

Numéro d'ordre

THESE

Présentée à l'université de Lille I

pour obtenir le grade de

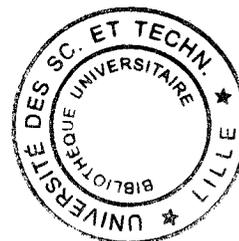
Docteur en Sciences

Spécialité Biologie et Physiologie Végétales

Etude d'un mutant embryogène d'*Asparagus officinalis* L. : description cytologique, approches biochimiques et moléculaires

par

Laurent Dupire



Soutenu le 14 Septembre 1999 devant la commission :

M. J. Vasseur	Professeur, Université de Lille I	Président
M. M. Jullien	Professeur, INA-PG	Rapporteur
M. J.-C. Audran	Professeur, Université de Reims	Rapporteur
M. B. Delbreil	Maître de conférences, Université de Lille I	Examineur

Remerciements

M. Vasseur m'a accueilli au sein de son laboratoire et m'a confié aux bons soins de M. Delbreil sur le sujet qui vous est présenté dans ce manuscrit. M. Delbreil s'est acquitté de cette tâche en faisant montre d'un soutien moral et scientifique sans restriction. Je le félicite, par ailleurs, d'avoir écouté et discuté mes hypothèses de travail qui étaient parfois si « tirées par les cheveux » qu'il a fini par se les raser.

Maîtres de Conférences au laboratoire, C. Rambaud et J.-L. Hilbert ont toujours fait preuve de beaucoup de sympathie à mon égard (voir de compassion en fonction des résultats). Cette sympathie partagée avec M. Legrand a contribué à ce que ces années de thèse se passent le mieux possible.

Je tiens à associer à ces quelques lignes le personnel du laboratoire sans qui le bon déroulement des manipulations ne serait sans doute pas possible.

J'ai particulièrement apprécié ces années de thèse dans ce laboratoire du fait de la présence des étudiants qui comme moi ont souffert et souffrent encore devant leur paillasse. Je citerai particulièrement Greg, Olivier, Robert, Jeff, Axelle pour l'intérêt qu'ils m'ont témoigné (ainsi qu'à mes recherches). Béatrice, que je félicite pour la soutenance qu'elle fera, je l'espère, à la même période que moi. Ce n'est pas sans émotion que je cite Rachel et Anne, je n'oublierai jamais les cadeaux dont elles m'ont couvert pour mes anniversaires. Ma thèse n'aurait pas pu se dérouler sans les précieux conseils et l'amitié dont m'a honoré et m'honore encore Eric. A toutes ces personnes je souhaite bonne chance et bonne fortune pour la suite de leurs études et de leur vie qui je l'espère nous amènera à nous côtoyer encore.

Au terme de ces quelques lignes je tiens à faire part de mes sincères remerciements à toutes les personnes citées. Je me dépêche de terminer puisque toute ma famille attend avec impatience que je soutienne enfin ce diplôme.

Abréviations

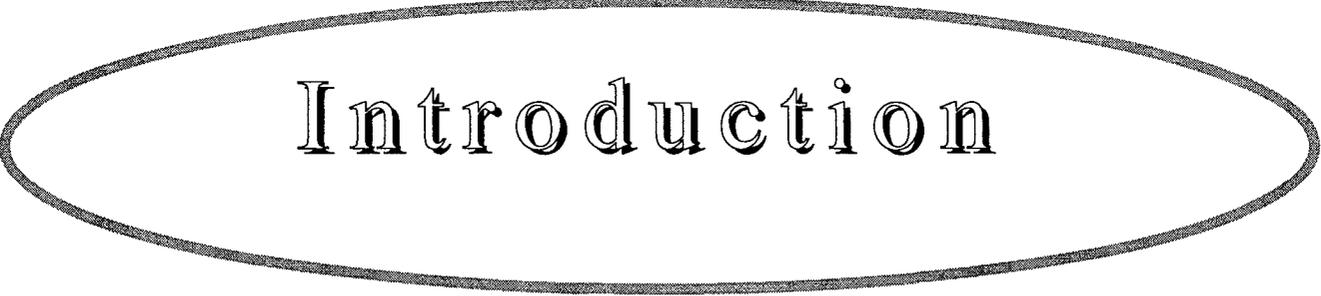
ABA	Acide Abscissique
ABAGE	ABA- Glucide
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIA	Acide Indolyl Acétique
AIA-Gly	AIA-Glycine
Am	Apex mutant
ANA	Acide Naphtalène Acétique
APS	Ammonium Persulfate
ARN	Acide Ribonucléique
As	Apex sauvage
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétique Acide
IMP	Isopentényladénine Monophosphate
IP	Isopentényladénine
IPA	Isopentényladénosine
K	Kinétine
kDa	Kilo Dalton
MSN	Murashige-Skoog-Nitsch
min.	minute
RAPD	Random Amplification Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAB	Sérum Albumine Bovine
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate Polyacrylamide Gel
TCA	Acide Trichloro Acétique
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Z	Zéatine
ZR	Zéatine Riboside
Z-gly	Mélange de zéatines glycosylées
9gIP	9-Glucide-Isopentényl Adénine

SOMMAIRE GENERAL

1. INTRODUCTION.....	8
1.1. L'ASPERGE.....	10
1.1.1. <i>Aspects botaniques</i>	10
1.1.2. <i>Historique et culture</i>	11
1.1.2.1. <i>Histoires d'asperges et préjugés</i>	11
1.1.2.2. <i>Culture et production</i>	12
1.1.3. <i>Sélection et culture in vitro de l'asperge</i>	12
1.2. L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE.....	13
1.2.1. <i>Généralités</i>	13
1.2.2. <i>Définitions</i>	14
1.2.3. <i>Origine de l'embryogenèse somatique</i>	15
1.2.4. <i>Les facteurs de l'embryogenèse</i>	17
1.2.4.1. <i>Facteurs endogènes</i>	17
1.2.4.2. <i>Facteurs exogènes</i>	19
1.2.5. <i>Les marqueurs de l'embryogenèse somatique</i>	21
1.2.5.1. <i>Les marqueurs physiologiques et histo-cytochimiques</i>	21
1.2.5.1.1. <i>Modifications pariétales</i>	21
1.2.5.1.2. <i>Modifications biochimiques</i>	22
1.2.5.2. <i>Les marqueurs protéiques et moléculaires</i>	23
1.2.5.2.1. <i>Les marqueurs protéiques</i>	23
1.2.5.2.1.1. <i>Protéines tissulaires</i>	23
1.2.5.2.1.2. <i>Protéines extracellulaires</i>	24
1.2.5.2.2. <i>Les marqueurs moléculaires</i>	26
1.3. CONCLUSION	28
1.4. L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ L'ASPERGE.....	29
1.4.1. <i>Les explants</i>	29
1.4.2. <i>L'effet du génotype et facteurs exogènes</i>	29
1.4.3. <i>Les milieux de culture</i>	30
1.4.3.1. <i>Nature des composés carbonés</i>	30
1.4.3.2. <i>Composition en régulateurs de croissance</i>	30
1.4.4. <i>Présentation de l'étude</i>	31
2. MATERIEL ET METHODES.....	33
2.1. MATERIEL VEGETAL.....	34
2.1.1. <i>Entretien des clones</i>	34
2.1.2. <i>Culture in vitro d'apex</i>	34
2.1.2.1. <i>Aseptisation et dissection des explants</i>	34
2.1.2.2. <i>Milieux et conditions de culture</i>	34
2.2. ANALYSES CYTOLOGIQUES.....	35
2.2.1. <i>Fixation et inclusion en résine JB4</i>	35
2.2.2. <i>Coupes et coloration</i>	35
2.3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	36
2.4. ANALYSE PROTEIQUE	36
2.4.1. <i>Préparation des échantillons</i>	36
2.4.1.1. <i>Prélèvement des explants</i>	36
2.4.1.2. <i>Extraction</i>	36
2.4.1.3. <i>Dosage</i>	36
2.4.2. <i>Electrophorèse bidimensionnelle</i>	37
2.4.2.1. <i>L'isoélectrofocalisation (IEF)</i>	37

2.4.2.2. SDS-PAGE	38
2.4.3. Révélation argentique.....	38
2.4.4. Séchage des gels.....	38
2.4.5. Analyse des profils protéiques.....	38
2.5. ANALYSE DU CONTENU EN REGULATEURS DE CROISSANCE.....	39
2.6. ANALYSE GENOMIQUE	39
2.6.1. Extraction d'ADN.....	39
2.6.2. Analyse du polymorphisme génétique par amplification aléatoire d'ADN (RAPD).....	40
2.6.3. Analyse du polymorphisme génétique par amplification de fragments d'ADN (AFLP).....	40
3. RESULTATS.....	41
3.1. ANALYSE HISTO-CYTOLOGIQUE	43
3.1.1. De la plante en serre au milieu de culture in vitro	43
3.1.1.1. Plantes en serre et explants mis en culture.....	43
3.1.1.2. Les milieux de culture d'apex.....	43
3.1.1.3. Conclusions sur le choix d'un milieu de culture.....	47
3.1.2. Etude morphologique des explants des plantes de type sauvage et de type mutant au cours de la culture	49
3.1.2.1. Les explants des plantes de type sauvage.....	49
3.1.2.2. Les explants des plantes de type mutant.....	49
3.1.3. Etude histologique des explants des plantes de type sauvage et de type mutant au cours de la culture	51
3.1.3.1. Etude en microscopie photonique des explants des plantes de type sauvage.....	51
3.1.3.2. Etude histologique des explants des plantes de type mutant.....	51
3.1.4. Discussion et conclusions de l'analyse cytologique	53
3.2. ANALYSE PROTEIQUE	62
3.2.1. Analyse du polymorphisme protéique par électrophorèses bidimensionnelles ..	62
3.2.1.1. Stades de l'analyse	62
3.2.1.2. Détermination des protéines d'intérêt	62
3.2.1.2.1. Protéines dont l'accumulation est modifiée différemment dans les deux types de tissus.....	64
3.2.1.2.2. Protéines dont l'accumulation n'est modifiée que dans les tissus des plantes de type mutant.....	66
3.2.1.2.3. Protéines dont l'accumulation varie dans les tissus du type sauvage et absentes ou exprimées de manière constante dans les tissus du type mutant ..	68
3.2.1.2.4. Protéines constitutives et constantes dans l'un ou l'autre des deux génotypes	68
3.2.2. Conclusions de l'analyse protéique.....	71
3.2.3. Discussion de l'analyse protéique.....	71
3.3. ANALYSE DU POLYMORPHISME GENOMIQUE.....	79
3.3.1. Analyse du polymorphisme entre le type sauvage et le type mutant par RAPD ..	79
3.3.2. Analyse du polymorphisme entre le type sauvage et le type mutant par AFLP ..	79
3.3.3. Discussion des résultats.....	79
3.4. ANALYSE DIFFERENTIELLE DU CONTENU ENDOGENE EN REGULATEURS DE CROISSANCE ENTRE LES PLANTES DES TYPES SAUVAGE ET MUTANT	85
3.4.1. Dosage de l'acide abscissique	85
3.4.2. Dosage des auxines.....	85
3.4.3. Dosage des cytokinines	85
3.4.3.1. Les isopentényles.....	86
3.4.3.2. Les zéatines	86

3.4.4. <i>Conclusions</i>	86
3.4.5. <i>Discussion sur les résultats des régulateurs de croissance</i>	88
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	93
4.1. CONCLUSIONS.....	94
4.2. PERSPECTIVES	100
5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104
6. ANNEXES	128
6.1. ANNEXE 1 : LES MILIEUX DE CULTURE.....	129
6.2. ANNEXE 2 : ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE.....	131
6.3. ANNEXE 3 : LISTE DES AMORCES.....	133
6.4 ANNEXE 4 : PUBLICATION.....	136



Introduction

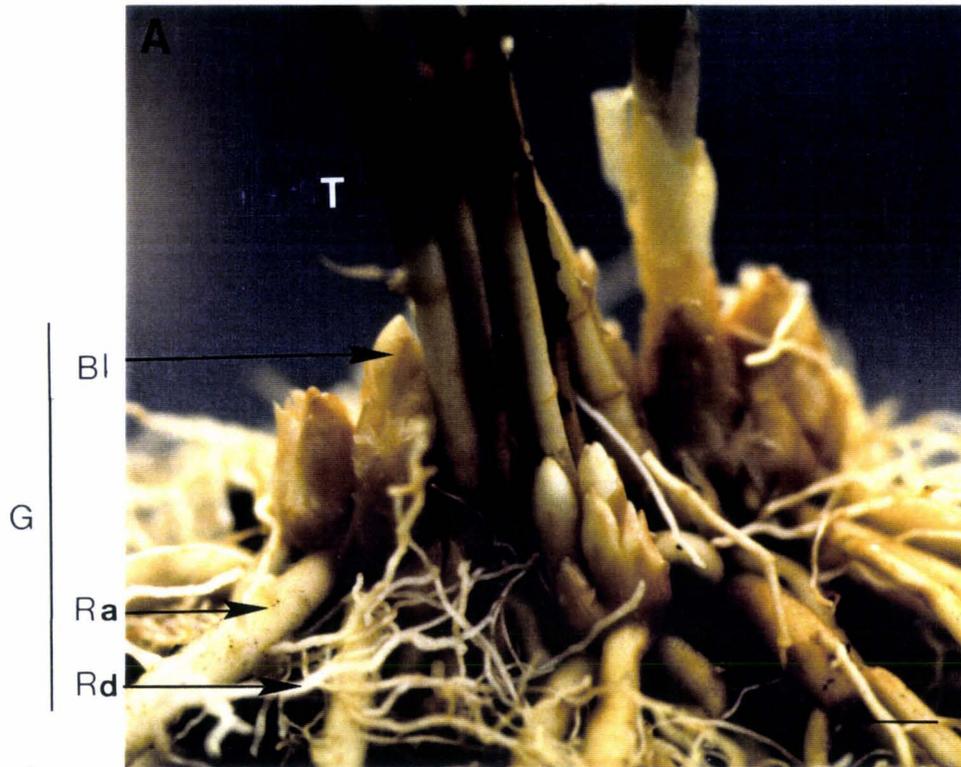


Figure 1 : Griffe d'asperge présentant à sa base des bourgeons latents. Bourgeons latents (Bl) ; Griffe (G) ; Radicelle (Rd); Racine adventive (Ra); Turion (T); (barre = 1 cm).

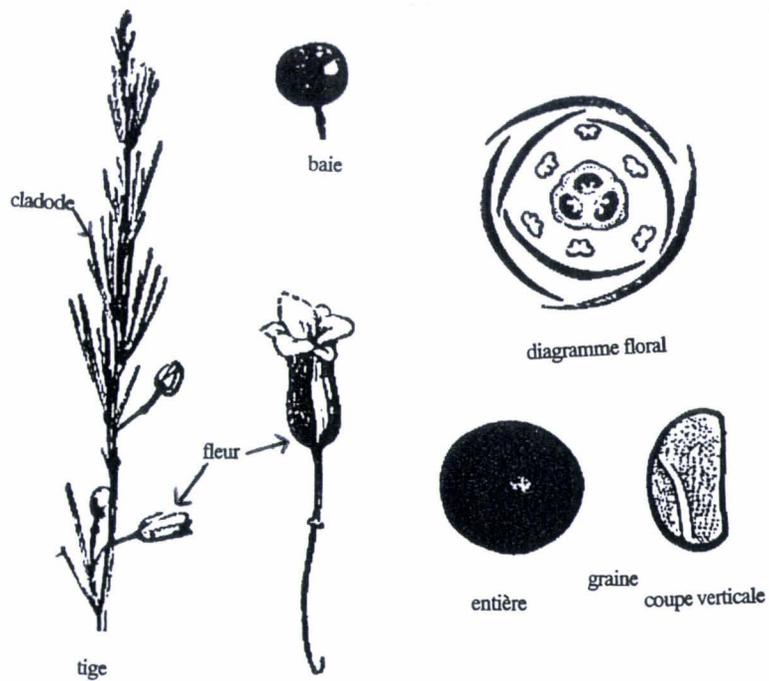


Figure 2 : Détail des différents éléments constituant l'appareil végétatif et floral d'une plante d'asperge, d'après Watson et Dallwitz (1992).

1.1. L'asperge

1.1.1. Aspects botaniques

Asparagus officinalis L.: Embranchement des Spermaphytes
Sous embranchement des Liliophytina
Division des Liliophyta
Classe des Liliopsida
Sous classe des Liliidae
Ordre des Liliales
Famille des Liliaceae
Sous famille des Asparagaceae
Genre des Asparagus
Tribu des Asparageae

Asparagus officinalis L. est une espèce pérenne d'une durée de vie comprise entre 10 et 20 ans. La plante est constituée d'une partie souterraine appelée « griffe » et d'une partie aérienne. Les réserves synthétisées par les parties aériennes s'accumulent dans la griffe. Des bourgeons dormants se mettent en place au sommet de la griffe (Figure 1) et se développent après un rabattage des parties aériennes qui exercent une dominance sur ces bourgeons. Cette griffe est parfois assimilée à un rhizome et ses bourgeons qualifiés d'adventifs peuvent produire des ramifications latérales et donner naissance à des griffes autonomes (Jones et Robbins, 1928; Rivière, 1973). Les racines adventives ont un rôle dans l'accumulation des réserves et portent des radicules qui assurent l'absorption des éléments nutritifs.

La partie aérienne est constituée de tiges dressées partant du rhizome et pouvant atteindre deux mètres de haut. Ces tiges portent des écailles qui axillent les ramifications et les cladodes (Figure 2). Les écailles ont une structure anatomique de feuille tandis que les cladodes sont des tiges modifiées (Mullendore, 1935). Jeunes, les tiges sont appelées turions, et représentent la partie consommée de l'asperge (Figure 1).

Asparagus officinalis L. est une espèce subdioïque dont tous les types de plantes entre la gynomonoïque et l'andromonoïque sont répertoriés (Thévenin et Doré, 1976). Sa floraison survient 14 à 15 mois après le semis. Dans les populations, il est admis que les mâles sont hétérogamétiques (Mm) et les femelles (mm) homogamétiques. Des individus peuvent porter des étamines et être capables de produire des graines alors que leur génotype est « Mm ». Des plantes « supermâles » (MM) ont été obtenues par autofécondation de plantes bisexuées ou par haplodiploïdisation. La descendance de ces

plantes est entièrement « mM » et toute staminée, hermaphrodite ou mâle selon l'origine de la plante et les conditions de culture (Thévenin et Doré, 1976).

1.1.2. Historique et culture

1.1.2.1. Histoires d'asperges et préjugés

Asparagus officinalis L. serait originaire de l'Europe Méditerranéenne et Centrale, ainsi que du nord-est de l'Asie. Connue depuis la haute antiquité, puisqu'elle est représentée en bottes vertes sur des fresques de l'ancienne Egypte, elle est la seule espèce du genre cultivée pour l'alimentation. Les grecs l'ont cultivée et avaient ajouté à son nom le terme de désir puisqu'ils la croyaient aphrodisiaque. Sa culture bien maîtrisée chez les Romains, a fait l'objet d'écrits que ne désavoueraient pas les maraîchers d'Argenteuil (Caton, 200 av. J. C. *De re rustica* in Colin, 1937). Son extension en Europe Occidentale aurait d'ailleurs suivi les troupes romaines (Colin, 1937). Peu en vogue au moyen âge, l'asperge réapparaît à la Renaissance, époque à laquelle on reproche à Henri III de la servir à ces mignons lors de somptueux banquets. Mais c'est au 17^{ème} Siècle que l'asperge acquiert ses lettres de noblesse en étant servie à la table de Louis XIV, et son essor date du début du 20^{ème} siècle alors que démarre sa culture sur les terres sablonneuses de Sologne (Delbreil, 1992).

En faveur auprès des médecins depuis l'antiquité, les rôles attribués à l'asperge peuvent surprendre et sont souvent, pour le moins contradictoires. Recommandée au moyen âge comme laxatif et diurétique dans des obstructions du foie ou des douleurs néphrétiques, ces propriétés sont très controversées à l'approche du 18^{ème} siècle et en 1894 les études menées par trois médecins anglais aboutissent à des conclusions opposées. En ce qui concerne son effet aphrodisiaque, là aussi les expériences n'ont jamais fait l'unanimité et des avis très divergents ont été émis. En effet, si pour certains l'asperge est un aliment aphrodisiaque, pour d'autres la racine d'asperge aurait au contraire pour effet de rendre stérile aussi bien les hommes que les femmes.

L'asperge est un des légumes qui flatte le plus le sens du goût tout en exigeant le minimum d'appât culinaire : quelques minutes de cuisson dans l'eau suffisent pour lui donner le moelleux voulu et développer sa saveur et son parfum. Néanmoins les hygiénistes s'accordent pour la considérer comme un aliment dont l'usage doit être déconseillé aux malades atteints de rhumatismes articulaires aigus, à ceux dont les voies urinaires sont vulnérables mais aussi aux vieillards artérioscléreux dont le myocarde est déficient et aux goutteux. A ces réserves près, l'asperge est considérée comme un aliment sain quoique peu nutritif et dont l'aspect diurétique peut être mis à profit chez les individus indemnes de lésions des voies urinaires. Les autres devront se contenter du

sirop des cinq racines, préparation assez agréable mais pas au point de tempérer en eux l'amertume d'être privés du plus convoitable des légumes (Leclerc, 1984).

1.1.2.2. Culture et production

Une aspergeraie est installée sur des sols sableux très drainants à partir de griffes d'un an issues de pépinière. Ces plantations sont effectuées pour dix ans environ. Le sexe des plantes n'est pas connu à l'installation des griffes, or celui-ci influence énormément les qualités productrices de l'aspergeraie. Les plantes mâles sont plus précoces et produisent plus que les femelles (Jones et Robbins, 1928; Bannerot, 1963). Les deux premières années, l'aspergeraie n'est pas exploitée pour permettre aux plantes d'accumuler des réserves dans la griffe, lesquelles participeront ensuite au développement des turions au cours de la période d'exploitation. Le rendement maximum de la plantation est atteint à la quatrième année. Les récoltes se déroulent de la mi-Mars à la fin Juin. Il existe trois types de culture de l'asperge. Le premier est la culture en buttée à l'abri de la lumière qui est la technique utilisée pour l'obtention de l'asperge blanche. Ce mode de culture est le plus répandu en France. Le second consiste en un début d'exposition à la lumière pour obtenir des asperges violettes, coloration liée à la production d'anthocyanes. Le troisième type de culture est réalisé à la lumière ce qui conduit à la production d'asperges vertes, couleur due à la pigmentation par les chlorophylles.

L'asperge est l'un des 40 végétaux les plus consommés dans le monde avec une production mondiale de 3 464 594 de tonnes (t). La Chine est le plus gros producteur avec 2 857 560 t. Les USA occupent la 3^{ème} place (92 000 t) derrière le Pérou (137 943 t). Le continent Européen a une production de 234 931 t constituée principalement d'asperges blanches. La France occupe la 4^{ème} place Européenne avec une production de 33 000 t derrière l'Espagne (62 800 Mt), l'Allemagne (45 130 t) et l'Italie (35 218 t) (F.A.O., 1998).

1.1.3. Sélection et culture *in vitro* de l'asperge

L'amélioration de l'asperge se heurte à des problèmes relevant de sa biologie. Le premier des problèmes que nous citerons est dû au fait que les plantes sont pérennes et que leurs capacités agronomiques ne peuvent être estimées que 3 à 4 ans après la plantation de l'aspergeraie.

Un autre problème est lié à la forte hétérozygotie entre les différentes plantes qui est due à la dioécie de l'espèce. Ceci conduit à avoir des champs dont la production est

très hétérogène. La multiplication végétative de plants d'intérêts agronomiques est réalisée par le fractionnement du rhizome mais cela ne permet de produire qu'un nombre très faible d'individus par an.

L'asperge est une espèce traditionnellement cultivée à partir de populations issues de sélections massales. Jusqu'en 1974, les sélectionneurs ne disposaient que de trois variétés populations (Hâtive d'Argenteuil, Grosse Hâtive d'Argenteuil, Tardive d'Argenteuil) issues d'une population d'Argenteuil et de variétés américaines telle que Mary Washington. Ces populations présentaient une grande hétérogénéité de production (Bannerot, 1963). Depuis 1973, le perfectionnement des techniques de culture *in vitro* a permis de développer les programmes d'amélioration de l'asperge. Ainsi, la propagation clonale de plantes élites est importante pour obtenir des productions de grande qualité (Yang et Clore, 1973). Différentes voies sont utilisées pour la micropropagation de plantes d'asperges. Nous pouvons citer :

- La néoformation de cals (Hunault, 1973; Hunault, 1975; Hunault, 1979) et la régénération de bourgeons (Takatori *et al.*, 1968; Yakuwa *et al.*, 1971a; Yakuwa *et al.*, 1971b)

- La culture de méristèmes et de bourgeons apicaux (Hasegawa *et al.*, 1973; Yang et Clore, 1973; Doré, 1975; Chin, 1982)

- L'embryogenèse somatique (Takatori *et al.*, 1968; Wilmar et Hellendoorn, 1968; Jullien, 1974; Reuther, 1977).

1.2. L'embryogenèse somatique

1.2.1. Généralités

La pérennité de l'espèce est assurée par la production de cellules sexuelles, qui permettront le développement des tissus reproducteurs au sein desquels seront formés des ovules et du pollen. La fusion de deux gamètes haploïdes engendrera la formation d'un embryon zygotique diploïde qui se développera au sein des tissus maternels. Ce mode de reproduction sexué est non conforme puisqu'il fait intervenir le patrimoine génétique de deux individus différents. Ceci conduit à la création de la biodiversité dans les descendance par le brassage chromosomique. La reproduction sexuée permet donc la production d'individus qui sont différents des parents et différents entre eux. Or; l'agriculture moderne recherche les variétés les plus homogènes possibles. Cela peut être obtenu, entre autre, par la création d'hybrides F1 ou la multiplication clonale. Les sélectionneurs ont donc été amenés à utiliser les potentialités du règne végétal à la multiplication végétative asexuée, c'est à dire sans brassage chromosomique.

La reproduction asexuée se retrouve dans la nature de manière spontanée, dans le cas par exemple de la fragmentation d'une plante. Cette capacité a été mise en œuvre de façon artificielle (bouturage, greffage, marcottage) pour la multiplication de plantes d'intérêts agronomiques. La multiplication végétative est liée à la persistance ou à la production de cellules méristématiques primaires, dotées de potentialités embryogènes et/ou organogènes.

Ces potentialités sont à la base du processus d'embryogenèse somatique. Trois types d'embryogenèses peuvent être distingués en fonction du matériel végétal dont ils sont issus : embryogenèse zygotique (après fusion de 2 gamètes), embryogenèse haploïde (à partir de microspores ou de cellules du gamétophyte femelle) et embryogenèse somatique qui est obtenue lorsque l'embryon se développe à partir de cellules somatiques (Williams et Maheswaran, 1986). L'embryogenèse somatique correspond le plus souvent à un processus de dédifférenciation/redifférenciation aboutissant à la formation d'un embryon, c'est-à-dire à une structure bipolaire.

L'embryogenèse somatique *in vitro* a été mise en évidence, pour la première fois, chez la carotte (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958). Depuis, ce type d'embryogenèse a été décrit chez un grand nombre d'espèces à partir de tissus végétatifs (feuilles, tiges, cotylédons, ...) ou reproducteurs (styles, tissus ovulaires). En plus d'être une méthode de multiplication, les similitudes observées avec l'embryogenèse zygotique font que l'embryogenèse somatique est un modèle pour l'étude des événements régulateurs de la mise en place des embryons zygotiques et ceci en s'affranchissant des contraintes et des interactions naturelles avec les tissus maternels (Zimmerman, 1993; Dudits *et al.*, 1995).

1.2.2. Définitions

Au cours de sa vie un végétal acquiert des structures et une organisation fonctionnelle permettant sa croissance. Ceci est rendu possible grâce à la différenciation et la spécialisation des cellules. Néanmoins, chez les plantes, les cellules différenciées restent totipotentes. Cette caractéristique du règne végétal définit la capacité à la morphogenèse des cellules qui en se dédifférenciant peuvent élaborer des structures complexes telles que des embryons (par embryogenèse) et/ou des bourgeons et des racines (par organogenèse). Cette morphogenèse ne survient pas spontanément sur la totalité des cellules. Pour être compétente à répondre à un signal d'induction qui permettra la réorientation dans une voie de morphogenèse, la cellule somatique doit se dédifférencier (Yeung, 1995).

La **dédifférenciation** est provoquée par la modification de l'équilibre physiologique des tissus qui peut être réalisée en plaçant les tissus et/ou les organes

dans des conditions inhabituelles, ce qui déclenche dans ces cellules une modification plus ou moins importante de leur détermination. Ce processus peut permettre à la cellule de réacquérir une compétence.

La **compétence** de cellules, de tissus ou d'organes est donc l'aboutissement du processus de dédifférenciation et correspond à la capacité des cellules à répondre à des signaux internes ou externes spécifiques (Finstad *et al.*, 1993). Elle serait le reflet de changements moléculaires, cellulaires ou physiologiques déclenchés par les conditions de culture et/ou par la suppression des corrélations qui s'exercent dans la plante entre tissus ou organes. Dans certains cas, des cellules compétentes pourraient persister dans des tissus différenciés.

L'**induction** a lieu lorsqu'un signal unique (qui peut être complexe) provoque une réponse de développement unique de la part d'une cellule ou d'un groupe de cellules compétentes. Un nouveau 'programme' de développement est alors enclenché et permet la réalisation du processus induit, c'est-à-dire la mise en place de cal lors d'un processus de prolifération, d'organes ou d'embryons somatiques lors d'un processus d'organogenèse.

1.2.3. Origine de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique peut être obtenue de manière directe ou indirecte et avoir une origine unicellulaire ou pluricellulaire (Williams et Maheswaran, 1986). L'embryogenèse somatique est directe lorsque les embryons sont initiés à partir de cellules embryogènes de l'explant sans phase préliminaire de callogenèse. Les embryons peuvent dériver d'une cellule unique comme chez *Ranunculus sceleratus* (Konar *et al.*, 1972), *Cichorium* (Dubois *et al.*, 1988; Dubois *et al.*, 1991), *Dactylis glomerata* (Trigiano *et al.*, 1989) ou *Quercus suber* (El Maâtaoui *et al.*, 1990). Les embryons peuvent aussi dériver d'un massif de cellules comme chez *Daucus carota* (Toonen *et al.*, 1994; Masuda *et al.*, 1995) ou *Helianthus annuus* (Bronner *et al.*, 1994; Laparra *et al.*, 1997), et donc être d'origine pluricellulaire.

Quand les embryons somatiques sont initiés à partir de cellules embryogènes se formant à l'intérieur d'un cal, le processus est appelé embryogenèse somatique indirecte (Williams et Maheswaran, 1986). Dans ce cal, les cellules indifférenciées issues du processus de réactivation initial se divisent. Ce type d'embryogenèse somatique nécessite deux phases de culture. La phase d'initiation du cal qui requiert la présence de régulateurs de croissance (principalement l'auxine) et la phase de développement des embryons somatiques qui est une phase où les auxines ne sont souvent plus nécessaires. Cette embryogenèse a fait l'objet de très nombreux travaux. La majorité de ces systèmes embryogènes indirects présentent une embryogenèse somatique d'origine pluricellulaire

comme chez *Pennisetum americanum* (Vasil et Vasil, 1982), *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992) ou *Cicer arietinum* (Sagare *et al.*, 1995). Toutefois, il existe des systèmes d'embryogenèse somatique indirecte où les embryons proviennent d'une cellule unique, c'est le cas de *Daucus carota* (Toonen *et al.*, 1994).

Selon Sharp *et al.* (1980), lors du processus d'embryogenèse obtenue par voie directe, des cellules déterminées pré-embryogènes (Pre-Embryogenic Determined Cells) existeraient dans l'explant lors de la mise en culture. Elles n'ont besoin que de conditions favorables pour exprimer leurs potentialités et entrer en mitose. Ceci semble être confirmé dans le modèle *Helianthus* dans lequel de jeunes tissus foliaires mis en culture développent une embryogenèse somatique sans qu'il y ait nécessité d'apport de régulateurs de croissance (Fambrini *et al.*, 1997). Néanmoins, il peut s'agir là de cas particuliers prenant en compte des tissus jeunes ayant conservé certaines caractéristiques méristématiques alors que des tissus âgés nécessitent une phase de dédifférenciation.

Dans la voie indirecte, certains auteurs parlent plutôt de cellules induites à la détermination embryogène « Induced Embryogenically Determined Cells », puisque ces cellules évoluent en cal sous l'action de régulateurs de croissance pour acquérir la compétence (Sharp *et al.*, 1980).

Certains systèmes ont la capacité de réaliser l'embryogenèse somatique par la voie directe et indirecte. C'est le cas de l'embryogène obtenue à partir des anthères de *Vitis vinifera* où la différenciation des embryons est tissu-spécifique. Les embryons se développent directement à partir de l'endothécium ou indirectement à partir du cal issu des tissus connectifs. Dans les deux cas, l'embryogenèse est d'origine unicellulaire (Faure *et al.*, 1996). Dans d'autres modèles, les origines directes et indirectes sont moins tranchées. Chez *Euterpe edulis*, l'origine de l'embryogenèse somatique est fonction du type de tissu utilisé. Elle est d'origine directe unicellulaire à partir des cotylédons, les cellules réagissant étant subépidermiques. Dans l'autre cas, les cellules des primordiums floraux prolifèrent pour aboutir à la formation de tissus pro-embryogènes qui vont évoluer en embryons somatiques (Guerra et Handro, 1998).

Les cellules qui ont acquis la potentialité embryogène peuvent donc être observées, soit dans un explant, soit dans un cal. Elles se développent en embryons quand elles sont cultivées dans des conditions expérimentales qui permettent d'exprimer leurs potentialités. Les cellules qui ont fini la transition de l'état somatique vers un état où un stimuli externe n'est plus nécessaire pour produire un embryon somatique sont déterminées à l'embryogenèse, elles sont appelées « cellules embryogènes » (de Jong *et*

al., 1993). Cette cellule embryogène ressemble à une cellule méristématique par sa taille réduite, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, un nucléole unique, volumineux signalant un métabolisme transcriptionnel important (Komamine *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1993) et un cytoplasme dense renfermant de petits granules d'amidon (Michaux-Ferrière et Schwendiman, 1992). La présence d'une paroi épaissie autour des cellules embryogènes les différencie des cellules méristématiques.

1.2.4. Les facteurs de l'embryogenèse

L'induction et/ou le déroulement du processus embryogène sont tributaires de facteurs endogènes propres à l'explant ou à la plante, mais aussi de facteurs externes liés aux conditions de culture appliquées à la cellule ou à l'explant.

1.2.4.1. Facteurs endogènes

Dans une même plante, l'embryogenèse somatique peut se dérouler de différentes manières en fonction des tissus utilisés. C'est le cas de l'embryogenèse somatique chez *Vitis vinifera* (Faure *et al.*, 1996) et *Euterpe edulis* (Guerra et Handro, 1998) où le type d'embryogenèse somatique est tissu dépendant.

Les réponses aux cultures de tissus menant à l'embryogenèse ou à une organogenèse sont très variables en fonction des génotypes utilisés. En 1997, Kintzios et Taravira montraient que les capacités de réponse à l'induction d'un cal ou à l'embryogenèse somatique différaient entre 14 cultivars de *Cucumis melo*. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'obtention d'embryons somatiques a été étudiée par Luo en 1997, à partir d'embryons immatures provenant de plantes issues de 6 écotypes. Cette étude menée pour comparer les stades de développement de l'embryon somatique à ceux de l'embryon zygotique a permis de montrer que tous les génotypes ne réagissaient pas de la même manière. En particulier seul le génotype « Ler » montre un développement de l'embryon identique à celui de l'embryon zygotique (Luo et Koop, 1997). Ces études mettent aussi en évidence que l'état physiologique de l'explant au moment du prélèvement intervient sur ses capacités embryogènes.

La capacité embryogène de ces explants est aussi dépendante du génotype étudié puisque dans leur cas le meilleur rendement d'embryogenèse somatique est obtenu par l'utilisation d'embryons immatures au stade coeur tardif et ceci pour un génotype particulier (Nd-0). Des études menées sur le déterminisme génétique de l'embryogenèse somatique signalent que celui-ci est contrôlé dans la majorité des cas par un faible nombre de gènes (Tableau 1). A l'inverse, les mécanismes impliqués dans l'acquisition de la compétence ou/et l'expression de celle-ci, nécessiteraient l'intervention de nombreux gènes (Komamine *et al.*, 1992).

Plantes	NG	Relations	Références
<i>Medicago sativa</i>	1	dominant	(Hernandez-Fernandez et Christie, 1989)
	2	dominants	(Kielly et Bowley, 1992)
	2	dominants complémentaires	(Yu et Pauls, 1993)
<i>Asparagus officinalis</i>	1	dominant	(Delbreil et Jullien, 1994)
<i>Zea mays</i>	1 à 2	dominant	(Bruneau, 1985; Hodges <i>et al.</i> , 1986; Rhodes <i>et al.</i> , 1986; Willman <i>et al.</i> , 1989; Armstrong <i>et al.</i> , 1992)
<i>Dactylis glomerata</i>	1	dominant	(Gavin <i>et al.</i> , 1989)
<i>Triticum</i>	1	dominant pour la formation du cal	(Ben Amer <i>et al.</i> , 1992)
	2	ND	(Higgins et Mathias, 1987)

Tableau 1 : Caractéristiques du déterminisme génétique de l'embryogenèse somatique chez les plantes. D'après Henry *et al.* (1994), ND : non déterminé, NG : nombre de gènes.

De même, il a été démontré que les teneurs endogènes en régulateurs de croissance peuvent intervenir de manière décisive sur la capacité embryogène des tissus mis en culture. Dans les tissus de feuilles de *Pennisetum purpureum* Schum, la présence de fortes teneurs en acide abscissique a pu être corrélée positivement à la capacité embryogène (Rajasekaran *et al.*, 1987). Dans les tissus de *Larix X Leptoeuropaea*, l'acide abscissique est nécessaire à l'amorçage du processus d'embryogenèse somatique à partir d'embryons somatiques immatures (Jourdain *et al.*, 1997).

1.2.4.2. Facteurs exogènes

Parmi les facteurs externes, les facteurs physiques peuvent jouer un rôle déterminant. Dans le cas de l'embryogenèse de *Cucumis melo* l'intensité lumineuse apportée aux cultures est un facteur clé (Kintzios et Taravira, 1997). Dans le processus d'embryogenèse somatique chez une chicorée embryogène, la température influence le processus d'embryogenèse. A 35°C, les anthères et les styles sont particulièrement réactifs puisque 98% des styles sont embryogènes. A 30°C, le pourcentage de styles embryogènes n'est plus que de 39%. A des températures inférieures, l'embryogenèse somatique n'est plus obtenue (Dubois *et al.*, 1988). De même, Décout *et al.*, en 1994, ont montré que lorsqu'une température de 35°C est appliquée aux fragments de feuilles mis en culture statique, ceux-ci s'orientaient dans la voie embryogène. A 25°C, c'est la voie organogène qui est privilégiée avec la formation de bourgeons.

La composition du milieu de culture est sans doute l'un des facteurs externes influençant le plus la capacité embryogène des explants. Quelle que soit l'origine de l'embryogenèse somatique (directe ou indirecte), les régulateurs de croissance sont des éléments essentiels à l'induction et au développement des embryons somatiques. Dans le processus d'embryogenèse somatique directe trois cas sont à distinguer.

Le premier, est celui où la culture se déroule en présence des mêmes régulateurs de croissance. Ces régulateurs peuvent être présents pendant toute la durée de la culture sans modification de la qualité et de quantité. C'est le cas de l'embryogenèse somatique développée dans les tissus foliaires ou racinaires de la chicorée « 474 » (Dubois *et al.*, 1990; Dubois *et al.*, 1991) et dans les tissus d'*Helianthus annuus* (Fambrini *et al.*, 1996). Dans les deux cas les auxines sont associées avec des cytokinines.

Dans le deuxième cas, l'application de régulateurs de croissance peut varier en quantité et qualité au cours de la culture. Chez *Euterpe edulis*, l'embryogenèse somatique obtenue à partir des jeunes feuilles nécessite trois milieux de culture différents pour un déroulement normal des différentes phases de l'embryogenèse. Le milieu d'induction est réalisé avec du 2,4-D, la croissance ultérieure des embryons nécessitant du 2iP et de l'ANA. Par contre, lors de la transformation des embryons en plantules il n'y a pas nécessité de régulateurs de croissance et les concentrations en sucre et en sels sont abaissées. Ce cas s'apparente plus à ce que l'on peut rencontrer dans le cas d'une embryogenèse somatique indirecte, néanmoins nous sommes ici dans un système mixte (Guerra et Handro, 1998).

Le dernier cas, en terme de contenu du milieu en régulateurs de croissance est celui rencontré chez *Helianthus*. Un hybride tétraploïde interspécifique obtenu après le croisement *Helianthus annuus* X *H. tuberosus* est fortement embryogène. L'utilisation de tissus de cet hybride permet de s'affranchir de la présence de régulateurs de

croissance lors de l'induction de l'embryogenèse somatique. Dans ce cas, les tissus seraient naturellement compétents à l'induction embryogène et le facteur inducteur serait alors le stress physique subi lors de la mise en culture (Fambrini *et al.*, 1997).

Dans le cas de l'embryogenèse somatique indirecte, le protocole d'obtention des embryons comporte généralement deux phases. La première est la phase d'induction et a pour objectif de permettre à certaines cellules d'acquérir la compétence embryogène avec passage par un cal. Cette étape se déroule en présence de doses importantes d'auxines. La seconde phase est la phase d'expression, son rôle est de permettre l'expression des potentialités embryogènes des cellules compétentes et de permettre le développement d'embryons à partir de cellules embryogènes. Cette étape peut se dérouler en l'absence ou parfois en présence de faibles doses d'auxine.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'auxine serait nécessaire à l'obtention de la compétence embryogène mais qu'elle serait ultérieurement inhibitrice du développement des embryons (Komamine *et al.*, 1992). Les mêmes réflexions ont été faites sur le rôle des cytokinines. Certains auteurs les utilisent mais pensent qu'elles ne sont pas nécessaires à l'acquisition de la compétence embryogène et une augmentation de leur concentration serait même inhibitrice de l'embryogenèse somatique (Maatar et Hunault, 1997).

D'autres facteurs sont capables de provoquer la transition d'une cellule somatique vers un état de compétence. Ainsi, des modifications nutritionnelles et l'utilisation de molécules tels que les métaux lourds peuvent permettre de déclencher cette transition. Chez la carotte, l'embryogenèse somatique a pu être obtenue par la modification du pH extracellulaire sans apport de régulateurs de croissance (Smith et Krikorian, 1992). Elle a aussi été possible par l'ajout de métaux lourds (Cd, Ni, Co) au milieu de culture (Kiyosue *et al.*, 1990). Chez le *Citrus*, la nature des sources carbonées utilisées est un facteur influençant le processus embryogène. Des cals sont d'abord obtenus sur un milieu contenant du saccharose. Leur transfert sur un milieu ne contenant que du glycérol comme source carbonée permet ensuite l'expression de l'embryogenèse somatique (Gavish *et al.*, 1991). Cabasson *et al.*, (1991) ont montré que, dans ce même cal, l'embryogenèse somatique ne s'exprime qu'après transfert sur un milieu contenant du galactose. Chez le tournesol, à composition en régulateurs de croissance identique, l'utilisation de 12% de saccharose dans le milieu de culture d'embryons zygotiques immatures permet d'induire l'embryogenèse somatique, alors qu'une concentration de 3% induit du bourgeonnement. L'effet organogène de cette faible concentration en saccharose est contrebalancé par l'ajout de zéatine dans le milieu de culture et les explants sont alors embryogènes (Charrière et Hahne, 1998).

En dehors des facteurs influençant directement l'embryogenèse somatique, certaines modifications apportées au milieu de culture peuvent permettre d'augmenter la capacité embryogène des explants. Dans une suspension cellulaire de carotte, le pourcentage de cellules évoluant en embryons somatiques n'excède pas 2% (de Vries *et al.*, 1988a). L'augmentation de la concentration en calcium dans la seconde phase de culture (phase sans régulateur de croissance) permet de doubler le nombre d'embryons somatiques (Jansen *et al.*, 1990). De même, la composition du milieu de culture évolue au cours du temps, chez *Daucus carota* des activateurs de l'embryogenèse somatique sont excrétés (de Vries *et al.*, 1988a) dans le milieu lors de culture à faible densité de cellules. Lorsque la densité cellulaire est trop importante se sont des produits inhibiteurs qui sont relargués dans le milieu (Higashi *et al.*, 1998).

1.2.5. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique

La mise en place de l'embryogenèse somatique peut globalement être considérée comme nécessitant deux étapes successives : l'acquisition de la compétence et l'expression de cette compétence. La compréhension des mécanismes impliqués dans la formation d'embryons à partir de cellules somatiques passe par la caractérisation des événements physico-chimiques se déroulant durant ces deux étapes; événements qui impliquent d'importantes modifications moléculaires. L'identification de marqueurs moléculaires peut donc contribuer à la description et à la prédiction du processus embryogène. A ce titre, des molécules présentes uniquement au cours du processus embryogène peuvent être considérées comme marqueurs spécifiques de l'embryogenèse.

1.2.5.1. Les marqueurs physiologiques et histo-cytochimiques

1.2.5.1.1. Modifications pariétales

L'une des premières modifications mise en évidence dans le processus embryogène se situe au niveau de la paroi des cellules embryogènes. Dans les feuilles de l'hybride '474', la callose se dépose à partir du 3^{ème} jour autour de ces cellules réactivées sous la forme de dépôts pariétaux probablement localisés au niveau des plasmodesmes (Helleboid, 1998). Ces dépôts sont plus importants au 5^{ème} jour et disparaissent lorsque les cellules embryogènes se divisent. (Dubois *et al.*, 1990; Dubois *et al.*, 1991). L'un des rôles des dépôts callosiques pourrait être d'isoler les cellules embryogènes de l'influence de leur environnement direct. Ceci leur permettrait de se réorienter vers un autre programme de dédifférenciation/redifférenciation. La présence de callose autour des embryons à des stades précoces a également été rapportée chez *Camelia japonica* L. (Pedroso *et al.*, 1995) et les auteurs associent la présence de cette callose pariétale à

l'évolution des cellules dans la voie embryogène. Des modifications pariétales plus tardives ont également été rapportées chez *Cichorium*. Une lectine extraite de *Dolichos biflorus*, s'accroche de manière spécifique sur les cellules embryogènes et les proembryons (Dubois *et al.*, 1991). D'autre part, des études de la surface des proembryons réalisés en microscopie électronique à balayage montre la présence d'un réseau fibrillaire. Chez *Cichorium*, ce réseau de nature glycoprotéique disparaît dès que l'embryon est épidermisé (Dubois *et al.*, 1992). De telles modifications ont également été observées chez le caféier (Nakamura *et al.*, 1992). Chez *Camelia japonica* L., un dépôt de cutine sur la callose est nécessaire pour permettre l'expression de l'embryogenèse somatique et un réseau fibrillaire a également été mis en évidence (Pedroso et Pais, 1992). Par ailleurs, la composition pariétale des cellules de cals embryogènes et non embryogènes de *Daucus carota* présente des différences (Kikushi *et al.*, 1995) : la paroi des cellules des cals embryogènes est plus riche en polysaccharides neutres. A l'inverse celle des cals non embryogènes est plus riche en polysaccharides acides. L'analyse chromatographique de la fraction neutre montre que la paroi des cellules cals embryogènes et des embryons somatiques est riche en arabinose, alors que celle des cals non embryogènes est plutôt riche en galactose. Ces auteurs évoquent un rôle possible de ces polysaccharides neutres dans la liaison intercellulaire qui serait plus forte dans les cals embryogènes que dans les cals non embryogènes.

1.2.5.1.2. Modifications biochimiques

La mise en culture dans des conditions embryogènes des explants entraîne des modifications physiologiques. Ainsi, les polyamines (putrescine, spermidine et spermine) ont souvent été reliées avec des phénomènes de morphogenèse (Galston et Kaur-Sawhney, 1995) et plus particulièrement avec l'embryogenèse somatique chez *Daucus carota* (Feirer *et al.*, 1984), *Hevea brasiliensis* (El Hadrami *et al.*, 1989), *Cichorium* (Couillerot *et al.*, 1993) ou *Camelia japonica* (Pedroso *et al.*, 1997). Néanmoins, les variations du contenu en polyamines observées ne sont pas toujours en relation directe avec le processus d'embryogenèse somatique. Chez le *Foeniculum vulgare*, les variations du contenu en polyamines ne semblent pas être liées directement au processus d'embryogenèse somatique puisque des cultures réalisées dans des conditions non-embryogènes permettent d'observer les mêmes modifications (Maatar et Hunault, 1997). L'éthylène a également été relié avec l'embryogenèse somatique; il faut remarquer que le métabolisme de ce composé est en partie lié à celui des polyamines par l'intermédiaire de la S-Adénosylméthionine décarboxylase (Roustan *et al.*, 1994).

De même, des modifications du contenu en lipides ont été décrites. Chez *Linum ussitatissimum*, le ratio stigmastérol/ β -sistostérol augmente dans les cultures

embryogènes alors qu'il diminue dans les cultures de tissus non embryogènes (Cunha et Ferreira, 1997). Chez *Cichorium*, des modifications importantes au niveau des phospholipides, des triglycérides et des stérols dans les tissus foliaires mis en condition embryogène ont été mises en évidence. En particulier, le stigmatostérol devient le stérol majoritaire (Blanckaert, communication personnelle). Au sein des lignées embryogènes de *Prunus avium* les teneurs en phosphatidylcholine riche en acide linoléique sont supérieures à celles des lignées non embryogènes. De même, la composition en stérol diffère entre les deux types de tissus et les tissus embryogènes ont une teneur plus élevée en triglycérides (Reidiboym, 1998).

1.2.5.2. Les marqueurs protéiques et moléculaires

Deux sortes de démarches ont été utilisées pour mettre en évidence des marqueurs protéiques. La première est une approche ascendante qui consiste à rechercher des protéines intra ou extracellulaires exprimées au cours du processus d'embryogenèse somatique puis à tenter de remonter aux gènes par le séquençage de ces protéines. La seconde est une approche qui consiste à rechercher les ARN messagers correspondants à des gènes s'exprimant spécifiquement lors du processus par le criblage des produits de transcription. Cette démarche permet d'identifier des protéines et les gènes correspondants.

1.2.5.2.1. Les marqueurs protéiques

L'analyse par électrophorèse monodimensionnelle n'est pas suffisamment résolutive même si elle reste une bonne méthode d'approche. Les études sur l'évolution des profils protéiques réalisées à partir des protéines tissulaires au cours de l'embryogenèse somatique, ont été menées principalement par électrophorèse bidimensionnelle. Cette technique, sépare les protéines selon leur point isoélectrique d'une part et leur masse moléculaire d'autre part. Elle a permis de mettre en évidence des polypeptides spécifiques de certaines étapes de l'embryogenèse somatique.

1.2.5.2.1.1. Protéines tissulaires

Chez *Daucus carota*, en 1981, Sung et Okimoto réalisaient l'analyse des profils protéiques par électrophorèses bidimensionnelles après marquage *in vivo* à la méthionine ³⁵S. Cette analyse a révélé deux polypeptides associés à des cellules embryogènes. De nombreux groupes ont engagé des études similaires en essayant d'identifier des gènes surexprimés dans les embryons somatiques de carotte. La stratégie expérimentale étant basée sur la comparaison des gènes et des protéines exprimés dans les embryons

somatiques par rapport à ceux exprimés dans des cellules indifférenciées. Globalement, une augmentation de l'activité de transcription et de traduction a été mise en évidence (Nomura et Komamine, 1986). Plus particulièrement, sur ce même matériel, d'autres auteurs ont pu démontré l'enrichissement du noyau en protéines (Guiltingan *et al.*, 1989) ainsi qu'une expression différentielle de l'histone H3-11 durant l'embryogenèse somatique (Kaproos *et al.*, 1992). Chez *Glycine max*, lors de l'embryogenèse somatique de nouvelles protéines apparaissent mais leur nombre reste limité (Christou et Yang, 1989). En 1996, Pramanik et Bewley, dans cette même plante, ont mis en évidence des ribonucléo-protéines qui s'associent aux ARNm à un stade pré-cotylédonnaire de l'embryogenèse. Ces protéines pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la traduction (Pramanik et Bewley, 1996).

Chez l'hybride '474' de *Cichorium*, les analyses des profils protéiques bidimensionnels ont été menées sur les protéines totales des fragments foliaires (Hilbert *et al.*, 1992) et de racines (Boyer *et al.*, 1994). Les analyses différentielles de tissus induits et non-induits à l'embryogenèse somatique montrent que 27 polypeptides sont nouvellement exprimés au cours de l'embryogenèse dans les feuilles (Hilbert *et al.*, 1992) et les racines (Boyer *et al.*, 1994). Sur ce même modèle, Décout, en 1998, a montré que deux polypeptides seraient de bons candidats au titre de marqueur de l'embryogenèse somatique.

1.2.5.2.1.2. Protéines extracellulaires

La majorité des études concernant la recherche de marqueurs protéiques de l'embryogenèse somatique a concerné la caractérisation de protéines extracellulaires sur le modèle *Daucus carota* en cultures cellulaires. Ces études ont montré des modifications importantes des profils protéiques au cours du processus (de Vries *et al.*, 1988a).

Plusieurs glycoprotéines relarguées dans le milieu de culture de l'embryogenèse somatique (EP1, EP2, EP3) ont été caractérisées dans des cultures cellulaires de *Daucus carota* grâce à l'utilisation d'anticorps. EP1 ne semble pas reliée à l'embryogenèse somatique car elle est excrétée pendant la phase d'induction, la phase d'expression et ceci par des cellules qui ne sont pas considérées comme embryogènes (van Engelen *et al.*, 1991). La glycoprotéine EP2 est, elle, excrétée par les cellules embryogènes et par les embryons somatiques en cours de développement. C'est une protéine de transfert de lipides dont la masse moléculaire est de 10 kDa et le point isoélectrique proche de 9. L'ARNm codant pour cette protéine est détecté au niveau des masses proembryogènes et dans le protoderme des embryons somatiques et zygotiques aux stades globulaire et cordiforme. Pour Sterk *et al.* (1991) EP2 pourrait jouer un rôle dans la formation du

protoderme en transportant des monomères de cutine. Le rôle de la protéine EP3 a été abordé lors de l'étude d'une lignée de *Daucus carota ts11* pour laquelle l'embryogenèse somatique est bloquée au stade globulaire par une température de 32°C (Lo Schiavo *et al.*, 1990). La glycoprotéine EP3 est une endochitinase acide de 32 kDa capable de permettre la transition du stade globulaire au stade cordiforme dans cette lignée cellulaire *ts11* (de Jong *et al.*, 1992).

Il a été montré que des arabino-galactanes protéines (AGP) sont capables d'induire l'apparition de cellules embryogènes dans une suspension cellulaire non-embryogène, chez *Daucus carota* (Kreuger et van Holst, 1993) et chez *Picea abies* (Egertsdotter et von Arnold, 1995). Pennel *et al.* (1992) ont émis l'hypothèse que l'épitope d'une AGP (JIM 8) était caractéristique de l'état de compétence des cellules à l'embryogenèse. Toonen *et al.*, (1996) concluent que la présence de cet épitope, ne coïncide pas avec la capacité des cellules à former des embryons, mais en 1997, ils confirment que les arabino-galactanes peuvent intervenir dans le processus d'embryogenèse somatique chez *Daucus carota* (Toonen *et al.*, 1997).

D'autres glycoprotéines ont été mises en évidence chez *Pinus caribea* var. *hondurensis* grâce à l'analyse des protéines des milieux de culture de 4 lignées embryogènes et de 2 lignées non-embryogènes (Domon *et al.*, 1994). Parmi ces glycoprotéines, le polypeptide GP111 semble spécifique de l'embryogenèse somatique et présente de fortes homologues avec les germines du blé (Domon *et al.*, 1995).

Au cours du processus d'embryogenèse chez *Vitis vinifera*, une phosphatase acide et une estérase acide présentent des modifications dans leur nombre d'isoformes. L'activité spécifique d'une alcool déshydrogénase est également modifiée (Martinelli *et al.*, 1993). Sur ce même modèle, des protéines excrétées dans le milieu de culture des suspensions cellulaires embryogènes entraîneraient, en partie, l'arrêt du développement des embryons somatiques au stade cordiforme (Coutos-Thevenot *et al.*, 1992a; Coutos-Thevenot *et al.*, 1992b). L'une de ces protéines est une peroxydase basique glycosylée de 36 kDa. Par ailleurs, un anticorps dirigé contre une protéine de transfert de lipides du maïs reconnaît chez *Vitis vinifera* une bande protéique de 10 kDa (Coutos-Thevenot *et al.*, 1992b) composée en fait de 4 protéines de transfert de lipides (Coutos-Thevenot *et al.*, 1993).

Trois types de protéines extracellulaires corrélées à l'embryogenèse somatique ont été identifiés dans les milieux de cultures de feuilles de l'hybride '474'. Parmi celles-ci, deux β -1,3 glucanases acides de 38 kDa ne sont plus excrétées lorsque l'on inhibe le processus embryogène par l'ajout d' α -difluorométhylarginine, inhibiteur de la synthèse des polyamines. Elles réapparaissent lorsque l'inhibition est reversée par l'ajout de putrescine (Helleboid *et al.*, 1995). Ces β -1,3 glucanases, dont l'expression tissulaire est

colocalisée avec celle de la callose, interviendrait dans le métabolisme de ce polysaccharide et donc dans le processus embryogène au niveau de la paroi des cellules induites (Helleboid, 1998).

Les comparaisons des profils d'expression protéique de l'embryogenèse somatique et zygotique ont montré que de nombreuses protéines étaient communes aux deux phénomènes, beaucoup d'entre elles appartenant au groupe des LEA (Zimmerman, 1993) (Tableau 2). Des accumulations de "Heat Shock Proteins" ont aussi été décrites lors de l'embryogenèse somatique de *Medicago sativa* (Györgyey *et al.*, 1997). Même si toutes ne sont pas corrélées au phénomène, elles peuvent permettre de caractériser des stades de développement (Pitto *et al.*, 1983).

1.2.5.2.2. Les marqueurs moléculaires

Des expériences de traduction *in vitro* de populations d'ARN messagers provenant des masses proembryonnaires, d'embryons au stade torpille et d'hypocotyles de carotte menées en 1988 par de Vries *et al.* et par Wilde *et al.*, ont permis de caractériser 3 polypeptides présents dans les embryons au stade torpille. Le gène correspondant à l'ADNc *Dc 3* est exprimé dans les cultures qui ne contiennent que des masses proembryonnaires ou des embryons somatiques (Tableau 2). Ce résultat, montre que des gènes spécifiques impliqués dans l'embryogenèse somatique, sont exprimés avant que des embryons somatiques ne soient discernables. Depuis, différentes études ont permis de mettre en évidence et d'isoler un certain nombre de gènes qui sont plus fortement exprimés dans les embryons de *Daucus carota*. Parmi ceux-là, nous pouvons distinguer des gènes correspondant à des protéines LEA, à des protéines de transfert de lipides ou à des SERK (Tableau 2).

Kiyosue *et al.* (1998) ont mis en évidence un ADNc désigné sous le nom de DcCB1 isolé à partir d'une banque de ADNc provenant de masses de cellules embryogènes. Le gène code pour une chromoprotéine de 392 acides aminés. Cette protéine contient des homologies de séquence avec les produits du gène *Polycomo* qui est un répresseur de l'expression de gènes homéotiques. Ce gène est aussi exprimé dans les embryons zygotiques, ce qui suggère des mécanismes de régulation communs entre les embryons somatiques et zygotiques. De même, des produits de gènes homéotiques pouvant intervenir dans le développement des embryons somatiques ont été mis en évidence. Chez le concombre, le gène CUS 1 appartenant à la classe des MAD-Box est exprimé durant la phase coeur du développement des embryons somatiques (Filipecki *et al.*, 1997).

Gènes	Identification	modalités d'expression:			Références
		cal	embryons somatiques	embryons zygotiques	
DC3	LEA groupe 3	±	+++ (MPE, globulaire et torpille)	ND	(Wilde <i>et al.</i> , 1988)
EMB-1	LEA groupe 1	±	++ (globulaire et coeur) +++ (torpille)	+++	(Wurtele <i>et al.</i> , 1993)
ECP 31	LEA groupe 4	ND	++ (MPE) ± (globulaire et torpille)	+++	(Kiyosue <i>et al.</i> , 1992)
ECP 40	LEA groupe 2	ND	+++ (MPE) ±(globulaire et torpille)	+++	
EP 2	transfert de lipides	±	+++	+++	(de Vries <i>et al.</i> , 1988a) (Sterk <i>et al.</i> , 1991)
EP 3	chitinase	ND	+++	ND	(de Jong <i>et al.</i> , 1992)
SERK	récepteur kinase	ND	+++ (MPE)	ND	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997)

Tableau 2: Caractérisation de gènes clonés lors du processus d'embryogenèse somatique chez la Carotte. MPE: masse Proembryogène, ND : non déterminé ; ± , + , ++ , +++ : niveaux d'expression.

Chez *Medicago sativa*, des banques d'ADNc établies à partir de masses proembryogènes ont été comparées avec des banques d'ADNc établies à partir de pétioles ou d'embryons matures d'une lignée embryogène et aussi avec des banques d'ADNc établies à partir de cultures tissulaires d'une lignée non-embryogène. Ces criblages ont permis de mettre en évidence 3 clones (ASET1, ASET2, ASET3), le premier est un transcrit partiel, le second est complet mais n'a pu être identifié dans les bases de données et le troisième n'a pas pu être séquencé (Giroux et Pauls, 1997).

Chez *Oryza sativa*, le criblage différentiel de deux banques d'ADNc, l'une préparée à partir des ADNc de cals induits à l'embryogenèse et l'autre avec les ADNc obtenus à partir de cals induits à l'organogenèse, a permis de cloner un ADNc (RSEM1). Cet ADNc correspond à un ARN qui s'accumule de manière spécifique dans les cals

induits à l'embryogenèse et dans les tissus des embryons zygotiques et il ne s'accumule pas dans ceux induits à l'organogenèse.

1.3. Conclusion

Jusqu'à présent la majorité des gènes mis en évidence s'expriment aussi bien au cours de la phase d'induction que d'expression et ne reflètent donc pas les modifications qui engendrent ou qui sont concomitantes à l'acquisition de la compétence embryogène. Des produits de gènes plus spécifiques de la phase d'acquisition de la compétence à l'embryogenèse somatique peuvent néanmoins être mis en évidence. Le criblage différentiel de banques d'ADNc obtenues à partir de cultures cellulaires embryogènes et non-embryogènes, a permis de mettre en évidence un gène codant pour une protéine présentant des homologies avec un récepteur-kinase (SERK, Somatic Embryogenesis Receptor Kinase). Son expression est limitée aux cellules isolées et aux petites masses proembryogènes. Le produit de ce gène n'est plus détecté dans les stades ultérieurs de développement de la plante (Schmidt *et al.*, 1997).

De même, chez *Solanum melongena* L. un clone obtenu par PCR s'exprime 4 jours après la mise en culture, juste avant la mise en place d'un cal sur le fragment cotylédonnaire et s'accumule au cours de la culture (Momiya *et al.*, 1995). Néanmoins, aucune comparaison avec des explants non embryogènes ne peut être réalisée sur ce système.

La caractérisation de plantes mutantes est une voie d'étude possible. De nombreuses équipes qui travaillent sur l'embryogenèse zygotique d'*Arabidopsis thaliana* ont caractérisé des mutants qui présentent des aptitudes à l'embryogenèse somatique (Mordhorst *et al.*, 1998). L'utilisation de plantes mutantes semble être une voie prometteuse car elle offre la possibilité de disposer de contrôles (plantes sauvages non embryogènes) et elle donne aussi la possibilité d'avoir accès aux phases précoces de l'embryogenèse.

1.4. L'embryogenèse somatique chez l'asperge

1.4.1. Les explants

L'embryogenèse somatique chez l'asperge a été rapportée pour la première fois par Wilmar et Hellendoorn en 1968 qui ont utilisé des hypocotyles pour l'induction de cals embryogènes sur lesquels se développent des embryons somatiques une fois transférés sur un milieu contenant 1 mg.l⁻¹ de 2,4 D et 0,315 mg.l⁻¹ de kinétine. Depuis

de nombreux auteurs ont décrit cette embryogenèse somatique et cela à partir d'explants de nature très variable telle que tiges (Takatori *et al.*, 1968; Reuther, 1977), cladodes (Harada, 1973), cellules foliaires (Jullien, 1974), protoplastes isolés de cladodes (Bui Dang Ha et Mackenzie, 1973), jeunes griffes cultivées *in vitro* ou sections de turions (Levi *et al.*, 1986; Ghosh et Sen, 1991; Levi et Sink, 1991a; Odake *et al.*, 1993). Les explants les plus adaptés sont ceux qui contiennent des méristèmes, par exemple les bourgeons latéraux (Levi et Sink, 1991b). Ce type d'explant a permis à Delbreil et Jullien, en 1994, de régénérer des plantes mutantes embryogènes dont la capacité embryogène est remarquable puisque la majorité des explants mis en culture permettent d'obtenir des cals embryogènes.

1.4.2. L'effet du génotype et facteurs exogènes

Il existe de nombreuses espèces dans le genre *Asparagus* (si l'on y inclut les plantes ornementales) or l'embryogenèse somatique n'a été rapportée que dans deux d'entre elles : *Asparagus officinalis* L. et *Asparagus cooperi* Baker. Par contre, à l'intérieur de ces espèces, l'embryogenèse somatique est décrite pour de nombreux cultivars. Cependant tous les génotypes ne montrent pas la même aptitude à l'embryogenèse. Delbreil et Jullien (1994) l'ont observé lors de leurs études sur l'induction de cals embryogènes à partir d'apex caulinaires. Dans ces études, sur 12 génotypes utilisés tous n'ont pas eu la même réponse. De plus, le génotype interagit avec les facteurs environnementaux. Les études menées par Li et Wolyn (1996) sur 6 génotypes étudiés pour leur réponse en fonction de la température, trois génotypes répondent à l'induction embryogène et la température optimale est de 27°C. Dans ces conditions, le génotype G203 (Rutger 22) a une réponse supérieure aux deux autres. Ce même génotype, utilisé dans des études de capacité à l'embryogenèse en fonction de la source carbonée fournie dans le milieu de culture, a montré des performances supérieures au génotype G-171 aussi bien en nombre d'embryons qu'en taux de conversion de ces embryons en plantules (Mukhopadhyay et Desjardins, 1994). Lors de leurs études de l'influence du génotype et des auxines sur la capacité embryogène, May et Sink, en 1995, ont montré que cette fois c'était le génotype M10 qui était le mieux adapté aux conditions de culture utilisée.

Ainsi, si le génotype de la plante est important, il interagit de façon permanente avec les conditions de culture (milieux, environnement ...) dans lesquelles se réalise le processus embryogène.

1.4.3. Les milieux de culture

1.4.3.1. Nature des composés carbonés

La nature et la concentration de la source carbonée semblent fortement influencer la capacité embryogène et le développement de ces embryons somatiques. Mukhopadhyay et Desjardins en 1994, démontrent que le processus de l'embryogenèse initié à partir de protoplastes se déroule mieux lorsque l'induction se réalise en présence de 3% de saccharose et l'expression sur un milieu contenant 10% de saccharose ou de glucose. Ces résultats recourent ceux obtenus par Levi et Sink en 1992. Cette équipe avait démontré que l'utilisation du saccharose était plus adaptée au processus embryogène. De plus, ces auteurs ont montré que l'utilisation de 10 % de saccharose au cours de la seconde phase de culture permettait de diminuer le risque d'embryogenèse secondaire qui nuit à la conversion des embryons.

L'utilisation du maltose permet également d'améliorer le nombre et la morphologie des embryons obtenus (Kunitake et Mii, 1998)

1.4.3.2. Composition en régulateurs de croissance

L'embryogenèse somatique chez l'asperge est dans la grande majorité des cas d'origine indirecte. Les auteurs travaillant sur des modèles d'embryogenèse somatique obtenue à partir de protoplastes décrivent souvent la formation d'un microcal, à l'exception de l'embryogenèse somatique obtenue à partir de protoplastes par May et Sink en 1995. Cette embryogenèse nécessite plusieurs étapes de culture avec des changements dans la composition des milieux successifs.

Dans les cas d'obtention d'embryons somatiques à partir de protoplastes ou d'explants prélevés sur la plante, trois étapes sont décrites. La première est l'étape d'initiation d'un cal en culture liquide. La seconde consiste à transférer ces cals induits à l'embryogenèse sur un milieu d'expression de l'embryogenèse. La troisième va permettre la conversion de ces embryons en plantules. Pour chacune de ces étapes, des compositions particulières du milieu en régulateurs de croissance ont été développées de façon indépendante pour tous les systèmes de culture mis en place sur l'asperge. Nous ne signalerons ici que les traits les plus remarquables.

Ce sont principalement les auxines qui sont utilisées pour leur capacité à induire la formation des cals embryogènes (Ghosh et Sen, 1991; Levi et Sink, 1991a; Levi et Sink, 1991b; Kohmura *et al.*, 1994). Il s'agit du 2,4-D ou de l'ANA, cette dernière semble plus efficace dans la première phase de culture (May et Sink, 1995) et peut être utilisée seule ou couplée avec une cytokinine. Les cytokinines les plus souvent utilisées sont la benzyladénine et la kinétine. Certains auteurs transfèrent ces explants sur des

milieux contenant différentes concentrations en régulateurs de croissance (Jullien, 1974; Levi et Sink, 1990; Levi et Sink, 1991b). Au contraire, d'autres utilisent en deuxième phase de culture un milieu ne contenant plus que des cytokinines (Wilmar et Hellendoorn, 1968) ou aucun régulateur de croissance (Nakashima *et al.*, 1993; Delbreil *et al.*, 1994; Kohmura *et al.*, 1994). Les cytokinines sont reconnues dans certains cas pour leurs effets organogènes ou favorisant plutôt le développement des embryons somatiques en plantules (Ghosh et Sen, 1991).

L'obtention de cette embryogenèse s'inscrit en générale sur une période relativement longue pendant laquelle de nombreux repiquages sur le même milieu sont nécessaires. Il a fallu deux mois de culture pour que Jullien (1974) obtienne des cals friables, peu chlorophylliens et portant des glomérules blanchâtres correspondant à des embryons somatiques. Reuther, en 1977, avait obtenu des embryons en huit à douze semaines. Chez *Asparagus cooperi* Baker, les cals sont obtenus en quatre semaines et ceux-ci nécessitent trois subcultures pour aboutir à la formation d'embryons somatiques en quatre mois (Ghosh et Sen, 1991). Levi et Sink décrivent, en 1991, l'obtention d'embryons somatiques issus de cals initiés à partir de bourgeons latéraux. Avec leur technique, les embryons sont obtenus en 20 semaines après que les explants aient subi de nombreux repiquages sur 4 milieux différents.

1.4.4. Présentation de l'étude

Notre travail a porté sur l'étude de l'embryogenèse somatique d'un mutant d'*Asparagus officinalis* L. obtenu en cultivant des bourgeons latéraux de jeunes turions sur un milieu contenant 10 mg.l⁻¹ d'ANA puis en les repiquant sur un milieu sans régulateur de croissance (Delbreil *et al.*, 1994). Cette étape a permis d'obtenir des tissus fortement embryogènes anergiées vis à vis des régulateurs de croissance. Les explants prélevés sur des plantes régénérées à partir de ces tissus ont montré une capacité embryogène supérieure à celle observée sur les plantes initiales. Ces explants ont en outre la capacité de développer des embryons somatiques sans passage sur un milieu contenant des régulateurs de croissance. Ce nouveau phénotype fortement embryogène est sous le contrôle d'une mutation monogénique dominante (Delbreil *et al.*, 1994), et offre de multiples avantages :

- une production d'embryons somatiques en un temps très court par rapport aux autres méthodes développées sur l'asperge
- une procédure de culture simplifiée
- un déterminisme génétique simple

Introduction

- l'existence de plantes non mutées témoins qui ont été à l'origine de l'obtention des plantes de type mutant, ce qui n'est pas le cas pour de nombreux autres modèles.

En outre, il présente la particularité intéressante de permettre une recherche *in planta* de la caractérisation génétique de la mutation et d'appréhender l'enchaînement des mécanismes moléculaires précoces nécessaires à la mise en place du processus d'embryogenèse somatique.

Les études envisagées nécessitaient d'abord de mettre au point des conditions de culture *in vitro* devant permettre d'une part l'apparition des embryons somatiques au même moment dans tous les explants de type mutant et d'autre part une évolution des explants de type sauvage identique, à l'exception de la mise en place du processus embryogène. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé d'un point de vue cytologique les évolutions au cours de cette culture, de chacun des deux types d'explants utilisés. Une fois ces points acquis, nous avons réalisé l'analyse des profils protéiques par électrophorèse bidimensionnelle.

Disposant d'un système dans lequel le génotype embryogène découle d'un génotype sauvage utilisé comme témoin non embryogène, nous avons également tenté de mettre en évidence le polymorphisme lié à la mutation.

Enfin, les plantes de type mutant ont été obtenus par l'application *in vitro* de fortes concentrations d'auxines et présentent la caractéristique de produire des tissus embryogènes anergiés, capables de produire des embryons somatiques sans application de régulateurs de croissance. Ces éléments nous ont donc conduit à nous intéresser au contenu en régulateurs de croissance endogènes des tissus des deux types de plantes.

Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Deux types d'*Asparagus officinalis* L. sont cultivés dans cette étude de l'embryogenèse somatique. Le premier type, dit sauvage, est constitué de plantes mâles obtenues par clonage *in vitro* de plantes issues de la sélection massale d'une population d'Argenteuil. Ce clone appelé M8 provient des entreprises J. MARIONNET-GFA, il correspond à la plante utilisée par Delbreil et Jullien en 1994 pour l'obtention d'une souche d'asperge fortement embryogène. Le second type (S8), dit mutant est constitué de plantes mâles régénérées à partir d'embryons somatiques issus de la même souche fortement embryogène. Du mois de septembre au mois de mai, les plantes sont laissées au repos afin d'augmenter la qualité de la griffe. Au mois de mai les asperges sont rabattues et jusqu'au mois de septembre les turions émergents sont utilisés pour nos travaux. Au mois de septembre les turions sont laissés jusqu'à ce que la partie aérienne se développe, celle-ci est alors récoltée et stockée à -70°C pour les analyses moléculaires. Nous considérons que les deux types de plantes (mutante et sauvage) ont le même âge physiologique puisqu'elles ont toutes deux acquis l'aptitude à la floraison.

2.1.1. Entretien des clones

Les plantes sont maintenues en serre dans des containers. Le mélange de culture est composé de terre de jardin (60,9% m/m), de perlite (30,4% m/m) et de sable (8,7% m/m). La température est de 20°C et un complément de lumière est apporté 16 heures par jour. Les plantes sont arrosées tous les deux jours, un apport d'engrais solide (N/P/K/, 12/12/17) est réalisé toutes les trois semaines.

2.1.2. Culture *in vitro* d'apex

2.1.2.1. Aseptisation et dissection des explants

Les turions sont prélevés avant l'émergence des premiers cladodes. Ils sont aseptisés dans un bain de Domestos[®], 12% (v/v) pendant 15 min. puis rincés trois fois dans de l'eau osmosée stérile. Les apex sont disséqués sous loupe binoculaire afin d'obtenir des explants de 0,5 à 1 mm, composés d'un ensemble de méristèmes, qui sont mis en culture sur boîte de Pétri en milieu gélosé.

2.1.2.2. Milieux et conditions de culture

Le milieu MSN est utilisé comme milieu de base. Il est composé des macroéléments de Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962), des microéléments de Nitsch (Nitsch, 1968) et des vitamines de Nitsch et Nitsch (Nitsch et Nitsch, 1965)

(annexe 1) supplémenté par 20 g/l de saccharose et gélifié par 7 g/l d'agar Biokar type E. Le pH est ajusté à 5,7. Ce milieu a été utilisé tel quel ou supplémenté en régulateurs de croissance dont la nature et les quantités varient (annexe 1). Le transfert des explants, sur milieux ne contenant plus de régulateur de croissance, a été effectué après 7 ou 15 jours de culture. Pour les analyses, les 15 premiers jours de culture s'effectuent sur un milieu de base MSN (annexe 1) supplémenté par 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA, 0,1 mg.l⁻¹ de zéatine. Puis les explants sont transférés sur un milieu MSN dépourvu de régulateur de croissance. Toutes les cultures *in vitro* se font dans les mêmes conditions de température et d'éclairage : 24°C-20°C, 10 h-14 h (lumière-obscurité).

2.2. Analyses cytologiques

2.2.1. Fixation et inclusion en résine JB4 (Polysciences Inc)

Des apex mis en culture sur boîte de Pétri sont prélevés tous les trois jours jusqu'au 30^{ème} jour de culture (T30) pour les deux types : sauvage et mutant.

Les objets prélevés sont immédiatement fixés dans le FAA (formaldéhyde : acide acétique : éthanol 70%, 5 : 5 : 90) au moins 24 h avec renouvellement de la solution de FAA au bout de 2 h. Les objets sont alors déshydratés dans des bains de 20 min. de concentrations croissantes d'éthanol (50% à 100%). L'infiltration par la résine JB4 se fait sous vide 24 h dans le mélange A + C (0,9% p/v). L'inclusion se réalise dans des gélules pharmaceutiques à raison de 330 µl de A + C (0,9% p/v) + B (1 ml/25 ml de A + C). La résine est laissée à polymériser à température ambiante pendant au moins une heure.

2.2.2. Coupes et coloration

Des coupes de 3 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome Leica et déposées sur lame de verre recouverte par une goutte d'eau ammoniacquée. Les coupes sont fixées sur la lame par chauffage sur plaque à 50°C pendant 20 min.

Les coupes fixées sont hydrolysées 50 min. par l'acide périodique 0,5% à température ambiante. Les coupes sont couvertes par le réactif de Schiff. Quelques cristaux de métabisulfite de sodium sont ajoutés pour accélérer la coloration qui s'effectue à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à ce que les coupes rosissent. Les coupes sont alors rincées abondamment à l'eau distillée. Les lames sont mises à 50°C et recouvertes par du Naphtol Blue Black (NBB) 1% (p/v) dans l'acide acétique 7% pendant 5 min. puis régressées à l'acide acétique 7%. Les coupes sont montées dans l'Eukitt[®]. Les observations et photographies sont réalisées au microscope photonique (Olympus).

2.3. Microscopie électronique à balayage

Le matériel végétal est fixé pendant 3 h à température ambiante dans l'acide osmique (OsO₄) préparé à 1 % puis lavé à l'eau distillée. Après une déshydratation via une série de bains d'éthanol de concentration croissante (50°, 70°, 80°, 90°, 95°) de 30 min. chacun, le matériel fixé subit un point critique de séchage (Emscope CPD 750). Les échantillons sont ensuite recouvert d'un mélange or-palladium (Polaron SEM ES 100) et observé au microscope électronique à balayage (JEOL JSM-35CS). Les photographies ont été réalisées par M^{elle} Audrey Chapman.

2.4. Analyse protéique

2.4.1. Préparation des échantillons

2.4.1.1. Prélèvement des explants

Les apex sont prélevés à la mise en culture (T0), 12 jours (T12) et 15 jours (T15) après le début de la culture. Ils sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -70°C. Pour limiter la variabilité intra-plantes, l'échantillonnage est réalisé de manière à ce qu'un jour donné soit la somme d'explants de différentes mise en culture d'une même plante ainsi que pour limiter la variabilité intra-clone, il représente la somme d'explants de différentes plantes d'un même type.

2.4.1.2. Extraction

L'extraction des protéines est réalisée selon le protocole décrit par Boyer *et al.*, en 1993. Les explants sont broyés dans l'azote liquide. Le broyat est précipité dans 2 ml de tampon acétone-TCA (10% p/v) + β -mercaptoéthanol (0,07% v/v) (Zivy, 1986) à -20°C pendant 45 min., puis centrifugé à 30 000 g, 4°C, 20 min. Le culot est rincé dans 2 ml d'une solution acétonique froide de β -mercaptoéthanol (0,07% v/v) et précipité 45 min. à -20°C puis centrifugé comme précédemment. Le rinçage est répété pendant une nuit à -20°C. Après centrifugation le culot est séché sous une hotte aspirante pendant 3 heures. Il est ensuite resolubilisé dans le tampon de lyse UKS (Hochstrasser *et al.*, 1988) (annexe 2) pendant 2 heures à 20-22°C. Après une dernière centrifugation (30 000 g, 22°C, 20 min.), le surnageant est récupéré et stocké à -70° C.

2.4.1.3. Dosage

Des prélèvements de 2 μ l sont effectués dans chaque extrait. Le dosage se fait par spectrophotométrie à l'aide du kit BioRad[®] DC "Protein assay". Les 2 μ l d'extrait sont précipités par 1 ml d'acétone 1 h à -20°C puis centrifugés 30 000 g pendant 20 min.

à 4°C. Le culot protéique est séché sous une hotte aspirante au moins 20 min. Une gamme étalon de 1 à 30 µg de BSA est réalisée. Le culot est resolubilisé dans 20 µl d'H₂O. On ajoute alors 100 µl de réactif A' (20 µl de réactif S par ml de réactif A) aux échantillons et à la gamme étalon, ainsi que 800 µl de réactif B. La coloration est laissée à développer pendant 15 min., la DO est alors mesurée à 750 nm.

2.4.2. Electrophorèse bidimensionnelle

Cette technique permet la séparation des protéines en fonction de deux critères:

- Leur point isoélectrique (pI) pendant l'isoélectrofocalisation (IEF)
- Leur masse moléculaire pendant l'électrophorèse en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) : SDS PAGE.

2.4.2.1. L'isoélectrofocalisation (IEF)

Le principe consiste à créer un gradient de pH dans un support d'acrylamide : celui-ci est réalisé par le dépôt d'ampholines (BioRad®) (molécules riches en résidus polyamino-polycarboxyliques) qui sont soumises à un champ électrique. Les protéines migrent jusqu'à ce que leur charge nette s'annule au niveau de leur point isoélectrique.

L'IEF est réalisée dans des gels cylindriques d'acrylamide/PDA (annexe 2) préparés dans des tubes en verre de 1,5 mm de diamètre interne. La polymérisation du gel se réalise grâce à l'ajout de 20 µl de persulfate d'ammonium (APS) à 10% p/v et de 4 µl de Temed (N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine). Les gels polymérisent pendant 1h à température ambiante.

Les tubes sont ensuite installés sur le système de fixation de la cuve BioRad® (Modèle 175 Tube Cell). En haut des gels sont déposés 20 µl de tampon UKS puis 20 µl du même tampon dilué au demi.

Une solution d'acide phosphorique (H₃PO₄) 10 mM est ajoutée à l'anode. Une solution de soude (NaOH) 20 mM est ajoutée à la cathode. Celle-ci est préalablement dégazée pendant 40 min. afin d'éliminer le CO₂ dissout qui pourrait gêner la formation du gradient. L'établissement du gradient de pH dans le gel est réalisé par une préfocalisation d'une heure (1200V, 3W, 3 mA).

Les échantillons sont déposés au sommet des gels, à raison de 60 µg de protéines + 5 µl de bleu de bromophénol à 0,05% (p/v), ce dernier permettant de visualiser le front de migration. L'IEF est effectuée pendant 17 heures dans les mêmes conditions que la préfocalisation. La séparation des protéines se termine en les soumettant à une tension de 1500V pendant 30 min.

Après migration, les gels sont démoulés par l'application d'une surpression d'eau à l'aide d'une seringue. Ils sont alors stockés à -70°C dans un tampon d'équilibration (Annexe 2) + 50 µl de bleu de bromophénol (0,05% p/v).

2.4.2.2.SDS-PAGE

La seconde dimension permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Pour réaliser la deuxième dimension un gel à 12,5% d'acrylamide (annexe 2) est coulé entre deux plaques de verre (180 x 160 x 1 mm) et polymérise pendant une heure. Le gel d'IEF décongelé, est déposé au sommet du gel de séparation. Les plaques sont fixées sur le support et placées dans la cuve Protean® II contenant le tampon de migration (Annexe 2) (Hochstrasser *et al.*, 1988). La migration se fait à 350V limitant et à une température constante de 10°C jusqu'à ce que le front atteigne le bas du gel.

2.4.3. Révélation argentique

La révélation s'effectue par la méthode de Blum *et al.*, (1987), (annexe 2). Le protocole comprend 3 étapes principales :

- Le prétraitement des gels par le thiosulfate, qui réduit les protéines augmentant ainsi la sensibilité et le contraste de la coloration.

- L'imprégnation argentique, permet la formation de complexes protéines-nitrate d'argent indissociables. L'addition de formaldéhyde est indispensable pour la sensibilité et le contraste de la coloration.

- La révélation argentique au carbonate de sodium qui oxyde les complexes formés.

2.4.4. Séchage des gels

Les gels et des feuilles de Cellophane sont imprégnés dans une solution de glycérol à 5% (v/v) pendant 5 min., ce qui évite aux gels de se casser lors du séchage. Ceux-ci sont placés entre les deux feuilles de Cellophane dans un sécheur de gels (Model 543 Gel Dryer BioRad®), en prenant soin d'éliminer les bulles d'air. Le séchage dure deux heures sous l'action du vide à la température de 80°C.

2.4.5. Analyse des profils protéiques.

L'analyse et la comparaison des gels révélés à l'argent sont réalisées sur une station Sun Sparcstation 20. Grâce à un scanner (Sharp JX 330), 3 gels par date d'analyse sont numérisés et analysés avec le logiciel 2-D Analyzer (BioImage®). Chaque gel est d'abord traité séparément puis une image composite rassemblant l'information contenue sur les

3 gels est réalisée. Ce sont les images composites qui ont été comparées lors de l'analyse des profils protéiques bidimensionnels.

2.5. Analyse du contenu en régulateurs de croissance

Les turions ont été congelés dans de l'azote liquide puis lyophilisés avant d'être réduit en poudre. Les dosages ont été réalisés par M. Kraepiel, Maître de Conférence à l'université Pierre et Marie Curie. Trois familles de régulateurs de croissance ont été analysées : les formes libres et conjuguées de l'acide abscissique (ABA, ABAGE), les formes libres et conjuguées pour l'acide indolylacétique (AIA, AIA-Gly) et les formes libres et conjuguées pour les différentes cytokinines que sont les isopentényles et les zéatines (Kraepiel *et al.*, 1994; 1995).

2.6. Analyse génomique

2.6.1. Extraction d'ADN (Dellaporta *et al.*, 1983 modifié)

Cinq grammes maximum de matière fraîche sont broyés dans un mortier en présence d'azote liquide. Le broyat est repris dans 15 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM, pH 8 ; EDTA 50 mM ; NaCl 50 mM ; β -mercaptoéthanol 10 mM) et transvasé dans un tube Nalgène de 20 ml dans lequel est ajouté 1 ml de SDS 20% (p/v). Les tubes sont agités vigoureusement puis placés 30 min. au bain marie 65°C. Dans chaque tube 5 ml d'une solution d'acétate de potassium 5M sont ajoutés, le tout est mélangé vigoureusement puis mis 30 min. à 0°C avant d'être centrifugé 30 min. à 10 000 g. Le surnageant filtré sur Miracloth (Calbiochem®) est récupéré dans 10 ml d'isopropanol et placé 30 min. à -20°C. Après centrifugation (30 min., 10 000 g), le culot est séché sous hotte puis repris dans 9 ml de tampon TE 10:1 (Tris 10 mM, pH8 ; EDTA 1 mM) auxquels sont ajoutés 9 g de CsCl et 50 μ l de BET (10 mg/ml). Après ultracentrifugation (15 h ; 55 000 tpm ; 20°C) la bande d'ADN est prélevée sous UV à l'aide d'une seringue de 10 ml, puis placée dans un tube Falcon de 15 ml et rincé plusieurs fois à l'aide de butanol saturé en eau afin d'éliminer le BET. La phase inférieure aqueuse contenant l'ADN est remis dans des tubes Nalgène et 2 vol. d'H₂O et 6 vol. d'éthanol 95% froid y sont alors ajoutés. L'ADN est précipité 15 min. à -20°C puis centrifugé (30 min., 4°C, 10 000 g). Le culot d'ADN est séché et repris dans 100 μ l de tampon TE 10:1 et laissé 24 h à 4°C avant d'être dosé à 260 nm.

2.6.2. Analyse du polymorphisme génétique par amplification aléatoire d'ADN (RAPD)

Nous avons testé 118 amorces aléatoires de 10 paires de bases (Operon™, RAPD Primer KITS, Annexe 3) sur les lots d'ADN des types mutants et sauvages. Pour chaque amplification le même mix est utilisé pour les deux types d'ADN, sa composition est la suivante :

MgCl ₂ 10 mM	1,5 µl
dNTP 10 mM	0,15 µl
Tampon Taq polymérase 10x	1,5 µl
ADN	1,5 ng
Taq polymérase 1:40	1,2 µl
Amorce	0,6 µl

La réaction se fait dans un volume final de 15 µl. Les amplifications sont réalisées simultanément dans le même appareil PCR (Perkin Elmer® 2400) pour une amorce donnée sur les deux lots d'ADN. L'amplification débute par 3 min. à 92°C pour la première dénaturation des brins d'ADN et suivi de 45 cycles comprenant :

- 1 min. à 92°C : dénaturation
- 1 min. à 38°C : hybridation des amorces
- 1 min. à 72°C : élongation

La PCR se termine par une élongation de 8 min. 72°C.

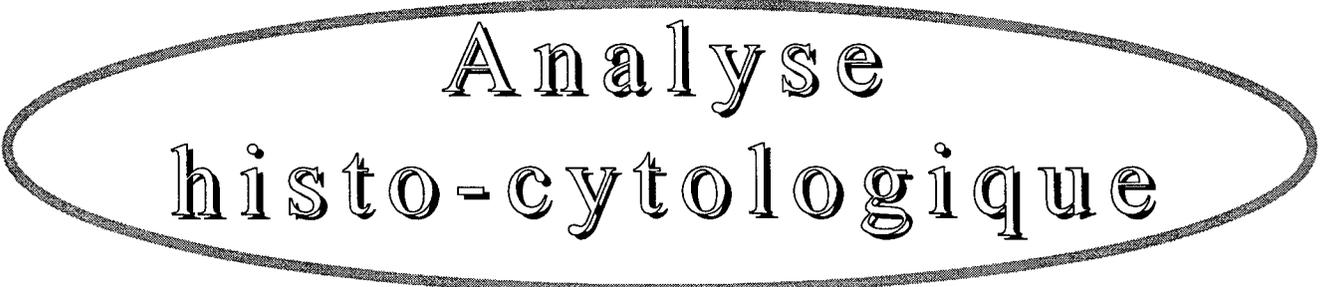
Les produits de PCR sont ensuite séparés sur gels à 0,8% d'agarose, les bandes sont visualisées sur plaque UV grâce à la présence de BET dans le gel.

2.6.3. Analyse du polymorphisme génétique par amplification de fragments d'ADN (AFLP)

Les expériences d'AFLP ont été réalisées par la société Agrogene. L'ADN génomique subit une double digestion enzymatique par *Pst*I et *Mse*I. Des adaptateurs Pst+A et Mse+C sont ligués aux extrémités respectivement digérées par ces enzymes. Une préamplification de l'ADN est réalisée en utilisant des couples amorces Pst+A et Mse+C. Une amplification spécifique est alors effectuée en utilisant 9 amorces correspondant aux séquences Pst et Mse comprenant à leurs extrémités 3' trois bases (Annexe 3). Les 9 amorces permettent de réaliser le test sur 20 couples d'amorces (Pst-Mse). Les produits des amplifications sélectives sont séparés sur gel de séquence.



Résultats



Analyse
histo-cytologique

3.1. Analyse histo-cytologique

3.1.1. De la plante en serre au milieu de culture *in vitro*

3.1.1.1. Plantes en serre et explants mis en culture

La Figure 3 présente deux turions développés sur la griffe d'une plante mutante après rabattage. Les explants mis en culture pour l'étude de l'embryogenèse somatique sont obtenus après dissection des turions sous loupe binoculaire. Sous les écailles qui sont disposées tout le long des turions, se trouvent les apex. Ceux-ci sont découpés en fragment d'environ 1 mm qui sont mis en culture sur milieu gélosé (Figure 4-A et B). L'observation de ces explants sous loupe binoculaire ne fait pas apparaître de différence morphologique entre ceux issus des plantes de type mutant (Figure 4-A) et ceux issus des plantes de type sauvage (Figure 4-B). Ces mêmes explants observés en coupe semi-fine ne montrent pas non plus de différences histologiques. Ces fragments sont constitués d'un ensemble de tissus hétérogènes : des tissus méristématiques constituant les méristèmes végétatifs et floraux et à l'aisselle de ces méristèmes des tissus différenciés forment les écailles qui sont des tissus foliaires modifiés (Figure 4-C).

3.1.1.2. Les milieux de culture d'apex

Nous avons testé 8 milieux de culture différents (Tableau 3), ayant comme base le milieu MSN. Ce test est mis en place afin de déterminer quel milieu permettra d'obtenir une expression homogène de l'embryogenèse somatique, comprenant une répétabilité des pourcentages de réponse et une quantité de cal identique pour les différents explants et ceci entre plusieurs mises en culture. La répétabilité du moment d'apparition des embryons somatiques intervient également comme critère de choix. Pour chaque condition testée 50 explants ont été mis en culture.

Une première expérimentation est réalisée avec un transfert au 7^{ème} jour de culture sur milieu sans régulateur de croissance, les observations ont été réalisées 15, 21 et 30 jours après la mise en culture. Dans ces conditions, il faut attendre deux mois pour que les premiers embryons somatiques commencent à être visibles à la surface du cal qui s'est développé à la base de l'explant primaire. De plus, l'observation comparée des explants montre que la formation de ces embryons est décalée d'un explant à l'autre.

Dans une seconde expérimentation, le transfert sur milieu sans régulateur de croissance est réalisé au 15^{ème} jour de culture (Tableau 3).



Figure 3 : Turions d'une plante d'asperge de type mutant 9 jours après le rabattage. Ecaille (e) ; (barre = 1 cm).

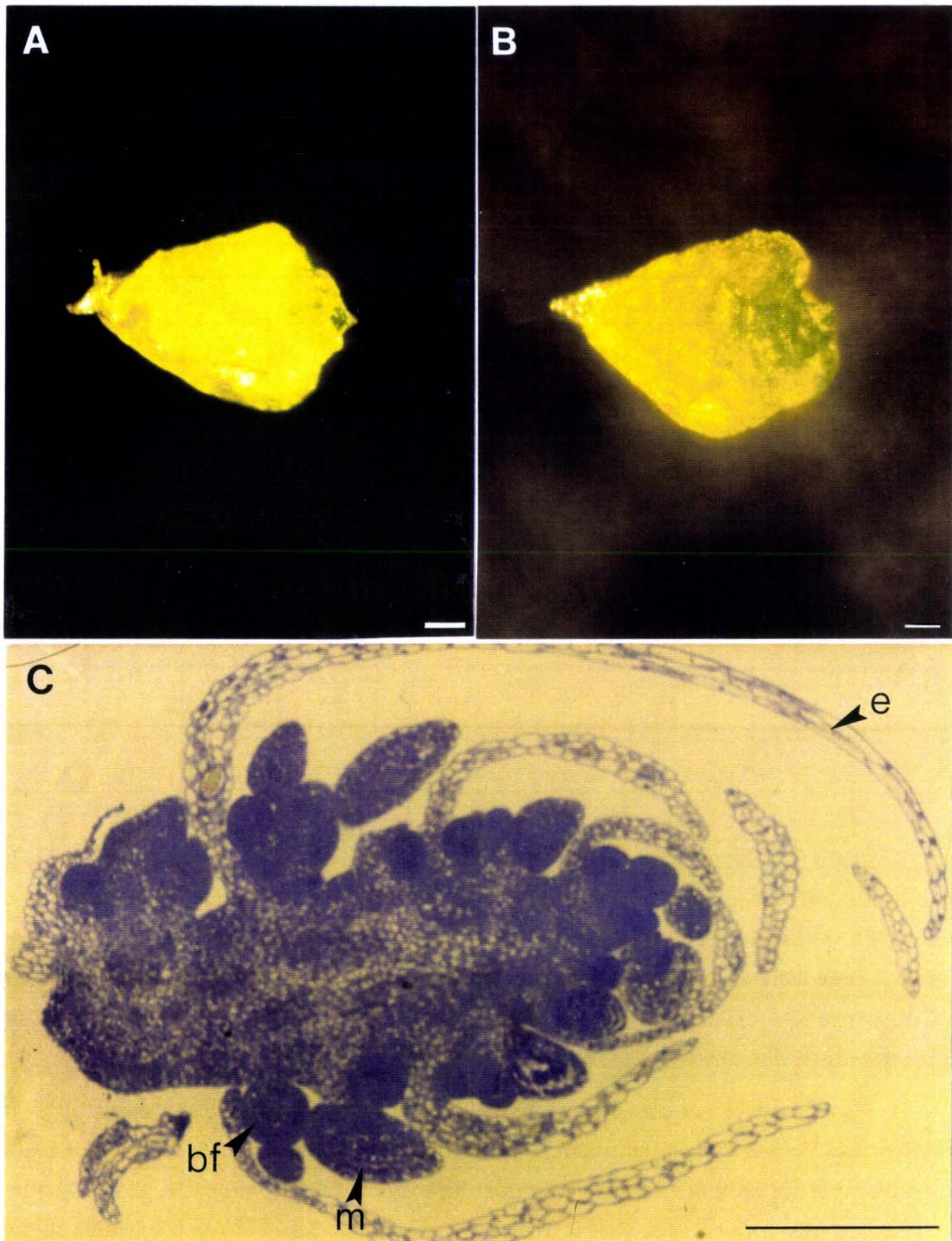


Figure 4 : Macroscopie et microscopie photonique des explants utilisés pour la culture *in vitro*. A/ Apex de plantes de type mutant en vue macroscopique. B/ Apex d'une plante sauvage en vue macroscopique. C/ Microscopie photonique de l'apex d'une plante mutante après coloration au bleu de toluidine. Ecailles (e), méristème (m), bouton floral (bf); (barre = 100 μ m).

Au 15^{ème} jour de culture, nous avons noté la présence ou non de cals. Après 21 jours de culture nous avons observé le pourcentage d'explants donnant un cal à la base. Après 30 jours de culture nous avons chiffré le pourcentage d'explants donnant du cal ainsi que le pourcentage de cals embryogènes. Tous les pourcentages sont exprimés en fonction du nombre d'explants mis en culture.

temps de culture	types de tissus	milieux de culture							
		MSN	ANA	A1 Z 1	A 0,1 K 0,1	A 1 K 0,1	A 0,1 K 1	A 0,1 Z 1	A 0,1 Z 0,1
T15 m s	Cals	+	++	+	+	+	+	++	+
	Cals	0	+	+++	0	++	0	++	++
T21 m s	Cals	9,0 %	20,0 %	1,2 %	0 %	1,0 %	0 %	10,4%	14,6 %
	Cals	0 %	42,0 %	43,0 %	0 %	17,0 %	21,2 %	51,0%	33,0 %
T30 m s	Cals	24,0 %	36,0 %	2,0 %	0 %	0 %	0 %	20,0 %	32,0 %
	C.Emb	20,0 %	36,0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	4,0 %	32,0 %
	Cals	0 %	20,0 %	24,0 %	0 %	30,0 %	22,0 %	34,0 %	42,0 %
	C.Emb	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Tableau 3 : Résultats des tests de différents milieux de culture après 15, 21, 30 jours de culture des explants issus de plantes de type mutant et sauvage. Pas de cal (0), volume faible (+), volume moyen (++), volume important (+++). Fréquence (%) des explants callogènes (Cals) « mutants » (m) et « sauvages » (s), Fréquence de cals embryogènes (C.Emb) « mutants » (m) et « sauvages » (s), composition des milieux de culture (Annexes 1)

Sur les explants prélevés à partir des plantes de type mutant et cultivés sur milieu MSN, des cals apparaissent après le 15^{ème} jour de culture. Ceux-ci ne sont visibles que sur 24% des explants mis en culture au bout de 30 jours. La grande majorité de ces cals est embryogène (83%) mais ne représentent que 20% des explants mis en culture. Sur ce même milieu les explants provenant des plantes de type sauvage meurent rapidement puisque les explants sont nécrosés dès le 15^{ème} jour de culture. Aucun cal n'a pu être obtenu dans ces conditions de culture à partir des explants du type sauvage.

Les tissus du mutant cultivés sur le milieu MSN+10 mg.l⁻¹ d'ANA ont développés au 15^{ème} jour de culture des cals de volume moyen. Après 21 jours de culture, 20% des explants ont développé un cal. Ce pourcentage passe à 36% au 30^{ème}

jour de culture et tous ces cals sont embryogènes. Dans ces mêmes conditions, après 21 jours de culture, les tissus de plantes de type sauvage montrent la présence de cal hyperhydrique à leur base pour 42% des explants. Du fait de la mort de nombreux explants, le pourcentage des tissus callogènes chute à 20% après 30 jours de culture et aucun embryon somatique n'est observé sur les cals survivants.

Les milieux A1/Z1 ; A0,1/K0,1 ; A1/K0,1 et A0,1/K1 n'ont pas permis d'obtenir d'embryons à partir des explants du type mutant.

Les tissus du mutant cultivés sur le milieu A0,1/Z1 ont développé des cals de volume moyen au 15^{ème} jour de culture. Après 21 jours de culture, 10,4% des explants ont développés un cal. Ce pourcentage est multiplié par deux au 30^{ème} jour de culture (20%), mais le pourcentage de cals embryogènes ne représente que 4% des explants mis en culture. Certains de ces cals montrent des structures organogènes qui pourraient être des bourgeons. Dans ces mêmes conditions, après 15 jours de culture, 51% des explants issus des tissus de plantes de type sauvage développent, à leur base, un cal formé de cellules hyperhydriques. Ce pourcentage est de 42% après 30 jours de culture et aucun embryon somatique n'est observé.

Les explants issus des plantes de type mutant cultivés sur milieu A0,1/Z0,1 ont développé un volume de cal faible après 15 jours de culture. Après 21 jours de culture, les explants callogènes représentent 14,6% des explants mis en culture. Ce pourcentage augmente à 32% au 30^{ème} jour de culture. A cette date, tous les cals obtenus ont donné naissance à des embryons somatiques qui sont visibles à leur surface. Tous les cals obtenus sont apparus entre le 12^{ème} et le 16^{ème} jour de la culture. Dans ces mêmes conditions de culture, 33% des explants issus des plantes de type sauvage développent des cals. Ces cals se mettent en place au même moment que ceux observés lors de la culture des tissus du mutant mais cessent leur développement après transfert sur milieu dépourvu de régulateur de croissance. Les méristèmes de l'explant primaire mis en culture forment alors des tiges et des cladodes. Les cals ne sont pas hyperhydriques et aucune structure organogène n'est apparue à leur surface.

3.1.1.3. Conclusions sur le choix d'un milieu de culture

Nous utiliserons le milieu A0,1/Z0,1 qui permet, dans les 15 premiers jours de la culture, de disposer d'un système où les deux types d'explants ont le même comportement morphologique. Sur les explants issus des plantes de type mutant, la présence d'un cal est le gage du développement d'embryons somatiques. Il est à noter que le milieu MSN utilisé sans régulateur de croissance permet le développement d'embryons à partir des explants issus des plantes de type mutant. Ceci se fait à des

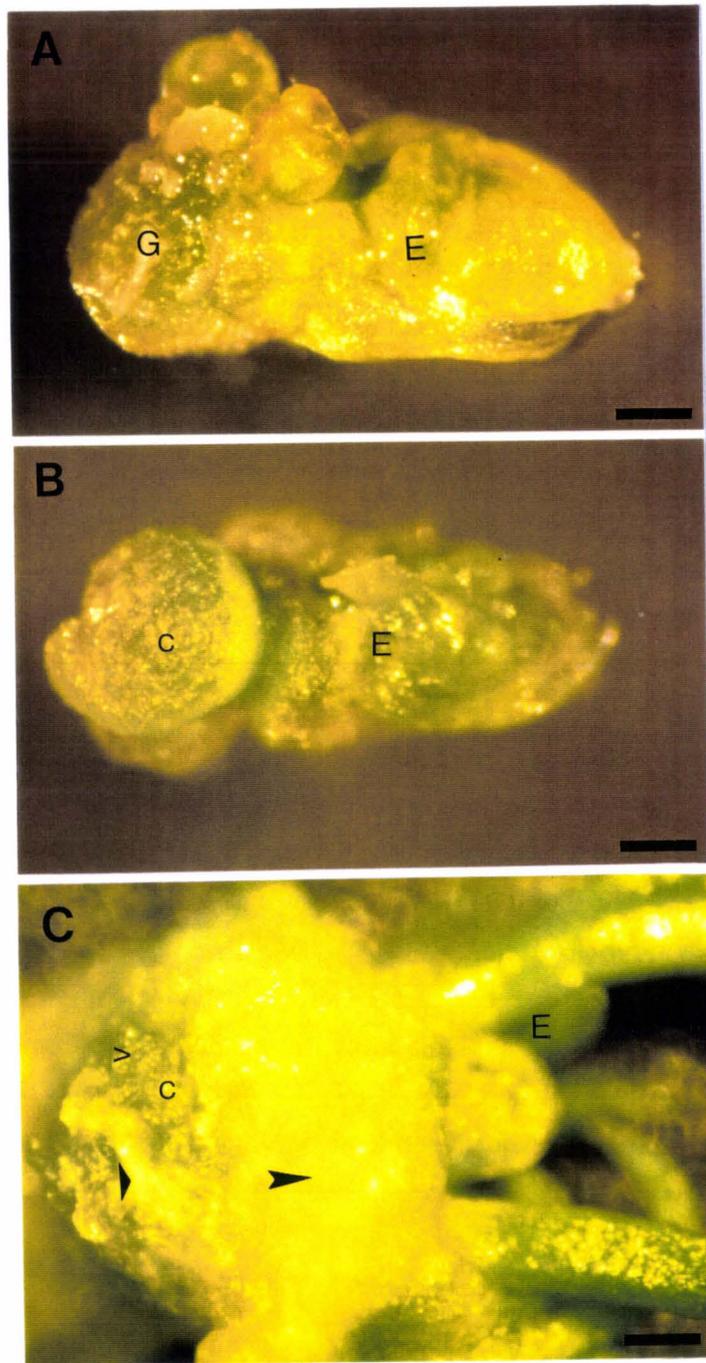


Figure 5 : Etude macroscopique des apex de plantes de type sauvage mis en culture sur milieu MSN contenant $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ de zéatine et $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ d'ANA pendant 15 jours puis transférés sur milieu sans régulateur de croissance A/ Après 9 jours de culture. B/ Après 15 jours de culture. C/ Après 30 jours de culture. Gonflement (G), explant primaire (E), cal (C), partie dense chlorophyllienne (>), partie nécrosée (▴), cal hyperhydrique (▸); (barre = $200 \mu\text{m}$).

pourcentages inférieurs à ceux obtenus sur le milieu A 0,1/Z 0,1. De plus, en l'absence de régulateur de croissance dans le milieu, chaque explant réagit de manière désynchronisé par rapport aux autres. Sur ce même milieu, les explants issus des plantes de type sauvage dégénèrent très rapidement.

3.1.2. Etude morphologique des explants des plantes de type sauvage et de type mutant au cours de la culture

3.1.2.1. *Les explants des plantes de type sauvage*

Après 9 jours de culture sur milieu MSN supplémenté par 0,1 mg.l⁻¹ de zéatine et 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA, un gonflement est visible à la base de l'explant primaire (Figure 5-A). Ce gonflement s'accroît après 15 jours de culture et un cal se met en place (Figure 5-B). Le cal atteint son développement maximal au 18^{ème} jour de culture. Ces cals se composent de parties compactes chlorophylliennes, de cellules hyperhydriques éparses à la surface et de zones blanches de nécrose (Figure 5-C).

Trois jours après transfert sur milieu dépourvu en régulateur de croissance (T18), les méristèmes primaires de certains explants conduisent à la mise en place de tiges et de cladodes. Ce phénomène est généralisable à tous les explants au 30^{ème} jour de culture (Figure 5-C).

Après 30 jours, aucune structure organogène n'est observable à la surface des cals issus des explants primaires prélevés sur les turions des plantes de type sauvage. Des observations, réalisées en microscopie électronique à balayage sur la surface de ces cals confirment les observations macroscopiques.

3.1.2.2. *Les explants des plantes de type mutant*

Après 9 jours de culture sur milieu MSN, supplémenté par 0,1 mg/l de zéatine et 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA, un gonflement est observé à la base de l'explant primaire. Ce gonflement présente des excroissances blanchâtres à sa partie basale (Figure 6-A).

Après 15 jours de culture le gonflement évolue en cal dont la surface paraît s'égaliser (Figure 6-B). Au bout de 30 jours de culture, des embryons somatiques sont nettement visibles à la surface de ce cal (Figure 6-C). Le cal embryogène est devenu l'élément dominant de la culture. Le cal proprement dit reste néanmoins limité. Nous avons en réalité une structure principalement composée d'embryons somatiques. La structure est anergique et produit continuellement des embryons somatiques.

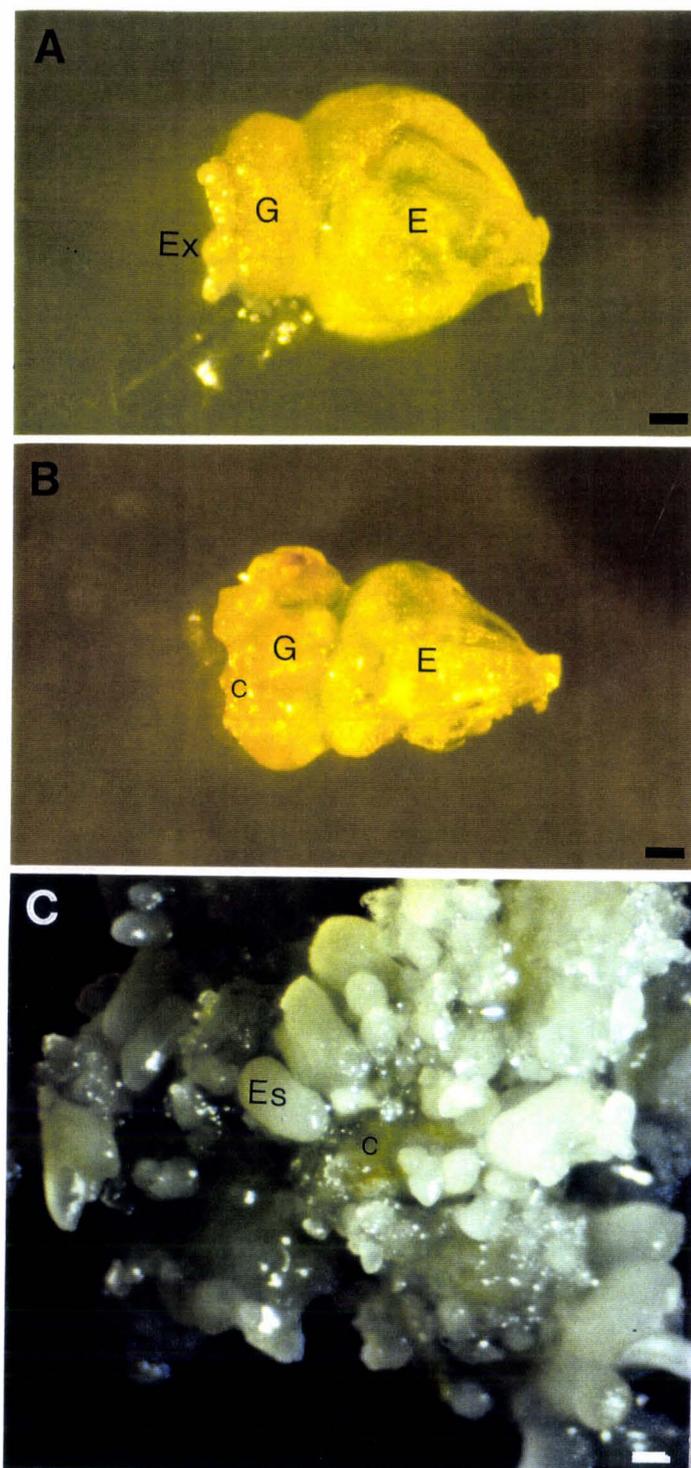


Figure 6 : Evolution des apex mutants mis en culture sur milieu MSN contenant $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ de zéatine et $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ d'ANA, pendant 15 jours puis transférés sur milieu sans régulateur de croissance A/ Après 9 jours de culture. B/ Après 15 jours de culture C/ Après 30 jours de culture. Embryons somatiques (Es), gonflement (G), explants (E), excroissances (Ex), cal (C); (barre = $200 \mu\text{m}$).

Des observations en microscopie électronique de la surface de ces cals ont été réalisées après 30 jours de culture (Figure 7). Ces observations mettent en évidence la présence de structures embryonnaires, à différents stades de développement, cohabitant avec des cellules de cal (Figure 7-A). Les structures embryonnaires sont compactes et se composent de cellules de petite taille (Figure 7). Un réseau extracellulaire est présent autour des plus jeunes embryons somatiques (globulaires). Il est composé de microfibrilles qui relient les cellules embryonnaires entre elles. Tout au long de ces microfibrilles des formations globuleuses sont repérables (Figure 7-B).

3.1.3. Etude histologique des explants des plantes de type sauvage et de type mutant au cours de la culture

3.1.3.1. Etude en microscopie photonique des explants des plantes de type sauvage

Les coupes semi-fines réalisées au 9^{ème} jour de culture dans le gonflement à la base des explants issus des plantes de type sauvage montrent que la majorité des cellules internes possèdent un noyau sphérique pariétal et une large vacuole (Figure 8-A). Peu d'entre elles contiennent des granules d'amidon. Des massifs de cellules méristématiques sont localisés à la périphérie du gonflement (ZP). Dans la zone centrale (ZC) du gonflement, ces cellules se présentent sous forme d'empilement. Celles-ci ont une longueur d'environ 15 µm, un cytoplasme dense occupant toute la cellule, un noyau d'environ 5 µm associé à un nucléole occupant la moitié de son espace (environ 2,5 µm). Entre les cellules, nous observons un mucilage se colorant positivement au réactif de Schiff.

Au 15^{ème} jour de la culture, un cal s'est mis en place à la base de l'explant. Ce cal a la même structure que celle rencontrée lors de coupes réalisées au 18^{ème} jour de la culture (Figure 8-B). Les cellules de ce cal possèdent les mêmes caractéristiques de taille que les cellules méristématiques décrites au 9^{ème} jour de culture. Pour certaines de ces cellules, le noyau a tendance à se centraliser et le cytoplasme devient trabéculaire. Des divisions cellulaires sont observées à l'intérieur de ce cal mais aucune structure organisée n'a été mise en évidence. A la périphérie de ces cals, des cellules vidées de leur contenu cytoplasmique se sont détachées et sont isolées du reste du tissu.

3.1.3.2. Etude histologique des explants des plantes de type mutant

Après 9 jours de culture, les explants issus des plantes de type mutant présentent un gonflement à leur base. Des coupes réalisées dans ces tissus montrent que

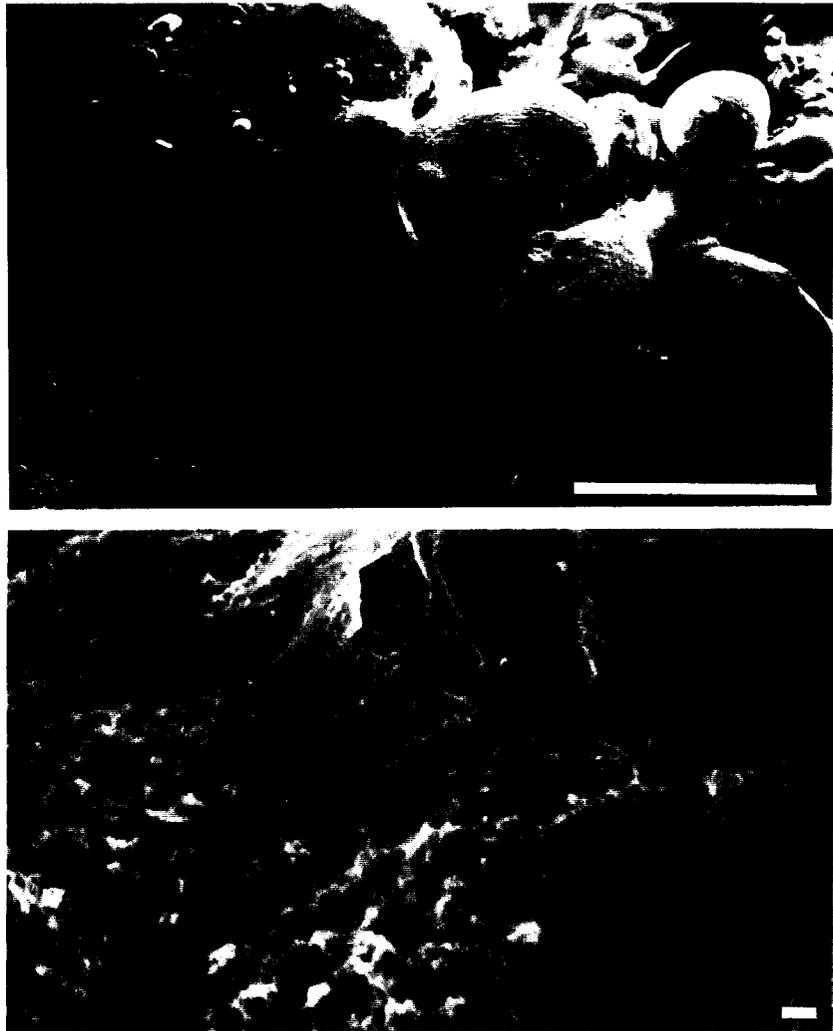


Figure 7 : Microscopie électronique à balayage de la surface des cals issus des explants primaires provenant des plantes de type mutant A/ Surface en plan large; (barre = 1 mm). B/ Observation du réseau extracellulaire (Rec) reliant les cellules des embryons somatiques (CEs); (barre = 10 μ m).

ce gonflement présente des excroissances dans lesquelles de nombreuses cellules méristématiques sont observables. Ces cellules ont les mêmes caractéristiques de taille que celles observées dans les explants du type sauvage à la même date. Elles s'en différencient par leur forme qui est plus arrondie qu'allongée. De nombreux granules d'amidons sont visibles, aussi bien dans les cellules méristématiques que dans les cellules parenchymateuses du cal. Ces dernières possèdent une large vacuole et les granules d'amidon sont localisés près de la paroi alors que dans les cellules méristématiques ces granules amylicés se retrouvent à proximité du noyau (Figure 9-A).

Après 15 jours de culture, nous observons des cellules qui ont une taille moyenne plus importante (26 μm) que les cellules méristématiques précédemment décrites. Elles se caractérisent par un nucléole actif (3,7 μm en moyenne) associé à un noyau central très volumineux (8,9 μm). Le contenu cytoplasmique est dense, la vacuole est fragmentée et des trabécules cytoplasmiques sont observées. Ces cellules possèdent une paroi épaisse (1,5 μm) et sont, en général, détachées des tissus du cal proprement dit (Figure 9-B). Ces cellules répondent aux critères définis pour les cellules embryogènes. Au même stade, des massifs de cellules sont observés (Figure 9-B). Ces ensembles ont approximativement la même taille que les cellules embryogènes et sont entourés d'une paroi épaisse réagissant au réactif de Schiff (Figure 9-B), ils correspondent à des proembryons. Les cellules embryogènes et les proembryons sont tous deux localisés à la périphérie du cal. L'espace intercellulaire est comblé par un mucilage coloré en rose par le réactif de Schiff (Figure 9-C).

3.1.4. Discussion et conclusions de l'analyse cytologique

Nous n'avons pas observé de différence morpho-cytologique entre les tissus des plantes de type mutant et de type sauvage au moment de la mise en culture. Par contre ces tissus réagissent différemment aux conditions de culture testées. Nous avons utilisé 8 milieux de culture, 7 contiennent de l'auxine en mélange, ou non, avec des cytokinines, le 8^{ème} ne contenant aucun régulateur de croissance. Si l'auxine utilisée est toujours l'ANA la quantité de ce régulateur change. Quant aux cytokinines, il s'agit soit de la zéatine soit de la kinétine.

L'utilisation de la kinétine ne permet pas d'obtenir d'embryogenèse à partir des tissus du mutant alors que les milieux contenant de la zéatine ont tous permis une embryogenèse somatique. La nature des cytokinines utilisées est donc importante. Dans de nombreux cas cités dans la littérature, c'est le rapport auxine/cytokinine qui détermine soit une organogenèse soit une embryogenèse. Dans le cas de l'asperge, les cals issus des tissus du mutant ne produisent que des embryons quel que soit le rapport testé. Néanmoins, le pourcentage de réponse embryogène varie en fonction des doses de

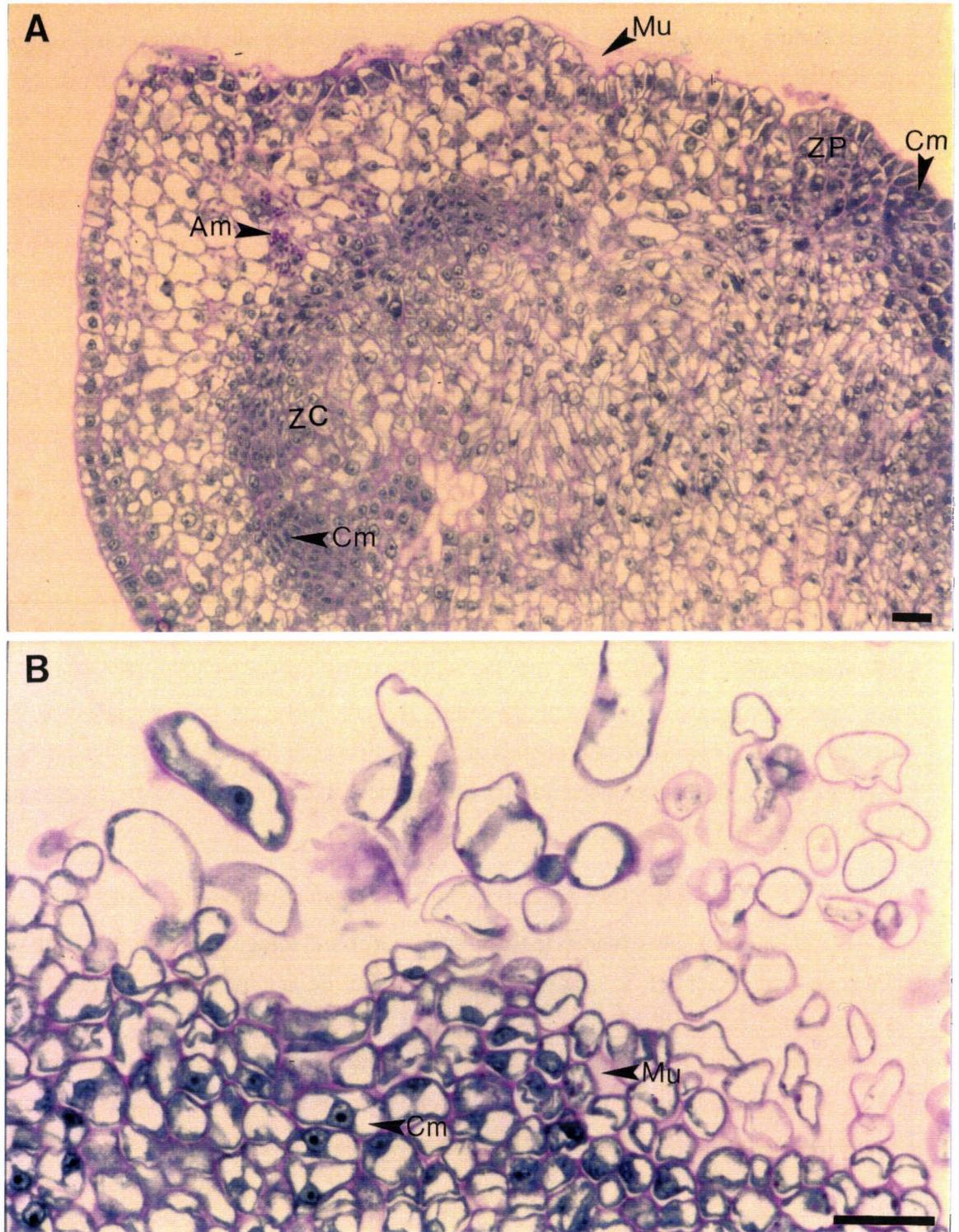


Figure 8 : Microscopie d'apex des plantes de type sauvage. Culture sur milieu MSN contenant $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ de zéatine et $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ d'ANA pendant 15 jours puis transfert sur milieu sans régulateur de croissance. A/ Après 9 jours de culture. B/ Zone externe du cal après 18 jours de culture. Zone Centrale (ZC), Zone périphérique (ZP), Mucilage (Mu), Amidon (Am), Cellules méristématiques (Cm); (barre = $20 \mu\text{m}$).

régulateurs dans le milieu. Pour un rapport auxine/cytokinine égal à 1 mais avec des doses de 1 mg.l^{-1} de chacun des régulateurs de croissance la réponse embryogène est nulle alors qu'avec des doses plus faibles ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de chaque régulateur) la réponse embryogène est importante. Avec des doses d'ANA équivalentes, le milieu contenant de faibles doses de zéatine ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ contre 1 mg.l^{-1}) donne les meilleurs résultats. Il semble donc que la zéatine ait un faible effet inhibiteur sur la capacité embryogène. Dans la plupart des cas les cytokinines sont citées comme ayant une action positive sur les phénomènes d'organogenèse, ce qui n'est pas le cas dans les tissus de l'asperge (mutant ou sauvage) aux doses utilisées. Néanmoins, chez *Helianthus annuus*, la zéatine stimule l'embryogenèse somatique (Charrière et Hahne, 1998). L'effet inhibiteur de la zéatine semble confirmé par le fait que le milieu le plus favorable à l'embryogenèse est celui qui n'en contient pas et qui ne possède que de l'ANA. Néanmoins, le milieu contenant de la zéatine a été retenu pour nos études (ANA et zéatine $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) puisque celui-ci permet d'obtenir le développement d'un cal sur les explants issus des plantes de type sauvage. Ceci n'étant pas possible en l'absence de zéatine. Ce milieu n'induit par contre aucune organogenèse sur ces mêmes tissus.

Nous possédons donc un système d'embryogenèse indirecte puisqu'il y a formation d'un cal à partir des explants des plantes de type mutant avant la formation des embryons. Ce cal peut être comparé à celui formé par le témoin non embryogène issus des plantes de type sauvage, qui ne donne pas d'embryon somatique.

Dès le 9^{ème} jour de culture, un gonflement s'observe à la base des explants des deux types de tissus. L'analyse cytologique montre que leur constitution diffère. Les deux gonflements semblent liés à la dédifférenciation des cellules du parenchyme qui sont redevenues méristématiques. Néanmoins, la position de ces massifs méristématiques n'est pas équivalente dans les deux cas. La position des cellules initiatrices du cal peut avoir une importance dans la définition des futures capacités embryogènes de ce cal. Dans les tissus non embryogènes de maïs, le cal se forme de manière interne alors que le cal embryogène se forme de manière externe (Bronsema *et al.*, 1997). Lors de l'embryogenèse somatique du *Musa sp.*, il a été démontré que les cals embryogènes apparaissent à la base de l'explant et que ce cal est constitué de cellules méristématiques qui donnent des embryons à sa périphérie (Navarro *et al.*, 1997). Dans le cas de l'asperge, des observations similaires sont réalisées puisque les cellules méristématiques des tissus du mutant se situent à la périphérie du cal tandis que dans les cals issus des tissus du type sauvage, elles sont principalement internes.

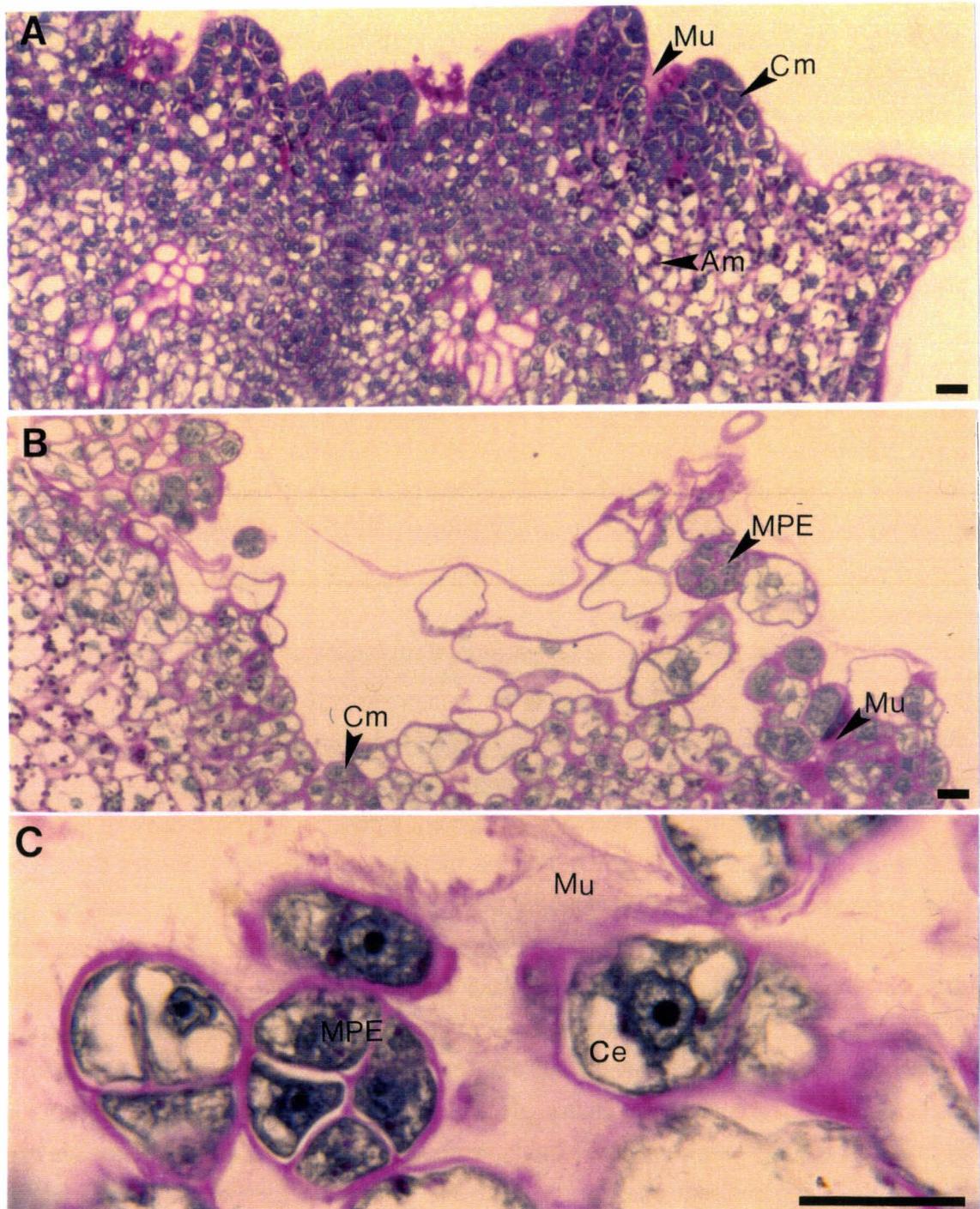


Figure 9 : Microscopie d'apex des plantes de type mutant. Culture sur milieu MSN contenant $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ de zéatine et $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ d'ANA. pendant 15 jours puis transfert sur milieu sans régulateur de croissance. A/ Après 9 jours de culture. B/ Zone externe du cal après 15 jours de culture. C/ Présence de proembryons et de cellules embryogènes (Ce) dans la zone externe du cal. Mucilage (Mu), amidon (Am), cellules méristématiques (Cm); (barre = $20 \mu\text{m}$).

Pour certains auteurs, l'accumulation d'amidon est l'achèvement de la différenciation embryogène. Cette accumulation survient dans les cellules embryogènes lors de l'embryogenèse directe (Tétu *et al.*, 1987; Cabasson *et al.*, 1995), mais aussi dans les cellules des cals embryogènes développés lors du processus d'embryogenèse somatique indirecte (Michaux-Ferrière et Schwendiman, 1992; Rout *et al.*, 1998). Dans notre cas, au 9^{ème} jour de culture, les gonflements obtenus à la base des deux types (mutant, sauvage) de tissus mis en culture présentent des cellules contenant de l'amidon, cependant, le nombre de cellules contenant des granules d'amidon est plus important dans les tissus embryogènes. Par ailleurs, au sein des différents types cellulaires, parenchymateux et méristématiques, la localisation de granules d'amidon est différente. Dans les cellules parenchymateuses, l'amidon se positionne en périphérie de la cellule, à proximité de la paroi alors que dans les cellules méristématiques il se localise autour du noyau. Avec le développement des cals, la différence des contenus en amidon s'accroît entre les deux types de tissus. Les cals développés à partir des explants du type mutant contiennent, au final, plus d'amidon que les cals issus des explants des plantes de type sauvage. La position des réserves dans la cellule et la quantité importante d'amidon dans le tissu pourraient donc être un indicateur des capacités embryogènes du cal issu des plantes de type mutant. Des coupes réalisées aux 12^{ème}, 13^{ème} et 14^{ème} jour de la culture nous ont permis de faire les mêmes observations qu'au 9^{ème} jour. Seule la quantité de cal à la base de l'explant augmente entre ces dates.

Après 15 jours de culture, nous observons la présence de trois types cellulaires dans les tissus issus des plantes de type mutant. Le premier est constitué par des cellules isodiamétriques à vacuole unique occupant la totalité du volume de la cellule. Ces cellules sont caractéristiques des cals. Le second concerne des cellules localisées de manière plus externe dans le cal, elles possèdent un cytoplasme dense, une paroi fine, de nombreuses vacuoles et un noyau central. Ces cellules sont des cellules dédifférenciées de type méristématique. Le troisième type cellulaire concerne des cellules localisées dans la partie désorganisée (externe); ces cellules sphériques à cytoplasme dense dont la vacuole est fragmentée possèdent un noyau central et un nucléole très volumineux. La paroi de ces cellules est épaissie par un composé de type polysaccharidique coloré en rose par le réactif de Schiff. Ces cellules répondent à la définition couramment employée dans de nombreux modèles d'embryogenèse somatique directe ou indirecte pour décrire des cellules embryogènes (Buvat, 1944; Michaux-Ferrière et Schwendiman, 1992; Blervacq *et al.*, 1995; Laparra *et al.*, 1997). L'épaississement pariétal de telles cellules a déjà été décrit par ailleurs (El Maâtaoui *et al.*, 1990; Pedroso *et al.*, 1995); il permettrait l'isolement de la cellule et l'expression de sa totipotence (Décout, 1998). Dans le cas de l'asperge, cet isolement est accentué par la détérioration de la zone périphérique des cals

et c'est particulièrement dans cette zone que se forment les premiers embryons somatiques. Néanmoins, l'isolement n'est pas l'unique facteur nécessaire à l'apparition d'embryons somatiques puisque le cal provenant des tissus des plantes de type sauvage se déstructure à sa périphérie sans pour autant donner naissance à des embryons somatiques.

Des proembryons sont observés au 15^{ème} jour de culture. Ces structures proviennent du reclouonnement de cellules embryogènes décrit par Vasil et Vasil en 1982. Par ailleurs, l'étude en microscopie électronique à balayage de la surface de ces structures montre qu'un réseau fibrillaire relie les cellules entre elles. Ce réseau extracellulaire, de nature polysaccharidique chez la chicorée « 474 » (Dubois *et al.*, 1991), est observé dans de nombreux modèles pendant les stades précoces (globulaire) de l'embryogenèse somatique. Chez l'asperge, comme dans d'autres modèles il disparaît lors du développement des embryons (Sondahl *et al.*, 1979; Nakamura *et al.*, 1992; Samaj *et al.*, 1995).

Chez l'asperge, l'origine de l'embryogenèse somatique est indirecte mais unicellulaire à l'inverse de certains systèmes indirects (*Pennisetum americanum*, Vasil, 1982; *Hevea brasiliensis*, Michaux-Ferriere *et al.*, 1992; *Cicer arietinum*, Sagare *et al.*, 1995). Le modèle indirect unicellulaire servant de référence est la carotte (Toonen *et al.*, 1994). Ce système nécessite un passage obligé par un milieu contenant des régulateurs de croissance puis le retrait de ces régulateurs pour le développement des embryons (Komamine *et al.*, 1992). C'est aussi le cas pour d'autres modèles indirects tels que les conifères (Yeung *et al.*, 1981) ou *Musa* (Navarro *et al.*, 1997). Dans le cas des tissus d'asperge, ce passage n'est pas une nécessité. Les tissus d'asperge du type mutant, cultivés sans régulateur de croissance, sont capables de générer une embryogenèse somatique abondante qui s'auto-entretient pendant plusieurs années (au moins 3 ans).

Cette capacité des tissus du mutant d'asperge que nous étudions, nous amène à définir le terme de « compétence des tissus » à l'embryogenèse. Dans l'introduction, nous avons défini la compétence des cellules comme étant la capacité de celles-ci à répondre à un stimulus qui les fait entrer dans une voie embryogène. De même la compétence des tissus de turions décrit le fait que ces tissus sont aptes à répondre au stimulus qu'est la mise en culture en produisant des embryons somatiques et ceci même en l'absence de régulateur de croissance.

Aux vues des éléments présentés lors de cette discussion, il apparaît que l'embryogenèse somatique chez l'asperge se présente comme un système classique d'embryogenèse somatique indirecte. Cette embryogenèse comporte des événements communs à de nombreux systèmes (amidon, paroi épaissie, formation de proembryons

par reclouement). Par contre, la caractéristique qui fait que ces plantes sont capables de développer des embryons somatiques sans régulateur de croissance et que nous avons appelé « compétence tissulaire » va nous permettre d'avoir accès aux mécanismes d'acquisition de la compétence ainsi qu'à ceux des premiers stades de la mise en place du processus embryogène.

Les comparaisons des observations cytologiques réalisées dans les deux types de tissus (Figure 10) montrent que le modèle mutant/sauvage que nous utilisons, réuni les conditions qui devraient permettre d'accéder à l'information sur les transformations nécessaires à la réalisation du processus embryogène.

Nous utiliserons les stades T0, T12 et T15 pour les analyses de l'expression des protéines dans les deux types de tissus. Le stade T0 nous permet d'accéder aux éventuelles modifications constitutives qu'a pu engendrer le traitement hormonal ayant permis l'acquisition de la compétence des tissus des turions d'asperge à l'embryogenèse. Le stade T12 est situé juste avant l'apparition des premières cellules embryogènes. A ce stade, aucune structure embryogène n'est observée et des cellules méristématiques sont présentes dans les deux cas. Nous supposons que les modifications biochimiques et moléculaires nécessaires au déroulement des premiers événements de l'embryogenèse sont, au moins en partie, réalisées.

Au stade T15, les premiers événements histo-cytologiques du déroulement de l'embryogenèse sont réalisés. Les analyses biochimiques et moléculaires devraient permettre de mettre en évidence les éléments nécessaires à l'induction et à l'évolution de l'embryogenèse somatique qui se sont déroulés avant cette date.

Des stades ultérieurs à T15 n'ont pas été étudiés du fait de la divergence d'évolution que prennent les deux types de tissus, après transfert sur un milieu dépourvu de régulateur de croissance. En effet, alors que les tissus des plantes de type mutant ne présentent que des embryons somatiques et du cal, les explants issus des plantes de type sauvage développent des tiges initiées à partir des méristèmes contenus sur l'explant maternel mis en culture.

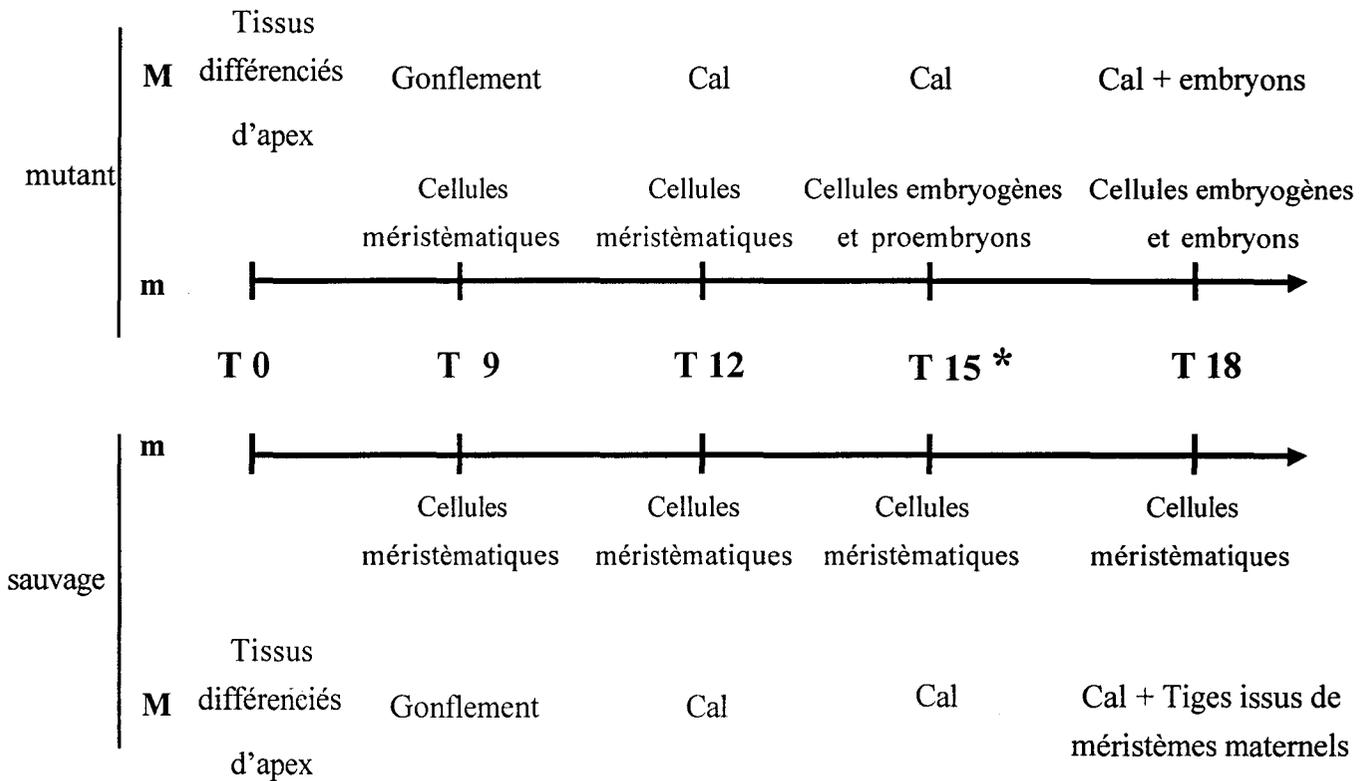


Figure 10 : Récapitulatif des événements successifs se déroulant dans les tissus issus des plantes de type mutant et sauvage au cours de la culture embryogène d'un point de vue microscopique (m) et macroscopique (M). Transfert sur milieu de culture sans régulateurs de croissance (*)

Analyse protéique

3.2. Analyse protéique

3.2.1. Analyse du polymorphisme protéique par électrophorèses bidimensionnelles

3.2.1.1. Stades de l'analyse

Les protéines tissulaires des deux génotypes ont été analysées par électrophorèse bidimensionnelle. Nous avons déterminé 3 stades (T0, T12, T15) pour l'analyse protéique. Dans chacun des extraits protéiques nous détectons des polypeptides dont le pH est compris entre 4 et 9 et les tailles entre 10 à 100 kDa.

3.2.1.2. Détermination des protéines d'intérêt

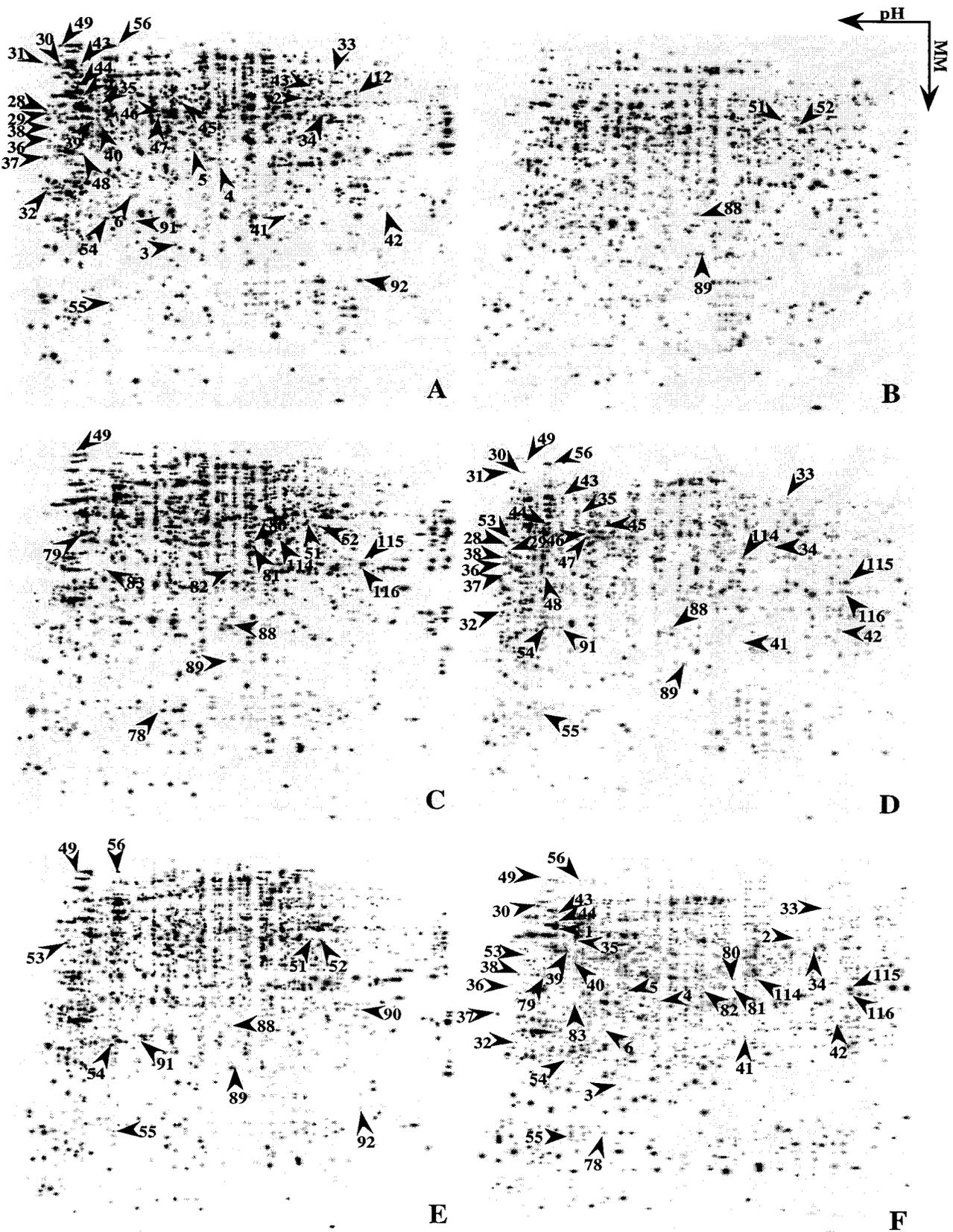
Nous avons comparé les images composites des différents stades de prélèvements des protéines issues des tissus d'apex du mutant (Am). Toutes les comparaisons ont été réalisées sur le principe de la présence ou de l'absence de spots protéiques entre les images composites comparées. La comparaison des images composites T0Am et T12Am a mis en évidence 286 spots différents dont l'expression a été modifiée au cours de la culture. La comparaison des images composites des gels T12Am et T15Am met en évidence des modifications d'expression pour 74 spots protéiques. Soit un total de 360 spots protéiques qui sont modifiés tout au long de la culture d'apex issus des plantes de type mutant.

La comparaison des images composites des profils protéiques provenant des tissus du génotype sauvage (As) au cours de la culture révèle 241 protéines dont l'expression est modifiée entre le départ de la culture (T0As) et le 12^{ème} jour (T12As). Nous mettons aussi en évidence 88 spots dont l'expression varie entre le 12^{ème} jour (T12As) et le 15^{ème} jour (T15As), soit un total de 329 protéines.



Figure 11 : Cinétique de l'accumulation différentielle des protéines des groupes 1, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 20 au cours de la culture d'apex des asperges du type mutant (A, C, E) et du type sauvage (B, D, F). Les protéines sont positionnées sur les images de synthèse des gels bidimensionnels réalisés à partir des extraits protéiques totaux, aux différents jours de culture étudiés : T0 (A, B), T12 (C, D) et T15 (E, F).

Figure 11



3.2.1.2.1. Protéines dont l'accumulation est modifiée différemment dans les deux types de tissus

Les comparaisons menées entre les gels T0Am-T0As, T12Am-T12As et T15Am-T15As montrent que sur les 360 spots variants dans les tissus du type mutant et les 329 spots variants dans les profils protéiques des tissus du type sauvage, 271 sont communs aux deux génotypes et présentent la même évolution. Il y a donc 89 spots qui sont modifiés de manière spécifique dans les tissus du mutant et 58 qui ont une évolution spécifique aux tissus du génotype sauvage.

Certains des spots retenus se retrouvent dans les tissus des deux génotypes. Ils sont synthétisés par les deux génotypes au cours de leur culture mais montrent des modifications temporelles de leur expression dans chacun des cas. Ainsi, 48 spots protéiques présentant ce type d'évolution ont été caractérisés (Figure 11) et regroupés en 9 groupes (Tableau 4; groupes : 1, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 20).

Les 27 protéines des groupes 1 et 6 sont présentes à T0 dans les tissus des plantes de type mutant et ont disparu dès le 12^{ème} jour de culture. Parmi ces protéines celles du groupe 6 sont détectées à partir du 12^{ème} jour de la culture des tissus des plantes de type sauvage et celles du groupe 1 seulement au 15^{ème} jour de culture.

La protéine constituant le groupe 7 n'est plus détectée dans les tissus du type mutant au 15^{ème} jour de culture alors qu'elle apparaît au 12^{ème} jour de culture dans les tissus du type sauvage.

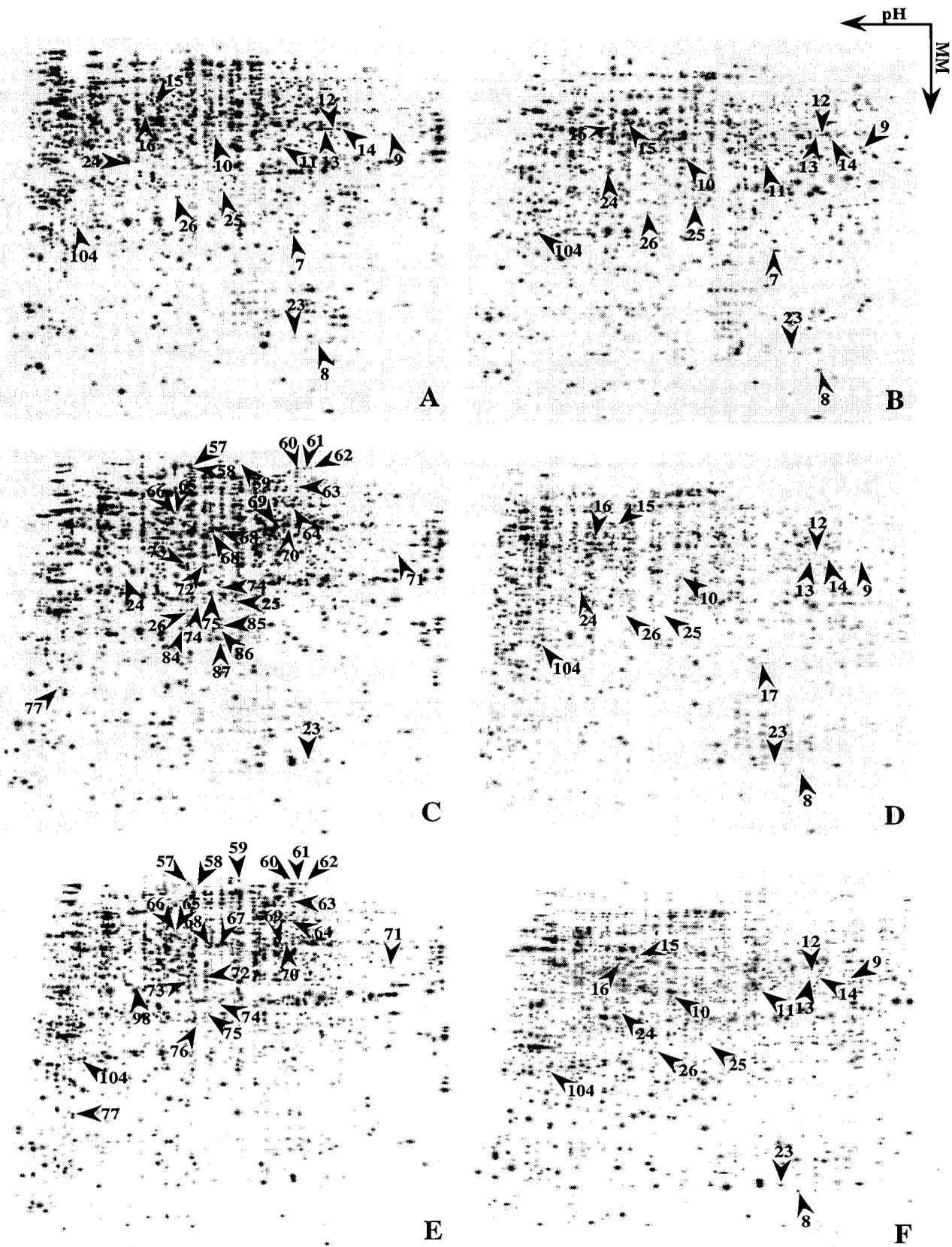
Les 2 protéines du groupe 9 ainsi que les deux du groupe 14 sont révélées au 12^{ème} jour de culture dans les tissus du type mutant alors qu'elles ne sont plus présentes dans les tissus du type sauvage à cette date (groupe 9) ou au 15^{ème} jour (groupe 14).

Les autres groupes (10, 12, 15, 20) comportent des protéines dont l'expression est transitoire au sein des tissus du type mutant ou sauvage. Ainsi nous pouvons distinguer :



Figure 12 : Cinétique de l'accumulation différentielle des protéines des groupes 2, 4, 5, 11, 13, 17 au cours de la culture d'apex des asperges du type mutant (A, C, E) et du type sauvage (B, D, F). Les protéines sont positionnées sur les images de synthèse des gels bidimensionnels réalisés à partir des extraits protéiques totaux, aux différents jours de culture étudiés : T0 (A, B), T12 (C, D) et T15 (E, F).

Figure 12



Résultats : analyse protéique

- des protéines qui ne sont exprimées qu'aux stades T0 et T15 dans les tissus du type mutant. Elles apparaissent au 12^{ème} jour dans les tissus des plantes de type sauvage (groupe 10) ou sont présentes de manière transitoire (T12) dans ces mêmes tissus (groupe 15).

- des protéines qui sont exprimées de manière transitoire dans les tissus du type mutant au stade T12 alors qu'elles sont repérables dans les tissus du type sauvage à partir du 12^{ème} jour de culture (groupe 20) ou au 15^{ème} jour (groupe 12).

3.2.1.2.2. Protéines dont l'accumulation n'est modifiée que dans les tissus des plantes de type mutant

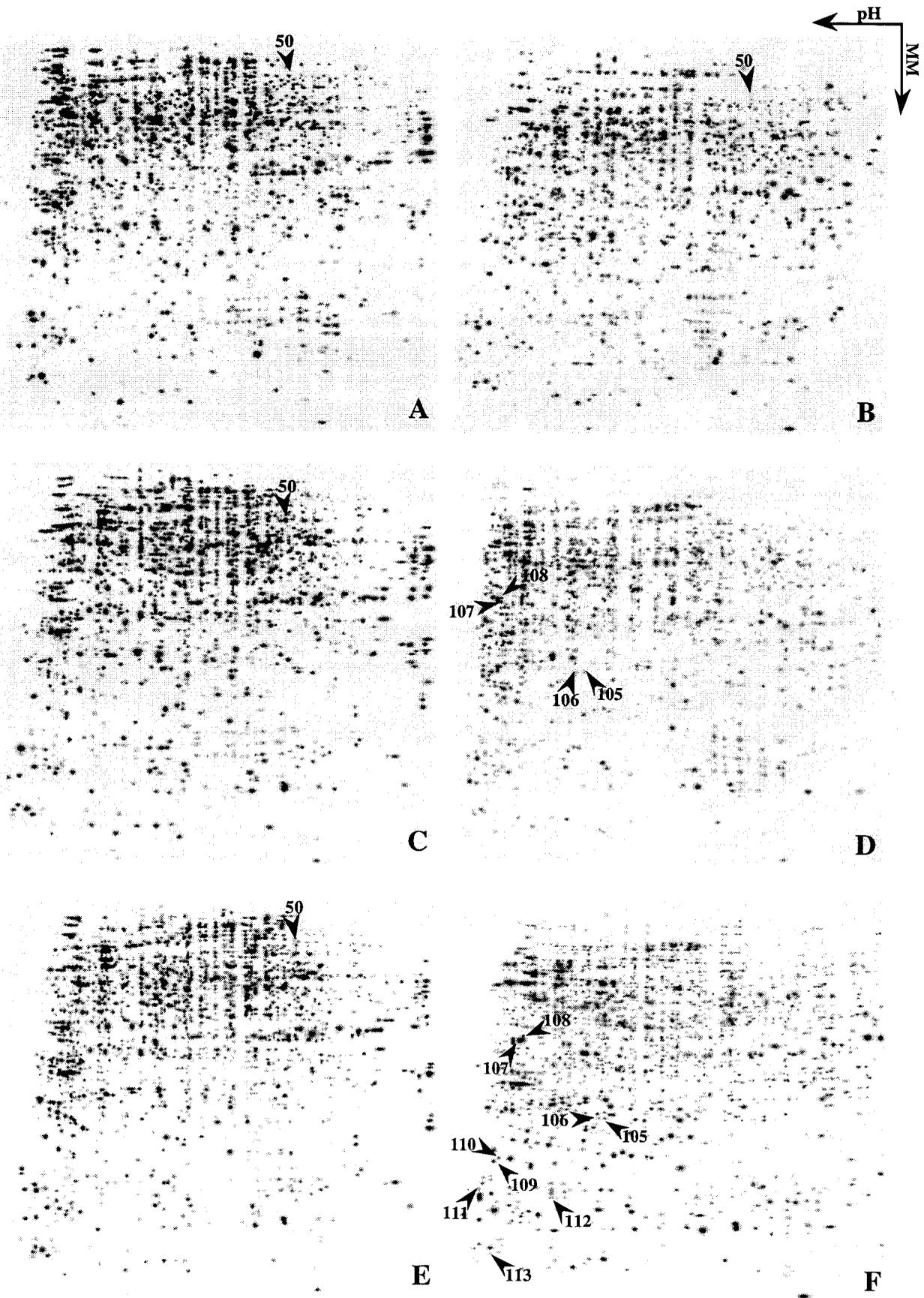
Nous avons pu déterminer 41 protéines dont la synthèse est modifiée uniquement dans les tissus du type mutant au cours de la culture (Figure 12, Tableau 4 ; groupes 2, 4, 5, 11, 13, 17).

Vingt six d'entre elles ne sont jamais retrouvées dans les tissus du type sauvage. Ces 26 protéines sont réparties en 3 groupes, en fonction de leur moment d'apparition ou simplement de leur présence dans les tissus du type mutant. Le groupe 5 est formé d'une seule protéine qui est présente dans les tissus du type mutant au 15^{ème} jour de culture. Le groupe 11 rassemble 21 protéines dont l'expression est repérable au 12^{ème} et au 15^{ème} jour de culture alors que le groupe 13 est constitué de 4 protéines qui ne sont détectées qu'au 12^{ème} jour. Les 15 protéines restantes sont exprimées dans les tissus des plantes de type sauvage de manière constitutive (T0) et constante tout au long de la culture. Elles sont réparties en 3 groupes. Les groupes 2 et 4 comportent 14 protéines qui disparaissent au cours de la culture des tissus du type mutant. Les protéines du groupe 2 ne sont plus détectées à partir du 12^{ème} jour de la culture et celles du groupe 4 à partir du 15^{ème} jour de la culture. La protéine constituant le groupe 17 est caractérisé par une expression qui n'est repérable qu'aux stades T0 et T15 de la culture.



Figure 13 : Cinétique de l'accumulation différentielle des protéines des groupes 8, 18, 19 au cours de la culture d'apex des asperges du type mutant (A, C, E) et du type sauvage (B, D, F). Les protéines sont positionnées sur les images de synthèse des gels bidimensionnels réalisés à partir des extraits protéiques totaux, aux différents jours de culture étudiés : T0 (A, B), T12 (C, D) et T15 (E, F).

Figure 13



3.2.1.2.3. Protéines dont l'accumulation varie dans les tissus du type sauvage et absentes ou exprimées de manière constante dans les tissus du type mutant

Les analyses croisées des gels des protéines totales des tissus du type mutant et du type sauvage nous ont permis de mettre en évidence des protéines dont la synthèse est modifiée dans les tissus des plantes de type sauvage en culture. Ces protéines ne sont jamais retrouvées dans les tissus des plantes de type mutant ou, au contraire, constitutives et constantes dans ces tissus. Nous avons dénombré 10 de ces protéines réparties en 3 groupes (Figure 13, Tableau 4 ; groupes : 8, 18, 19).

Les groupes 18 et 19 renferment des protéines exprimées dans les tissus des plantes de type sauvage au cours de la culture. Les 4 protéines du groupe 18 sont détectées dès le 12^{ème} jour de cette culture et les 5 protéines du groupe 19 sont repérables au 15^{ème} jour de la culture. Les 9 protéines de ces 2 groupes ne sont pas détectées dans les tissus issus des plantes de type mutant. La protéine constituant le groupe 8 n'est observable qu'au moment de la mise en culture des fragments provenant des plantes de type sauvage alors qu'elle est exprimée de manière constante et constitutive dans les tissus des plantes de type mutant en culture.

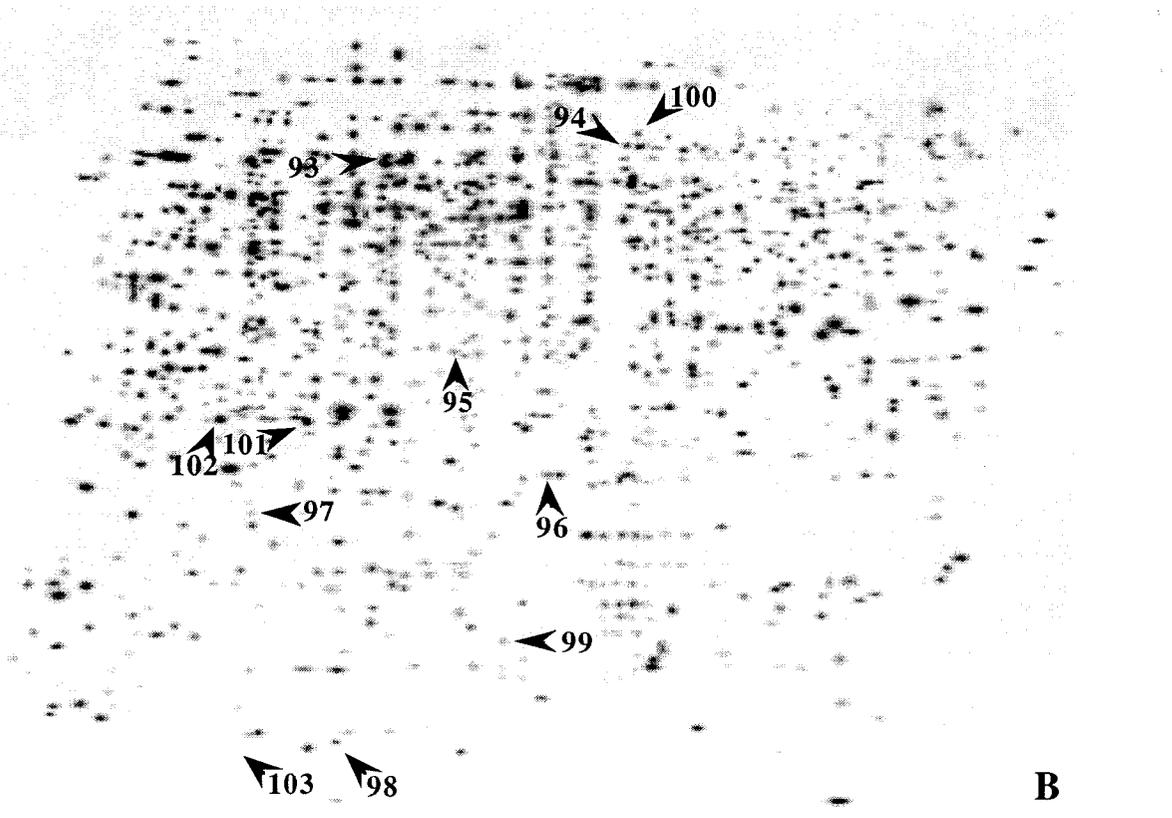
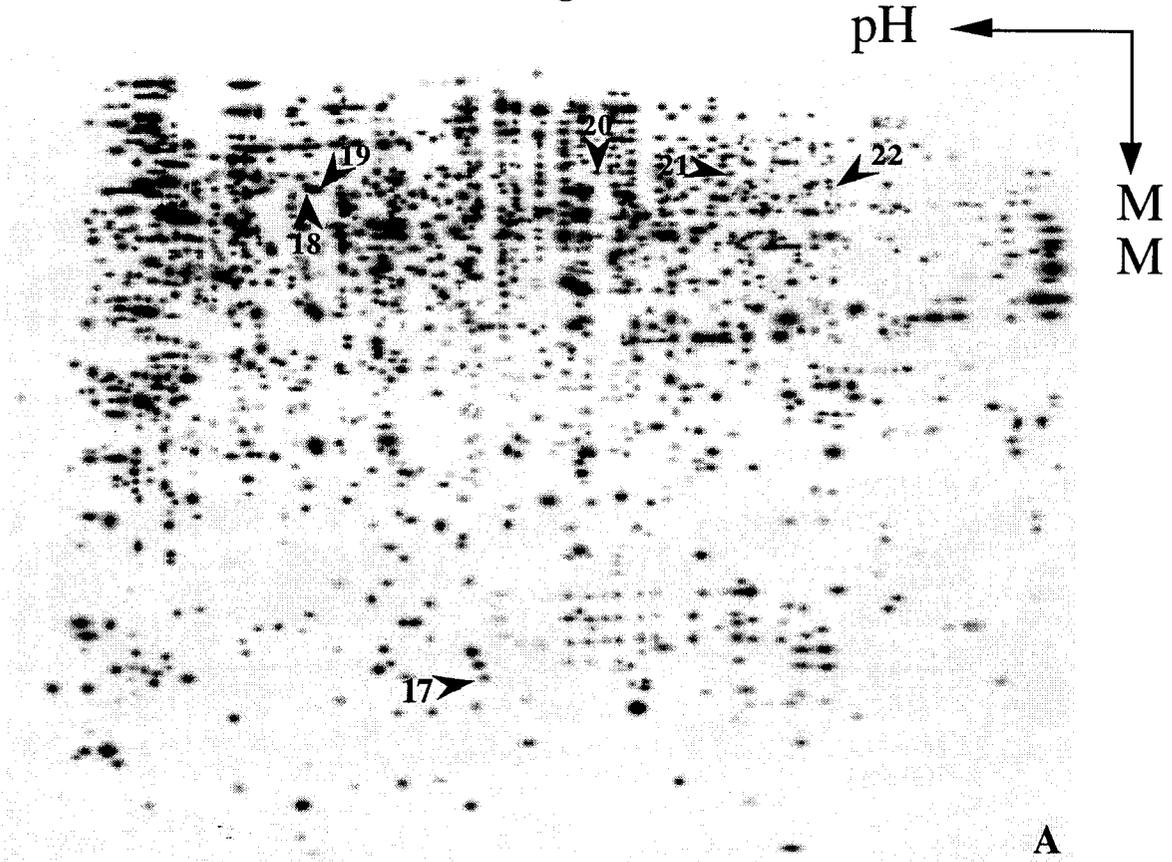
3.2.1.2.4. Protéines constitutives et constantes dans l'un ou l'autre des deux génotypes

La comparaison intergénotype des images des gels bidimensionnels a aussi permis de mettre en évidence des protéines dont l'expression n'est pas modifiée au cours des cultures. Néanmoins, ces protéines ont un intérêt, puisqu'elles ne sont retrouvées que dans l'un ou l'autre des génotypes où elles présentent une expression constitutive. Ces protéines sont au nombre de 6 dans les tissus des explants issus des plantes de type mutant (Figure 14; groupe 3) et de 11 dans les tissus des explants issus des plantes de type sauvage (Figure 14; groupe 16).



Figure 14 : Localisation des protéines des groupes 3 et 16. Les protéines sont positionnées sur les images de synthèse des gels bidimensionnels réalisés à partir des extraits protéiques totaux d'apex du mutant (A) et du sauvage (B) à T0.

Figure 14



Résultats : analyse protéique

grp	type	T0	T12	T15	spot	pI/MM	grp	type	T0	T12	T15	spot	pI/MM	grp	type	T0	T12	T15	spot	pI/MM	
1	m	+	-	-	1	4.5 / 58						40	4.6 / 49	12	m	-	+	-	78	5.1 / 21	
	s	-	-	+	2	6.0 / 60						41	5.9 / 30		s	-	-	+	79	4.5 / 48	
					3	5.1 / 26						42	7.4 / 30						80	5.8 / 47	
					4	5.6 / 38						43	4.4 / 76						81	5.8 / 46	
					5	5.4 / 42						44	4.4 / 65						82	5.6 / 39	
					6	4.8 / 32						45	5.3 / 56						83	4.7 / 38	
2	m	+	-	-	7	6.0 / 29						46	5.3 / 53	13	m	-	+	-	84	5.3 / 30	
	s	+	+	+	8	6.3 / 18						47	5.3 / 51		s	-	-	-	85	5.7 / 31	
					9	7.1 / 51						48	4.7 / 40						86	5.7 / 30	
					10	5.6 / 48	7	m	+	+	-	49	4.2 / 86						87	5.6 / 30	
					11	5.9 / 45		s	-	+	+								88	5.6 / 30	
					12	6.2 / 51	8	m	+	+	+	50	6.0 / 72		s	+	+	-	89	5.6 / 26	
					13	6.3 / 52		s	+	-	-								90	6.9 / 33	
					14	6.4 / 52	9	m	-	+	+	51	6.0 / 54		s	-	+	-	91	4.8 / 29	
					15	5.3 / 61		s	+	-	-	52	6.1 / 53						92	6.5 / 23	
					16	5.3 / 56	10	m	+	-	+	53	4.3 / 52		16	m	-	-	-	93	5.0 / 60
3	m	+	+	+	17	5.4 / 19		s	-	+	+	54	4.6 / 28		s	+	+	+	94	5.8 / 65	
	s	-	-	-	18	5.0 / 60					55	4.7 / 20							95	5.2 / 37	
					19	5.0 / 60					56	4.4 / 91							96	5.6 / 27	
					20	5.8 / 64	11	m	-	+	+	57	5.3 / 86						97	4.6 / 23	
					21	6.1 / 64		s	-	-	-	58	5.3 / 84						98	4.9 / 14	
					22	6.3 / 62					59	5.6 / 89							99	5.4 / 18	
4	m	+	+	-	23	6.2 / 19					60	6.1 / 82							100	5.9 / 67	
	s	+	+	+	24	5.0 / 40					61	6.1 / 82							101	4.6 / 29	
					25	5.7 / 36					62	6.1 / 82							102	4.5 / 28	
					26	5.4 / 32					63	6.0 / 74							103	4.6 / 14	
5	m	-	-	+	27	5.1 / 42					64	6.0 / 64		17	m	+	-	+	104	4.5 / 28	
	s	-	-	-							65	5.4 / 61			s	+	+	+			
6	m	+	-	-	28	4.1 / 57					66	5.4 / 61		18	m	-	-	-	105	5.1 / 28	
	s	-	+	+	29	4.1 / 55					67	5.6 / 55			s	-	+	+	106	5.0 / 28	
					30	4.2 / 76					68	5.6 / 54							107	4.4 / 42	
					31	4.1 / 77					69	6.0 / 56							108	4.5 / 43	
					32	4.1 / 34					70	6.0 / 57		19	m	-	-	-	109	4.3 / 23	
					33	6.2 / 71					71	7.1 / 50			s	-	-	+	110	4.3 / 22	
					34	6.1 / 54					72	5.6 / 44							111	4.2 / 19	
					35	4.6 / 56					73	5.5 / 44							112	4.8 / 19	
					36	4.1 / 46					74	5.7 / 38							113	4.4 / 15	
					37	4.1 / 41					75	5.6 / 36		20	m	-	+	-	114	5.9 / 49	
					38	4.1 / 50					76	5.5 / 34			s	-	+	+	115	7.4 / 44	
					39	4.5 / 52					77	4.5 / 23							116	7.4 / 43	

Tableau 4 : Synthèse de l'analyse des gels bidimensionnels. Les spots sont classés par groupes (grp) en fonction de leur évolution comparée entre les tissus de type mutant (m) et sauvage (s) aux différents jours de culture (T0, T12, T15). Ils sont numérotés de manière systématique et repérés par leur masse moléculaire (MM) et leur point isoélectrique (pI).

3.2.2. Conclusions de l'analyse protéique

La comparaison des gels protéiques bidimensionnels a mis en évidence :

- 48 protéines dont l'expression est commune aux deux génotypes mais varie de manière différente (groupes : 1, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 20)
- 26 protéines dont l'expression varie et qui ne sont retrouvées que chez le type mutant (groupes : 5, 11, 13)
- 9 protéines dont l'expression varie et qui ne sont retrouvées que chez le type sauvage (groupes : 18, 19)
- 15 protéines dont l'expression varie chez le mutant et qui reste constante chez le type sauvage (groupes : 2, 4, 17)
- 1 protéine dont l'expression varie chez le sauvage et qui reste constante chez le type mutant (groupe 8)
- 6 protéines dont l'expression est constante chez le mutant et qui ne sont jamais retrouvées chez le type sauvage (groupe 3)
- 11 protéines dont l'expression est constante chez le type sauvage et qui ne sont jamais retrouvées chez le type mutant (groupe 16)

Soit un total de 116 protéines dont l'évolution de l'expression est regroupée dans le tableau 4 et positionnée sur les images de synthèse des gels bidimensionnels.

Cette analyse permet aussi de constater que des différences dans les protéines exprimées existent dans les explants et ceci dès le stade turion. En effet, au stade T0, 47 protéines sont exprimées dans les tissus des plantes de type mutant et non détectées dans les tissus des plantes de type sauvage au même stade (groupes : 1, 3, 6, 7, 10, 15). De même, 15 protéines sont exprimées dans les tissus des plantes de type sauvage et non observables dans les tissus des plantes de type mutant au même stade (groupes : 9, 14, 16).

3.2.3. Discussion de l'analyse protéique

Les analyses des protéines intratissulaires ont été réalisées pour chaque génotype aux trois stades (T0, T12, T15) établis grâce à l'analyse cytologique. L'analyse protéique n'a pas excédé les 15 premiers jours de la culture. Ceci nous a permis de nous focaliser sur les phases précoces de l'embryogenèse somatique puisque c'est à ce stade que sont visibles les premières cellules embryogènes et les premiers proembryons.

Dans de nombreuses espèces, les profils protéiques restent relativement stables lors du processus embryogène (Ramagopal, 1989; Boyer *et al.*, 1993) et il n'y a que peu de protéines qui aient été identifiées comme associées à l'embryogenèse somatique

(*Pisum sativum*, Stirn et al., 1987; *Dactylis glomerata*, Hahne et al., 1988; *Hordeum vulgare*, Ramagopal, 1989; *Medicago sativa*, Giroux et Pauls, 1996; *Cichorium*, Boyer et al., 1993; Helleboid et al., 1998 et Décout et al., 1998). Dans le cas de l'asperge nous avons observé de nombreux changements sur les profils protéiques au cours de la culture des deux types de tissus. Dans notre étude, les analyses ont été réalisées grâce à l'utilisation de logiciels de traitement d'images qui permettent de traiter la totalité de l'information contenue sur les gels bidimensionnels, contrairement à la majorité des autres études. De plus dans le cas de notre modèle les différences observées se trouvent réparties sur deux types de tissus (mutant et sauvage). Au cours de la culture des tissus issus des types sauvage et mutant, l'analyse de l'évolution des profils protéiques a permis la détection de 116 protéines classées en 20 groupes d'évolutions différentes. Cela nous conduit maintenant à discuter l'existence de groupes potentiellement reliés à la compétence des tissus à l'embryogenèse ou/et aux processus d'embryogenèse somatique.

Ainsi, nous avons défini des critères qui caractériseraient des **protéines impliquées dans la compétence des tissus du type mutant** à développer des embryons somatiques. Pour nous ces protéines doivent :

- être exprimées dès T0, uniquement dans les tissus du type mutant et être maintenues tout au long de la culture puisque le processus d'induction d'embryons somatiques est permanent dans les explants au cours de la culture.

Seules les 6 protéines du groupe 3 répondent à cette définition. Nous pouvons supposer que toutes ou certaines protéines du groupe 3 seraient impliquées dans le fait que les tissus du mutant soient dans un état de compétence permanent à l'embryogenèse. Ainsi, les protéines du groupe 3 sont de bons candidats au titre de marqueurs de la compétence des tissus puisqu'elles sont exprimées de manière constitutive et constante au cours du processus ce qui peut être le reflet de la mutation monogénique dominante qui caractérise la capacité embryogène des tissus du type mutant.

Ensuite, nous nous sommes demandés comment définir des **protéines qui pourraient être qualifiés de marqueurs spécifiques** de la mise en place *in vitro* du processus d'embryogenèse somatique. De telles protéines devraient répondre à un certain nombre de critères (Tableau 5) :

Jours de culture	Evénements cytologiques dans les tissus mutant	m s		m s		m s	
T0	Tissus différenciés	-	-	-	-	-	-
T12	Cm	-	-	+	-	+	-
T15	Cm, Ce, PE	+	-	+	-	-	-
grp.		5		11		13	

Tableau 5 : Evolution (+, -) de protéines du mutant (m) et du sauvage (s), pouvant être des marqueurs de l'embryogenèse somatique. Jour 0 (T0), jour 12 (T12), jour 15 (T15), groupes de protéines (grp) (Tableau 4), cellules méristématiques (Cm), proembryons (PE), cellules embryogènes (Ce).

- apparaît précocement (T12), plus tardivement (T15) ou de manière transitoire (T12), dans les tissus du type mutant au cours du processus d'embryogenèse somatique

- être absentes dans les explants avant leur mise en culture
- ne jamais être détectées dans les tissus du type sauvage

Dans notre étude, des protéines répondent à ce type d'évolution et appartiennent aux groupes 5, 11 et 13. Ces groupes sont constitués de protéines du génotype mutant. Les protéines de ces groupes ne sont pas présentes dans les turions (T0) mais deviennent détectables au cours de la culture embryogène. Aucune de ces protéines n'a été repérée dans les tissus du type sauvage. Si l'on considère l'ordre d'apparition de ces différents polypeptides, les protéines des groupes 11 et 13 pourraient être nécessaires pendant les étapes initiales de l'induction de l'embryogenèse somatique. Les protéines du groupe 11 seraient maintenues au jour 15 du fait que le processus embryogène est asynchrone, c'est à dire que des embryons somatiques cohabitent avec des cellules embryogènes à ce stade. Les protéines du groupe 5 peuvent être reliées au développement des embryons puisque repérées à partir du 15^{ème} jour, alors que les proembryons sont déjà visibles.

Les protéines de ces trois groupes répondent aux critères de spécificité nécessaires pour être de bons candidats au titre de marqueurs du processus embryogène. Néanmoins, si l'expression de protéines de ces trois groupes peut être nécessaire au déroulement de l'embryogenèse leur accumulation pourrait n'être que la conséquence d'une réaction en cascade nécessaire à la mise en place et au déroulement de l'embryogenèse somatique dans les tissus d'*Asparagus officinalis*. consécutif à la mise en culture; le stress généré par la mise en culture des explants pouvant être assimilé à l'induction nécessaire à l'expression de la compétence des tissus du mutant d'*Asparagus officinalis*.

Nous avons défini des protéines répondant aux critères nécessaires pour quelles soient considérées comme marqueur de la compétence des tissus ou du processus embryogène. Sur le même principe, nous nous sommes demandé si il était possible de définir des critères pour des protéines qui seraient inhibitrices du processus embryogène dans les tissus provenant des plantes de type sauvage. En fait, de telles protéines doivent répondre à des critères plus complexes que précédemment. Des **protéines inhibitrices du processus** peuvent être définies aussi bien dans les tissus du type sauvage que dans les tissus du type mutant et ceci en fonction de leurs évolutions comparées dans chacun de ces tissus. Ainsi, ce type de protéines doit répondre à l'une des définitions suivantes :

- être spécifiquement accumulées ou exprimées de manière constitutive et constante dans les tissus du type sauvage au cours de leur culture (Tableau 6). Les protéines des groupes 16, 18 et 19, spécifiques des tissus du type sauvage, sont accumulées (18, 19) ou constitutives et constantes (16) dans ces tissus. Elles répondent aussi aux critères définis pour être potentiellement inhibitrices de l'embryogenèse somatique au sein des tissus des plantes du type sauvage. La conséquence de la mutation monogénique dominante serait alors, la suppression de l'expression de ces protéines dans les tissus du mutant. Par contre le maintien de l'accumulation de plusieurs (ou d'une seule) protéines de ces groupes dans les tissus du sauvage, rend ces derniers inaptes au déroulement du processus embryogène. La suppression de l'expression des protéines de ces groupes au sein des tissus des plantes de type mutant conduirait à la définition d'une configuration moléculaire de la compétence de ces tissus à l'embryogenèse somatique dès le jour 0 (stade turion).

- être accumulées ou exprimées de manière constitutive et constante dans les tissus du type sauvage et disparaître des tissus du type mutant au cours de la

culture. Lors de notre étude nous avons mis en évidence 5 groupes qui correspondent à l'une de ces évolutions (Tableau 6). Les protéines des groupes 1, 2, 4, 6, 7 disparaissent des tissus du type mutant au cours du processus embryogène alors qu'elles sont accumulées (1, 6, 7) ou constitutives et constantes (2, 4) dans les tissus du type sauvage

Jours de culture	Evénements cytologiques dans les tissus mutant	m s		m s		m s		m s		m s		m s	
		m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
T0	Tissus différenciés	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
T12	Cm	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
T15	Cm, PE, Ce	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
grp.		19		18		16		1		6		2	
		Nm		7		4							

Tableau 6 : Evolution (+, -) de protéines du mutant (m) et du sauvage (s), pouvant être impliquées dans l'inhibition de l'embryogenèse somatique. Jour 0 (T0), jour 12 (T12), jour 15 (T15), groupes de protéines (grp.) (Tableau 4), non mise en évidence lors de l'étude (Nm).

ceci dans les mêmes conditions de culture. Ces types d'évolutions pourraient correspondre à une levée d'inhibition du processus embryogène dans les tissus du type mutant, ce qui permettrait la mise en place des protéines nécessaires au déroulement du processus embryogène. Parallèlement, leur accumulation ou le maintien de leur expression dans les tissus du type sauvage rendrait ceux-ci inaptes à l'embryogenèse.

Dans le cas de l'asperge, l'embryogenèse s'effectue même s'il n'existe pas d'application d'un traitement hormonal sur les apex du type mutant. Parallèlement, les profils protéiques diffèrent entre les deux types de tissus dès le jour de la mise en culture (T0). Nous supposons que cette divergence peut conduire à un état de compétence qui serait le résultat de la mutation monogénique dominante caractérisée par Delbreil et Jullien en 1994. Ce comportement (embryogenèse somatique sans traitement hormonal) est aussi décrit dans d'autres systèmes, en particulier chez *Helianthus annuus* où comme chez l'asperge des explants à fort potentiel embryogène ont été

obtenus à partir de plantes régénérées par embryogenèse somatique indirecte. Les fragments foliaires utilisés expriment dans ce cas une embryogenèse directe, sans passage sur un milieu contenant des régulateurs de croissance (Fambrini *et al.*, 1997).

Ainsi, si les tissus d'asperge sont compétents à l'embryogenèse somatique, des protéines doivent être des marqueurs de cette compétence des tissus du type mutant (groupe 3) ou au contraire de l'absence de compétence des tissus du type sauvage (groupe 16).

En dehors de ces protéines qui pourraient être des marqueurs spécifiques de la compétence, des protéines sont exprimées dans les tissus du type mutant à T0, alors qu'elles sont absentes des tissus du type sauvage à cette date et sont décelées au cours de la culture. Ces protéines sont au nombre de 35 et sont réparties dans les groupes 1, 6, 7, 10 et 15. Une partie (ou l'ensemble) de ces protéines associée à celles du groupe 3 permettent de montrer que le profil protéique des explants issus des plantes de type mutant à T0 est très différent de celui observé dans les tissus des plantes sauvages. Tout ou partie de ce profil, caractéristique des plantes de type mutant, peut être considéré comme la configuration moléculaire minimale nécessaire à la définition d'une compétence à l'embryogenèse somatique des tissus.

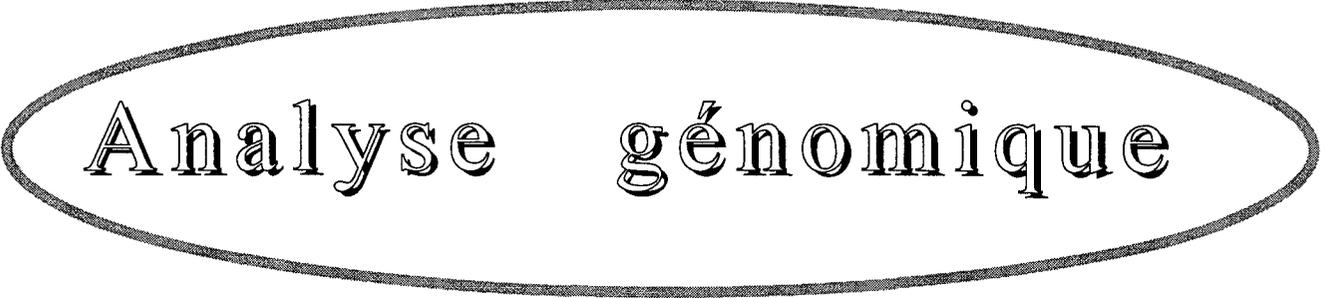
La comparaison des profils protéiques des tissus du type mutant et du type sauvage au cours de la culture embryogène montre que de nombreuses protéines peuvent être impliquées dans le processus. Néanmoins, au terme de la réflexion sur ces résultats, il apparaît que le nombre de protéines directement intéressantes pour l'étude de la compétence des tissus à l'embryogenèse reste limité à 41 : 35 protéines des groupes 1, 6, 7, 10, 15 associées aux 6 qui appartiennent au groupe 3.

Il serait intéressant de pouvoir caractériser ces différentes protéines et en particulier celle du groupe 3, par séquençage. Les tentatives de récupération effectuées sur ces protéines n'ont pas abouties. Nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés. Ces protéines sont souvent proches les unes des autres, les conditions de séparation demandent à être améliorées pour qu'il n'y ait pas de risque d'erreur lors des prélèvements. A l'inverse, certaines de ces protéines se trouvent isolées dans certaines zones du gel mais dans ce cas ce sont les quantités de protéines ou la structure même de la protéine (glycosylation, phosphorylation) qui n'a pas permis de les colorer au bleu de Coomassie ou avec une technique de coloration inverse utilisant un réactif au zinc, ceci a donc empêché leur récupération.

L'analyse protéique permet d'avoir accès à l'information génétique qui s'exprime lors du processus embryogène. Or, dans notre cas, le déterminisme du caractère embryogène est sous le contrôle d'une mutation monogénique dominante. Nous

Résultats : analyse protéique

pouvons donc utiliser une approche qui consiste à tenter d'appréhender cette mutation. Néanmoins, étant donné le traitement initiateur de cette mutation et les multiples cycles de culture, nous pensons que d'autres modifications du génome ont pu intervenir. Pour obtenir cette information nous avons développé les techniques de RAPD et d'AFLP pour la mise en évidence d'un polymorphisme au niveau des ADN des plantes de type mutant et de type sauvage.



Analyse génomique

3.3. Analyse du polymorphisme génomique

3.3.1. Analyse du polymorphisme entre le type sauvage et le type mutant par RAPD

Les tests réalisés sur 118 amorces aléatoires ont permis en moyenne de mettre en évidence 3 bandes majeures par amorce. Au terme de cette série, nous avons retenu 7 amorces permettant de mettre en évidence 3 bandes polymorphes spécifiques de l'ADN du type sauvage et 4 spécifiques de celui du type mutant, ces différences ne portaient cependant que sur des bandes mineures. Lors de la répétition des amplifications à partir de ces 7 amorces, il s'est avéré que les profils des fragments polymorphes n'étaient pas répétés. Ainsi, par la technique de RAPD il ne nous a pas été possible de mettre en évidence de façon certaine un polymorphisme génétique entre les deux types de plantes.

3.3.2. Analyse du polymorphisme entre le type sauvage et le type mutant par AFLP

Les 20 couples d'amorces qui ont été testés sur les ADN des plantes de type sauvage et de type mutant ont permis d'obtenir 1433 bandes sur gel de séquence à raison de 716 bandes obtenues à partir de l'ADN des plantes de type mutant et 717 bandes à partir de l'ADN des plantes de type sauvage. Ces bandes ont une taille comprise entre 60 et 700 pb. Sur les 20 couples, 12 ont permis de mettre en évidence 19 fragments polymorphes. Neufs de ces fragments sont spécifiques du génome des plantes de type mutant et les 10 autres du génome des plantes de type sauvage (Tableau 7). Au total ces différences représentent environ 1,3 % des fragments obtenus lors de l'analyse AFLP.

3.3.3. Discussion des résultats

Nous avons commencé par mettre en œuvre l'analyse par RAPD du fait de la simplicité avec laquelle celle-ci peut être réalisée puisqu'elle ne nécessite pas de digestion de l'ADN génomique et que les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose. De plus, cette méthode avait déjà fait ces preuves dans d'autres études sur le polymorphisme et ceci en utilisant un nombre faible d'amorce. Nous pouvons citer les études réalisées par Hashmi *et al.* en 1997, qui portaient sur l'analyse génétique de variants somaclonaux provenant de cal embryogène de pois. Dans leur cas, le test de 60

Amorces	Taille des bandes	Type d'explant
P31M47	147 pb	sauvage
P31M48	372 pb	mutant
P31M49	425 pb	mutant
P31M50	322 pb 118 pb 80 pb	mutant sauvage sauvage
P31M51	330 pb 122 pb	mutant sauvage
P32M49	368 pb 266 pb	sauvage mutant
P33M47	500 pb	sauvage
P33M49	405 pb	mutant
P33M50	390 pb 153 pb	mutant sauvage
P33M51	105 pb 94 pb	sauvage sauvage
P34M47	145 pb	mutant
P34M50	252 pb 108 pb	sauvage mutant

Tableau 7 : Récapitulatif des fragments d'ADN polymorphes mis en évidence par l'analyse AFLP.

amorce a permis de montrer que 10 amorces suffisent pour révéler un polymorphisme entre une plante régénérée à partir d'embryons issus du cultivar « Sunhigh » et la plante mère. De plus, cette technique a permis de cloner des fragments polymorphes après électroélution des bandes des gels d'agarose. Ainsi, la RAPD est l'une des techniques les plus utilisées pour l'identification des espèces et la structuration génétique de populations. Cette méthode permet généralement de générer de nombreux marqueurs qui peuvent être clonés et utilisés comme sonde.

Néanmoins, cette technique a montré deux limites importantes à son utilisation. La première est que deux types de produits d'amplification sont obtenus : des bandes dites mineures et des bandes dites majeures. La répétabilité de l'amplification des premières n'est pas systématique à l'inverse des bandes majeures. La difficulté est donc d'apprécier correctement quelles sont les bandes majeures et mineures. La deuxième limitation de l'utilisation de cette technique est liée aux méthodes de séparation. La ségrégation des fragments sur gel d'agarose n'est pas assez résolutive. L'utilisation de

gel d'acrylamide devrait permettre de séparer un plus grand nombre de produit issus de la PCR (Caetono-Anollés, 1993). La résolution de la technique RAPD est nettement améliorée par le couplage d'une séparation sur gel d'acrylamide avec une révélation argentique des produits d'amplification (Novy et Vorsa, 1995). Dans notre cas, l'application de ce type d'amélioration aurait peut être permis d'avoir une augmentation de la sensibilité de la méthode et ainsi diminuer le nombre de fragments faux positifs.

Lors de la réalisation de cartes génétiques chez *Cucumis melo* L. la technique RAPD s'est montrée moins efficace que la technique AFLP et ceci malgré un nombre plus important de marqueurs mis en évidence. Cette différence s'explique par le fait que la technique AFLP génère un nombre de faux positif nettement inférieur à la technique RAPD (Wang *et al.*, 1997).

La technique AFLP a été développée relativement récemment (Zabeau et Vos, 1993; Vos *et al.*, 1995). Elle est basée sur une double digestion de l'ADN génomique total de l'individu suivi de la ligation d'adaptateurs aux extrémités. L'amplification PCR qui s'en suit se réalise avec des amorces complémentaires des adaptateurs utilisés. Cette technique s'est montrée plus efficace que la technique de RFLP préconisée jusque-là (Marsan *et al.*, 1998) par le fait qu'elle permet d'obtenir un très grand nombre de produits de PCR qui présentent un index de diversité très élevé. Cette technique permet donc dans un temps court et avec l'utilisation d'un nombre limité d'amorces de mettre en évidence un grand nombre de marqueurs moléculaires (Russell *et al.*, 1997). Depuis l'AFLP a été largement utilisée comme outil d'aide à la sélection (Breyne *et al.*, 1997; Gaiotto *et al.*, 1997) mais aussi d'aide à la cartographie du génome (Roupe van der Voort *et al.*, 1997; Castiglioni *et al.*, 1998). Marques *et al.*, en 1998 ont utilisés cette technique pour cartographier deux clones d'*Eucalyptus*. L'utilisation de 30 combinaisons d'amorces sur 90 individus a permis (après élimination des erreurs et profils non reproductibles) de mettre en évidence que le taux d'hétérozygotie était très élevé (20,4%). De même, deux lignées d'*Hordeum vulgare* analysées indépendamment par AFLP montrent un polymorphisme élevé à l'intérieur de chaque lignées puisque compris entre 18 et 28%. Dans ce cas, les auteurs estiment que l'utilisation d'un couple d'amorce est suffisant pour différencier des lignées d'orge (Qi et Lindhout, 1997). Par contre, en 1997 Wang *et al.* après avoir identifié des caractères monogéniques, ont mis en évidence un polymorphisme de 3,9% chez les parents utilisés dans les croisements de sélection du *Cucumis melo*.

Dans le cas de l'asperge, l'analyse a permis de mettre en évidence 1,3 % de divergence entre les 2 types de génomes. Ce pourcentage est faible par rapport à ceux rapportés dans la littérature mais est élevé si l'on considère que la capacité embryogène est définie comme monogénique dominante (Delbreil et Jullien, 1994). Ce pourcentage de

divergence montre clairement que plusieurs mutations se sont réalisées au sein du génome à la suite de la culture *in vitro* en présence de 10 mg.l⁻¹ d'ANA et des fréquentes subcultures. En effet, les concentrations en régulateurs de croissance utilisées dans les milieux de culture *in vitro* peuvent entraîner des variations somaclonales (Skirvin *et al.*, 1994). Ceci ne remet pas en cause le fait que le caractère embryogène soit de type monogénique dominant. Ces modifications n'ont pas forcément toutes des répercussions sur le phénotype de ces plantes. En effet, elles peuvent se situer dans des zones non codantes de l'ADN et n'entraîner aucune modification de l'expression des gènes. Si elles ont une incidence sur le phénotype, elles interviennent sur un caractère qui n'a pas été caractérisé. Dans tous les cas cette multiplicité de modifications va compliquer la recherche de la mutation impliquée dans le caractère embryogène et ceci à tous les niveaux de l'analyse (ADN, ARN, protéines).

L'une des solutions serait donc de réaliser des croisements, en prenant comme critère de sélection le caractère embryogène des plantes. L'utilisation de marqueurs AFLP comme outil d'aide à la sélection permettrait d'éliminer les éléments génétiques qui n'interviennent pas dans le déterminisme du caractère embryogène mais qui montrent un polymorphisme entre les deux types. Cette méthode permettrait de cartographier et de détecter la portion d'ADN mutée correspondant à la mutation monogénique dominante.

Pour Breyne *et al.* (1997), la technique AFLP est une technique efficace pour la mise en évidence de marqueurs moléculaires en nombre important dans un temps court. L'un de ses avantages est aussi de permettre une séparation optimum des fragments sur gels et une récupération directement de ces gels. Ainsi, nous pouvons envisager une approche qui consisterait à cloner des fragments AFLP polymorphes mis en évidence et à les séquencer.

Plusieurs tentatives de récupération des 19 fragments polymorphes ont été menées. Néanmoins, aucune n'a abouti au clonage ni à l'identification d'un fragment. Si cette étape n'a pas été possible ceci est certainement dû à la technique utilisée lors de la mise en place du protocole de coloration argentique. En effet, pour éviter que le gel de séquence réalisé ne se casse au cours des différents traitements, nous avons utilisé tout au long de la coloration un support de papier Whatmann qui a probablement gêné considérablement les différentes étapes de la coloration.

Au cours de ces deux chapitres de résultats, centrés sur les aspects moléculaires (protéine et ADN). Nous avons donc montré que plusieurs mutations sont intervenues sur le génome des plantes de type mutant et que des protéines sont exprimées de

manière spécifique et constitutive dans ces tissus, certaines d'entre elles pouvant nous permettre de caractériser un état de compétence de ces tissus.

Les résultats cytologiques, nous ont par ailleurs permis de montrer que les comportements des deux types de tissus différent en culture *in vitro*, ceux du type mutant développent un cal embryogène alors que ceux du type sauvage meurent. De plus, la réalisation du processus embryogène ne nécessite pas le passage par un milieu contenant des régulateurs de croissance. Cette caractéristique définit des tissus anergiés vis à vis des régulateurs de croissance. La question qui s'est imposée à nous est de savoir quelles sont les modifications intervenues sur la synthèse des régulateurs de croissance endogènes après le traitement initial, pour que ces tissus soient anergiés ? Nous nous attendons à ce que ces deux types de comportement sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance soient le reflet d'une différence du contenu en régulateur entre ces deux types de tissus.

Au vu des résultats des analyses moléculaires, qui démontrent que les tissus des deux types de plantes présentent des différences au stade turion, nous nous sommes donc proposé d'analyser le contenu en régulateurs de croissance à ce stade, dans les deux types de tissus. Nous avons effectué l'analyse des principaux régulateurs de croissance connus pour leurs implications dans le processus embryogène. Nous abordons donc les études des contenus endogènes des trois catégories de régulateurs de croissance que sont l'acide abscissique (ABA), les auxines (AIA) et les cytokinines. Pour ces dernières, nous avons étudié les contenus endogènes des isopentényles et des zéatines.

Analyse des régulateurs
de croissance endogènes

3.4. Analyse différentielle du contenu endogène en régulateurs de croissance entre les plantes des types sauvage et mutant

3.4.1. Dosage de l'acide abscissique

Au sein des tissus des turions de plantes de type mutant, la concentration en acide abscissique libre (ABA) est de 1900 fmol.mg⁻¹MS (Figure 15-A). Cette même forme d'ABA est présente à des concentrations semblables dans les turions des plantes de type sauvage (2100 fmol.mg⁻¹MS). Il en est de même pour la forme liée (ABAGE) puisque la concentration est similaire dans les tissus du type mutant (334 fmol.mg⁻¹MS) à celle des tissus des turions des plantes de type sauvage (280 fmol.mg⁻¹MS). Ainsi, aucune différence significative n'a été observée entre les deux types de tissus pour les deux formes d'ABA étudiées.

3.4.2. Dosage des auxines

Les concentrations d'AIA libres sont très différentes entre les tissus des deux types de plantes (Figure 15-A). Dans les tissus des turions des plantes de type mutant l'AIA libre représente 1200 fmol.mg⁻¹ MS, alors que dans les tissus des plantes de type sauvage la concentration en AIA libre est 3,9 fois plus importante avec 4700 fmol.mg⁻¹ MS. La forme libre de l'AIA représente 30% de l'auxine totale dans les tissus des plantes du type mutant contre 84% dans les tissus des plantes du type sauvage. Par contre, la forme conjuguée, certainement de l'AIA-glycine est plus abondante dans les tissus du type mutant où elle est dosée à 2800 fmol.mg⁻¹ MS contre 878 fmol.mg⁻¹ MS dans les tissus des turions des plantes du type sauvage. Ainsi, la forme conjuguée représente 70% des auxines dosées dans les tissus du type mutant contre 16% dans les tissus des plantes du type sauvage. Si nous considérons la somme des concentrations des deux formes d'auxines respectives dans les deux types de tissus, la quantité d'AIA présente est nettement supérieure dans les tissus des plantes du type sauvage (5578 fmol.mg⁻¹MS contre 4000 fmol.mg⁻¹ MS) et elle se présente principalement sous forme d'auxine libre. La différence des concentrations totales en auxines dosées entre les deux types de plantes est de 1,4 fois en faveur des tissus des turions des plantes du type sauvage.

3.4.3. Dosage des cytokinines

Deux familles de cytokinines ont été dosées : les isopentényles et les zéatines. Ces deux types de cytokinines diffèrent par la nature chimique de leur chaîne latérale,

celle des zéatines comportent un groupement hydroxyle que n'ont pas les isopentényles. Pour ces dernières, seule la forme zéatine riboside (ZR) est identifiée avec certitude, les autres formes devront être confirmées par leur passage sur une colonne de chromatographie liquide à haute performance.

3.4.3.1. Les isopentényles

La concentration totale d'isopentényle est 3 fois supérieure dans les tissus des turions des plantes du type mutant ($164 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$) à celle des tissus des plantes du type sauvage ($51 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$). Prise individuellement, chaque isopentényle est présente en concentration plus importante dans les tissus des turions des plantes du type mutant que dans les tissus des plantes du type sauvage. En particulier, la concentration d'isopentényle adénine (IP) est 9 fois plus importante dans les tissus des plantes du type mutant ($52 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$) que dans les tissus des plantes du type sauvage ($5,8 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$). De même, l'isopentényle adénosine (IPA) est en concentration 7 fois plus élevée dans les tissus des plantes du type mutant à raison de $33 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$ contre $5,8 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$ dans les tissus des plantes du type sauvage.

3.4.3.2. Les zéatines

A l'inverse des isopentényles, la concentration totale des différentes formes de zéatine est équivalente dans les deux types de tissus. Néanmoins, prise indépendamment, la concentration de la zéatine riboside (ZR) est 1,6 fois plus représentée dans les tissus des turions des plantes du type mutant ($39 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$) que dans les tissus des turions des plantes du type sauvage ($24 \text{ fmol.mg}^{-1} \text{ MS}$).

3.4.4. Conclusions

Si les concentrations en acide abscissique ne sont pas significativement différentes entre les deux types de tissus, ce n'est pas le cas pour les deux autres régulateurs de croissance étudiés.

La concentration en auxine est plus élevée dans les tissus des plantes du type sauvage que dans ceux des plantes du type mutant, alors que la concentration en cytokinine est plus faible dans les tissus des plantes du type sauvage que dans ceux des plantes du type mutant.

De plus, la représentation des deux familles de cytokinines étudiées (isopentényles et zéatines) diffère entre les deux types de tissus. Dans les tissus des

Résultats : Les régulateurs de croissance

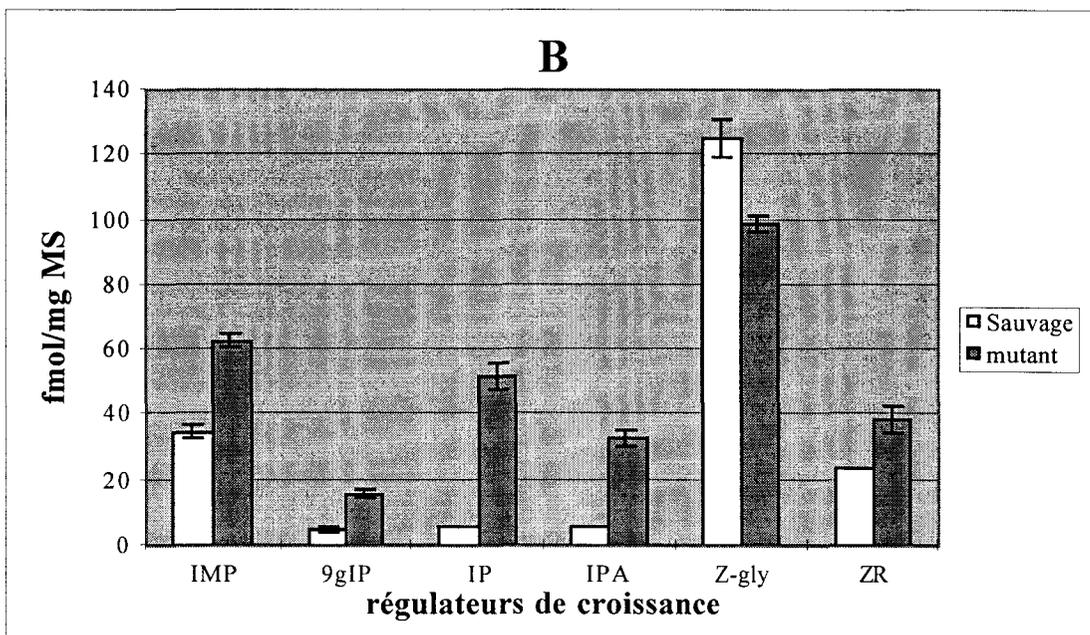
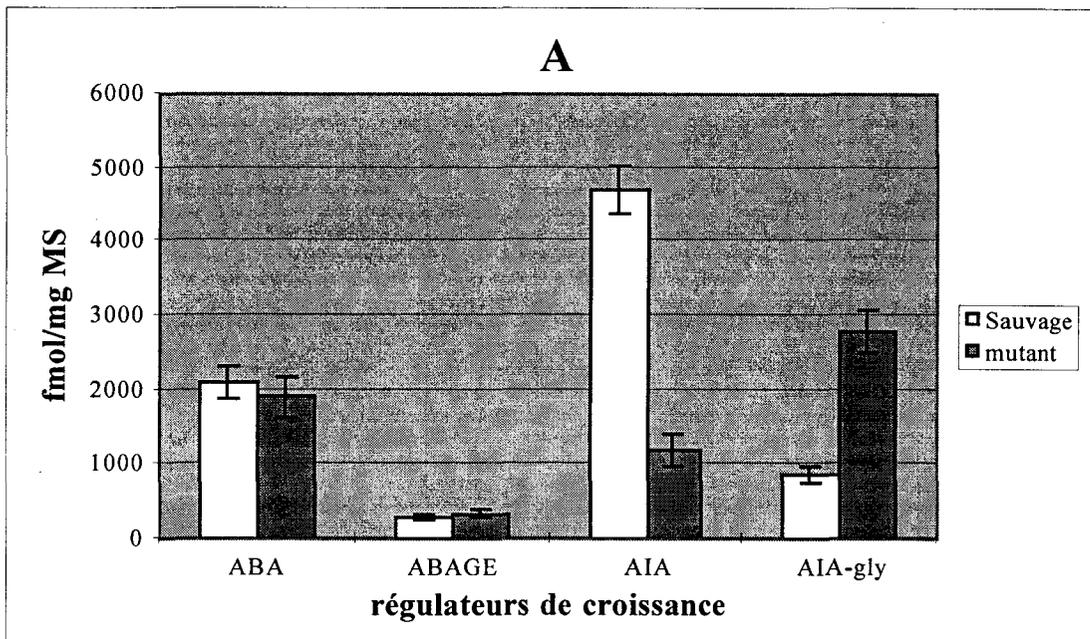


Figure 15 : Teneurs en régulateurs de croissance endogènes des turions des plantes de type sauvage et mutant. A/ Différentes formes d'acide abscissique (ABA, ABAGE) et d'auxine (AIA, AIA-glycine). B/ Différentes cytokinines (IMP, 9gIP, IP, IPA, Z-gly, ZR)

plantes du type sauvage, la concentration en zéatines est 2,5 fois plus élevée que la concentration en isopentényles. A l'inverse, dans les tissus des plantes du type mutant, c'est la concentration en isopentényles qui est 1,2 fois plus élevée que la concentration en zéatine.

Ces résultats induisent que le rapport cytokinine/auxine est différent entre les deux types de plantes. Si ce rapport est réalisé en utilisant la somme des deux formes d'auxines et la somme des différentes cytokinines, nous constatons qu'il est égal à 0,04 dans les turions des plantes du type sauvage, soit 25 fois plus d'auxines que de cytokinines et les formes de cytokinines les plus représentées sont les zéatines. Dans les tissus des plantes du type mutant, ce rapport est de 0,07 soit 14 fois plus d'auxines que de cytokinines et les formes de cytokinines les plus représentées sont les isopentényles. Si nous ne prenons en compte que les formes considérées comme actives (l'AIA pour les auxines, l'IP, l'IPA et ZR pour les cytokinines) alors les différences entre les deux types de tissus sont nettement plus affirmées car le rapport est égal à $7,6 \cdot 10^{-3}$, soit 132 fois plus d'auxine que de cytokinine dans les tissus des plantes de type sauvage alors qu'il est égal à 0,1, dans les tissus des plantes du type mutant, soit seulement 9,7 fois plus d'auxine que de cytokinine.

3.4.5. Discussion sur les résultats des régulateurs de croissance

Dans de nombreux modèles, la présence de fortes teneurs en ABA a pu être corrélée positivement à la capacité embryogène. Dans les tissus de feuilles de *Pennisetum purpureum* Schum, la concentration en ABA est plus élevée dans les parties embryogènes que dans les parties moins ou pas embryogènes. De même, lors de la perte de la capacité embryogène de ces fragments au cours de la culture, la concentration en ABA diminue fortement. Ce phénomène est concomitant à la baisse de la teneur en auxine (Rajasekaran *et al.*, 1987). Dans les tissus de *Larix X Leptoeuropaea*, la présence d'acide abscissique semble décisive dans l'amorçage du processus d'embryogenèse somatique obtenue à partir d'embryons somatiques immatures (Jourdain *et al.*, 1997). Dans ce cas, c'est la forme conjuguée ABAGE qui est la plus représentée. Notre étude de la teneur endogène de l'ABA dans les tissus de turions d'asperge, a porté sur deux formes de l'acide abscissique, l'ABA qui est la forme libre active; l'ABAGE forme conjuguée à un glucose étant principalement une forme de transport. Dans ces tissus, les teneurs en ces deux types de molécules ne diffèrent pas significativement entre les tissus des deux types de plantes. Ceci suggérerait que la teneur en acide abscissique n'interviendrait pas directement sur la capacité embryogène des plantes du type mutant. Néanmoins, Ivanova *et al.*, (1994) affirment que la régulation de la capacité embryogène des feuilles de *Medicago falcata*, liée à une intervention de l'ABA, se ferait par

l'appréciation du rapport ABA/AIA. Dans le cas des tissus d'asperge, la teneur en ABA n'est pas modifiée dans les tissus des plantes de type mutant par rapport à celle du type sauvage mais la teneur en AIA est nettement supérieure dans ces derniers. Le rapport ABA/AIA est donc bien modifié entre les deux tissus. A l'inverse des études menées par Ivanova *et al.*, (1994) et Rasekaran *et al.*, (1987) c'est un rapport plus élevé dans les tissus des turions des plantes de type mutant qui refléterait la capacité embryogène.

Les auxines influencent de nombreux événements durant le développement des plantes et plus particulièrement la division, l'élongation et la différenciation cellulaire (Hooley, 1998). L'application d'auxine à des tissus en culture entraîne de nombreuses modifications de l'expression génique (Sitbon et Perrot-Rechemann, 1997) par l'intermédiaire de protéines se fixant à l'ADN (Guilfoyle *et al.*, 1998) et les auxines sont particulièrement utilisées pour l'induction de l'embryogenèse somatique. Pour Harada *et al.*, (1998) l'acquisition de la compétence embryogène est induite par un traitement auxinique appliqué à des cellules en culture. En fait, les auxines sont couramment utilisées dans les cultures embryogènes de *Daucus carota* (Ammirato, 1985), mais aussi dans celles d'autres espèces (Dunstan et Bock, 1997). La présence d'auxine dans le milieu de culture permet la prolifération cellulaire, alors que son retrait permet l'expression de la compétence acquise par les cellules (Ribnicky *et al.*, 1996).

Lors du dosage des auxines, seule l'AIA a été prise en compte. Deux formes ont été dosées dans les tissus des plantes de type mutant et sauvage. La forme libre (AIA) qui est physiologiquement active et une forme liée (AIA-Gly). Dans notre cas, le mutant embryogène a été obtenu par culture sur un milieu contenant une forte concentration d'auxine (10 mg.l⁻¹) (Delbreil et Jullien, 1994). Ce mutant a un comportement anergié vis à vis des régulateurs de croissance et les explants issus de cette plante se montrent tous fortement embryogènes. Le comportement de ce mutant aurait pu s'expliquer par une synthèse d'auxine endogène importante. Les doses mises en évidence dans les tissus des plantes du type mutant vont à l'encontre de cette hypothèse.

Nous observons que les quantités d'AIA sont plus faibles dans les tissus des plantes du type mutant et qu'elles se présentent majoritairement sous forme conjuguées. Les formes conjuguées de l'AIA sont des formes de stockage réversibles qui peuvent redonner une forme active par hydrolyse de la liaison à l'acide aminé. Cette forme pourrait également servir au transport de la molécule ainsi qu'à la protection de l'AIA en évitant son oxydation. Cette forme particulière de l'auxine (AIA-glycine) pourrait cependant être une forme possédant une action auxinique (Leyser, 1997). Néanmoins, même si cette forme est biologiquement active ou tout du moins disponible par

hydrolyse, les teneurs globales de composés auxiniques sont inférieures dans les tissus des plantes du type mutant à celles observées dans les tissus des plantes du type sauvage.

Dans le cas de l'embryogenèse somatique obtenue à partir d'embryons immatures de blé, c'est la quantité d'auxine endogène qui régule l'aptitude à l'embryogenèse. L'absence de compétence des tissus à la régénération est liée à de fortes quantités d'auxine dans les tissus embryonnaires alors que la compétence à l'embryogenèse est reliée à une faible concentration en auxine associée à une concentration de cytokinine endogène élevée (Hess et Carman, 1998), ce qui serait également notre cas.

Les cytokinines interviennent dans de nombreux phénomènes physiologiques chez les végétaux. A titre d'exemple citons : la synthèse de la chlorophylle (Stetler et Laetsch, 1965), le développement de bourgeons latéraux (Sachs et Thimann, 1964), la rhizogenèse (Skoog et Miller, 1957), la division cellulaire (Miller *et al.*, 1955; Flores et Towbin, 1988), le retard de la sénescence des tissus (Richmond et Lang, 1957) et aussi sur la régulation de l'expression génique (Claes *et al.*, 1991; Schmölling *et al.*, 1997).

Des études de l'expression de protéines après un apport de cytokinines ont été menées par l'analyse de gels bidimensionnels. Ces analyses ont montré une grande diversité dans les résultats obtenus, l'apport de cytokinines étant susceptible d'entraîner une diminution, une augmentation ou l'arrêt de la synthèse de protéines (Schmölling *et al.*, 1997). Dans certains cas, les cytokinines ont permis d'obtenir une synthèse protéique *de novo* (Bauw *et al.*, 1987; Memelink *et al.*, 1987; Renaudin *et al.*, 1991; Ouelhazi *et al.*, 1994). L'exemple de l'expression du gène *cdc2a* à différents niveaux cellulaires de la structure racinaire (cellules du pérycycle, cellules du cylindre vasculaire) montre que les cytokinines peuvent avoir un effet sur des types cellulaires spécifiques (Schmölling *et al.*, 1997). Il a aussi été démontré que les différentes formes de cytokinines ne sont pas toutes équivalentes dans leurs actions. Dans le modèle « Asperge », ce sont les teneurs en isopentényles qui sont particulièrement modifiées et pourraient donc être plus particulièrement impliquées dans le processus de régulation de l'expression génique.

Dans notre modèle, la forte teneur en cytokinines peut donc être responsable de tout ou partie de la différence entre les profils protéiques des tissus du type mutant au jour 0. Ces tissus seraient alors compétents pour répondre à un stimulus permettant la mise en place d'un cal et l'orientation des tissus vers la voie embryogène. De plus, la présence de ces cytokinines peut permettre d'avoir un retard dans l'apparition des symptômes de la sénescence. Le fait que les tissus restent vivants après la mise en culture permet que les mécanismes nécessaires au déroulement de l'embryogenèse

somatique puissent se mettre en place. De plus, pour Rajasekaran *et al.*, (1987) l'accumulation de cytokinines est un prérequis à la mise en place de l'embryogenèse dans les feuilles de *Pennisetum purpureum* Schum. Cette accumulation est nécessaire à la mise en place du cal dans lequel se déroulera l'embryogenèse. Dans notre cas, la présence de concentrations plus importantes en cytokinines dans les tissus du type mutant permettrait la mise en place du cal embryogène directement après la mise en culture.

Il est aussi établi que les cytokinines interagissent avec les auxines. En 1992, Dominov *et al.* affirmaient que les cytokinines augmentent la réponse liée à l'auxine. Ceci se ferait par l'augmentation de la sensibilité des cellules ou par blocage de la rétroinhibition de la réponse auxinique. Rapportée à notre étude, cette observation peut être corrélée à la diminution des quantités d'auxines endogènes des tissus des plantes de type mutant. En effet, si la sensibilité des cellules est augmentée nous pouvons imaginer qu'un système de régulation de taux d'auxine se mette en place dans ces tissus. Ce phénomène permettrait de pallier à l'effet de toxicité lié à l'auxine appliquée sur les explants au moment de l'obtention des souches embryogènes. Un autre système d'action sur la régulation des concentrations d'auxine par les cytokinines a été décrit. L'ajout de cytokinines dans le milieu de culture permet l'augmentation de la synthèse d'AIA oxydase qui dégrade les auxines endogènes (Luc *et al.*, 1971). La présence de quantités de cytokinines endogènes importantes dans les tissus du mutant pourrait impliquer un tel phénomène de dégradation provoquée des auxines ce qui expliquerait les faibles teneurs en auxine observées dans les turions des plantes du type mutant.

En 1989, Meins décrit des plantes qui sont dénommées « cytokinin-habituated » et se cultivent *in vitro* sans apport de cytokinines. Ce phénotype n'est pas transmis à la descendance, il ne s'agissait donc pas dans ce cas d'une mutation. Depuis, des mutations portant sur le comportement des tissus vis à vis des cytokinines ont été mises en évidence. Ainsi des mutants surproducteurs ont été étudiés. Le mutant *amp1* d'*Arabidopsis thaliana* a un niveau élevé de cytokinines endogènes et un pouvoir de régénération 6 fois plus important que les plantes sauvages (Chaudhury *et al.*, 1993; Chin-Atkins *et al.*, 1996). Dans ce cas la mutation est récessive. Deux plants mutants de *Nicotiana tabacum* sont capables de se développer sur des milieux de culture ne contenant pas de cytokinine (Meins *et al.*, 1983; Meins et Foster, 1986). Les tests de ségrégation ont montré que la mutation portée par le mutant H11 était monogénique mais partiellement dominante alors que celle du mutant H12 est monogénique dominante. Même si le déterminisme génétique est le même que celui observé chez l'asperge, nous ne pouvons pas conclure que la mutation qui caractérise l'état embryogène des plantes

Résultats : Les régulateurs de croissance

de type mutant soit liée à une mutation qui affecterait la synthèse des cytokinines. En effet, dans notre cas nous observons simultanément une augmentation des quantités de cytokinines et une diminution de la quantité globale d'auxine, cette diminution obtenue par une mutation sur les voies de son métabolisme peut engendrer une augmentation de la synthèse des cytokinines.



Conclusions et
perspectives

4.1. Conclusions

Au cours de notre travail, nous avons cherché à savoir si le couple mutant/sauvage d'*Asparagus officinalis* L. dont nous disposons pouvait être un modèle d'étude de l'embryogenèse somatique.

Les tests de différents milieux de culture ont permis de déterminer que le milieu MSN contenant 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA et 0,1 mg.l⁻¹ de zéatine est le mieux adapté pour l'obtention d'une embryogenèse somatique indirecte, rapide (15 jours) et les embryons apparaissent au même moment dans tous les explants des plantes de type mutant. Parallèlement, la culture des explants issus des plantes de type sauvage sur le même milieu permet d'obtenir un cal qui n'est pas embryogène. Les deux types d'explants étant cultivés dans les mêmes conditions, nous possédons donc un témoin de choix pour l'étude de l'embryogenèse somatique. De plus, l'expression de la capacité embryogène des explants des plantes du type mutant ne nécessite pas un passage sur un milieu contenant des régulateurs de croissance puisque le processus embryogène se déroule sur milieu MSN dépourvu de régulateur de croissance. Les tissus des plantes de type mutant ont donc un comportement de tissus anergiés vis à vis des régulateurs de croissance au cours de la culture *in vitro*.

Les analyses histo-cytologiques menées parallèlement sur les deux types de tissus nous ont permis de caractériser les événements significatifs de la mise en place du processus embryogène. Les observations réalisées sur les apex au moment de leur mise en culture n'ont pas mis en évidence de différences entre les explants provenant des deux types de plantes. Dès le 9^{ème} jour de culture des différences dans l'évolution des explants issus de plantes de type mutant et sauvage sont repérées. En effet, si dans les deux cas un gonflement se développe à la base des explants, celui initié sur les tissus des explants provenant des plantes du type mutant présente systématiquement des excroissances composées de cellules méristématiques, que ne présentent jamais les explants des plantes du type sauvage. Après 12 jours de cultures ces différences s'accroissent. Par ailleurs, des cellules méristématiques sont visibles dans les deux types d'explants, elles ne sont pas localisées dans les mêmes zones et ne se présentent pas sous la même forme dans les deux types d'explants. Dans les explants des plantes du type sauvage ces cellules sont principalement localisées à l'intérieur du cal sous forme d'empilement ou à la périphérie sous forme de massifs. Dans les cals développés sur les explants issus des plantes de type mutant les cellules méristématiques sont principalement réparties sur le pourtour du cal et ne se présentent jamais sous forme

d'empilement dans la zone centrale de ces cals. Enfin, les accumulations de granules d'amidon dans les cellules et de mucilage dans les espaces intercellulaires se font de manière plus importante dans les explants issus des plantes du type mutant que dans ceux provenant des plantes de type sauvage. Entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour de la culture les cals issus des deux types de plantes ne subissent pas de modification importante, puisque seule leur taille augmente. Au 15^{ème} jour de la culture les cals provenant des plantes de type mutant contiennent les premières cellules embryogènes et les premiers proembryons. Ces formations se localisent toujours dans la zone périphérique des cals. Chaque proembryon semble dériver du recloisonnement d'une cellule embryogène. Les cellules embryogènes et les proembryons sont entourés d'une paroi épaisse de nature polysaccharidique. De même un réseau extracellulaire a été mis en évidence autour des cellules des jeunes embryons somatiques, ce réseau disparaît lors du développement de ces embryons.

Grâce aux analyses histo-cytologiques nous avons montré que l'embryogenèse somatique du mutant obtenu à partir d'un génotype non embryogène d'asperge, apparaît comme ayant de nombreuses caractéristiques communes avec d'autres modèles d'embryogenèse somatique. Un cal se développe au niveau de la zone de coupe et dans ce cal se met en place une embryogenèse vraisemblablement d'origine unicellulaire. Chez ce mutant, le passage par une première phase de culture contenant des régulateurs de croissance n'est pas une obligation. Cette embryogenèse se met en place rapidement (15 jours) et les embryons somatiques sont visibles macroscopiquement après 30 jours de culture. Ceci est plus rapide que dans la majorité des systèmes d'embryogenèse indirecte.

Les analyses protéiques ont été réalisées sur gels bidimensionnels par comparaison du contenu en protéines totales des tissus issus des deux types de plantes et ceci au jour de la mise en culture (T0), ainsi qu'après 12 et 15 jours de culture. Ces analyses ont permis de montrer que de nombreuses modifications intervenaient au cours de la culture. L'analyse comparée des profils protéiques des tissus issus des plantes de type sauvage et mutant au cours de la culture nous permet de décrire 62 protéines qui pourraient être reliées à l'inhibition du processus embryogène dans les tissus des plantes de type sauvage (Tableau 4, groupes : 1, 2, 4, 6, 7, 16, 18, 19). Les 11 protéines du groupe 16 présentent le double intérêt de rentrer dans la catégorie des protéines potentiellement inhibitrices du processus embryogène et de pouvoir être considérées comme marqueurs de la non compétence à l'embryogenèse des tissus des turions des plantes du type sauvage. De même, cette analyse nous a permis de définir que 26 protéines pourraient être utilisées comme marqueur du processus embryogène (groupes :

5, 11, 13) et que les 6 protéines appartenant au groupe 3 peuvent être de bons candidats au titre de marqueur de la compétence à l'embryogenèse des tissus des turions des plantes de type mutant.

Ainsi, l'analyse de l'évolution des profils protéiques montre que de nombreuses modifications interviennent au cours de la culture. Le fait le plus marquant est que dès le jour 0, les deux types de tissus ont une composition en protéines différente et il en est de même pour la composition en régulateurs de croissance. Les auxines sont moins représentées dans les tissus des turions du type mutant que chez ceux du type sauvage à l'inverse des cytokinines au sein desquelles les isopentényles sont majoritaires. Ces régulateurs de croissance interviennent directement sur la synthèse protéique (Schmülling *et al.*, 1997). Les modifications constitutives du contenu en régulateurs de croissance des turions peuvent être à l'origine de la différence marquée en protéine. Elles peuvent donc influencer plus ou moins directement la capacité embryogène du mutant.

Les modifications des profils protéiques des tissus issus des plantes de type mutant au cours de la culture pourraient être liées à la mise en place des embryons somatiques et à leur développement en plantule. Ces modifications pourraient être la conséquence d'une hyper-réactivité des tissus au stress, c'est à dire qu'ils seraient aptes à entrer dans la voie embryogène en réponse à un stimulus initié par la mise en culture (Yeung, 1995). Ainsi, les tissus des turions provenant des plantes de type mutant seraient initialement dans un état de compétence à l'embryogenèse somatique; la forte teneur en cytokinines étant favorable à la mise en place rapide du cal dans lequel se déroulera le processus embryogène.

Gottlieb *et al.*, (1988) ont montré qu'une mutation unique peut avoir un effet pléiotropique c'est à dire que la résultante sur la synthèse des protéines est une modification complexe des modalités d'expressions alors que seul un gène a été modifié. Dans le cas des tissus des plantes de type mutant d'asperge il pourrait effectivement s'agir d'un effet pléiotropique d'une mutation unique d'autant plus que dans ces tissus les balances en régulateurs de croissance sont modifiées. Néanmoins, l'approche de la mise en évidence de fragments polymorphes par AFLP a permis de caractériser 10 fragments d'ADN spécifiques du génome des plantes de type sauvage et 9 fragments spécifiques de celui des plantes de type mutant. Ces résultats montrent que plusieurs mutations ont eu lieu lors de la culture qui a permis de régénérer les plantes du type mutant à forte capacité embryogène. Le caractère embryogène étant défini comme monogénique dominant, cela suggère que toutes les mutations observées n'interviendraient pas forcément sur la capacité embryogène des tissus des plantes de type mutant même si toutes participent à la complexité des différences observées entre les profils protéiques des deux types de plantes au jour 0.

Compte tenu de ces remarques, nous proposons un schéma qui regroupe les principaux types de relations pouvant exister entre les modifications observées au cours de cette étude (Figure 15). Dans ce schéma, les événements développés dans les parties A et B se réalisent simultanément dans les tissus des turions des plantes du type mutant. Les événements présentés dans la partie A schématisent les mutations intervenues dans le génome de ces plantes mais n'ayant pas d'implication dans la capacité embryogène. Les événements présentés dans la partie B représentent les conséquences possibles de mutations entraînant la mise en place de la complexité moléculaire permettant l'acquisition de la compétence à l'embryogenèse de ces plantes. Les flèches en pointillé signalent le fait que les résultats ne nous permettent actuellement pas de conclure sur les différentes interactions qu'elles signalent.

Plusieurs cas de figures sont envisageables en ce qui concerne les diverses mutations :

- 1 - arrêt de la synthèse d'une protéine
- 2 - synthèse d'une protéine

La mutation peut provoquer l'arrêt de la synthèse d'une protéine inhibitrice (P0). Cet arrêt de synthèse entraîne la mise en route de la synthèse d'une (ou plusieurs) protéine (P1) qui était réprimée par P0 (Figure 15, ①). La mutation peut également entraîner directement la synthèse d'une protéine (P2), susceptible d'être impliquée dans l'activation de synthèses protéiques ou au contraire d'en réprimer d'autres (P3) (Figure 15, ②). Dans les cas de figure ① et ②, la résultante est la mise en place de protéines nouvellement synthétisées avec des effets activateurs ou au contraire répresseurs sur la synthèse de protéines en amont dans la chaîne de synthèse. Dans les cas ① et ②, les modifications ne seraient pas impliquées dans la compétence des tissus des plantes de type mutant à l'embryogenèse et viendraient donc perturber et complexifier l'analyse des profils protéiques.

Si la mutation est impliquée dans l'acquisition de la compétence embryogène, les deux mêmes cas de figures sont envisageables. Il peut donc s'agir de l'arrêt de la synthèse d'une protéine inhibitrice ou au contraire de la mise en place de nouvelles synthèses. Néanmoins, puisque la mutation est dominante, il est peu probable que son résultat direct soit l'arrêt de la synthèse d'une protéine inhibitrice. Cette modification disparaîtrait lors du croisement avec une plante ne possédant pas la capacité

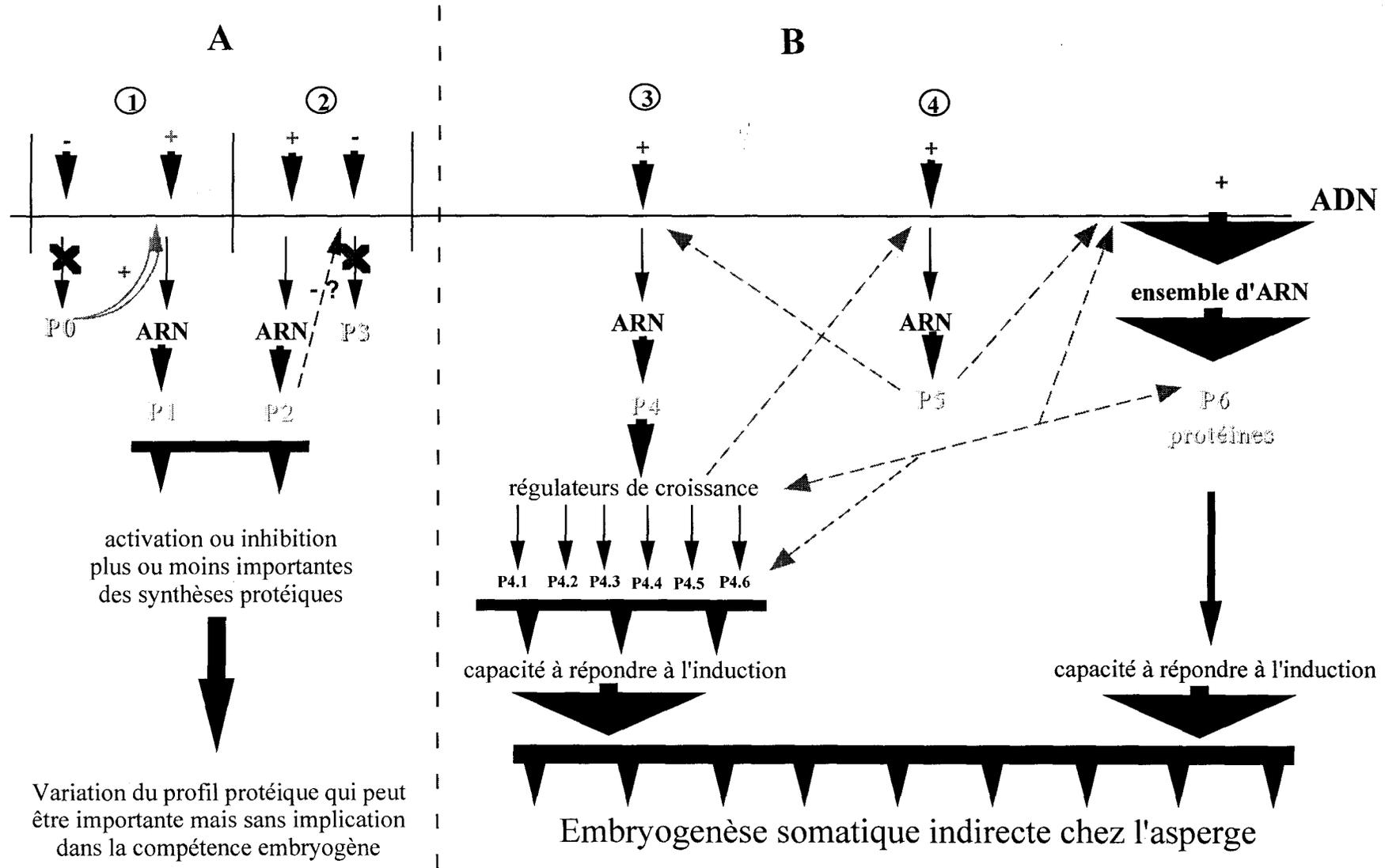


Figure 15 : Hypothèses des différentes modifications survenues dans les tissus des plantes de type mutant et conduisant à la mise en place de la compétence embryogène chez l'asperge. Activation (+), Inhibition, (-), protéines (P), mutations (1, 2, 3, 4)

embryogène du fait que la complémentation de la fonction est apportée par le nouveau génome. Dans ce cas, le caractère serait monogénique récessif est donc 100% des descendants de F1 ne seraient pas embryogènes. La mutation peut entraîner la mise en place de la synthèse d'une nouvelle protéine (P4) (Figure 15, ③) qui agit directement sur la balance hormonale. Cette modification de la balance hormonale entraîne des modifications profondes des profils protéiques (P4.1, P4.2, ...) et engendre la mise en place d'un profil moléculaire, dans les tissus du mutant, qui permettrait la réponse à un stress de manière très rapide et donc l'induction du processus embryogène. Le phénomène peut être plus complexe dans le sens où les protéines mises en place par cette voie peuvent elles aussi entraîner des modifications par le déclenchement de la synthèse de protéines du type de P5 (Figure 15, ④). Ce type de protéines peut avoir un effet en retour sur les synthèses de P4 et/ou sur la mise en place d'un ensemble de protéines P6. Cet ensemble P6 peut, lui aussi interagir de manière plus ou moins directe avec les voies de synthèse de régulateurs de croissance ou avec les protéines qui résultent de la modification de la balance hormonale.

Ainsi la mutation peut avoir un effet pléiotropique très important, surtout lorsque les régulateurs de croissance sont impliqués dans les modifications physiologiques. La résultante est un profil protéique largement modifié dans les tissus des plantes de type mutant au jour de la mise en culture (T0). Cet équilibre peut être instable, permettre la réponse au stress de la mise en culture et entraîner la mise en place de l'embryogenèse somatique dès que la rupture d'équilibre physiologique est perçue par les tissus.

Les études menées pour l'instant sur les tissus de l'asperge ne nous permettent pas de connaître le degré de complexité des interactions aboutissant à la création d'une compétence embryogène des tissus. Cette compétence peut alors être considérée comme une augmentation de la sensibilité à la blessure qui engendre une amplification de la réponse physiologique au stress de la mise en culture et une généralisation de celle-ci.



4.2. Perspectives

Les études menées lors de ce travail montrent que les événements histocytologiques se déroulant au cours du processus embryogène sont communs à de nombreux modèles existants. Un cal se développe à la base des explants au sein duquel se met en place une embryogenèse. Sur milieu MSN contenant 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA et 0,1 mg.l⁻¹ de zéatine, cette embryogenèse se met en place rapidement (les premières cellules embryogènes et proembryons visibles au 15^{ème} jour) et les embryons somatiques sont repérés à la surface des cals après 30 jours de culture. Nous avons défini cette embryogenèse comme étant d'origine unicellulaire puisque chaque proembryon semble dériver du reclonement d'une cellule embryogène. Cette origine unicellulaire doit être confirmée par le suivi de l'évolution des cellules embryogènes au sein des cals à l'aide d'une caméra. Les cellules embryogènes et les proembryons sont entourés d'une paroi épaisse caractéristique. De même un réseau extracellulaire est mis en évidence autour des proembryons et il disparaît lors de leur développement en embryons. L'utilisation de techniques immunologiques devrait permettre de préciser la nature chimique de la matrice extracellulaire.

L'analyse des modifications des profils protéiques a été réalisée par séparation électrophorétique bidimensionnelle des protéines totales. Ces analyses ont permis de montrer que de nombreuses modifications des profils protéiques intervenaient au cours de la culture. L'analyse comparée des profils protéiques des tissus des plantes de type sauvage et mutant au cours du processus permet de définir 94 protéines pouvant être reliées soit à l'absence de compétence ou à l'inhibition du processus embryogène dans les tissus des plantes de type sauvage, soit à la compétence embryogène ou au processus d'embryogenèse dans les tissus des plantes de type mutant. Les hypothèses concernant le rôle de ces 94 protéines pourraient être confirmées par leur identification. Les tentatives de récupérations menées au stade T0, nous ont montré que les méthodes de séparation et de coloration en vue de la récupération des protéines demandent à être améliorées. Nous pourrions envisager de faire varier la zone de pH utilisée en gel bidimensionnel afin d'isoler des protéines particulières, ce qui permettrait leur récupération. Une technique de fractionnement des échantillons couplée à une séparation sur gel préparatif devrait permettre de réaliser des dépôts qui soient plus concentrés en protéine ce qui permettrait alors d'augmenter la sensibilité des techniques de coloration au bleu de Coomassie ou au zinc. Il serait également possible d'envisager l'analyse du processus d'embryogenèse par l'approche des contenus en ARN dans les deux types de

tissus au cours de la culture. Le criblage différentiel de deux banques d'ADNc nous semble la démarche la plus judicieuse. Néanmoins, la limitation de ce type d'approche au cours de la culture vient du fait de la difficulté d'accumuler le matériel végétal en quantité suffisante, ceci est en relation directe avec la taille des explants mis en culture.

La technique AFLP permet de caractériser des fragments d'ADN spécifiques de l'un ou l'autre des deux génomes (mutant ou sauvage). Cette étude a montré que plusieurs mutations sont intervenues au niveau du génome des plantes embryogènes. Ces fragments polymorphes peuvent être utilisés dans un programme de croisement dont le but serait de faire ségréger les différentes mutations intervenues sur le génome des plantes de type mutant et de ne conserver que celles qui seraient impliquées dans le phénotype embryogène. La sélection de la descendance devra se faire sur le caractère embryogène observé lors de la culture *in vitro*. Il faut donc définir une plante femelle qui pourra servir dans les croisements. Dans le cadre d'un tel programme, le problème réside dans le temps nécessaire à l'obtention de plantes suffisamment robustes pour le test d'embryogenèse *in vitro*. La récupération des fragments mis en évidence lors de l'étude AFLP peut être envisagée sur gel de séquence. Cette récupération conduit au clonage et au séquençage de ces fragments ce qui peut être informatif dans le cas où les fragments récupérés correspondent à des parties codantes du génome.

Les études menées sur les concentrations endogènes en régulateurs de croissance montrent que les concentrations en acide abscissique ne sont pas significativement différentes entre les deux types de tissus, que la concentration en auxine est plus élevée dans les tissus des plantes du type sauvage que dans ceux des plantes du type mutant et que la concentration en cytokinine est plus faible dans les tissus des plantes du type sauvage que dans ceux des plantes du type mutant. Dans les tissus des plantes du type sauvage, la concentration en zéatines est plus élevée que la concentration en isopentényles, à l'inverse des tissus des plantes du type mutant. Dans le cadre de ces études il faut dans un premier temps confirmer la détermination des concentrations en régulateurs de croissance par des analyses de ces différents composés en chromatographie liquide à haute performance et par la réalisation de tests ELISA (Enzyme Link Immuno Sorbent Assay). Les rôles de ces différents régulateurs de croissance sur la capacité embryogène des plantes de type mutant peuvent être appréhendés par l'utilisation d'inhibiteurs de leurs voies de synthèse. L'approche de l'implication des auxines peut être abordé grâce à l'utilisation de l'acide N-(1-naphtyl)thalimique (NPA) ou l'acide p-chlorophenoxyisobutyrique (PCIB) (Hadfi *et al.*, 1998). Le rôle des cytokinines peut être approché par l'utilisation de l'antagoniste

qu'est le 2-chloro-4-cyclobutylamino-6-ethylamino-s-tiazine (Sano et Youssefian, 1994). De plus, le suivi de l'évolution des teneurs des différents régulateurs de croissance au cours de la culture permettrait de conforter les résultats obtenus. Enfin une approche consisterait à ajouter des régulateurs de croissance dans les milieux de culture des tissus des plantes de type sauvage pour tenter d'induire le processus embryogène. Cette approche présente néanmoins le désavantage de ne pas permettre l'estimation des quantités de régulateurs de croissance utilisé par les tissus en culture. L'étude du contrôle de la synthèse des régulateurs de croissance, de leur concentration endogène et de leur implication sur le caractère embryogène nous semble être l'une des voies principale de l'analyse du processus embryogène.

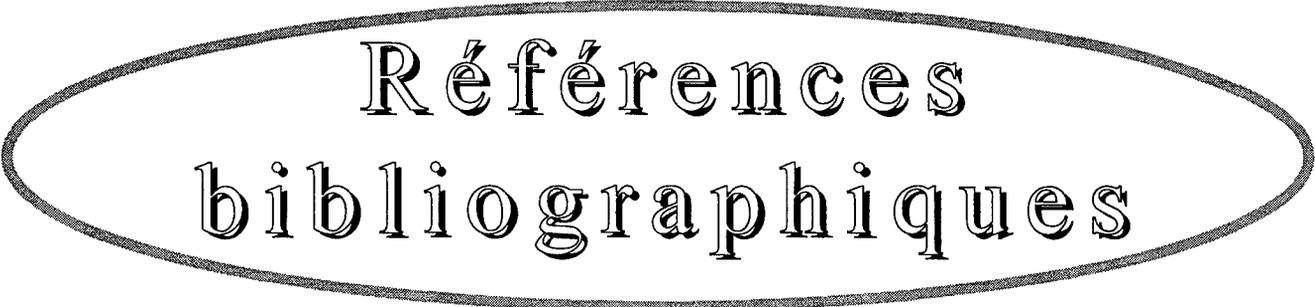
Ainsi, au cours de cette étude nous avons pu recueillir un nombre important d'informations. Ces informations n'apportent pas de réponses tranchées aux questions qui se posent sur le déterminisme et le déroulement de l'embryogenèse somatique mais permettent de définir des perspectives pour poursuivre le travail sur l'embryogenèse somatique avec l'asperge comme modèle. L'avantage fondamental de l'utilisation de ce modèle pour l'étude de l'embryogenèse somatique est que nous possédons un témoin naturel (plante sauvage) à l'embryogenèse.

Les études réalisées permettent de supposer que les tissus des turions issus des plantes de type mutant sont compétents à l'embryogenèse. Il semble donc que les éléments nécessaires au déclenchement du processus soient présents de manière constitutive (T0) dans ces tissus. Cette constatation implique que les modifications moléculaires qui caractérisent l'état de compétence à l'embryogenèse des cellules soient accessibles à ce stade. Le matériel n'étant plus limitant à ce stade (plantes entière, turions) nous pouvons envisager d'approfondir les analyses protéiques et de démarrer les analyses du contenu différentiel en ARNm entre les deux types de plantes. La validation des résultats de ces analyses peut se faire par la technique de transformation des plantes de type mutant par une stratégie anti-sens à partir des tissus.

Ainsi, malgré les problèmes d'accumulation de matériel végétal nécessaire pour les analyses au cours du processus embryogène et la durée de la croissance des plantes, nous pensons que l'asperge peut être un bon modèle d'étude de l'embryogenèse somatique à plusieurs titres. Les tissus des turions des plantes de type mutant sont naturellement compétents à l'embryogenèse somatique, à ce stade toutes les voies d'analyses pour la mise en évidence de marqueurs moléculaires sont envisageables puisque le matériel n'est plus limitant. De plus les informations recueillies sont

conclusions et perspectives

directement comparables à celles obtenues chez les plantes de type sauvage qui constituent un témoin incontestable.



Références
bibliographiques

Ammirato P. V., (1985). Patterns of development in culture. In: Tissue Culture in Forestry and Agriculture, Eds R. R. Henke K.W.H., M. P. Constantin, A. Hollaender, Plenum Press, New York, 9-29.

Armstrong C. L., Romero-Severson J., et Hodges T. K., (1992). Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **84**, 755-762.

Bannerot H., (1963). Résultats actuels d'un essai variétal d'asperge. *Compte Rendu des Journées Internationales de l'Asperge*, Blois, 23-25 mai.

Bauw G., De Loose M., Van Montagu M., et Vandekerckhove J., (1987). Alterations in the phenotype of plant cells studied by NH₂-terminal amino acid-sequence analysis of proteins electroblotted from the two-dimensional gel-separated total extracts. *Proceedings of National Academy of Science USA*, **84**, 4806-4810.

Ben Amer I. M., Boerner A., et Schlegel R., (1992). The effect of the hybrid dwarfism gene *D2* on tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communication*, **20**, 87-93.

Blervacq A. S., Dubois T., Dubois J., et Vasseur J., (1995). First divisions of somatic embryogenic cells in *Cichorium* hybrid "474". *Protoplasma*, **186**, 163-168.

Blum H., Beier H., et Gross H. J., (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.

Boyer C., Hilbert J. L., et Vasseur J., (1993). Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*. *Plant Science*, **93**, 41-53.

Boyer C., Hilbert J. L., et Vasseur J., (1994). Two-dimensional gel electrophoretic analysis of the changes in protein patterns during early somatic embryogenesis in *Cichorium* root tissues. *plant Physiology Life Sciences Advances*, **13**, 183-189.

Breyne P., Boerjan W., Gerats T., Van Montagu M., et Van Gysel A., (1997). Applications of AFLP™ in plant breeding, molecular biology and genetics. *Belgian Journal of Botany*, **129**, 107-117.

Bronner R., Jeannin G., et Hahne G., (1994). Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*). *Canadian Journal of Botany*, **72**, 239-248.

Bronsema F. B. F., van Oostveen W. J. F., et van Lammeren A. A. M., (1997). Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 and A632. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **50**, 57-65.

Bruneau R., (1985). Régénération *in vitro* à partir de cals d'embryons immatures de maïs. Aspects quantitatifs et transmission héréditaire. *Agronomie*, **5**, 591-597.

Bui Dang Ha D. et Mackenzie I., (1973). The division of protoplast from *Asparagus officinalis* L. and their growth and differentiation. *Protoplasma*, **78**, 215-221.

Buvat R., (1944). Recherches sur la différenciation des cellules végétales. *Annales de la Société Nationale de Botanique et de Biologie Végétale*, **5**, 1-30.

Cabasson C., Ollitrault P., Cote F. X., Michaux-Ferrière N., Dambier D., Dalnic R., et Teisson C., (1995). Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. *Physiologia Plantarum*, **93**, 464-470.

Caetono-Anollés G., (1993). Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods and Applications*, **3**, 85-94.

Castiglioni P., Pozzi C., Heun M., Terzi V., Müller K. J., Rohde W., et Salamini F., (1998). An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics*, **149**, 2039-2056.

Charrière F. et Hahne G., (1998). Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Science*, **137**, 63-71.

Références bibliographiques

Chaudhury A. M., Letham S., Craig S., et Dennis E. S., (1993). *amp1*-A mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *The Plant Journal*, **4**, 907-916.

Chin C. K., (1982). Promotion of shoot and root formation in *Asparagus in vitro* by ancymidol. *HortScience*, **17**, 590-591.

Chin-Atkins A. N., Craig S., Hocard C. H., Dennis E. S., et Chaudhury A. M., (1996). Increased endogenous cytokinin in the arabidopsis *amp1* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta*, **198**, 549-556.

Christou P. et Yang N. S., (1989). Developmental aspects of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, **64**, 225-234.

Claes B., Smalle J., Dekeyser R., Van Montagu M., et Caplan A., (1991). Organ-dependent regulation of a plant promoter isolated from rice "promoter-trapping" in tobacco. *The Plant Journal*, **1**, 15-26.

Colin G., (1937). Etude de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.). Thèse, Strasbourg, p

Couillerot J. P., Decout E., Warnot F., Dubois J., et Vasseur J., (1993). Evolution des polyamines libres en relation avec la source carbonnée et l'embryogenèse somatique chez un *Cichorium* hybride. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **316**, 299-305.

Coutos-Thevenot P., Goebel-Tourand I., Mauro M. C., Jouanneau J. P., Boulay M., Deloire A., et Guern J., (1992a). Somatic embryogenesis from grapevine cells. I- Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **29**, 125-133.

Coutos-Thevenot P., Jouenne T., Maes O., Guerbette F., Grosbois M., Le Caer J. P., Boulay M., Deloire A., Kader J. C., et Guern J., (1993). Four 9-Kda proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins. *European Journal of Biochemistry*, **217**, 885-889.

Coutos-Thevenot P., Maes O., Jouenne T., Mauro M. C., Boulay M., Deloire A., et Guern J., (1992b). Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Science*, **86**, 137-145.

Cunha A. et Ferreira M. F., (1997). Differences in the free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax. *Plant Science*, **124**, 97-105.

de Jong A. J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., van Kammen A., et de Vries S. C., (1992). A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant Cell*, **4**, 425-433.

de Jong A. J., Schmidt E. D. I., et de Vries S. C., (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, **22**, 367-377.

de Vries S. C., Booij H., Janssens R., Vogels R., Saris L., Lo Schiavo F., Terzi M., et van Kammen A., (1988a). Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes and Development*, **2**, 462-476.

de Vries S. C., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde H. D., Thomas T. L., et van Kammen A., (1988b). Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, **176**, 196-204.

Décout E., (1998). Recherche de marqueurs cytologiques et biochimiques de la différenciation embryogène et caulogène dans des feuilles d'une chicorée hybride. Thèse, Reims, p 141.

Décout E., Dubois T., Guedira M., Dubois J., Audran J. C., et Vasseur J., (1994). Role of temperature as triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, **45**, 1859-1865.

Delbreil B., (1992). Etude de l'embryogenèse somatique chez l'asperge cultivée, *Asparagus officinalis* L. et son application à la transformation de l'espèce par *Agrobacterium tumefaciens*. Thèse, Paris, p 148.

Delbreil B., Goebel-Tourand I., Lefrançois C., et Jullien M., (1994). Isolation and characterization of long-term embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 194-200.

Delbreil B. et Jullien M., (1994). Evidence for *in vitro* induced mutation which improves somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Reports*, **13**, 372-376.

Dellaporta S. L., Wood J., et Hicks J. B., (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reproduction*, **1**, 19-21.

Dominov J. A., Stenzler L., Lee S., Schwarz J. J., Leisner S., et Howell S. H., (1992). Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. *Plant Cell*, **4**, 451-461.

Domon J. M., Dumas B., Lainé E., Meyer Y., David A., et 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 Physiology*, **108**, 141-148.

Domon J. M., Meyer Y., Faye L., David A., et 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 Physiology and Biochemistry*, **32**, 137-147.

Doré C., (1975). La multiplication clonale de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) par culture *in vitro* : son utilisation en sélection. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, **25**, 201-244.

Dubois T., Dubois J., Guedira M., Diop A., et Vasseur J., (1992). SEM characterization of an extracellular matrix around somatic proembryos in roots of *Cichorium*. *Annals of Botany*, **70**, 119-124.

Dubois T., Dubois J., Guedira M., et Vasseur J., (1988). Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoïdes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **307**, 669-675.

Références bibliographiques

Dubois T., Guedira M., Dubois J., et Vasseur J., (1990). Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium* : Is callose an early marker? *Annals of Botany*, **65**, 539-545.

Dubois T., Guedira M., Dubois J., et Vasseur J., (1991). Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, **162**, 120-127.

Dudits D., Györgyey J., Bögre L., et Bakò L., (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. In: *In vitro* embryogenesis in plants, Eds Thorpe T.A., Kluwer academics publishers, Dordrecht, 267-308.

Dunstan D. I. et Bock C. A., (1997). Abscisic acid [(+)-ABA] content in white spruce somatic embryo tissues related to concentration of fed ABA. *Journal of Plant Physiology*, **150**, 691-696.

Egertsdotter U. et von Arnold S., (1995). Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum*, **93**, 334-345.

El Hadrami I., Michaux-Ferrière N., Carron M. P., et D'Auzac J., (1989). Les polyamines, facteur limitant possible de l'embryogenèse somatique chez l'*Hevea brasiliensis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **308**, 205-211.

El Maâtaoui M., Espagnac H., et Michaux-Ferrière N., (1990). Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of Cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. *Annals of Botany*, **66**, 183-190.

Fambrini M., Cionini G., et Pugliesi C., (1996). Development of somatic embryos from morphogenetic cells of the interspecific hybrid *Helianthus annuus* X *Helianthus tuberosus*. *Plant Science*, **114**, 205-214.

Fambrini M., Cionini G., et Pugliesi C., (1997). Acquisition of high embryogenic potential in regenerated plants of *Helianthus annuus* x *H. tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **51**, 103-110.

Faure O., Aarouf J., et Nougarede A., (1996). Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.) : proembryogenesis. *Annals of Botany*, **78**, 23-28.

Feirer R., Mignon G., et Litvay J. D., (1984). Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in wild carrot. *Science*, **223**, 1433-1435.

Filipecki M. K., Sommer H., et Malepszy S., (1997). The MADS-box gene *CUS1* is expressed during cucumber somatic embryogenesis. *Plant Science*, **125**, 63-74.

Finstad K., Brown D. C. W., et Joy K., (1993). Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **34**, 125-132.

Flores S. et Towbin E. M., (1988). Cytokinin modulation of LHCP mRNA levels: the involvement of post-transcriptional regulation. *Plant Molecular Biology*, **11**, 409-415.

Gaiotto F. A., Bramucci M., et Grattapaglia D., (1997). Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 842-849.

Galston A. W. et Kaur-Sawhney R., (1995). Polyamines as endogenous growth regulators. In: *Plant hormones and their role in plant growth and development.*, Eds Davies P.J., Nijhoff, M., Dordrecht, 158-178.

Gavin A. L., Conger B. V., et Trigiano R. N., (1989). Sexual transmission of somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. *Plant Breeding*, **103**, 251-254.

Gavish H., Vardi A., et Fluhr R., (1991). Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cultures. *Physiologia Plantarum*, **82**, 606-616.

Ghosh B. et Sen S., (1991). Plant regeneration through somatic embryogenesis from spear callus culture of *Asparagus cooperi* Baker. *Plant Cell Reports*, **9**, 667-670.

Giroux R. W. et Pauls K. P., (1996). Characterization of embryogenesis-related proteins in alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiologia Plantarum*, **96**, 585-592.

Références bibliographiques

Giroux R. W. et Pauls K. P., (1997). Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, **33**, 393-404.

Gottlieb L. D. et de Vienne D., (1988). Assessment of pleiotropic effects of a gene substitution in Pea by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Genetics*, **119**, 705-710.

Guerra M. P. et Handro W., (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. *Journal of Plant Research*, **111**, 65-71.

Guilfoyle T., Hagen G., Ulmasov T., et Murfett J., (1998). How does auxin turn on genes? *Plant Physiology*, **118**, 341-347.

Guiltinan M. J., Thomas J. C., Nessler C. L., et Thomas T. L., (1989). Expression of DNA binding proteins in carrot somatic embryos that specifically interact with a *cis* regulatory element of the French bean phaseolin gene. *Plant Molecular Biology*, **13**, 605-610.

Györgyey J., Németh K., Magyar Z., Kelemen Z., Alliotte T., Inzé D., et Dudits D., (1997). Expression of a novel-type small proline-rich protein gene of alfalfa is induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in dedifferentiated callus cells. *Plant Molecular Biology*, **34**, 593-602.

Hadfi K., Speth V., et Neuhaus G., (1998). Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development*, **125**, 879-887.

Hahne G., Mayer J. E., et Lörz H., (1988). Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Science*, **55**, 267-279.

Harada H., (1973). Differentiation of shoots, roots and somatic embryos in *Asparagus* tissue culture. 4^{ème} réunion sur la sélection de l'asperge, Versailles, 163-172.

Harada J. J., Lotan T., Fischer R. L., et Goldberg R. B., (1998). Response : embryos without sex. *Trends in Plant Science*, **3**, 452-453.

Hasegawa P. M., Murashige T., et Takatori F. H., (1973). Propagation of *Asparagus* through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *Journal of American Society of Horticultural Science*, **98**, 143-148.

Hashmi G., Huettel R., Meyer R., Krusberg L., et Hammerschlag F., (1997). RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*, **16**, 624-627.

Helleboid S., (1998). Caractérisation de protéines extracellulaires reliées aux phases précoces de l'embryogenèse somatique d'un *Cichorium* hybride. Analyse immunocytologique et moléculaire de l'implication de β -1,3-glucanases accumulées au cours du processus embryogène. Thèse, Compiègne, p 142.

Helleboid S., Couillerot J. P., Hilbert J. L., et 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.

Henry Y., Vain P., et De Buyser J., (1994). Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica*, **79**, 45-58.

Hernandez-Fernandez M. M. et Christie B. R., (1989). Inheritance of somatic embryogenesis in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genome*, **32**, 318-321.

Hess J. R. et Carman J. G., (1998). Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. *Crop Science*, **38**, 249-253.

Higashi K., Daita M., Kobayashi T., Sasaki K., Harada H., et Kamada H., (1998). Inhibitory conditioning for carrot somatic embryogenesis in high-cell-density cultures. *Plant Cell Reports*, **18**, 2-6.

Higgins P. et Mathias R. J., (1987). The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. *Theoretical and Applied Genetics*, **74**, 439-44.

Hilbert J. L., Dubois T., et Vasseur J., (1992). Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **30**, 733-741.

Hochstrasser D. F., Harrington M. G., Hochstrasser A. C., Miller M. J., et Merrill C. R., (1988). Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Annals of Biochemistry*, **173**, 424-435.

Hodges T. K., Kamo K. K., Imbrie C. W., et Becvar M. R., (1986). Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Biotechnology*, **4**, 219-223.

Hooley R., (1998). Auxin signaling: Homing in with targeted genetics. *Plant Cell*, **10**, 1581-1583.

Hunault G., (1973). Etude de l'histogenèse au cours de la formation du cal sur des fragments de tiges d'Asperge (*Asparagus officinalis* L.) cultivés *in vitro*. *Revue de Cytologie et Biologie Végétales*, **36**, 335-356.

Hunault G., (1975). Influence de différents milieux de culture sur la croissance de tissus d'Asperge (*Asparagus officinalis* L.) cultivés *in vitro*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **280**, 2661-2664.

Hunault G., (1979). Recherche sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés *in vitro*. III Etude du cas de plusieurs Liliacées. *Revue de Cytologie et Biologie Végétales*, **2**, 103-154.

Ivanova A., Velcheva M., Denchev P., Atanassov A., et Van Onckelen H. A., (1994). Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiologia Plantarum*, **92**, 85-89.

Jansen M. A. K., Booij H., Schel J. H. N., et de Vries S. C., (1990). Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports*, **9**, 221-223.

Jones H. A. et Robbins W. W., (1928). The asparagus industry in California. *University of California Bulletin*, **446**, 3-105.

Références bibliographiques

Jourdain I., Lelu M.-A., et Label P., (1997). Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch. *Plant Physiology and Biochemistry*, **35**, 741-749.

Jullien M., (1974). La culture *in vitro* de cellules du tissu foliaire d'*Asparagus officinalis* L. : obtention de souches à embryogenèse permanente et régénération de plantes entières. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, **279**, 747-750.

Kapros T., Bögre L., Németh K., Bakò L., Györgyey J., Wu S. C., et Dudits D., (1992). Differential expression of histone H3 gene variants during cell cycle and somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Physiology*, **98**, 621-625.

Kielly G. A. et Bowley S. R., (1992). Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome*, **35**, 474-477.

Kikushi A., Satoh S., Nakamura N., et Fujii T., (1995). Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. *Plant Cell Reports*, **14**, 279-284.

Kintzios S. E. et Taravira N., (1997). Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Breeding*, **116**, 359-362.

Kiyosue T., Satoh S., Kamada H., et Harada H., (1992). Immunological detection of an embryogenic-cell protein (ECP31) during stress-induced somatic embryogenesis in carrot. *Canadian Journal of Botany*, **70**, 651-653.

Kiyosue T., Shiota H., Higashi K., Kamada H., et Shinozaki K., (1998). A chromo box gene from carrot (*Daucus carota* L.): its cDNA structure and expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1398**, 42-46.

Kiyosue T., Takano K., Kamada H., et Harada H., (1990). Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Canadian Journal of Botany*, **68**, 2301-2303.

Kohmura H., Chokyu S., et Harada T., (1994). An effective micropropagation system using embryogenic calli induced from bud clusters in *Asparagus officinalis* L. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, **63**, 51-59.

Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukuhara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., Nomura K., et Fukimura T., (1992). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures : physiology, biochemistry, and molecular biology. In *Vitro Cell Developmental Biology*, **28**, 11-14.

Konar R. N., Thomas E., et Street H. E., (1972). Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus sceleratus* L. Journal of Cell Science, **11**, 77-93.

Kraepiel Y., Marrec K., Sotta B., Caboche M., et Miginiac E., (1995). *In vitro* morphogenic characteristics of phytochrome mutant in *Nicotiana plumbaginifolia* are modified and correlated to high Indole-3-acetic Acid levels. *Planta*, **197**, 142-146.

Kraepiel Y., Rousselin P., Sotta B., Kerhoas L., Einhorn J., Caboche M., et Miginiac E., (1994). Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *The Plant Journal*, **6**, 665-672.

Kreuger M. et van Holst G. J., (1993). Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, **189**, 243-248.

Kunitake H. et Mii M., (1998). Somatic embryogenesis and its application for breeding and micropropagation in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Biotechnology*, **15**, 51-61.

Laparra H., Stoeva P., Ivanov P., et Hahne G., (1997). Plant regeneration from different explants in *Helianthus smithii* Heiser. *Plant Cell Reports*, **16**, 692-695.

Leclerc H., (1984). Les légumes de France. eds Eds Masson, Paris, pp. 257.

Références bibliographiques

Levi A. et Sink K. C., (1990). Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in *Asparagus*. *Journal of Plant Physiology*, **137**, 184-189.

Levi A. et Sink K. C., (1991a). Histology and morphology of asparagus somatic embryos. *HortScience*, **26**, 1322-1324.

Levi A. et Sink K. C., (1991b). Somatic embryogenesis in asparagus : the role of explants and growth regulators. *Plant Cell Reports*, **10**, 71-75.

Levi A. et Sink K. C., (1992). Asparagus somatic embryos: production in suspension culture and conversion to plantlets on solidified medium as influenced by carbohydrate regime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **31**, 115-122.

Levi A., Volokita M., Guri A., et Sink K. C., (1986). Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* . 6^{ème} IAPTC Congress, Mineapolis, 134.

Leyser O., (1997). Auxin: Lessons from a mutant weed. *Physiologia Plantarum*, **100**, 407-414.

Li B. et Wolyn D. J., (1996). Temperature and genotype affect asparagus embryogenesis. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, **32**, 136-139.

Lo Schiavo F., Giuliano G., de Vries S. C., Genga A., Bollini R., Pitto L., Cozzani F., Nuti-Ronchi V., et Terzi M., (1990). A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Molecular General Genetics*, **223**, 385-393.

Luo Y. K. et Koop H. U., (1997). Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta*, **202**, 387-396.

Maatar A. et Hunault G., (1997). Effect of growth regulators on polyamine level of tissues during somatic embryogenesis induction in fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciencesde Paris*, **320**, 245-251.

Marques C. M., Araujo J. A., Ferreira J. G., Whetten R., O'Malley D. M., Liu B. H., et Sederoff R., (1998). AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 727-737.

Marsan P. A., Castiglioni P., Fusari F., Kuiper M., et Motto M., (1998). Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 219-227.

Martinelli L., Scienza A., Villa P., De Ponti P., et Gianazza E., (1993). Enzyme markers for somatic embryogenesis in *Vitis*. *Journal of Plant Physiology*, **141**, 476-481.

Masuda H., Oohashi S. I., Tokuji Y., et Mizue Y., (1995). Direct embryo formation from epidermal cells of carrot hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*, **145**, 531-534.

May R. A. et Sink K. C., (1995). Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of *Asparagus officinalis* L. *Plant Science*, **108**, 71-84.

Meins F. J., (1989). Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. *Annual Review of Genetic*, **23**, 395-408.

Meins F. J. et Foster R., (1986). A cytokinin mutant derived from cultured tobacco cells. *Developmental Genetics*, **7**, 159-165.

Meins F. J., Foster R., et Lutz J., (1983). Evidence for a mendelian factor controlling the cytokinin requirement of cultured tobacco cells. *Developmental Genetics*, **4**, 129-141.

Memelink J., Hoge J. H. C., et Schilperoort R. A., (1987). Cytokinin stress changes the developmental regulation of several defence-related genes in tobacco. *EMBO Journal*, **6**, 3579-3583.

Michaux-Ferrière N., Grout H., et Carron M. P., (1992). Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany*, **79**, 174-180.

Références bibliographiques

Michaux-Ferrière N. et Schwendiman J., (1992). Histology of somatic embryogenesis. In: Reproductive biology and plant breeding, Eds Dattée Y., Dumas C., Gallais A., Springer-Verlag, Berlin, 247-259.

Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., et Strong F. M., (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. Journal of American Chemistry Society, **78**, 1392.

Momiyama T., Afele J. C., Saito T., Kayano T., Tabei Y., Takaiwa F., Takayanagi K., et Nishimura S., (1995). Differential display identifies developmentally regulated genes during somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications, **213**, 376-382.

Mordhorst A. P., Voerman K. J., Hartog M. V., Meijer E. A., vanWent J., Koornneef M., et deVries S. C., (1998). Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. Genetics, **149**, 549-563.

Mukhopadhyay S. et Desjardins Y., (1994). A comparative study on mode of culture and plant regeneration from protoplast-derived somatic embryos of two genotypes of *Asparagus officinalis* L. Plant Science, **100**, 97-104.

Mullendore N., (1935). Anatomy of seedling of *Asparagus officinalis* L. Botanical Gazette, **97**, 356-375.

Murashige T. et Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, **15**, 473-497.

Nakamura T., Taniguchi T., et Maeda E., (1992). Studies on somatic embryogenesis in coffee by scanning electron microscope. Japanese Journal of Crop Science, **61**, 476-486.

Nakashima T., Kunitake H., Mori K., et Tanaka M., (1993). The development of embryoid and shoot primordia. 5. *In vitro* mass-propagation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Bulletin of Saga University, **28**, 12-29.

Références bibliographiques

Navarro C., Escobedo R. M., et Mayo A., (1997). *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **51**, 17-25.

Nitsch J. P., (1968). Induction *in vitro* de la floraison chez une plante de jours courts : *Plumbago indica* L. *Annales de la Société Nationale de Botanique*, **9**, 1-9.

Nitsch J. P. et Nitsch C., (1965). Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L. *Annales de physiologie végétale*, **7**, 251-256.

Nomura K. et Komamine A., (1986). Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, **3**, 456-465.

Novy R. G. et Vorsa N., (1995). Identification of intracultivar genetic heterogeneity in cranberry using silver-stained RAPDs. *HortScience*, **30**, 600-604.

Food and Agricultural Organization (1998). Site internet: <http://apps.fao.org>.

Odake Y., Udagawa A., Saga H., et Mii M., (1993). Somatic embryogenesis of tetraploid plants from internodal segments of a diploid cultivar of *Asparagus officinalis* L. grown in liquid culture. *Plant Science*, **94**, 173-177.

Ouelhazi L., Hamdi S., Chenieux J.-C., et Rideau M., (1994). Cytokinin and auxin-induced regulation of protein synthesis and poly (A+) RNA accumulation, in *Catharanthus roseus* cell culture. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 167-174.

Pedroso M. C., Hilbert J. L., Vasseur J., et Pais S., (1995). Polypeptides associated with the induction of direct somatic embryogenesis in *Camellia japonica* leaves I. Identification of embryo-specific polypeptides. *Journal of Experimental Botany*, **46**, 1579-1584.

Pedroso M. C. et Pais M. S., (1992). A scanning electron microscopy and X-ray microanalysis study during induction of morphogenesis in *Camellia japonica* L. *Plant Science*, **87**, 99-108.

Références bibliographiques

Pedroso M. C., Primikirios N., Roubelakis-Angelakis K. A., et Pais M. S., (1997). Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of camellia leaves before and during direct somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, **101**, 213-219.

Pennel R. I., Janniche L., Scoffield G. N., Booij H., de Vries S. C., et Roberts K., (1992). Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *Journal of Cell Biology*, **119**,

Pitto L., Lo Schiavo F., Giuliano G., et Terzi M., (1983). Analysis of heat-shock protein pattern during somatic embryogenesis of carrot. *Plant Molecular Biology*, **2**, 231-237.

Pramanik S. K. et Bewley J. D., (1996). Post-transcriptional regulation of protein synthesis during alfalfa embryogenesis: proteins associated with the cytoplasmic polysomal and non-polysomal mRNA_s (Messenger ribonucleoprotein complex). *Journal of Experimental Botany*, **45**, 1871-1879.

Qi X. et Lindhout P., (1997). Development of AFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics*, **254**, 330-336.

Rajasekaran K., Hein M. B., Davis G. C., Carnes M. G., et Vasil I. K., (1987). Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *Journal of Plant Physiology*, **130**, 13-25.

Ramagopal S., (1989). Barley proteins associated with tissue dedifferentiation. *Journal of Plant Physiology*, **134**, 395-405.

Reidiboym L., (1998). Embryogenèse somatique chez le merisier (*Prunus avium* L.). Recherche de marqueurs lipidiques et d'une protéine de transfert de lipides. Thèse, Compiègne, p 159.

Reinert J., (1958). Morphogenese und ihre kontrolle an gewebekulturen aus carotten. *Naturwissenschaften*, **45**, 344-345.

Renaudin J. P., Tournaire C., et Teyssendier de la Serve B., (1991). Quantitative analysis of protein changes during meristem initiation and bud development in protoplast-derived *Petunia hybrida* callus. *Physiologia Plantarum*, **82**, 48-56.

Reuther G., (1977). Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus of *Asparagus* and *Iris* and its possible application. *Acta Horticulturae*, **78**, 217-224.

Rhodes C. A., Green C. E., et Phillips R. L., (1986). Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. *Plant Science*, **46**, 225-232.

Ribnicky D. M., Ilic N., Cohen J. D., et Cooke T. J., (1996). The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. *Plant Physiology*, **112**, 549-558.

Richmond E. A. et Lang A., (1957). Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science*, **125**, 650-651.

Rivière S., (1973). Les activités méristématiques durant l'ontogenèse d'une plantule de monocotylédone à germination hypogée : *Asparagus officinalis* L. (Liliacées). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **277**, 293-296.

Roupe van der Voort J. R., Wolters P., Folkertsma R., Hutten R., van Zandvoort P., Vinke H., Kanyuka K., Bendahmane A., Jacobsen E., Janssen R., et Bakker J., (1997). Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 874-880.

Roustan J. P., Latché A., et Fallot J., (1994). Role of ethylene on induction and expression of carrot somatic embryogenesis : relationship with polyamine metabolism. *Plant Science*, **103**, 223-229.

Rout G. R., Samantaray S., Mottley J., Yokoya K., Mandegaran Z., Sarasan V., Kandasamy K., Roberts A. V., et Das P., (1998). Histology of *in vitro* organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa*. *Biologia, Bratislava*, **53**, 121-126.

Russell J. R., Fuller J. D., Macauley M., Hatz B. G., et Jahoor A., (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 714-722.

Sachs T. et Thimann K. V., (1964). Release of lateral buds from apical dominance. *Nature*, **201**, 939-940.

Sagare A. P., Suhasini K., et Krishnamurthy K. V., (1995). Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Science*, **109**, 87-93.

Samaj J., Bobak M., Blehova A., Kristin J., et Auxtova-Samajova O., (1995). Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays*. *Protoplasma*, **186**, 45-49.

Sano H. et Youssefian S., (1994). Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. *Proceedings of National Academy of Science USA*, **91**, 2582-2586.

Schmidt E. D. L., Guzzo F., Toonen M., et De Vries S. C., (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, **124**, 2049-2062.

Schmülling T., Schäfer S., et Romanov G., (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiologia Plantarum*, **100**, 505-519.

Sharp W. R., Sondahl M. R., Caldas L. S., et Maraffa S. B., (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews*, **2**, 268-309.

Sitbon F. et Perrot-Rechemann C., (1997). Expression of auxin-regulated genes. *Physiologia Plantarum*, **100**, 443.

Skirvin R. M., McPheeters K. D., et Norton M., (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, **29**,

Références bibliographiques

Skoog F. et Miller C. O., (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposium of Society of Experimental Biology, **11**, 1018-1131.

Smith D. L. et Krikorian A. D., (1992). Low external pH prevents cell elongation but not multiplication of embryogenic carrot cells. *Physiologia Plantarum*, **84**, 495-501.

Sondahl M. R., Salisbury J. L., et Sharp W. R., (1979). SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **94**, 185-188.

Sterk P., Booij H., Schellekens G. A., van Kammen A., et de Vries S. C., (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*, **3**, 907-921.

Stetler D. A. et Laetsch W. M., (1965). Kinetin-induced chloroplast maturation in culture of tobacco tissues. *Science*, **149**, 1387-1388.

Steward F. C., Mapes M. O., et Mearns K., (1958). Growth and organized development of cultured cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, **45**, 705-708.

Stirn S. et Jacobsen H. J., (1987). Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Reports*, **6**, 50-54.

Sung Z. R. et Okimoto R., (1981). Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proceeding of National Academy of Science USA*, **78**, 3683-3687.

Takatori F. H., Murashige T., et Stillman J. I., (1968). Vegetative propagation of asparagus through tissue culture. *HortScience*, **3**, 20-22.

Tétu T., Sangwan R. S., et Sangwan-Norreel B. S., (1987). Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus. *Journal of Experimental Botany*, **38**, 506-517.

Thévenin L. et Doré C., (1976). L'amélioration de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) et son atout majeur, la culture *in vitro*. Annales de l'Amélioration des Plantes, **26**, 655-674.

Toonen M. A. J., Hendriks T., Schmidt E. D. L., Verhoeven H. A., van Kammen A., et de Vries S. C., (1994). Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures video cell tracking. *Planta*, **194**, 565-572.

Toonen M. A. J., Schmidt E. D. L., Hendriks T., Verhoeven H. A., van Kammen A., et de Vries S. C., (1996). Expression of the JIM8 cell wall epitope in carrot somatic embryogenesis. *Planta*, **200**, 167-173.

Toonen M. A. J., Schmidt E. D. L., van Kammen A., et de Vries S. C., (1997). Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta*, **203**, 188-195.

Trigiano R. N., Gray D. J., Conger B. V., et McDaniel J. K., (1989). Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Botanical Gazette*, **150**, 72-77.

van Engelen F. A., Sterk P., Booij H., Cordewener J. H. G., Rook W., van Kammen A. B., et de Vries S. C., (1991). Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. *Plant Physiology*, **96**, 705-712.

Vasil V. et Vasil I. K., (1982). The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. In cultured immature embryos. *Botanical Gazette*, **143**, 454-465.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., et M. Z., (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414.

Wang Y. H., Thomas C. E., et Dean R. A., (1997). A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 791-798.

Watson L. et Dallwitz M. J., (1992). The families of flowering plants. Site internet : <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.

Wilde H. D., Nelson W. S., Booij H., de Vries S. C., et Thomas T. L., (1988). Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta*, **176**, 205-211.

Williams E. G. et Maheswaran G., (1986). Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, **57**, 443-462.

Willman M. R., Schroll S. M., et Hodges T. K., (1989). Inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from primary (type I) callus in maize. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, **25**, 95-100.

Wilmar C. et Hellendoorn M., (1968). Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro*. *Nature*, **217**, 369-370.

Wurtele E. S., Wang H., Durgerian S., Nikolau B. J., et Ulrich T. H., (1993). Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiology*, **102**, 303-312.

Yakuwa T., Harada T., Saga K., et Shiga Y., (1971a). Studies on the morphogenesis of asparagus. I. Callus formation originating in the pith tissue of asparagus spears in tissue culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **40**, 30-36.

Yakuwa T., Harada T., Saga K., et Shiga Y., (1971b). Studies on the morphogenesis of asparagus. II. Effect of auxins and 6-benzyladenine on callus and organ formation of stem pieces cultured *in vitro*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **40**, 11-17.

Yang H. J. et Clore W. J., (1973). Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. *HortScience*, **41**, 141-143.

Références bibliographiques

Yeung E. C., (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: *In vitro* embryogenesis in plants, Eds Thorpe T.A., Kluwer academic publishers, Dordrecht, 205-247.

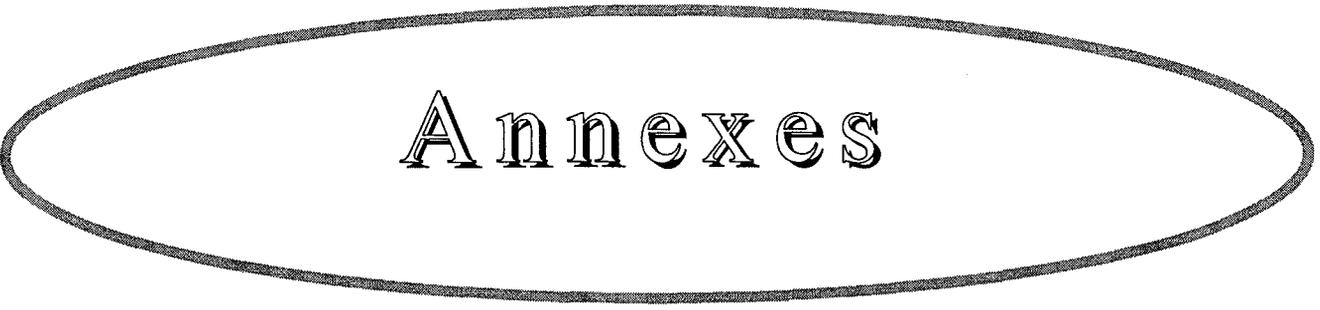
Yeung E. C., Aitken C., Biondi J., et Thorpe T. A., (1981). Shoot histogenesis in cotyledon explants of *radiata pine*. *Botanical Gazette*, **142**, 494-501.

Yu K. et Pauls K. P., (1993). Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Molecular Biology*, **22**, 269-277.

Zabeau M. et Vos P., (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application number 924026297, **Publication number 0 534 858 A1**,

Zimmerman J. L., (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, **5**, 1411-1423.

Zivy M., (1986). Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent. In: *Recent Progresses in Two-Dimensional Electrophoresis*, Eds Galteau M.M., Siest G., Presses Universitaires de Nancy, Nancy, 69-72.



Annexes

6.1. Annexe 1 : Les milieux de culture

Solutions mères :

- Macroéléments de Murashige et Skoog (X 10):

NH ₄ NO ₃	206,1 mM
KNO ₃	187,9 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	29,9 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	15 mM
KH ₂ PO ₄	12,5 mM

- Microéléments de Nitsch (X 100) :

MnSO ₄ , 4H ₂ O	110 mM
H ₃ BO ₃	160 mM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	34,78 mM
Na ₂ MO ₄ , 2H ₂ O	1,03 mM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,1 mM

- Vitamines de Nitsch et Nitsch (X1000) :

Myo-inositol	560 mM
A. Nicotinique	40,62 mM
Pyridoxine HCl	2,43 mM
Thiamine HCl	1,48 mM
Glycine	26,64 mM
A. folique	1,13 mM
Biotine	0,21 mM

- FeNa EDTA (X 10) : 1 mM

Milieux de culture (MSN) :

- Macroéléments de Murashige et Skoog (X 10)	100 ml
- Microéléments de Nitsch (X 100)	1 ml
- Vitamines de Nitsch et Nitsch (X1000)	1 ml
- FeNa EDTA (X 10)	10 ml
- H ₂ O	QSP 1000 ml

Milieux avec régulateurs de croissance

MSN A1/Z	= MSN + 1 mg.l ⁻¹ d'ANA + 1 mg.l ⁻¹ de zéatine
MSN A0,1/Z1	= MSN + 0,1 mg.l ⁻¹ d'ANA + 1 mg.l ⁻¹ de zéatine
MSN A0,1/Z0,1	= MSN + 0,1 mg.l ⁻¹ d'ANA + 0,1 mg.l ⁻¹ de zéatine
MSN A0,1/K0,1	= MSN + 0,1 mg.l ⁻¹ d'ANA + 0,1 mg.l ⁻¹ de kinétine
MSN A0,1/K1	= MSN + 0,1 mg.l ⁻¹ d'ANA + 1 mg.l ⁻¹ de kinétine
MSN A1/K0,1	= MSN + 1 mg.l ⁻¹ d'ANA + 0,1 mg.l ⁻¹ de kinétine
ANA	= MSN + 10 mg.l ⁻¹ d'ANA

6.2. Annexe 2 : Electrophorèse bidimensionnelle

Tampon de lyse UKS

Urée	28,5 g
K ₂ CO ₃	0,345 g
Triton X100	1 ml
DTT	0,25 g
Ampholines : pH3 à 10	1 ml
SDS	0,625 g
H ₂ O	QSP 50 ml

Gel d'IEF :

Urée	10 g
H ₂ O	6 ml
Acryl/PDA (30%/0,8%)	2,5 ml
Ampholines : pH 3 à 10 :	0,9 ml
pH 5 à 7 :	0,1 ml
Triton 10%	2 ml
APS 10 %	40 µl
Temed	20 µl

Gel 2D 12,5 %

Acryl/PDA (30%/0,8%)	25 ml
TrisHCl 1,5 M, pH8,8	15 ml
H ₂ O	19,1 ml
APS 10%	0,3 ml
Temed	30 µl

Tampon de migration

Glycine	28,8 g
Tris	6 g
SDS	1 g
H ₂ O	QSP 1000 ml

Tampon de Laemmli

Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	1,25 ml
Glycérol	2 ml
SDS	200 mg
DTT	154,3 mg
Bleu de Bromophénol(0,05%)	50 µl
H ₂ O	QSP 10 ml

Tampon d'équilibration

Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	QSP 100 ml
SDS	2,3 g

Acide orthophosphorique : 3,04 ml d'H₃PO₄ 85 % QSP 4,5 litres

Soude : 20 ml NaOH 4 % (1 M) QSP 1 litre

Révélation des gels à l'argent (Blum *et al.*, 1987)

Étapes	Solutions	Durée
Fixation	éthanol 50% (v/v) acide acétique 12% (v/v) formaldéhyde 0,05% (v/v)	1 heure minimum
Rinçages	éthanol 50% (v/v)	3x20 minutes
Prétraitement	Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O: 0,2 g/l	1 minute
Rinçages	H ₂ O bidistillée	3x20 secondes
imprégnation	AgNO ₃ : 1 g/l, formaldéhyde 0,03% (v/v)	20 minutes
Rinçage	H ₂ O bidistillée	2x20 secondes
Révélation	Na ₂ CO ₃ : 60 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O 0,4% (v/v) formaldéhyde 0,2% (v/v)	10 minutes
Rinçages	H ₂ O bidistillée	20 secondes
Arrêt de la révélation	éthanol 50% (v/v) acide acétique 12% (v/v)	10 minutes
Conservation des gels	éthanol 50% (v/v)	plusieurs jours

6.3. Annexe 3 : liste des amorces

Amorce RAPD

Kit A

A-01 CAGGCCCTTC A-06 GGTCCCTGAC A-11 CAATCGCCGT A-16 AGCCAGCGAA
A-02 TGCCGAGCTG A-07 GAAACGGGTG A-12 TCGGCGATAG A-17 GACCGCTTGT
A-03 AGTCAGCCAC A-08 GTGACGTAGG A-13 CAGCACCCAC A-18 AGGTGACCGT
A-04 AATCGGGCTG A-09 GGGTAACGCC A-14 TCTGTGCTGG A-19 CAAACGTCCG
A-05 AGGGGTCTTG A-10 GTGATCGCAG A-15 TTCCGAACCC A-20 GTTGCGATCC

Kit B

B-01 GTTTCGCYCC B-06 TGCTCTGCCC B-11 GTAGACCCGT B-16 TTTGCCCGGA
B-02 TGATCCCTGG B-07 GGTGACGCAG B-12 CCTTGACGCA B-17 AGGGAACGAG
B-03 CATCCCCCTG A-08 GTCCACACGG B-13 TTCCCCGCT B-19 CCACAGCAGT
B-04 GGACTGGAGT B-09 TGGGGGACTC B-14 TCCGCTCTGG B-20 ACCCCCGAAG
B-05 TGCGCCCTTC B-10 CTGCTGGGAC B-15 GGAGGGTGTT B-21 GGACCCTTAC

Kit C

C-01 TTCGAGCCAG C-06 GAACGGACTC C-11 AAAGCTGCGG C-16 CACACTCCAG
C-02 GTGAGGCGTC C-07 GTCCCGACGA C-12 TGTCATCCCC C-17 TTCCCCCAG
C-03 GGGGGTCTTT C-08 TGGACCGGTG C-13 AAGCCTCGTC C-18 TGAGTGGGTG
C-04 CCGCATCTAC C-09 CTCACCGTCC C-14 TCGTGCTTG C-19 GTTGCCAGCC
C-05 GATGACCGCC C-10 TGTCTGGGTG C-15 GACGGATCAG C-20 ACTTCGCCAC

Kit D

D-01 ACCGCGAAGG **D-06** ACCTGAACGG **D-11** AGCGCCATTG **D-16** AGGGCGTAAG
D-02 GGACCCAACC **D-07** TTGGCACGGG **D-12** CACCGTATCC **D-17** TTTCCCACGG
D-03 GTCGCCGTCA **A-08** GTGTGCCCCA **D-13** GGGGTGACGA **D-18** GAGAGCCAAC
D-04 TCTGGTGAGG **D-09** CTCTGGAGAC **D-14** CTTCCCCAAG **D-19** CTGGGGACTT
D-05 TGAGCGGACA **D-10** GGTCTACACC **D-15** CATCCGTGCT **D-20** ACCCGGTCAC

Kit E

E-01 CCAAGGTCC **E-06** AAGACCCCTC **E-11** GAGTCTCAGG **E-16** GGTGACTGTG
E-02 GGTGCGGGAA **E-07** AGATGCAGCC **E-12** TTATCGCCCC **E-17** CTA CTG CCGT
E-03 CCAGATGCAC **A-08** TCACCACGGT **E-13** CCCGATTCGG **E-18** GGACTGCAGA
E-04 GTGACATGCC **E-09** CTTACCCCGA **E-14** TGCGGCTGAG **E-19** ACGGCGTATG
E-05 TCAGGGAGGT **E-10** CACCAGGTGA **E-15** ACGCACAACC **E-20** AACGGTGACC

Kit F

F-01 ACGGATCCTG **F-06** GGGAATTCGG **F-11** TTGGTACCCC **F-16** GGAGTACTGG
F-02 GAGGATCCCT **F-07** CCGATATCCC **F-12** ACGGTACCAG **F-17** AACCCGGGAA
F-03 CCTGATCACC **A-08** GGGATATCGG **F-13** GGCTGCAGAA **F-18** TTCCCGGGTT
F-04 GGTGATCAGG **F-09** CCAAGCTTCC **F-14** TGCTGCAGGT **F-19** CCTCTAGACC
F-05 CCGAATTCCC **F-10** GGAAGCTTGG **F-15** CCAGTACTCC **F-20** GGTCTAGAGG

Amorces AFLP

Pst 31 : 5'-GAC TGC GTA CAT GCA G+AAA-3'

Pst 32 : 5'-GAC TGC GTA CAT GCA G+AAC-3'

Pst 33 : 5'-GAC TGC GTA CAT GCA G+AAG-3'

Pst 34 : 5'-GAC TGC GTA CAT GCA G+AAT-3'

Mse 47 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+CAA-3'

Mse 48 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+CAC-3'

Mse 49 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+CAG-3'

Mse 50 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+CAT-3'

Mse 51 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+CCA-3'

6.4. Annexe 4 : publication acceptée dans Plant Science le 3 Mai 1999.

Histological and 2-D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L.

Laurent Dupire, Eric Décout, Jacques Vasseur, Bruno Delbreil

Laboratoire de Physiologie et de Morphogenèse Végétales, Bat. SN2, USTL, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

Corresponding author: B. Delbreil

Laboratoire de Physiologie et de Morphogenèse Végétales, Bat. SN2, USTL, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. Fax: 03 20 33 72 44, E-mail: Bruno.Delbreil@univ-lille1.fr

Summary

We study the induction of somatic embryogenesis using an original *Asparagus* model : a mutant type which an important somatic embryogenesis and its non-embryogenic wild type used as control. We describe the histological events and the modifications of protein patterns occurring during the initiation of somatic embryogenesis in cultures of apices. Using the mutant type apices, pro-embryogenic masses and embryogenic cells are observed at the periphery of the callus after transfer on hormone-free medium while in the same culture conditions, the wild type calli never show embryogenic structure. Analysis of the tissular proteins during the culture leads us to classify 116 proteins into 20 groups potentially related to somatic embryogenesis. Two of these groups are particularly interesting as they correspond to polypeptides that are only related to one of the 2 types : 6 polypeptides (group 1) are specific to the mutant type apices and could be related to the competence of the mutant tissues with respect to somatic embryogenesis. Eleven proteins (group 7) are detected specifically in the wild type tissues and their presence could be related to an inhibition of the somatic embryogenesis ability.

Key words - *Asparagus officinalis*, histology, somatic embryogenesis, 2D-PAGE.

Abbreviations - NAA, Naphtyl Acetic Acid ; PEM, Proembryogenic Mass.

Introduction

Somatic embryogenesis is a characteristic of higher plants not observed in the animal kingdom [1]. This phenomenon was first described as an exceptional way of morphogenesis, but now it has been recognised to occur throughout angiosperms as well as gymnosperms. This process is now used as a model for studies on plant embryogenesis, particularly those pertaining to the late steps (for review see [2-5]). The analysis of the gene expression during somatic embryogenesis has been studied at different levels. De Vries et al. [6] and Wilde et al. [7] have characterised 21 translation products specifically expressed in proembryogenic masses and somatic embryos of carrot at the torpedo stages. Sung et al. [8] have identified, after *in vivo* labelling of proteins, 2 polypeptides related to the embryonic development of carrot. Many proteins such as the Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein family have been observed both in zygotic and somatic embryogenesis [1]. Heat shock proteins accumulation has also been shown during somatic embryogenesis and has been used to characterise particular steps of this process [9]. During the initiation of somatic embryogenesis, an increase of transcriptional activity has been described [10] and some early-expressed genes have been cloned [11-13]. However there is a lack of knowledge on the molecular mechanisms controlling the initial steps of this morphogenic process. How and why somatic cells become embryogenic-competent ?

Delbreil et al. [14] described an original *Asparagus officinalis* somatic embryogenesis model. Explants were first cultured on an auxin-rich inducing medium and then transferred onto a hormone-free development medium. During the development phase, highly embryogenic callus appeared. These tissues, continuously subcultured on a hormone-free medium, were named embryogenic lines. When compared to the parent plants, regenerated plants from these lines showed an increased embryogenic response. Plant used in our study was isolated from one highly embryogenic line. The embryogenic ability of this

plant is controlled by a monogenic dominant mutation [15]. Unlike in most somatic embryogenesis models, where more than one factor controls somatic embryogenesis [16], our monogenic mutant can be used to make comparative studies.

In this study, histological analysis was carried out in order to follow the cellular events occurring during the culture of the mutant and the wild *Asparagus officinalis* and to determine the appropriate stages used for the analysis of the proteins patterns by 2D electrophoresis.

Material and Methods

Plant material and culture conditions

Asparagus was cultured in greenhouse conditions with a light intensity of $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cool White, Philips) at 20°C . The substrate comprised 61% (w/w) of garden earth, 30% (w/w) of perlite, 9% (w/w) of sand. The non embryogenic wild type and the mutant type obtained from apices culture on hormone medium [15] were used. Young spears were sterilised by soaking for 15 min in a 12% Domestos™ solution and rinsed three times with sterile distilled water. Lateral shoots apices were dissected and cultured in Petri dishes containing 20 ml of a MSN-ZA medium with Murashige and Skoog macroelements [17], Nitsch microelements [18], Nitsch and Nitsch vitamins [19], 20 g l^{-1} sucrose, 7 g l^{-1} Agar Biokar Type E, 0.1 mg l^{-1} zeatin and 0.1 mg l^{-1} naphthyl acetic acid. After 15 days of culture, they were transferred onto a MSN medium devoid of growth regulators. Cultures were performed in a growth chamber with 12 h photoperiod and 24 / 20°C day / night. Explants were taken out each 3 days over the 30 days culture period (called D0, D3, ..., D30) and stored at -70°C for proteins extraction or fixed in FAA (formalin : acetic acid : alcohol 70°, 5 : 5 : 90) for the histological studies.

Light microscopy

After the fixation, explants were dehydrated in a graded ethanol series, infiltrated and embedded in JB4™ resin. Sections, 3 µm thick, were performed on a Leica microtome RM 2065 using a dry glass knife, and affixed on slides by heating. For the histological analysis, sections were hydrolysed with 0.5% periodic acid and stained by the PAS (periodic acid Schiff) and NBB [naphtol blue black 7% (w/v) in acetic acid].

Protein extraction

After grinding in liquid nitrogen, the D0, D12, D15 tissular proteins from the mutant type (m) or wild type (w) were extracted in a denaturant buffer [10% (w/v) trichloroacetic acid, 0.7% (v/v) β-mercaptoethanol in cold acetone] and precipitated for 45 min at -20°C and centrifuged at 30 000 g for 20 min at 4°C. The pellet was resuspended in 0.7% (v/v) β-mercaptoethanol in cold acetone for 45 min at -20°C. The precipitation step was repeated overnight at -20°C. After a new centrifugation at 30 000 g for 20 min at 4°C, proteins were solubilised in 60 µl.mg DW⁻¹ UKS lysis buffer [20]. After a last centrifugation at 30 000 g during 20 min at 22°C, the supernatants were aliquoted and stored at -70°C. Proteins were quantified using the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad).

2D-electrophoresis

Two-dimensional gel electrophoresis was carried out as described by Boyer et al. [21]. For the IEF, ampholines (Bio-Rad) pH 5-7 (10% v/v) and pH 3-10 (90% v/v) were added at a final concentration of 4% (v/v). Sixty µg of proteins per sample were loaded at the basic

end of the 4% polyacrylamide IEF gel. The IEF was run at 1200 V for 17 h followed by 1500 V for 0.5 h in Bio-Rad Model 175 Tube Cell. The second dimension was run in a 12.5% polyacrylamide gel at 350 V using a Bio-Rad Protean II electrophoresis cell. Proteins were silver-stained as in Blum et al. [22]. Gels were dried on a Bio-Rad model 543 slab-gel drier before their use for computer analysis. All comparisons were performed on a Sun Sparc Station 20 with the 2-D Analyzer software (BioImage ®). Three gels per sample were compared and for analysis purposes, synthetic images were prepared. Two types of analysis have been realised: firstly, for each genotype, the different stages between themselves and secondly, for each stage, the two genotypes together.

Results

Histological analysis

No histological difference was observed at day 0 between the mutant and the wild type explants (data not shown). After 9 days of culture a swelling at the incision point was observed for both types of explants. The 9-days-old cultured apices of the embryogenic mutant showed a lot of outgrowth due to the presence of abundant dedifferentiated meristematic cells (Fig. 1A). A prominent callus at the basis of explants developed from those meristematic cells. At the periphery of this callus, cells were characterised by a large nucleus with a prominent nucleolus and dense cytoplasm. A positively Schiff stained matrix surrounding these cells was observed. Numerous starch granules were detected both in internal and peripheral cells of the callus. These cells had large vacuoles and starch granules were located near the cell wall. After 9 days of culture the cytological constitution of the wild type apices (Fig. 1B) was completely different from the mutant one. The majority of the cells inside the swollen structure showed a parietal spherical nucleus and a large vacuole with low starch granule content. Some cell divisions were observed at the

vicinity of the incision point and meristematic cells were limited to the parenchyma near the vascular bundles of the apex (data not shown). The mutant type callus was more voluminous than the wild type.

After 15 days, cultures were transferred to hormone-free medium. In the mutant type callus, the first embryogenic cells and proembryogenic masses (PEMs) were mainly observed at the periphery (Fig. 1C). The intercellular space between PEMs was densely stained by the Schiff's reaction. PEMs, embryogenic cells and dead cells were simultaneously detected on the external side of the callus. The embryogenic cells were characterised by a central nucleus with an active nucleolus and a thick cell wall (Fig. 1D). The cytoplasmic content increased and numerous small vacuoles were observed. These PEMs approximately had the same size and were surrounded by a cell wall thicker than the internal cell walls (Fig. 1D). They resulted from the segmentation of single embryogenic cells. At the same date, the callus developed from the wild type reached its maximum size with abundant dissociated dead cells at its external part (data not shown). The cells of this callus had the characteristics of parenchymatous cells (e.g. large vacuole, parietal nucleus).

After 30 days of culture, the mutant type callus continued to grow and somatic embryos were observed (Fig. 1E). In this case, the embryos developed rapidly into plants and no synchronisation of somatic embryogenesis was observed. In the wild type, callus proliferation stopped and the meristems of the primary explant began to develop into chlorophyllous shoots (data not shown).

Protein analysis

For protein analysis, 3 stages (D0, D12, D15) have been determined. These were based on the histological data. Day 0, corresponding to greenhouse plant tissue, was used as starting point for the protein analysis. Day 12 of the culture corresponds to the stage just

before the first detection of embryogenic cells and PEMs. At day 15, embryogenic cells and PEMs were detectable in the tissues of the mutant while in the wild type tissues, only callus proliferation was observed. After transfer on the hormone-free medium, the somatic embryos pursued their development into plants and in the same time the meristems from the primary explant of the wild type apices developed into shoots. In all proteins samples, over 1600 polypeptides were detected ranging from pI 4 to 9 and molecular masses from 10 to 100 kDa. The number of proteins in the wild genotype tissues is always higher than the number of proteins in the mutant genotype. The divergence between the two genotypes (i.e. non common proteins at one common stage) increased during the culture.

In the mutant genotype 357 proteins were differentially expressed during the whole culture, 286 proteins between D0 and D12 and 71 proteins between the D12 and D15. In the same culture conditions, the comparison of the protein patterns of the wild *Asparagus officinalis* showed 326 proteins differentially expressed, 241 proteins between D0 and D12 and 85 proteins between D12 and D15, while 268 spots were similarly accumulated in the mutant and the wild type culture. We selected 89 (357-268) proteins from the mutant tissues and 58 (326-268) from the wild type tissues for further investigations.

These 89 proteins which expression was subjected to modification during the culture of the mutant could be classified into 4 classes : (1) 42 polypeptides present at D0 and no longer detected at D15 (Tab1, groups 5, 6, 9, 12, 20) ; (2) 26 polypeptides not detected at D0 and present at D15 (Tab. 1, groups 2, 3, 13, 19) ; (3) 13 proteins detected at D12 but neither at D0 nor D15 (Tab. 1, groups 4, 10, 17) and finally (4) 8 proteins observed at D0 and D15 but not at D12 (Tab. 1, groups 8, 11, 14). The 58 proteins which expression was modified during the culture of the wild type could be classified into 3 classes : (1) 5 polypeptides present at D0 and no longer detected at D15 (Tab. 1, groups 13, 18, 19) ; (2) 50 polypeptides not detected at D0 and present at D15 (Tab. 1, groups 9, 10, 11, 12, 15, 16,17, 20) and (3) 3 proteins detected at D12 but neither at D0 nor D15 (Tab. 1, group 14).

The comparison between the 89 proteins from the mutant and the 58 proteins selected from the wild type showed that 48 proteins were detected with a different pattern of evolution in both types (Tab. 1, groups 12, 9, 20, 19, 11, 10, 13, 14, 17). We characterised 41 proteins (i.e. 89-48) from the mutant genotype cultured tissues. Among those polypeptides, 15 showed a differential expression in the mutant type tissues but were constitutive in the wild *Asparagus* (Tab. 1, groups 5, 6, 8), the 26 remaining proteins were mutant specific and never observed in the wild genotype tissues (Tab. 1, groups 2, 3, 4). In the wild genotype tissues, from the 10 selected proteins (i.e. 58-48), 9 had a specific expression during the culture and were never observed in the mutant tissues (Tab. 1, groups 15, 16). The remaining protein (10-9) had a modified wild genotype expression and was constitutively expressed in the mutant genotype cultured tissues (Tab. 1, group 18).

The comparison between the 2 genotypes showed that 17 proteins were expressed without modification and specific to one of the genotypes : 6 proteins for the mutant type (Tab. 1, group 1, Fig. 2) and 11 for the wild type (Tab. 1, group 7, Fig. 3).

Discussion

Asparagus somatic embryos have been induced *in vitro* from different parts of the plant as hypocotyl [23], cladophyll cells culture [24], stems [25], buds [26] and cells suspension culture [27]. In our system, somatic embryogenic mutant and non-embryogenic wild type, somatic embryogenesis is achieved from apices of young spears. The pair mutant-wild type allows direct comparisons of histological and biochemical events occurring during somatic embryogenesis, and particularly during the early stages which are rarely studied in the other plants.

The histological analysis shows that in our culture conditions, the mutant type tissues divide more precociously and actively than the wild type tissues where the pre-

existent meristems develop into chlorophyllous shoots after 30 days of culture. The mutant tissues develop early specific structures (swelling) with an abundant accumulation of starch. This accumulation has also been described as a characteristic of somatic embryogenic tissues in several models [28-30].

In the *Asparagus* model we have been able to localise at D15, in the external part of the callus derived from the swellings, the first embryogenic cells and the first proembryonic masses (PEMs). As reviewed by Yeung [5] the embryogenic cells show a dense cytoplasm and numerous small vacuoles, and an active nucleolus is associated with a voluminous centred nucleus. These cells are isolated from the maternal tissue. This characteristic has already been described during somatic embryogenesis in cocoa [31], chicory [32], or in camelia [33]. The isolation of the single cell could be necessary for the initiation of somatic embryogenesis [2], but this occurs mainly in the case of direct somatic embryogenesis. These cells, presenting a thick cell wall, undergo a series of symmetrical divisions leading to the formation of proembryos which consequently were of unicellular origin. As the appearance of the somatic embryos occurs inside a callus and according to Williams and Maheswaran [34] the somatic embryogenesis is indirect and unicellular in our model.

Analysis of the intratissular proteins has been performed for both genotypes at 3 stages (D0, D12, D15). Protein analysis was carried out until day 15 because we focused on the induction of the embryogenic events.

Few proteins associated with somatic embryogenesis have been identified in species, including *Pisum sativum* [35], *Dactylis glomerata* [36], or *Medicago sativa* [37] and protein patterns were relatively stable during the culture [21, 38]. Although, in our study, we observed a lot of changes in the protein pattern during the culture.

We imagine that competent cells, once triggered to develop, will lose the set of proteins characteristic of competent cells and acquire proteins related to embryo development, culminating in proteins with known functions : storage proteins, LEA and

so on. Since competence could result of the presence or the absence of one of more specific proteins. We examined our protein profiles for both kinds of patterns. In this study, the protein pattern analysis allows the detection of 116 selected polypeptides classified into 20 different evolution groups. The occurrence of proteins potentially related to somatic embryogenesis process (group 1, 2, 3, 4, 7, 15, 16) are hereby discussed.

Groups 2, 3, 4 are constituted by mutant genotype proteins which are not present at D0 but became detectable during the embryogenic culture. None of these proteins have been found in the wild type tissues. They are proteins that mark somatic embryogenesis. While considering the order of appearance of these different proteins, polypeptides of group 2 could be necessary during the initial steps of somatic embryogenesis induction. These proteins would be maintained at D15 because of the asynchronous embryogenic process in the callus. Proteins of the group 3 could be related to the development of the somatic embryos. In other respect, the expression of these 3 groups of proteins could be induced by other polypeptides present before D12 like group 1 proteins which are present as soon as D0.

We suggest that some (or one ?) proteins of the group 1 may be implicated in the permanent state of competence of the mutant tissues for somatic embryogenesis. The other modifications of the 2D-protein pattern could be the consequences of the expression of group 1 proteins.

Inversely, proteins of the groups 7, 15 and 16 could act as inhibitors of the somatic embryogenesis in the wild type tissues. The consequence of the monogenic dominant mutation could stop expression and the synthesis of new proteins in the mutant.

Yeung [5] has reviewed the structural and developmental patterns observed during somatic embryogenesis. The acquisition of competence occurs after a period of dedifferentiation. During this period cells change their developmental information in order to become competent i.e. responsive to an induction signal. Then the induction occurs when a signal produces a unique developmental response from competent tissue. In

Alfalfa embryogenic cell culture, Finstad et al. [39] have described a competent state acquired without auxin treatment. In our model, the somatic embryogenesis is achieved even when no hormonal treatment is applied to the mutant apices [15] and protein patterns are different as soon as D0. We proposed that this competence may be the result of the monogenic dominant mutation [15]. The stress generated by the *in vitro* culture with the breaking of cellular correlations could be assimilated to the step needed for the expression of the competence for somatic embryogenesis in the *Asparagus officinalis* mutant tissues. This kind of behaviour: plants which revealed somatic embryogenesis without hormonal treatment has also been described in *Arabidopsis thaliana* in the case of mutation (*PKL*) [40] or ectopically expressed gene (*LEC1*) [41]. The mutation characterised in our model could act with pleiotropic effects on protein expression as described by Gottlieb and de Vienne [42]. Therefore, the groups 1 and 7 (17 polypeptides) with the synthesis of a newly expressed protein in the mutant type or on the repression in the mutant tissues of a wild type expressed protein may be related to the competence or to the non-competence for somatic embryogenesis. We tried to follow this analytical study on the protein pattern analysis by the microsequencing of some potential markers. The characterisation of the groups 1 and 7 proteins failed because we obtained too high ratios between polyacrylamide matrix and polypeptides for mass spectrometry analysis. In order to follow our study on the somatic embryogenesis, we are realising a differential screening of the D0 cDNAs.

References

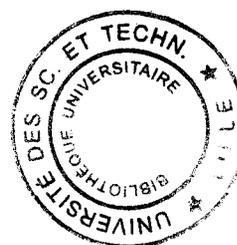
1. Zimmerman J. L., Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5 (1993) 1411-1423.
2. W. Halperin, In vitro embryogenesis: some historical issues and unresolved problems, in: Thorpe T.A. (Ed.), *In vitro embryogenesis in plants*, Kluwer Academic Publishers, 1995, pp. 1-16.
3. A. Komamine, R. Kawahara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, A. Fujiwara, M. Tsukuhara, J. Smith, M. Ito, H. Fukuda, K. Nomura and T. Fujimura, Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 28 (1992) 11-14.
4. A.P. Mordhorst, M.A.J. Toonen and S.C. deVries, Plant embryogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16 (1997) 535-576.
5. E.C. Yeung, Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis, in: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro embryogenesis in plants*, Kluwer Academic Publishers, 1995, pp. 205-247.
6. S.C. De Vries, H. Booij, P. Meyernink, G. Huisman, H.D. Wilde, T.L. Thomas and A.B. Van Kammen, Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, 176 (1988) 196-204.
7. H.D. Wilde, W.S. Nelson, H. Booij, S.C. De Vries and T.L. Thomas, Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta*, 176 (1988) 205-211.
8. Z.R. Sung and R. Okimoto, Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78 (1981) 3683-3687.
9. J. Györgyey, A. Gartner, K. Nemeth, Z. Magyar, H. Hirt, E. Herberle-Bors and D. Dudits, Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 16 (1991) 999-1007.

10. K. Nomura and A. Komamine, Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 3 (1986) 456-466.
11. E.S. Wurtele, H. Wang, S. Durgerian, B.J. Nikolau and T.H. Ulrich, Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol.*, 102 (1993) 303-312.
12. B.K. Jung, J.H. Pyo, W.S. Kim, B.H. Nam, S.J. Hwang and B. Hwang, Cloning gene specifically expressed in rice embryogenic cells. *Mol. Cells*, 8 (1998) 62-67.
13. R.W. Giroux and K.P. Pauls, Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.*, 33 (1997) 393-404.
14. B. Delbreil, I. Goebel-Tourand, C. Lefrançois and M. Jullien, Isolation and characterization of long-term embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L. *J. Plant Physiol.*, 144 (1994) 194-200.
15. B. Delbreil and M. Jullien, Evidence for in vitro induced mutation which improves somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Rep.*, 13 (1994) 372-376.
16. Y. Henry, P. Vain and J. De Buyser, Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica*, 79 (1994) 45-58.
17. T. Murashige and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 (1962) 473-497.
18. J.P. Nitsch, Induction in vitro de la floraison chez une plante de jours courts : *Plumbago indica* L. *Ann. Soc. Nat. Bot.*, 9 (1968) 1-9.
19. J.P. Nitsch and C. Nitsch, Néof ormation de fleurs in vitro chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L. *Ann. Physiol. vég.*, 7 (1965) 251-256.
20. M. Zivy, Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent, in: Galteau, M.M. & Siest, G. (Eds.), *Recent Progresses in Two-Dimensional Electrophoresis*, Presses Universitaires de Nancy, 1986, pp. 69-72.

21. C. Boyer, J.-L. Hilbert and J. Vasseur, Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*. *Plant Sci.*, 93 (1993) 41-53.
22. H. Blum, H. Beier and H.J. Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 (1987) 93-99.
23. C. Willmar and M. Hellendoorn, Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured in vitro. *Nature.*, 217 (1968) 369-371.
24. M. Jullien, La culture in vitro de cellules du tissu foliaire d'*Asparagus officinalis* L. : Obtention de souches à embryogenèse permanente et régénération de plantes entières. *C. R. Acad. Sci. Ser. III-vie*, 279 (1974) 747-750.
25. G. Reuther, Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus of *Asparagus* and *Iris* and its possible application. *Acta Hortic.*, 78 (1977) 217-224.
26. A. Levi and K.C. Sink, Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in *Asparagus*. *J. Plant Physiol.*, 137 (1990) 184-189.
27. A. Levi and K.C. Sink, *Asparagus* somatic embryos: Production in suspension culture and conversion to plantlets on solidified medium as influenced by carbohydrate regime. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 31 (1992) 115-122.
28. C. Cabasson, P. Ollitrault, F.-X. Cote, N. Michaux-Ferrière, D. Dambier, R. Dalnic and C. Teisson, Characteristics of Citrus cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. *Physiol. Plant.*, 93 (1995) 464-470.
29. N. Michaux-Ferriere, H. Grout and M.P. Carron, Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Am. J. Bot.*, 79 (1992) 174-180.
30. T. Tétu, R.S. Sangwan and B.S. Sangwan-Norreel, Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus. *J. Exp. Bot.*, 38 (1987) 506-517.

31. N. Michaux-Ferriere and J. Schwendiman, Histology of somatic embryogenesis, in: Dattée, Y., Dumas, C. & Gallais, A. (Eds.), Reproductive biology and plant breeding, Springer-Verlag, 1992, pp. 247-259.
32. M.-C. Verdus, T. Dubois, J. Dubois and J. Vasseur, Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. *Ann. Bot.*, 72 (1993) 375-383.
33. M.C. Pedroso and M.S. Pais, Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 43 (1995) 147-154.
34. E.G. Williams and G. Maheswaran, Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57 (1986) 443-462.
35. S. Stirn and H.J. Jacobsen, Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.*, 6 (1987) 50-54.
36. G. Hahne, J.E. Mayer and H. Lörz, Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Sci.*, 55 (1988) 267-279.
37. R.W. Giroux and K.P. Pauls, Characterization of embryogenesis-related proteins in alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiol. Plant.*, 96 (1996) 585-592.
38. S. Ramagopal, Barley proteins associated with tissue dedifferentiation. *J. Plant Physiol.*, 134 (1989) 395-405.
39. K. Finstad, D.C.W. Brown and K. Joy, Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 34 (1993) 125-132.
40. J. Ogas, J.-C. Cheng, Z.R. Sung and C. Somerville, Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science*, 277 (1997) 91-94.
41. T. Lotan, M. Ohto, K.M. Yee, M.A.L. West, R. Lo, R.W. Kwong, K. Yamagishi, R.L. Fischer, R.B. Goldberg and J.J. Harada, *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93 (1998) 1195-1205.

42. L.D. Gottlieb and D. de Vienne, Assessment of pleiotropic effects of a gene substitution in pea by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Genetics*, 119 (1988) 705-710.



Legends

Fig. 1 : PAS-NBB stained semi-thin sections of *Asparagus* apices cultured 9 days : mutant type (1A) or wild type (1B) and 15 days-old mutant type apices (1C, 1D). Macrophotography of 30 days-old mutant type callus culture (1E). A : 9 day-cultured mutant type apex : meristematic cells (mc) are observed at the periphery of the callus, they are surrounded by a matrix (M). Starch granules (st) are detected both in meristematic or callus cells. B : 9 day-cultured wild type apex : parenchymatous cells (pc) with low starch (st) content are observed in the swell. C : Embryogenic cells (Ec), proembryogenic masses (PEM) are detected at the periphery of the callus. D : Enlargement of the periphery of a 15 day old callus : embryogenic cells (Ec) with thick cell wall and proembryogenic masses (PEM) are simultaneously observed. The matrix (M) observed between cells is stained by the Schiff reaction. E : Somatic embryos (➤) observed on the surface of the mutant type callus after 30 days of culture.

Bar = 10 μ m : A, B, C, D. Bar = 2 mm : E.

Fig. 2 : Synthetic image of the 2D gels used for the protein analysis of the mutant type uncultured apices. Arrow (➤) located the proteins of the group 1.

Fig.3 : Synthetic image of the 2D gels used for the protein analysis of the wild type uncultured apices. Arrow (➤) located the proteins of the group 7.

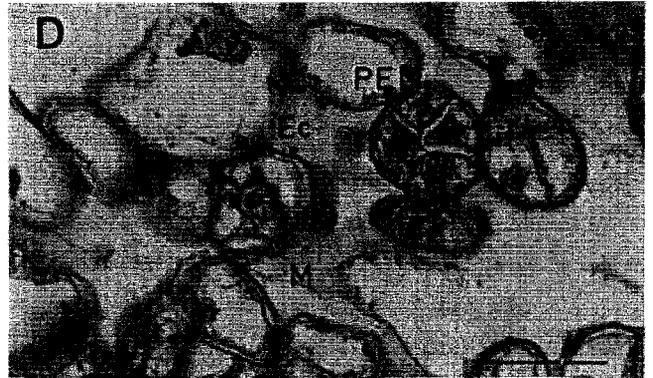
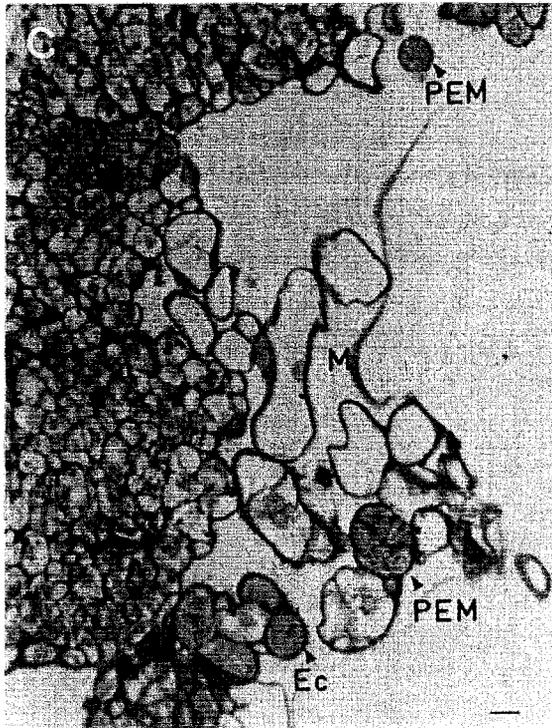
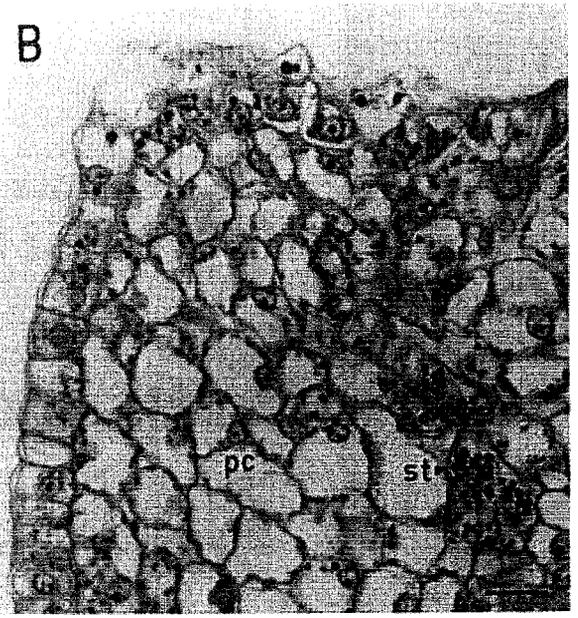
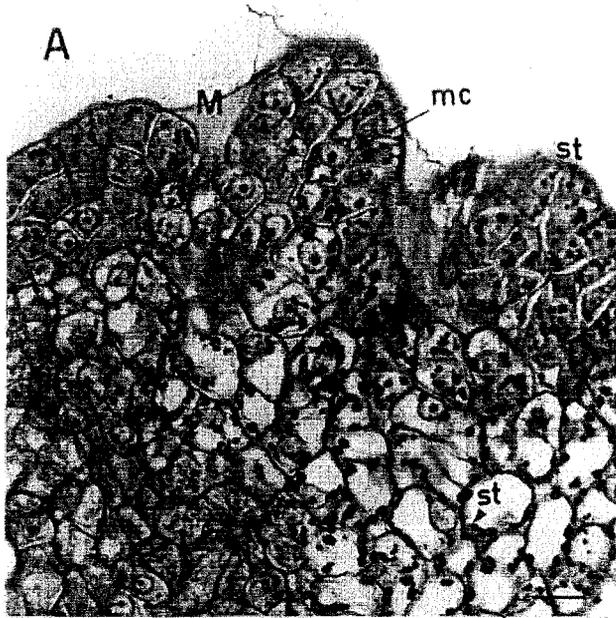


Fig 1



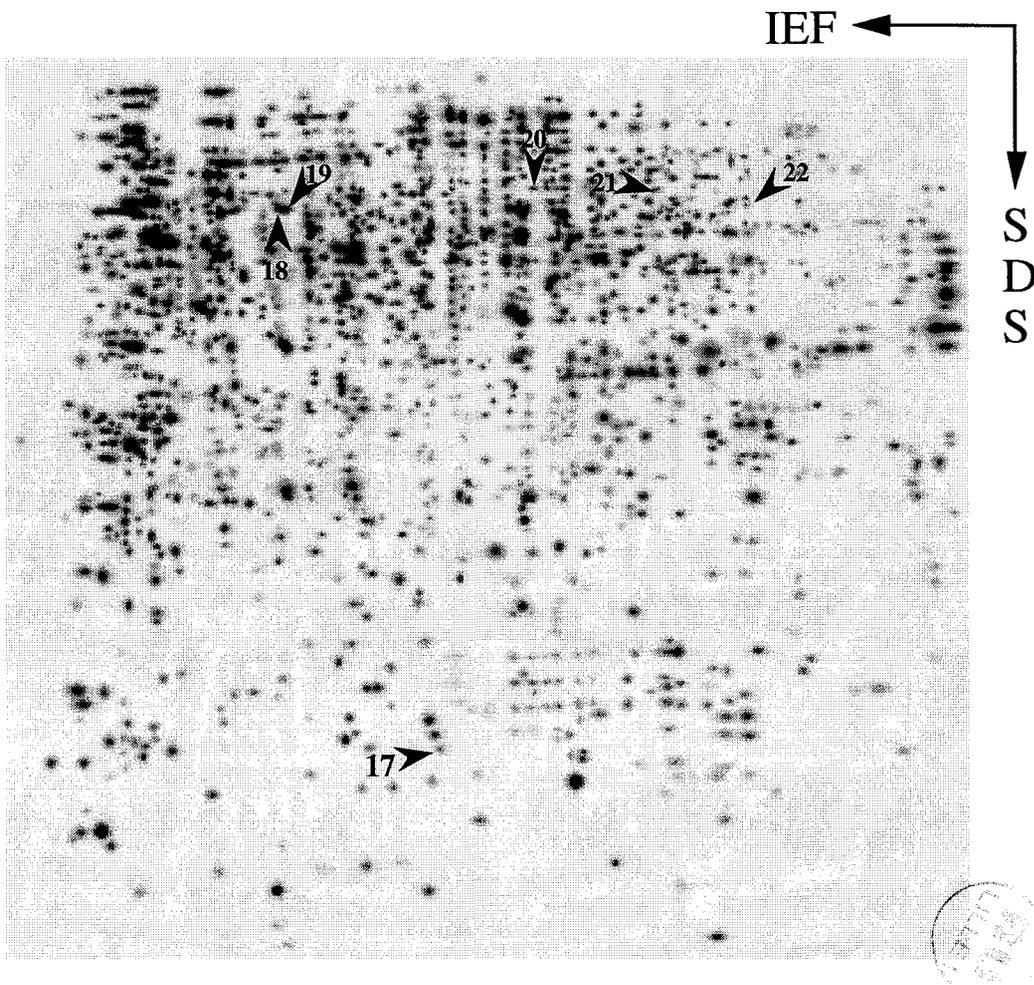


Figure 2

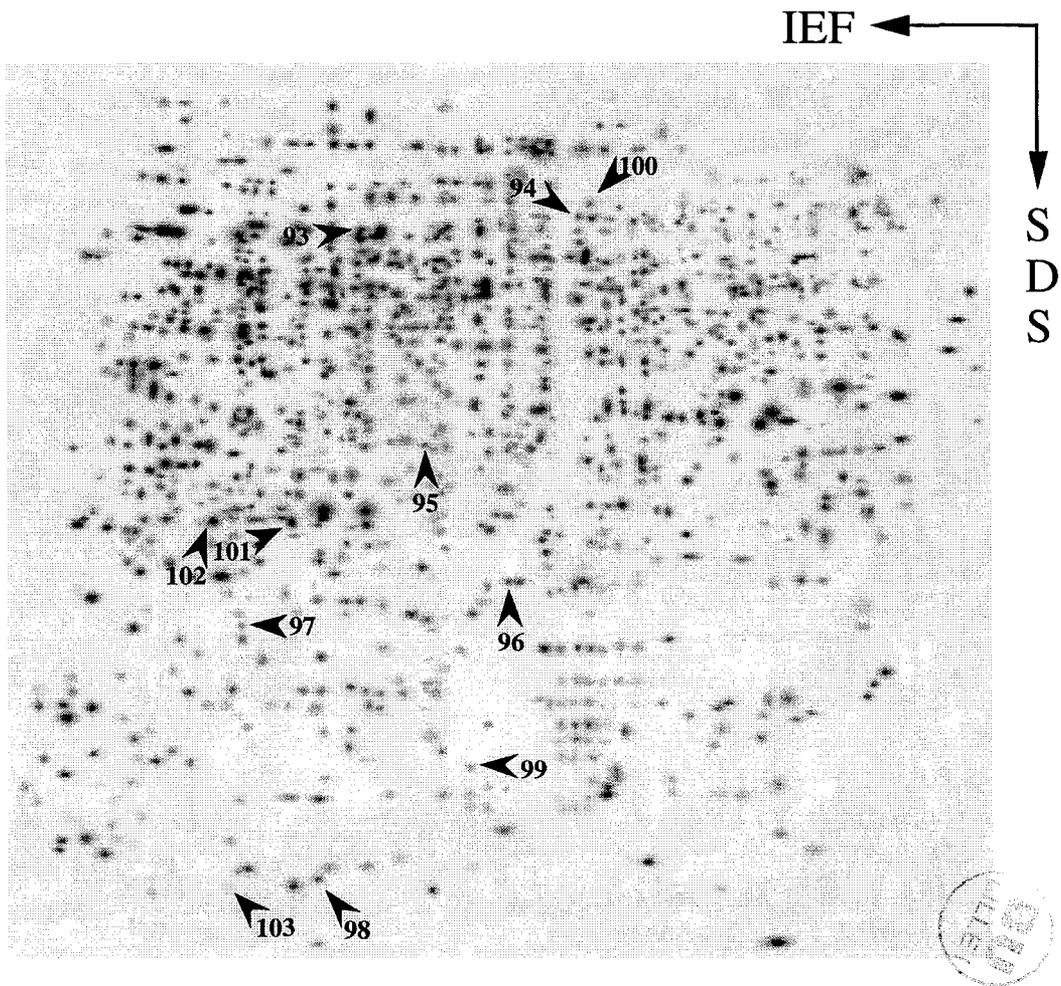


Figure 3

grp	type	D0	D12	D15	spot	pI/MW	grp	type	D0	D12	D15	spot	pI/MW	grp	type	D0	D12	D15	spot	pI/MW	grp	type	D0	D12	D15	spot	pI/MW																																																	
1	m	+	+	+	17	5.4 / 19	4	m	-	+	-	84	5.3 / 30	9	m	+	-	-	28	4.1 / 57	12	m	+	-	-	1	4.5 / 58																																																	
					18	5.0 / 60						85	5.7 / 31						29	4.1 / 55						2	6.0 / 60																																																	
					19	5.0 / 60						86	5.7 / 30						30	4.2 / 76						3	5.1 / 26																																																	
					20	5.8 / 64						87	5.6 / 30						31	4.1 / 77						4	5.6 / 38																																																	
					21	6.1 / 64						88	5.6 / 30						32	4.1 / 34						5	5.4 / 42																																																	
	w	-	-	-	22	6.3 / 62		89	5.6 / 30	33	6.2 / 71	6	4.8 / 32		13	m	-	+	+	88		5.6 / 30	105	5.1 / 28	w	+	+	-	89	5.6 / 26																																														
					57	5.3 / 86		90	6.9 / 33	90	6.9 / 33	91	4.8 / 29																																																															
					58	5.3 / 84		91	4.8 / 29	92	6.5 / 23	92	6.5 / 23																																																															
					59	5.6 / 89		93	5.0 / 60	93	5.0 / 60	94	5.8 / 65																																																															
					60	6.1 / 82		94	5.8 / 65	95	5.2 / 37	95	5.2 / 37																																																															
2	m	-	+	+	61	6.1 / 82	5	m	+	-	-	7	6.0 / 29	6	m	+	+	-	23	6.2 / 19	10	m	-	+	-	114	5.9 / 49	14	m	+	-	+	90	6.9 / 33																																										
					62	6.1 / 82						8	6.3 / 18						24	5.0 / 40															91	4.8 / 29	92	6.5 / 23	93	5.0 / 60	94	5.8 / 65	95	5.2 / 37	96	5.6 / 27	97	4.6 / 23	98	4.9 / 14	99	5.4 / 18	100	5.9 / 67	101	4.6 / 29	102	4.5 / 28	103	4.6 / 14	104	4.5 / 28														
					63	6.0 / 74						9	7.1 / 51						25	5.7 / 36															96	5.6 / 27	97	4.6 / 23	98	4.9 / 14	99	5.4 / 18	100	5.9 / 67	101	4.6 / 29	102	4.5 / 28	103	4.6 / 14	104	4.5 / 28	105	5.6 / 44	106	6.0 / 74	107	4.4 / 42	108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43
					64	6.0 / 64						10	5.6 / 48						26	5.4 / 32															99	5.4 / 18	100	5.9 / 67	101	4.6 / 29	102	4.5 / 28	103	4.6 / 14	104	4.5 / 28	105	5.6 / 44	106	6.0 / 74	107	4.4 / 42	108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43						
					65	5.4 / 61						11	5.9 / 45						27	6.2 / 19															101	4.6 / 29	102	4.5 / 28	103	4.6 / 14	104	4.5 / 28	105	5.6 / 44	106	6.0 / 74	107	4.4 / 42	108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43										
					66	5.4 / 61						12	6.2 / 51						28	6.2 / 19															102	4.5 / 28	103	4.6 / 14	104	4.5 / 28	105	5.6 / 44	106	6.0 / 74	107	4.4 / 42	108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43												
					67	5.6 / 55						13	6.3 / 52						29	5.7 / 36															103	4.6 / 14	104	4.5 / 28	105	5.6 / 44	106	6.0 / 74	107	4.4 / 42	108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43														
					68	5.6 / 54						14	6.4 / 52						30	5.4 / 32															104	4.5 / 28	105	5.6 / 44	106	6.0 / 74	107	4.4 / 42	108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																
	69	6.0 / 56	15	5.3 / 61	31	5.4 / 32		105	5.6 / 44	106	6.0 / 74	107	4.4 / 42		108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22		111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15		114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																																										
	70	6.0 / 57	16	5.3 / 56	32	5.4 / 32		106	6.0 / 74	107	4.4 / 42	108	4.5 / 43		109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19		112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49		115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																																												
	71	7.1 / 50	17	5.3 / 61	33	6.2 / 71		107	4.4 / 42	108	4.5 / 43	109	4.3 / 23		110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19		113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44		116	7.4 / 43																																														
	72	5.6 / 44	18	4.6 / 49	34	6.1 / 54		108	4.5 / 43	109	4.3 / 23	110	4.3 / 22		111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15		114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																																																	
	73	5.5 / 44	19	4.6 / 49	35	4.6 / 56		109	4.3 / 23	110	4.3 / 22	111	4.2 / 19		112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49		115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																																																			
	74	5.7 / 38	20	4.6 / 49	36	4.1 / 46		110	4.3 / 22	111	4.2 / 19	112	4.8 / 19		113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44		116	7.4 / 43																																																					
	75	5.6 / 36	21	4.6 / 49	37	4.1 / 41		111	4.2 / 19	112	4.8 / 19	113	4.4 / 15		114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																																																								
	76	5.5 / 34	22	4.6 / 49	38	4.1 / 50		112	4.8 / 19	113	4.4 / 15	114	5.9 / 49		115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																																																										
	77	4.5 / 23	23	4.6 / 49	39	4.5 / 52		113	4.4 / 15	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44		116	7.4 / 43																																																												
3	m	-	-	+	27	5.1 / 42	114	5.9 / 49	115	7.4 / 44	116	7.4 / 43																																																																
					w	-	-	-	28	4.1 / 57	29	4.1 / 55	30	4.2 / 76	31	4.1 / 77	32	4.1 / 34	33	6.2 / 71	34	6.1 / 54	35	4.6 / 56	36	4.1 / 46	37	4.1 / 41	38	4.1 / 50	39	4.5 / 52	40	4.6 / 49	41	5.9 / 30	42	7.4 / 30	43	4.4 / 76	44	4.4 / 65	45	5.3 / 56	46	5.3 / 53	47	5.3 / 51	48	4.7 / 40	49	4.3 / 52	50	6.0 / 72	51	6.0 / 54	52	6.1 / 53	53	4.3 / 52	54	4.6 / 28	55	4.7 / 20	56	4.4 / 91										
									29	5.1 / 42	30	5.1 / 42	31	5.1 / 42	32	5.1 / 42	33	5.1 / 42	34	5.1 / 42	35	5.1 / 42	36	5.1 / 42	37	5.1 / 42	38	5.1 / 42	39	5.1 / 42	40	5.1 / 42	41	5.1 / 42	42	5.1 / 42	43	5.1 / 42	44	5.1 / 42	45	5.1 / 42	46	5.1 / 42	47	5.1 / 42	48	5.1 / 42	49	5.1 / 42	50	5.1 / 42	51	5.1 / 42	52	5.1 / 42	53	5.1 / 42	54	5.1 / 42	55	5.1 / 42	56	5.1 / 42												

Tab. 1: Distribution of the 116 proteins of interest and their comparative evolution between the mutant and the wild type tissues. These proteins are dispatched in 20 groups (grp) of differential evolutions numbered from 1 to 20. Analysis have been performed on 3 different stages of the culture: uncultured tissues (D0), after 12 (D12) or 15 days of culture (D15) in the mutant type tissues (m) and in the wild type (w). Spots are numbered from 1 to 116 and characterised by their isoelectric point (pI) and their molecular weight (MW).