler sur des feuilles de l'hybride '474' **tétraploïde**, car leurs cellules présentent un noyau beaucoup plus gros. D'autre part, le glycérol a été éliminé du milieu de culture des feuilles (Annexe 3) et celles-ci ont été prélevées après 4 jours de culture. Enfin, une dilacération mécanique a été effectuée afin d'obtenir un lit de cellules (type "frottis"). Par conséquent, aucune orientation de la BPP ne peut être fournie par rapport aux faisceaux ou aux sites de blessure. Un double marquage du noyau (DAPI) et du réseau microtubulaire (α tubuline) a été réalisé.

2.3.1 La transition Interphase / préprophase

2.3.1.1 Bande préprophasique normale

Les cellules non réactivées sont caractérisées par un noyau constitué de chromatine faiblement fluorescente et uniformément colorée. Le noyau est généralement assez petit (10-11 μm environ), mais peut parfois atteindre 13-15 μm de diamètre. Il est accolé au plasmalemme (Pl. 4A). Ces cellules possèdent un réseau microtubulaire cortical plus ou moins dense avec des Mts transversaux parallèles (Pl. 4B) caractéristiques de cellules en cours d'élongation.

Au cours de la réactivation, les CR ressemblent à celles observées dans le tissu foliaire diploïde. Leur noyau se centralise et devient très volumineux (diamètre >15 μm) et ellipsoïdal. Il contient plusieurs nucléoles actifs (diamètre 3-5 μm). Ces CR restent toutefois assez allongées.

Au stade CE, les cellules deviennent généralement isodiamétriques (environ 50 μm x 40 μm). Le noyau est maintenu au centre de la CE par un réseau très dense de Mts cytoplasmiques périnucléaires, rayonnant autour du noyau: c'est la forme interphasique active (phase G₂) des Mts (Pl. 4C). Le noyau présente progressivement un nombre de plus en plus élevé de chromocentres très fluorescents, caractérisant l'évolution de la condensation chromatinienne au cours de la préprophase/ prophase. Ces chromocentres sont d'abord sphériques et dispersés sur la surface nucléaire. L'enveloppe nucléaire n'est pas encore rompue (Pl. 4D).

Au cours de la préprophase des CE, une BPP apparaît. Celle-ci est d'abord diffuse et se caractérise par des Mts corticaux parallèles, dispersés mais situés près de l'équateur (BPP précoce). Ces Mts se regroupent ensuite et forment un anneau étroit, de plus en plus dense et extrêmement fluorescent (Pl. 4E). Celui-ci se localise à proximité de l'équateur du noyau préprophasique (BPP "moyenne"). En fin de préprophase, une autre sorte de Mts, nucléés à la surface nucléaire, se développent en éventail du noyau vers le cytoplasme (Pl. 4E). Le noyau ressemble à une ellipse. La densité microtubulaire de la BPP diminue de façon concomitante, lors de l'entrée en prophase, alors que celle des Mts cytoplasmiques augmente .

Planche 4
La première division embryogène:
Mise en évidence d'une bande préprophasique

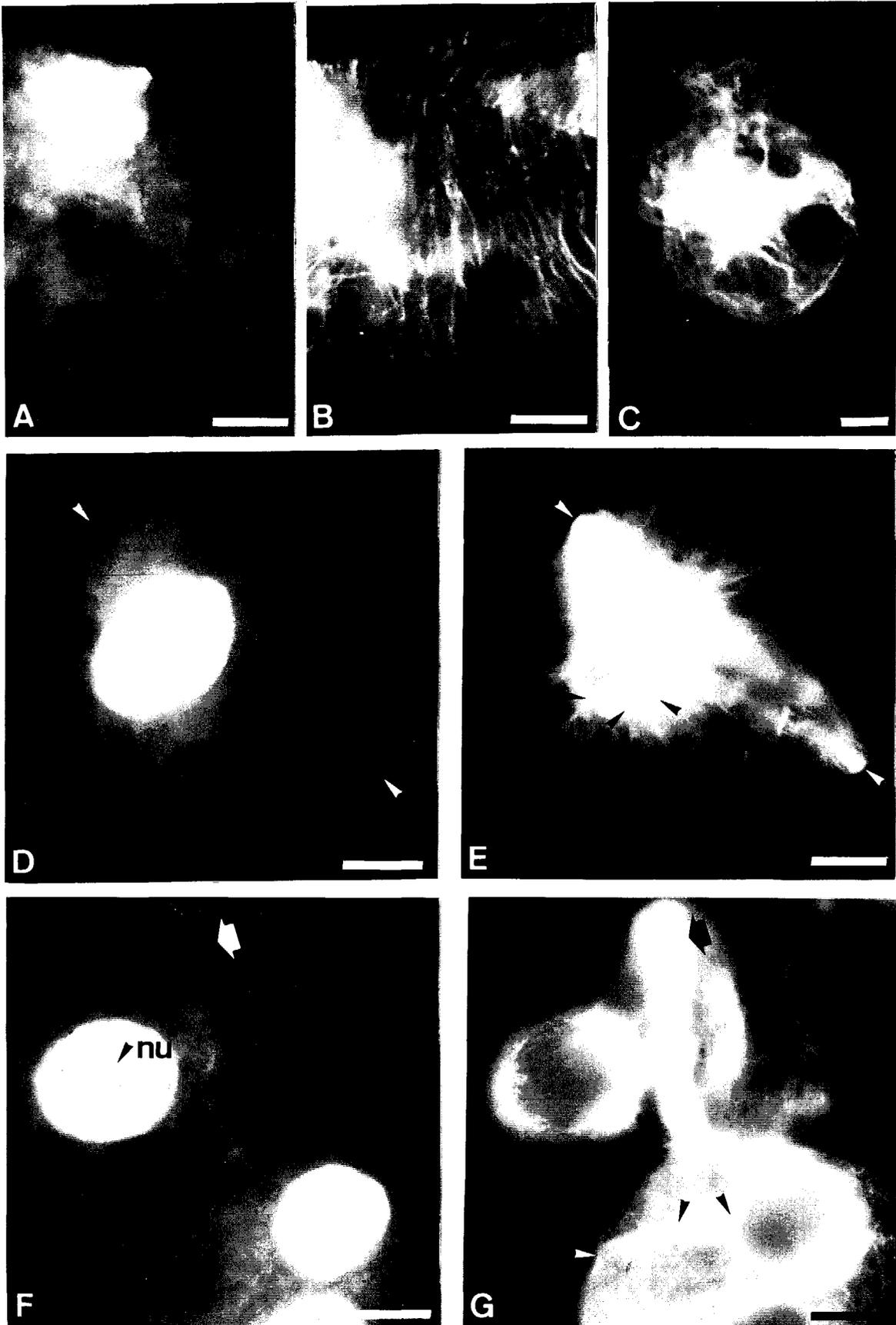


Planche 4
La première division embryogène:
Mise en évidence d'une bande préprophasique

- A, B** Cellule non réactivée: le noyau est petit (**A**) et la cellule possède un réseau des Mts transverses parallèles et fins (**B**).
- C** Cellule réactivée: de nombreux Mts périnucléaires émergent de la surface du noyau et traversent le cytoplasme.
- D, E** Cellule embryogène en phase G₂ (**D**). Les Mts périnucléaires se forment à la surface de l'enveloppe nucléaire (tête de flèche noire) et la bande préprophasique est située à l'équateur de la cellule (tête de flèche blanche) (**E**).
- F, G** Cellule embryogène, un gros nucléole (nu) occupe le centre du noyau (**F**). Une bande préprophasique est décalée de 15 µm par rapport à l'équateur du noyau (flèche noire) (**G**). Un embryon bicellulaire présentant des Mts périnucléaires et un alignement de Mts parallèles est situé près de la CE (têtes de flèches).

Feuille du *Cichorium* hybride '474' tétraploïdes, observation à J5
Marquage: anticorps anti- α tubuline, révélation par la FITC
Coloration : DAPI (A, D, F)
Barre = 10 µm

2.3.1.2 Bandes préprophasiques anormales

Des configurations plus rares de BPPs ont été observées. Dans tous les cas, les CE ont un noyau central ellipsoïdal. La BPP peut être décalée (de 15 µm) par rapport à l'équateur du noyau (Pl. 4F et 4G). Celle-ci est particulièrement épaisse et du matériel périnucléaire est très fortement marqué. On remarque que le nucléole peut atteindre 7-8 µm de diamètre. Parfois, certaines cellules présentent un seul noyau préprophasique (Pl. 4H) alors que deux anneaux de Mts sont visibles (Pl. 4I). Un des deux se situe au niveau du noyau alors que l'autre en est distant de 20 µm.

Une figure chromosomale particulière apparaît dans ce matériel végétal. Elle est probablement liée à la ploïdie de celui-ci et résulte d'une endoréplication du stock d'ADN. En effet, de telles cellules présentent au cours de la préprophase/prophase, des chromosomes groupés par deux (bivalents) et accolés sur toute leur longueur (Pl. 4J). Cette configuration chromosomique, en dehors d'une méiose, ressemble à celle observée dans le cas d'une mitose de cellules traitées par la

colchicine. Le noyau est sphérique. Ces cellules sont toutefois capables de poursuivre leur cycle cellulaire, et d'initier la formation d'une BPP assez large dont les Mts parallèles sont moins denses et plus dispersés (Pl. 4K). Un réseau de Mts périnucléaires cytoplasmiques peu dense est décelable dans le plan optique médian (Pl. 4L).

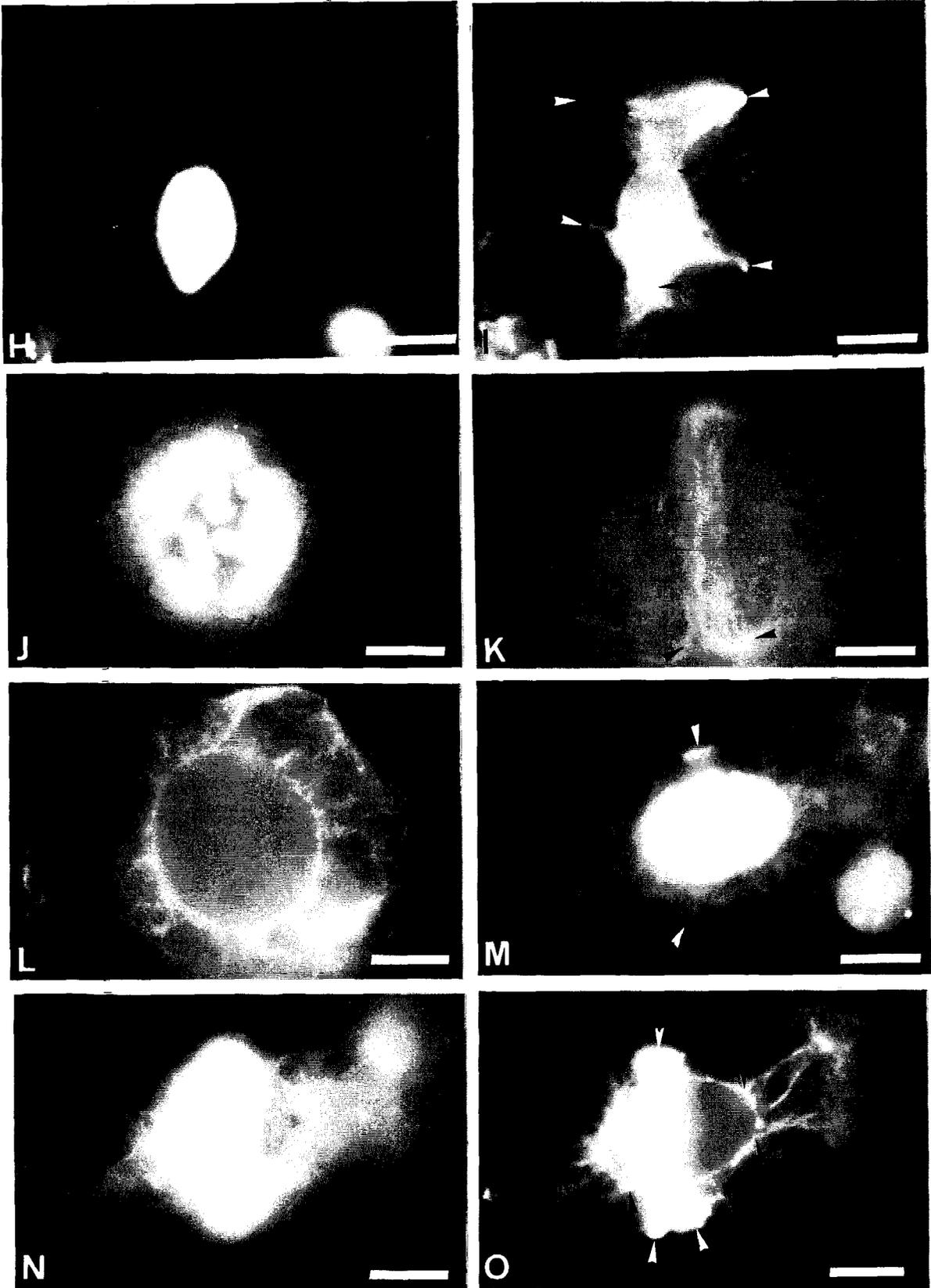
D'autres CE possédant un noyau ellipsoïdal (Pl. 4M) présentent une BPP très fluorescente dans le plan optique cortical (Pl. 4N). L'observation de cette dernière dans le plan médian, permet de montrer une séparation en deux bras de l'anneau, au niveau d'un seul côté de la cellule, d'où résultent deux zones sphériques fortement marquées (Pl. 4O). Cette CE présente des Mts périnucléaires dirigés vers les pôles cellulaires.

Planche 4 (suite)
La première division embryogène:
Mise en évidence d'une bande préprophasique

- H, I** Cellule embryogène, le noyau est ellipsoïdal (**H**). Deux bandes préprophasiques sont mises en évidence dont une à l'équateur du noyau (tête de flèche blanche) (**I**). Des Mts périnucléaires sont présents (tête de flèche noire)
- J, K, L** Cellule embryogène présentant une configuration chromosomique d'une C-mitose: les chromosomes sont groupés en bivalents (**J**). Une bande préprophasique (plan optique cortical) est caractérisé par un anneau assez large et peu dense de Mts parallèles (tête de flèche) (**K**). La même cellule (plan optique médian) présente un réseau peu dense en étoile autour du noyau (**L**).
- M, N, O** Cellule embryogène, de nombreux chromocentres sont visibles (**M**). Dans le plan optique cortical, une bande préprophasique se forme (**N**), deux bras sont nettement séparés (tête de flèche blanche), la surface du noyau émet des Mts en éventail (tête de flèche noire) (**O**).

Feuille du *Cichorium* hybride '474' tétraploïdes, observation à J5
Marquage: anticorps anti- α tubuline, révélation par la FITC
Coloration : DAPI (I, L, N)
Barre = 10 μ m

Planche 4 (suite)
La première division embryogène:
Mise en évidence d'une bande préprophasique



2.3.2 Cycle microtubulaire mitotique

La chromatine se condense très nettement au cours de la prophase. Elle présente de nombreux chromocentres très condensés et fluorescents (Pl. 5A). Un nucléole sphérique apparaît en gris parmi les chromocentres. L'observation du réseau microtubulaire, dans un plan optique médian, permet de noter la présence d'un système cytoplasmique périnucléaire, dont les Mts sont particulièrement visibles; ils traversent le cytoplasme et rejoignent le plasmalemme (Pl. 5B).

Planche 5

La première division embryogène: Evolution du réseau microtubulaire au cours de la première mitose

- A,B** Prophase dans une cellule embryogène: le noyau contient de nombreux chromocentres et un nucléole (**A**). Cette cellule possède un réseau dense de Mts périnucléaires en éventail (**B**).
- C,D,E,F** Métaphase: les chromosomes se placent sur un plan situé à l'équateur de la cellule (**C**). Des Mts kinétochoriens s'allongent et pointent vers les pôles de la cellule (**D**). Les chromosomes métaphasiques (**E**) peuvent présenter aussi des Mts du fuseau (**F**).
- G,H** Fin d'anaphase: les chromosomes sont tractés vers les pôles (**G**) par les Mts kinétochoriens, des Mts interzonaux (tête de flèche noire) apparaissent et le fuseau s'allonge (**H**).
- I,J** Télophase: les noyaux fils se reforment (**I**). La plaque cellulaire commence à se former (étoiles). Le phragmoplaste est constitué d'une double rangée de Mts courts. Des Mts périnucléaires peu denses constituent un éventail autour des noyaux fils (flèches blanches) (**J**).

Feuilles de *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J5

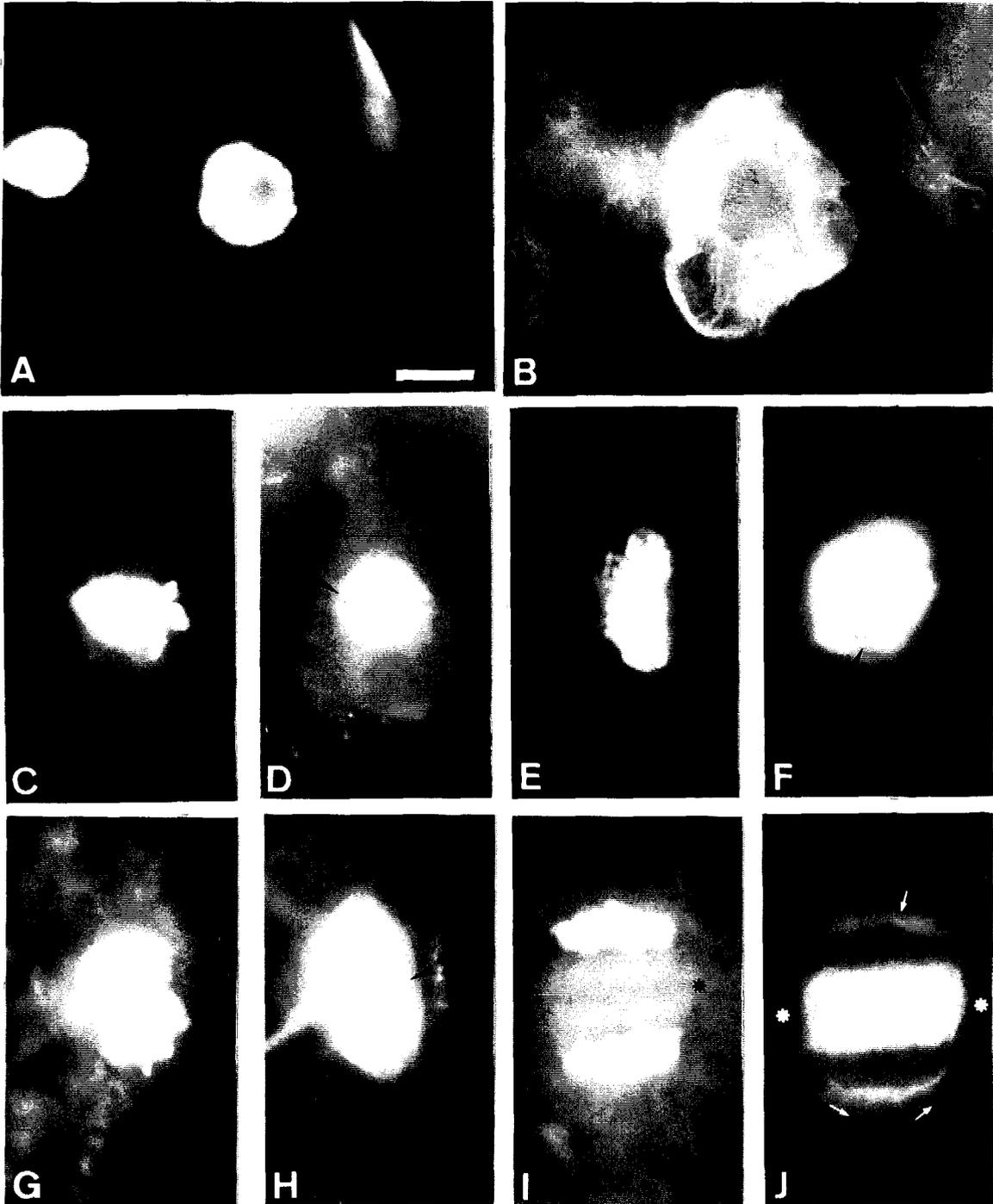
Marquage: anticorps anti- α tubuline, révélation par la FITC

Coloration: DAPI (A, C, E, G, I)

Même échelle pour toutes les figures : barre = 10 μ m.

Planche 5

**La première division embryogène:
Evolution du réseau microtubulaire
au cours de la première mitose**



Lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, les chromosomes se placent sur la plaque équatoriale en métaphase (Pl. 5C). Deux demi-fuseaux de Mts sont apparents, et chaque cône converge vers un pôle cellulaire opposé. Au niveau de l'interzone, se trouvent des Mts kinétochoriens, impliqués dans la migration des chromosomes vers les pôles (Pl. 5D). D'autres cellules en métaphase possèdent leurs chromosomes à l'équateur (Pl. 5E) mais présentent, en plus, un fuseau mitotique (15 μm de distance entre les deux pôles) (Pl. 5F). Cette dernière configuration microtubulaire est constituée de deux lots de Mts kinétochoriens qui ne sont plus sous la forme de cône; il s'agit probablement du stade intermédiaire entre la métaphase et l'anaphase.

L'ascension des deux lots de chromosomes a lieu en anaphase. Les chromosomes migrent vers les pôles, et leurs bras sont bien délimités dans l'interzone (Pl. 5G). Ceux-ci sont entraînés par des Mts kinétochoriens. Le fuseau s'allonge (30 μm de long). Des Mts interzonaux sont visibles au niveau de l'équateur (Pl. 5H).

En télophase, les chromosomes se décondensent et des noyaux fils se reforment (Pl. 5I). Deux types de Mts sont alors présents: les Mts du phragmoplaste et des Mts périnucléaires autour des noyaux fils. Le phragmoplaste est constitué d'une double "palissade" de Mts courts, séparés par la plaque cellulaire en cours de formation (ligne noire) (Pl. 5J). Les Mts périnucléaires, très fins et faiblement fluorescents, se développent dans le cytoplasme à partir de la surface des noyaux fils, et se collent au plasmalemme.

Lors de la cytokinèse, les noyaux, sphériques, présentent une chromatine uniforme. Une multitude de Mts périnucléaires, fortement fluorescents, sont observés et caractérisent le réseau microtubulaire postcytotinétique (ce dernier ressemble au réseau interphasique) (Pl. 4G). Il n'y a pas encore de réseau microtubulaire cortical (Mts parallèles), mais de nombreux Mts issus probablement du phragmoplaste, sont encore détectés entre les deux cellules embryonnaires.

2.4 Essais d'immunomarquage du réseau microtubulaire dans d'autres cellules foliaires

Cette étude s'est effectuée sur des fragments foliaires diploïdes prélevés après 48 h de transfert (J5+2) dans le milieu de culture dépourvu de glycérol. Après

une digestion ménagée des échantillons, une immunolocalisation est réalisée ainsi qu'un marquage des noyaux par le Hoechst.

2.4.1 Mise en évidence du réseau dans les feuilles diploïdes

De nombreux marquages ont été réussis sur des cellules mésophylliennes superficielles après avoir pallié:

- la présence de chlorophylle, par addition d'une étape de contact avec du NaHB₄;
- la localisation intratissulaire des CE, par une digestion enzymatique ménagée.

Ces cellules mésophylliennes montrent un réseau cortical de type hélicoïdal qui appartient généralement à une cellule en fin de différenciation (Pl. 6A et 6B). Elles n'ont donc pas réagi au signal d'induction embryogène. En effet, un réseau en réorganisation voire une BPP sont attendus, car ils caractérisent une cellule qui progresse dans le cycle cellulaire et se prépare à la mitose. Sur ce dernier point, aucune corrélation ne peut se faire quant au plan métaphasique anticline, observé par coloration des noyaux au Hoechst.

2.4.2 Mise en évidence du réseau dans les cellules épidermiques

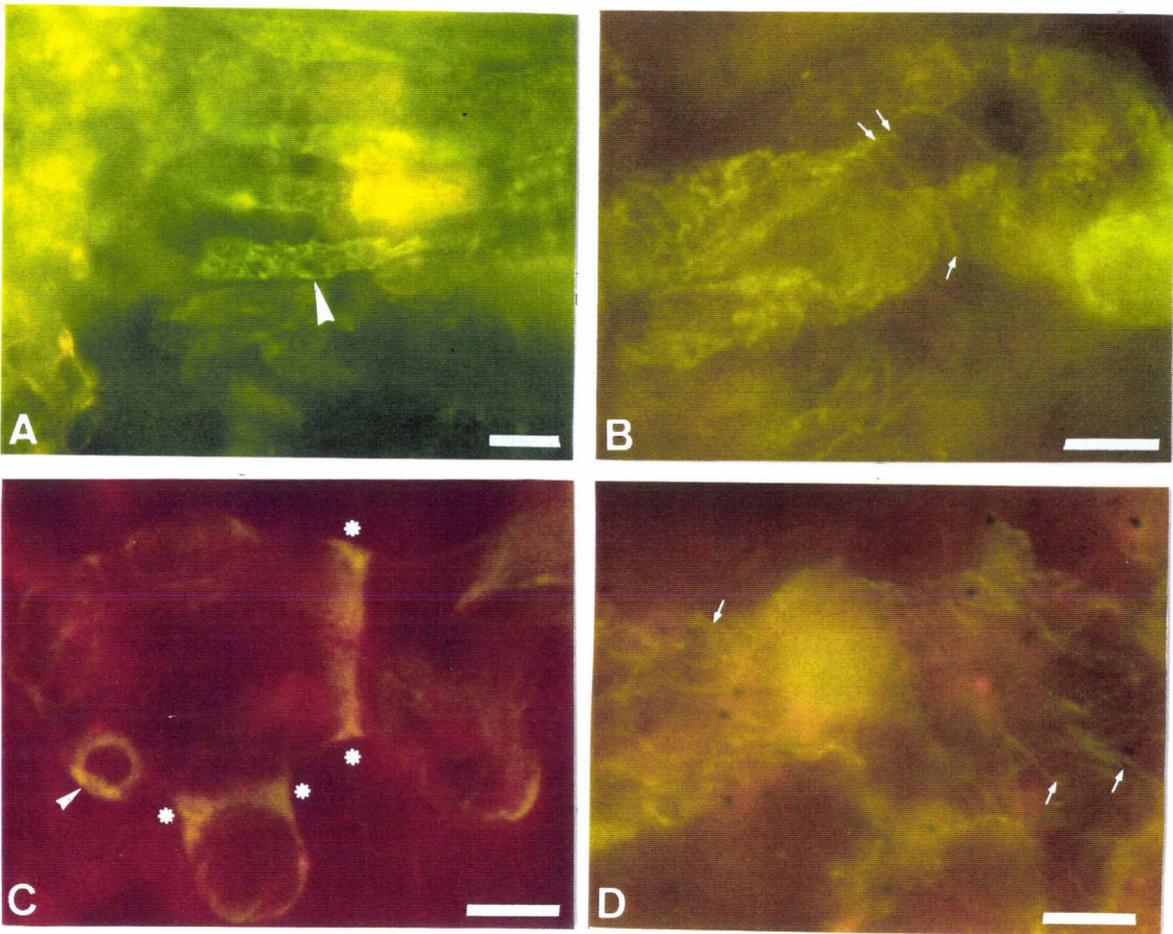
D'autres cellules sont capables de s'engager dans un tel processus, notamment des cellules épidermiques. Aussi avons-nous étudié les cellules de l'épiderme et de la couche sous-épidermique de feuilles induites, auxquelles nous avons appliqué le même protocole d'investigation que dans le paragraphe précédent.

Deux types de réseau ont été marqués :

- des anneaux de tubulines, en vue polaire ou équatoriale sont révélés dans les cellules épidermiques en puzzle. Ils sont caractéristiques de leur morphogenèse, car ces anneaux se rétrécissent et permettent aux bords de la cellule de se rapprocher et de former ainsi une excroissance (Pl. 6C);
- un réseau cortical, désordonné et fragmenté, avec un noyau entouré de Mts périnucléaires, sont révélés dans les cellules sous-épidermiques (Pl. 6D).

Ces réseaux caractérisent l'état différencié de ces cellules et, en aucun cas, ne sont liés à une réorganisation due à l'induction embryogène.

Planche 6 Réseau microtubulaire d'autres structures foliaires



- A Réseau cortical d'une cellule mésophyllienne.
- B Réseau cortical hélicoïdal (flèches) d'une cellule mésophyllienne.
- C Réseau en anneau d'une cellule épidermique dite "en puzzle". Vue polaire (tête flèche blanche) et équatoriale (étoiles).
- D Réseau cortical hélicoïdal (flèches) d'une cellule épidermique.

Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J5+3
Marquage : anticorps anti- α tubuline , révélation par la FITC
Barre = 10 μ m, sauf A, barre = 20 μ m.

2.5 Conclusions

Dans les tissus foliaires diploïdes, la réactivation nucléaire a pu être décrite ainsi que le cycle nucléaire mitotique, par un marquage nucléaire au moyen d'un fluorochrome, le Hoechst ou le DAPI. Ces observations nous ont permis de conclure que la première division embryogène est symétrique et son plan anticline par rapport aux faisceaux conducteurs.

Différentes techniques d'immunomarquage ont été testées et mises au point sur des matériels foliaires diploïdes. Le principal problème a consisté dans la mise en évidence du réseau des CE localisées en profondeur dans le tissu foliaire, sans pour autant altérer le tissu lui-même. L'utilisation de feuilles d'un clone tétraploïde de l'hybride '474' semble être plus adaptée à l'immunomarquage du réseau microtubulaire des CE, à condition d'effectuer une digestion poussée et d'étaler les cellules ("frottis"). Elle a révélé la présence d'une BPP au cours de la première division embryogène dont la position équatoriale implique une future division symétrique.

3. LES MITOSES EMBRYONNAIRES

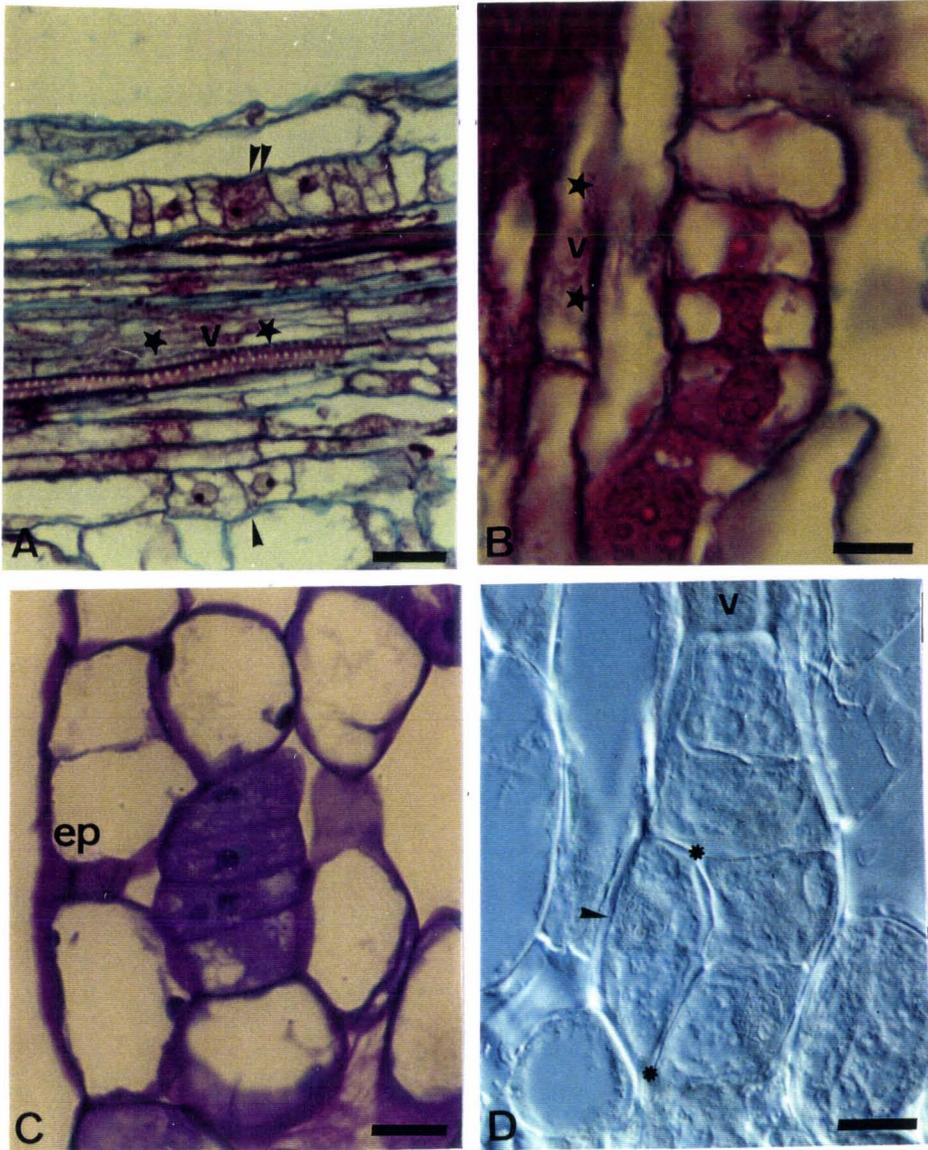
3.1 Description des divisions embryonnaires

Les proembryons ont aussi été recherchés le long des nervures, sur différents types de coupes ainsi que dans les tissus.

Après la première division de la CE, le proembryon comprend deux cellules semblables (Pl. 7A). Les 2^{ème} et 3^{ème} divisions lui permettent de s'allonger et de former une file de cellules embryonnaires parallèle à l'axe du faisceau vasculaire (Pl. 7A et 7B). Cet allongement embryonnaire, par une suite de division anticlines, est aussi décelé près de l'épiderme alors qu'il n'y a pas de faisceau vasculaire à proximité (Pl. 7C). Lorsque l'embryon atteint au moins 4 cellules, une des cellules de l'extrémité, se divise de façon péricline permettant ainsi à l'embryon de croître en épaisseur (Pl. 7D). Une certaine polarité apparaît donc ici.

Planche 7

Mode de division des embryons somatiques



- A** Embryon bicellulaire (tête de flèche unique) et linéaire (double flèche) près d'un faisceau vasculaire (v).
- B** Embryon linéaire longeant le faisceau vasculaire (v).
- C** Embryon linéaire situé sous l'épiderme (ep).
- D** Embryon présentant une division anticlinale (étoiles) par rapport à l'emplacement d'un faisceau vasculaire (v).

Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J5+4

Coupes longitudinales (A, B, D) et transversales (C)

Coupes en paraffine colorées par la safranine / fast green (A,B), et semi-fines colorées par le bleu de toluidine (C) ou observée en contraste interférentiel de Nomarski (D)

Barre = 20 μm , sauf A, barre = 50 μm .

Les modalités de division de la CE puis du proembryon semblent répondre à un ordre. Après une phase d'allongement correspondant à un minimum de deux cycles mitotiques, une des cellules de l'extrémité se divise de façon péricline débutant ainsi une phase d'épaississement embryonnaire.

3.2 Description du cycle cytosquelettique

L'embryon bicellulaire possède un réseau microtubulaire de type post-cytocinétique (Pl. 4G). Il semble que les divisions soient très rapides car aucun autre type de réseau (parallèle cortical) n'a pu être observé dans les embryons constitués d'une file de 4 cellules (Pl. 8A et 8B). Le rythme des divisions embryonnaires est très rapide, et les phases G₁-G₂ doivent être écourtées.

Les cellules embryonnaires présentent généralement des noyaux en fin d'interphase. Ils sont situés au centre de la cellule et présentent un gros nucléole (Pl. 8A). Le réseau microtubulaire est identique dans chacune des 4 cellules embryonnaires. Des Mts issus du phragmoplaste sont fortement marqués et permettent ainsi de délimiter les cellules. Un réseau cytoplasmique de Mts périnucléaires est aussi présent; il est encore peu dense (Pl. 8B).

Planche 8
Réseau microtubulaire des embryons somatiques

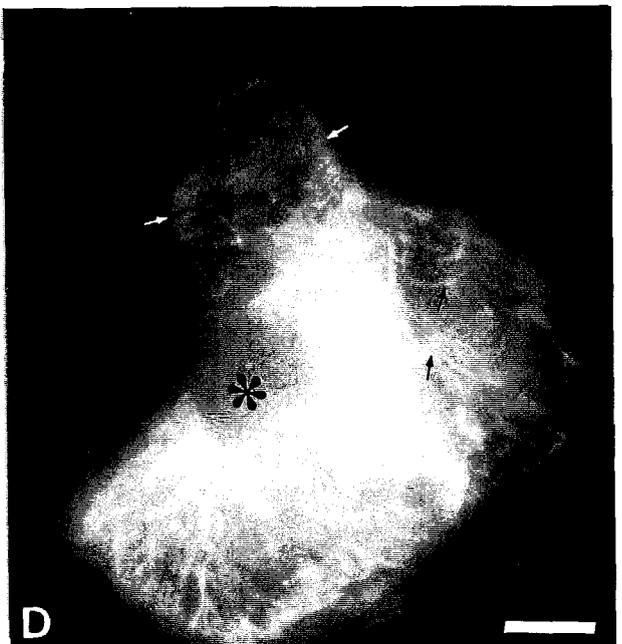
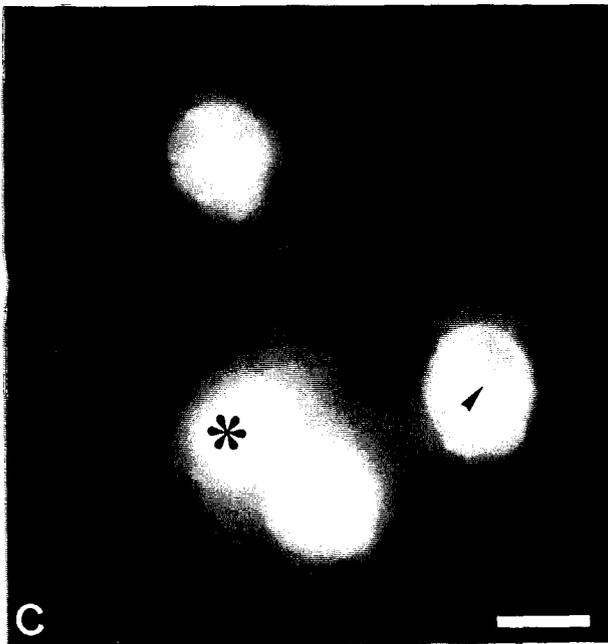
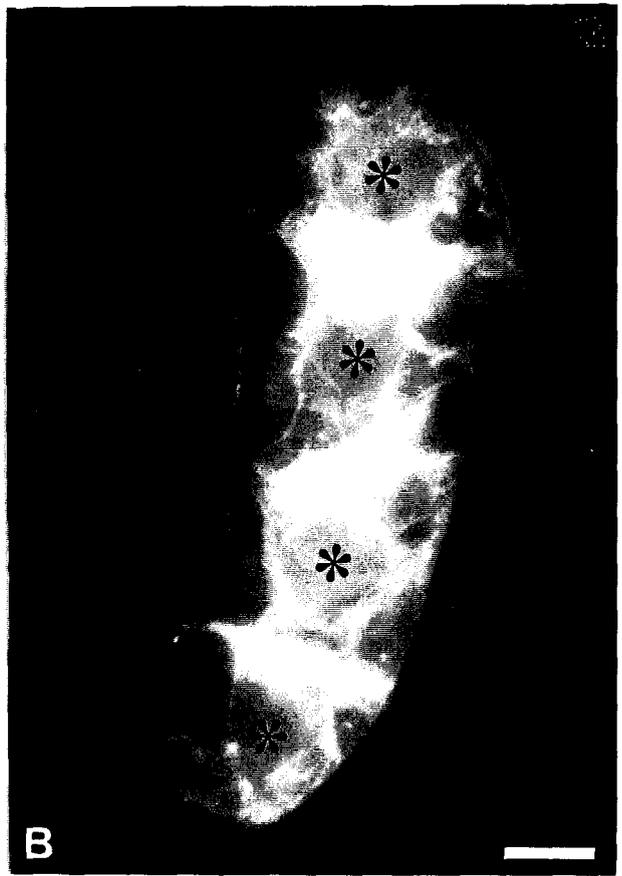


Planche 8

Réseau microtubulaire des embryons somatiques

- A,B** Embryon linéaire muni de 4 noyaux centraux; le nucléole est volumineux (tête de flèche noire). Les parois sont localisées par les têtes de flèche blanche (**A**). Réseau microtubulaire périnucléaire composé de Mts rayonnant autour des noyaux (étoiles) (**B**).
- C,D** Jeune embryon présentant des noyaux muni d'un gros nucléole (tête de flèche noire) (**C**). Réseau microtubulaire cortical parallèle (flèche blanche) ou interconnecté (flèche noire) (**D**).

Feuille du *Cichorium* hybride '474' tétraploïde, observation à J4 (pas de synchronisation)
Marquage: anticorps anti- α tubuline, révélation par la FITC
Coloration: Hoechst.

D'autres proembryons ne présentent pas cette forme longitudinale. Un amas sphérique de quelques cellules (3-4) est accolé à une cellule plus allongée (Pl. 8C). Des Mts corticaux interconnectés sont détectés dans les cellules de l'amas, alors que des Mts corticaux parallèles sont présents dans la cellule allongée (Pl. 8D). Cette dernière possède donc un réseau microtubulaire caractéristique d'une cellule en cours d'élongation. Peut-être s'agit-il ici d'une forme de proembryon muni d'un pseudo-suspenseur (ce qui est rarement observé chez l'hybride '474'), ou d'une cellule mésophyllienne qui a été isolée en même tant que l'eS et qui lui est resté accolée.

Des mitoses ont été observées dans la zone corticale de certains proembryons (Pl. 8E). Les configurations microtubulaires correspondent à celles décrites pour la première division, notamment en fin de télophase (Pl. 8F). Le phragmoplaste s'interrompt au niveau où la plaque cellulaire fusionne avec la paroi parentale (croissance centrifuge de la plaque cellulaire). Le proembryon possède un réseau cortical désordonné de fins Mts peu denses et particulièrement interconnectés entre eux. Les cellules embryonnaires sont séparées par une zone microtubulaire très fine et fluorescente. Des PBBs sont décelées dans les proembryons constitués de plus de 10 cellules (les stades intermédiaires n'ont pas été observés). Les divisions semblent le plus souvent localisées dans la zone corticale du proembryon (Pl. 8G et 8H).

Planche 8 (suite)
Réseau microtubulaire des embryons somatiques

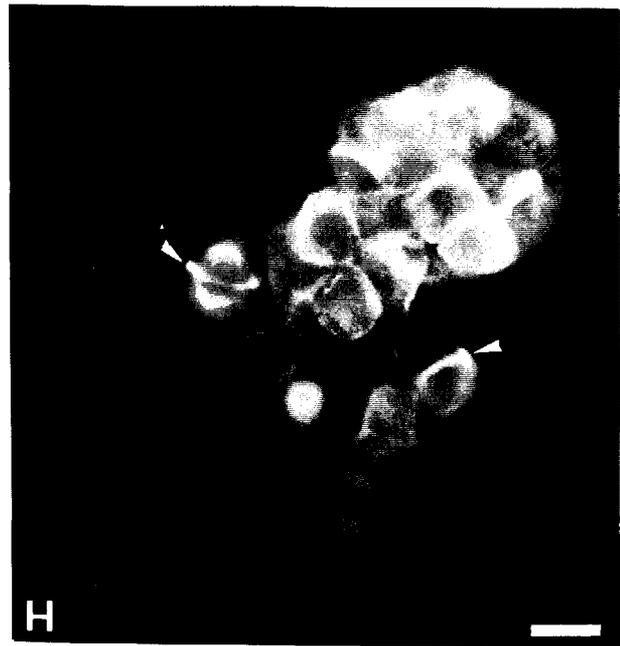
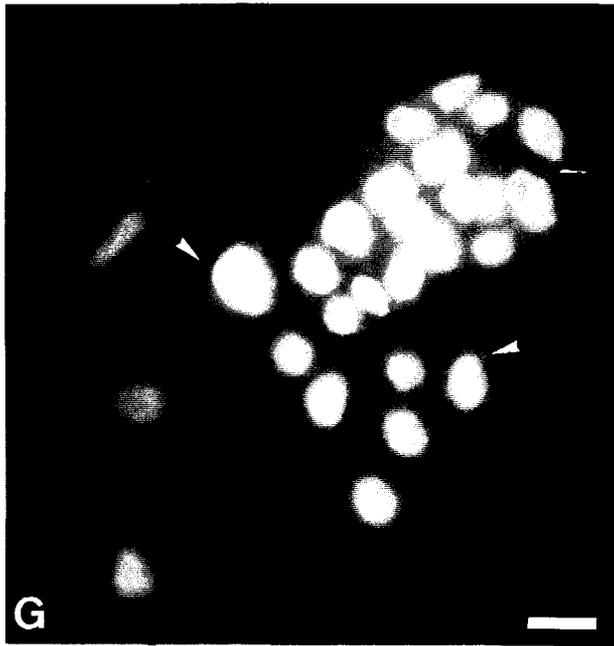
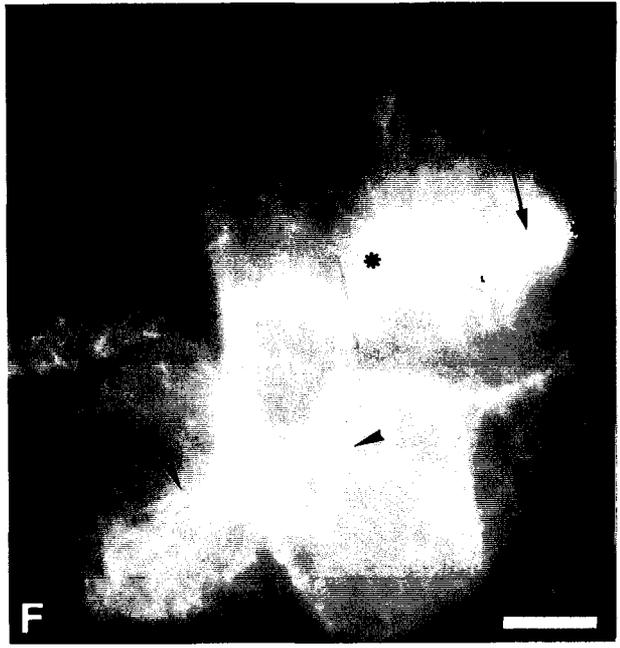
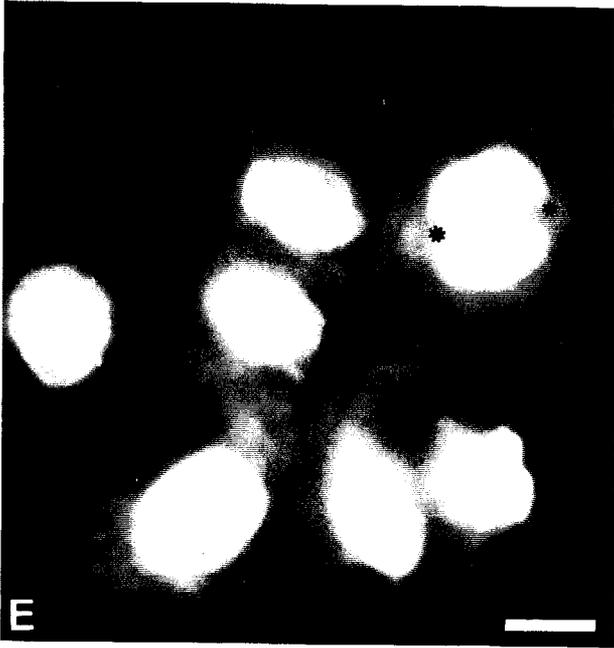


Planche 8 (suite)
Réseau microtubulaire des embryons somatiques

- E,F** Proembryon présentant une fin de télophase avec une plaque cellulaire en formation (étoile) (**E**). Réseau microtubulaire cortical interconnecté (tête de flèche noire), le phragmoplaste s'étend (étoile) et fusionne avec la paroi parentale où il disparaît (flèche noire) (**F**).
- G,H** Embryon composé d'une multitude de petites cellules dont certaines sont en préprophase (tête de flèche) (**G**). Bandes préprophasiques (tête de flèche) de ces cellules (**H**).

Feuille du *Cichorium* hybride '474' tétraploïde, observation à J4 (pas de synchronisation)
Marquage: anticorps anti- α tubuline, révélation par la FITC
Coloration: Hoechst.

4. VARIATIONS ELECTROPHORETIQUES DE L'ACTINE ET DES TUBULINES

Les variations quantitatives des isoformes α et β tubulines, et de l'actine, ont été étudiées après séparation en électrophorèse SDS-PAGE monodimensionnelle et analyse des immuno-empreintes sur membranes. Les extraits protéiques sont obtenus à partir d'une culture des feuilles diploïdes cultivées dans le milieu d'induction (Annexe 3) puis transférées dans le même milieu dépourvu de glycérol.

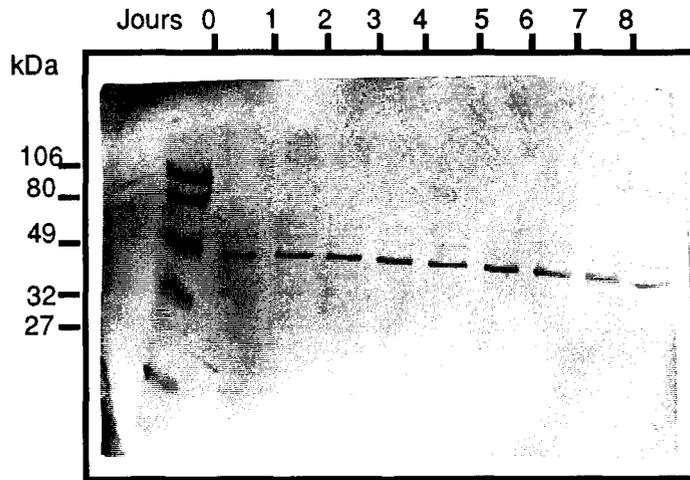
4.1 Variations quantitatives de l'actine

Les anticorps anti-actine IgM de souris (Amersham, N350) ont été utilisés. L'anticorps secondaire couplé à une phosphatase alcaline a été fourni par Jackson Immunoresearch Labs. (USA).

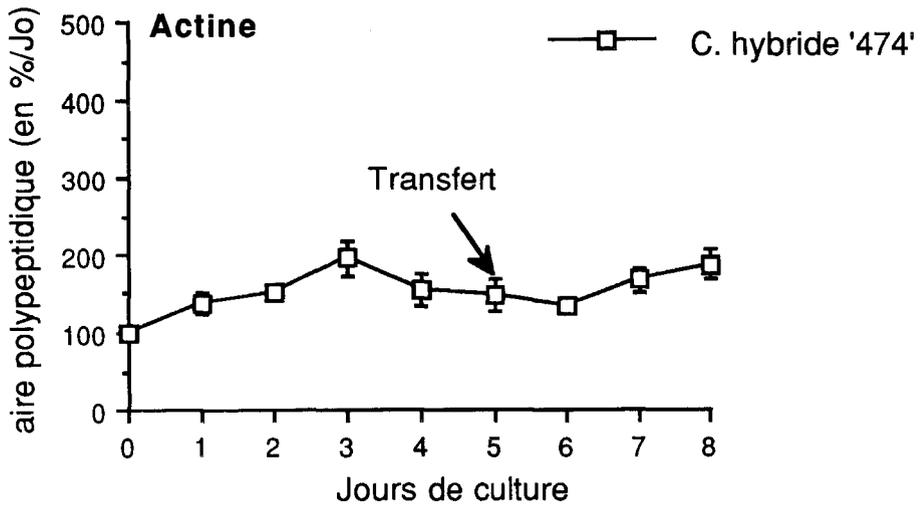
Une bande fine a été révélée au cours de la cinétique de culture. Elle se situe aux environs de 43-45 kDa (selon les répétitions) (Fig. 14A). Pendant la phase d'induction, le taux de l'actine augmente régulièrement jusqu'à J3, où il est deux fois plus important qu'au début de la culture. Il diminue légèrement jusqu'à J6, soit un jour après le transfert des explants, où il revient sensiblement au niveau de J0. On constate une nouvelle augmentation entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour de la culture (Fig. 14B). Quelques bandes aspécifiques apparaissent tardivement au cours de la révélation (même pendant le rinçage de la membrane dans l'eau), après l'apparition de la protéine recherchée.

Figure 14: Immunolocalisation de l'actine au cours d'une culture de feuilles du *Cichorium* hybride '474'. Aire moyenne \pm écart type (3 répétitions). **A:** Révélation de l'actine sur une membrane de nitrocellulose (gel de polyacrylamide à 12,5%). **B:** Evolution quantitative de l'actine.

A: Révélation de l'actine



B: Evolution quantitative



4.2 Variations quantitatives des tubulines

Dans un premier temps, nous avons utilisé des anticorps polyclonaux de lapin (Sigma). De nombreuses bandes aspécifiques ont été révélées (Pl. 9A). Des anticorps monoclonaux ont donc été employés par la suite, conformément à la littérature, avec une préférence pour ceux provenant d'Amersham (N356, N357) plutôt que pour ceux issus de chez Sigma (T9026, T4026). Ces derniers anticorps induisent la révélation de quelques bandes aspécifiques qui sont facilement identifiables. L'emploi d'une solution d'anticorps anti-tubuline congelée pour les répétitions, c'est à dire déjà utilisée une première fois, induit aussi ce genre de problèmes. Aucun marquage n'a été obtenu avec le serum pré-immun de souris.

Plusieurs types d'immunolocalisation ont été réalisés :

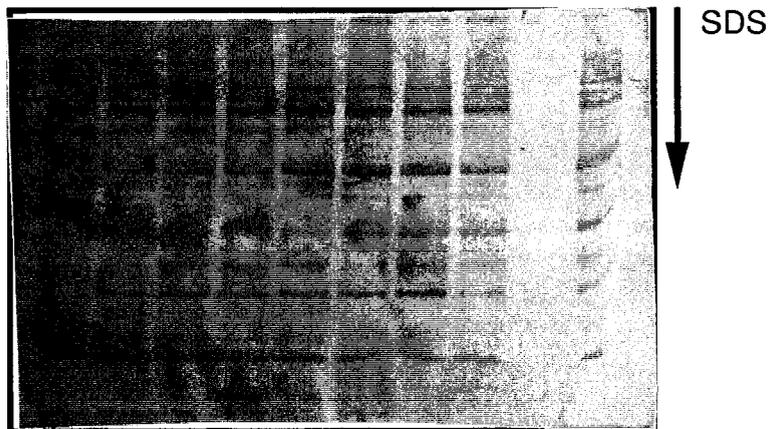
- mono-marquage α tubuline ou β tubuline
- double marquage α tubuline + β tubuline (Pl. 9B)
- cinétique de culture (Pl. 9B et 9C).

Les variations des taux de tubulines au cours de la culture ont été quantifiées en fonction des paramètres de densité (niveau de gris de la membrane digitalisée) et d'aire (surface de la bande). Les données (exprimées en pixels) ont été traitées par un logiciel grapheur (Crickett graph) en vue d'obtenir une courbe.

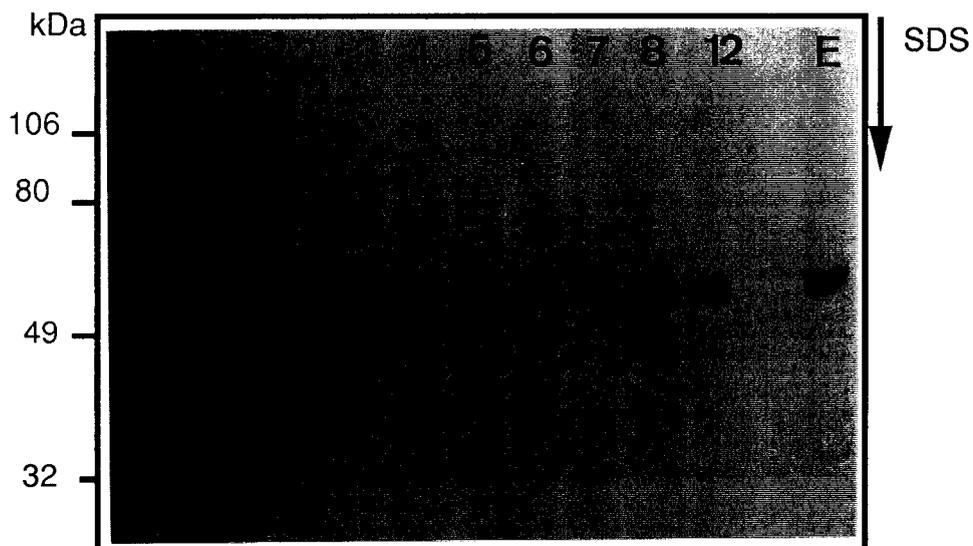
D'autres types de chicorées ont été testées. Il s'agit de *C. intybus* cv. '206' et *C. intybus* cv. 'Flash'; toutes deux sont non-embryogènes. Les tubulines ont été mises en évidence comme pour l'hybride '474'. Un comparatif des tubulines (à J₀, J₅ et J₈) des trois sources de matériel est montré dans la Pl. 9C.

Compte-tenu du fait qu'une quantité **identique** de protéines a été chargée dans chacun des puits du gel de concentration, on observe que la part des tubulines des extraits de l'hybride '474' est plus grande dès J₅. La différence est visuellement plus marquée en comparant les tubulines à J₈ pour chaque source végétale.

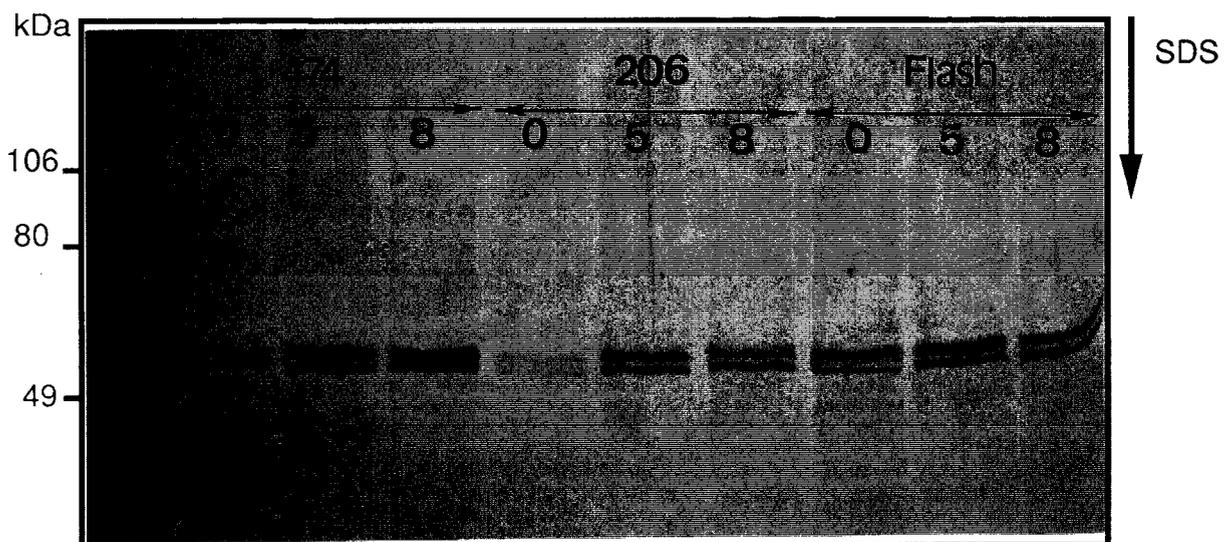
Planche 9
Immunodétection des tubulines,
Evolution quantitative au cours de la culture de feuilles



A: Révélation par des anticorps polyclonaux, Gel 12,5%.



B: Double révélation alpha+béta tubuline au cours d'une culture (Jours J0 à J8, puis J12). Gel à 10 %. E= embryon agé de trois semaines.



C: Double révélation alpha + bêta tubuline. Gel à 10 %. Extraits protéiques issus des prélèvements effectués à J0, J5 et J8 de feuilles de l'hybride "474", du clone "206" et de la variété Flash.

Les analyses suivantes ont été effectuées à partir d'un minimum de trois répétitions par conditions. Une même quantité de protéines a été déposée dans les puits du gel. Les données obtenues après digitalisation des membranes de nitrocellulose ont permis d'établir des courbes de variations des tubulines au cours d'une culture de feuilles de *Cichorium* (Fig. 15):

4.2.1 Variations de l' α tubuline (Fig. 15A)

+ hybride '474'

La quantité de tubuline augmente régulièrement de J₀ à J₂ puis amorce une chute à J₃. Le même phénomène est observé entre J₃ et J₅. Le transfert des explants foliaires dans le milieu dépourvu de glycérol provoque une élévation significative de la quantité de tubuline entre J₅ et J₇. Une diminution est constatée entre J₇ et J₈.

+ *C. intybus* cv. '206' et cv. 'Flash'

De très faibles variations sont décelées au cours de la phase d'induction. L'évolution est semblable à celle de l'hybride '474' mais l'amplitude est plus faible. Le transfert des explants n'induit pas d'augmentation de la quantité d' α tubuline.

4.2.2 Variations de la β tubuline (Fig. 15B)

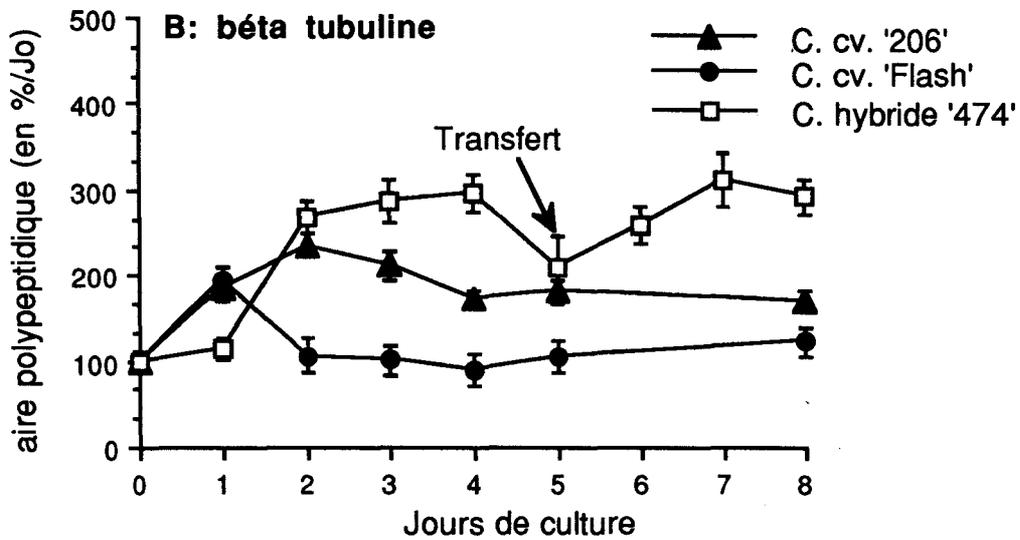
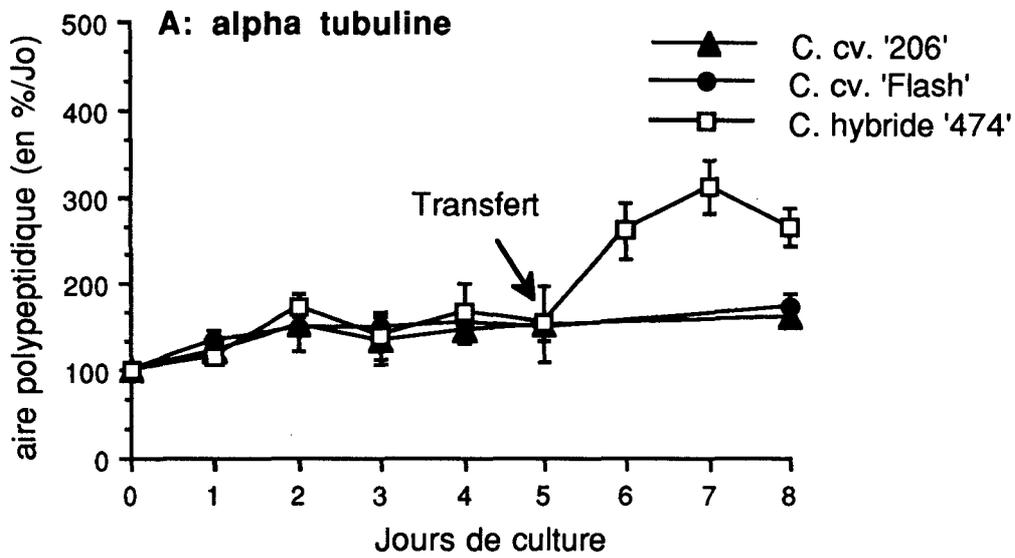
+ hybride '474'

Après une phase de latence (J₀-J₁), le taux augmente fortement jusque J₂ puis faiblement jusque J₄. Au 4^{ème} jour, la quantité de la β tubuline est 1,8 fois plus élevée que celui de l' α tubuline. Une chute est observée entre J₄ et J₅. Le transfert des explants produit une augmentation de la quantité du même ordre que pour l'autre isoforme. De même, une légère diminution est décelée entre J₇ et J₈.

+ *C. intybus* cv. '206' et cv. 'Flash'

Une augmentation de la quantité est observée entre J₀ et J₁. La quantité de tubuline du cv. '206' poursuit son ascension jusque J₂, puis amorce une chute. Une phase stationnaire est observée dès J₄. Par contre, une diminution de cette quantité de β tubuline est constatée dès J₂ pour le cv. 'Flash'.

Figure 15: Evolution quantitative des isoformes de tubulines au cours d'une culture de feuilles du *Cichorium intybus* cv. '206' (▲), *C. intybus* cv 'Flash' (●) et du *C. hybride* '474' (□). A: α tubuline, B: β tubuline. Valeur moyenne ± écart type (5 répétitions).



4.2.3 Conclusions

La phase d'induction des feuilles du *Cichorium* hybride '474' est caractérisée par une variation non linéaire de la quantité d'actine, marquée par un doublement jusqu'au 3^{ème} jour, puis par une diminution. Pendant cette phase, l' α tubuline subit de faibles variations (d'une amplitude semblable à celle des deux autres chicorées non embryogènes). Le taux de la β tubuline, par contre, augmente très fortement entre J₁ et J₂ puis plus faiblement jusque J₄. Ces modifications pourraient être en relation avec l'activation des cellules cibles du mésophylle à la suite de stress: coupure des feuilles, mise en culture, milieu liquide, température de 35 °C. Elles pourraient correspondre au déplacement du noyau par les trabécules issues du cytoplasme pariétal (formation du phragmosome) et à la préparation de la première mitose des CE (formation de la bande préprophasique).

L'augmentation des quantités d'actine (J₆-J₈) et des tubulines (J₅-J₇) correspondrait à la première division des CE qui est synchrone (il n'y a pas d'autres cellules en division à cette période).

Les diminutions des taux dès J₃ pour l'actine et J₄ pour les tubulines, ainsi qu'entre J₅-J₆ pour l'actine et J₇-J₈ pour les tubulines, pourraient refléter le moment où les cellules de l'hybride '474' sont en phase G₂.

4.3 Essai de quantification du taux de la β tubuline en chemiluminescence

Dans le but d'optimiser la technique et de vérifier les variations des tubulines observées auparavant, un autre type de révélation a été testé: il s'agit d'une révélation par chemiluminescence du substrat AMPPD, réagissant avec la phosphatase alcaline. Les rayons émis sont captés par un film photo qui sert de support pour l'analyse. Deux types de membranes sont testées: nitrocellulose ou PVDF.

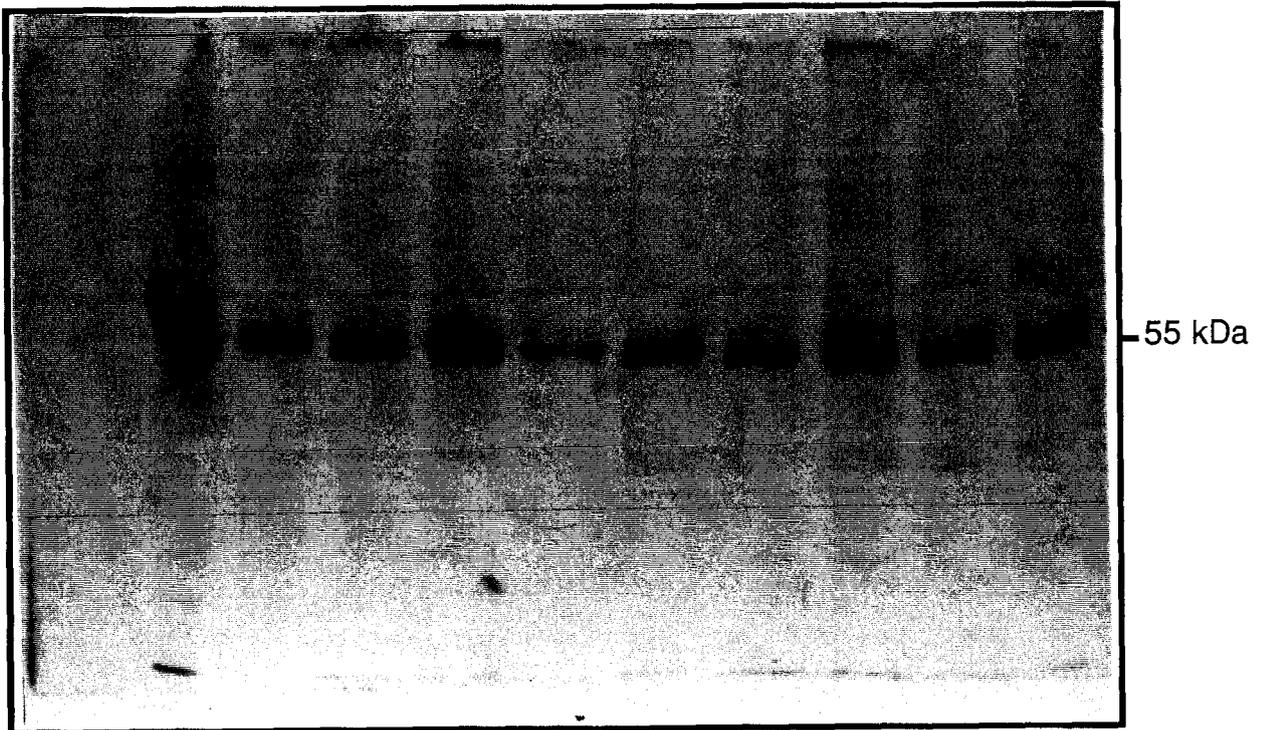
Il s'est avéré que l'autoradiographie des membranes de nitrocellulose est plus facilement lisible que celle des membranes de PVDF (Fig. 16A). Les répétitions effectuées sur notre matériel ont montré cependant que cette technique induit plus de variabilité entre les essais que la technique initiale (révélation NBT + BCIP). L'interprétation des variations détectées doit donc s'effectuer avec prudence quelles que soient les techniques employées.

Figure 16: Révélation de la β tubuline immunolocalisée par chemiluminescence. **A:** Autoradiographie d'une membrane de nitrocellulose (révélation par l'AMPPD). **B:** Evolution quantitative de la β tubuline au cours de la culture des feuilles du *Cichorium* hybride '474'. Valeur moyenne \pm écart type (3 répétitions).

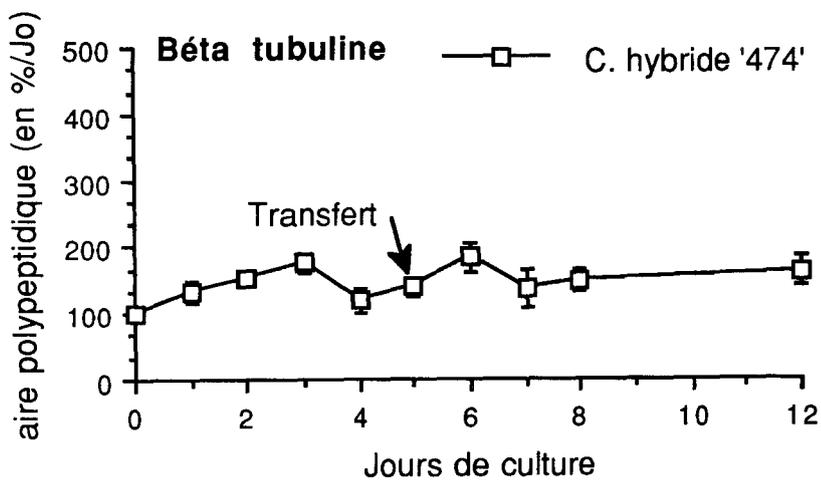
A :

Jours de culture

Jo J1 J2 J3 J4 J5 J6 J7 J8 J12



B :



Les variations des taux de β tubuline sont représentées dans la Fig. 16B. Le taux augmente jusque J₃ puis chute jusque J₄. Un second pic est observé à J₇. La phase d'induction est donc caractérisée par une augmentation de synthèse des β tubulines pendant les trois premiers jours de culture. Une chute est détectée à J₄ juste avant le transfert des explants. Les premières mitoses sont concomitantes avec une reprise de la synthèse des tubulines. De telles fluctuations sont semblables à celles décelées avec la révélation NBT + BCIP. Toutefois, l'amplitude est plus faible même si la périodicité des variations est identique. On peut noter que la valeur du taux à J₈ est plus ou moins identique à celle de J₁₂.

4.4 Essai de séparation des isotypes de tubulines

De nombreux auteurs ont analysé les différents isotypes d' α tubuline et de β tubuline, impliqués dans un phénomène de croissance ou lors d'une adaptation physiologique. Leur étude s'est effectuée à partir d'analyse de protéines. Dans de nombreux cas, des variations d'expression des isotypes ont été détectées, mais il existe des exceptions où des plantes possèdent des caractéristiques différentes (cas d'une résistance aux herbicides par exemple), mais n'expriment aucune modification isotypique. Une investigation s'est engagée sur cet axe, et différents problèmes ont été rencontrés au niveau :

- du seuil de résolution et de l'optimisation de la révélation des spots protéiques, en coloration argentique;
- de l'optimisation du transfert des protéines après iso-électrofocalisation;
- de l'adaptation des temps de révélation des anticorps;
- du type d'organe utilisé.

4.4.1 Amélioration de la technique d'iso-électro focalisation

Avant de tenter de révéler les isotypes, il a fallu tester la validité de la technique d'IEF en colorant les protéines des gels 2D. Dans un premier temps, la technique d'IEF, c'est-à-dire une migration de la cathode vers l'anode, a permis une séparation des sous-unités protéiques masquées par des traces noires (avec ou sans β mercapto-éthanol lors de l'extraction) (Fig. 17A). Une autre technique d'IEF, dite non équilibrée, et l'application d'un voltage total d'au moins 1800 volts (par augmentation lente du voltage) ont considérablement amélioré la précision, la

résolution et la qualité générale des gels. Les traces noires ont été éliminées (Fig. 17B).

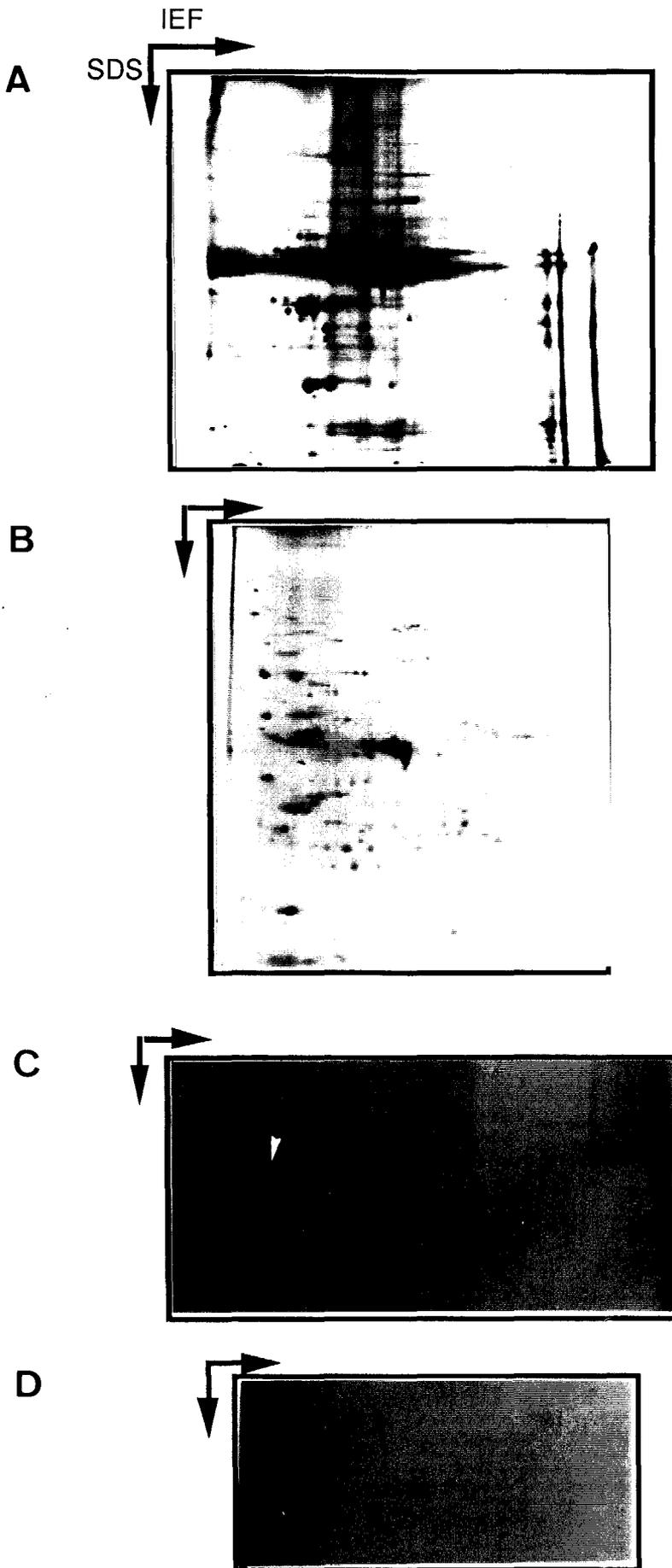
4.4.2 Optimisation de l'électrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Etant donné le nombre élevé de protéines, révélées en coloration argentique, il a été nécessaire d'augmenter de plusieurs heures l'électrotransfert. Le dégagement de chaleur par effet Joule, à 100 V même à 4°C, nous a conduit à réduire le voltage-heure et utiliser du tampon refroidi. Différents temps de transfert et de voltage totaux ont été testés. Il en résulte qu'un maximum de 70 V.h⁻¹ est toléré. Le tampon a été changé toutes les 45 à 60 min. Le temps de transfert a été fixé à 5 h à 70 V.h⁻¹ ou 12 h à 30 V.h⁻¹. Un voltage total de 350 V semble être suffisant. La qualité de l'électrotransfert a été déterminée en colorant les gels de polyacrylamide par le nitrate d'argent. Seules quelques protéines de haut PM, ou fortement concentrées, sont encore présentes.

4.4.3 Détermination des quantités de protéines à déposer et de la gamme d'ampholines

Après une amélioration très nette de la qualité de séparation, il a fallu déterminer la quantité minimale de protéines à déposer dans les capillaires en vue de l'électrotransfert. En effet, il est nécessaire de dépasser le seuil de sensibilité des anticorps; celui-ci est déterminé par la quantité de protéines que contient chaque spot. Après électrotransfert, les membranes ont été colorées par le bleu de Coomassie et le seuil de détection de ce colorant a été considéré comme celui des anticorps (selon les recommandations du Pr J. SHAW, John Innes Inst., Norwich). Il a été nécessaire d'augmenter de 7 à 10 fois, la quantité de protéines déposées dans le cas d'une électrophorèse monodimensionnelle, pour avoir une réponse correcte (soit 35 à 50 µg / capillaire). Par ailleurs, les données bibliographiques ont permis de cerner avec plus de précision la gamme d'ampholytes à privilégier lors de la confection des gels contenus dans les capillaires. La gamme comprise entre les pH 5 - 6,5 a été choisie. De ce fait, un mélange de 80 % d'ampholytes pH 5-7, et de 20 % d'ampholytes pH 3-10, a été utilisé.

Figure 17: Immunolocalisation des isotypes de tubulines et gels 2D. **A, B**: Gel 2D coloré par le nitrate d'argent à J₁, **A**: IEF équilibrée, **B**: IEF non équilibrée. **C, D**: immunolocalisation des isotypes de tubulines sur des membranes de nitrocellulose à J₈, **C**: zone des β tubulines, **D**: zone des α tubulines dans un extrait racinaire.



4.4.4 Détermination de la concentration des anticorps et du temps de révélation

Après plusieurs essais, aucune amélioration, concernant la révélation et la netteté des spots, n'a été obtenue en augmentant la concentration d'anticorps monoclonaux. Les doses employées en électrophorèse 1D ont donc été conservées. Par contre, la durée de contact semble être déterminante. Un résultat optimum est obtenu pour un temps de contact trois fois plus important (soit 6 h) ou une nuit à 4°C pour l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est mis en contact pendant 4 h.

4.4.5 Variations des réponses en fonction des organes

Un extrait de racines induites a alors été testé. Effectivement, la RUBISCO est éliminée. Deux zones sont révélées après l'application d'anticorps anti- α tubuline. Mais l'induction embryogène racinaire ne procède peut-être pas de la même façon que l'induction embryogène foliaire d'autant :

- que ce ne sont pas les mêmes organes,
- qu'il n'y a pas de synchronisation possible des premières divisions dans les racines.

Dans le cadre des extraits foliaires, de nombreux spots, isolés et dispersés sur les lignes de PM = 53-55 kDa ont été révélés (Fig. 17C). Toutefois, aucune certitude quant à leur spécificité n'a été donnée même s'ils sont présents dans chaque répétition. Par conséquent, nous ne pouvons pas utiliser cette méthode pour une analyse qualitative des tubulines au cours des cultures de feuilles lors du processus d'ES. De nombreux paramètres tels que les sources d'anticorps, la nature des membranes ont été testés sans apporter d'amélioration.

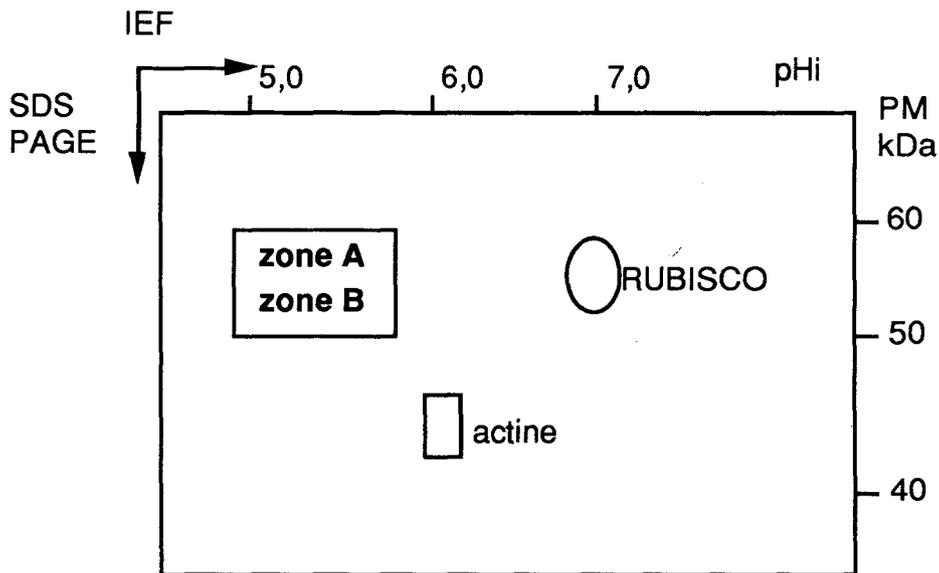
4.4.6 Comparaison des gels révélés par coloration argentique

L'intérêt d'une immunolocalisation des isotypes de tubulines réside dans la spécificité des protéines révélées. Cette technique permet de sélectionner les protéines recherchées parmi la multitude de spots protéiques révélés en coloration argentique. Ces essais restant infructueux, nous nous sommes orientés vers l'analyse des gels 2D colorés par le nitrate d'argent; en effet, les isotypes de tubulines y sont présents (Pl. 10). Après avoir employé des protéines témoins

(marqueurs) dont le PM et le pHi sont connus, des repères (PM-pHi) ont pu être déterminés quant la migration des protéines dans le gel de polyacrylamide.

Le secteur considéré comme la zone putative des isotypes de tubulines est caractérisé par les coordonnées suivantes: PM = 53-55 kDa, pHi = 5,8-6,0. Il est scindé en deux lots de protéines dénommés partie A : PM = 55 kDa et partie B : PM = 53 kDa. Cette zone a été localisée en fonction de la position de marqueurs d'IEF, dont les PM et pHi, sont connus. Ce secteur est représenté schématiquement dans la Fig. 18 La zone putative de l'actine est aussi représentée.

Figure 18: Représentation schématique d'un gel 2D et de la zone putative des isotypes des tubulines. Gel 2D (10 % d'acrylamide) obtenu après une IEF non équilibrée. Les coordonnées (pHi-PM) ont été localisées par des marqueurs connus. La position de la Ribulose bis carboxylase (RUBISCO) est signalée ainsi que celle de l'actine. La zone A correspond aux isotypes de la β tubuline (PM 55 kDa) et la zone B à ceux de l' α tubuline (PM 53 kDa).



L'analyse des gels (Planche 10 A-F) et de leur représentation (Planche 10 A'-F') montre que la protéine 7B apparaît dès J₁ et sa quantité présente des variations. Un polypeptide est visible à J₂ (1A) et fluctue très faiblement. Le troisième jour de culture semble être celui où la plupart (84 %) des protéines considérées deviennent fortement colorées, c'est-à-dire présentes en grande quantité; l'augmentation des taux dans la suite de la culture concerne 56 % d'entre elles. Dans les autres cas, un maintien des taux est observé, même après transfert des explants. L'analyse des protéines de la zone A (Tableau 5) montre qu'une protéine (3A) varie fortement; son taux augmente à J₃, diminue à J₄ pour croître

après le transfert dès J₈. Une protéine (7B) pourrait être liée au stress de la mise en culture, car elle apparaît à J₂, pour chuter progressivement par la suite. Une protéine (1A) est présente en faible quantité en période d'induction, elle disparaît ensuite.

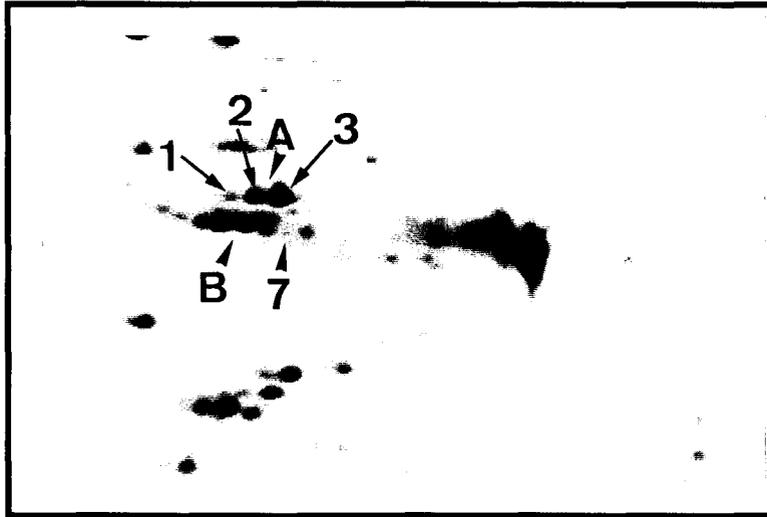
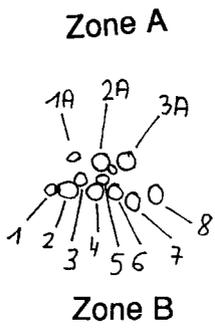
ZONES POLYPEPTIDIQUE	CARACTERISTIQUES	Nb de polypeptides	N° POLYPEPTIDES
ZONE A	très variable et faible taux	1	1A
	chute des taux à J2	2	2A et 3A
	augmentation à J3 puis maintien dès J4	2	2A et 3A
ZONE B	apparition à J1 puis disparition progressive	1	7B
	chute des taux à J2	7	1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 8B
	augmentation à J3 puis maintien dès J4	5	2B, 4B, 5B, 6B, 8B
	très variable, taux élevé	1	3B

Tableau 5: Evolution des polypeptides de la zone putative des tubulines au cours d'une culture de feuille (milieu décrit dans l'Annexe 3)

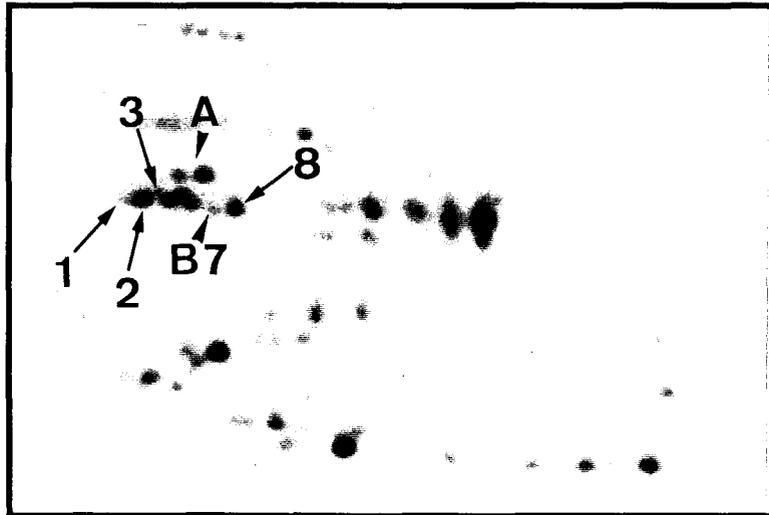
La chute des quantités notée à J₂ pourrait être liée au stress causé par la mise en culture, à l'adaptation et/ou à l'induction de certaines des cellules du tissu foliaire au milieu (ce qui nécessiterait la mise en place d'une réactivation des séquences géniques impliquées dans l'ES). Le transfert des explants, et le déclenchement des mitoses, favorisent la synthèse de la plupart des protéines dont la coloration par le nitrate d'argent, et la superficie du spot, augmentent.

Planche 10

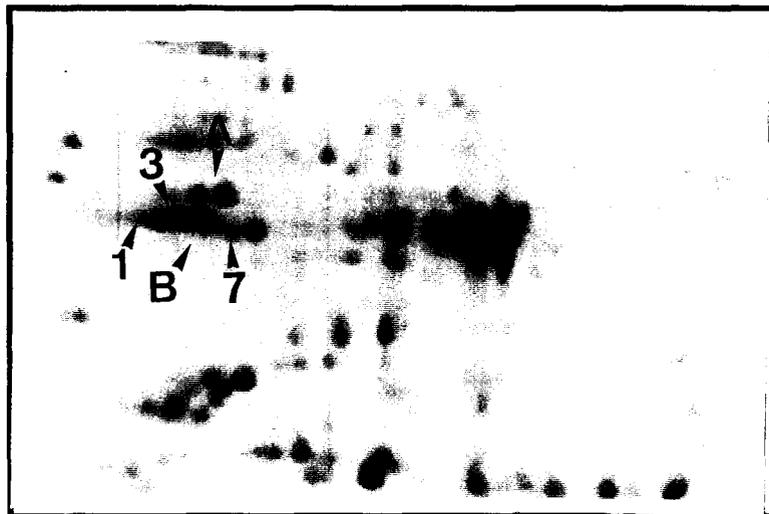
Zone putative des isotopes de tubulines



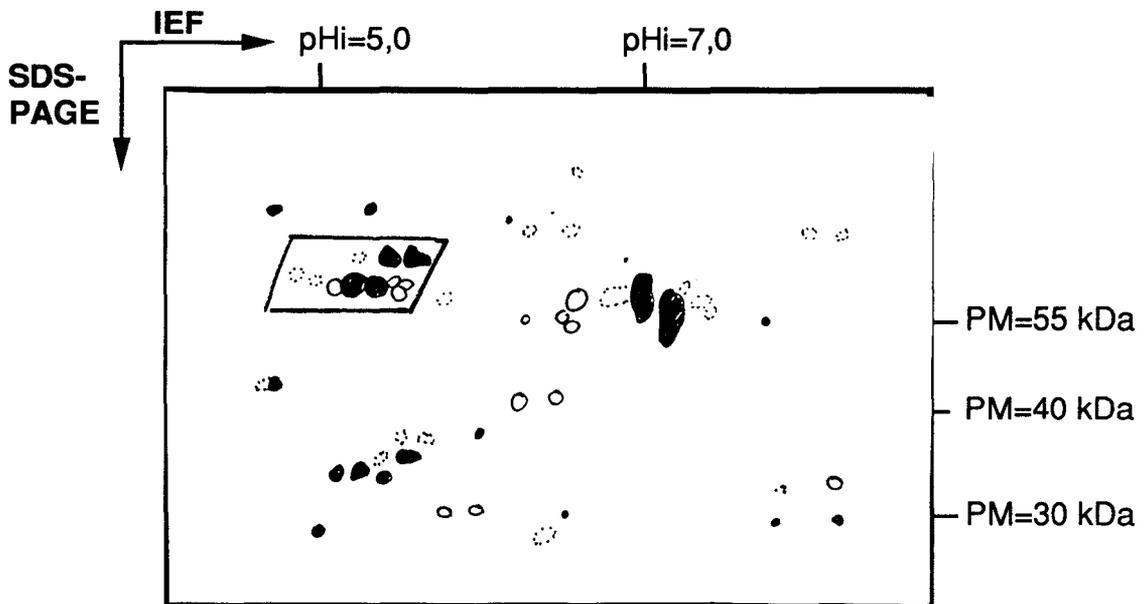
A: Zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J1



B: Zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J2



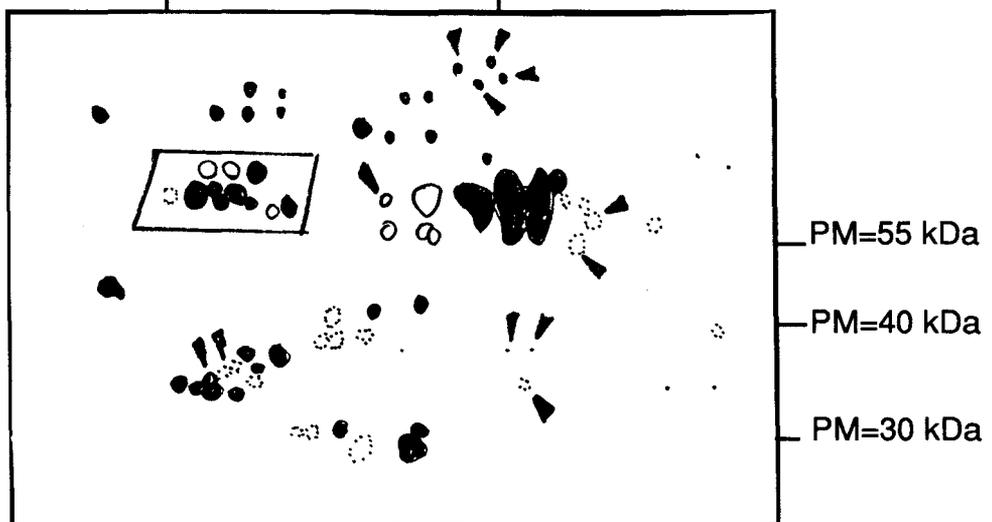
C: Zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J3



A: Représentation schématique de la zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J1



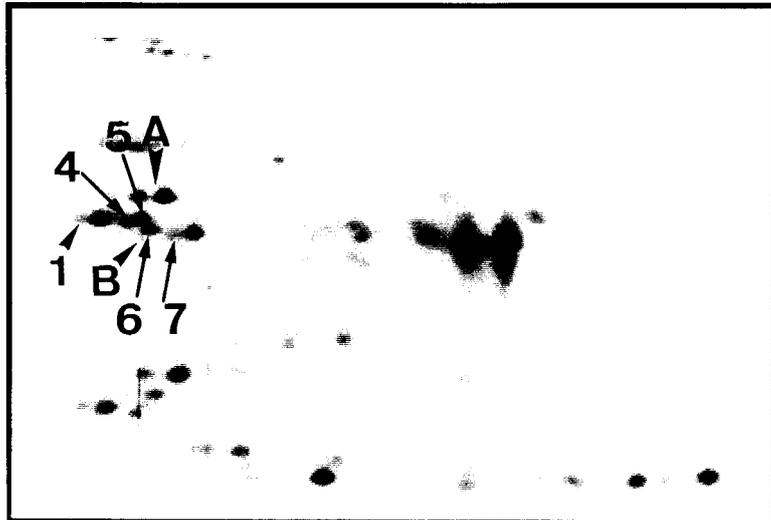
B: Représentation schématique de la zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J2



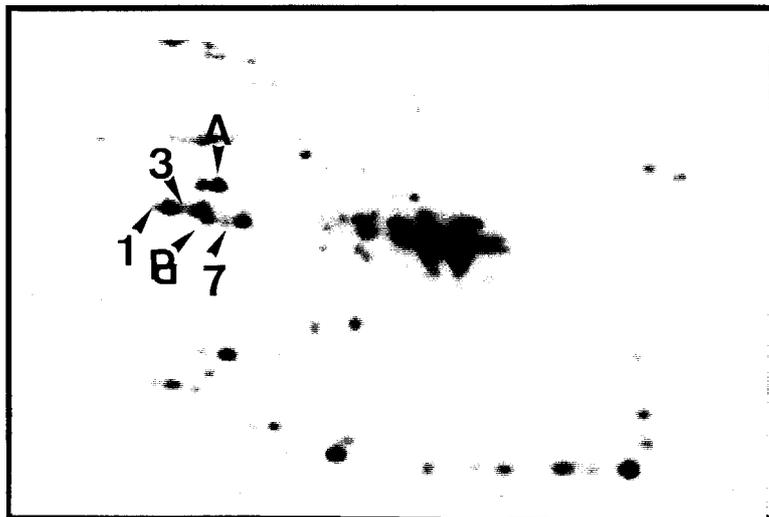
C: Représentation schématique de la zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J3

Planche 10

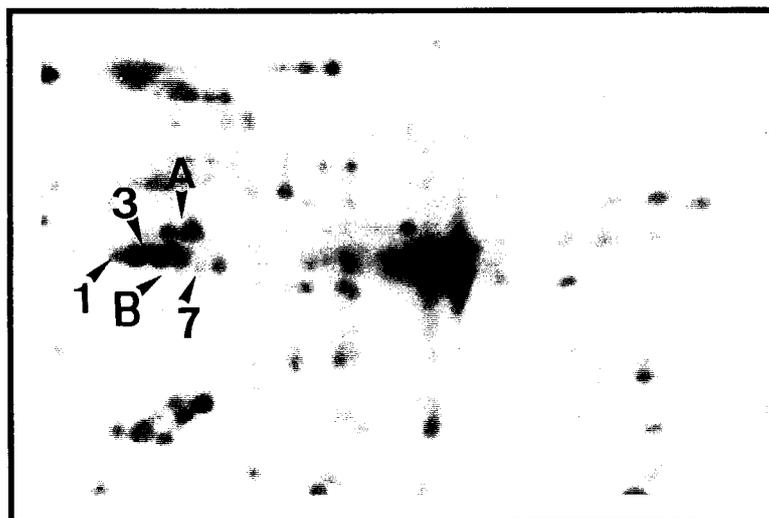
Zone putative des isotypes de tubulines



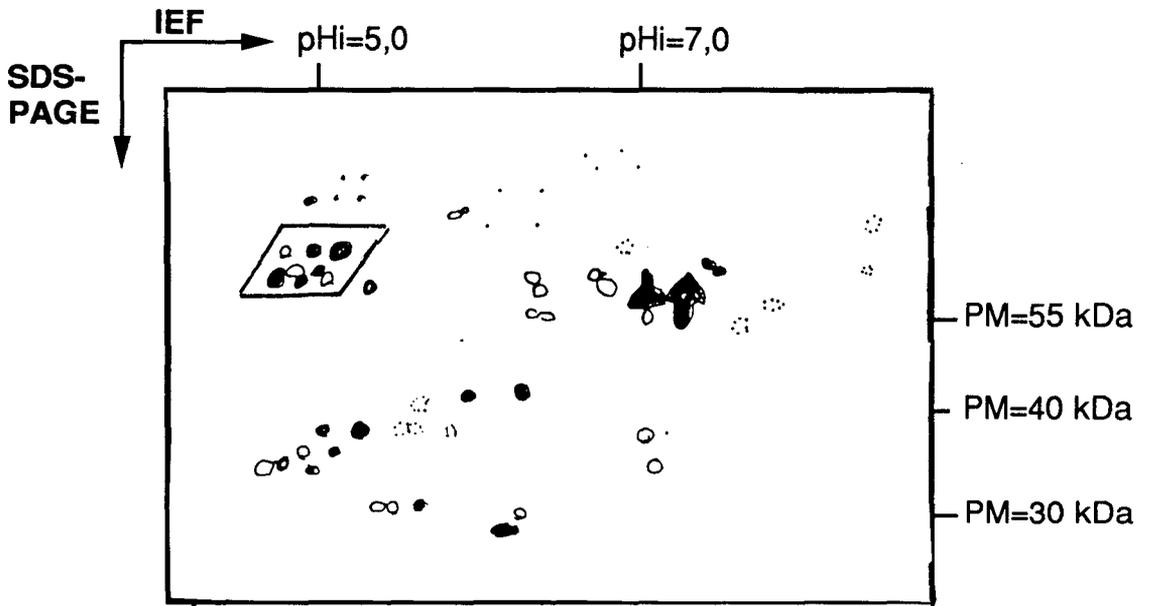
D: Zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J4



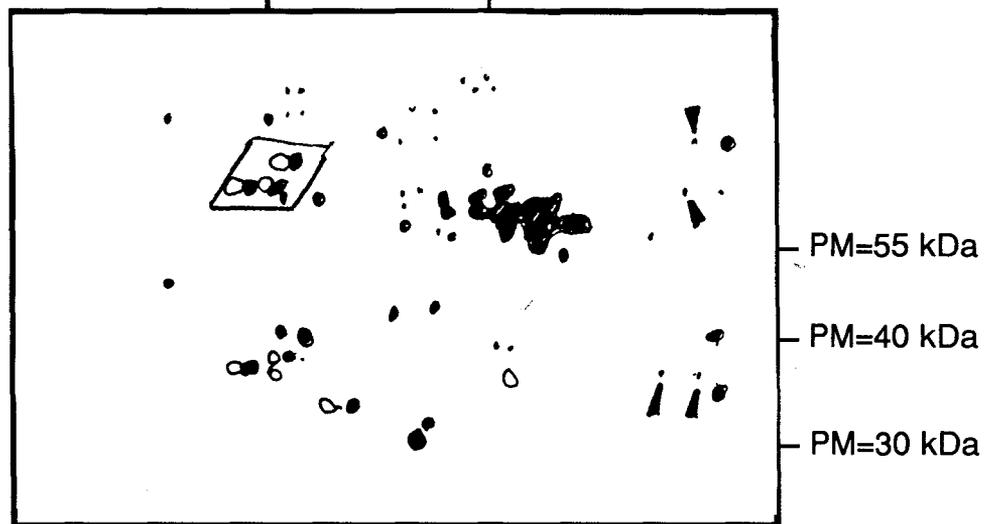
E: Zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J5



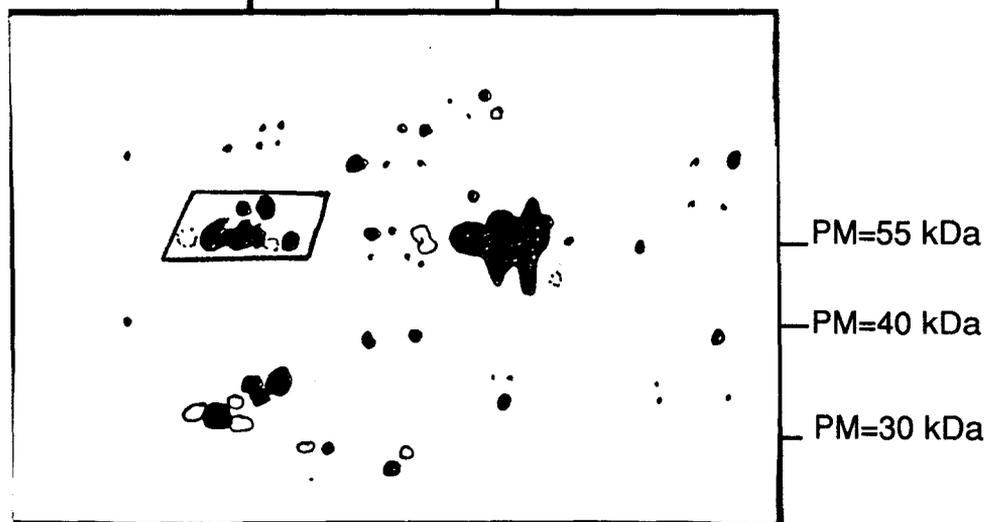
F: Zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J5+3



D: Représentation schématique de la zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J4



E: Représentation schématique de la zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J5



F: Représentation schématique de la zone centrale d'un gel 2D d'extrait foliaire à J5+3

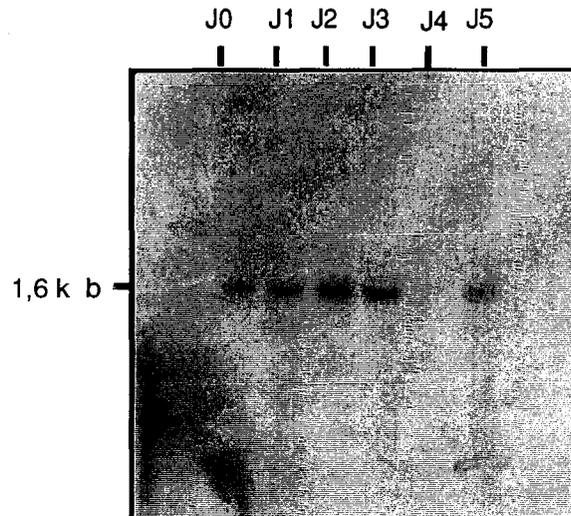
4.5 Variations des taux de synthèse des ARNs α tubuline

Les expériences ont été menées à partir de 3 extractions d'ARN totaux. Dans chaque type d'extraction, deux transferts indépendants, sur une membrane de nylon (Northern blot), ont été réalisés ainsi qu'un autoradiogramme (Fig. 19A). Les membranes ont été digitalisées, et les données obtenues ont été traitées par un logiciel grapheur. Une photo du gel d'agarose (réplication) permet de vérifier que la quantité d'ARN déposée dans chaque puit est semblable.

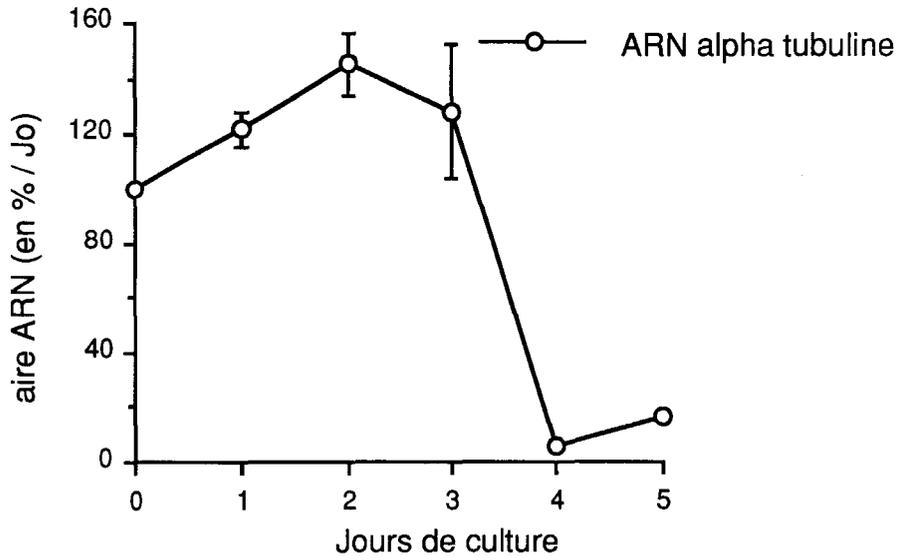
L'analyse du taux d'ARN entre J_0 et J_2 permet de détecter une augmentation régulière du taux de transcription d'un facteur de 1,2 (Fig. 19B). Une légère chute est alors détectée entre J_2 et J_3 (d'un facteur de 0,9). Celle-ci se poursuit et devient spectaculaire; le facteur est ici de 4,7 / 24 h. Un accroissement du taux s'amorce entre J_4 et J_5 (x2,5).

Figure 19: Variation des ARNs α tubuline au cours de la phase d'induction. **A:** Hybridation des ARNs foliaires avec une sonde ARN α tubuline sur une membrane de nylon. **B:** Evolution quantitative au cours de la phase d'induction des feuilles du *Cichorium* hybride '474', valeur moyenne \pm écart type (3 séries de 2 répétitions).

A:



B:



4.6 Conclusions

Chez le *Cichorium* hybride '474', une augmentation de la quantitative de l'actine est observée durant les 3 premiers jours de culture (phase d'induction). Le

taux chute légèrement et devient semblable à celui de J_0 . Il s'élève à nouveau 24 h après le transfert des explants.

Des variations caractéristiques des α et β tubulines apparaissent chez l'hybride '474', pendant l'induction et le développement des embryons somatiques. Au cours de la phase d'induction, les taux de tubuline augmentent, pour se stabiliser rapidement (dès J_2). Cette phase de plateau est sans doute liée à la réactivation cellulaire des cellules compétentes et à leur blocage à l'entrée en mitose. Le transfert sur un milieu dépourvu de glycérol entraîne une augmentation des taux liée au déclenchement des premières mitoses embryogènes et des mitoses embryonnaires ultérieures.

Les tubulines des chicorées non embryogènes présentent de faibles variations au cours des tous premiers jours de culture. La principale différence avec l'hybride '474' embryogène concerne le comportement des tubulines pendant les deux phases de culture. Chez l'hybride '474', les mitoses embryonnaires sont corrélées avec une élévation simultanée, et de même amplitude, de la quantité des deux isoformes de tubulines. Les chicorées non embryogènes possèdent semblablement le même stock d' α tubuline. Mais de faibles variations sont toutefois observées au niveau de la β tubuline de C. cv. 'Flash' dès J_2 , et du cv. '206' dès J_4 .

Les résultats préliminaires concernant l'expression des différents isotypes de tubulines font ressortir plusieurs problèmes, notamment ceux liés au type de matériel et à l'optimisation du transfert sur membrane. Les résultats les plus prometteurs sont ceux obtenus avec l'analyse du taux de transcription des ARNs α tubuline: après une augmentation au cours des 3 premiers jours, une chute spectaculaire de transcription est observée juste avant le transfert.

5. CONCLUSIONS

Une séquence des événements liés à la réactivation cellulaire des cellules compétentes et à leurs premières divisions lors de l'induction embryogène du tissu foliaire de l'hybride '474' a pu être définie.

Une réactivation nucléaire et la préparation de la première mitose caractérisées par la formation d'un phragmosome précèdent la migration

prémitotique du noyau au centre de la CE. Cet évènement cytologique est facilement détectable sur des coupes de tissus induits.

La première division embryogène est symétrique (noyau central). Son plan est anticline par rapport au faisceau vasculaire près duquel se situent les premiers embryons somatiques induits. Une BPP est mise en place au préalable (chez l'hybride '474' tétraploïde).

Les proembryons se forment selon un mode particulier, caractérisé par un recloisonnement anticline de la CE, conduisant à un proembryon linéaire, suivi d'un épaissement à l'une ou l'autre de ses extrémités (pas de polarité à ce stade, ni de pseudo-suspenseur).

Ces modifications cytologiques découlent de réarrangements intrinsèques, tels que l'augmentation des taux d'actine, d' α et de β tubuline, permettant la réorganisation du cytosquelette des CE (phase G₂), notamment entre J₀ et J₃, et leur entrée en mitose (après transfert). De telles synthèses, notamment lors de la phase d'expression, ne sont pas détectées chez les chicorées non embryogènes. L'analyse du comportement des protéines cytosquelettiques, corrélées à des observations cytologiques, constituent bien une base de recherche sur les facteurs précoces de la différenciation au cours de l'ES. Ces protéines participent à tout processus morphogénétique en tant que déterminants subcellulaires.

Les résultats préliminaires concernant les ARNs d' α tubuline sont encourageants. Des fluctuations sont en effet décelées très rapidement après la mise en culture des explants foliaires. De plus, elles devraient permettre de déterminer des variations plus précoces du fait que les ARNs se situent en amont des protéines pour lesquelles ils codent. Leur mise en évidence, par hybridation *in situ* sur coupe, permettrait de déterminer les cellules mésophylliennes s'engageant dans un processus de dédifférenciation, avant même la migration prémitotique du noyau et la formation du phragmosome.

EFFETS DE LA CAFEINE ET DU VERAPAMIL SUR L'INDUCTION ET L'EXPRESSION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

Chez *Cichorium* hybride '474', la première division embryogène est observée après 48 h de culture dans le milieu d'expression (J5+2). La préparation des cellules embryogènes à la division s'est déroulée pendant la phase d'induction, et différentes étapes ont été caractérisées. Ces étapes concernent, en particulier, la réorganisation du réseau de Mts (et probablement de Mfs). Ces évènements sont le reflet des signaux mitogènes qu'a reçus le noyau de certaines cellules compétentes du mésophylle.

L'originalité de cette troisième partie réside dans l'utilisation d'inhibiteurs. Le premier est la caféine. Celle-ci est connue dans la littérature comme étant un agent déstabilisant la plaque cellulaire en cours de formation en fin de télophase (HEPLER et BONSIGNORE, 1990). Le deuxième composé testé est le vérapamil qui affecte le fonctionnement des canaux calciques.

L'hybride '474' semble être un matériel approprié pour l'étude de l'acquisition du programme de division embryogène, puisque une méthode de culture, découplant les phases d'induction et d'expression, a pu être déterminée (ROBATCHE-CLAIVE et al., 1992). Dans une première partie, nous nous attacherons à décrire les aspects nucléaires et cellulaires induits par la caféine au cours de ces deux phases. Ses effets sur l'ES n'ont pas encore été décrits jusqu'ici. Cet inhibiteur a été ajouté au milieu de culture de façon séquentielle, c'est-à-dire dans l'une et/ou l'autre phase. Les liens potentiels entre la matrice extra-cellulaire et le cytosquelette, nous ont conduits à analyser les taux protéiques de l'actine et des tubulines. Cet agent a été ajouté au milieu de culture à la dose de 5mM selon trois conditions :

- **condition 1** : la caféine est ajoutée au milieu de culture pendant la phase d'induction (J0 à J5),
- **condition 2** : la caféine est ajoutée pendant la phase d'expression (J5 à J5+3),
- **condition 3** : la caféine est présente dans les deux phases de culture (J0 à J5+3).

Les feuilles ainsi traitées sont analysées après 8 jours de culture (J5+3) au moment où les premières mitoses ont lieu. Les observations sont réalisées sur des coupes semi-fines (résine hydrophile) et en paraffine.

L'influence du vérapamil sur les modalités de l'induction et de l'expression embryogène a déjà été étudiée d'un point de vue cytologique par DUMINY (1993) chez le *Cichorium* '474'. Une diminution très nette de la potentialité embryogène a été obtenue lors de l'addition de 100 µM de vérapamil pendant toute la culture des feuilles. Pour étudier les effets de cet inhibiteur sur les protéines du cytosquelette, nous avons ajouté 100 µM de cette molécule pendant toute la durée de la culture des feuilles, qui ont été prélevées puis préparées pour une étude électrophorétique des protéines du cytosquelette.

1. EFFETS DE LA CAFEINE SUR LA REACTIVATION CELLULAIRE DES CELLULES MESOPHYLLIENNES COMPETENTES

Dans les conditions de culture 1 et 2, certaines cellules mésophylliennes deviennent compétentes. Ces CR sont caractérisées par la présence d'un noyau volumineux (15-20 µm) et d'un nucléole très actif (jusqu'à 7 µm de diamètre) (Pl. 11A). De telles CR sont soit disséminées dans le mésophylle (Pl. 11A) soit à proximité d'un faisceau vasculaire (Pl. 11B). Le cytoplasme dense et granuleux est localisé près du noyau (Pl. 11A) ou pariétal (Pl. 11B). D'autres cellules ne montrent aucun signe de réactivation. Elles possèdent un noyau lenticulaire muni d'un très petit nucléole qui est accolé au plasmalemme (Pl. 11A).

La présence de caféine dans l'une ou l'autre phase de culture n'empêche pas la différenciation des CR en CE. En effet, des CE sont décelées, tant près des faisceaux vasculaires (Pl. 11C), que dans le mésophylle (Pl. 11D). Elles sont comparables à celles observées dans la condition témoin (Pl. 1C); le noyau, maintenu par des trabécules cytoplasmiques très denses, est tracté vers l'équateur de la CE (Pl. 11C). La vacuole se fragmente en plus petites unités. Généralement, deux nucléoles de taille variable sont visibles dans les noyaux de ces cellules. Un autre type de CE est détecté; le noyau, bien que réactivé, ne migre pas au centre de la cellule, même si quelques trabécules se mettent en place (Pl. 11D). La vacuole est alors plus grande que dans les CE typiques et le cytoplasme granuleux et dense est pariétal.

La position latérale du noyau des CE de ce dernier type ne les empêche pas de suivre normalement une caryocinèse. Ainsi, des nucléofilaments apparaissent fréquemment à la surface du noyau indiquant la fin de la phase S et l'entrée en préprophase (Pl. 11E). D'autres CE, possèdent des nucléofilaments épais, composés de chromatine fortement condensée et colorés par la safranine, ce qui est caractéristique d'un début de prophase (Pl. 11F). L'enveloppe nucléaire n'est pas encore rompue. Il y a donc une véritable réactivation cellulaire des cellules compétentes et une redifférenciation jusqu'au stade CE. De plus, la caryocinèse n'est pas affectée par la position pariétale du noyau.

Lorsque la caféine est présente pendant toute la culture (condition 3), des CR sont décelées. Mais aucune CE typique n'est détectée. Chez ces CR, de nombreux fragments de chromatine condensée sont dispersés sur la surface nucléaire, et le cytoplasme périnucléaire émet de fines trabéculations, de la périphérie du noyau vers la paroi. De très rares embryons bicellulaires sont parfois observés sur quelques coupes.

Planche 11
Effets de la caféine sur la réactivation cellulaire

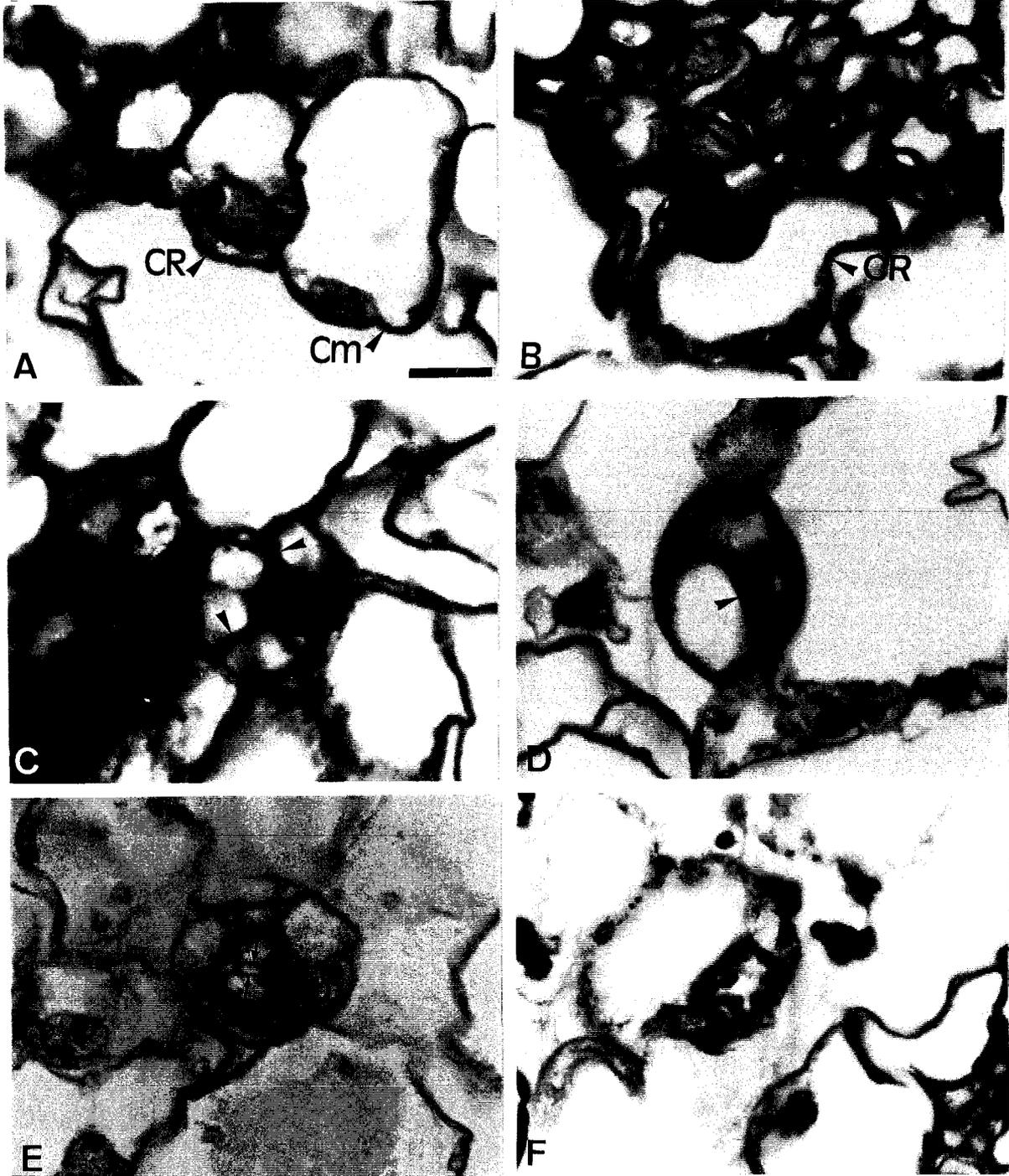


Planche 11

Effets de la caféine sur la réactivation cellulaire

- A** Réactivation d'une cellule mésophyllienne (CR), le noyau est volumineux et le nucléole est très coloré. Une cellule non réactivée (Cm) possède un petit noyau lenticulaire accolé au plasmalemme.
- B** Réactivation d'une cellule (CR) périvasculaire (v). Le cytoplasme pariétal est très granuleux.
- C** Cellule embryogène typique périvasculaire. Le noyau est tracté par des trabécules cytoplasmiques (têtes de flèches). La vacuole s'est fragmentée en petites unités.
- D** Cellule embryogène inachevée (mésophylle). Le noyau reste accolé au plasmalemme (tête de flèche). Quelques trabécules se forment à partir du cytoplasme périnucléaire.
- E, F** Préparation à la mitose: des nucléofilaments se forment à la surface des CE (**E**), mais la position pariétale du noyau n'empêche pas l'observation d'une condensation chromatiniennne caractéristique d'une prophase (**F**).

Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J₅
Coupes en paraffine colorées par la safranine/fast green.
Même échelle pour toutes les figures, barre = 20 µm.

La présence de caféine au cours d'une culture de feuilles du *Cichorium* hybride '474' provoque quelques modifications dans la réactivation cellulaire des cellules compétentes. L'état cytologique caractérisant les CE peut être complètement acquis dans la condition 1, alors qu'il n'est que partiellement atteint dans la condition 2. Cette molécule de la famille des méthylxanthines inhibe la migration prémitotique du noyau. Elle n'empêche pas le noyau de progresser dans le cycle nucléaire jusqu'au stade prophase.

2. EFFETS DE LA CAFEINE SUR LES MITOSES EMBRYONNAIRES

2.1 Addition de caféine dans l'une ou l'autre phase de culture

Dans chacune des deux premières conditions, la caféine induit une structuration nucléaire et nucléolaire particulières. Dans de nombreuses CR, une extrusion partielle du nucléole est observée (Pl. 12A). Celui-ci est situé à la périphérie du noyau et provoque une excroissance de l'enveloppe nucléaire. Parfois, lorsqu'il existe deux nucléoles, l'un peut être totalement exclu du noyau et se situer dans le cytoplasme périnucléaire, alors que l'autre reste dans le noyau (Pl. 12B, 12C et 12D).

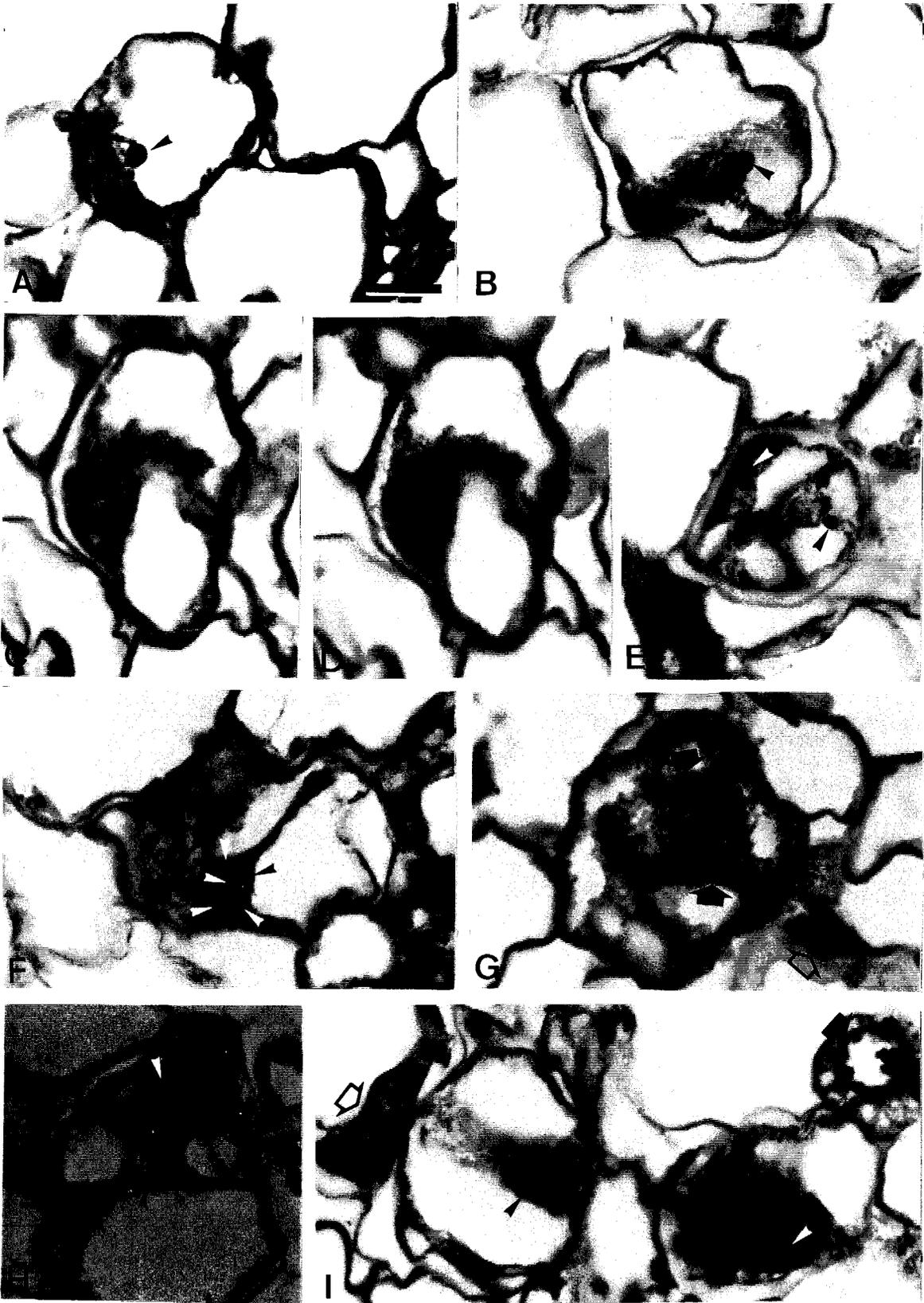
Planche 12

Effets de la caféine sur l'aspect nucléaire et nucléolaire

- A** Cellule réactivée dont le noyau présente une extrusion partielle du nucléole (tête de flèche).
- B, C, D** Extrusion totale du nucléole dans des cellules réactivées: le nucléole (tête de flèche) est rejeté dans le cytoplasme périnucléaire.
- E** Extrusion totale du nucléole (têtes de flèche) dans une structure embryonnaire binucléée.
- F** Présence d'un grand nombre de nucléole (têtes de flèche) dans un noyau de cellule embryogène inachevée.
- G** Ensemble de noyaux fusionnés (flèches) présentant de nombreux nucléoles de tailles variables.
- H** Embryon bicellulaire comportant deux cellules séparées par une paroi (tête de flèche noire). Une des deux cellules possède deux noyaux dont les enveloppes nucléaires ont fusionné (tête de flèche blanche).
- I** Ensemble des différentes structures rencontrées en présence de caféine : Cellule non réactivée (tête de flèche blanche), Cellule embryogène à noyau pariétal (tête de flèche noire), Cellule embryogène typique présentant une configuration nucléaire préprophasique (flèche noire), Cellule binucléée (flèche blanche).

Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J5+3.
Coupes en paraffine colorées par la safranine/fast green.
Même échelle pour toutes les figures, barre = 20 µm.

Planche 12
Effets de la caféine sur l'aspect
nucléaire et nucléolaire



L'extrusion totale du nucléole peut être fréquemment observée dans les CR (Pl. 12C et 12D) et parfois dans les cellules des proembryons (Pl. 12E).

D'autre part, une multiplication du nombre de nucléoles (Pl. 12F) et une diminution de leur taille (micro-nucléole ?) sont souvent associés avec une augmentation de taille des noyaux fusionnés (Pl. 12G). Ainsi, la surface nucléaire d'une cellule non réactivée dans le plan de coupe est d'environ $80 \mu\text{m}^2$, alors que celui de l'ensemble de noyaux est de $490 \mu\text{m}^2$ (soit 6 fois plus). Cette augmentation de la taille du noyau est représentée dans le Tableau 6:

Type	diamètre nucléaire (μm)	surface en coupe (μm^2)
cellule non réactivée	10-11	80-95
cellule réactivée	14-15	155-180
cellule embryogène typique (noyau central)	15-18	180-250
Noyaux fusionnés*	25	490-500

Tableau 6: Taille et surface nucléaire des structures embryogènes induites au cours de la culture. La présence de 5 mM de caféine au cours de l'une ou l'autre phase de culture induit la fusion de noyaux*.

Plus rarement, des phénomènes de fusion de l'enveloppe nucléaire sont mis en évidence. Après un accollement des noyaux, les enveloppes fusionnent avec, ou non, mélange des chromatines (Pl. 12H). Les nucléoles restent indépendants les uns des autres.

Quels que soient les morphotypes nucléaires, la réactivation induite au cours de la première phase de culture conduit à une caryocinèse normale. On peut donc observer des cellules mésophylliennes non réactivées, des CR, des CE dont le noyau pariétal peut présenter une configuration chromatiniennne prophasique, et des cellules binucléées (le noyaux sont pariétaux) résultant d'une cytokinèse déficiente (Pl. 12I). De telles cellules binucléées peuvent être issues des CE munies d'un noyau latéral mais dont le devenir n'a pas été observé, ou du faible pourcentage de CE possédant un noyau central.

Si la caféine est éliminée lors du transfert, des embryons bicellulaires normaux sont décelés (Pl. 13A). Une paroi sépare deux cellules embryonnaires identiques suggérant une division symétrique préalable.

La figure originale observée dans cette expérience est l'apparition de structures cellulaires comportant plusieurs noyaux appelées **coenocytes**. En effet, dans les mêmes échantillons, il est possible de trouver à la fois des embryons multicellulaires et des structures coenocytiques.

De nombreuses cellules binucléées sont décelées: deux noyaux sont ainsi localisés dans un même cytoplasme (Pl. 13B). Ces deux noyaux peuvent être maintenus par quelques trabécules cytoplasmiques (Pl. 13B). Dans de telles cellules, les noyaux peuvent être intimement accolés (Pl. 13C), et de nombreux nucléoles de tailles variables sont parsemés à la surface nucléaire. Ces noyaux sont localisés à l'équateur de la cellule, mais aucune plaque cellulaire contenant de la cellulose (et donc colorée en vert par le fast green) n'est détectée. Parfois, l'emplacement d'une future plaque cellulaire est localisé sous la forme d'une ligne rouge très colorée par la safranine.

Des embryons multicellulaires normaux sont présents notamment près des faisceaux vasculaires (Pl. 13D). Chaque cellule embryonnaire est séparée de sa voisine par une fine paroi pecto-cellulosique. Ces eS se forment conformément à la séquence décrite précédemment. Après un allongement dans l'axe du faisceau vasculaire par une suite de divisions anticlines (Pl. 13E), des divisions périclines permettent à l'eS de croître en épaisseur (Pl. 13F).

Des eS chimériques sont souvent observés. La répartition des cellules embryonnaires et la taille de ces dernières sont altérées par la présence de caféine lors de la phase d'induction. Ainsi, un eS peut présenter un certain nombre de cellules embryonnaires normalement constituées, alors que d'autres cellules possèdent un ensemble de noyaux fusionnés et parsemés de petits nucléoles (Pl. 13G et 13H). Cet ensemble nucléaire est située à un pôle de l'embryon, et un cytoplasme très dense et très granuleux est mis en évidence. Cette cellule embryonnaire anormalement grande est munie d'une vacuole importante. D'autres eS présentent plusieurs noyaux au sein d'une même cellule (Pl. 13G). Les noyaux sont bien individualisés et sont généralement localisés à proximité du plasmalemme.

Planche 13
Effets de la caféine sur
les divisions embryonnaires

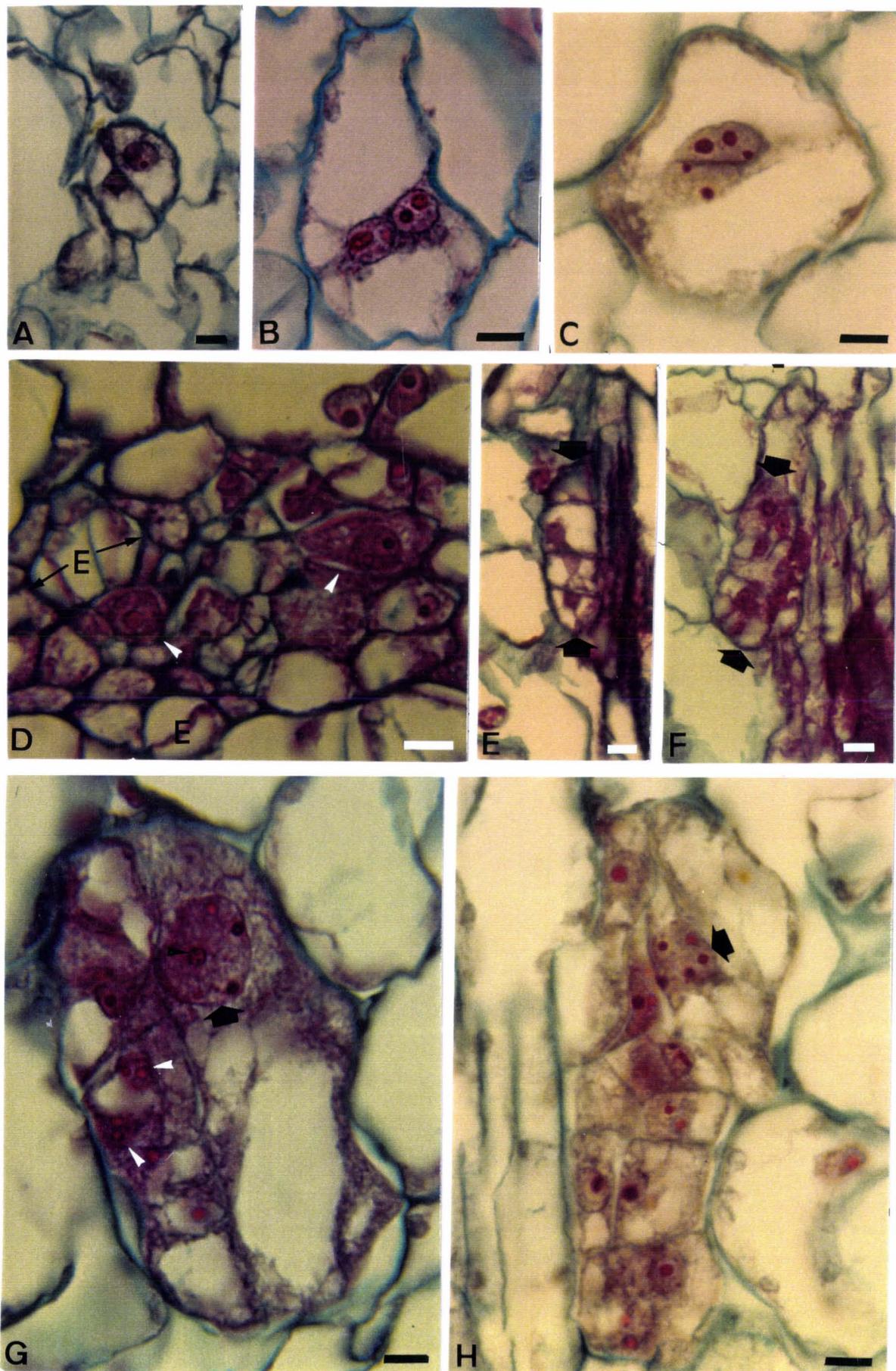


Planche 13
Effets de la caféine sur
les divisions embryonnaires

- A** Embryon bicellulaire, les cellules embryonnaires sont séparées par une paroi pecto-cellulosique.
- B** Cellule binucléée: la caryocinèse s'est déroulée normalement mais la cytokinèse est défectueuse.
- C** Cellule binucléée: les noyaux sont intimement accolés.
- D** Structures embryonnaires périvasculaires: des cellules embryogènes (têtes de flèche blanches) et des embryons multicellulaires (E) sont observés.
- E, F** Mode de division du jeune embryon somatique périvasculaire: embryon linéaire (flèches) résultant de divisions anticlines (E). Des divisions périclines permettent à l'embryon (flèches) de croître en épaisseur.
- G, H** Embryon somatique chimérique: des cellules embryonnaires normales, des cellules plurinucléées (têtes de flèche blanches) et une cellule présentant une masse nucléaire (flèche) sont observées au sein du même embryon.

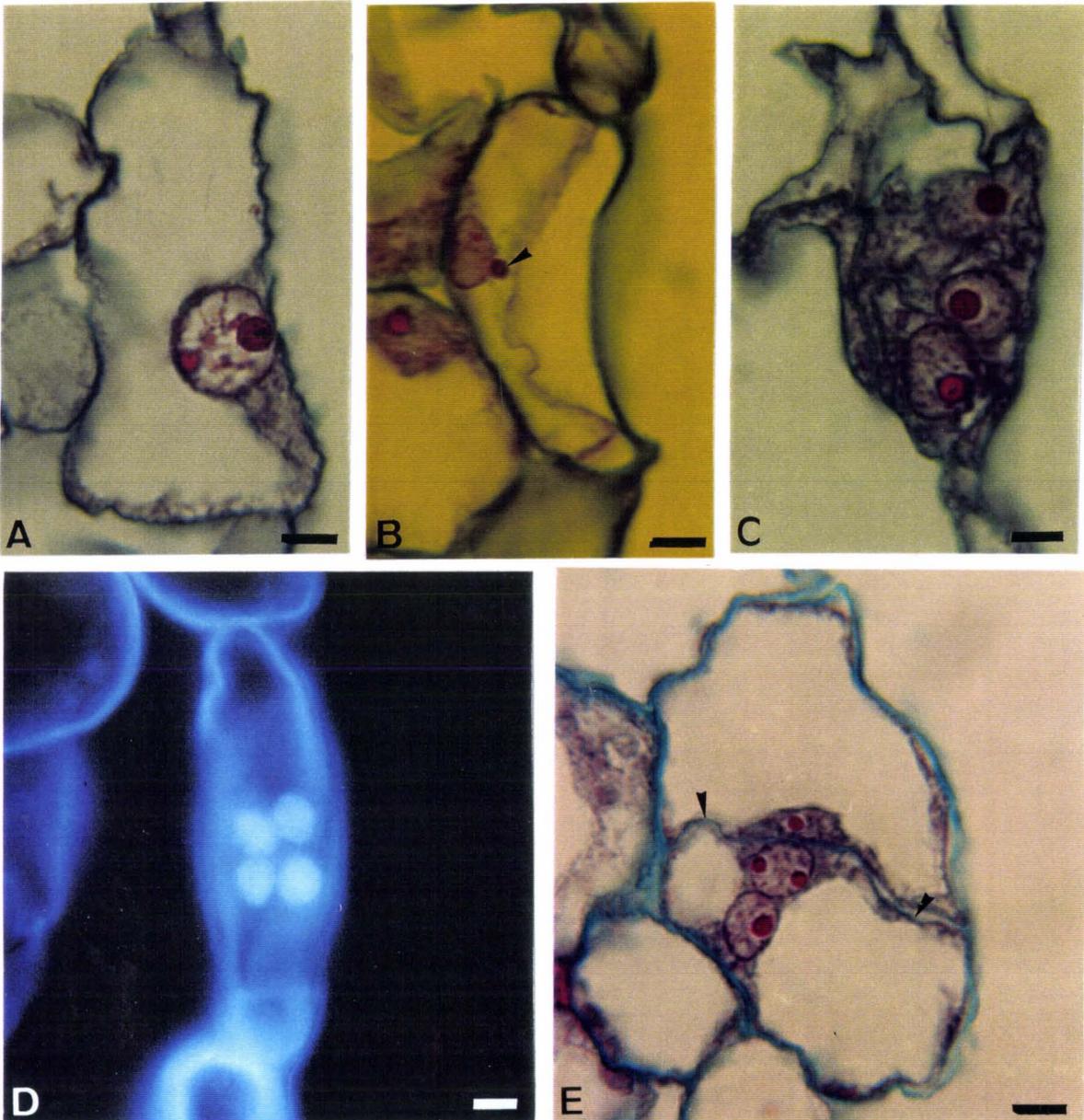
Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J5+3.
Coupes en paraffine colorées par la safranine/fast green.
Barre = 10 µm.

D'autres sites cellulaires sont aussi compétents à l'ES. Une réactivation cellulaire peut être détectée dans quelques cellules épidermiques (Pl. 14A). Cette réactivation est caractérisée par la présence d'un noyau volumineux muni de plusieurs nucléoles. De nombreux nucléofilaments sont dispersés à la surface du noyau. D'autres CR possèdent un noyau pariétal (accolé au plasmalemme sur la face cellulaire en regard du mésophylle) présentant une extrusion de son nucléole (Pl. 14B). De telles CR épidermiques sont capables de progresser dans le cycle cellulaire et de montrer une caryocinèse normale. Comme les autres cellules mésophylliennes compétentes, elles sont soumises aux mêmes effets causés par la caféine, avec notamment, une cytokinèse déficiente. Des structures coenocytiques à trois (Pl. 14C) ou 4 noyaux centraux (Pl. 14D) sont mises en évidence. Des eS chimériques peuvent aussi apparaître à ce site (Pl. 14E). Dans ce cas, l'eS présente deux cellules embryonnaires dans le plan de coupe. Celles-ci sont limitées par une paroi pecto-cellulosique. Une des deux cellules

embryonnaires possède deux noyaux individualisés entourés d'un cytoplasme périnucléaire dense.

Généralement, après 8 jours de culture, on observe 2 à 4 cycles normaux de caryocinèse. Les noyaux sont groupés ou non, et se trouvent souvent près de la paroi ou à un pôle cellulaire. Le cytoplasme est très dense et les nucléoles semblent actifs, ce qui laisse supposer que ces structures embryonnaires, normales, coenocytiques ou chimériques, sont métaboliquement actives.

Planche 14
Effets de la caféine sur
l'induction et l'expression embryogènes
de cellules épidermiques



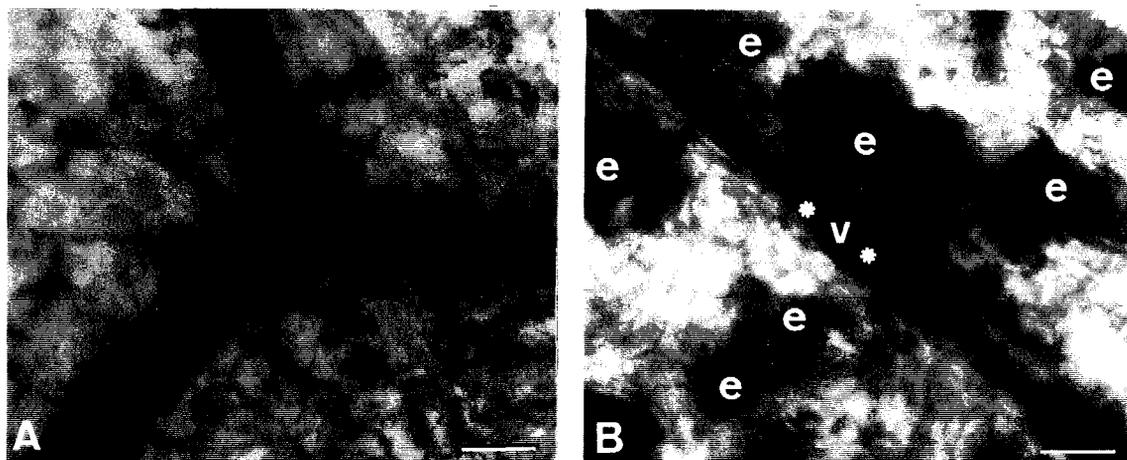
- A** Cellule embryogène à noyau pariétal: deux nucléoles sont très colorés, des nucléofilaments parsèment la surface nucléaire.
- B** Extrusion nucléolaire partielle (tête de flèche).
- C** Structure coenocytique trinuécléée.
- D** Structure coenocytique tétranuécléée.
- E** Embryon bicellulaire (tête de flèche), dont une des deux cellules présente deux noyaux.

Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J₅₊₃.
Coupes en paraffine colorées par la safranine/fast green (A, B, C, E).
Coloration: Hoechst (D). Barre = 10 µm.

2.2 Addition de la caféine pendant toute la culture

Si la caféine est maintenue dans le milieu de culture lors du transfert (condition 3), seules des CR sont observées dans les coupes. Aucune structure plus développée n'apparaît. Un contrôle a été effectué sur une durée plus grande de culture; deux parties d'une même feuille ont été cultivées: l'une en présence de caféine pendant 12 jours et l'autre dans le même milieu sans inhibiteur. Dans le premier cas, aucun embryon globulaire n'est détecté par transparence (Pl. 15A). Au contraire, le témoin présente une multitude d'embryons somatiques globulaires très fortement colorés par le lugol (Pl. 15B).

Planche 15 Effets de la caféine (12 jours) sur le développement des embryons



- A** Limbe d'une feuille cultivée en présence de caféine: aucun embryon n'est visible par transparence.
- B** Limbe d'une feuille cultivée dans la condition témoin: de nombreux embryons sont colorés, * v * symbolise une nervure.

Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes, observation à J5+7.

Limbe coloré par le lugol.

Barre = 100 μ m.

2.3 Influence de la caféine sur le nombre et le type de structures embryonnaires

Cette étude s'est effectuée à partir de l'analyse de coupes de feuilles induites 8 jours puis incluses dans de la paraffine. La répartition des structures embryonnaires a été réalisée dans les trois conditions inhibitrices ainsi que dans une condition témoin sans caféine (Fig. 20).

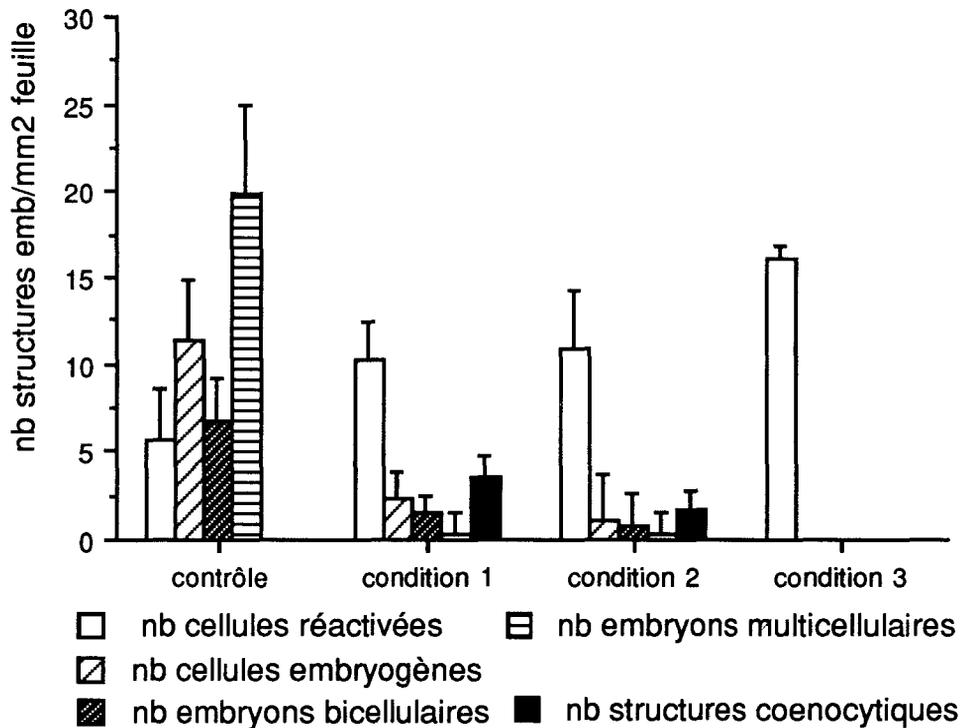


Figure 20: Répartition des structures embryonnaires induites dans les trois conditions inhibitrices (5 mM caféine) et dans le témoin. Nombre moyen par mm² de feuille ± écart type (n = 10 lames dans chaque expérience).

Un dénombrement pour chaque cas est présenté dans le Tableau 14. Les comparaisons entre les nombres moyens pour chaque type de structures embryonnaires sont réalisées en appliquant un test de Student (avec calcul de l'estimateur S du fait que $n < 30$, car seulement 10 lames sont analysées). Le degré de liberté est ici de $ddl = 10+10-2=18$. Les valeurs théoriques du test de Student sont données sous le Tableau 7:

	CR	CE	eS bicellulaire	eS multi- cellulaire	coenocyte	TOTAL mm ²
témoin en %	5,7 13	11,4 26	6,7 15	19,9 46	0 0	43,7 100
condition 1 en %	10,3 58	2,3 13	1,5 8	0,3 1	3,5 20	17,9 100
condition 2 en %	10,9 74	1,1 7	0,8 5	0,3 3	1,7 11	14,8 100
condition 3 en %	16,1 100	0 0	0 0	0 0	0 0	16,1 100

Tableau 7: Répartition des structures embryonnaires induites par la présence séquentielle de 5 mM de caféine dans le milieu au cours de la culture de feuilles. Observation à J₅₊₃. (CR: cellule réactivée, CE: cellule embryogène, eS: embryon somatique). Condition 3: 0* = un seul eS bicellulaire a été observé sur l'ensemble des coupes ce qui est non significatif.

seuil du risque (en %)	représentation	valeur théorique du test
5	*	1,73
1	**	2,55
0,1	***	2,88

Les valeurs données par le Tableau 7 nous ont permis d'analyser statistiquement les effets de l'addition séquentielle de caféine au cours de la culture des feuilles. Les résultats sont représentés dans le Tableau 8:

conditions comparées	condition 1	condition 2	condition 3
témoin :			
nb de CR	*** (11,6)	*** (4,94)	*** (31,5)
nb de CE	*** (22,1)	*** (21,7)	
condition 1:			
nb de CR		NS (1,35)	*** (23,6)
nb de CE		*** (3,6)	

Tableau 8: Degré de signification des tests de Student calculés sur le nombre des cellules réactivées (CR) et des cellules embryogènes (CE) en fonction des conditions inhibitrices. Les valeurs calculées sont mises entre parenthèses. NS: non significatif.

Dans le témoin, 4 types de structures sont inventoriées: des cellules réactivées (CR), des cellules embryogènes (CE), des embryons somatiques (eS) bicellulaires ou multicellulaires (Tableau 7). L'addition de caféine modifie la distribution quantitative de ces structures notamment lorsqu'elle est présente pendant toute la culture (condition 3), où aucune forme plus développée que le stade CR n'apparaît. Les forts pourcentages de CR comptabilisés dans les conditions inhibitrices sont très significatifs de l'influence de la caféine sur le processus de différenciation des CR en CE (Tableau 8).

Lorsque la caféine est ajoutée de façon séquentielle dans l'une ou l'autre phase de culture (conditions 1 et 2), on observe l'apparition de structures coenocytiques. C'est à ce niveau que l'on note des différences significatives. En effet, leur apparition est quantitativement liée à la phase de culture où la caféine est ajoutée (test Student = 9,55; ***).

2.4 Conclusions

Le potentiel embryogène est affecté par la présence de l'inhibiteur. En effet, le nombre moyen de structures embryonnaires induites en sa présence représente entre 34 % (14,8/43,7 structures.mm⁻²; condition 2) et 41 % (16,1/43,7 structures.mm⁻²; condition 1) du celui obtenu dans le témoin (43,7 structures.m⁻²). Après 8 jours de culture, la classe de taille la plus représentée dans le témoin est celle constituée des eS multicellulaires, alors que dans les conditions inhibitrices, il s'agit de celle des CR. La caféine ne bloque donc pas la réactivation cellulaire mais ralentit leur différenciation jusqu'au stade CE. L'apparition de structures coenocytiques est liée à l'absence de la caféine dans l'une ou l'autre phase de culture. Le maintien de la caféine pendant la phase d'expression empêche les mitoses.

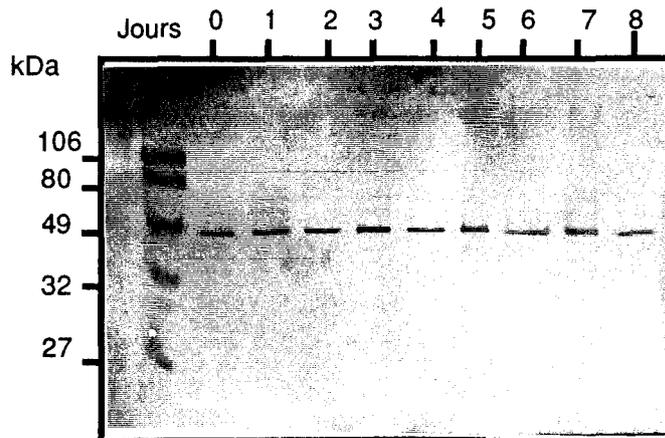
La caféine n'a pas d'effets apparents sur la caryocinèse même si elle altère la migration prémitotique du noyau. L'inhibition de la partition de la CE ou des cellules embryonnaires induit l'apparition de coenocytes. Or les éléments du cytosquelette sont impliqués dans la formation du phragmoplaste, le dépôt des microfibrilles de cellulose et dans le transport des vésicules vers le futur site de formation de la paroi. Nous avons donc poursuivi nos investigations par l'analyse de telles protéines cytosquelettiques.

3. VARIATIONS DE L'ACTINE ET DES TUBULINES EN PRESENCE DE CAFEINE

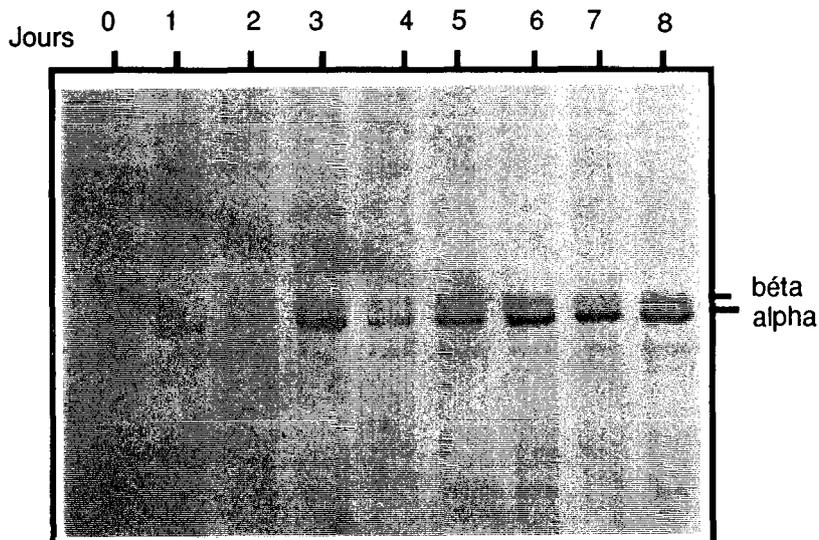
Les protéines totales sont extraites de feuilles de l'hybride '474' cultivées en présence de caféine pendant les deux phases de culture (condition 3) ou sans inhibiteur (contrôle). Après électrophorèse 1D et un électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose, l'actine (Fig.21A) et les tubulines (Fig. 21B) sont immunolocalisées. Ces protéines sont ensuite quantifiées après digitalisation de la membrane.

Figure 21: Immunodétection des protéines cytosquelettiques au cours d'une culture de feuilles de *Cichorium* hybride '474' en présence de 5 mM de caféine. **A:** Révélation de l'actine (gel à 12,5 %), **B:** Révélation des tubulines (gel à 10 %).

A :



B :



3.1 Variations quantitatives de l'actine

L'actine apparaît sous la forme d'une fine bande de 43-44 kDa (Fig. 21A). Pendant la phase d'induction en présence de caféine, la quantité de protéines est quatre fois plus élevée que dans le témoin (Fig. 22A). En effet, elle quadruple entre J₀ et J₂ puis atteint une phase de plateau pendant le reste de la culture. Dans le témoin, elle double entre J₀ et J₃, puis diminue d'un même facteur entre J₃ et J₆, et augmente 24 h après le transfert. Des variations quantitatives ont été observées entre les membranes (répétitions); de fait, les écarts-types sont plus grands comparativement à la Fig. 14A.

3.2 Variations quantitatives des tubulines

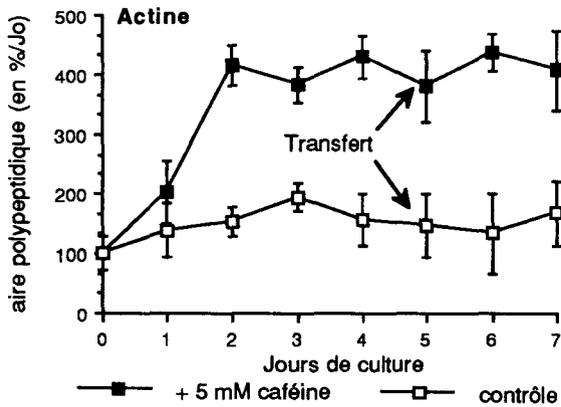
Les tubulines apparaissent sous l'aspect de bandes de 55 kDa (β tubuline) et 53 kDa (α tubuline). La bande de l' α tubuline est plus fine et plus fortement révélée. Elle est facilement décelée visuellement dès J₁. La bande de β tubuline est plus diffuse que celle de l' α tubuline (Fig. 21B), elle apparaît plus claire mais semble plus large.

L'addition de caféine pendant toute la durée de culture provoque un découplage beaucoup plus important des quantités des deux tubulines. Celle de l' α tubuline diminue puis reste très faible jusque J₃ (Fig. 22B). Peu avant le transfert des explants foliaires, la quantité de protéines augmente fortement (J₃-J₄) puis se maintient avec de faibles fluctuations.

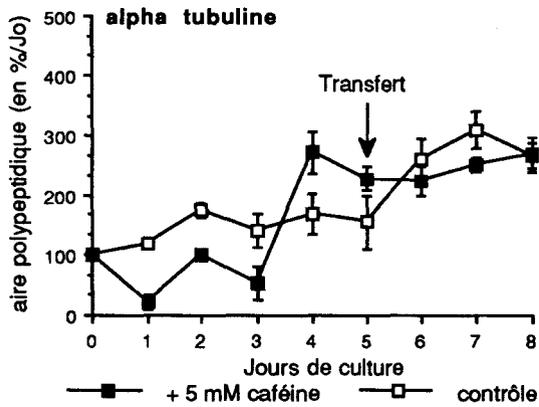
La quantité de la β tubuline augmente rapidement pendant les deux premiers jours (environ x4), puis plus lentement jusque J₄. Elle reste très élevée pendant la seconde phase de culture (Fig. 22C).

Figure 22: Evolution quantitative de l'actine et des tubulines au cours d'une culture de feuilles du *Cichorium* '474' en présence (■) ou non (□) de 5 mM de caféine pendant toute la culture. Valeurs moyennes ± écart type (3 répétitions). **A:** actine, **B:** α tubuline, **C:** β tubuline.

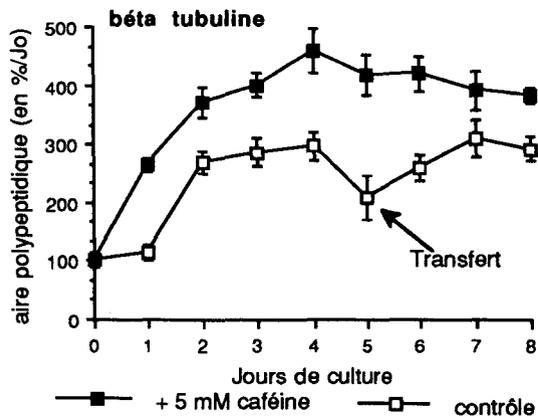
A:



B:



C:



3.3 Conclusions

Une accumulation très nette de l'actine est mise en évidence lorsque la caféine est présente, et ce, dès le 2^{ème} jour de culture. L'addition de caféine pendant toute la durée de la culture affecte le stock d' α et de β tubulines contenues dans les feuilles traitées. Une accumulation de tubulines est décelée dès le 4^{ème} jour pour l' α , et dès le 1^{er} pour la β . Leurs taux sont supérieurs à ceux du témoin.

Dans le témoin, une coévolution de l'actine et de l' α tubuline caractérise la phase d'induction. La phase d'expression est marquée par une évolution simultanée des deux tubulines. En présence de caféine, l'actine et la β tubuline coévoluent. Seule, l' α tubuline présente de fortes variations pendant la phase d'induction. Un maintien des stocks des deux tubulines est observé à partir de J4.

Les observations cytologiques nous conduisent à suggérer que ces protéines du cytosquelette ne sont pas employées lors de la réorganisation des réseaux, inhérente à la mise en place des futures mitoses, ou que leur régulation est fortement perturbée. Ces molécules pourraient être stockées dans les CR, dont très peu d'entre elles atteignent le stade CE en présence de l'inhibiteur. La caféine altère donc la progression des CR dans le processus de dédifférenciation. La coévolution des deux tubulines chez le témoin suggère qu'elle est nécessaire à la mise en place d'une cytokinèse normale.

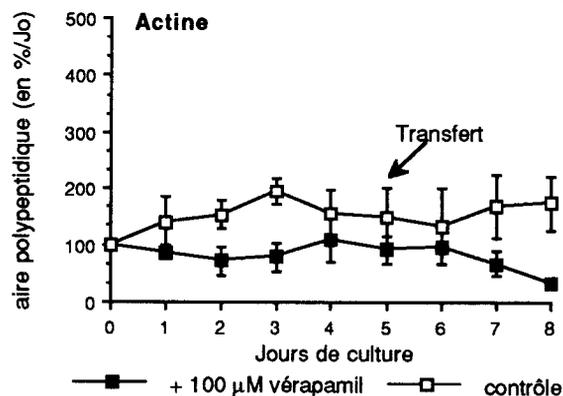
4. VARIATIONS DE L'ACTINE ET DES TUBULINES EN PRESENCE DE VERAPAMIL

4.1 Variations quantitatives de l'actine

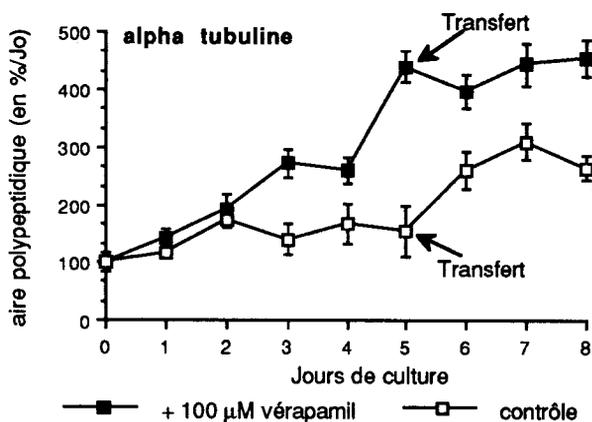
Ces variations sont représentées dans la Fig. 23A. Une phase stationnaire est observée entre J0 et J3, où la quantité d'actine augmente légèrement de J3 à J4. Après une phase de maintien, celle-ci amorce une chute dès 24h après le transfert des explants sur le milieu d'expression.

Figure 23: Evolution quantitative de l'actine et des tubulines au cours d'une culture de feuilles du *Cichorium* hybride '474' en présence (■) ou non (□) de 100 μM de vérapamil pendant toute la culture. Valeurs moyennes ± écart type (3 répétitions). **A:** actine, **B:** α tubuline, **C:** β tubuline.

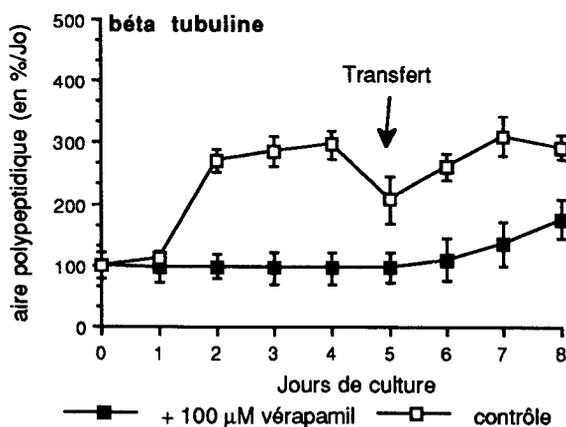
A :



B :



C :



4.2 Variations quantitatives des tubulines

Les fluctuations du taux de l' α tubuline sont caractérisées par deux zones séparées par un pallier (Fig. 23B). La première dure 3 jours (J0 à J3) et se caractérise par une augmentation régulière de la quantité. Un plateau est atteint au 3^{ème} jour de culture. Une très forte augmentation est observée avant le transfert (entre J4 et J5), puis le taux se maintient après le transfert. Il demeure élevé pendant la phase d'expression, avec des variations relativement faibles.

Le vérapamil affecte tout particulièrement la quantité de la β tubuline (Fig. 23C). En effet, comme pour l'actine, aucune variation significative n'est mesurée lors de la phase d'induction. Par contre, dès le 2^{ème} jour après le transfert (J5+2), la quantité augmente régulièrement.

4.3 Conclusions

Pendant la phase d'induction, les quantités d'actine et de β tubuline demeurent constantes dans les feuilles cultivées en présence de vérapamil alors qu'elles augmentent dans les feuilles témoins. La quantité d' α tubuline augmente beaucoup dans les feuilles traitées pendant toute la durée de la phase d'induction, alors que dans les feuilles témoins, elle demeure stationnaire à partir du 2^{ème} jour.

Pendant la phase d'expression, le vérapamil a une action opposée sur l'évolution des tubulines. La quantité d' α tubuline reste très élevée; celle de la β est faible, bien qu'elle augmente régulièrement au cours de cette phase de culture.

Ces résultats suggèrent que la diminution de l'actine est préjudiciable à une induction de CE et que le découplage des α et β tubulines pendant la phase d'expression perturbe le développement des eS; en effet aucun eS de type allongé ou cotylédonnaire n'est détecté.

5. CONCLUSIONS

L'action classique de la caféine sur la cytocinèse a été confirmée lors de l'ES des feuilles de *Cichorium* diploïdes. Une réactivation nucléaire peut être observée. Toutefois, la migration nucléaire prémitotique est perturbée, ce qui suggère une action inhibitrice sur la réorganisation, et/ou, sur le fonctionnement du cytosquelette, ainsi que sur le positionnement du phragmosome. La caryocinèse est normale même si des particularités cytologiques ont été mises en évidence au niveau des nucléoles (extrusion partielle ou totale, nombre et taille).

La cytocinèse est perturbée et entraîne la formation de cellules binucléées, ou de structures coenocytiques constituées de plusieurs noyaux individualisés ou fusionnés. Des embryons de type chimérique ont d'ailleurs été découverts. La présence de caféine pendant la première phase de culture induit des effets qui peuvent être observés même après son élimination du milieu de culture. En effet, des structures embryonnaires anormales persistent et côtoient des embryons multicellulaires. L'action de la caféine pourrait être rémanente car des cellules binucléées, sans doute induites lors de la première phase de culture, sont encore présentes.

Cet inhibiteur réduit aussi le potentiel embryogène, et provoque des perturbations au niveau des protéines majeures du cytosquelette.

Le vérapamil entraîne une diminution du nombre d'eS (DUMINY, 1993), mais n'empêche pas leur induction dans la concentration employée (100 μ M). La phase d'induction est caractérisée par un écart très important entre les deux quantités de tubulines, mais avec, cette fois, une altération plus prononcée de celle de la β tubuline. La quantité d'actine chute pendant la phase d'expression. Le blocage des canaux calciques, et des signaux qu'ils devraient engendrer, altère donc la régulation des tubulines d'une façon différente de la caféine.

Les deux inhibiteurs employés ne causent pas les mêmes effets d'un point de vue cytologique. La caféine altère la maturation de la plaque cellulaire, et, dans la condition testée pour l'analyse, inhibe la formation de structures embryonnaires. Le vérapamil bloque les canaux calciques, diminue le nombre d'eS induits et bloque leur développement au delà du stade globulaire. Ces deux inhibiteurs provoquent des modifications dans l'évolution des protéines du cytosquelette.

RECHERCHE DE MARQUEURS CORRELES A L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE

DUBOIS et al. (1992) et VERDUS et al. (1993) ont montré qu'il existait une relation entre la MEC et le cytosquelette. Nous avons montré, au cours des résultats précédents, l'importance du cytosquelette dans la mise en place, et le bon déroulement de la première division embryogène, ainsi que pour les mitoses embryonnaires ultérieures. Une altération spécifique d'une des phases de la mitose, en l'occurrence la cytokinèse, appliquée pendant l'une ou l'autre phase de culture, modifie l'expression des protéines du cytosquelette et en perturbe la régulation.

Dans cette quatrième partie, nous nous proposons de centrer notre étude sur les glycoprotéines, dont certaines constituent la MEC. Cette matrice est liée à la phase de développement embryonnaire, au moment où les eS ne sont pas encore muni d'un protoderme (DUBOIS et al., 1991). Elle est présente à la fois à la surface des eS foliaires et racinaires (DUBOIS et al., 1991, 1992). Différentes études ont permis de caractériser sa nature biochimique: lipo-glycoprotéique (DUBOIS et al., 1992; VERDUS et al., 1993).

Dans l'optique de définir les rôles éventuels de la MEC et de ses composants glycoprotéiques, deux inhibiteurs de la glycosylation ont été employés au cours d'une culture de feuilles de *Cichorium* diploïdes :

- la tunicamycine (TM) qui affecte spécifiquement la glycosylation en N- des protéines,
- la déoxynojirimycine (dNM) qui n'agit que sur la glycosylation en O- des protéines.

Les feuilles sont observées après 7 jours de transfert (J5+7).

Dans le cadre d'une recherche de marqueurs pariétaux, nous avons élargi notre étude à la mise en évidence de la callose (polymère de β 1,3 glucose) qui constitue un marqueur des CE foliaires (DUBOIS et al., 1990). Par ailleurs, VERDUS et al. (1993) ont montré la présence Ca^{2+} vacuolaire et de structures tubulaires au niveau du plasmalemma des cellules embryogènes. Or, la présence de callose liée à une libération de calcium intracellulaire a déjà été décrite par KAUSS et JEBLICK (1985) dans les cellules de soja. Compte-tenu de la présence d'une MEC probablement liée au cytosquelette, et de sa présence autour des eS

foliaires et racinaires, nous avons étudié les modalités du dépôt de callose autour des CE au sein de racines induites dans différentes conditions. D'autre part, nous avons tenté d'analyser plus particulièrement les relations possibles entre le dépôt de callose (ES précoce) et le cytosquelette. Pour cela, nous nous sommes basés sur les travaux de DUBOIS et al. (1992). Ces auteurs ont altéré voire éliminé la MEC par des traitements connus pour destabiliser le cytosquelette. Nous les avons appliqués à des racines de *Cichorium* diploïdes induites, puis les CE présentant cet élément pariétal (observé en microscopie UV) ont été dénombrées.

1. LES GLYCOPROTEINES INTRATISSULAIRES

Les explants foliaires de différentes chicorées embryogène (*Cichorium* hybride '474') ou non embryogènes (*C. intybus* cv. '206' et cv. 'Flash') ont été cultivés pendant 5 jours puis repiqués dans le même milieu dépourvu de glycérol. Des racines de l'hybride '474' ont aussi été induites. Des prélèvements ont été effectués quotidiennement. Les glycoprotéines sont ensuite révélées sur une membrane par la ConA couplée à une phosphatase alcaline. Un témoin réalisé avec son substrat spécifique (α methyl D mannose) n'a pas montré d'aspécificité.

L'ensemble des protéines révélées est repris dans le Tableau 10 et quelques exemples de diagrammes électrophorétiques sont donnés dans les Figures 24 et 25. Globalement, leur nombre varie peu entre chicorées embryogène ou non et entre organes, les différences sont plus d'ordre quantitatif notamment dans le cas des racines de l'hybride '474'. La gamme des poids moléculaires sont similaires.

1.1 Variabilité des glycoprotéines

1.1.1 Variabilité en fonction du génotype

Douze groupes de glycoprotéines, ou glycoprotéines uniques, sont choisis parmi le Tableau 9. Ces glycoprotéines sont retrouvées dans les extraits de *Cichorium* (Tableau 10). Les racines présentent une gamme de poids moléculaire plus étendue notamment pour les faibles PM (Fig. 24A).

<i>Cichorium</i> '474'	racines
18 protéines	25,8 à 102,1 kDa
<i>Cichorium</i> '474'	feuilles
14 protéines	25,5 à 126,4 kDa
<i>Cichorium</i> cv. 'Flash'	feuilles
14 protéines	26,3 à 127 kDa
<i>Cichorium</i> cv. '206'	feuilles
17 protéines	29 à 128 kDa

Tableau 9: Nombre et poids moléculaires des glycoprotéines révélées par la conA sur des membranes de nitrocellulose. Différentes sources et organes de chicorées ont été utilisés pour la réalisation des extraits protéiques.

PM (kDa)	'474'				embryon 3 sem.	'206'	'Flash'
	feuilles			racines		feuilles	feuilles
	témoin	caféine	vérapamil				
126	x	o	o	o	x	x	x
111	x	x	x	x	o	x	x
102	x	x	o	x	x	x	x
94	x	x	o	x	o	x	x
91	x	o	o	x	o	o	x
77-80	x	x	o	x	o	x	x
69-71	x	x	x	x	x	x	x
58-61	x	x	x	x	x	x	x
55-56	x	x	o	x	o	x	x
44-47	x	o	x	x	x	x	x
28	x	x	o	x	x	x	x
25,5	x	o	o	x	x	o	x

Tableau 10: Récapitulatif des protéines communes, révélées par la concanavaleine A (ConA) conjuguée à la phosphatase alcaline (site α méthyl-D-mannose), chez différentes sources de chicorées et différents organes de l'hybride '474'. La présence d'une glycoprotéine est symbolisée par (x), son absence par (o).

Si l'on se base sur les glycoprotéines détectées dans les feuilles de l'hybride '474' comme témoin (Fig. 24B), on s'aperçoit que le cv. 'Flash' possède les mêmes que l'hybride embryogène. Deux protéines sont absentes chez le cv. '206' (91 kDa et 25,5 kDa) (Fig. 24C), et une dans les racines de l'hybride '474' (126 kDa). Il est donc difficile de relier la présence de telle ou telle glycoprotéine :

- aux potentialités embryogènes des différents types de chicorées,
- à une organo-spécificité sans lien avec l'ES.

1.1.2 Variabilité au cours d'une culture de feuilles de l'hybride '474'

Au cours de la culture des feuilles de l'hybride '474', la protéine de 126 kDa subit des variations d'intensité au niveau de sa révélation. Elle apparaît à J₃, puis son intensité augmente jusqu'à J₅ où elle reste alors constante. Chez le cv. '206', celle-ci apparaît et reste constante dès J₀. Le même comportement est observé chez le cv. 'Flash' mais à J₃.

1.2 Effets de la caféine et du vérapamil

Si l'on compare les différentes expériences menées chez l'hybride '474', on remarque que l'eS âgé de 3 semaines possède 58 % des glycoprotéines mises en évidence dans les feuilles. Or, cet eS ne présente plus de MEC.

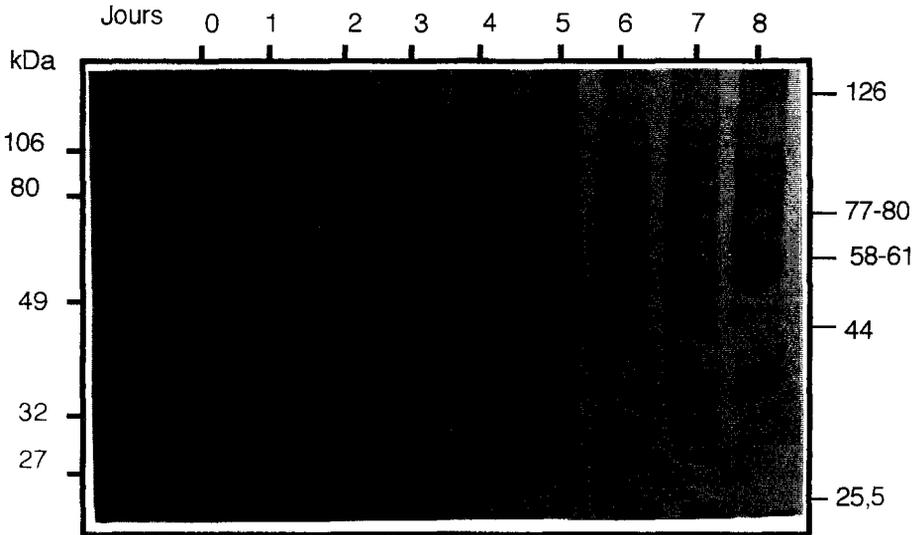
Les conditions inhibitrices entraînent la disparition des glycoprotéines des groupes suivants (Fig. 25A et 25B) :

conditions inhibitrices	polypeptides perdus (kDa)
caféine (5 mM) 12 glycoprotéines	126- 91- (44-47)- 25,5
vérapamil (100 µM) 13 glycoprotéines	126- 102- 94- (77-80)- (55-56)- 28- 25,5

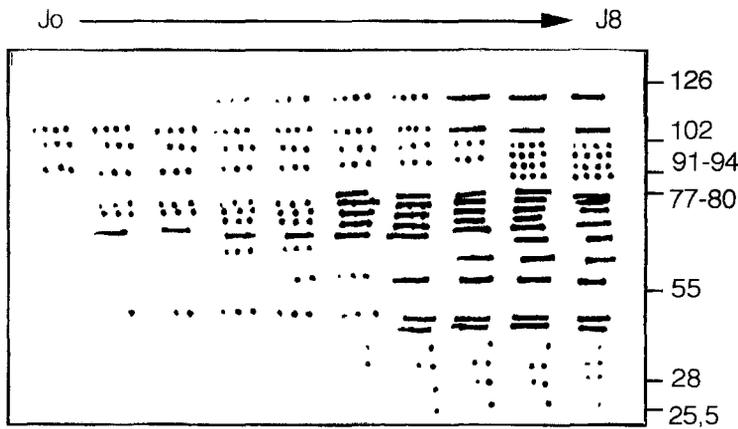
Trois protéines sont perdues quel que soit l'inhibiteur (126 kDa, 91 kDa et 25,5 kDa).

Figure 24: Glycoprotéines intratissulaires révélées par la Concanavaleine A couplée à une phosphatase alcaline. **A**: Racines de l'hybride '474', **B**: représentation schématique des glycoprotéines d'extraits de feuilles de l'hybride '474', **C**: Représentation schématique des glycoprotéines d'extraits de feuilles du cv. '206'.

A:



B:



C:

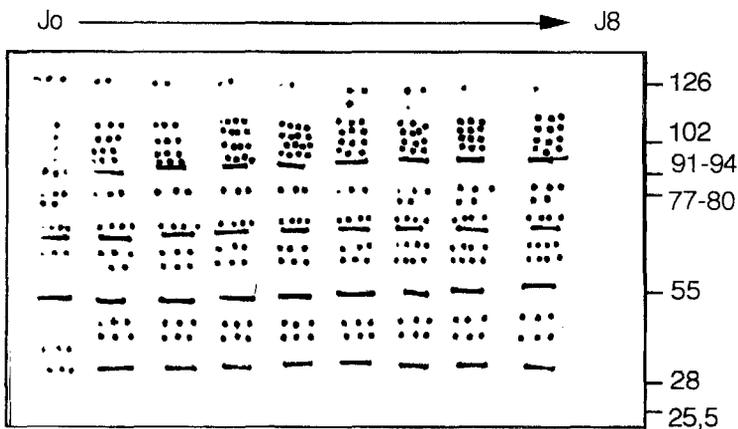
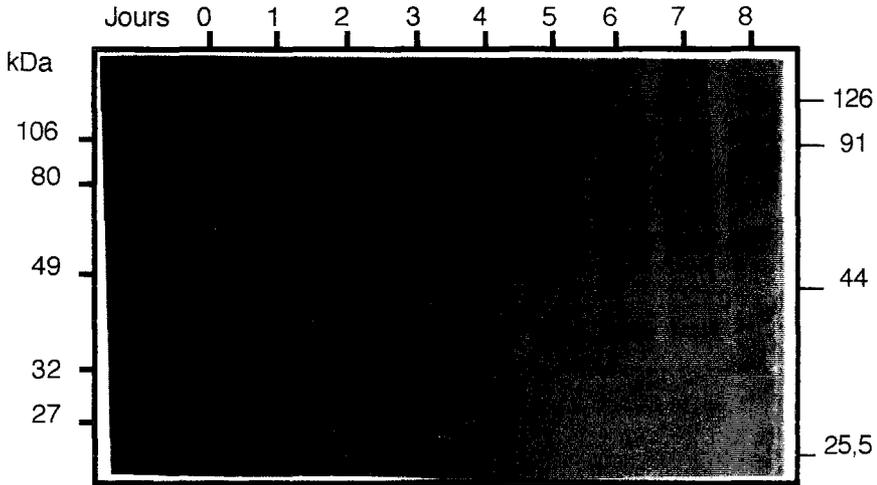
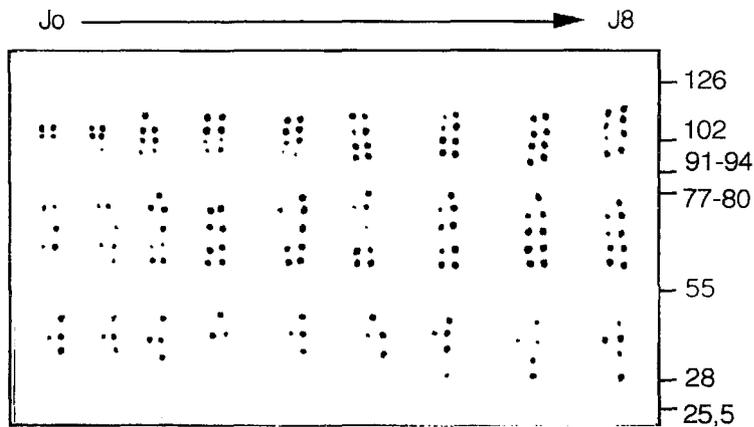


Figure 25: Glycoprotéines intratissulaires révélées par la ConA couplée à la phosphatase alcaline au cours d'une culture de feuilles de l'hybride '474' en présence d'inhibiteurs (J₀ à J₅₊₃). **A:** Caféine (5 mM), **B:** Représentation schématique des glycoprotéines révélées dans des extraits de feuilles cultivées en présence de vérapamil (100 μM).

A:



B:



1.3 Effets d'inhibiteurs de la glycosylation

1.3.1 Effets de la tunicamycine

Compte-tenu des résultats présentés dans la littérature (sur des suspensions cellulaires de carotte), nous avons employé la dose la plus forte (soit $2,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) comme dose initiale, puisque le matériel végétal utilisé est un tissu. L'observation de coupes de feuilles incluses dans la paraffine montre que la présence de TM affecte le potentiel embryogène. Pour les conditions n'entraînant aucune nécrose, on dénombre $14,4 \text{ eS}.\text{mm}^{-2}$ pour la condition $12,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et $8,52 \text{ eS}.\text{mm}^{-2}$ pour la condition $25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Ces valeurs correspondent environ au quart de ce qui est observé dans la condition témoin.

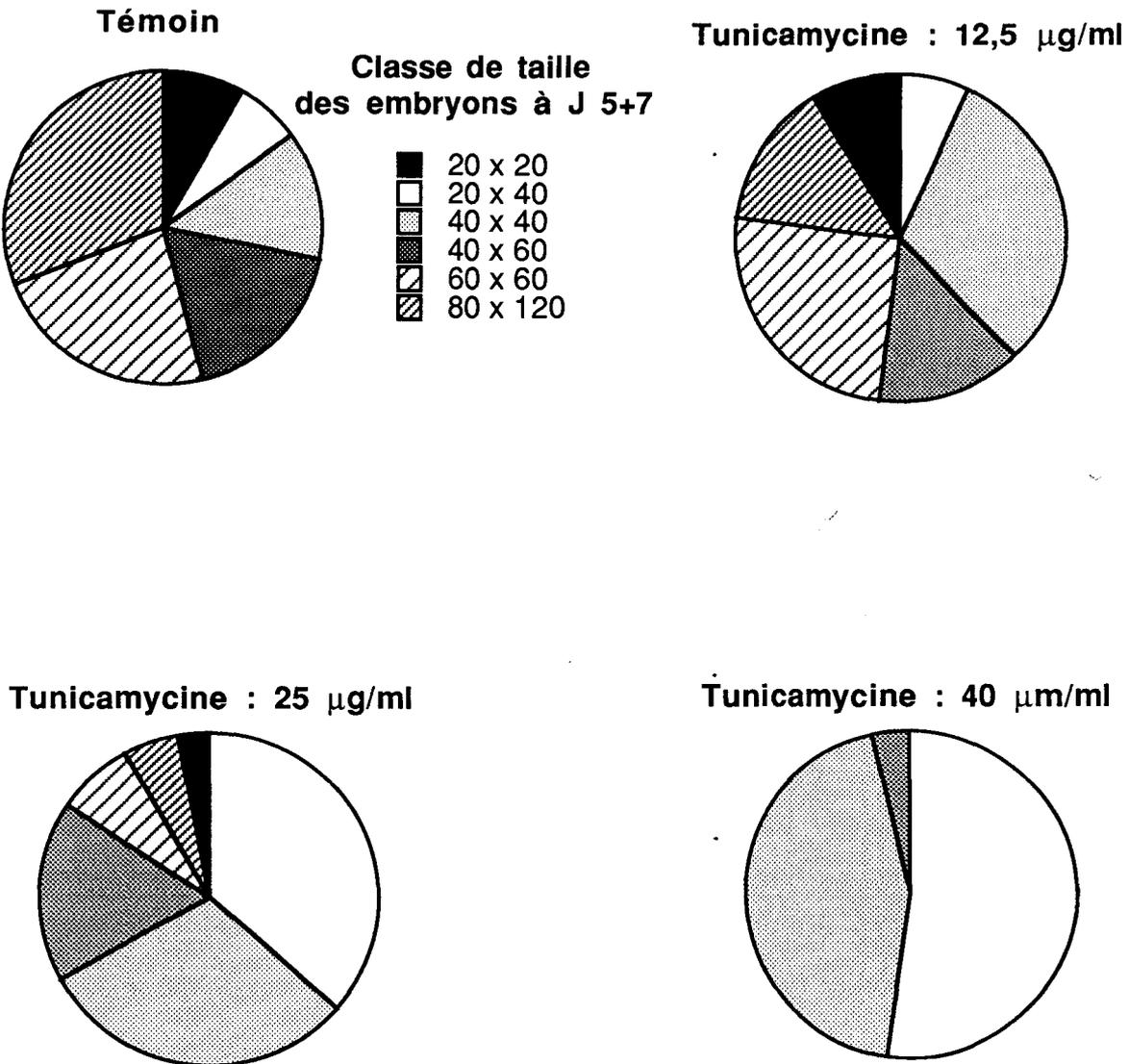
L'analyse de coupes foliaires a permis de répartir les eS selon leur taille (dans le plan de coupe). La taille d'un eS s'estime par sa surface dans le plan de coupe. Celle-ci se caractérise par sa grandeur et par le rapport longueur / largeur de l'eS (si le rapport est proche de 1, l'eS est de forme globulaire).

Six classes de taille ont été choisies pour ce dénombrement. Celles-ci sont toutes représentées dans le témoin et la condition inhibitrice minimale ($12,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) (Fig. 26A). Les plus petits ($20 \times 20 \mu\text{m}$), comme les plus gros eS allongés ($80 \times 120 \mu\text{m}$), sont décelés dans une proportion semblable.

Aucun effet significatif n'a été décelé pour des doses inférieures à $12,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de TM. Pour cette dernière concentration, des eS sont toutefois dénombrés en observant le limbe des feuilles colorés par le lugol. Après 6 jours de la culture, quelques petits eS globulaires apparaissent et sont particulièrement visibles près de faisceaux vasculaires. Au 8^{ème} jour, le nombre d'eS augmente, et leurs tailles sont variables. Après 12 jours de culture, la quantité d'eS ne semble pas avoir été modifiée; les petits eS se sont développés, et ont atteint la taille des plus gros eS observés au 8^{ème} jour. Ainsi, l'addition de faibles doses de TM n'empêche pas l'induction embryogène. La répartition des eS ainsi obtenue est très comparable à celle par classe de taille de la condition témoin (Fig. 13B) (la classe 2 (eS bicellulaires) comprend des eS issus des deux classes de taille suivantes $20 \times 20 \mu\text{m}$ et $40 \times 40 \mu\text{m}$).

L'application de doses supérieures à $40 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ entraîne une nécrose des tissus, notamment pour la concentration maximale de $80 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Dans ce cas, aucun eS n'est détecté dans les feuilles colorées par le lugol et observées par transparence.

Figure 26: Répartition par classes de taille des embryons dans les feuilles cultivées 12 jours en présence de tunicamycine. Nombre d'embryons à J5+7 entre parenthèses. **A:** Témoin ($n= 26,6 \text{ eS.mm}^{-2}$), **B :** $12,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n= 14,4 \text{ eS.mm}^{-2}$), **C:** $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n= 8,52 \text{ eS.mm}^{-2}$), et **D:** $40 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n=8,47 \text{ eS.mm}^{-2}$). Observation sur 10 lames.



L'addition de $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ augmente très nettement la part des petits eS de type isodiamétrique ($20 \times 20 \mu\text{m}$; $20 \times 40 \mu\text{m}$; $40 \times 40 \mu\text{m}$) (Fig. 26B). La part des plus gros eS est réduite, mais les 6 classes de taille sont encore présentes.

L'addition de $40 \mu\text{g.ml}^{-1}$ élimine les trois classes d'eS suivantes: $40 \times 60 \mu\text{m}$, $60 \times 60 \mu\text{m}$ et $80 \times 120 \mu\text{m}$ (Fig. 26C). La troisième classe ($40 \times 40 \mu\text{m}$) correspond à 3,6 % des structures embryonnaires dénombrées, les deux premières classes ($20 \times 20 \mu\text{m}$ et $20 \times 40 \mu\text{m}$) se partageant 96,4 % du reste des eS.

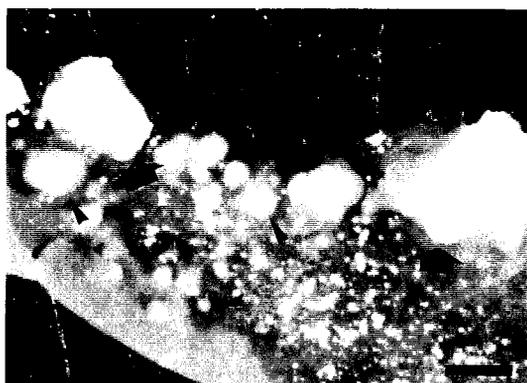
1.3.2 Effets de la déoxynojirimycine

Les doses employées dans la littérature sont proportionnellement plus élevées que pour celles de la TM. Aussi, nous avons utilisé une très forte concentration de dNM dans le milieu de culture, soit $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

L'observation de feuilles induites en présence de cet inhibiteur pendant 12 jours montre que de très nombreux embryons sphériques apparaissent sur le pourtour des feuilles (Fig. 27). Ces eS sont visibles avec la loupe binoculaire. D'autres structures embryonnaires sont aussi présentes à l'intérieur du limbe. Après 12 jours de culture, aucun eS au stade cotylédonnaire n'est observé. La dNM affecte particulièrement le développement des embryons.

Des doses supérieures à $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de dNM n'ont pas été employées, d'autant que cette molécule intervient tardivement dans le phénomène embryogène.

Figure 27: Limbe d'une feuille cultivée en présence de déoxynojirimycine ($250 \mu\text{g.ml}^{-1}$): J₅₊₇, de très nombreux embryons sont observés à la loupe binoculaire. Des structures de forme globulaire et de différentes tailles (tête de flèche, flèche) sont observées.



Feuilles du *Cichorium* hybride '474' diploïdes. Barre = 3 mm

1.3.3 Effets de tels inhibiteurs sur le développement des embryons

Nous avons tenté d'observer la capacité germinative de ces eS globulaires induits en présence d'inhibiteurs, en repiquant les explants de feuilles traitées ou non sur du milieu solide sans inhibiteur pendant 10 jours. La présence de TM inhibe particulièrement le développement des eS au delà des stades globulaires. Un pôle racinaire se met en place, mais le pôle caulinaire est anormal. Une structure de type nodulaire apparaît fréquemment au niveau de l'hypocotyle et se recouvre de fins poils absorbants. Une seule feuille se développe, mais reste assez petite.

L'addition de dNM semble moins altérer la poursuite du développement embryonnaire. Le pôle caulinaire est présent. Aucun cal ni nodule ne sont observés à la base de la feuille. Dans les deux cas, nous n'avons pas pu obtenir de grandes plantules. Les vitroplants se développent peu puis se nécrosent.

Des plantules ont été obtenues à partir d'eS issus de feuilles non traitées (témoin). Leur faible nombre est lié au fait que ces eS se détachent moins facilement que dans les racines; ces dernières sont utilisées préférentiellement dans la propagation de l'hybride '474'.

En conclusion, la présence d'inhibiteurs spécifiques de la glycosylation altère le développement des eS qui restent majoritairement globulaires. Leur élimination du milieu de culture permet aux eS d'atteindre le stade cotylédonnaire, uniquement dans le cas de l'addition de dNM (glycosylation des O -protéines). Ces résultats suggèrent l'importance d'une glycosylation correcte des protéines, lors de la phase d'induction et de la phase d'expression (12 premiers jours). L'altération des N- protéines (comparativement aux effets causés par la dNM) dans ces deux phases semble particulièrement néfaste au bon déroulement du développement embryonnaire ultérieur (observation après 22 jours).

1.4 Conclusions

Hormis une différence de révélation en intensité de la protéine de 126 kDa en fonction de la phase de culture et du type de chicorée, peu de variations significatives sont détectées au niveau intracellulaire. Le blocage des canaux calciques affecte plus particulièrement la synthèse de telles glycoprotéines (le calcium pourrait-il intervenir en tant que signal d'induction de synthèse ?). Par contre, la caféine, qui altère la cytokinèse, inhibe un tiers des glycoprotéines présentes normalement dans les feuilles. Elles doivent donc faire partie intégrante

d'une régulation cellulaire générale et complexe, bien que leurs rôles, et leur implication dans le processus embryogène, ne soient pas encore connus. Globalement, on remarque que de nombreuses glycoprotéines sont décelées dans les feuilles de l'hybride '474'; elles apparaissent tout au long de la culture. Aucune ne semble spécifique d'une phase précise du processus embryogène (réactivation, première mitose, mitoses embryonnaires).

L'inhibition de la glycosylation des protéines (en N- ou O-) n'empêche pas l'induction embryogène, qui est faible, mais affecte surtout le développement des eS d'une façon irréversible (TM) ou non (dNM). Dans ce dernier cas, après l'élimination de cet inhibiteur, les eS possèdent une bipolarité normale et sont capables de régénérer des petites plantules. Ces inhibiteurs ont des effets tardifs.

2. LA CALLOSE, MARQUEUR PRECOCE DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DANS LES RACINES ?

DUBOIS et al. (1990) ont montré que ce polymère pouvait être considéré comme un marqueur précoce de l'ES dans les feuilles de l'hybride '474'. Nous avons donc essayé de déceler sa présence au cours des tous premiers jours de l'induction des racines. D'autre part, de nombreux auteurs suggèrent qu'il existe un continuum MEC- membrane plasmique - cytosquelette (DUBOIS et al., 1992; VERDUS et al., 1993; WYATT et CARPITA, 1993; REUZEAU et PONT-LEZICA, 1995). Ces éléments nous ont conduits à appliquer des traitements physicochimiques altérant ce continuum. Les expériences sont effectuées sur des fragments de racines mis en culture dans le milieu décrit dans l'Annexe 1 (il n'y a pas de synchronisation de la première division chez ce type d'explant). Une quarantaine de fragments sont utilisés pour le dénombrement des CE. La callose est mise en évidence par le fluorochrome bleu d'aniline (Annexe 16). La moyenne du nombre de CE obtenue est alors ramenée pour un centimètre de racine.

L'observation de racines non induites ne permet pas la détection de ce polymère (Pl. 16A). Il est néanmoins présent lorsque les racines sont mécaniquement stimulées auquel cas, la callose est dite callose traumatique. Elle peut apparaître au niveau des plasmodesmes (Pl. 16B). Ce polymère glycanique est normalement présent au niveau de la plaque cellulaire; il est d'ailleurs détecté dans un apex racinaire (Pl. 16C).

Au 3^{ème} jour de culture, de la callose est décelée dans les cellules sous épidermiques. Plus tardivement (J5), de rares cellules proches de la stèle montrent une fluorescence caractéristique de la présence de callose. D'abord sous forme de spots, la callose forme, par la suite, des plages qui s'étendent jusqu'à constituer des zones très fluorescentes de couleur jaune (Pl. 16D). Ce type de dépôt est particulièrement différent de la callose traumatique. Le nombre de cellules présentant ces dépôts augmente au cours de la culture (Pl. 16E). Aucun dépôt de callose n'a été détecté dans les racines du cv. 'Flash' (*C. intybus* non embryogène) cultivées dans les mêmes conditions.

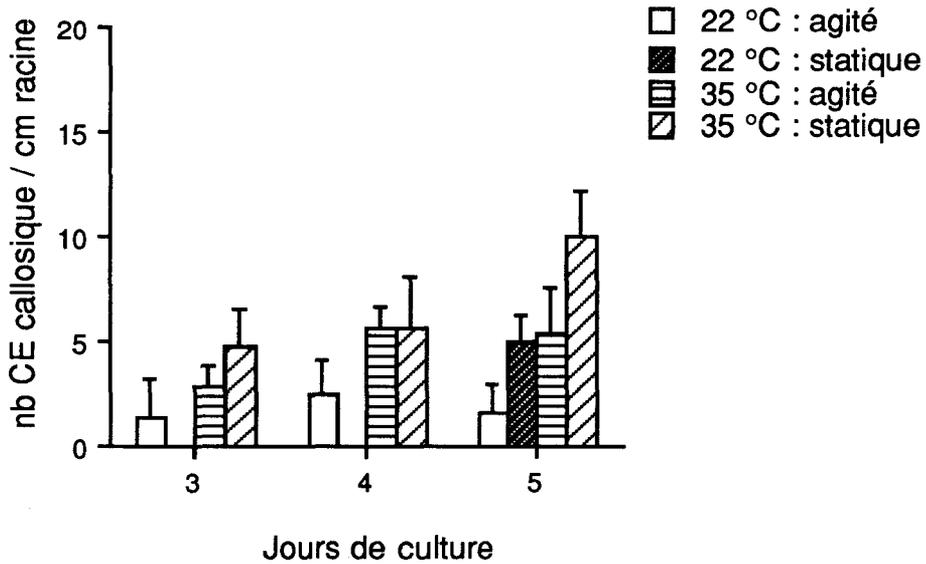
2.1 Influence du milieu et des conditions de culture

Dans un premier temps, les conditions optimales de propagation de l'hybride par les racines ont été employées (35 °C, obscurité, agitation). L'apparition de très nombreux eS et le gonflement des cellules racinaires ont généré le marquage de la callose. Aussi n'avons-nous pas pu déterminer le nombre de cellules réactives au bleu d'aniline. Ce paramètre a donc été recherché dans d'autres conditions de culture facilitant l'observation et où l'induction embryogène est retardée. Deux températures ont été testées, 22 °C ou 35 °C, ainsi que deux compositions de milieux de culture décrites dans les Annexes 1 et 2. Les cultures ont été placées, soit sur un agitateur orbital, soit sur une étagère de la salle de culture (statique). Toutes les expériences sont menées à l'obscurité.

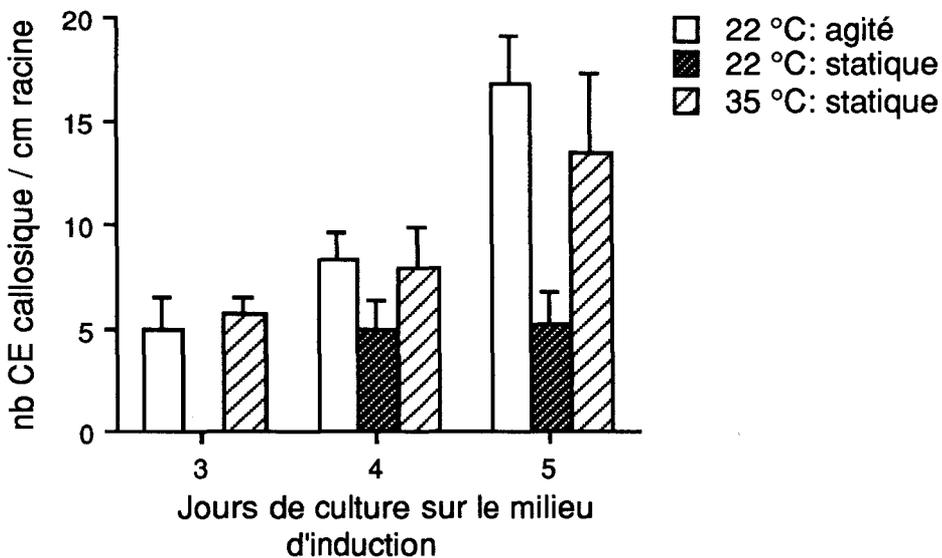
Compte tenu que nous ne pouvions pas utiliser la condition optimale pour l'obtention des eS racinaires, nous avons employé la condition suivante: 35°C- statique- milieu d'induction (composition Annexe 1) parmi les conditions de culture restantes (Fig.28A). La condition la plus défavorable est : 22 °C- statique- milieu modifié de Heller (décrit dans l'Annexe 2) (Fig. 28B). D'autre part, le nombre de fragments racinaires contenant de telles cellules varie en fonction du milieu de culture :

- milieu d'induction embryogène (Annexe 1) : 60 % des fragments présentent des cellules callosiques,
- milieu modifié de Heller (Annexe 2) : 40 % de réponse.

Figure 28: Evolution du nombre de CE présentant de la callose au cours d'une culture de racines de l'hybride "474" dans différents milieux. Effets de la température et du mode de culture. Nombre moyen \pm écart type (40 fragments).



A: Culture des racines dans un milieu modifié de Heller (Annexe 2).



B: Culture des racines dans le milieu d'induction (Annexe 1).

Les tests de Student, effectués à J5, montrent que, quel que soit le milieu, la température et les conditions de culture influencent, d'une façon très significative, la production de CE callosiques (Tableau 11):

conditions comparées	22 °C agitation	22 °C statique
22 °C - agitation statique	*** (26,1)	*** (26,1)
35 °C statique	*** (4,68)	*** (12,58)

Tableau 11: Degré de signification du test de Student effectués sur le nombre de CE présentant de la callose dans des fragments racinaires cultivés 5 jours dans le milieu d'induction. Les valeurs calculées sont entre parenthèses. ***: hautement significatif ($P < 0,01$).

Compte-tenu de ces résultats, nous avons appliqué des conditions de culture les plus proches de celles qui sont optimales, à savoir: 35 °C- milieu d'induction- statique. En effet, le fait d'agiter les cultures est très favorable à l'ES, mais perturbe l'analyse quantitative des CE présentant de la callose.

2.2 Relation callose-cytosquelette

Des traitements sont réalisés aux 4^{ème} et 5^{ème} jour de culture de racines de l'hybride '474'. Ceux-ci sont spécifiques de la nature biochimique des éléments étudiés. Ainsi, le mélange éther-méthanol détruit une partie des lipides de la MEC. La composante protéique et cellulosique du continuum MEC- membrane plasmique - cytosquelette peut être partiellement détruite par l'action d'enzymes. L'action de la température agit plus particulièrement sur la composante cytosquelettique (dépolymérisation des Mts).

Les traitements comportant une mise en contact des fragments induits avec le mélange éther-méthanol (1/1, v/v; 15 ou 40 minutes), une digestion des composés pectiques par la Caylase M2 (1 mg.ml⁻¹, 30 °C , 3 h), ainsi que l'emploi de la Pronase E (1mg.ml⁻¹ dans Tris-HCl 0.05 M pH = 7,2; 30 °C, 3 h), ont été néfastes à la détection des CE callosiques racinaires. En effet, aucun dépôt de callose n'a été décelé dans ces fragments traités.

La séquence de température a donné des résultats repris dans le Tableau 12:

	0 °C - 6 h		0 °C - 6 h 35 °C - 9h		témoin : 35 °C	
	% fragments	nb CE	% fragments	nb CE	% fragments	nb CE
4 ^{ème} jour	15	1,5	30	4,7	40	5,3
5 ^{ème} jour	0	0	4	3,2	40	7,2

Tableau 12: Influence de la température sur la détection de cellules embryogènes comportant une couche callosique (mise en évidence par le bleu d'aniline). Le pourcentage de fragments racinaires contenant de telles cellules est donné, ainsi que nombre moyen de CE callosiques (sur 40 fragments). Les échantillons sont cultivés de façon statique dans le milieu d'induction.

Le nombre de fragments racinaires contenant des CE callosiques, après remise des explants à 35 °C, est supérieur à celui obtenu dans la condition 0 °C-6h. Le changement de température favorise donc une nouvelle synthèse de callose autour des CE. En effet, le nombre de CE (moyenne sur 40 fragments) détectée n'est pas significativement différent de la condition témoin au 4^{ème} jour de culture. Toutefois, l'application d'une telle séquence thermique est plus active quand elle se déroule au 5^{ème} jour de culture. Ainsi, le nombre de fragments racinaires induits et le nombre moyen de CE callosiques sont plus faibles que ceux obtenus au 4^{ème} jour de culture, et que ceux de la condition témoin.

2.3 Conclusions

La présence de callose lors d'un phénomène embryogène précoce est confirmée dans les racines du *Cichorium* hybride '474' induites dans les conditions suivantes: 35 °C-statique. Ce type de matériel présente l'avantage de ne pas contenir de chlorophylle perturbant la détection de ce polymère en fluorescence, et ce dernier peut ainsi être directement décelé au sein du tissu induit. L'obtention d'un grand nombre de CE nécessite la réunion de plusieurs facteurs, notamment le type de milieu et la température, mais leur observation s'est effectuée en modifiant légèrement les conditions optimales.

3. CONCLUSIONS

Bien qu'il y ait des changements cytologiques causés par l'induction embryogène, les glycoprotéines intratissulaires ne semblent pas spécifiques de cette potentialité chez l'hybride '474'. En effet, le cv. 'Flash' possède les mêmes groupes de glycoprotéines. Leur présence est affectée par l'addition d'inhibiteur de la cytokinèse, et plus particulièrement, par celle du vérapamil dont les effets se concentrent sur les canaux calciques. Ainsi, le message de synthèse pourrait être perturbé.

L'inhibition de la glycosylation des protéines altère le développement des eS au delà du stade globulaire. Un effet toxique est observé pour les doses élevées de TM, et semble persister, dans une moindre mesure, après l'élimination des inhibiteurs, puisque le développement des plantules est ralenti. La présence de protéines correctement glycosylées semble donc nécessaires à l'eS.

Des changements pariétaux s'opèrent au cours de l'ES. En effet, la présence de callose autour des CE, dans les racines induites, est confirmée. Cet élément constitue bien un marqueur précoce intéressant (dès J₃). Des traitements affectant la constitution de la paroi (éther-méthanol, enzymes) et le cytosquelette (froid) ont causé une diminution du nombre de CE comportant de la callose, ce qui pourrait suggérer sa présence transitoire au sein de la MEC. La recherche d'autres molécules (intégrines, protéines de type RGD, pseudo-vitronectine) pourraient confirmer la présence d'un continuum MEC- membrane - cytosquelette et constituer ainsi des marqueurs. Jusqu'à présent, nous n'avons pas pu déceler la présence de pseudo-vitronectine ni d'intégrines (anticorps fournis par Sigma) sur des coupes en cryostat de feuilles de l'hybride '474' bien qu'elles soient présentes chez d'autres systèmes végétaux (ZHU et al., 1993). D'autres essais devraient être envisagés.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Réactivation cellulaire et compétence à l'embryogenèse somatique

Les mécanismes inducteurs de l'ES chez *Cichorium* sont encore mal connus. Ce travail nous a permis de déterminer quelques éléments cytologiques et biochimiques corrélés à la réactivation cellulaire des cellules cibles. Cette réactivation se caractérise par une augmentation de la taille du noyau et son déplacement vers le centre de la cellule (BLERVACQ et al., 1995a). On note aussi une forte augmentation du volume nucléolaire qui précède les variations de la synthèse des protéines dans les feuilles cultivées en condition d'induction (HILBERT et al., 1992; BOYER et al., 1993).

Les cellules cibles sont des cellules qui sont capables de se différencier puis de former un eS. L'aptitude à recevoir un signal mitogène et à lui répondre a été étudié chez des protoplastes de *Petunia* par l'analyse de l'expression du gène *cdc2+* (cycline) (BERGOUNIOUX et al., 1992). NUTI-RONCHI et al. (1992a, 1992b, 1993), GIORGETTI et al. (1995) et NUTI-RONCHI (1995) qui montrent que des cellules embryogènes présentes dans une suspension cellulaire de carotte passent par une phase transitoire haploïde: c'est le phénomène de méïose somatique. Cette hypothèse ne semble pas généralisable chez la Chicorée. En effet, une bande préprophasique a été mise en évidence au cours de la phase G₂, et son absence au cours de la méïose a été décrite (BROWN et LEMMON, 1991 a,b). De plus, des analyses en cytométrie de flux n'ont pas décelé une population de cellules haploïdes (RAMBAUD et al., 1995).

Bien que toutes les cellules somatiques du tissu foliaire de l'hybride '474' pourraient théoriquement répondre au stimulus embryogène, seules certaines d'entre elles, dites compétentes, répondent. Chez *Cichorium*, les cellules péri-vasculaires sont les premières à montrer des changements cytologiques au cours de l'induction embryogène. GUZZO et al. (1994, 1995) ont remarqué que les cellules capables de former des masses pro-embryogènes dans les plantules de *Daucus carota* sont celles situées près des faisceaux vasculaires. Ces auteurs pensent que les signaux hormonaux permettent aux cellules d'acquiescer cette potentialité embryogène (De VRIES et al., 1988; GUZZO et al., 1994, 1995). D'autres suggèrent l'existence de cellules embryogènes prédéterminées (= compétentes) qui utilisent ces signaux pour entrer en mitose (MAHESWARAN et WILLIAMS, 1986; ALIZADEH et MANTELL, 1991). Les modifications cytologiques que nous avons décrites, et qui concernent le noyau, le cytoquelette, l'état du vacuome, la paroi..., s'inscrivent dans

la phase de réactivation cellulaire qui précède la première mitose conduisant à la formation des eS. Mais, nous n'avons pas pu déterminer de marqueurs prédictifs susceptibles de repérer les cellules compétentes avant de telles modifications cytologiques.

Synchronisation de la première division des cellules embryogènes

Une fois la réactivation cellulaire achevée, ces cellules progressent dans le programme embryonnaire. De JONG et al. (1993) définissent une CE comme une cellule n'ayant plus besoin d'autres stimuli extérieurs pour continuer le programme enclenché. Nous avons mis en place une séquence de culture permettant de synchroniser la première division des CE dans les feuilles du *Cichorium* hybride '474' (ROBATCHE-CLAIVE et al., 1992). Ce système est favorable à toute étude moléculaire des phénomènes précoces de l'ES c'est à dire avant la première division embryogène. Il permet, en outre, d'observer des changements cytologiques et moléculaires prémitotiques. L'observation cytologique de la surface nucléaire à J₅ ou J₅₊₁ montre que peu de noyaux de CE présentent une chromatine en cours de compaction (nucléofilaments). Cette surface apparaît uniformément colorée par la safranine et les nucléoles sont présents.

Nous avons confirmé la présence précoce de callose au niveau des CE racinaires de *Cichorium*. Sa présence est surtout observée lors des phases gamétophytiques. Chez *Cytinus hypocystis* (CARAFA et PIZZOLONGO, 1990), ce polymère est mis en évidence autour des megasporocytes mais il disparaît avant la division équationnelle. Les microspores présentent aussi de la callose jusqu'au stade tétrade au niveau des parois nouvellement formées. Elle n'est plus visible après la fécondation et l'entrée du tube pollinique dans le sac embryonnaire. Ces auteurs suggèrent que la callose pourrait jouer le rôle d'un filtre permettant une régulation de la zone gamétophytique et de l'orientation chemiotropique du tube pollinique. Sa présence entre les deux premières cellules de l'embryon zygotique pourrait découler de la nécessité d'une mise en place d'une barrière de régulation des flux de macromolécules. SINGH et PAOLILLO (1990) ont montré que le dépôt de callose au niveau des papilles stigmatiques chez *Brassica* était un phénomène Ca⁺⁺-dépendant. LUCAS et al. (1993) et SANTIAGO et GOODWIN (1988) suggèrent que la synchronisation des cellules de l'apex de *Silene* implique une réduction de la continuité symplastique. De plus, un dépôt de matériaux osmiophiliques a été observé au niveau des plasmodemes lors de la spermatogenèse chez *Chara* (KWIATKOWSKA et MASZEWSKI, 1986;

KWIATKOWSKA, 1988). On peut donc proposer que sa présence transitoire au cours de l'ES chez *Cichorium* permet un "isolement" des cellules compétentes des corrélations (hormonales, symplastiques) issues des cellules voisines. Cet état serait ainsi favorable à une "reprogrammation" des séquences géniques impliquées au cours de étapes précoces de l'ES.

L'observation cytologique des cellules pendant la phase d'induction des cultures montre que le glycérol bloque le processus embryogène avant l'entrée en mitose. Les transferts des explants dans un milieu dépourvu de glycérol, phase d'expression, conduit à la synchronisation de la première division (ROBATCHE-CLAIVE et al., 1992). L'explication de ce blocage, au niveau moléculaire est moins aisée. De nombreux auteurs ont mis en évidence des points de contrôle du cycle cellulaire: point de départ (START), point d'initiation mitotique (G₂-> mitose) (JOHN et al., 1993), point de contrôle du passage métaphase->anaphase (CAMPBELL et GORBSKY, 1995). L'étude des ARNm d'histones de cellules synchronisées BY-2 de tabac ont montré qu'il y a une corrélation de leur taux avec la progression des cellules dans le cycle cellulaire (REICHHELD et al., 1995). Nous disposons d'un système tissulaire où les premières divisions embryogènes sont synchronisées. De telles études moléculaires pourraient être envisagées tant au niveau des ARNs (par Northern blot) qu'au niveau de coupes de tissus. Cependant, la faible proportion de cellules compétentes (environ 1 à 2 %) limite la possibilité d'investigation.

La diminution de la teneur en glycérol lors de la phase d'induction (J₀ à J₅), et l'inefficacité des solutions isomolaires de mannitol et de saccharose, semblerait indiquer que le glycérol n'agit pas uniquement comme un osmoticum (ROBATCHE-CLAIVE et al., 1992). Il a été récemment montré que cet élément pénètre dans les feuilles, et qu'il est métabolisé dans les fractions glucidiques et lipidiques (LABIS et COUILLEROT, communication personnelle). L'entrée de glycérol dans les feuilles du *Cichorium* '474' pourrait être la cause d'une complexation réversible avec les tubulines (ZABRECKY et COLE, 1979; CAPLOW et SHANKS, 1987), et donc retarder l'entrée en mitose des CE en perturbant la réorganisation du cytosquelette. Si la phase d'induction est caractérisée par la réactivation de CE, à l'exclusion de toute mitose, la phase d'expression comporte à la fois des divisions de CE (leur première division étant synchrone), et la réactivation de nouvelles cellules.

Préparation à l'entrée en mitose et synthèse des protéines du cytosquelette

La première phase de culture des feuilles en présence de glycérol constitue une étape de préparation à la mitose. Des signes cytologiques comme la migration pré-mitotique du noyau réactivé et la formation d'un phragmosome ont d'ailleurs été observées. En effet, ces éléments s'intègrent dans le cycle cellulaire (VENVERLOO et LIBBENGA, 1987; FLANDERS et al., 1990; DUDITS et al., 1991). D'un point de vue biochimique, une augmentation des protéines est observée, notamment pour la β tubuline, dès 48 h de culture. Après 96 h, ce taux chute. A ce stade de la culture, ces fluctuations ne sont pas décelées chez des chicorées non embryogènes (*C. intybus* cv. '206' et cv. 'Flash'). De telles variations ont déjà été décrites lors de la culture de cellules mésophylliennes de *Zinnia* (FUKUDA, 1987). Cet auteur a observé simultanément une dégradation des tubulines (par rétro-contrôle) et une synthèse (ARNs) particulièrement active. Nos résultats suggèrent que l'auto-régulation ne fonctionne pas comme un mécanisme clé pour la régulation des taux de tubuline lors de l'induction embryogène. Ceci a déjà été observé par FUKUDA (1987).

La phase de plateau des taux de tubuline entre J₂ et J₄ pourrait correspondre au temps nécessaire pour que les cellules compétentes passent du point de départ au point d'initiation mitotique. En J₄, de nombreuses cellules seraient en fin d'interphase (fin G₂). L'observation cytologique nous a permis de constater la migration prémitotique du noyau réactivé au cours des 3 premiers jours de culture où un maximum de CE apparaissent (ROBATCHE-CLAIVE et al., 1992). L'analyse de la quantité d'actine pendant cette période montre qu'il y a une augmentation puis une stabilisation après J₃. Ces résultats confirment le rôle de ces molécules dans la migration du noyau, la formation du phragmosome et lors de la réorganisation du cytosquelette. En effet, des études précédentes en microscopie à fluorescence ont montré que le phragmosome contenait des Mts et des Mfs (TRAAS et al., 1987; KATSUTA et SHIBAOKA, 1988; LLOYD et TRAAS, 1988; FLANDERS et al., 1990; MINEYUKI et GUNNING, 1990).

Si l'on observe indépendamment les courbes d'évolution quantitative d' α et β tubuline, un écart est constamment marqué entre ces taux. Il est aussi présent lors de la comparaison des tubulines des chicorées non embryogènes ou même chez l'embryon somatique âgé de 3 semaines. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence. Il peut y avoir une différence de sensibilité des anticorps monoclonaux utilisés contre les deux isoformes de tubuline. Cette

différence est plus importante lorsque les feuilles sont cultivées en présence d'inhibiteurs (caféine, vérapamil). Elle est pourtant incompatible avec les données d'enzymologie (BORKIRD et SUNG, 1985; PANTALONI, 1989; AMOS et AMOS, 1991). FUKUDA et IWATA (1986) ont aussi observé un écart entre les quantités d' α et de β tubuline chez *Catharanthus* (respectivement 19 $\mu\text{g.eq}$ et 13 $\mu\text{g.eq}$) et chez *Mougeotia* (11 $\mu\text{g.eq}$ et 5 $\mu\text{g.eq}$).

Dans le cas où cette différence ne serait pas liée à la méthode d'analyse, on peut penser à une éventuelle compensation avec une autre protéine cytosquelettique. Nous observons une moins grande quantité d' α tubuline comparativement à la β tubuline pendant la phase d'induction. Or, il est possible que l'une des deux isoformes subisse des modifications post-traductionnelles de type acétylation ou tyrosination conduisant à une reconnaissance limitée de l'anticorps monoclonal. De tels changements sont d'ailleurs souvent associés à l'isoforme α et interviennent dans les processus de stabilité des réseaux microtubulaires (DAWSON et LLOYD, 1984; GUNDERSEN et al., 1984, 1987; KERR et CARTER, 1988; ASTROM, 1992). Il serait particulièrement intéressant de rechercher de telles formes de tubulines dans nos extraits foliaires. En effet, HOFFMAN et VAUGHN (1995) ont montré que la présence de tubuline acétylée est liée à un réseau stable caractéristique d'un stade de développement précis chez *Ceratopteris richardii*. Les formes tyrosinées sont retrouvées dans les réseaux dynamiques.

Nous avons aussi recherché si ces variations pouvaient résulter de la technique de localisation et de quantification de ces protéines. Pour cela nous avons testé des anticorps monoclonaux commerciaux provenant de deux fournisseurs (Sigma et Amersham). Les substrats de la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps secondaire ont été changés (NBT+BCIP, ou AMPPD) ainsi que le support d'électrotransfert (membrane de nitrocellulose ou PVDF). En dehors de l'application pratique de ces éléments, un écart a toujours été observé entre les deux isoformes de tubulines. D'autres méthodes de quantification des tubulines ont été précédemment décrites: la plus courante consiste à révéler la présence des tubulines par des molécules comme l'iode (FUKUDA et IWATA, 1986) ou le soufre (FUKUDA, 1989) après autoradiographie. La densitométrie après une révélation péroxydasique a été également utilisée (OKAMURA et al., 1993). Il serait intéressant de confirmer nos résultats par l'une ou l'autre de ces méthodes.

On peut remarquer que très peu de tubulines et d'actine sont détectées à J_0 , alors que l'induction embryogène entraîne une augmentation de leurs synthèses.

Notre matériel végétal est constitué de feuilles prélevées sur des vitroplants âgés de 6 à 8 semaines dans lesquels les mitoses sont sans doute très rares. JUNG et al. (1993) et HELLMANN et al. (1995) ont d'ailleurs observé une diminution de la quantité de tubuline au cours du développement des feuilles de mono- (*Triticum* et *Hordeum*) et de dicotylédones (*Nicotiana*). On peut donc penser qu'une (ré)activation des gènes concernés et de leurs transcription ne s'opère que dans les cellules compétentes, lors de l'induction.

En supposant qu'il y ait un léger décalage entre la transcription des ARNs α tubuline et la synthèse des protéines, et qu'il existe des variations expérimentales, on s'aperçoit que l'augmentation régulière des taux d'ARNs entre J_0 et J_2 se reflète dans l'obtention du plateau du taux protéique. La chute des taux d'ARNs qui s'amorce à J_3 et se poursuit à J_4 impliquerait une chute de ce taux, ce qui ne se vérifie pas. Il semble que le stock cytoplasmique d' α tubuline demeure constant et qu'il n'y ait pas de dégradation issue de la régulation en boucle. Aussi peut-on émettre les hypothèses suivantes: soit l' α tubuline, en tant que monomère, n'est pas dégradée, soit les ARNs α tubuline cytoplasmiques sont plus stables et la traduction se poursuit. Un phénomène comparable a d'ailleurs été décrit par CLEVELAND et THEODORAKIS (1994). Compte-tenu des analyses cytologiques effectuées et des évènements nucléaires liés à la mitose, on peut suggérer que la chute de la transcription est sans doute due à la disparition du nucléole (normalement en prophase) ou d'une diminution de l'activité transcriptionnelle. Cette diminution est caractéristique de l'état de différenciation d'une cellule alors qu'une augmentation de l'activité nucléolaire est associée avec la phase G_2 (CERDIDO et MEDINA, 1995; HELLMANN et al., 1995). L'étude approfondie des variations des ARNs α et β tubuline permettrait de détecter rapidement les premiers réarrangements microtubulaires liés à l'induction embryogène. Comme JUNG et al. (1993) le proposent, ces modifications s'opérant au niveau des Mts peuvent constituer des marqueurs potentiels de la capacité à la (dé)différenciation de certaines cellules, bien que l'organogenèse et la différenciation peuvent être établies sans réarrangement spécifique du cytosquelette (TRAAS et al., 1995).

L'étude de l'enclenchement des mitoses chez les végétaux pourrait aussi s'inscrire dans l'optique d'une comparaison avec l'animal. Un système commun de régulation composé de la protéine kinase p34^{cdc2} et de nombreuses cyclines a été observé chez les Levures, le Xenope et les oeufs d'Oursin. Le complexe p34-cycline est un composant du facteur de promotion de la maturation qui régule ce cycle. Les formes actives ou inactives de ces protéines sont gouvernées par le degré de phosphorylation/déphosphorylation (COLEMAN et DUNPHY, 1994) même chez les

plantes (NURSE, 1990; JOHN et al., 1991). Le plus souvent, en vitroculture, les milieux contiennent des hormones notamment de type auxine ou cytokinine. Récemment, KATO et al. (1991 et 1993) ont montré que le taux de division des cellules de coléoptiles de maïs et d'épicotyles de *Vigna* augmentait par l'addition du facteur épidermique de croissance animale, dont les rôles variés sont souvent associés à une autophosphorylation (CARPENTER, 1993). L'étude de l'activité de phosphorylation des kinases lors de l'induction embryogène n'a pas été encore abordée, mais ceci pourrait constituer un marqueur de la phase G₂ des cellules compétentes (MURRAY, 1994; YOUNG et al., 1994). De plus, les cyclines sont impliquées dans les transitions G₁-S et S-G₂ où de nombreuses phosphorylations s'opèrent (TRAAS et al., 1992; ZHANG et al., 1992; JOHN et al., 1993; HEMERLY et al., 1993; DOERNER, 1994; O'CONNELL et NURSE, 1994; FRANCIS et HALFORD, 1995). Dans cette phase précoce, les CR pourraient être décelées sur coupes par hybridation *in situ* au moyen de sondes cyclines ou de sonde de protéines de contrôle du cycle cellulaire comme la p34^{cdc2} (séquence conservée PSTAIR). MURRAY (1989), et MURRAY et KIRSCHNER (1989) ont déjà montré qu'elle régulait le cycle cellulaire embryonnaire chez l'animal, et que sa synthèse était suffisante pour induire les changements cytologiques et biochimiques caractéristiques de la mitose. De plus, son action peut être inhibée de façon réversible par la mimosine (PERENNES et al., 1993). La kinase p34^{cdc2} phosphoryle différents substrats comme les histones H1, H3, les nucléolines, les lamines. La recherche de protéines mitogènes de type kinase serait aussi intéressante, puisqu'elles régissent les signaux intracellulaires de phosphorylation en les transmettant de l'extérieur aux cibles cellulaires (PETER et al., 1992).

Caractérisation de la première division embryogène

Les divisions embryogènes sont rarement étudiées dans les tissus mais de nombreux résultats ont été obtenus dans des systèmes cellulaires tels que des microspores où la première division peut être symétrique comme chez *Zea mays* (PRETOVA et al., 1993), *Brassica* (BINAROVA et al., 1993) ou encore *Nicotiana* (ZONIA et TUPY, 1995). Etant donné la difficulté d'atteindre les CE près des vaisseaux en immunocytologie, la technique d'OULD et NANNINGA (1992) a été appliquée dans un premier temps afin de suivre le déroulement de la division du noyau par son marquage au Hoechst. Nous avons pu montrer que la première division des CE périvasculaires est symétrique et que son plan est anticline par rapport aux éléments conducteurs les plus proches. La symétrie est jugée ici sur la

position de la nouvelle paroi engendrée par celle du phragmoplaste, le fuseau microtubulaire étant symétrique quel que soit le type de division.

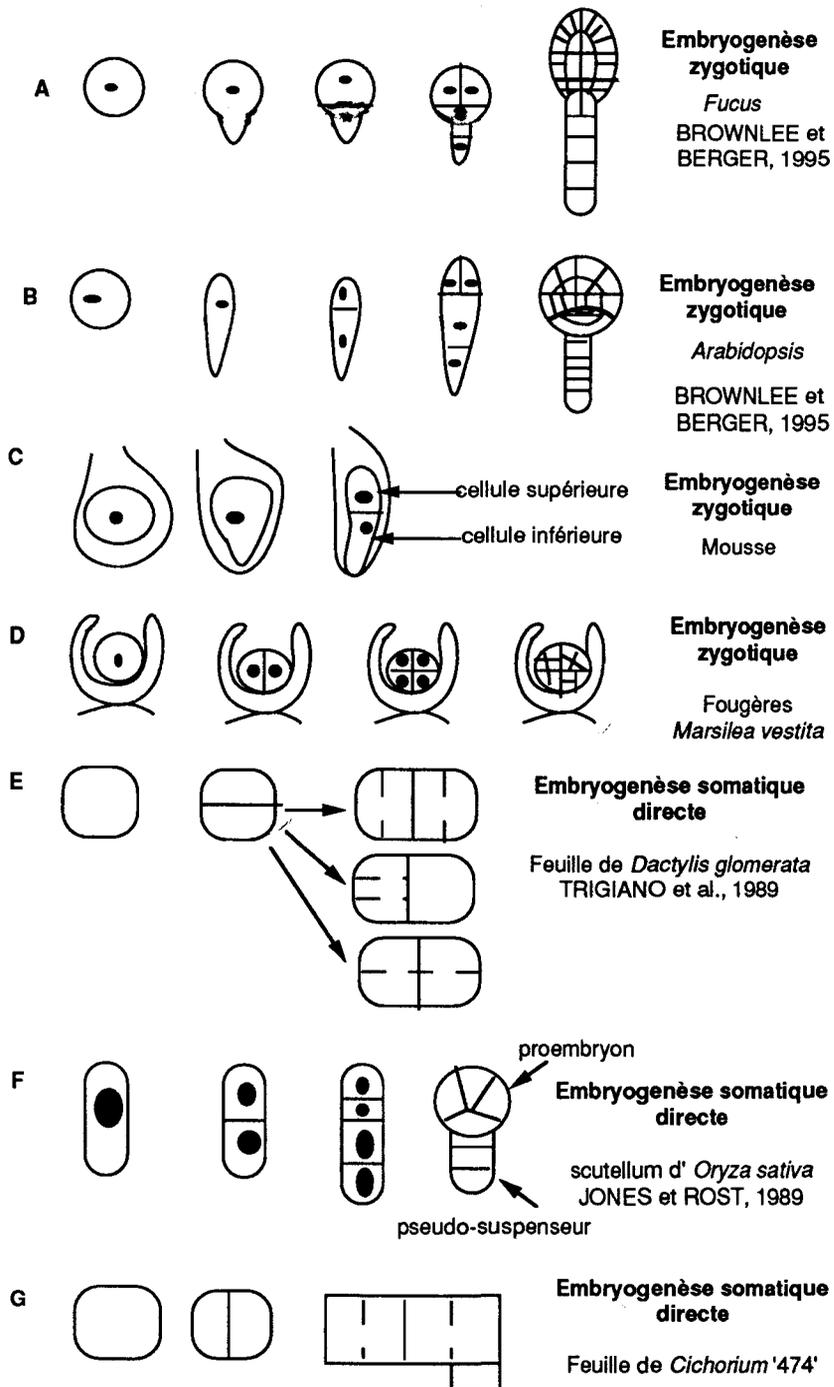


Figure 29: Représentation schématique des modes de divisions dans différents systèmes embryogènes (zygotique A à D, somatique E à G).

Cette première division symétrique est peu courante. Dans les systèmes d'embryogenèse zygotique, la première division est souvent asymétrique (Fig. 29 A à C) sauf dans certaines fougères (Fig. 29 D). L'asymétrie du premier plan de division peu être le reflet d'une répartition inégale du cytoplasme et de ses organites. Par contre, une symétrie est plus souvent observée au cours de l'ES directe. Dans certains cas, les eS sont munis d'un pseudo-suspenseur issu de plans de division variables comme chez le *Dactylis* (suspenseur multisérié, Fig. 29 E), ou d'une asymétrie qui apparaît après cette première mitose comme c'est le cas chez des eS d'*Oryza* (Fig. 29 F). L'originalité de notre modèle réside dans l'origine unicellulaire des eS qui ne présentent pas de suspenseur, et dont le plan de la première division est, dans la majorité des cas, équatorial. Une étude en microscopie électronique à transmission nous permettrait de connaître la répartition des organites dans le cytoplasme des CE de *Cichorium*.

Les travaux concernant la localisation du futur site de division s'effectuent généralement par l'immunolocalisation de la BPP autour des cellules en G₂. En effet, il a été établi qu'elle permettait de situer le futur plan de division (SEAGULL, 1989; MINEYUKI et GUNNING, 1990; STAIGER et LLOYD, 1991) et que la formation de la BPP est liée au cycle nucléaire (GUNNING et SAMMUT, 1990; MIZUTANI et al., 1993; LAMBERT et LLOYD, 1994). Nous n'avons pas observé la présence d'une BPP dans le tissu foliaire diploïde cultivé en présence de glycérol. Or cet osmoticum est connu pour déstabiliser le cytosquelette en se complexant avec les tubulines (ZABRECKY et COLE, 1979). Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons éliminé le glycérol et utilisé un clone tétraploïde de l'hybride '474' dont les cellules du mésophylle sont nettement plus grandes que celles du clone diploïde initialement employé dans notre travail. Une BPP équatoriale est formée dans les CE (RAMBAUD et al., 1995). Une connexion a été observée entre les MTsPN et le cortex cellulaire en fin de préprophase et après la cytokinèse. Cette association avait déjà été remarquée par différents auteurs dans les cellules se préparant à la mitose (PALEVITZ, 1991; LAMBERT et al., 1991; PANTERIS et al., 1991; STAIGER et LLOYD, 1991, WICK, 1991; LAMBERT et LLOYD, 1994). Du matériel périnucléaire a été fréquemment observé autour des noyaux préprophasiques. Ceci pourrait être lié à l'ancrage des Mts cytoplasmiques à l'enveloppe nucléaire (LAMBERT, 1993; SCHMIT et al., 1994; STOPPIN et al., 1994). D'ailleurs l'injection de tubuline exogène a permis de montrer son incorporation à ce niveau (VANTARD et al., 1990; ZHANG et al., 1990).

Des configurations particulières de BPP ont été remarquées dans de rares CE. Ainsi, des BPPs bifides (souvent en forme de Y) apparaissent comme cela a

déjà été noté dans des cellules racinaires de *Vigna* traitées par de la colchicine (GALATIS et APOSTOLAKOS, 1991). De très rares BPP doubles (2 anneaux parallèles) ont été observées comme c'est le cas dans les cellules racinaires d'oignon (GUNNING et WICK, 1985). Parfois, la BPP est décalée par rapport à la position du noyau mais la distance reste faible au regard de celle engendrée par une centrifugation du protonéma d'*Adiantum* (MURATA et WADA, 1989 et 1991). Il semble difficile de penser que cette dernière forme de BPP soit liée au mode de culture (agitation orbitale) ou à l'obtention d'une couche de cellules (par dilacération). En effet, des BPPs normales sont présentes, et il est difficile de rompre les connexions noyau-BPP au cours de la préprophase alors qu'il semble plus aisé de le faire à un autre stade de la mitose (GUNNING et WICK, 1985). La présence d'une BPP au cours des premiers stades de l'ES chez *Cichorium*, pourrait nous conduire à tenter de définir un potentiel embryogène (capacité de mise en place d'un programme morphogène ordonné) au moyen d'un index de BPP comme l'ont défini GORST et al. (1986). En effet, un index élevé est corrélé au potentiel embryogène de suspensions cellulaires de carotte (GORST et al., 1986) et de *Picea mariana* (TAUTORUS et al., 1992). Pour cela, il faudrait pouvoir travailler sur un autre type de matériel que des tissus foliaires comme des protoplastes ou des suspensions embryogènes. SIDIKOU-SEYNI et al. (1992) ont démontré que les protoplastes foliaires du *Cichorium* hybride '474' conservent la potentialité embryogène des cellules mésophylliennes, mais la formation des eS est indirecte, ce qui limite l'intérêt du modèle pour l'étude envisagée.

A notre connaissance aucun auteur n'a étudié les effets de la caféine lors du processus d'induction embryogène et des divisions embryonnaires. Nos résultats montrent que la caféine affecte les modalités d'expression de l'embryogenèse d'une façon quantitative car peu d'eS sont dénombrés à J5+3, et d'une façon qualitative puisque des structures coenocytiques apparaissent et peuvent persister même après l'élimination de cet inhibiteur. Ces phénomènes peuvent être reliés au processus embryogène du fait que seules les cellules compétentes sont susceptibles d'entrer en division dans les conditions de culture retenues (ROBATCHE-CLAIVE et al., 1992; DECOUT et al., 1994).

Une des premières observations cytologiques concerne l'immobilité du noyau qui reste proche du plasmalemme. Or la migration nucléaire prémitotique est un prérequis lors d'une mitose (DUDITS et al., 1991; LLOYD, 1991). De plus, VENVERLOO et LIBBENGA (1987) ont clairement démontré la nécessité des liens cytoplasmiques transvacuolaires dans le positionnement du noyau, et du phragmosome dans la formation de la future plaque cellulaire. Le cytosquelette, qui

est impliqué dans cette migration, serait donc affecté par la présence de caféine (LLOYD, 1991; STAIGER et LLOYD, 1991).

La présence de la caféine n'empêche pas la caryocinèse. De nombreux nucléofilaments sont observés à la surface des CR et des CE. Ceci a déjà été observé dans les cellules animales où la présence de caféine induit une condensation précoce des chromosomes (SCHLEGEL et PARDEE, 1986). Chez *Cichorium*, une multinucléation a été fréquemment observée ainsi qu'une fusion des chromatines ou d'enveloppes nucléaires. Cette dernière a déjà été remarquée par PAUL et GOFF (1973) dans les cellules racinaires d'oignon traitées par la caféine ainsi que par PICKETT-HEAPS (1969). Plus récemment, MURATA et WADA (1993b) ont observé que cet agent cause une fusion des chromosomes en prémétaphase. Une augmentation significative des quantités de β tubuline et d'actine dès 48 h de traitement a été détectée (BLERVACQ et al., 1995b). Il y aurait donc, en amont, une modification de la stabilité des ARNs qui ne seraient plus autorégulés par le taux de protéines monomériques du cytoplasme. Un tel phénomène existe lors de l'utilisation de la cytochalasine B (McCURDY et al., 1991), de la colchicine ou de l'oryzaline (STARGELL et al., 1992). Ces derniers soulignent que seul le taux d' α tubuline augmente en leur présence chez *Tetrahymena thermophila*.

Mode de division du proembryon

Lors de l'ES de *Cichorium*, il n'y a pas de formation d'un pseudo-suspenseur, et le proembryon ne semble pas présenter de polarité. Il faudrait attendre la différenciation des cellules dites cellules initiales du méristème racinaire; leur localisation chez l'embryon somatique globulaire marquerait le futur pôle racinaire et donc une polarité. Cette dernière pourrait être mise en évidence sur des coupes semi-fines (résine de méthacrylate hydrophobe) en observant la disposition des Mts de cellules méristématiques ou en cours de croissance (A.M. LAMBERT et A.C. SCHMIT, communication personnelle). Les premiers essais effectués sur l'hybride diploïde se sont révélés infructueux. Il serait intéressant de réaliser ces coupes sur des feuilles du clone tétraploïde. Le mode de division du proembryon de *Cichorium* '474' semble suivre des diagrammes déterminés. Ainsi, après quelques divisions unidirectionnelles, d'où résultent une file d'au moins 4 cellules, l'embryon croît en épaisseur en commençant par l'une de ses extrémités en effectuant des divisions périclines.

La présence séquentielle de caféine dans le milieu de culture provoque l'apparition d'eS chimériques constitués de cellules embryonnaires multinucléées et de cellules ne possédant qu'un seul noyau (BLERVACQ et al., 1995b). Il y a donc une altération de la formation de la plaque cellulaire. Or celle-ci est guidée par l'expansion centrifuge du phragmoplaste. MURATA et WADA (1993 a,b) ont obtenu des cellules chimériques d'*Adiantum* par l'addition de caféine; l'étude du réseau microtubulaire de telles cellules montre que le phragmoplaste est ramifié causant la formation de cellules uninucléées et de cellules multinucléées.

Nos résultats indiquent que le moment où la caféine est ajoutée est une période critique dans l'obtention d'une plaque cellulaire normale. La caféine pourrait aussi avoir un effet toxique quand elle est ajoutée pendant une longue période. Dans les travaux précédents, le temps de contact des explants avec l'inhibiteur n'excède pas 1,5 à 4 heures (HEPLER et BONSIGNORE, 1990; ENCINA et BECERRA, 1986; BECERRA et ENCINA, 1987), et BONSIGNORE et HEPLER (1985) ont remarqué que cet agent est particulièrement efficace sur les cellules en division et sur la cytokinèse. Nous devons aussi considérer le fait que la caféine pourrait s'accumuler dans les tissus foliaires comme cela a été montré par SMYTH (1992) chez le riz. D'autre part, nous avons pu confirmer les effets de la caféine sur la cytokinèse lors des divisions embryogènes et embryonnaires. Même si la caryokinèse et la cytokinèse sont deux processus distincts, leurs fonctionnements s'influencent mutuellement (WICK, 1991).

Le contrôle de la formation de la plaque cellulaire est aussi sous le contrôle de la concentration en calcium (BATTEY et BLACKBOURN, 1995). On pense que la caféine interfère avec l'homéostasie calcique qui est essentielle dans cette formation. De plus elle pourrait agir sur le stockage du Ca^{2+} dans le reticulum (HEPLER et al., 1990). Mais le mode d'action de la caféine reste toutefois obscur notamment dans la séquence exacte des événements du processus d'inhibition. La caféine agirait en fait sur le phénomène Ca^{2+} -dépendant de la fusion des vésicules, ce qui implique aussi le cytosquelette (BONSIGNORE et HEPLER, 1985; HEPLER et BONSIGNORE, 1990; BATTEY et BLACKBOURNE, 1995). La libération du Ca^{2+} intracellulaire (HEPLER et BONSIGNORE, 1990) n'a pourtant pas été observée par KEIFER et al. (1992) et WILLIAMSON et ASHLEY (1992). De nombreuses études ont montré l'importance du calcium dans les phénomènes embryogènes animaux (PATEL et al., 1989; TOMBES et al., 1992) ou végétaux, notamment chez *Cichorium* (DUMINY et al., 1993). Ces derniers travaux nous ont conduit à utiliser la caféine et à en déterminer les effets sur les mitoses embryonnaires. D'autres agents, telles que les cytochalasines, pourraient être testés du fait de leur action spécifique sur les Mfs

dont l'importance, lors de la migration nucléaire prémitotique, est considérable. Le vérapamil (inhibiteur des canaux calciques) utilisé à 100 μM induit une diminution du nombre d'eS. mm^{-2} dont le développement est perturbé (DUMINY, 1993). Nous avons observé que ce composé modifie les courbes d'évolution quantitative des tubulines et de l'actine. Or, le blocage des canaux calciques ne permet pas le maintien des gradients calciques nécessaires au développement des eS de carotte (OVERVOORDE et GRIMES, 1994). WACKER et SCHNEPF (1990) ont montré que le transport polarisé des vésicules par les Mfs était perturbé mais que les Mts n'étaient pas affectés chez *Funaria hygrometrica*. Comme pour la caféine, les effets du vérapamil ont été très peu décrits lors de l'ES. Par contre, on sait que ces deux composés interviennent sur les processus Ca^{2+} -dépendants tels que la cytokinèse ou la transmission des signaux inducteurs (BIEN et al., 1993). Nos travaux apportent donc quelques indications concernant leurs effets sur l'ES. On peut noter que le vérapamil existe sous une forme médicamenteuse (Isoptine) utilisée comme β bloquant (hypotenseur); aucun effet tératogène n'est indiqué chez le fœtus humain.

Les glycoprotéines et la MEC

Peu de différences ont été obtenues dans les diagrammes des glycoprotéines intratissulaires au cours de l'induction embryogène des feuilles du *Cichorium* '474'. Ceci a déjà été observé par DOMON et al. (1994) chez des lignées embryogènes de *Pinus caribea*. Des fluctuations sont pourtant décelées au niveau extracellulaire (NEUENSCHWANDER et al., 1994; DOMON et al., 1995). L'analyse des glycoprotéines extracellulaires au cours de l'ES chez *Cichorium* pourrait être envisagée. La présence d'inhibiteurs de glycosylation (TM, dNM) conduit à des résultats mitigés puisque des eS peuvent être induits. La perturbation de leur développement pourrait s'expliquer par une modification de la synthèse de certains constituants de la MEC.

DAVIES et al. (1993) et STANKOVIC et al. (1993) ont montré une relation étroite entre la membrane, le cytosquelette et les polysomes. Il serait donc intéressant de poursuivre des recherches concernant des protéines établissant un pont entre le cytosquelette et la MEC afin de mieux caractériser le continuum cytosquelette-membrane plasmique-MEC. Ce continuum comprend de nombreuses protéines comme des intégrines, des molécules d'adhésion (pseudo- vitronectine et pseudo-fibronectine), la ponticuline, des protéines de type RGD... (SCHINDLER et al., 1989; WYATT et CARPITA, 1993; CYR, 1994; CYR et PALEVITZ, 1995; REUZEAU et PONT-LEZICA, 1995). Nous n'avons pas pu établir la présence d'une

pseudo-vitronectine chez *Cichorium*; mais avec la même méthode et les mêmes anticorps, une telle protéine a été immunolocalisée chez des eS issus de cals de *Medicago* (résultats non publiés). Des recherches pourront se porter sur le continuum Mts-paroi-membrane et notamment sur les molécules qui lui sont liées (CYR, 1994) puisqu'une MEC est présente chez les eS globulaires du *Cichorium* et qu'elle disparaît lors de la formation du protoderme qui marque le début de l'établissement d'une polarité chez ces eS (DUBOIS et al., 1991, 1992).

- ALIZADEH S., MANTELL S.H., 1991. Early cellular events during somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solanum aviculare* Forst. Ann. Bot., 67: 257-263.
- ALLEFS J.J.H.M., SALENTIJJN E.M.J., KRENS F.S., ROWENDAL G.J.A., 1990. Optimization of non radioactive southern blot hybridization : single copy detection and reuse of blots. Nucl. Acid Res., 18: 3099-3100.
- AMOS L.A., AMOS W.B., 1991. Molecules of the cytoskeleton. MacMillan Molecular biology series, SKIDMORE C.J. Ed., Mac Millan education Ltd., London.
- ASADA T., SONOBE S., SHIBAOKA H., 1991. Microtubule translocation in the cytokinetic apparatus of cultured tobacco cells. Nature, 350: 238-241.
- ASTROM H., 1992. Acetylated alpha tubulin in the pollen tube microtubules. Cell Biol. Int. Rep., 16: 871-881.
- BALUSKA F., BARLOW P.W., 1993. The role of the microtubular cytoskeleton in determining nuclear chromatin structure and passage of maize root cells through the cell cycle. Eur. J. Cell Biol., 61: 160-167.
- BARLOW P.W., 1991. From cell wall networks to algorithms. The stimulation and cytology of cell division patterns in plants. Protoplasma, 162: 69-85.
- BASKIN T.I., BUSBY C.H., FOWKE L.C., SAMMUT M., GUBLER F., 1992. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. Planta, 187: 405-413.
- BATTEY N.H., BLACKBOURN H.D., 1995. The control of exocytosis in plant cells. New Phytol., 125: 307-338.
- BECERRA J., ENCINA C.L., 1987. Biological effects of lithium : experimental analysis in plant cytokinesis. Experientia, 43: 1025-1027.
- BEN HAYYIM G., NEUMANN H., 1983. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. Z. Pflanzenphysiol., 110: 331-337.
- BERGOUNIOUX C., PERENNES C., HEMERLY A.S., QIN L.X., SARDA C., INZE D., GADAL P., 1992. A *cdc2* gene of *Petunia hybrida* is differentially expressed in leaves protoplasts and during various cell cyle phases. Plant Mol. Biol., 20: 1121-1130.
- BIEN M., LACHOWICZ T.M., ORLOWSKA-MATUSZEWSKA G., 1993. Inhibitory effect of cafeine on diploidization and sporulation in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2/43: 91-100.
- BINAROVA P., STRAATMAN K., HAUSE B., HAUSE G., VAN LAMMEREN A.A.M., 1993. Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L. Theor. Appl. Genet., 87: 9-16.
- BLANCAFLOR E.B., HASENSTEIN K.H., 1993. Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots. Planta, 191: 231-237.
- BLERVACQ A.S., DUBOIS T., DUBOIS J., VASSEUR J., 1995a. First divisions of somatic embryogenesis cells in *Cichorium* hybrid "474". Protoplasma, 186: 163-168.
- BLERVACQ A.S., DUBOIS J., HILBERT J.L., VASSEUR J., 1995b. Effects of cafeine on somatic embryogenesis induction and expression in leaves of a *Cichorium* hybrid. Plant Physiol. Biochem., 33, 741-749.

- BLERVACQ A.S., DUBOIS J., HILBERT J.L., VASSEUR J., 1995b. Effects of caffeine on somatic embryogenesis induction and expression in leaves of a *Cichorium* hybrid. *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 741-749.
- BLUM H., BEIER H., GROSS H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- BOKROS C.L., HUGHDAHL J.D., HANESWORTH V.R., MURPHY J.V., MOREJOHN L.C., 1993. Characterization of the reversible taxol-induced polymerization of plant tubulin into microtubules. *Biochemistry*, 32: 3437-3447.
- BONSIGNORE C.L., HEPLER P.K., 1985. Caffeine inhibition of cytokinesis: dynamics of cell plate formation-deformation *in vivo*. *Protoplasma*, 129: 28-35.
- BORKIRD C., SUNG Z.R., 1985. Expression of tubulin genes during somatic embryogenesis. In : "Somatic embryogenesis", Proceedings San Miniato 28-31 May, TERZI M., PITTO L., SUNG Z.R. Eds., IPRA, Roma, pp 14-21.
- BOYER C., HILBERT J.L., VASSEUR J., 1993. Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*. *Plant Sci.*, 93: 41-53.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- BREITLING F., LITTLE M., 1986. Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. *J. Mol. Biol.*, 189: 367-370.
- BRONNER R., JEANNIN G., HAHNE G., 1994. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*). *Can. J. Bot.*, 72: 239-248.
- BROWN R.C., LEMMON B.E., 1991a. Plastid polarity and meiotic spindle development in microsporogenesis of *Selaginella*. *Protoplasma*, 161: 168-180.
- BROWN R.C., LEMMON B.E. 1991b. Pollen development in orchids. 2. The cytokinetic apparatus in simultaneous cytokinesis. *Protoplasma*, 165: 155-166.
- BROWNLEE C., BERGER F., 1995. Extracellular matrix and pattern in plant embryos: on the lookout for developmental information. *TIG*, 11: 344-348.
- CAMPBPELL M.S., GORBSKY G.J., 1995. Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. *J. Cell Biol.*, 129: 1195-1204.
- CAPLOW M., SHANKS J., 1987. GTP requirement for *in vitro* and *in vivo* microtubule assembly and stability. In : The cytoskeleton in cell differentiation and development, MACCIONI R.B. and ARECHAGA J. Eds., Proc. 1st Intern. Symp., Granda, Spain, April 21-25, ISCU Press by IRL Press, Oxford, pp 63-73.
- CARAF A.M., PIZZOLONGO P., 1990. Callose in cell walls during reproductive processes in *Cystinus hypocystis* L. *Caryologia*, 43: 57-63.
- CARON J.M., JONES A.L., BALL L.B., KIRSCHNER M.W., 1985. Autoregulation of tubulin synthesis in enucleated cells. *Nature*, 317: 648-651.
- CARPENTER G., 1993. EGF: new tricks for a growth factor. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 261-264.

- CARTER J.V., WICK S.M., 1984. Irreversible microtubule depolymerization associated with freezing injury in *Allium cepa* root tip cells. *Cryo Lett.*, 5: 373-382.
- CASSAB G.I., VARNER J.E., 1988. Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J. Cell Biol.*, 105: 2581-2588.
- CERDIDO A., MEDINA F.J., 1995. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, 103: 625-634.
- CHEVRIER V., KOMESLI S., SCHMIT A.C., VANTARD M., LAMBERT A.M., JOB D., 1992. A monoclonal antibody, raised against mammalian centrosomes and screened by recognition of plant microtubule organizing centers, identifies a pericentriolar component in different cell types. *J. Cell Sci.*, 101: 823-835.
- CHIA C.P., SHARIFF A., SAVAGE S.A., LUNA E., 1993. To integral membrane protein ponticulin, acts as a monomer in nucleating actin assembly. *J. Cell Biol.*, 120: 909-922.
- CHIRWING J.M., PRZYBYLA A.E., Mc DONALD R.J., RUTTER W.J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.*, 18: 5294-5299.
- CHURCH G., GILBERT W., 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1991-1995.
- CLEARY A.L., 1995. F-actin redistributions at the division site in living *Tradescantia* stomatal complexes as revealed by microinjection of rhodamine-phalloidin. *Protoplasma*, 185: 152-165.
- CLEARY A.L., HARDHAM A.R., 1989. Microtubule organization during development of stomatal complexes in *Lolium rigidum*. *Protoplasma*, 149: 67-81.
- CLEVELAND D.W., THEODOAKIS N.G., 1994. Regulation of tubulin synthesis, In: *Microtubules*, HYAMS J.S. and LLOYD C.W. Eds., *Modern Cell Biology*, Vol. 13, pp 47-58.
- CLEVELAND D.W., LOPATA M.A., SHERLINE P., KIRSHNER M.W. , 1981. Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell*, 25: 537-546.
- COLEMAN T.R., DUNPHY W.G., 1994. Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 877-883.
- COLLINS C.A., VALLEE R.B., 1987. Temperature-dependent reversible assembly of taxol-treated microtubules. *J. Cell Biol.*, 105: 2847-2854.
- CONDIT C.M., McLEAN B.C., MEAGHER R.B., 1990. Characterization of the expression of the *Petunia* glycine-rich protein-1 product. *Plant Physiol.*, 93: 596-602.
- CORDEWENER J., BOOIJ H., VAN DER ZANDT H., VAN KAMMEN A., De VRIES S.C., 1991. Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, 184: 478-486.
- CORDEWENER J.H.G., BUSINK R., TRAAS J.A., CUSTERS J.B.M., DONS H.J.M., VAN LOOKEREN CAMPAGNE M.M., 1994. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. is accompanied by specific changes in protein synthesis. *Planta*, 195: 50-56.
- CORREIA J.J., 1991. Effect of antimetabolic agents on tubulin-nucleotide interactions. *Pharmac. Theor.*, 52: 127-147.

- COUILLEROT J.P., WARNOT F., DECOUT E., DUBOIS J., VASSEUR J., 1992. Utilization and metabolism of carbohydrates during direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*. In: Second international symposium on fructan, Aberystwyth (Pays de Galles).
- CREMONINI R., SALVI G., CAVALLINI A., NATALI L., CIONNI G., FREDIANI M., 1992. Changes in chromatin structure and protein synthesis during heat shock in *Vicia faba* roots. *Chromatin*, 1: 19-26.
- CYR R.J., 1991. Calcium/calmodulin affects microtubule stability in lysed protoplasts. *J. Cell Sci.*, 100: 311-317.
- CYR R.J., 1994. Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10: 153-180.
- CYR R.J., PALEVITZ B.A., 1995. Organization of cortical microtubules in plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7: 65-71.
- CYR R.J., BUSTOS M.M., GULTINAN M.J., FOSKET D.E., 1987. Developmental modulation of tubulin proteins and mRNA levels during somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *Planta*, 171: 365-376.
- DAVIES E., COMER E.C., LIONBERGER J.M., STANKOVIC S., ABE S., 1993. Cytoskeleton-bound polysomes in plants. III. Polysome-cytoskeleton-membrane interactions in corn endosperm. *Cell Biol. Intern.*, 17: 331-340.
- DAWSON P.J., LLOYD C.W., 1984. Identification of multiple tubulins in taxol microtubules purified from carrot suspension cells. *EMBO J.*, 4: 2451-2455.
- DECOUT E., DUBOIS T., GUEDIRA M., DUBOIS J., AUDRAN J.C., VASSEUR J., 1994. Role of temperature as a triggering signal for organogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 45: 1859-1865.
- De JONG A.J., SCHMIDT E.D.L., De VRIES S.C., 1993. Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 22: 367-377.
- DELMER D.P., 1987. Cellulose biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38: 259-290.
- DENG Z., ZHANG W., WAN S., 1990. High frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration from nucellar calli and protoplasts of *Citrus*. *Acta Biol. Exp. Sin.*, 23: 135-143.
- De VRIES S.C., BOOIJ H., JANSSENS R., VOGELS R., SARIS L., LO SCHIAVO F., TERZI M., VAN KAMMEN A., 1988. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Dev.*, 2: 462-476.
- DIJAK M., SIMMONDS D.H., 1988. Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Sci.*, 58: 183-191.
- DOERNER P.W., 1994. Cell cycle regulation in plants. *Plant Physiol.*, 106: 823-827.
- DOLFINI S., CONSONNI G., MEREGHETTI M., TONELLI C., 1993. Antiparallel expression of the sense and antisense transcripts of maize α -tubulin genes. *Mol. Gen. Genet.*, 241: 161-169.
- DOMON J.M., MEYER Y., FAYE L., DAVID A., DAVID H., 1994. Extracellular (glyco)proteins in embryogenic and non-embryogenic cell lines of Caribbean pine. Comparison between phenotypes of stage one somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.*, 32: 137-147.

- DOMON J.M., DUMAS B., LAINE E., MEYER Y., DAVID A., DAVID H., 1995. Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of Pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. *Plant Physiol.*, 108: 141-148.
- DONNELLY S.F.H., POCKLINGTON M.J., PALLOTTA D., ORR E., 1993. A proline-rich protein, verpolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 10: 585-596.
- DORNELAS M.C., VIEIRA M.L.C., APPEZZATO DA GLORIA B., 1992. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. *Ann. Bot.*, 70: 474-482.
- DUBOIS T., DUBOIS J., GUEDIRA M., VASSEUR J., 1988. Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoïdes. *C.R.Acad. Sci. Paris*, 307: 669-675.
- DUBOIS T., GUEDIRA M., DUBOIS J., VASSEUR J., 1990. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium* : is callose an early marker ? *Ann. Bot.*, 65: 539-545.
- DUBOIS T., GUEDIRA M., DUBOIS J., VASSEUR J., 1991. Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium* . A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, 162: 120-127.
- DUBOIS T., DUBOIS J., GUEDIRA M., DIOP A., VASSEUR J. 1992. SEM characterization of an extracellular matrix around somatic pro-embryos in roots of *Cichorium*. *Ann. Bot.*, 70: 119-124.
- DUDITS D., BOGRE L., GYORGYEY J., 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell Biol.*, 99: 475-484.
- DUMINY A., 1993. Etude de la callose en relation avec l'embryogenèse somatique dans les feuilles de *Cichorium*. Importance des ions Ca²⁺. Diplôme d'études approfondies, Université de Compiègne, 53 pages.
- DUMINY A., GUEDIRA M., DUBOIS T., DUBOIS J., VASSEUR J., 1993. Etude cinétique du dépôt de callose dans la paroi des cellules embryogènes de *Cichorium* . Importance des ions Ca²⁺, 2d colloque IAPTC-France, Embryogenèse somatique : aspects moléculaires et cellulaires, Montpellier 16-17 Nov.
- ELEFTHERIOU E.P., PALEVITZ B.A., 1992. The effect of cytochalasin D on preprophase band organization in root tip cells of *Allium*. *J. Cell Sci.*, 103: 989-998.
- ENCINA C.L., BECERRA J., 1986. Caffeine inhibition of plant cytokinesis by beryllium and its reversion by calcium. *Envir. Exp. Bot.*, 26 : 75-80.
- FALCONER M.M., DONALDSON G., SEAGULL R.W., 1988. MTOCs in higher plant cells: an immunofluorescent study of microtubule assembly sites following depolymerization by APM. *Protoplasma*, 144: 46-55.
- FLANDERS D.J., RAWLINS D.J., SHAW P.J., LLOYD C.W., 1990. Nucleus-associated microtubules help cells : avoidance of 4-way junctions and the role of cell geometry. *J. Cell Biol.*, 110: 1111-1122.
- FOSKET D.E., MOREJOHN L.C., 1992. Structural and functional organization of tubulin. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 201-240.

- FOWKE L.C., ATTREE S.M., WANG H., DUNSTAN D.I. , 1990. Microtubule organization and cell division in embryogenic protoplast cultures of white spruce (*Picea glauca*). *Protoplasma*, 158: 86-94.
- FRANCIS D., HALFORD N.G., 1995. The plant cell cycle. *Physiol. Plant.*, 93: 365-374.
- FUKUDA H., 1987. A change in tubulin synthesis in the process of tracheary element differentiation and cell division of isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.*, 28: 517-528.
- FUKUDA H., 1989. Regulation of tubulin degradation in isolated *Zinnia* mesophyll cells in culture. *Plant Cell Physiol.*, 30: 243-252.
- FUKUDA H. , IWATA N., 1986. Establishment of a sensitized immunoblotting method for measuring plant tubulin content. *Plant Cell Physiol.*, 27: 273-283.
- GALATIS B., APOSTOLAKOS P., 1991. Microtubule organization and morphogenesis of stomata in caffeine-affected seedlings of *Zea mays*. *Protoplasma*, 165: 11-26.
- GAVISH H., VARDI A., FLUHR R., 1988. Alternative model system for plant embryogenesis. In : The second international congress of plant molecular biology, Jerusalem, November, Abstract 467.
- GIDDINGS T.H., STAEHELIN L.A., 1991. Microtubule-mediated control of microfibril deposition : a re-examination of the hypothesis, In: The cytoskeletal basis of plant growth and form, LLOYD C.W. Ed., Academic Press, New York, pp 85-99.
- GIORGETTI L., VERGARA M.R., EVANGELISTA M., LO SCHIAVO F., TERZI M., NUTI-RONCHI V., 1995. On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. *Mol. Gen. Genet.*, 246: 657-662.
- GOODBODY K.C., LLOYD C.W., 1990. Actin filaments line up across *Tradescantia* epidermal cells, anticipating wound-induced division planes. *Protoplasma*, 157: 92-101.
- GORST J., WERNICKE W., GUNNING B.E.S, 1986. Is the preprophase band of microtubules a marker of organization in suspension cultures?. *Protoplasma*, 134: 130-140.
- GUBLER F., 1989. Immunofluorescence localization of microtubules in plant root tips embedded in butyl-methyl methacrylate. *Cell Biol. Intern. Rep.*, 13: 137-145.
- GUEDIRA M., DUBOIS-TYLSKI T., VASSEUR J., DUBOIS J., 1989. Embryogenèse somatique directe à partir de culture d'anthères du *Cichorium* (Asteracea). *Can. J. Bot.*, 67: 970-976.
- GUEDIRA M., DUBOIS T., DUBOIS J., VASSEUR J., 1990. Influence du saccharose sur le rendement, la morphologie et le développement des embryons somatiques chez *Cichorium*. *C.R.Acad. Sci. Paris.*, 310: 453-459.
- GUNDERSEN G.G., KALNOSKI M.H., BULINSKI J.C., 1984. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently *in vivo*. *Cell*, 38: 779-789.
- GUNDERSEN G.G., KHAWAJA S., BULINSKI J.C., 1987. Postpolymerization of alpha tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J. Cell Biol.*, 105: 251-264.
- GUNNING B.E.S, HARDHAM A.R., 1982. Microtubules. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33: 651-698.

- GUNNING B.E.S., WICK S.M., 1985. Preprophase bands, phragmoplasts and spatial control of cytokinesis. *J. Cell Sci.*, Suppl 2: 157-179.
- GUNNING B.E.S., SAMMUT M., 1990. Rearrangements of microtubules involved in establishing cell division planes start immediately after DNA synthesis and are completed just before mitosis. *Plant Cell*, 2: 1273-1282.
- GUZZO F., BALDAN B., MARIANI P., LO SCHIAVO F., TERZI M., 1994. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J. Exp. Bot.*, 45 : 1427-1432.
- GUZZO F., BALDAN B., LEVI M., SPARVOLI E., LO SCHIAVO F., TERZI M., MARIANI P., 1995. Early cellular events during induction of carrot explants with 2,4-D. *Protoplasma*, 185: 28-36.
- HAUSE B., HAUSE G., PECHAN P., VAN LAMMEREN A.A.M., 1993. Cytoskeletal changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. *Cell Biol. Intern.*, 17: 153-168.
- HEIRWEGH K.M.G., BANERJEE N., VAN NERUM K., De LANGHE E., 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cichorium intybus* L. (Witloof, Compositae). *Plant Cell Rep.*, 4: 108-111.
- HELLEBOID S., COUILLEROT J.P., HILBERT J.L., VASSEUR J., 1995. Inhibition of direct somatic embryogenesis by α -difluoromethylarginine in a *Cichorium* hybrid: effects on polyamine content and protein patterns. *Planta*, 196, 571-576.
- HELLER R., 1953. Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Veg.*, 14: 1-223.
- HELLMANN A., MEYER C.U., WERNICKE W., 1995. Tubulin gene expression during growth and maturation of leaves with different developmental patterns. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 30: 67-72.
- HEMERLY A.S., FERREIRA P., De ALMEIDA ENGLER J., VAN MONTAGU M., ENGLER G., INZE D., 1993. *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, 5: 1711-1723.
- HEPLER P.K., BONSIGNORE C.L., 1990. Caffeine inhibition of cytokinesis : ultrastructure of cell plate formation/degradation. *Protoplasma*, 157: 182-192.
- HEPLER P.K., PALEVITZ B.A., LANCELLE S.A., McCAULEY M.M., LICHTSCHEIDL I., 1990. Cortical endoplasmic reticulum in plants. *J. Cell Sci.*, 96: 355-373.
- HILBERT J.L., DUBOIS T., VASSEUR J., 1992. Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiol. Biochem.*, 30 : 733-741.
- HOCHTRASSER D.F., HARRINGTON M.G., HOCHSTRASSER A.C., MILLER M.J., MERRIL C.R., 1988. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 173: 424-435.
- HOFFMAN J.C., VAUGHN K.C., 1995. Post-translational tubulin modification in spermatogeneous cells of the pteridophyte *Ceratopteris richardii*. *Protoplasma*, 186: 169-182.
- HUANG G., SHERIDAN W.F., 1994. Female gametophyte development in maize: microtubular organization and embryo sac polarity. *Plant Cell*, 6: 845-861.

- HUSH J.M., OVERALL R.L., 1992. Re-orientation of cortical F-actin is not necessary for wound-induced microtubule re-orientation and cell polarity establishment. *Protoplasma*, 169: 97-106.
- HUSH J.M., HAWES C.R., OVERALL R.L., 1990. Interphase microtubule reorientation predicts a new cell polarity in wounded pea roots. *J. Cell Sci.*, 96: 47-61.
- INOUE S., 1981. Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 91: 131s-147s.
- ISHIDA K., KATSUMI M., 1992. Effects of gibberellin and abscisic acid on the cortical microtubule orientation on hypocotyl cells of light-grown cucumber seedlings. *Int. J. Plant Sci.*, 153: 155-163.
- JASIK J., SALAJOVA T., SALAJ J., 1995. Developmental anatomy and ultrastructure of early somatic embryos in european black pine (*Pinus nigra* Arn). *Protoplasma*, 185: 205-211.
- JOHN P.C.L., SEK F.J., HAYLES J., 1991. Association of the plant p34cdc2-like protein with p13suc1: implications for control of cell division cycles in plants. *Protoplasma*, 161: 70-74.
- JOHN P.C.L., ZHANG K., DONG C., DIEDERICH L., WIGHTMAN F., 1993. p34cdc2 related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. *Aust. J. Plant Physiol.*, 20: 503-526.
- JONAK, C., HEBERLE-BORS E., HIRT H., 1994. MAP kinases: universal multi-purpose signaling tools. *Plant Mol. Biol.*, 24: 407-416.
- JONES T.J., ROST T.L., 1989. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Bot. Gaz.*, 150: 41-49.
- JOSHI H.C., PALACIOS M.J., McNAMARA L., CLEVELAND D.W., 1992. γ tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature*, 356: 80-83.
- JULIAN M., TOLLON Y., LAJOIE-MAZENC I., MOISAND A., MAZARGUIL H., PUGET A., WRIGHT M., 1993. γ tubulin participates in the formation of the midbody during the cytokinesis in mammalian cells. *J. Cell Sci.*, 105: 145-156.
- JUNG C., WERNICKE W., 1990. Cell shaping and microtubules in developing mesophyll of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Protoplasma*, 153: 141-148.
- JUNG C., HELLMAN A., WERNICKE W., 1993. Changes in the density of microtubular networks in mesophyll cells and mesophyll derived protoplasts of *Nicotiana* and *Triticum* during leaf development. *Planta*, 190: 10-16.
- KAKIMOTO T., SHIBAOKA H., 1987. Actin filaments and microtubules in the PPB and phragmoplast of tobacco cells. *Protoplasma*, 140: 151-156.
- KATO R., ITAGAKI K., UCHIDA K., SHINOMURA T.H., HARADA Y., 1991. Effects of an epidermal growth factor on the growth of *Zea* coleoptiles. *Plant Cell Physiol.*, 32: 917-919.
- KATO R., NAGAYAMA E., SUZUKI T., UCHIDA K., SHINOMURA T.H., HARADA Y., 1993. Promotion of plant cell division by an epidermal growth factor. *Plant Cell Physiol.*, 34: 789-793.
- KATSUTA J., SHIBAOKA H., 1988. The roles of the cytoskeleton on the cell wall in nuclear positioning in Tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.*, 29: 403-413.

- KATSUTA J., HASHIGUCHI Y., SHIBAOKA H., 1990. The role of the cytoskeleton in positioning the nucleus in premitotic tobacco BY-cells. *J. Cell Sci.*, 95: 413-422.
- KAUSS H., JEBLICK W., 1985. Activation by polyamines, polycations and ruthenium red of the Ca^{2+} -dependent glucan synthase from soybean cells. *FEBS Lett.*, 185: 226-230.
- KEIFER A.Q., CALLAHAM D.A., HEPLER P.K., 1992. Inhibitors of cell division and protoplasmic streaming fail to cause a detectable effect on intracellular calcium levels in stamen-hair cells of *Tradescantia virginiana* L. *Planta*, 186: 361-366.
- KENGEN H.M.P., De GRAAF B.H.J., 1991. Microtubules and actin filaments colocalize extensively in non fixed cells of Tobacco. *Protoplasma*, 163: 62-65.
- KERR G.P., CARTER J.V., 1988. Microtubules of higher plants contain acetylated alpha tubulin. *J. Cell Biol.* 107: 670a.
- KIELISZWESKI M.J., LAMPORT D.T.A., 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J.*, 5: 157-172.
- KIELISZWESKI M., De ZACKS R., LEYKAM J.F., LAMPORT D.T.A., 1992. A repetitive prolin-rich protein from the gymnosperm Douglas fir is a hydroxyproline glycoprotein. *Plant Physiol.*, 98: 919-926.
- KWIATKOWSKA M., 1988. Symplasmic isolation of *Chara vulgaris* antheridium and mechanisms regulating the process of spermatogenesis. *Protoplasma*, 142: 137-146.
- KWIATKOWSKA M., MASZEWSKI J., 1986. Changes in the occurrence and ultrastructure of plasmodesmata in antheridia of *Chara vulgaris* L. during different stages of spermatogenesis. *Protoplasma*, 132: 179-188.
- LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LAMBERT A.M., 1993. Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 116-122.
- LAMBERT A.M., LLOYD C.W., 1994. The higher plant microtubule cycle, In: *Microtubules*, HYAMS J.S. and LLOYD C.W. Eds., *Modern Cell Biology*, Vol. 13, pp 325-341.
- LAMBERT A.M., VANTARD M., SCHMIT A.C., STOECKEL H., 1991. Mitosis in plant, In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form*, LLOYD C.W. Ed., Academic Press, New York, pp 199-208.
- LANG J.M., EISINGER W.R., GREEN P.B., 1982. Effects of ethylene on the orientation of microtubules and cellulose microfibrils of pea epicotyl cells with polylamellate cell walls. *Protoplasma*, 110: 5-14.
- LAPORTE K., ROSSIGNOL M., TRAAS J., 1993. Interaction of tubulin with the plasma membrane : tubulin is present in purified plasmalemma and behaves as an integral membrane protein. *Planta*, 191: 413-416.
- LELU M.A., BORNMAN C.H., 1990. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea glauca* and *Picea mariana*. *Plant Physiol. Biochem.*, 28: 785-791.
- LETEINTURIER J., COCHET J.P., MARLE M., BENIGNI M., 1991. *L'endive: guide pratique*. CTIFL Ed., Paris, 271 pages.

- LIU B., PALEVITZ B.A., 1992. Anaphase chromosome separation in dividing generative cells of *Tradescantia*. Changes in microtubule organization and kinetochore distribution visualized by antitubulin and CREST immunocytochemistry. *Protoplasma*, 166: 122-133.
- LIU B., MARC J., JOSHI H.C., PALEVITZ B.A., 1993. A γ - tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle dependent manner. *J. Cell Sci.*, 104: 1217-1228.
- LIU B., JOSHI H.C., WILSON T.J., SILFLOW C.W., PALEVITZ B.A., SNUSTAD D.P., 1994. γ tubulin in *Arabidopsis*. Gene sequence, immunoblot and immunofluorescence studies. *Plant Cell*, 6: 303-314.
- LLOYD C.W., 1989. The plant cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1:30-35.
- LLOYD C.W., 1991. Cytoskeletal elements of the phragmosome establish the division plane in vacuolated higher plant cells. In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form*, LLOYD C.W. Ed., Academic Press, New York, pp 245-257.
- LLOYD C.W., TRAAS J.A., 1988. The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. *Drug studies. Development*, 102: 211-221.
- LLOYD C.W., CLAYTON L., DAWSON P.J., DOONAN D.H., HULME J.S., ROBERTS I.N., WELLS B., 1985. The cytoskeleton underlying side walls and crosswalls in plants : molecules and macromolecular assemblies. *J. Cell Sci., Suppl 2*: 143-155.
- LONGLY B., LOUANT B.P., 1987. Mécanismes de la reproduction chez la chicorée de Bruxelles: fondements et applications à la sélection. IRSIA, Bruxelles, 108 pages.
- LO SCHIAVO F., QUESADA-ALLUE L.A., SUNG Z.R., 1986. Tunicamycin affects somatic embryogenesis but not cell proliferation of carrot. *Plant Sci.*, 44: 65-71.
- LUCAS W.J., DING B., VAN DER SCHOOT C., 1993. Plasmodesmata and supracellular nature of plants. *New Phytol.*, 125: 435-476.
- LUNA E.J.C., GOODLOE-HOLLAND C.M., INGALLS H.M., 1984. A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum*. II. Integral proteins mediate the binding of plasma membranes to F-actin affinity beads. *J. Cell Biol.*, 99: 58-70.
- LÜTTGE U., KLEIGE M., BAUER G., 1992. *Traité fondamental de Botanique*. Tec & Doc Lavoisier Ed., Paris, p75.
- MAHESWARAN G., WILLIAMS E.G., 1985. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. *Ann. Bot.*, 56: 619-630.
- MAHESWARAN G., WILLIAMS E.G., 1986. Direct secondary somatic embryogenesis from immature sexual embryos of *Trifolium repens* cultures *in vitro*. *Ann. Bot.*, 57: 109-117.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J., 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor, New York.
- MAY R.A., TRIGIANO R.N., 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116: 366-371.
- MCCURDY D.W., PALEVITZ B.A., GUNNING B.E.S., 1991. Effect of cytochalasins on actin in dividing root tip cells of *Allium* and *Triticum* : a comparative immunocytochemical study. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 18 : 107-112.

- McDONALD F.D., AP REES T., 1983. Labelling of carbohydrate by [¹⁴C] glycerol supplied to suspension cultures of soybean. *Phytochem.*, 22: 1141-1143.
- McDONALD A.R., LIU B., JOSHI H.C., PALEVITZ B.A., 1993. γ -Tubulin is associated with a cortical-microtubule-organizing zone in the developing guard cells of *Allium cepa* L. *Planta*, 191: 357-361.
- MEAGHER R.B., McLEAN B.G., 1990. Diversity of plant actins. *Cell Motil. Cytoskel.*, 16: 164-166.
- MEINDL U., 1983. Cytoskeletal control of nuclear migration and anchoring in developing cells of *Micrasterias denticulata* and the change caused by the anti-microtubular herbicide amiprofos-methyl(APM). *Protoplasma*, 118: 75-90.
- MICHAUX-FERRIERE N., SCHWENDIMAN J., 1992. Histology of somatic embryogenesis. In: *Reproductive biology and plant breeding*, DATTEE Y., DUMAS C. and GALLAIS A. Eds., Springer-Verlag, Berlin, pp 248-259.
- MICHAUX-FERRIERE N., DUBLIN P., SCHWENDIMAN J., 1987. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explantats foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*, 31: 103-111.
- MINEYUKI Y., GUNNING B.E.S., 1988. Streak time-lapse video microscopy : analysis of protoplasmic motility and cell division in *Tradescantia* stamen hair cells. *J. Microsc.*, 150: 41-55.
- MINEYUKI Y., GUNNING B.E.S., 1990. A role for preprophase band of microtubules in maturation of new cell walls, and a general proposal on the function of PPB sites in cell division in higher plants. *J. Cell Sci.*, 97: 527-537.
- MITA T., KATSUMI M., 1986. Gibberellin control of microtubule arrangement in the mesocotyl epidermal cells of the d5 mutant of *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.*, 27: 651-659.
- MIZUTANI T., KATSUTA J., SHIBAOKA H., 1993. Nuclear-cycle dependence of the development of the preprophase band in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.*, 34: 215-219.
- MOLE-BAJER J., BAJER A.S., ZINKOWSKI R.P., BALCZON R.D., BRINKLEY B.R., 1990. Autoantibodies from a patient with scleroderma CREST recognized kinetochores of the higher plant *Haemanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3599-3603.
- MONNIER M., 1988. Embryogenèses zygotique et somatique. In : *Culture de cellules, tissus et organes végétaux*, ZRYD J.P. Ed., Presses polytechniques romande, Lausanne, pp 119-134.
- MOREJOHN L.C., 1991. The molecular pharmacology of plant tubulin and microtubules, In : *The molecular basis of plant growth and form*, LLOYD C.W. Ed., Academic Press, London, pp 29-43.
- MOREJOHN L.C., FOSKET D.E., 1984. Inhibition of plant microtubule polymerization *in vitro* by the phosphoric amide herbicide amiprofosmethyl. *Science*, 224: 874-876.
- MOREJOHN L.C., BUREAU T.E., TOCCHI L.P., FOSKET D.E., 1987. Resistance of *Rosa* microtubule polymerization to colchicine results from a low-affinity interaction of colchicine and tubulin. *Planta*, 170: 230-241.
- MOREL G., WETMORE R.H., 1951. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, 38: 141-143.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

- MURATA T., WADA M., 1989. Re-organization of microtubules during preprophase band development in *Adiantum* protonemata. *Protoplasma*, 151: 73-80.
- MURATA T., WADA M., 1991. Re-formation of the preprophase band after cold-induced depolymerization of microtubules in *Adiantum* protonemata. *Plant Cell Physiol.*, 32: 1145-1151.
- MURATA T., WADA M., 1993a. Cell division in caffeine-induced binucleate protonemal cells of *Adiantum*. I. Asynchronous mitosis of two nuclei in a single cell. *J. Plant Res.*, 106: 305-311.
- MURATA T., WADA M., 1993b. Cell division in caffeine-induced binucleate protonemal cells of *Adiantum*. II. Formation of the preprophase band and cell division in centrifuged and non-centrifuged cells. *J. Plant Res.*, 106: 313-318.
- MURRAY A.W., 1989. Cyclin synthesis and degradation and the embryonic cell cycle. *J. Cell Sci.*, Suppl 12: 65-76.
- MURRAY A.W., 1994. Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 872-876.
- MURRAY A.W., KIRSCHNER M.W., 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 339: 275-280.
- NAGAI R., 1993. Regulation of intracellular movements in plant cells by environmental stimuli. *Int. Rev. Cytol.*, 145: 251-310.
- NEUENSCHWANDER U., FLEMING A.J., KUHLEMEIER C., 1994. Cytokinin induces the developmentally restricted synthesis of an extracellular protein in *Physcomitrella patens*. *Plant J.*, 5: 21-31.
- NIEDZ R.P., BAUSHER M.G., HEARN C.J., 1991. Detection of *Citrus* leaf and seed glycoproteins using biotinylated lectin probes. *Hortsci.*, 26: 910-913.
- NURSE P., 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344: 503-508.
- NUTI-RONCHI V., 1993. Cell commitment to somatic embryogenesis. XIIe colloque de la section française de l'IAPTC: L'embryogenèse somatique: approches cellulaires et moléculaires, 16-17 Novembre, Montpellier, France.
- NUTI-RONCHI V., 1995. Mitosis and meiosis in cultured plant cells and their relationship to variant cell types arising in culture. *Intern. Rev. Cytol.*, 158: 65-140.
- NUTI-RONCHI V., GIORGETTI L., TONELLI M., MARTINI G., 1992 a. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. I. Prophase chromosome reduction. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 30: 107-114.
- NUTI-RONCHI V., GIORGETTI L., TONELLI M., MARTINI G., 1992 b. II. Somatic meiosis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 30: 115-119.
- OAKLEY B.R., 1992. γ -tubulin: the microtubule organizer ?. *Trends Cell Biol.*, 2: 1-5.
- OAKLEY B.R., 1994. γ -tubulin. In: *Microtubules*, HYAMS J.S. and LLOYD C.W. Eds., *Modern Cell Biology*, Vol. 13, pp 33-45.
- OAKLEY C.E., OAKLEY B.R., 1989. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mip A* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, 338: 662-664.

- O'CONNELL M.J., NURSE P., 1994. How cells know they are in G1 or G2 ?, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 867-871.
- O'FARRELL P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250: 4007-4021.
- OKAMURA S., KAKIUCHI M., SANO A., KAWAJIRI M., 1993. Loss of tubulin during cold treatment of cultured carrot cells. *Physiol. Plant.*, 88: 93-98.
- ODD J.L., NANNINGA N., 1992. Cell shape, chromosome orientation and the position of the plane of division in *Vicia faba* root cortex cells. *J. Cell Sci.* 103: 847-855.
- OVERVOORDE P.J., GRIMES H.D., 1994. The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell Physiol.*, 32: 135-144.
- PALEVITZ B.A., 1987. Accumulation of F-actin during cytokinesis in *Allium*. Correlation with microtubule distribution and the effects of drugs. *Protoplasma*, 141 : 24-32.
- PALEVITZ B.A., 1991. Microtubules rearrangement, translocation and reutilization. In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form*, LLOYD C.W. Ed., Academic press, New York, pp 45-55.
- PALEVITZ B.A., LIU B., JOSHI H.C., 1994. γ -tubulin in tobacco pollen tubes : association with generative cell and vegetative microtubules. *Sex. Plant Reprod.*, 7: 209-214.
- PANTALONI D., 1989. Dynamique du cytosquelette, microtubules et microfilament. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 136: 5-15.
- PANTERIS E., GALATIS B., APOSTOLAKOS P., 1991. Patterns of cortical and perinuclear microtubule organization in meristematic root cells of *Adiantum capillus veneris*. *Protoplasma*, 165: 173-188.
- PAPPAS P.W., 1971. The use of a chrome alum-gelatin (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections. *Stain Technol.*, 46:121-124.
- PATEL R., TWIGG J., CROSSLEY I., GOLSTEYN R., WHITAKER M., 1989. Calcium-induced chromatin condensation and cyclin phosphorylation during chromatin condensation cycles in ammonia-activated sea urchin eggs. *J. Cell Sci., Suppl* 12: 129-144.
- PAUL D.C., GOFF C.W., 1973. Comparative effects of caffeine, its analogues and calcium deficiency on cytokinesis. *Exp. Cell Res.*, 78 : 399-413.
- PEDROSO M.C., PAIS M.S., 1993. Direct embryo formation in leaves of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Rep.*, 12: 639-643.
- PENNELL R.I., JANNICHE L., SCOFIELD G.N., BOOIJ H., De VRIES S. C., ROBERTS K., 1992. Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J. Cell Biol.*, 119: 1371-1380.
- PERENNES C., QIN L.X., GLAB N., BERGOUNIOUX C., 1993. Petunia p34^{cdc2} protein kinase activity in G₂/M cells obtained with a reversible cell cycle inhibitor, mimosine. *FEBS Lett.*, 333: 141-145.
- PETER M., SANGHERA J.S., PELECH S.L., NIGG E.A., 1992. Mitogen-activated kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34^{cdc2}. *Eur. J. Biochem.*, 205: 287-294.

- PICKETT-HEAPS J.D., 1969. Preprophase microtubule bands in some abnormal mitotic cells of wheat. *J. Cell Sci.*, 4: 397-420.
- PITTENGER M.F., CLEVELAND D.W., 1985. Retention of autoregulatory control of tubulin synthesis in cytoplasts: demonstration of a cytoplasmic mechanism that regulates the level of tubulin expression. *J. Cell Biol.*, 101: 1941-1952.
- PRETOVA A., De RUIJTER N.C.A., VAN LAMMEREN A.A.M., SCHEL J.H.N., 1993. Structural observations during androgenic microspore culture of 4c1 genotype of *Zea mays* L. *Euphytica*, 65: 61-69.
- RACUSEN R.H., SCHIAVONE F.M., 1990. Positional cues and differential gene expression in somatic embryos of higher plants. *Cell Differ. Dev.*, 30: 159-169.
- RAMBAUD C., DUBOIS J., VASSEUR J., 1990. Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdeburg chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdeburg). *Agronomie*, 10: 767-772.
- RAMBAUD C., DUBOIS J., VASSEUR J. 1992. The induction of tetraploidy in chicory (*Cichorium intybus* L., var. Magdebourg) by protoplast fusion. *Euphytica*, 62: 63-67.
- RAMBAUD C., BLERVACQ A.S., DEVAUX P., DUBOIS T., DUBOIS J., LAMMIN F., VASSEUR J., 1995. There is no somatic meiosis in embryogenic leaves of *Cichorium*. Soumise à *Annals of Botany*.
- REICHHELD J.P., SONOBE S., CLEMENT B., CHAUBET N., GIGOT C., 1995. Cell cycle-regulated histone gene expression in synchronized plant cells. *Plant J.*, 7: 245-252.
- REUZEAU C., PONT-LEZICA R.F., 1995. Comparing plant and animal extracellular matrix-cytoskeleton-connections are they alike ?. *Protoplasma*, 186: 113-121.
- ROBERTS I.N., LLOYD C.W., ROBERTS K., 1985. Ethylene-induced microtubule reorientations: mediation by helicoidal arrays. *Planta*, 164, 439-447.
- ROBATCHE-CLAIVE A.S., COUILLEROT J.P., DUBOIS T., DUBOIS J., VASSEUR J., 1992. Embryogenèse somatique directe dans les feuilles du *Cichorium* hybride "474" : synchronisation de l'induction. *C.R.Acad. Sci. Paris*, 314: 371-377.
- RÖS M., JUNG G., WERNICKE W., 1991. The first cell division cycle in *Nicotiana tabacum* mesophyll protoplasts cultured *in vitro*. II. Microtubules and the plane of division. *J. Plant Physiol.*, 138: 156-161.
- RUOSLATHI E., PIERSCHBACHER M.D., 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238: 491-497.
- SAFA A.R., HAMEL E., FELDSTED R.L., 1987. Photoaffinity labeling of tubulin subunits with a photoactive analogue of vinblastine. *Biochemistry*, 26: 97-102.
- SAKIYAMA M., SHIBAOKA H., 1990. Effects of abscissic acid on the orientation and cold stability of cortical microtubules in epicotyl cells of the dwarf pea. *Protoplasma*, 157: 165-171.
- SAMAJ J., BOBAK M., BIEHOVA A., KRISTIN J., AUXTOVA-SAMAJOVA O., 1995. Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays*. *Protoplasma*, 186: 45-49.
- SAMMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor, New York.

- SANTIAGO J.F., GOODWIN P.B., 1988. Restricted cell/cell communication in the shoot apex of *Silene coeli-rosa* during the transition to flowering is associated with a high mitotic index rather than with evocation. *Protoplasma*, 146: 52-60.
- SAUDEMONT D., 1992. Chicorées Witloof (*Cichorium intybus* L. var. Witloof). Comparaison avec un hybride embryogène (*Cichorium intybus* var. Magdebourg x *Cichorium endivia* L. var. *latifolia*) et analyses des polyamines endogènes libres. Université de Lille, Thèse, 121 pages.
- SAUNDERS M.J., 1986. Cytokinin activation and redistribution of plasma-membrane ion channels in *Funaria*. *Planta*, 167: 402-409.
- SCHINDLER M., MEINERS S., CHERESH D.A., 1989. RGD dependent linkage between plant cell wall and plasma membrane : consequences for growth. *J. Cell Biol.*, 108: 1955-1965.
- SCHINDLER T., BERGFELD R., SCHOPFER P., 1995. Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant J.*, 7: 25-36.
- SCHLEGEL R., PARDEE A.B., 1986. Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. *Nature*, 232: 1264-1266.
- SCHLIWA M., EUTENEUER U., BULINSKI J.C., IZANT J.G., 1981. Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1037-1041.
- SCHMIT A.C., LAMBERT A.M., 1990. Microinjected fluorescent phalloidin *in vivo* reveals the F-actin dynamics and assembly in higher plant mitotic cells. *Plant Cell*, 2: 129-138.
- SCHMIT A.C., VANTARD M., De MEY J., LAMBERT A.M., 1983. Aster like microtubule centers establish spindle polarity during interphase mitosis transition in higher plant cells. *Plant Cell Rep.*, 2: 285-288.
- SCHMIT A.C., STOPPIN V., CHEVRIER V., JOB D., LAMBERT A.M., 1994. Cell cycle dependent distribution of a centrosomal antigen at the perinuclear MTOC or at the kinetochores of higher plant cells. *Chromosoma*, 103: 343-351.
- SCHWARTZ M.A., LUNA E.J., 1986. Binding and assembly of actin filaments by plasma membranes from *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.*, 102: 2067-2075.
- SCHWARTZ M.A., LUNA E.J., 1988. How actin binds and assembles onto plasma membranes from *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.*, 102: 2018-2019.
- SEAGULL R.W., 1989. The plant cytoskeleton. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 8: 131-167.
- SEAGULL R.W., HEATH I.B., 1980. The organization of cortical microtubule arrays in the radish root hair. *Protoplasma*, 103: 205-230.
- SERANO L., WANDOSELL F., AVILA J., 1986. Location of the regions recognized by five commercial antibodies on the tubuline molecule. *Anal. Biochem.*, 159: 253-259.
- SHARIFF A., LUNA E.J., 1990. *Dictyostelium discoideum* plasma membrane contain an actin-nucleating activity that requires ponticulín, an integral membrane glycoprotein. *J. Cell Biol.*, 110: 681-692.
- SIDIKOU-SEYNI R., RAMBAUD C., DUBOIS J., VASSEUR J., 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Cichorium intybus* L. x *Cichorium endivia* L. *Plant Cell Tiss. org. cult.*, 29: 83-91.

- SINGH, PAOLILLO, 1990.
- SMALLWOOD M., BEVEN A., DONOVAN N., NEILL S.J., PEART J., ROBERTS K., KNOX J.P., 1994. Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. *Plant J.*, 5: 237-246.
- SMYTH D.A., 1992. Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth. *J. Plant Growth Regul.*, 11 : 125-128.
- SONESSON A., WIDELL S., 1993. Cytoskeleton components of inside-out and right-side-out membrane vesicle from plants. *Protoplasma*, 177: 45-52.
- STAIGER C.J. , LLOYD C.W., 1991. The plant cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3: 33-42.
- STANKOVIC B., ABE S., DAVIES E., 1993. Co-localization of polysomes, cytoskeleton, and membranes with protein bodies from corn endosperm. *Protoplasma*, 177: 66-72.
- STARGELL L.A., HERUTH D.P., GAERTIG J., GOROVSKY M.A., 1992. Drugs affecting microtubule dynamics increase α -tubulin mRNA accumulation via transcription in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 1443-1450.
- STAXEN I., BERGOUNIOUX C., BORNMAN J.F., 1993. Effect of ultraviolet radiation on cell division and microtubule organization in *Petunia hybrida* protoplasts. *Protoplasma*, 173: 70-76.
- STEEN D.A., CHADWICK A.V., 1981. Ethylene effects in pea stem tissue. Evidence for microtubule mediation. *Plant Physiol.*, 67: 460-465.
- STOPPIN V., VANTARD M., SCHMIT A.C., LAMBERT A.M., 1994. Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly : the nuclear surface in higher plant has centrosome-like activity. *Plant Cell*, 6: 1099-1106.
- TAUTORUS T.E., WANG H., FOWKE L.C., DUNSTAN D.I., 1992. Microtubule pattern and the occurrence of the pre-prophase bands in embryogenic cultures of black spruce (*Picea mariana* Mill.) and non-embryogenic cultures of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). *Plant Cell Rep.*, 11: 419-423.
- TETU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORRELL B.S., 1990. Direct embryogenesis and organogenesis in cultured immature zygotic embryos of *Pisum sativum* L. *J. Plant Physiol.*, 137: 102-109.
- TOMBES R.M., SIMERLY C., BORISY G.G., SCHATTEN G., 1992. Meiosis, egg activation, and the nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{++} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{++} independent in the mouse oocyte. *J. Cell Biol.*, 117: 799-811.
- TOWBIN H., STAEBELIN T.V., GORDON J., 1979. Electroporetic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4353.
- TRAAS J., DOONAN J.H., RAWLINS D.J., SHAW P.J., WATTS J., LLOYD C.W., 1987. An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. *J. Cell Biol.*, 105: 387-395.
- TRAAS J.A., BEVEN A.F., DOONAN J.H., CORDEWENER J., SHAW P.J., 1992. Cell-cycle-dependent changes in labelling of specific phosphoproteins by the monoclonal antibody MPM-2 in plant cells. *Plant J.*, 2: 723-732.

- TRAAS J., BELLINI C., NACRY P., KRONENBERGER J., BOUCHEZ D., CABOCHE M., 1995. Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature*, 375: 676-677.
- TRIGIANO R.N., GRAY D.J., CONGER B.V., McDANIEL J.K., 1989. Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.*, 150: 72-77.
- UTRILLA L., SANS J., De la TORRE C., 1989. Colchicine resistant assembly of tubulin in plant mitosis. *Protoplasma*, 152: 101-108.
- VANTARD M., LEVILLIERS N., HILL A.M., ADOUTTE A., LAMBERT A.M., 1990. Incorporation of *Paramecium* axonemal tubulin into higher plant cells reveals functional sites of microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8825-8829.
- VASIL I.K., HILDEBRANDT A.C., 1966. Variations of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*. *Am. J. Bot.*, 53: 860-869.
- VASIL I.K., HILDEBRANDT A.C., RIKER A.J., 1964. Endive plantlets from freely suspended cells and cell groups grown *in vitro*. *Science*, 146: 76-77.
- VASIL V., REDWAY F., VASIL I.K., 1990. Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology*, 8: 429-434.
- VASSEUR J., DUBOIS J., HILBERT J.L., COUILLEROT J.P., 1995. Somatic embryogenesis in Chicory (*Cichorium* species). In: *Biotechnology in agriculture and forestry, Somatic embryogenesis and synthesis seed II*, BAJAJ Y.P.S. Ed., Springer Verlag, Berlin, 31: 125-137.
- VAUGHAN M.A., VAUGHN K.C., 1988. Mitotic disrupters from higher plants and their uses as herbicides. *Weed Technol.*, 2: 533-539.
- VAUGHN K.C., MARKS M.D., WEEKS D.P., 1987. A dinitroaniline-resistant mutant of *Eleusine indica* exhibits cross-resistance and super-sensitivity to antimicrotubule herbicides and drugs. *Plant physiol.*, 83: 956-964.
- VENVERLOO C.J., LIBBENGA K.R., 1987. Regulation of the plane of cell division in vacuolated cells. I. The function of nuclear positioning and phragmosome formation. *J. Plant Physiol.*, 131: 267-284.
- VERA P., LAMB C., DOERNER P.W., 1994. Cell-cycle regulation of hydroxyproline-rich glycoprotein *HRGPnt3* gene expression during the initiation of lateral root meristems. *Plant J.*, 6: 717-727.
- VERDUS M.C., DUBOIS T., DUBOIS J., VASSEUR J., 1993. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. *Ann. Bot.*, 72: 375-383.
- VILLEMUR R., JOYCE C.M., HAAS N.A., GODDARD R.H., KOPCZAK S.D., HUSSEY P.J., SNUSTAD D.P., SILFLOW C.D., 1992. The α -tubulin gene family of maize (*Zea mays* L.): evidence for two ancient α -tubulin genes in plants. *J. Mol. Biol.*, 227: 81-96.
- VU J.C.V., NIEDZ R.P., YELENOSKY G., 1993. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis, and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of 'Hamlin' sweet orange. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 35: 75-80.
- WACKER I., SCHNEPF E., 1990. Effects of nifedipine, verapamil, and diltiazem on tip growth in *Funaria hygrometrica*. *Planta*, 180: 492-501.

- WANG H., CUTLER A.J., FOWKE L.C., 1991. Microtubule organization in cultured soybean and black spruce cells: interphase mitosis transition and spindle morphology. *Protoplasma*, 162: 46-54.
- WETHERELL D.F., 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 3: 221-227.
- WICK S.M., 1991. Spatial aspects of cytokinesis in plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3: 253-260.
- WICK S.M., DUNIEC J., 1984. Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. II. Transition between preprophase band and mitotic spindle. *Protoplasma*, 122: 45-55.
- WICK S.M., SEAGULL R.W., OSBORN M., WEBER K., GUNNING B.E.S., 1981. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. *J. Cell Biol.*, 89, 685-690.
- WILLIAMSON R.E., 1991. Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. *Intern. Rev. Cytol.*, 129: 125- 205.
- WILLIAMSON R.E., ASHLEY C.C., 1982. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature*, 296: 750-759.
- WOODS C.M., POLITO V.S., REID M.S., 1984. Response to chilling stress in plant cells. II. Redistribution of intracellular calcium. *Protoplasma*, 121: 17-24.
- WYATT S.E., CARPITA N.C., 1993. The plant cytoskeleton-cell-wall continuum. *Trends Cell Biol.*, 3: 413-417.
- YEN T.J., MACHLIN P.S., CLEVELAND D.W., 1988. Autoregulated instability of β -tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of β -tubulin. *Nature*, 334: 580-585.
- YOUNG T., HYAMS J.S., LLOYD C.W., 1994. Increased cell cycle-dependent staining of plant cells by the antibody MPM-2 correlates with preprophase band formation. *Plant J.*, 5: 279-284.
- ZABRECKY J.R., COLE R.D., 1979. Tubulin does not bind glycerol irreversibly. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 91: 755-760.
- ZANDOMENI K., SCHOPFER P., 1993. Reorientation of microtubules at the outer epidermal wall of maize coleptiles by phytochrome, blue-light photoreceptor and auxin. *Protoplasma*, 173: 103-112.
- ZHANG D., WADSWORTH P., HEPLER P.K., 1990. Microtubule dynamics in living dividing plant cells : confocal imaging of microinjected fluorescent brain tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 8820-8824.
- ZHANG K., TSUKITANI Y., JOHN P.C.L., 1992. Mitotic arrest in tobacco caused by the phosphoprotein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant Cell Physiol.*, 33: 677-688.
- ZHU J.K., SHI J., SINGH U., WYATT S.E., BRESSAN R.A., HASEGAWA P.M., CARPITA N.C., 1993. Enrichment of vitronectin- and fibronectin- like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant J.*, 3: 637-646.
- ZIVY M., 1986. Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent, In : *Recent progress in two-dimensional electrophoresis*, GALTEAU M.M. and SIEST G. Eds., Presses Universitaires de Nancy, Nancy, pp 69-72.

ZONIA L.E., TUPY J., 1995. Lithium treatment of *Nicotiana tabacum* microspores blocks polar nuclear migration, disrupts the partitioning of membrane-associated Ca^{2+} , and induces symmetrical mitosis. *Sex. Plant Reprod.*, 8: 152-160.

Eléments	mg.l ⁻¹	mM
MgSO ₄	185	1,5
CaCl ₂	220	1,5
NH ₄ NO ₃	825	10
KCl	750	10
KH ₂ PO ₄	85	0,6
Fer-EDTA :		
Na ₂ -EDTA	18,65	
FeSO ₄ , 7H ₂ O	13,9	1.10 ⁻⁵
Glutamine	100	0,7
Microéléments de HELLER (1953)		
Vitamines de MOREL et WETMORE (1951)		
ANA	0,02	1.10 ⁻⁴
2iP	0,5	2,5.10 ⁻³
Saccharose	10 g.l ⁻¹	30
pH 5,5		

Annexe 1 : Composition du milieu d'induction des embryons somatiques.

Eléments	mg.l ⁻¹	mM
NaNO ₃	600	7
KCl	450	10
CaCl ₂	75	0,5
NaH ₂ PO ₄	125	1
MgSO ₄	250	2
Fer-EDTA:		
Na ₂ -EDTA	18,65	
FeSO ₄ , 7H ₂ O	13,9	1.10 ⁻⁵
Microéléments de HELLER (1953)		
Vitamines de MOREL et WETMORE (1951)		
Saccharose	5 g.l ⁻¹	15
Agar	6 g.l ⁻¹	
pH 5,5		

Annexe 2: Composition du milieu de développement des embryons somatiques (milieu de Heller modifié).

Eléments	mg.l ⁻¹	mM
MgSO ₄	185	1,5
CaCl ₂	220	1,5
NH ₄ NO ₃	825	10
KCl	750	10
KH ₂ PO ₄	85	0,6
Fer-EDTA :		
Na ₂ -EDTA	18,65	
FeSO ₄ , 7H ₂ O	13,9	1.10 ⁻⁵
Glutamine	100	0,7
Microéléments de HELLER (1953)		
Vitamines de MOREL et WETMORE (1951)		
ANA	0,02	1.10 ⁻⁴
2iP	0,5	2,5.10 ⁻³
Saccharose	10 g.l ⁻¹	30
Glycérol	24 ml	330

Annexe 3: Composition du milieu d'induction des embryons somatiques dans les feuilles du *Cichorium* hybride '474' pendant les cinq premiers jours. Les explants sont ensuite transférés dans le même milieu dépourvu de glycérol.

PIPES	50 mM
EGTA	5 mM
MgSO ₄	1 mM
Glycérol	10 %
Fixateur : tampon	
+ paraformaldéhyde	3,7%
Destabilisation: tampon	
+ Triton X100	0,1 %
pH 7,2 ou pH 5,5 (enzymes)	

Annexe 4: Composition du tampon MSB (microtubule stabilizing buffer).

ETAPES	SOLUTIONS	DUREE
<u>Fixation des tissus :</u> rinçages	Tampon MSB pH 6,8 + 0,1 % Triton X100 + 3,7 % paraformaldéhyde Tampon MSB pH 6,8	1h, 20 °C 3 fois 10 min
<u>Digestion des tissus :</u> rinçages élimination de la chlorophylle (si nécessaire)	Tampon MSB pH 5,5 + 2 % cellulase + 2 % pectinase + 2 mM PMSF Tampon MSB pH 6,8 0,1 % NaHB ₄ puis rinçages	1 h, 37 °C 3 fois 10 min 3 fois 10 min
<u>Etallement des tissus :</u>	dans du Tampon MSB pH 6,8,	sur lamelles polyislinées
<u>Destabilisation membranaire :</u> rinçages	Tampon MSB pH 6,8 + 0,1 % Triton X100 Tampon MSB pH 6,8	1 h, 20 °C 3 fois 10 min
<u>Saturation des sites :</u>	Tampon PBS pH 7,2 + 1% PVP	10 min, 20 °C
<u>Incubation anticorps primaire :</u> rinçages	dilution : 1 / 2000 Tampon PBS pH 7,2 + 1% PVP Tampon PBS pH 7,2 + 1% PVP + 0,1 % Triton X100	2 h, 37 °C 3 fois 10 min
<u>Incubation anticorps secondaire :</u> rinçages	dilution : 1 / 200 Tampon PBS pH 7,2 + 1 % PVP comme incubation n° 1	2 h, 37 °C 3 fois 10 min
<u>Marquage :</u>	DAPI	10 min
<u>Montage :</u>	Citifluor AF2	ou PBS / Glycérol (1/1)
<u>Observation :</u>	$\lambda = 435 \text{ nm}$ $\lambda = 334 \text{ nm}$	pour FITC : vert pour noyau : bleu
<u>Conservation des lamelles</u>	sur lames, à l'obscurité, à 4 °C	

Annexe 5 : Protocole et composition des solutions d'immunolocalisation du réseau microtubulaire des cellules embryogènes foliaires, modifié d'après HUANG et SHERIDAN (1994).

SDS	1,25 %
Triton X100	2 %
Urée	9,5 M
K ₂ CO ₃	5 mM
DTT	0,5 %
conserver à -20 °C	
pour l'analyse en IEF, ajouter :	1,6 %
ampholytes pH [3-10]	1,3 %
ampholytes pH [5-7]	0,3 %
conserver à -20 °C	

Annexe 6: Composition du tampon de lyse (ZIVY, 1986).

gels de séparation :		
	10 %	13 %
Acrylamide-PDA*	4,78 ml	6,9 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	5,25 ml	4,25 ml
eau distillée	5,91 ml	3,9 ml
APS**	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
gels de concentration :		
	2 %	4,5 %
Acrylamide	0,69 ml	1,2 ml
Tris 1,5 M pH 6,8	2,12 ml	1,98 ml
eau distillée	5,15 ml	4,82 ml
APS**	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Acrylamide-PDA * :	30 % acrylamide + 0,8 % PDA	
APS **:	100 mg d'APS dans 1 ml d'eau distillée	
composition pour 2 gels soit une mini-cuve.		

Annexe 7: Composition des gels de séparation et de concentration pour électrophorèse en mini-cuves.

H ₂ O	3 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1 ml
Glycérol	1,6 ml
SDS 10 %	1,6 ml
β mercaptoéthanol	0,4 ml
bleu de bromophénol	0,05 %
conservation à 4 °C	

Annexe 8: Composition du tampon de LAEMMLI (1970).

Etapes	Objet	Tampon	Durée
Saturation	limite l'aspécificité bloque les sites libres de la membrane	TBS + PVP 2%	1 nuit
anticorps primaire	repère la protéine recherchée	TBS + PVP 1% + 0.1 % Triton X100	2 h
rinçages	élimine l'excès d'anticorps non fixés		3 x 10 min
anticorps secondaire	se couple avec le 1er anticorps		2 h
rinçages	élimine l'excès d'anticorps non fixés		3 x 10 min
Révélation enzymatique	révèle la position de la protéine recherchée	tampon carbonate	quelques minutes

Annexe 9 : Etapes nécessaires à une immuno-empreinte électrophorétique sur membrane de nitrocellulose.

ETAPES	SOLUTIONS	DUREE
Fixation avant coloration	Tampon de fixation* + 100 µl formaldéhyde** / 200 ml de tampon	au moins 1 heure
Rinçages	Ethanol 50 %	3 fois 20 min
Pré-traitement des gels	0,2 g.l ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₂ , 5H ₂ O H ₂ O	1 min
Rinçages		3 fois 20 s
Imprégnation	1 g.l ⁻¹ AgNO ₃ + 0,075 % de formaldéhyde H ₂ O	20 min
Rinçages		2 fois 20 s
Développement de la coloration	60 g.l ⁻¹ Na ₂ CO ₃ 4 mg.l ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O 0,05 % de formaldéhyde	jusqu'à apparition de la coloration noire
Lavages	H ₂ O	2 fois 20 s
Arrêt de la coloration	Tampon de fixation*	au moins 1 heure
Lavages et stockage	Ethanol 50 %	à 4°C
Séchage des gels	passer les gels dans une solution de glycérol 2-3 % les recouvrir de cellophane préalablement imprégnée de solution	45 min-1 h

Tampon de fixation * :	Ethanol Acide acétique	50 % 12 %
Formaldéhyde ** :		solution à 37 %

Annexe 10: Protocole de coloration des protéines par le nitrate d'argent (BLUM et al., 1987).

solution d'Acrylamide 40 % - 0,8 %PDA	1,25 ml
Urée	5 g
H ₂ O	3 ml
Ampholytes :	
pH 5-7	400 µl
pH 3-10	100 µl
Triton X100 à 10 %	1 ml
APS*	20 µl
TEMED	20 µl
APS*: solution à 10 %	

Annexe 11: Composition des gels d'iso-électrofocalisation en capillaires (mini-cuves).

Ovalbumine	6,0-6,3-6,6	76
Serum albumine bovine	5,4-5,5-5,6	66,2
Actine de muscle bovin	5,0-5,1	43
G6PDH* de muscle de lapin	8,3-8,5	36
Anhydrase carbonique de bovin	5,9-6,0	31
Inhibiteur de trypsine du soja	4,5	24,5
myoglobine de cheval	7,0	17,5

Annexe 12: Marqueurs protéiques utilisés en iso-électrofocalisation.

<u>Tampon MOPS:</u>	
MOPS	0,4 M
NaCl	100 mM
EDTA	10 mM
DEPC	0,1 % une nuit avant autoclavage
<u>Formamide désionisée :</u>	
formamide + gel DOWEX AG 501 X8(20.50 mesh)	
filtration sur papier Whatman n°1	
<u>Tampon de préparation des ARNs :</u>	
formamide désionisée	50 %
Tampon MOPs	10 %
formaldéhyde à 37 %	2,2 M final
<u>Tampon SSC 20x: pH 7,0 :</u>	
NaCl	3 M
Citrate de sodium	300 mM
<u>Tampon SSPE 20x :</u>	
NaCl	3,6 M
NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,5	0,2 M
EDTA	20 mM
<u>Tampon TE :</u>	
Tris-HCl; pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Annexe 13: Composition des tampons nécessaires à la migration des ARNs en gel d'agarose et à leurs transfert sur membrane de nylon.

<u>Composition du gel de migration :</u>		1,2 % 10 % 2,4 M final 15 %
agarose Tampon MOPS* formaldéhyde 37 %		
<u>Préparation des extraits d'ARN :</u>		volume contenant 20 µg 19 µl 5 min à 100°C, 5 min sur glace 5 µl
extrait d'ARN Tampon de préparation des ARNs Dénaturation de l'échantillon alourdisseur		
<u>Migration sur gel d'agarose:</u>		Tampon MOPS 1x + formaldéhyde à 37 % 0,22 M final 30-35 V, sous hotte
Tampon de migration voltage		
<u>Coloration des gels (photo) :</u>		5 µg.ml ⁻¹ H ₂ O 2 µg.ml ⁻¹ H ₂ O H ₂ O, 30 min
BET ou acridine orange décoloration des gels avant photo		
<u>Transfert des ARN sur membrane :</u>		Tampon SSPE 20 x minimum 6 h, 20 °C 4 min sous UV
Tampon de migration durée de transfert fixation des ARN sur membrane		
<u>Conservation des membranes :</u>		dans papier Joseph

Annexe 14 : Protocole de migration des ARNs en gel d'agarose et conditions de transfert des ARNs sur membrane de nylon. Les tampons sont décrits dans l'Annexe 13.

<u>Préhybridation :</u>		
sérum albumine bovine	0,5 g	
Na ₂ HPO ₄ 0,5 M	25 ml	1 h, 65 °C
SDS 20 %	17,5 ml	
H ₂ O	qsp 50 ml	
<u>Hybridation :</u>	même tampon que pour la préhybridation	1 nuit, 60 °C
<u>Déshybridation :</u>		3 fois 15 min, 80-85 °C
Tris-HCl pH 8,1	2 mM	
EDTA	1 mM	
SDS	0,1 %	

Annexe 15: Composition des tampons et conditions d'hybridation des membranes de nylon.

Solution mère :	2,3 g (soit 0,1 M) K_3PO_4 0,1 g Bleu d'Aniline qsp 100 ml eau distillée
Décoloration de la solution :	12-24 h à l'obscurité (20 °C)
Conservation de la solution :	Ajouter 10 ml de glycérol après la décoloration Conserver à l'obscurité (20 °C)

Annexe 16: Composition du Bleu d'Aniline pour la mise en évidence de la callose en UV. Cette solution sert de milieu de montage et se dépose sur les coupes au moment de l'observation.

RESUME

Le *Cichorium* hybride '474' (*C. intybus* var. *sativum* x *C. endivia* var. *latifolia*) nous offre un modèle attractif d'embryogenèse somatique (ES). Les embryons somatiques (eS) peuvent être obtenus à partir de tissus végétatifs. Ils ont une origine directe unicellulaire. L'étude cytologique et moléculaire des changements inhérents à la réactivation cellulaire des cellules compétentes au cours de l'induction embryogène, nous a conduit à mettre en place une méthode de culture permettant de synchroniser la première division des cellules embryogènes (CE). Elle se compose de deux phases: les explants foliaires sont d'abord cultivés pendant 5 jours dans un milieu contenant 330 mM de glycérol (phase d'induction). Leur transfert dans un milieu dépourvu de cet osmoticum constitue la seconde phase de culture (phase d'expression) et conduit au déclenchement synchrone de la première division des CE.

Au cours de la phase d'induction, les cellules compétentes subissent des modifications cytologiques: augmentation de la taille du noyau et sa migration vers le centre de la CE, formation du phragmosome et activation des nucléoles. L'immunolocalisation du réseau microtubulaire nous a permis d'observer la formation de bandes préprophasiques (BPP) de différents types. Parallèlement, les quantités d'actine et de tubulines augmentent pendant cette période. De telles modifications ne sont pas observées chez des chicorées non embryogènes (*C. intybus* cv. 'Flash' et cv. '206') cultivées dans les mêmes conditions.

Au cours de la phase d'expression, les CE se divisent de façon synchrone 36 h après le transfert des explants. Les premières divisions des CE apparaissent près des faisceaux vasculaires. Cette première division embryogène est symétrique et son plan est anticline par rapport aux éléments vasculaires les plus proches. La réorganisation du réseau microtubulaire au cours de la première mitose des CE est décrite. L'eS qui en résulte est d'abord linéaire, puis des divisions périclines lui permettent de se développer en épaisseur. Ces eS montrent des cellules possédant un réseau composé de microtubules périnucléaires et d'autres cellules embryonnaires présentant une BPP. Pendant cette période, les variations d'actine et des tubulines sont quantifiées.

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la maturation de la plaque cellulaire, la caféine (5 mM) conduit à des changements dans les séquences cytologiques liées à la réactivation cellulaire et aux divisions embryonnaires. Le noyau des CE ne migre pas mais la caféine ne semble pas affecter la caryocinèse. Par contre, des anomalies sont observées au niveau nucléolaire et au niveau du développement des eS. En effet, des structures coenocytiques et des eS chimériques sont obtenus. Cette inhibition est corrélée à une accumulation d'actine et de β tubuline. Aucun eS n'est décelé lorsque la caféine est présente pendant toute la culture. Un inhibiteur des canaux calciques, le vérapamil (100 μ M) entraîne une diminution du potentiel embryogène et altère le développement des eS. Une accumulation d' α tubuline est détectée.

Les glycoprotéines intratissulaires ont été étudiées mais aucune différence significative n'a été observée entre l'hybride '474' et les chicorées non embryogènes. Par contre, l'utilisation d'inhibiteurs de la glycosylation (tunicamycine, déoxynojirimycine) provoque une diminution du nombre d'eS induits et affecte leur développement.

La présence d'une matrice extracellulaire autour des eS globulaires nous offre de nombreuses perspectives de recherche quant à la détermination des (glyco)protéines qui composent le continuum matrice-membrane-cytosquelette. Par ailleurs, l'obtention de marqueurs prédictifs de la compétence à l'ES de certaines cellules serait d'un grand intérêt.

SUMMARY

Cichorium hybrid '474' (*C. intybus* var. *sativum* x *C. endivia* var. *latifolia*) is an attractive model for studying somatic embryogenesis (SE). Somatic embryos (Se) are obtained from vegetative tissues. They are directly originated from a single cell. Cytological and molecular studies correlated to the cellular reactivation of competent cells led us to determine a method for synchronizing the first division of embryogenic cells (EC). It consists of two steps. Leaf-explants are first cultured in medium containing 330 mM glycerol during 5 days (induction phase) then they are transferred into a medium deprived of this osmoticum (expression phase). Mitosis start after the transfer of explants.

During the induction phase, competent cells undergo cytological modifications as the increase of the nucleus size, its migration toward the cell centre, the formation of the phragmosome, the activation of the nucleolus. Immunolocalization of the microtubular network allows us to observe different types of preprophase bands (PPB). The quantities of actin and tubulins increase during this step of culture but such differences are not detected in non-embryogenic chicories (*C. intybus* cv. 'Flash' and cv. '206') cultured in the same conditions.

During the expression step, the first EC divide in a synchronized manner 36 h after the transfer. The first divisions of EC appear near the vascular bundles. In leaves, this first embryogenic division is symmetrical and its plane is anticlinal with regard to the nearest vascular elements. The reorganization of the microtubular network during the first embryogenic mitosis is described. Resulting Se are first linear and they develop in thickness by periclinal divisions. Se contain cells exhibiting a network constituted of perinuclear microtubules and a few embryonnary cells present a PPB. Variations of actin and tubulins are quantified.

The specific inhibitor of the maturation of the cell plate, caffen (5 mM) induces modifications of the cytological sequences linked to cellular reactivation and to embryonnary divisions. The nucleus of EC does not move toward the centre but caffen does not seem to alter karyokinesis. On the contrary, abnormalities are observed on nucleolus and Se development. Coenocytic structures and chimeric Se are obtained. This inhibition is correlated with an accumulation of actin and β tubulin. No Se are observed when caffen is added during the whole time of culture. An inhibitor of the Ca-channels, verapamil (100 μ M) produces the decrease of embryogenic potential and alters the Se development. An accumulation of α tubulin is detected.

The intratissular glycoproteins are studied but no significant differences are observed between the hybrid '474' and non-embryogenic chicories. The use of inhibitors of glycosylation (tunicamycin and deoxynojirimycin) induces a decrease in the number of Se and affects their development.

The presence of an extracellular matrix around globular embryos offers numerous research perspectives on the screening of (glyco)proteins which constitute the matrix-membrane-cytoskeleton continuum. The determination of predictive markers of the SE ability would be of a great interest.

