

the no 000 492

50376-
1999-
403

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Numéro d'ordre

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

discipline: GENIE ENZYMATIQUE, BIOCONVERSION ET MICROBIOLOGIE

présentée par

Anne BELLETTRE-FIEVET

Le glycérol, ses effets et sa contribution à la recherche de marqueurs précoces au cours de l'embryogenèse somatique dans les tissus foliaires de chicorée hybride "474".

Soutenue le 2 novembre 1999 devant la commission:



M. J. VASSEUR	Professeur, Université de Lille I	Président
M. J-C. AUDRAN	Professeur, Université de Reims	Rapporteur
M. G. LEDOIGT	Professeur, Université Clermont-Ferrand II	Rapporteur
M. J-P. COUILLEROT	Maître de conférences, Université de Lille I	Examineur
M. H. MORVAN	Professeur, Université de Limoges	Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance au président de ce jury, Monsieur le Professeur J. Vasseur qui a bien voulu m'accepter dans ce doctorat "Génie enzymatique Bioconversion Microbiologie" et m'a ainsi permis de réaliser cette thèse. J'associe à cela Monsieur J.P. Couillerot qui est à l'origine de ce sujet. Je lui sais gré de m'avoir laissé une grande liberté dans mes activités de recherche et je le remercie d'être l'un des examinateurs de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Messieurs les Professeurs J.C. Audran et G. Ledoigt pour avoir accepté de juger ce mémoire et d'être rapporteurs.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le professeur H. Morvan pour avoir accepté d'être membre du jury en tant qu'examineur.

Je tiens à remercier Caroline, Marie-Christine et Pascale, Monsieur Legrand, Monsieur et Madame Dubois, ainsi que le personnel du laboratoire pour l'intérêt qu'ils m'ont porté. Je remercie vivement S. Aubert de l'Université J. Fourier de Grenoble ainsi qu'E. Gout du CEA de Grenoble pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes résultats, Anne-Sophie pour la cytologie et Jean-Louis pour avoir accepté de corriger la partie protéique de ce travail.

Merci à Axelle, Béa, Eric, Isabelle, Sophie, Laurent, Marie, Nourredine (danseur émérite) et les Panous : Delphine et Nathalie pour tous les bons moments passés ensemble. A Rachel et Robert pour les discussions "scientifiques" quotidiennes autour d'un repas gastronomique. A Olivier pour son enthousiasme et ses dons virtuels. Un petit clin d'œil à Bérangère, ma sœur d'armes (qui a su les déposer : chapeau !). A Jeff et Greg en témoignage d'une amitié qui dure depuis bien des années pour mon plaisir. A vous tous, pour votre aide scientifique et morale, je souhaite bon courage dans le monde des sciences et bonne chance dans le monde réel.

Ceux à qui je dois tout, mes parents. Je voudrais que cette thèse soit l'expression de ma reconnaissance. Merci de m'avoir donné les moyens matériels et "cordiformes" pour que mon désir de réaliser cette thèse soit comblé.

A tous ceux qui de près ou de loin et par quelques moyens que se soit ont participé à ces longues années d'études. J'espère que cette thèse ne vous décevra pas.

Abréviations

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADP	:	adénosine diphosphate
AIA	:	Acide indolyl acétique
ANA	:	acide naphtalène acétique
APS	:	Ammonium persulfate
ARN	:	acide ribonucléique
ATP	:	adénosine triphosphate
BA	:	Benzyl adénine
BCIP	:	Phosphate 5 bromo 4-chloro 3-indolyl de toluidine
BET	:	Bromure d'éthidium
BSA	:	sérum albumine bovine
CLHP	:	chromatographie liquide haute performance
D.O.	:	Densité optique
DHAP	:	dihydroxyacétone phosphate
DMF	:	Diméthylformamide
DMPC	:	Diméthyl pyrocarbonate
DTT	:	Dithiothréitol
FAA	:	formaldéhyde, acide acétique, éthanol
FITC	:	Fluorescéine isothiocyanate
G-3P	:	Glycérol 3-Phosphate
Gly	:	glycérol
GIT	:	Guanidium isothiocyante
kDa	:	kilo Dalton
LEA	:	Late Embryogenesis Abundant
LTP	:	Lipid transfer protein
MALDI-TV	:	Désorption - ionisation par impact laser assistée par matrice - temps de vol
MF	:	matière fraîche
MOPS Acide	:	morpholinopropane sulfonique

Abréviations

NAD	:	nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH	:	nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NBT	:	Para - nitro bleu de tétrazolium
PDA	:	Piperazine diacrylamide
PFA	:	Paraformaldéhyde
ppm	:	partie par million
PR	:	Pathogenesis related
PVDF	:	Polyvinylidène difluoridone
PVP	:	Polyvinyl pyrrolidone
RMN	:	Résonance magnétique nucléaire
S	:	saccharose
SAB	:	Sérum albumine bovine
SDS	:	Sodium dodécyl sulfate
TCA	:	Acide trichloro acétique
Temed	:	N, N, N', N' - tétraméthyléthylènediamine
Tris	:	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
2,4D	:	acide 2,4 dichlorophénoxyacétique
2-iP	:	6- diméthylaminopurine (N6-[2isopentényl] adénine)

Table des matières

Introduction	13
Etude bibliographique	15
I. L'embryogenèse somatique	15
A. Définition et intérêt de l'embryogenèse somatique	15
B. Origine des embryons somatiques	18
C. Facteurs intervenant sur l'embryogenèse somatique	20
1. Facteurs chimiques	20
2. Les facteurs physiques	21
D. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique	22
1. Les marqueurs physiologiques et cytochimiques	22
2. Les marqueurs protéiques	23
a. Les marqueurs protéiques tissulaires	23
b. Les marqueurs protéiques extracellulaires	24
3. Les gènes marqueurs	25
II. Le glycérol	27
A. Le glycérol en culture in vitro	27
1. Source carbonée des végétaux	27
2. Effet protecteur et stabilisateur	28
3. Effet stimulateur	28
4. Agent osmotique	29
5. Effet cryoprotecteur	29
B. Le métabolisme du glycérol	29
1. L'anabolisme du glycérol	29
2. Le catabolisme du glycérol	32
C. Le glycérol et l'embryogenèse somatique	34
1. La stimulation de l'embryogenèse par le glycérol	34
2. Inhibition de l'embryogenèse somatique par le glycérol	35
3. Synchronisation de l'embryogenèse somatique par le glycérol	36
Matériel et méthodes	37
I. Le matériel végétal	37
II. Techniques de culture <i>in vitro</i>	39
A. Le milieu de base M17	39
B. Production du clone "474" de chicorée	39
C. Multiplication des vitroplants par embryogenèse somatique à partir de racines	40
D. Embryogenèse somatique à partir des tissus foliaires	40
1. Mise en culture des fragments foliaires	41
2. Les deux phases de la culture embryogène	42
E. Milieux et conditions modifiés	42
III. Techniques de cytologie	42
A. Coupes en paraffine	42
1. Fixation, déshydratation et inclusion du matériel	42
2. Coupes au microtome	43
3. Coloration fast-green / safranine	43
B. Coupes semi-fines	43
1. Fixation, déshydratation, et inclusion	43
2. Confection des coupes semi-fines	44
3. Colorations et montage	44
C. Coloration des noyaux et immunomarquage	44

IV. Techniques de chromatographie	45
A. Dosage des glucides par chromatographie liquide haute performance	45
1. Extraction des glucides	45
2. Dosage des glucides	46
B. Utilisation de glycérol marqué	46
V. Etude par résonance magnétique nucléaire	47
A. Principe	47
B. Traitement du signal	48
VI. Analyse des protéines	50
A. Extraction des protéines	51
1. Protéines tissulaires	51
2. Protéines extracellulaires	52
B. Dosage	52
C. Electrophorèse bidimensionnelle	53
1. Electrophorèse de première dimension ou isoélectrofocalisation	53
2. Electrophorèse de deuxième dimension	53
3. Révélation argentique des protéines	54
4. Séchage des gels	54
5. Révélation des protéines au bleu de Coomassie	55
6. Electrophorèse monodimensionnelle	56
7. Immunodétection des protéines	56
a. Electrotransfert sur membrane	56
b. Révélation des protéines d'intérêt	57
8. Coloration des gels en vue du séquençage	57
9. Caractérisation des protéines par MALDI-TV	58
10. Analyse informatique des gels et des membranes	58
D. Dosage enzymatique	58
1. Dosage de la glycérol kinase et de la NAD-glycérol3P déshydrogénase.	58
2. Dosage des activités invertasiques	59
VII. Techniques de biologie moléculaire	60
A. Extraction des ARN totaux	60
B. Dosage	61
C. Northern Blot	61
1. Electrophorèse en gel d'agarose	61
2. Transfert sur membrane	61
3. Marquage d'une sonde chaude	62
D. Technique de PCR.	63
E. Séquençage	64
1. Amplification préparative d'un insert par PCR	64
2. Séquençage de l'insert	64
Résultats	67
Partie I : Effet du glycérol sur l'induction des cellules embryogènes et la formation des embryons somatiques	67
I. Effet du glycérol sur la synchronisation de la première division des cellules embryogènes	67
A. Le contenu en saccharose et rendement en embryons somatiques	67
B. Les tissus foliaires au cinquième jour de culture	68
C. Les tissus au quatrième jour de culture	70
D. Conclusion	71
II. Effet de l'augmentation de la concentration en glycérol sur la synchronisation de la première division des cellules embryogènes.	71

A.Effet de l'apport de 495 mM de glycérol	71
B.Effet de l'apport de 660 mM de glycérol	73
III. Effet du glycérol sur la quantité et la qualité des embryons somatiques	73
A. Les tissus foliaires au quatrième jour en absence de glycérol	73
B. Mise en place d'un nouveau protocole	74
IV.Conclusion	77
V.Etude histologique chez une variété non embryogène : la chicorée Flash	78
A.Au quatrième jour de culture	78
B.Au huitième jour de culture	78
C. Conclusion	80
VI.Effet du glycérol sur les microtubules du cytosquelette au cours de la division des cellules embryogènes de chicorée "474"	80
A.Effets du glycérol sur la quantité de tubulines	81
1.Variations de l' α tubuline.	81
2.Variations de la β tubuline	83
3.Conclusion	83
B.Effet du glycérol sur l'organisation en microtubules	85
C. Discussion - Conclusion	87
VII.Effet du glycérol sur le conditionnement des cultures embryogènes	87
A.Effet de l'apport additionnel de 330 mM de glycérol	87
B.Le glycérol peut-il remplacer le saccharose ?	88
C.conclusion	91
Partie II. Le métabolisme du glycérol et son implication sur l'embryogenèse somatique	94
I.Evolution du glycérol	94
A.Dans les milieux de culture	94
B.Dans les tissus foliaires	96
C.Répercussion sur la pression osmotique dans les milieux de culture	97
D.Discussion-Conclusion	99
II.Devenir du glycérol marqué : Glycérol- ¹⁴	99
III. Les enzymes du métabolisme du glycérol	100
A. Mesure de l'activité de la glycérol kinase	100
B. Mesure de l'activité de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase	100
C. Conclusion	102
IV.Etude du métabolisme du glycérol par la RMN	102
A.Le glycérol et les molécules carbonées	102
B.La phosphorylation du glycérol et les molécules phosphatées	104
C.Conclusion – discussion	106
V. Un autre effet du glycérol: l'accumulation d'un oligosaccharide	107
A.Détection par CLHP	107
1. Mise en évidence.	107
2.Quantification	107
B.Détection en RMN et quantification	109
C.Conclusion	109
VI. Le métabolisme du glycérol chez la chicorée Flash	110
A.Evolution du glycérol	110
B.Conclusion	111
C.Le produit X chez Flash	112

Partie III: Effet du glycérol sur le métabolisme carboné	113
I.Interaction du glycérol avec le métabolisme des sucres	114
A.Dans les milieux de culture	114
B.Dans les tissus foliaires	117
II.Effet du glycérol sur les activités de l'invertase	117
A.Effet du glycérol sur l'activité de l'invertase neutre cytoplasmique	118
B.Effet du glycérol sur les activités des invertases acides	119
1.Mesure de l'activité invertasique vacuolaire	119
2.Mesure de l'activité invertasique pariétale	120
C.Conclusion	121
III.Etude de l'effet du glycérol sur l'invertase pariétale acide	121
A.Purification et révélation par Western blot	121
1.Purification de la protéine	121
2.Etude du taux de l'invertase au cours de l'embryogenèse somatique	123
B.Etude des ARNm	125
1.Obtention d'une sonde d'invertase de chicorée	126
2.Northern blot	130
IV Chez la chicorée non embryogène Flash	131
A.Dosage des sucres alcoolosolubles	131
B.Dosage des activités invertasiques	133
C.Conclusion	135
Partie IV: Contribution du glycérol à la recherche de marqueurs précoces	137
I.Analyse des protéines extracellulaires après révélation argentique	138
A.Chez l'hybride "474"	138
B.Chez la variété Flash	141
C. Conclusion	142
III.Caractérisation des protéines 10a et 10b et 14a, b, c et d excrétés par les fragments foliaires de chicorée "474"	144
A.Les protéines de 10 kDa	144
1. Electrophorèse monodimensionnelle et coloration argentique	144
2. Révélation immunologique	145
3. Chez la chicorée Flash	147
B.Les protéines de 14 kDa	148
1.Séquençage partiel	148
2. Conclusion	149
IV. Analyse des protéines tissulaires foliaires	149
A. Après révélation argentique	149
B.Analyse de la zone I	151
C.Analyse des autres parties du gel	153
D.Les polypeptides d'intérêt	153
E. De nouveaux polypeptides marqueurs ?	156
1.Mise en évidence chez la chicorée "474"	156
2.Chez la chicorée Flash	156
F. conclusion	158
Discussion - conclusions	159
Références bibliographiques	171
Annexes	187
Publications	

Introduction

Introduction

En Egypte, 4000 ans avant notre ère, la culture de chicorée s'étend sur les deux rives du Nil. Les paysans font griller sur des pierres plates des petites graines aux vertus digestives. De cette période date le premier document connu relatif à la chicorée. Herbacée de la famille des Astéracées, la chicorée est une cousine du pissenlit et de la laitue. Un genre de chicorée, l'*intybus*, produit la racine à torrifier et l'endive ; un second l'*endivia*, donne la scarole et la chicorée frisée.

Vasil *et al.* (1964) ont été les premiers à révéler les potentialités embryogènes de cals issus d'embryons zygotiques de *Cichorium endivia*. Le développement en plantule de ces embryons somatiques n'a été obtenu qu'en 1985 par Heirwergh *et al.* Les premiers travaux sur l'embryogenèse somatique chez la chicorée ont été publiés par Dubois *et al.* en 1988. Parmi les différents génotypes testés, seuls deux ont été capables de produire des embryons somatiques : *C. intybus* var. Magdebourg cv. 1106 et *C. intybus* var. *sativum* x *C. endivia*. var. *latifolia* : le *Cichorium* hybride "474". Les premiers résultats portèrent sur l'obtention d'embryons somatiques à partir d'organes reproducteurs tels que les anthères ou les styles (Dubois *et al.*, 1988 ; Guedira *et al.*, 1989). Par la suite, les racines et les feuilles de vitroplants âgés de deux mois se sont révélées particulièrement aptes à l'embryogenèse somatique (Guedira *et al.*, 1990 ; Dubois *et al.*, 1991). Ces travaux s'intègrent dans l'étude de la différenciation des cellules compétentes à l'embryogenèse somatique et dans la recherche de marqueurs précoces de cette potentialité.

Les tissus foliaires de la chicorée hybride "474" représentent un modèle particulièrement attractif de l'embryogenèse somatique car celle-ci est directe, rapide (moins de 12 jours) et abondante (plus de dix embryons somatiques par mm² de limbe). Ce qui fait l'originalité du système, c'est que l'ajout de glycérol au milieu de culture permet une synchronisation relative de la première division des cellules embryogènes (Robatche-claive *et al.*, 1992). De ce fait, les études physiologiques et moléculaires lors des stades précoces de l'embryogenèse somatique, s'avèrent plus aisées à appréhender. Les auteurs montrent que le glycérol n'a pas qu'un rôle d'osmoticum et qu'une fraction de celui-ci peut

être métabolisé dans les racines. Il nous a donc paru essentiel d'étudier plus en détail les effets de ce polyol sur la synchronisation du processus d'embryogenèse somatique.

L'étude bibliographique dresse un bilan des connaissances actuelles sur l'embryogenèse somatique et fait le point sur l'utilisation et le métabolisme du glycérol chez les végétaux. Les résultats sont décrits dans quatre parties.

La première partie de notre travail a consisté à rechercher l'effet du glycérol sur la synchronisation de la première division de la cellule embryogène dans les limbes cultivés avec davantage de saccharose destiné à accroître le nombre d'embryons somatiques différenciés. Nous avons étudié l'influence du glycérol sur les microtubules, la quantité et la qualité des embryons somatiques.

La seconde partie traite du métabolisme propre du glycérol au cours de l'embryogenèse somatique. Le devenir du glycérol au sein des tissus foliaires de chicorée a été étudié grâce à des techniques de quantification par CLHP, d'analyse du glycérol marqué par le ^{14}C , de recherche par RMN de métabolites dérivés du glycérol et de suivre les activités de deux enzymes du métabolisme : la glycérol kinase et la glycérol 3-phosphate deshydrogénase

Dans la troisième partie, nous décrivons l'effet du glycérol sur le métabolisme carboné et plus particulièrement sur les invertases.

La quatrième partie de notre travail a pour objectif de mettre en évidence de nouveaux marqueurs précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Nous montrerons comment le glycérol peut contribuer à cette étude.

Une discussion termine ce travail et fait la synthèse des effets du glycérol observés au cours de l'embryogenèse somatique dans les tissus foliaires de l'hybride "474" de chicorée et propose des perspectives éventuelles.

Etude bibliographique

Etude bibliographique

I. L'embryogenèse somatique

A. Définition et intérêt de l'embryogenèse somatique

Si la morphogenèse comprend divers phénomènes d'acquisition de formes, de structures et d'organisation fonctionnelles chez les organismes vivants, elle englobe également la différenciation des tissus, de leur origine cellulaire à leur état adulte. Mais on ne peut parler de morphogenèse végétale qu'en introduisant la notion de **totipotence**. En effet, la capacité à construire à tout âge et dans certaines conditions, la structure complexe de l'embryon et à régénérer des organes ou des individus complets à partir d'une seule cellule est sans doute une des propriétés les plus remarquables du monde végétal. Cette aptitude permanente distingue les plantes des animaux les plus évolués et combat le cours de la spécialisation et de la sénescence.

La manifestation de la totipotence montre que l'apparente fixité et la limitation des propriétés morphogénétiques ne résultent pas d'une perte définitive d'informations génétiques. Celles-ci sont masquées ou réprimées et doivent être réactivées afin de pouvoir à nouveau s'exprimer. Les applications de la propriété de totipotence sont courantes aussi bien dans le domaine horticole (bouturage, marcottage,...) que pour la régénération de plantes entières par culture *in vitro*. Dans ce dernier cas l'**embryogenèse** somatique paraît, de plus en plus, être la technique idéale.

Dans des conditions bien déterminées, une cellule ou un groupe de cellules donnera un embryon capable ensuite de former une plante entière (Dudits *et al.*, 1991). Par définition, un embryon est une structure bipolaire avec un pôle caulinaire et un pôle racinaire. Il existe trois types d'embryogenèse : l'embryogenèse zygotique (issue de la fusion de deux gamètes haploïdes), l'embryogenèse haploïde (issue de microspores ou de

	Embryon zygotique	Embryon somatique
Origine	Reproduction sexuée Bicellulaire	Multiplication végétative Unicellulaire
Développement	Divisions successives dans un même plan jusqu'à obtention d'un ensemble unisérie de 8 cellules. C'est à ce stade qu'intervient la première division longitudinale. Présence d'un suspenseur qui alimente le jeune embryon en substances trophiques et régulateurs de croissance à l'intérieur du sac embryonnaire	Division longitudinale précoce aboutissant à la formation d'un agrégat cellulaire. Les substances trophiques et les régulateurs de croissance doivent être apportés par le milieu de culture. Toutes les conditions, pH, hygrométrie, concentrations en O ₂ , en hormones végétales, en saccharose et en acides aminés peuvent être différentes.
	Dans les deux cas, le développement de l'embryon se fait au travers d'une séquence de stades définis : <ul style="list-style-type: none"> * stade globulaire * stade cordiforme * stade torpille 	
Morphologie	Structure bipolaire, développement précoce et simultané d'un méristème de tige et d'un méristème de racine. L'axe caulinaire développe d'abord les cotylédons.	
Biochimie	Protéines de stockage spécifiquement embryonnaires	Identification de protéines embryonnaires à des taux inférieurs (Colza...) ou supérieurs (Carotte...).
Germination	La germination peut être différée (dormance). Elle est autonome grâce aux réserves de la graine.	Le développement d'une plante est immédiate pour un embryon mature, mais nécessite un milieu riche en sucre.

Tableau 1: Comparaisons majeures entre l'embryogenèse somatique et l'embryogenèse zygotique. D'après Zimmerman, 1993.

cellules du gamétophytes femelle) et l'embryogenèse somatique qui résulte de la différenciation d'une ou plusieurs cellules diploïdes d'un tissu somatique (feuille, racine, anthère, style,...). Les embryons somatiques se distinguent des embryons zygotiques pour un certain nombre de propriétés (Tableau 1 ; Fig. 1).

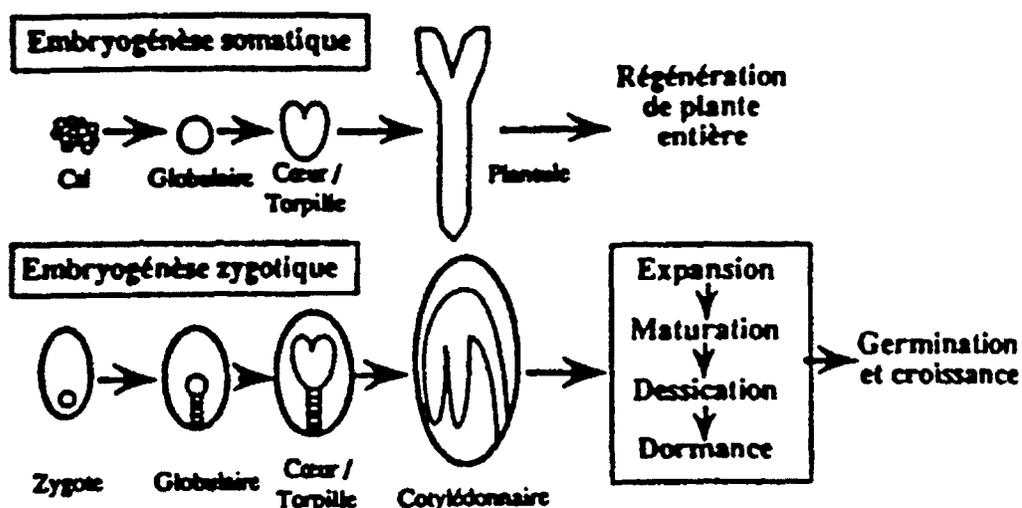


Figure 1 : Comparaison entre l'embryogenèse somatique et zygotique (d'après Zimmerman, 1993)

Pour le sélectionneur, l'embryogenèse présente un avantage important. En effet si les embryons zygotiques résultent d'un brassage chromosomique des patrimoines des gamètes mâles et femelles et n'ont donc pas de conformité stricte avec les parents à l'inverse, les embryons somatiques résultent d'une cellule banale et permettent la multiplication des plantes hybrides tout en respectant l'uniformité génétique (Nouaille et Pétiard, 1988).

Depuis que Reinert (1958) et Stewart *et al.* (1958) ont décrit les premiers résultats sur l'embryogenèse somatique, cette technique a permis de régénérer de nombreuses espèces végétales (luzerne, céleri, carotte,...). Les embryons somatiques permettent pour certaines plantes (camélia, cyclamen, gerbera,...) de diminuer les coûts de production car le potentiel embryogène par litre de milieu de culture est considérable et peut atteindre

plusieurs millions de structures embryogènes ce qui est nettement supérieur à n'importe quelle autre méthode de production classique ou *in vitro*. Dans le cadre des semences artificielles, la stabilisation des embryons somatiques par des techniques d'enrobage à l'aide d'un gel de nature polysaccharidique (alginate, agarose, agar, carraghéane,...) ou encore organique (polyacrylamide, résine,...) est également largement étudiée.

D'un point de vue fondamental, les embryons somatiques permettent de faire le lien entre une cellule et une plante entière. L'embryon somatique est donc un modèle d'expérimentation idéal pour étudier la différenciation des plantes ainsi que les mécanismes d'expression de la totipotence (Nomura et Komamine, 1986). Cependant malgré de nombreux succès, la régénération de certaines plantes par embryogenèse somatique présente encore des difficultés. Celles-ci sont d'autant plus mal acceptées qu'elles concernent les problèmes d'intérêt agronomique. Une meilleure compréhension du ou des processus de l'embryogenèse somatique est donc susceptible d'améliorer cette situation.

Afin qu'une structure tissulaire complexe foliaire ou racinaire, bien définie par des relations spatiales et entretenue dans un flux de changements continuels, puisse modifier son développement morphogénétique et permettre une redifférenciation d'embryons à partir de cellules déjà différenciées, deux étapes sont indispensables : une étape préalable de **dédifférenciation** ou de réactivation cellulaire, puis une étape d'**induction** conduisant à l'obtention de cellules compétentes à l'embryogenèse somatique. Une phase finale d'expression à la compétence embryogène conduit à la formation d'embryons somatiques qui se développeront en plantules.

B. Origine des embryons somatiques

Les embryons somatiques peuvent avoir deux origines distinctes (unicellulaire ou pluricellulaires) qu'il est nécessaire de définir par rapport à la notion d'embryogenèse somatique directe ou indirecte.

Les embryons somatiques peuvent avoir une origine **unicellulaire** : une cellule dédifférenciée subit plusieurs divisions et donne un embryon somatique. Cela a été observé

lors de l'embryogenèse somatique chez *Freesia refracta* Klatt. (Wang *et al.*, 1990), *Nicotiana tabacum* L. (Stolarz *et al.*, 1991), *Cichorium intybus* L. (Dubois *et al.* 1988, 1990) ou encore *Daucus carota* (Toonen *et al.* 1994) ou **pluricellulaires** où un ensemble de cellules forme un complexe de cellules pro embryogènes qui donnera des embryons somatiques.

L'embryogenèse somatique est **directe** lorsque les embryons sont initiés à partir de cellules dites embryogènes (Figure 2) sur l'explant lui-même sans phase préliminaire de callogenèse. C'est le cas chez le dactyle (Hanning et Conger, 1982), la chicorée (Guedira *et al.*, 1989 ; Dubois *et al.* 1991), *Quercus suber* (El-Maataoui *et al.*,1990), *Solanum aviculare* (Alizadeh *et al.*, 1991), la carotte (Masuda *et al.*, 1995) ou *Helianthus smithii* (Laparra *et al.* 1997).

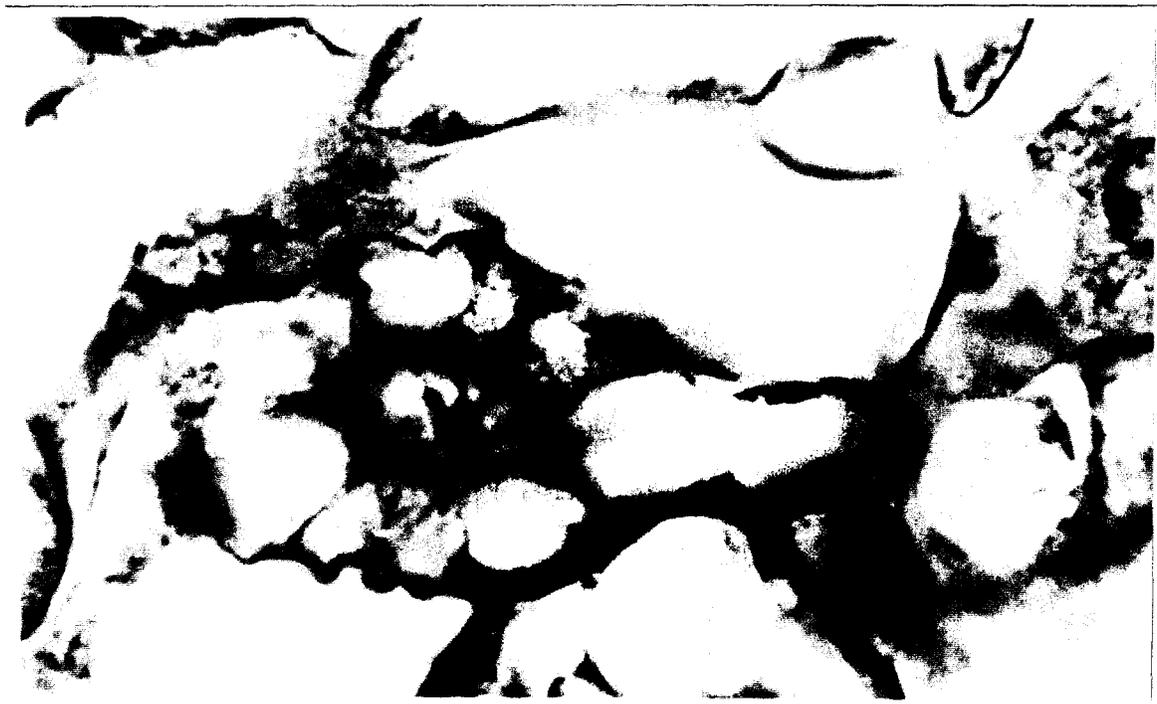


Figure 2 : Cellule réactivée potentiellement embryogène sur un limbe de chicorée hybride "474" Photographie après 5 jours d'incubation dans un milieu permettant l'embryogenèse somatique.

L'embryogenèse somatique est indirecte lorsque les cellules embryogènes se forment à l'intérieur d'un cal et nécessite un transfert sur milieu d'expression pour l'obtention

d'embryons comme chez *Picea abies* (Hakman *et al.*, 1990), *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992) ou *Cicer arietinum* (Sagare *et al.*, 1995). L'embryogenèse somatique indirecte a été particulièrement bien étudiée sur le modèle carotte (De Vries *et al.*, 1988a ; Cordewinner *et al.*, 1991). Cependant, même si l'origine unicellulaire d'embryons a été démontrée (Nomura et Komamine, 1985), il est difficile de suivre le développement de ces cellules et de déterminer les événements précoces de l'embryogenèse somatique dans les masses proembryonnaires.

C.Facteurs intervenant sur l'embryogenèse somatique

1.Facteurs chimiques

Pour de nombreuses espèces, **les régulateurs de croissance** permettent l'obtention d'embryons somatiques (Ammirato, 1983). Au cours de l'induction des embryons somatiques chez l'olivier les cytokinines sont nécessaires (Rugini, 1988) et il en est de même chez la chicorée (Guedira *et al.*, 1989). Williams et Maheswaran (1986) ont obtenu des embryons somatiques produits directement à partir de cellules épidermiques d'hypocotyles de *Trifolium repens* en présence de BAP. Par contre, pour Vieitez et Barciela (1990) aucune relation claire ne peut être établie entre les régulateurs de croissance et l'embryogenèse somatique chez *Camellia japonica* L. Les auxines peuvent même dans certains cas devenir inhibitrices de l'embryogenèse chez la carotte (Guzzo *et al.*, 1994).

De nombreuses études soulignent l'importance de **l'azote** sous forme de composés azotés minéraux ou organiques lors de l'embryogenèse somatique. Pour Wetherell et Dougall (1976) l'addition de composés azotés minéraux, réduits ou oxydés permet d'améliorer l'embryogenèse somatique par rapport à l'utilisation de KNO_3 comme seule source azotée. L'ammonium est absolument nécessaire à l'induction et à la différenciation des embryons de luzerne (Meijer et Brown, 1987). L'azote organique est ajouté sous forme d'acides aminés : la proline pour l'obtention d'embryons de maïs (Vasil et Vasil, 1987), la glycine chez l'*Allium fistulosum* L. (Lu *et al.*, 1989) ou encore la glutamine chez la chicorée (Guedira *et al.*, 1989). Une augmentation du potentiel embryogène peut être obtenue par

addition d'un mélange azoté complexe tel que l'hydrolysate de caséine dans le cas de *Zea diploperennis* (Swedlund *et Locy*, 1988) ou du tournesol (Pélissier *et al.*, 1990).

Les sels tels que les chlorures de sodium ou de potassium favorisent l'induction de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons immatures de blé (Galiba *et Yamada*, 1988).

La source carbonée est un élément important du milieu de culture dans la mesure où elle permet aux tissus de compenser le manque d'activité photosynthétique des explants cultivés *in vitro*. La nature de la source carbonée ne semble pas influencer l'embryogenèse somatique chez la carotte (Verma *et Dougall*, 1977). Chez la luzerne, le maltose est la source carbonée utilisée (Strickland *et al.*, 1987) et les embryons somatiques de pois sont induits et se développent en présence de glucose (Lazzeri *et al.*, 1987). Toutefois, dans la majeure partie des cas c'est le saccharose qui est utilisé à des concentrations comprises entre 20 et 30 g.l⁻¹. Ainsi, parmi dix sources carbonées testées, le saccharose est la plus efficace pour l'obtention d'embryons somatiques chez la chicorée (Couillerot *et al.*, 1993).

2. Les facteurs physiques

Le rôle de **la pression osmotique** est étudié au cours de l'embryogenèse somatique en additionnant par exemple des polyols présumés non métabolisables par les végétaux (mannitol, sorbitol, voire le glycérol). Une forte augmentation de la pression osmotique est favorable à l'embryogenèse du tournesol (Jeannin *et al.*, 1993) et selon Wetherell (1984) des stress osmotiques importants peuvent provoquer l'isolement des futures cellules embryogènes par rupture des plasmodesmes chez la carotte. Un effet positif du mannitol est aussi rapporté dans des suspensions cellulaires de céleri (Nadel *et al.*, 1990). Chez la chicorée, Guedira *et al.* (1990) constatent qu'une forte pression osmotique est bénéfique à l'embryogenèse somatique issue de styles.

La température utilisée pour l'induction de l'embryogenèse somatique est généralement voisine de 25°C. Des températures plus élevées (30°C) sont requises pour certaines espèces comme le caféier (Dublin, 1982) ou le tournesol (Finer, 1987). Chez la

chicorée, une température de 35°C est déterminante pour l'induction de l'embryogenèse somatique (Dubois *et al.*, 1988 ; Décout *et al.* 1994).

L'induction est parfois réalisée en **lumière** continue chez le millet (Eapen *et* George, 1990) ou avec photopériode de 16 heures chez le pois (Kysely *et* Jacobsen, 1990). Dans la majorité des cas, l'induction des embryons ou des cals embryogènes s'effectue à l'**obscurité** comme dans le cas de la chicorée.

D. Les marqueurs de l'embryogenèse somatique

Les marqueurs sont des événements de nature physiologique, cytochimique ou moléculaire qui sont impliqués dans les étapes décisives de l'embryogenèse somatique. A ce jour, la majeure partie des marqueurs découverts est associée à des phénomènes particuliers qui ne sont que la conséquence de l'expression de ces phénomènes et peu de marqueurs peuvent être qualifiés de prédictifs, c'est à dire qui précèdent l'événement cytologique ou morphologique qui va déclencher l'embryogenèse somatique.

1. Les marqueurs physiologiques et cytochimiques

Dans les tissus embryogènes de la chicorée, le premier signe distinctifs des cellules embryogènes est un dépôt de **callose** entre le deuxième et le troisième jour de culture (Dubois *et al.*, 1990). Ces modifications au niveau pariétal isolent les cellules de leur environnement tissulaire permettant alors l'expression du programme embryogène. Les cellules évoluent ensuite en cellules compétentes caractérisées par un cytoplasme dense et un noyau avec un nucléole bien visible. Ce dépôt de callose pariétale dans un premier temps localisé au niveau des plasmodesmes s'épaissit puis disparaît lorsque l'embryon se développe (Dubois *et al.*, 1991). Pedroso *et* Pais (1995) associent eux aussi dans les tissus de *Camellia japonica* une telle présence de callose à un isolement de la cellule embryogène, nécessaire au déroulement du programme embryogène.

La présence d'un **réseau fibrillaire** a été observé plus tardivement au niveau des embryons somatiques déjà formés chez le camélia (Pedroso *et* Pais, 1992) et chez la

chicorée (Dubois *et al.*, 1992). Ce réseau fibrillaire serait de nature glycoprotéique chez la chicorée (Dubois *et al.*, 1992) mais aussi chez le caféier (Nakamura *et al.*, 1992).

L'apparition de modifications de la composition pariétale, notamment en **polysaccharides**, est rapportée au cours de l'embryogenèse de la carotte (Kikuchi *et al.*, 1995). L'analyse de cals embryogènes et non embryogènes révèle une différence au niveau des sucres (arabinose et galactose) qui assureraient des liaisons plus ou moins importantes entre les cellules des différents cals.

Le taux et la biosynthèse des **polyamines** (putrescine, spermidine et spermine) modifient la formation et le développement des embryons somatiques chez la carotte (Montague *et al.*, 1978; Feirer *et al.*, 1984; Minocha *et al.*, 1991). Leur apport est souvent favorable à l'embryogenèse somatique chez cette espèce mais aussi chez la chicorée (Couillerot *et al.*, 1993; Deldicque, communication personnelle) et chez le camélia (Pedroso *et al.*, 1997). Des inhibiteurs de synthèse des polyamines provoquent souvent une diminution de l'embryogenèse somatique réversible, comme c'est le cas chez la chicorée (Helleboid *et al.*, 1995). En revanche, ces inhibitions induisent une augmentation de la synthèse de l'**éthylène** qui est parfois favorable à l'embryogenèse somatique (Hutchinson *et al.*, 1997).

2. Les marqueurs protéiques

a. Les marqueurs protéiques tissulaires

Le but des travaux est de rechercher des protéines exprimées spécifiquement au cours des différents stades de l'embryogenèse somatique. Les premières "protéines spécifiques" ont été identifiées à la fois sur des embryons zygotiques et somatiques chez la carotte (Sung et Okimoto, 1981). Deux marqueurs protéiques mis en évidence dans des nodules embryogènes de pois semblent similaires à ceux de carotte (Stirn *et Jacobsen*, 1987). Hahne *et al.* (1988) identifient des marqueurs protéiques dans des cals embryogènes de *Dactylis glomerata*. Chez le riz, des protéines de 40 et 44 kD sont associées à l'embryogenèse somatique (Chen et Luthe, 1987) et ces protéines présentent de fortes

homologies avec des protéines détectées dans des cals de blé (Fellers *et al.*, 1997). Chez la chicorée, des profils protéiques de tissus induits ou non-induits montrent des polypeptides nouvellement exprimés au cours de l'embryogenèse somatique dans les feuilles (Hilbert *et al.*, 1992) et dans les racines (Boyer *et al.*, 1993). Dans les racines 12 protéines associées à l'embryogenèse somatique sont caractérisées (Boyer *et al.*, 1994).

b. Les marqueurs protéiques extracellulaires

Des protéines extracellulaires dans des cultures cellulaires embryogènes ont été observées chez de nombreuses espèces. Ainsi chez la carotte la présence de protéines extracellulaires glycosylées est associé au phénomène d'embryogenèse somatique (De Vries *et al.*, 1988b ; Cordewener *et al.*, 1991 ; De Jong *et al.*, 1988). Le rôle de ces protéines n'est pas totalement élucidé mais quelques unes d'entre elles provoquent l'embryogenèse somatique lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de culture de lignées cellulaires non-embryogènes (De Vries *et al.*, 1989 ; Lo Schiavo *et al.*, 1990).

Dans les milieux de culture de cellules, de tissus ou d'organes, peu de protéines ont pu être identifiées. Cette identification, si elle est nécessaire ne permet pas toujours une interprétation aisée de la présence de ces polypeptides. Par exemple, Domon *et al.* (1995) ont mis en évidence une **germine** chez le pin. Cette protéine s'accumule habituellement dans les parois des embryons de blé lorsque la plantule se développe.

Parmi les protéines excrétées, Sterk *et al.* (1991) identifient une **LTP** (lipid transfer protein) dans les milieux de culture de carotte. Cette protéine désignée EP 2 a une masse moléculaire de 10 kD. De la même manière chez la vigne, Coutos-Thévenot *et al.* (1992a et b) ont mis en évidence des LTP dont 4 isoformes de 9 kD ont été caractérisées (Coutos-Thévenot *et al.*, 1993). Ces protéines semblent être responsables de l'arrêt du développement de l'embryon somatique entre les stades globulaires et cordiformes dans un milieu dépourvu d'auxine (Maës *et al.*, 1997). De façon similaire, des glycoprotéines extracellulaires suppriment l'embryogenèse somatique chez le *Citrus* (*et al.*, 1991).

Chez la chicorée, dans les milieux de culture de feuilles, trois types de protéines ont été identifiés et associés à l'embryogenèse somatique : deux β -1,3 glucanases de 38 kDa, une chitinase de 30 kDa et une thaumatine-osmotine-like de 22 kDa (Helleboid *et al.*, 1998). Si la fonction des deux dernières est encore à déterminer, les auteurs pensent que les glucanases permettent la dégradation de la callose qui entoure les cellules engagées dans le processus embryogène. Ces protéines disparaissent d'ailleurs du milieu de culture lorsqu'on inhibe le processus embryogène (Helleboid *et al.*, 1995).

3. Les gènes marqueurs

Il est très difficile d'identifier des gènes qui soient spécifiquement impliqués dans le processus d'induction de l'embryogenèse somatique (Wilde *et al.*, 1988). En effet la plupart sont habituellement exprimés dans les embryons somatiques et ne sont qu'une conséquence de leur développement. Actuellement la majeure partie des gènes découverts, en relation avec l'embryogenèse somatique, codent pour des LEA (late embryogenesis abundant protein) et sont étudiés chez la carotte (Choi *et al.*, 1987 ; Wilde *et al.*, 1988 ; Franz *et al.*, 1989 ; Kiyosue *et al.*, 1992 ; Wurtele *et al.*, 1993). La plupart des gènes LEA étudiés peuvent être induits par un traitement des cals embryogènes ou des embryons somatiques à l'acide abscissique (Hatzopoulos *et al.*, 1990a ; Goupil *et al.*, 1992 ; Kiyosue *et al.*, 1993).

D'autres gènes ont pu être isolés à partir de banques d'ADNc construites à partir des ARNm isolés au cours des différents stades de l'embryogenèse somatique chez la carotte: i) des gènes codant pour un facteur d'élongation et une ATPase dans les cals (Zimmerman, 1992), ii) différents clones isolés par Aleith et Richter (1990) qui traduiraient des protéines riches en proline ou en glycine et présenteraient des homologues avec des protéines de la paroi cellulaire (Keller *et al.*, 1988). Schmidt *et al.* (1997) ont mis en évidence un gène codant pour une protéine SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) dont le produit est décelable uniquement au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique.

Chez la luzerne, des gènes de mRNP (ribonucléo-protéines) qui s'associent aux ARNm ont été isolés et associés à l'embryogenèse somatique (Pramanik et Bewley, 1996). D'autres

n'ont pu être séquencés ou ne correspondent à aucun gène connu dans les bases de données (Giroux et Pauls, 1997).

Les marqueurs chez la chicorée

Nous avons résumé sur la figure 3 les différents marqueurs de l'embryogenèse somatique chez la chicorée précédemment cités au cours de la première partie de cette étude bibliographique.

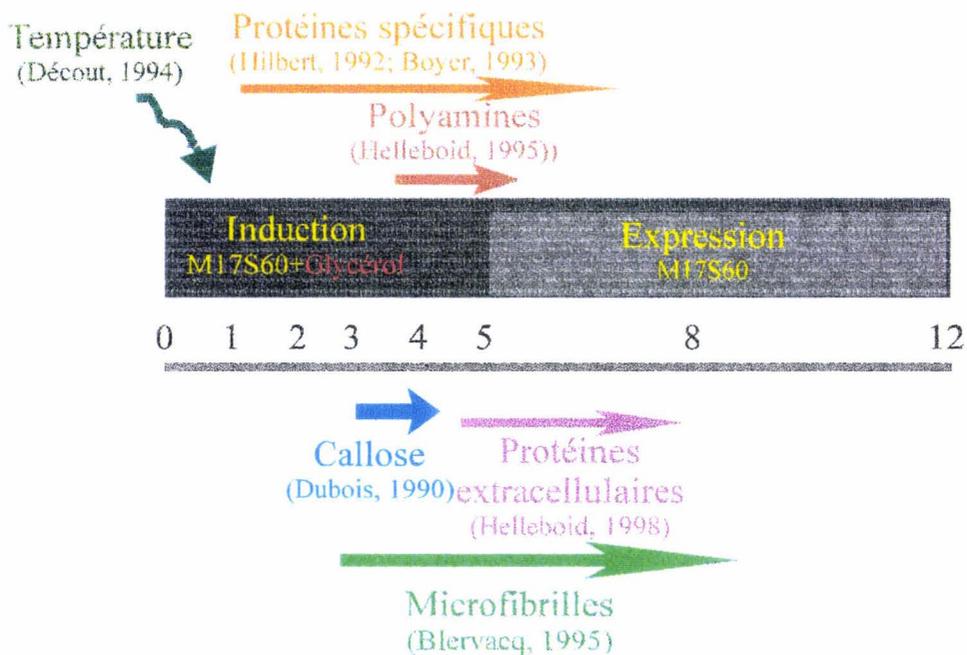


Figure 3 : Les marqueurs précoces mis en évidence chez la chicorée "474".

II. Le glycérol

Le glycérol, composé à trois atomes de carbone, est considéré comme un produit de la réduction de la dihydroxyacétone ou du glycéraldéhyde. C'est un trialcool dont l'importance métabolique est considérable. Outre le fait qu'il soit une molécule primordiale dans les voies de la glycolyse et de la néoglucogenèse, il est le précurseur commun des glycérides, des galactolipides et des phospholipides (Mazliak, 1968).

A. Le glycérol en culture *in vitro*

1. Source carbonée des végétaux

Gautheret est le premier en 1948, à rapporter l'utilisation du glycérol en culture *in vitro*. Il montre que des cals de carotte et de tournesol peuvent être cultivés indéfiniment sur du glycérol comme seule source carbonée. Successivement, Hildebrandt et Riker (1949) puis Nickell et Bulkholder (1950) obtiennent un effet sur des tissus tels que des fragments foliaires et racinaires. Gautheret (1959) signale que le glycérol est le seul polyalcool pouvant constituer une source carbonée satisfaisante pour les végétaux.

Des suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus* sont capables de croître sur un milieu enrichi en glycérol (Scala et Semersky, 1971). Si les cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum* sont incapables de se développer sur glycérol comme seule source carbonée, une lignée cellulaire mutante 'Gut' utilise spécifiquement le glycérol et semble incapable de croître sur d'autres sources carbonées. De plus, cette mutation est transmise et maintenue au cours des régénérations ultérieures (Chaleff et Parsons, 1978). Jones et Veliky (1980) qui étudient la possibilité d'utiliser le glycérol comme unique source d'énergie pour des suspensions cellulaires de carotte, de *Cannabis sativa* et d'*Ipomea sp.*, montrent que ces trois espèces ont une croissance tout à fait satisfaisante même si les deux premières nécessitent un temps d'adaptation.

Grout *et al.* (1976) signalent toutefois que des cellules d'*Acer pseudoplatanus* L. cultivées en présence de glycérol présentent des anomalies structurales de la paroi. Ces

mêmes différences apparaissent chez des explants de *Lactuca* et sont typiquement liées à la formation des trachéïdes dans le xylème (Roberts, 1976) et en 1982, Roberts et Baba montrent que le glycérol est à l'origine de l'induction de la xylogénèse.

Chez les végétaux inférieurs des résultats intéressants ont également été obtenus. Chez les algues, l'utilisation de glycérol comme source carbonée, favorise la croissance d'*Ecklonia radiata* (Lawlor *et al.*, 1989) et de *Grateloupia doryphora* (Robaina *et al.*, 1990). Chez *Gracilaria verrucosa*, la combinaison du glycérol avec des phytohormones augmente considérablement la croissance (Kaczyna et Megnet, 1993).

2.Effet protecteur et stabilisateur

D'une façon générale, le glycérol protège les enzymes contre une dénaturation liée à une soudaine élévation de température (Paley *et al.*, 1981; Nash *et al.*, 1982). Chez *Zea mays* le glycérol semble avoir un effet protecteur pour les enzymes du type phosphoénol pyruvate carboxylase (P.E.P carboxylase) au cours des procédés de purification (Selioneti *et al.*, 1987). Selon Gekko et Tamasheff (1981-a et b), le glycérol favorise l'accumulation de protéines et stabilise leur structure. De ce fait, le glycérol est utilisé pour stabiliser la P.E.P carboxylase au cours de son extraction et du dosage de son activité chez *Cynodon dactylon* L. (Stamatakis *et al.*, 1988) et chez *Zea mays* (Karabourniotis *et al.*, 1983; Manetas *et al.*, 1982; Manetas *et al.*, 1986). Le glycérol protège encore la pyruvate orthophosphate dikinase, une enzyme chloroplastique des plantes en C₄, contre la dissociation de sa structure quaternaire en culture *in vitro* (Shirahashi *et al.*, 1978). De plus, cette enzyme traitée par des températures basses conserve son activité en présence de glycérol (Krall *et al.*, 1989).

3.Effet stimulateur

La présence du glycérol stimule et optimise l'efficacité de la P.E.P carboxylase en la maintenant dans sa forme la plus active dans des feuilles de *Zea mays* (Podesta et Andreo, 1989). Chez cette espèce, il augmente également son activité à pH élevé (Uedan et Sugiawama, 1976) et quand la quantité de substrat - le phosphoénol pyruvate - est faible

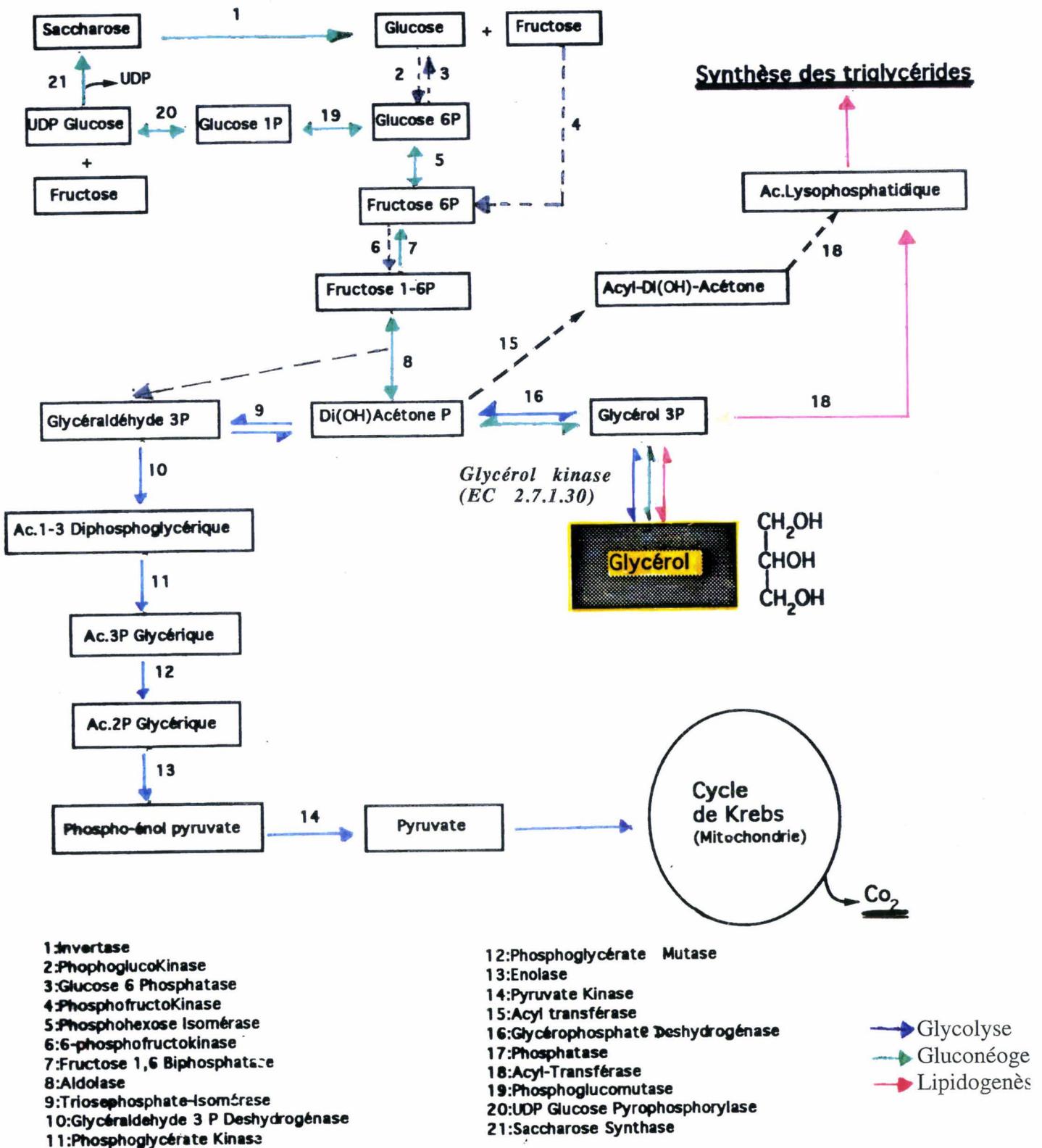


Figure 4: Le métabolisme du glycérol dans les plantes supérieures, d'après Beevers (1961) et MacDonald et Ap Rees (1983) modifié.

(Gavalas *et al.*, 1982) ; le glycérol intervient au niveau de la régulation de l'activation et de la désactivation de la pyruvate orthophosphate dikinase (Salahas *et al.*, 1990).

4. Agent osmotique

Ben Amotz et Mordhay, en 1973, démontrent le rôle du glycérol dans la régulation osmotique d'une algue verte, *Dunaliella parva*. Dans un milieu hypertonique riche en magnésium, l'accumulation de glycérol permet de restaurer l'équilibre osmotique nécessaire au maintien de l'intégrité des membranes de *Dunaliella tertiolecta* (Fujii, 1991) et de *Dunaliella salina* (Cowan *et al.*, 1992). Ces algues constituent actuellement un modèle d'étude pour les cellules végétales exposées à un stress osmotique.

Chez les plantes supérieures cependant, la bétaine et la proline sont les osmotica les plus communément signalés alors que le glycérol ou d'autres composés ne le sont que dans de rares cas comme chez les *Plantaginaceae* (Briens et Lahrer, 1982).

5. Effet cryoprotecteur

Le glycérol (2M) peut être utilisé comme cryoprotecteur associé au saccharose (0,4M) ; il permet alors la cryoconservation des cellules embryogènes d'*Asparagus officinalis* dont 80 à 90 % régénèrent des plantes lors de leur remise en culture (Nishisawa, 1992).

B. Le métabolisme du glycérol

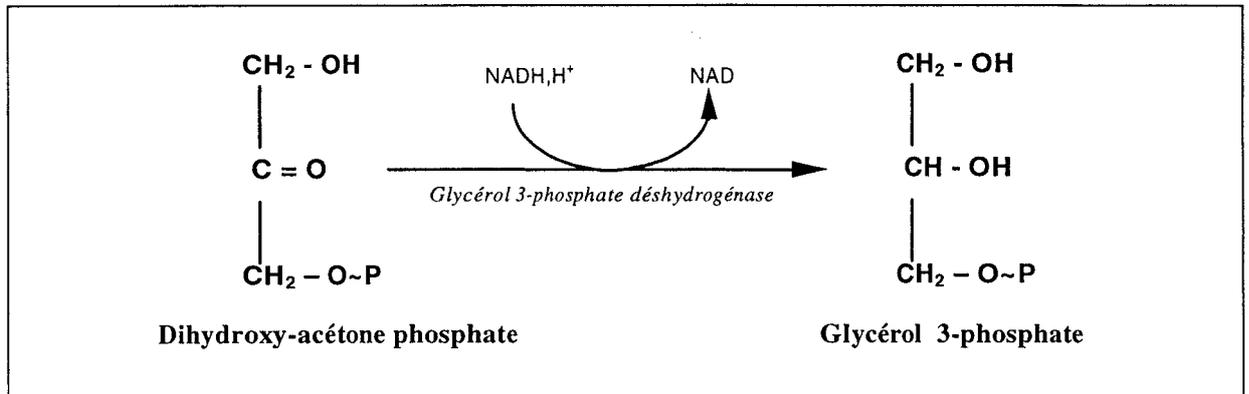
Les principales voies métaboliques sont résumées dans la figure 4.

1. L'anabolisme du glycérol

Le glycérol dans la plante peut provenir du catabolisme des glucides par la voie de la glycolyse ou du catabolisme des lipides par la voie de la lipolyse.

✓La voie de la glycolyse

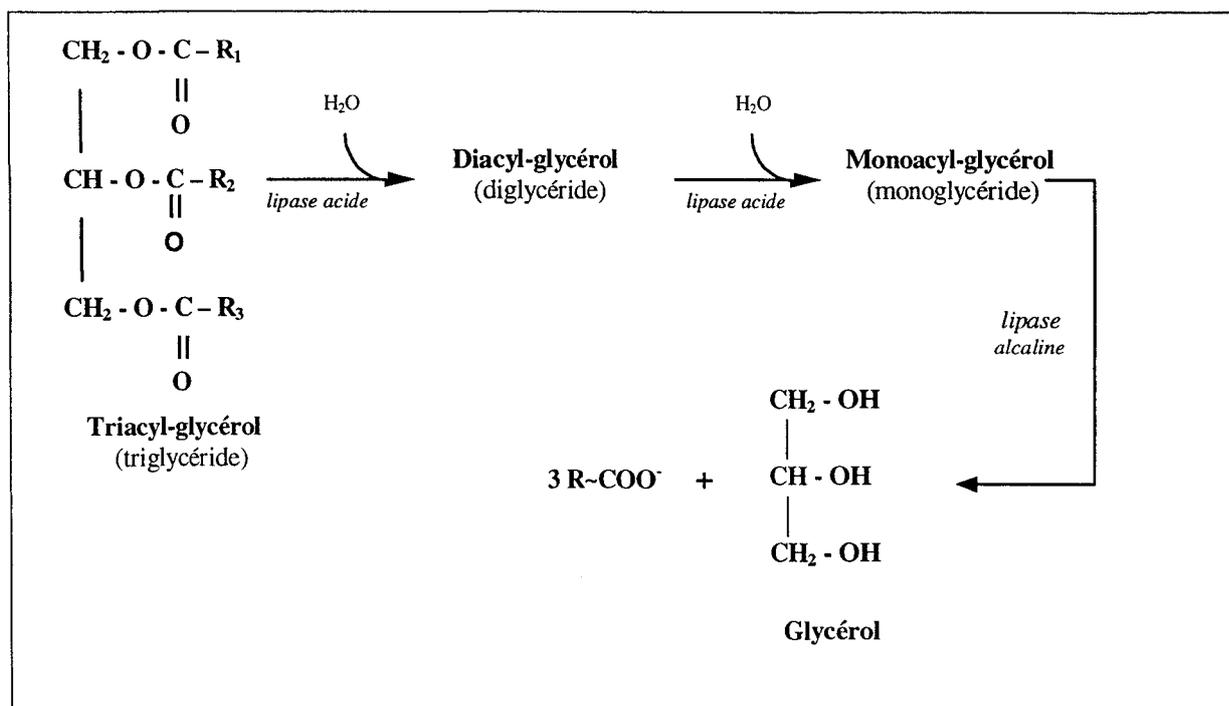
Le glycérol provient de la conversion du produit intermédiaire de dégradation de la dihydroxyacétone phosphate: le glycérol 3-phosphate (Mazliak, 1968).



Cette transformation par la voie des trioses phosphate (DHAP et G-3P) a été mise en évidence par Mac Donald et Ap-Rees (1983) sur des suspensions cellulaires de *Glycine max*. En effet, 0,03 % du ^{14}C fourni aux cellules sous forme de saccharose- ^{14}C se retrouve au niveau du glycérol. S'il semble évident qu'une telle voie existe *in vivo*, on n'en connaît cependant ni son importance quantitative ni les éventuelles voies de dégradation intermédiaires qui y sont associées (Stumpf et Conn, 1988).

✓La voie de la lipolyse

Durant les stades précoces de germination des graines de *Ricinus communis* (Muto et Beevers, 1974), de *Cucumis sativus* (Davies et Chapman, 1979) ou de *Glycine max* (Lin *et al.*, 1982; Lin et Huang, 1983), les triglycérides sont mobilisés pour permettre la croissance de l'axe embryonnaire. La première étape de cette mobilisation est leur hydrolyse en acide gras et en glycérol. Deux lipases responsables de cette hydrolyse ont été mises en évidence dans les cotylédons de *Citrus* (Garcia-Agustin *et al.*, 1992).



Chez *Ricinus communis*, la lipase acide (EC 3.1.1.3) serait associée à la membrane des sphérosomes (Ory, 1969) alors que la lipase alcaline (EC 3.1.1.3) apparaît en relation avec la membrane des glyoxysomes. L'activité de la lipase alcaline a été plus particulièrement étudiée dans des graines en germination de *Gossypium herbaceum*, de *Cucumis sativus*, de *Zea mays*, de *Lycopersicon esculentum* Mill., d'*Arachis hypogea* L. et de *Helianthus annuus* (Huang et Moreau, 1978). La purification et les propriétés de cette enzyme ont été étudiées dans l'albumen de *Ricinus communis* (Maeshima et Beevers, 1985).

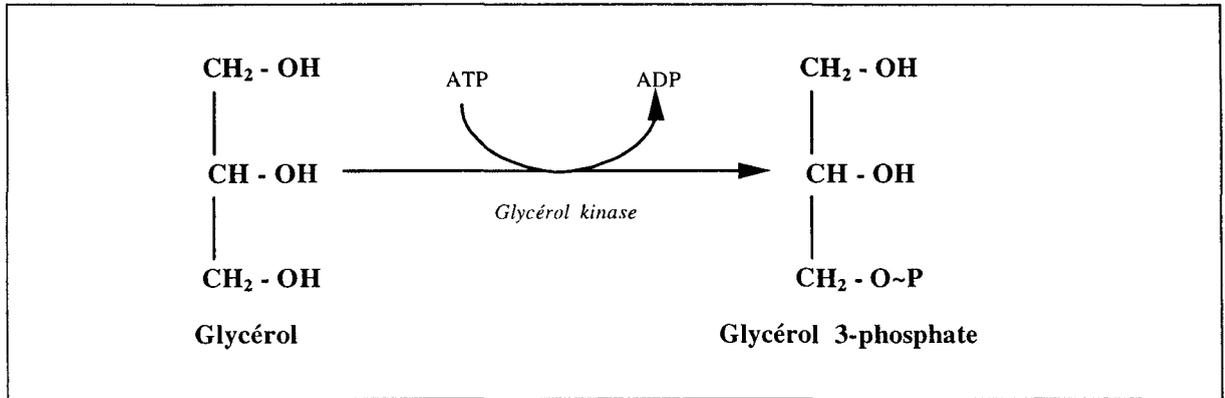
2. Le catabolisme du glycérol

✓ La voie de la glycolyse

Les tissus de graines de *Ricinus communis* en germination incubés dans une solution de glycérol-¹⁴C montrent une synthèse importante de saccharose-¹⁴C qui s'accompagne d'un dégagement non négligeable de ¹⁴CO₂ (Stumpf, 1955; Beevers, 1956). Selon Beevers (1961), le niveau de production des hexoses-¹⁴C à partir de glycérol-1,3-¹⁴C chez *Cucurbita maxima* Duch. indique que la chaîne carbonée est intacte et incorporée telle quelle, probablement par la conversion primaire en trioses. Le glycérol s'oriente donc, vers la voie

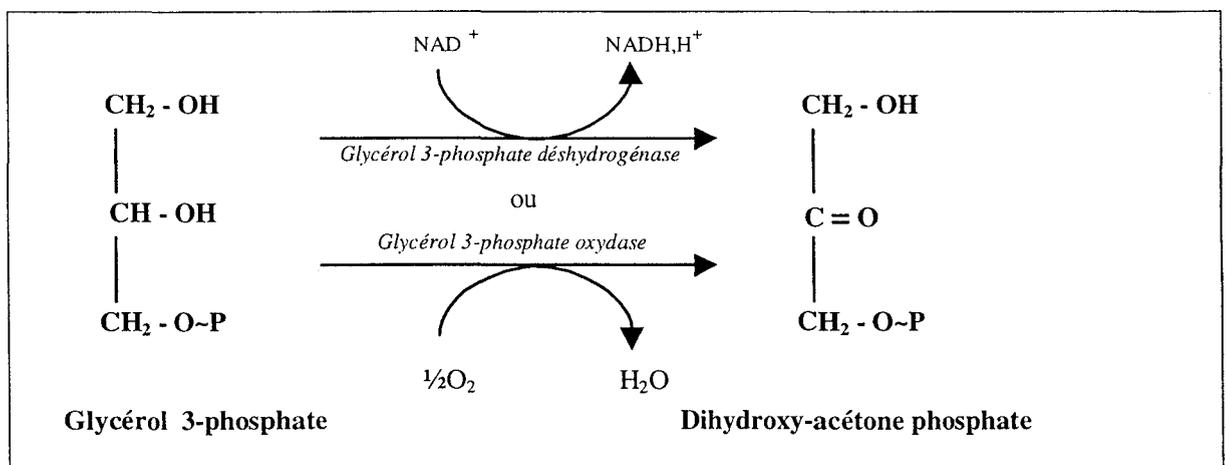
de la glycolyse (Stumpf et Bradbeer, 1959) et cette voie est confirmée par MacDonald et Ap Rees (1983) sur des suspensions cellulaires de *Glycine max*.

Chez les bactéries et les mammifères, un tel métabolisme est initié par la conversion du glycérol en glycérol-3-phosphate, catalysée par la glycérol kinase (EC 2.7.1.30).



La présence de la glycérol kinase chez les plantes a été décelée indirectement grâce à l'utilisation de molécules marquées (Barron et Stumpf, 1962; Cheniae, 1965). Huang (1975) détecte l'enzyme par des dosages directs dans les graines de *Phaseolus vulgaris* L. et d'*Arachis hypogena*; elle est cytosolique. Ses propriétés biochimiques ont été étudiées chez *Cucumis* (Sadava et Moore, 1987).

Le glycérol 3-phosphate est ensuite converti en DHAP par la glycérol 3-phosphate oxydase (EC 1.1.99.5) ou, à pH alcalin par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (NAD⁺-dépendante ; EC 1.1.1.8) mitochondriale. La DHAP est alors relarguée dans le cytosol pour être convertie par les enzymes de la voie de Embden-Meyerhof-Parnas (Huang, 1975).



✓La voie de la gluconéogenèse

Dans les cotylédons de *Ricinus communis* une partie du glycérol est convertie en saccharose (Bradbeer et Stumpf, 1960). Dans les graines en germination de cette espèce, la première étape de mobilisation des triglycérides est leur hydrolyse en acide gras et en glycérol. Ce dernier est converti par la voie de la gluconéogenèse en saccharose (Hutton et Stumpf, 1969; Huang, 1975).

Les différentes enzymes responsables de cette voie spécifique de synthèse du saccharose (fig. 3) ont été mises en évidence dans l'albumen de *Ricinus communis* et dans les cotylédons d'*Arachis hypogea* L. (Huang 1975).

✓La voie de la lipogenèse

Le glycérol tritié s'oriente dans la voie de synthèse *de novo* à partir de glycérol 3-phosphate et en quatre heures il est totalement incorporé dans les diglycérides des embryons de *Brassica napus* (Perry et Harwood, 1993). Weber et Taylor (1990) décrivent également cette voie de biosynthèse des triacyl glycérols dans des cultures cellulaires de plantes oléagineuses.

III. Le glycérol et l'embryogenèse somatique

A. La stimulation de l'embryogenèse par le glycérol

Le glycérol stimule l'embryogenèse somatique chez le *Citrus* et cette embryogenèse est indirecte à partir de cals capables de croître sur du glycérol comme seule source carbonée. Cette capacité est un phénomène général et commun chez bon nombre d'espèces de *Citrus* (Ben Hayyim et Kochba, 1982). Au contraire des cellules de *Saccharum officinarum* (Maretzki et Thom, 1978), des cals d'orange croissent immédiatement sur des milieux additionnés de glycérol. Si la plupart des cultivars de *Citrus* nécessite un transfert sur un milieu sans glycérol pour une complète régénération des plantes, quelques cultivars

peuvent toutefois régénérer directement sur le milieu d'induction avec glycérol (Vardi *et al.*, 1982a et b).

La stimulation de l'embryogenèse somatique par le glycérol est un procédé rapide en comparaison avec les autres traitements appliqués sur les cals de *Citrus* (Kochba et Spiegel-Roy, 1977; Kochba *et al.* 1978, 1982). Alors que les effets des sucres, de l'acide abscissique ou des inhibiteurs de synthèse de l'acide gibbérellique, sont révélés après 10 semaines d'incubation, l'effet du glycérol est visible au bout de 3 semaines et les embryons peuvent être obtenus sur milieu solide ou liquide (Ben Hayyim et Neumann, 1983). Dans des cals issus du nucelle et sur des ovules d'orange, le glycérol stimule l'embryogenèse et permet même de doubler la production des embryons somatiques (Deng *et al.*, 1990 ; Starrantino et Caponnetto, 1991 ; Vu *et al.*, 1993).

Selon les différents auteurs, la capacité des cals de *Citrus* à produire des embryons serait liée aux propriétés particulières du plasmalemme à transporter le glycérol dans la cellule et à modifier la balance intra-cellulaire carbonée qui serait à l'origine du processus de dédifférenciation des cellules et de la mise en place des cellules embryogènes.

B. Inhibition de l'embryogenèse somatique par le glycérol

Chez *Medicago sativa* L. le glycérol inhibe l'embryogenèse somatique (Strickland *et al.*, 1987).

Deux lignées cellulaires de *Datura metel* sont capables d'utiliser le glycérol et l'application de ce dernier sur les cals augmente l'embryogenèse. En revanche, l'embryogenèse haploïde, lors de la culture d'anthères, est totalement ou partiellement inhibée par le glycérol et dans ce dernier cas les embryons sont mal formés (Babbar et Gupta, 1986).

C.Synchronisation de l'embryogenèse somatique par le glycérol

Chez *Daucus carota*, un prétraitement de courte durée (45 min) par du saccharose ou du sorbitol 1 M provoque la synchronisation des divisions des cellules en culture; l'utilisation du glycérol permet également la plasmolyse des cellules mais son effet sur la synchronisation des divisions cellulaires n'est pas mentionné (Wetherell, 1984).

Le glycérol, par comparaison avec le saccharose, permet une relative synchronisation des divisions cellulaires sur des cultivars de *Citrus* (Gavish *et al.*, 1988 et 1991).

Chez la chicorée une synchronisation de l'induction a été obtenue sur des fragments foliaires incubés dans un milieu de base enrichi en glycérol (330 mM) (Robatche-Claive *et al.*, 1992). Dans de telles conditions, la première division des cellules embryogènes est bloquée et les embryons ne se développent qu'après un transfert des explants sur un milieu dépourvu de glycérol, le saccharose constituant alors la seule source carbonée.

Matériel et Méthodes

Résultats

Partie I

Matériel et méthodes

I. Le matériel végétal

La position systématique de la **chicorée** est la suivante :

- Embranchement des Spermaphytes
- Division des Magnoliophyta
- Classe des Magnoliopsida
- Sous-classe des Asteridae
- Ordre des Astérales
- Famille des Astéracées
- Genre *Cichorium*

On distingue trois espèces : *intybus*, *endivia* et *spinsum*. Seules les deux premières espèces sont utilisées pour leurs caractères agronomiques (Boulineau *et al.*, 1994). Chez *Cichorium intybus*, 2 sous-espèces peuvent être distinguées : *C. intybus* var. *sativum*, qui comprend notamment la chicorée industrielle (cv. Magdebourg) et *C. intybus* var. *foliosum* qui correspond aux chicorées à feuilles, telle, la chicorée de Bruxelles (cv. Witloof). Le *Cichorium endivia* a permis de sélectionner entre autres les scaroles (*C. endivia* var. *latifolia*) ou les chicorées frisées (*C. endivia* var. *crispa*).

Au cours de cette étude concernant l'embryogenèse, nous avons travaillé sur un clone provenant de l'**hybride "474"** qui résulte d'un croisement: *C. intybus* var. *sativum* cv. Magdebourg X *C. endivia* var. *Latifolia*. Nous avons également utilisé la variété Flash de *C. intybus* var. *foliosum* comme témoin non embryogène dans les conditions de culture imposées habituellement à l'hybride "474".

Composés	Milieux de culture				
	M17S60Gly330 (pour 1 litre)	M17S60 (pour 1 litre)	M17S45 (pour 1 litre)	Heller S15 (pour 1 litre)	Heller gélosé S15 (pour 1 litre)
macroéléments: solution stock 10 X concentré	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
microéléments de Heller	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
glutamine	250 mg	250 mg	250 mg		
vitamines (M et W)	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
inositol	100 mg	100 mg	100 mg	500 mg	500 mg
2-iP	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg		
ANA	0,02 mg	0,02 mg	0,02 mg		
KH ₂ PO ₄	85 mg	85 mg	85 mg		
Fe-EDTA	19,5 mg	19,5 mg	19,5 mg	19,5 mg	19,5 mg
saccharose	20 g	20 g	15 g	5 g	5 g
glycérol	24 mL				
agar					6 g

Solutions Stock Macroéléments x10 mg/L:	M17	Heller
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1850	2500
CaCl ₂ , 2H ₂ O	2200	
NH ₄ NO ₃	8250	
KCl	7500	7500
CaCl ₂ , 2H ₂ O		750
NaNO ₃		6000
NaH ₂ PO ₄		1080

Microéléments Heller (1953) mg/L:	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1
H ₃ BO ₄	1
MnSO ₄	0,075
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,03
AlCl ₃	0,03
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,01
KI	0,01

Vitamines de Morel et Wetmore (1951) mg/L:	
Pantothénate de Ca	1
Thiamine	1
Acide Nicotinique	1
Pyridoxine	1
Biotine	0,01

Tableau 2: Composition des milieux de culture et des solutions mères pour les milieux M17 et Heller, les concentrations sont mentionnées en mM pour le saccharose (S15, S45, S60) et le glycérol (Gly330).

II. Techniques de culture *in vitro*

A. Le milieu de base M17

Toutes nos expériences sur l'embryogenèse somatique du *Cichorium* sont réalisées sur un milieu de base M17, correspondant au milieu de Murashige et Skoog (1962) modifié et dilué au demi (Tableau 2). Ce milieu contient 10,1 mM de chlorure de potassium (KCl) au lieu du nitrate de potassium (KNO₃), les microéléments de Heller (1953), les vitamines de Morel et Wetmore (1951) (Tableau 2), 5.10⁻⁵ M de Fe-EDTA, 1,7 mM de glutamine, 60 mM (20 g L⁻¹) de saccharose, 10⁻⁷ M d'ANA et 2,5.10⁻⁶ M de 2iP. Le pH est ajusté à 5,5 avant passage à l'autoclave (20 minutes à 110°C).

B. Production du clone "474" de chicorée

Des plantules de l'hybride "474" se développent à partir d'embryons directement issus de styles (Dubois *et al.*, 1988). Chaque année, afin de maintenir la conformité du clone, des plantes sont acclimatées et de nouveaux lots de styles sont prélevés sur les boutons floraux avant l'anthèse et placés dans les conditions d'induction de l'embryogenèse précédemment décrites. La nouvelle population clonale issue de cette culture sera utilisée pour la régénération *in vitro* pendant un an.

C. Multiplication des vitroplants par embryogenèse somatique à partir de racines

Les racines sont cultivées sur milieu de base M17 contenant 45 mM (15 g L⁻¹) de saccharose, à l'obscurité, à 35°C et sous agitation (agitateur Gehrardt, 70 rpm). Après une dizaine de jour, les embryons somatiques, encore fixés aux fragments racinaires sont ensuite transférés sur une solution minérale de Heller (Tableau 2) contenant 15 mM de saccharose pendant 5 jours à la lumière, à 20°C et sous agitation (Dubois *et al.* 1990). Les embryons somatiques les plus développés sont alors repiqués d'abord en boîtes de Pétri, puis dans des tubes sur une solution minérale de Heller gélosée (6 g L⁻¹ d'Agar) contenant 15 mM de saccharose. La conversion des embryons somatiques en plantules s'effectue en

chambre climatisée (photopériode 12h de lumière à 24°C/12h d'obscurité à 20°C) et dure de 1 à 2 mois (figure 5).

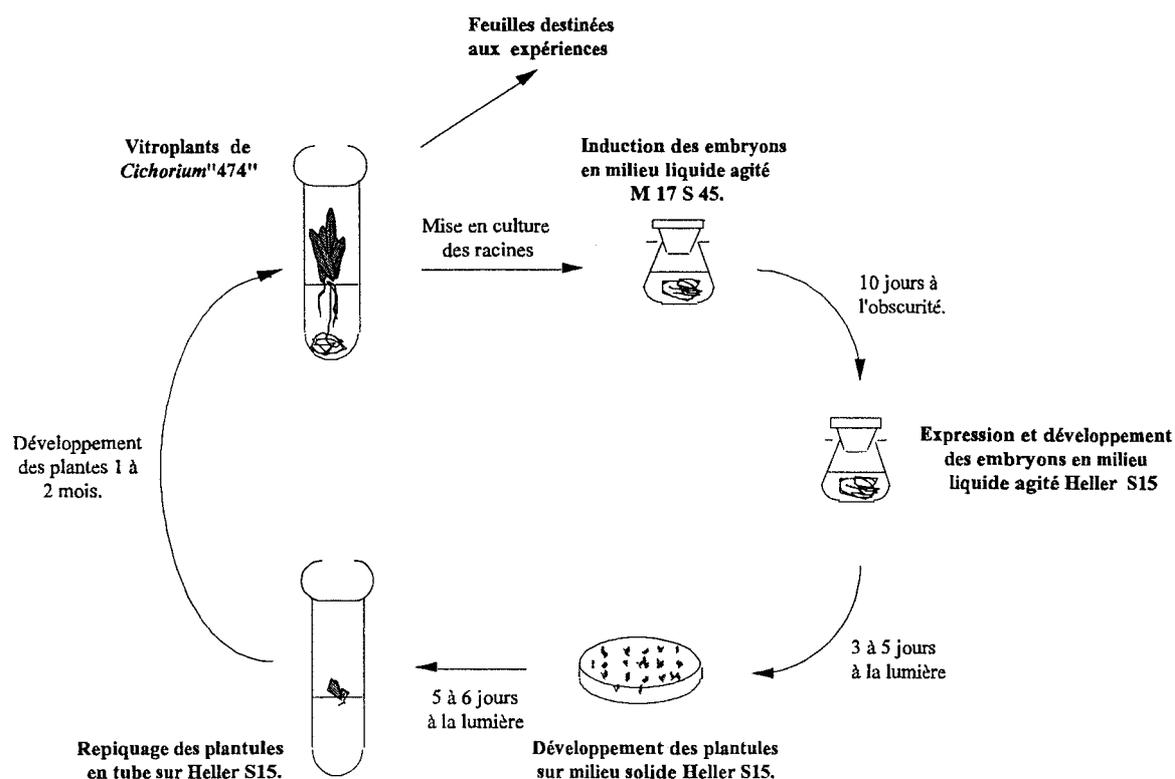


Figure 5 : Embryogenèse somatique à partir de racines de chicorée hybride "474". Dubois *et al*, 1990.

D. Embryogenèse somatique à partir des tissus foliaires

1. Mise en culture des fragments foliaires (Dubois *et al*, 1991).

Les feuilles prélevées sur les vitroplants âgés de 6 semaines sont découpées en 3 fragments (basal, médian et apical) d'environ 2 cm² de surface. Ces derniers sont répartis dans des erlenmeyers (50 mL) différents afin de minimiser la variabilité intra et inter plantes. Ainsi chaque erlenmeyer contient 3 fragments provenant de feuilles et de plantes différentes (figure 6). Les erlenmeyers sont obturés par des bouchons en cellulose pressée.

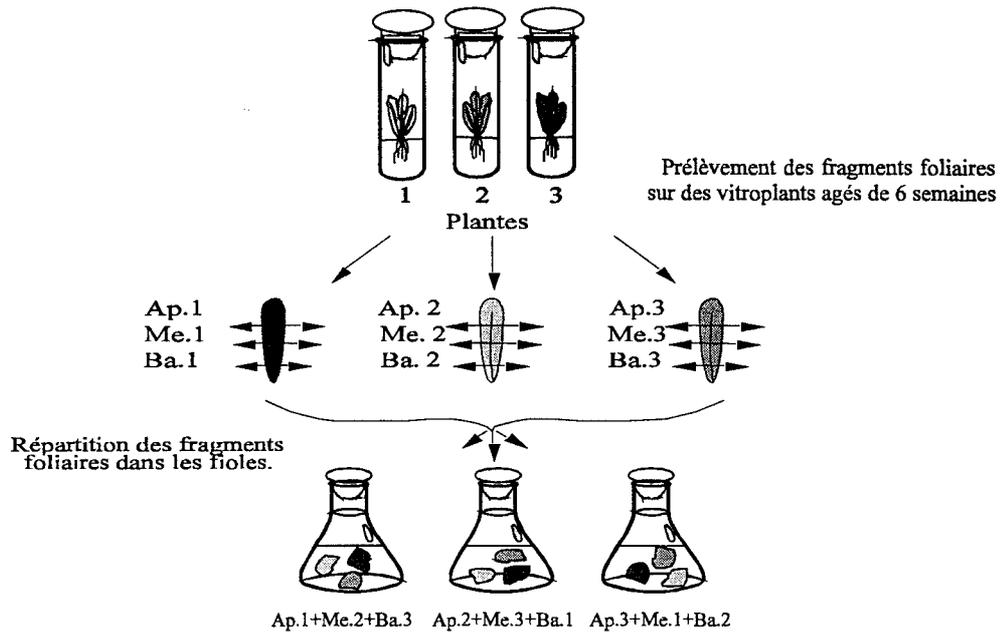


Figure 6 : Mise en culture des fragments foliaires de chicorée. Dubois *et al*, 1991.

2. Les deux phases de la culture embryogène

Deux phases de cultures sont utilisées pour l'obtention de ces embryons (figure 7): une phase d'induction suivie d'une seconde phase durant laquelle les embryons somatiques se différencient.

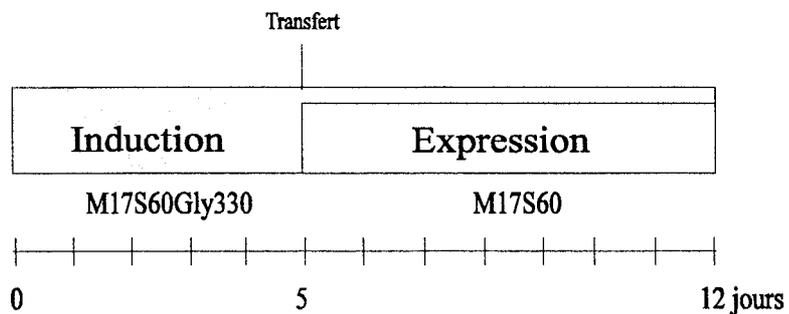


Figure 7 : Les deux phases de la culture embryogène des tissus foliaires de chicorée .

– La phase d'induction des embryons somatiques

Les fragments sont cultivés dans 20 mL de milieu de M17 contenant 60 mM de saccharose et 330 mM de glycérol ajouté après filtration stérile (M17S60Gly330). L'addition de glycérol permet d'obtenir le blocage de la première division des cellules embryogènes (Robatche-Claive *et al.*, 1992).

La culture dure 5 jours à l'obscurité, à 35°C et en milieu liquide agité.

– La phase d'expression des embryons somatiques

Au cinquième jour de culture, les fragments foliaires sont transférés sur un milieu M17 dépourvu de glycérol mais contenant 60 mM de saccharose (M17S60). La culture se poursuit pendant 7 jours dans les mêmes conditions que précédemment, à l'obscurité, à 35°C et sous agitation.

E. Milieux et conditions modifiés

Afin de déterminer l'influence du glycérol sur l'embryogenèse somatique, nous avons remplacé le saccharose 60 mM par du glycérol en concentration équimolaire à différents moments de la culture: au cours de la phase d'induction, au cours de la phase d'expression ou au cours des deux phases à la fois.

III. Techniques de cytologie

A. Coupes en paraffine

1. Fixation, déshydratation et inclusion du matériel

Les échantillons à analyser sont prélevés et fixés dans du F.A.A. (formol/acide acétique/alcool 50%; 3,5/6,5/100, V/V). Dans chaque expérience un fragment destiné au comptage des embryons est fixé de la même manière.

Les échantillons sont déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol de force croissante (50% jusqu'à 90%), plongés une nuit dans l'éthanol à 95% et ensuite, 3 heures dans l'éthanol absolu.

Ces fragments sont alors immergés dans un mélange xylène/éthanol absolu (1/1) puis dans du xylène puis dans du xylène/paraffine (1/1), avant, d'être plongés une nuit dans la paraffine à 54°C. L'inclusion définitive est réalisée dans de la paraffine pour histologie MERCK® à température ambiante. Les fragments sont positionnés à plat dans le fond du moule, la nervure centrale orientée selon la longueur du bloc de paraffine.

2.Coupes au microtome

Les blocs sont débités dans le sens de la longueur sur un microtome (Jung et Heidelberg) de manière à obtenir des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur. Des rubans de 7 coupes sont collés sur des lames par une solution de gélatine en plaque (1 cm²/20 mL d'eau distillée).

3.Coloration fast-green / safranine

Le déparaffinage se fait dans du xylène pendant 2 heures puis les coupes sont réhydratées par trempages successifs dans 2 bains d'éthanol 100% et 95% puis, dans des bains d'éthanol 70% et 50%. Les lames sont alors plongées pendant 24 heures dans de la safranine (10 g L⁻¹ de safranine dans de l'éthanol 50%) et à nouveau déshydratées par trempage dans de l'éthanol 50%, 70%, 95% et 100%. Elles sont colorées par passage rapide dans une solution hydroalcoolique de fast-green (2 g L⁻¹ de fast-green dans de l'éthanol absolu) puis successivement rincées dans 2 bains d'éthanol absolu et 2 bains de xylène. Le montage se fait entre lame et lamelle dans du baume du Canada. La safranine colore les noyaux et les embryons en rouge, tandis que le fast-green colore la cellulose des parois en bleu-vert.

B.Coupes semi-fines

1.Fixation, déshydratation, et inclusion

Les échantillons à analyser sont prélevés et fixés durant 2 heures à température ambiante. Le fixateur est constitué de paraformaldéhyde 3%, piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid) (PIPES) 0,1 M, glutaraldehyde 1%. La première heure de fixation a lieu sous vide. Les fragments sont lavés dans du PIPES 0,1 M à 4°C, 3 fois une heure.

Les échantillons sont déshydratés à température ambiante dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante : 30° et 50° à 4°C, 70°, 80°, 90°, 95° pendant 20 minutes chaque fois, puis 2 fois 1 heure dans l'éthanol absolu. Les échantillons sont ensuite imprégnés par un mélange d'éthanol absolu/London Resin White (LRW) (50/50, v/v) pendant 2 heures puis par de la LRW pure pendant 2 fois 2 heures. L'inclusion est réalisée à température ambiante avec de la LRW. Les moules sont refermés aussitôt que l'échantillon est en place. La polymérisation est complète en 12 heures à 50°C.

2. Confection des coupes semi-fines

Les coupes sont réalisées sur un microtome Leica R2065. D'une épaisseur de 1 µm, elles sont confectionnées avec un couteau de verre sec, récupérées dans l'eau et déposées sur un ménisque d'eau. Les lames histologiques sont ensuite séchées sur une platine chauffante à 50°C.

3. Colorations et montage

Les coupes semi-fines sont colorées 30 secondes dans une solution de bleu de toluidine (1% p/v dans une solution de carbonate de sodium 2,5%). Après rinçage, la coloration est régressée à l'eau distillée jusqu'à décoloration complète de la résine. Les lames histologiques sont séchées à l'air comprimé, puis montées dans une résine synthétique de montage (Eukitt).

C. Coloration des noyaux et immunomarquage

Dans le cadre de l'étude de l'organisation du cytosquelette, nous avons utilisé une technique d'immunocytologie.

Les fragments foliaires sont prélevés au jour 4, découpés en pièce de 3 x 1 mm, puis fixés pendant 1 h dans du tampon PBS (Na_2HPO_4 16 mM, $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 4mM, NaCl 150 mM ; pH 7,2 ou 5,5 pour les enzymes) additionné de 3,7 % de paraformaldéhyde (PFA). Après trois rinçages de 10 min dans du PBS, les fragments subissent deux digestions successives avec 0,15 % de pectinase (Caylase® 345, Cayla, Toulouse), pendant 1 h à 37°C et sous agitation puis par 0,5 % de cellulase (Caylase® 345, Cayla, Toulouse), dans les mêmes conditions. Ces enzymes sont préalablement diluées dans du PBS pH 5,5.

L'immunomarquage est réalisé à l'aide d'anticorps dirigé contre les α -tubulines (Amersham). Les tissus digérés subissent un rinçage bref dans le PBS et sont ensuite incubés dans du PBS contenant l'anticorps dilué (1:2000) pendant 3 h à température ambiante. Les tissus sont ensuite rinçés 3 fois dans du PBS, puis mis en contact avec l'anticorps secondaire couplé à une molécule révélatrice, la fluorescéine isothiocyanate (FITC). L'observation se fait avec un microscope Olympus BH-12 muni du filtre d'excitation à 405 nm sous UV. Les observations se font à l'obscurité. Les noyaux sont mis en évidence par une coloration au DAPI.

IV. Techniques de chromatographie

A. Dosage des glucides par chromatographie liquide haute performance (CPLH)

1. Extraction des glucides

– Des explantats foliaires

Les explants foliaires sont prélevés chaque jour au cours des 12 jours de culture. Le milieu présent sur les tissus est éliminé par de l'eau distillée. Les fragments sont alors séchés sur papier filtre et leur masse de matière fraîche est déterminée.

Les fragments foliaires sont broyés dans un appareil de Potter en présence de 2 mL d'éthanol à 95% à température ambiante. Le broyat est centrifugé pendant 10 minutes à 30000 g. Le surnageant contenant les glucides alcool solubles est prélevé puis transvasé dans un ballon d'évaporation; le culot est remis en suspension dans 0,5 mL d'éthanol pour être centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Les surnageants sont évaporés sous vide à 45° C; l'extrait desséché est repris par 0,5 mL d'une solution de sorbitol 2 mg L⁻¹. L'ajout de charbon actif permet d'éliminer les pigments chlorophylliens qui subsistent dans la solution aqueuse renfermant les glucides. Après centrifugation le surnageant limpide renferme les glucides à doser.

– Du milieu de culture

Les glucides étant déjà en solution dans le milieu de culture, le dosage des glucides est directement effectué après filtration.

2. Dosage des glucides

Les analyses qualitatives et quantitatives des glucides sont effectuées par chromatographie liquide haute performance (CPLH) au moyen d'une colonne WATERS SUGAR PAK 1. C'est une colonne à microparticules échangeuses de cations Ca^{2+} . La phase mobile est de l'eau bidistillée délivrée par une pompe quaternaire Spectra Physics P4000. Les glucides sont détectés par un réfractomètre différentiel (KNAUER) qui mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre les glucides et la phase mobile. Ce réfractomètre est couplé à un détecteur de radioactivité (Flo-one/Beta Radiomatic 500TR Packard).

Le tracé des chromatogrammes et l'intégration des pics sont réalisés par un système informatique (Logicel Flo-one/Data). Ce système informatique permet de contrôler l'intégralité de la chaîne CPLH.

Le débit de la phase mobile est fixé à $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ et la température de la colonne est de 85°C .

Avant d'être injectés, les extraits sont filtrés sur filtres Millipore[®] (0,45 mm).

B.Utilisation de glycérol marqué

Le glycérol- ^{14}C (Amersham) est marqué sur les trois atomes de carbone et présente une activité spécifique de $5,59 \text{ GBq.mmol}^{-1}$ soit $57,9 \text{ MBq mg}^{-1}$. Le milieu d'induction M17S60 est additionné de glycérol froid (2,3 %) et complété avec $3,31.10^{-4} \text{ mmol}$ (1,85 MBq) de glycérol marqué.

Les glucides marqués sont détectés par CPLH en même temps que les sucres froids et sont exprimés en DPM (désintégrations par minute).

V. Etude par résonance magnétique nucléaire

A. Principe

Les isotopes de certains éléments (^{31}P , ^{13}C) présentent un spin nucléaire dû au fait qu'un électron, voire une particule atomique possède un moment cinétique (μ) provoqué par la rotation de la particule sur elle-même. L'orientation de ces moments est aléatoire en absence de champ magnétique, mais lorsqu'on leur applique un champ magnétique uniforme B_0 , ils s'orientent et tournent autour de B_0 à la fréquence ω_0 (figure 8A). Cette fréquence dépend du rapport gyromagnétique (γ) caractéristique de chaque noyau étudié. Pour les noyaux ^{31}P et ^{13}C , le nombre de spin vaut $1/2$, la rotation autour de l'axe B_0 (ou précession de Larmor) peut donc être parallèle ou antiparallèle à B_0 (figure 8B). Ces deux positions correspondent à des niveaux d'énergie différents : $\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi$ (h , constante de Planck)(Figure 8C).

Le nombre de noyaux ayant l'énergie $E_{1/2}$ (n^+) est supérieur au nombre de noyaux d'énergie $E_{-1/2}$ (n^-) ; la loi de distribution de Boltzmann donne : $n^+/n^- = e^{(\Delta E/kT)}$ (k , constante de Boltzmann et T , température). La résultante de tous les moments magnétiques (M_0) se trouve donc la même direction et le même sens que B_0 (figure 8B).

L'expérimentation en RMN consiste à appliquer à ce système une excitation de quelques μs par un champ magnétique B_1 , provoquant ainsi la transition des spins nucléaires entre les deux niveaux d'énergie. Ainsi, l'aimantation macroscopique M_0 , subit une rotation d'angle i (avec $i = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau$; τ , durée d'excitation ; figure 8D). La relaxation dure quelques millisecondes et correspond à un retour à la normale dû à la suppression de B_1 . L'aimantation M revient à sa position initiale en décrivant un mouvement de rotation. La projection de M dans le plan xOy varie et engendre un "signal de précession libre" enregistré par la bobine (figure 8E).

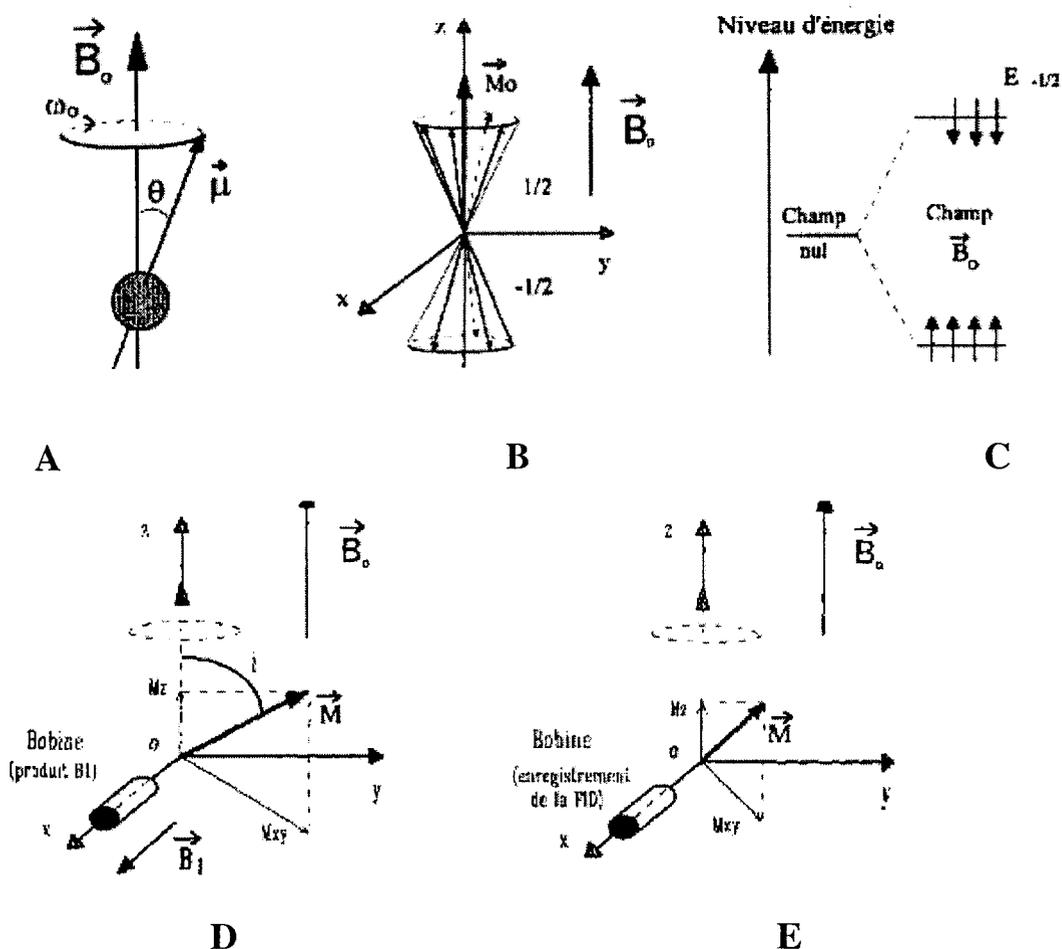


Figure 8 : Influence d'un champ B_0 sur les spins nucléaires et effets de l'application d'un champ B_1 sur l'aimantation M_0 . FID : Free Induction Decay. (D'après Aubert, 1995).

B. Traitement du signal

– Cas d'une seule résonance

Le signal de précession du temps précédemment évoqué est une fonction du temps : $f(t) = e^{-(t/T_2^*)} \cos \omega_0 t$ avec $1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta B$; (ΔB représente l'inhomogénéité du champ). Le signal est traité par la transformation de Fourier, qui permet la transformation de l'échelle de temps en échelle de fréquence. On obtient ainsi un pic de résonance.

– Cas de plusieurs résonances

La fréquence de résonance (ν) dépend du type de noyau étudié, mais elle varie également en fonction de l'environnement électronique au sein des molécules. Le glycérol, par exemple, ne donnera pas trois raies mais deux pics de résonance. Les atomes C₁ et C₃ ont le même environnement et leurs signaux sont superposés (pic de hauteur double). Chaque pic est caractérisé par son déplacement chimique δ (en ppm, partie par millions).

$$\delta = (\nu - \nu_{\text{ref}}) \cdot 10^6 / \nu_{\text{ref}} \quad (\nu_{\text{ref}}, \text{ fréquence d'une molécule de référence}).$$

– Les couplages spin-spin

Dans le spectre d'une molécule, la résonance correspondant à un noyau n'apparaît pas toujours sous la forme d'un seul pic (singulet). Elle peut être divisée en plusieurs composantes et donne un multiplet. Cet effet résulte d'interactions spin-spin entre noyaux proches au sein d'une même molécule. Si les atomes sont de même nature, les noyaux subissent l'influence des noyaux voisins et ceci se traduit par un doublet ou un multiplet. Les noyaux peuvent interagir avec des noyaux de nature différente. Pour pallier la multiplication des multiplets l'expérimentateur effectue un découplage.

– Appareillage

L'appareil utilisé est un spectromètre BRUKER AM 400 NB (fréquence de résonance du proton 400 MHz). Des solénoïdes supraconducteurs produisent un champ B₀ de 9,4 Teslas. L'ensemble est relié à un ordinateur pour le traitement des données.

Les conditions d'utilisation de l'appareil sont les suivantes : les noyaux étudiés sont le ¹³C et le ³¹P, les fréquences d'excitation sont respectivement 100,6 et 161,9 MHz, l'angle $i=60^\circ$ et les durées d'excitation sont de 18 et 10 μs , avec des délais respectifs de 4 et 1,8 s. Les puissances de découplage sont de 2,5 W pendant l'acquisition et 0,4 W pendant le délai pour le ¹³C et 1 et 0,4 W pour le ³¹P. Les molécules de références sont l'hexaméthylsilane en RMN au ¹³C ($\delta = 2,7$ ppm) et l'acide méthylène diphosphonique pour la RMN au ³¹P ($\delta = 16,38$ ppm à pH 8,9).

– Préparation des extraits

Les fragments foliaires de chicorée (8 g de matière fraîche) sont congelés dans l'azote liquide et réduits en poudre dans un mortier en présence d'acide perchlorique (70 % V/V). Une fois décongelé, l'extrait est centrifugé (10000 g, 10 min) afin d'éliminer le perchlorate de potassium. Le surnageant est lyophilisé et repris dans 2,5 mL d'eau contenant 10 % D₂O. L'extrait est neutralisé à pH 7 (avec KOH) en présence de CDTA 1mM pour l'étude en RMN au ¹³C ou à pH 7,5 (avec KOH) en présence de CDTA 60 mM pour l'étude en RMN au ³¹P.

VI. Analyse des protéines

A. Extraction des protéines

1. Protéines tissulaires

L'extraction des protéines est réalisée selon le protocole décrit par Boyer *et al.* (1993). Après broyage dans un mortier, en présence d'azote liquide, le matériel végétal est repris dans 2 mL de tampon de précipitation des protéines préconisé par Zivy (1986)(acide trichloroacétique (TCA) 10% (p/v), β-mercaptoéthanol 0,07% (v/v) dans l'acétone froid). Les protéines sont précipitées à -20°C pendant 45 minutes et l'extrait est centrifugé (30000 g, 20 minutes, 4°C). Afin d'éliminer l'excès de TCA, le culot est repris dans 2 mL de β-mercaptoéthanol 0,07% (v/v) dans de l'acétone froid, puis homogénéisé et remis à précipiter à -20°C pendant 45 minutes.

Après centrifugation (30000 g, 20 minutes, 4°C) l'opération précédente est renouvelée mais cette fois les protéines sont précipitées 12 heures à -20°C. Une nouvelle centrifugation permet d'éliminer le surnageant, le culot est séché sous une hotte afin d'évaporer l'acétone résiduel.

Le culot protéique est placé pendant deux heures dans du tampon de solubilisation 'UKS' (tableau 3) à raison de 60 µl mg⁻¹ de matière sèche. une centrifugation (30000 g, 20 minutes, 20°C) permet de recueillir les protéines dans le surnageant. Elles sont alors aliquotées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation en électrophorèse.

Composés	Quantité
SDS	0,625 g
K ₂ CO ₃	0,345 g
Ampholines Bio-Rad pH: 3 à 10	1 mL
Triton X100	1 mL
Urée	28,5 g
DTT	0,25 g
H ₂ O	q.s.p. 50 mL

Tableau 3: Composition du tampon de solubilisation UKS (Zivy, 1986)

2. Protéines extracellulaires

Les milieux de cultures sont passés sur un filtre Millipore de 0,22 μm , dialysés pendant au moins 72 heures (membrane Spectrapore, coupure 3500 Da) contre de l'eau distillée afin d'éliminer les sucres puis lyophilisés. Les protéines sont reprises dans l'eau et précipitées par un mélange acétone / β -mercaptoéthanol 0,07% (v/v) dans la proportion de 1 volume d'eau pour 5 volumes pendant une nuit à -20°C . Après centrifugation (30000 g, 20 minutes, 4°C), l'opération précédente est renouvelée mais cette fois les protéines sont précipitées 2 heures à -20°C . Après une nouvelle centrifugation, le culot est séché sous une hotte afin d'évaporer l'acétone résiduel. Le culot est repris dans un tampon Tris-HCl 62,5mM (pH 6,8) contenant 2% (p/v) de SDS, 20% (v/v) de glycérol, du DTT à 100mM. Les échantillons sont ensuite conservés à -70°C .

B. Dosage

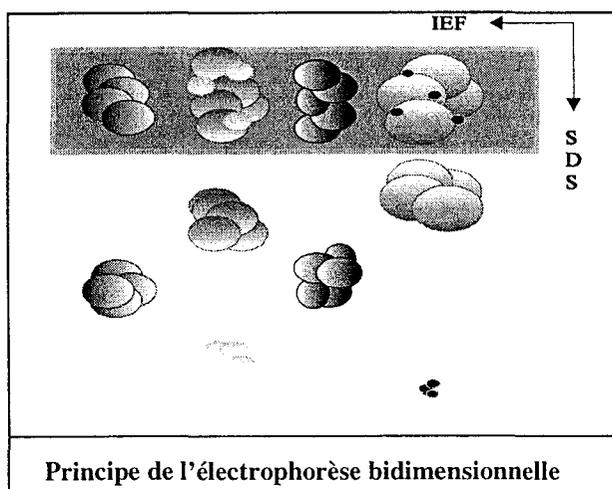
Un dosage spectrophotométrique est réalisé à l'aide du kit Bio-Rad DC (Protein assay).

Ainsi, 2 μl d'extrait sont précipités dans 1 mL d'acétone pendant 1 heure à -20°C puis centrifugés à 4°C , 30000g, pendant 20 minutes. Le culot protéique est séché sous une hotte aspirante. Une gamme étalon est réalisée en parallèle avec de la SAB (Sérum Albumine Bovine). La coloration se développe pendant 15 minutes et la DO est mesurée à 750 nm.

C. Electrophorèse bidimensionnelle

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de 2 paramètres indépendants:

- la charge électrique au cours de la focalisation électrique des protéines IEF
- la masse moléculaire au cours de la migration en gel SDS.



1. Electrophorèse de première dimension ou isoélectrofocalisation (IEF)

Elle génère un gradient de pH dans un support d'acrylamide en soumettant des ampholytes (molécules renfermant un grand nombre de résidus polyamino-polycarboxyliques) à un champ électrique. Sous l'action du courant électrique, une protéine migrera dans ce gradient jusqu'à sa position d'équilibre où sa charge nette s'annule. Cette position correspond à son point isoélectrique (pI).

L'isofocalisation est réalisée en gels cylindriques préparés dans des tubes de verre de 1,5 mm de diamètre interne. Ces tubes sont placés dans une éprouvette dans laquelle on ajoute la solution d'acrylamide (Tableau 4). Le remplissage des tubes s'effectue par capillarité en complétant l'éprouvette avec de l'eau.

Après 1 heure de polymérisation, 12 tubes sont montés dans le système d'électrophorèse Bio-Rad (Modèle 175 Tube Cell). Le haut des gels est complété par 20 μL de tampon de solubilisation (Tableau 3), puis 20 μL de tampon de solubilisation dilué au demi.

Les solutions d'électrodes sont de l'acide ortho-phosphorique 10 mM à l'anode et de la soude 20 mM à la cathode. Afin d'éliminer le CO_2 préjudiciable à la formation du gradient, la solution de NaOH est dégazée pendant 45 minutes.

Une préfocalisation d'une heure est réalisée pour permettre l'établissement du gradient de pH dans le gel (1200V, 300mA, 3W). Ensuite les échantillons protéiques auxquels auront été rajoutés 5 μ l de bleu de bromophénol, sont déposés.

L'isoélectrofocalisation est effectuée avec les mêmes paramètres que la préfocalisation pendant 17 heures. La séparation est terminée en soumettant les gels à une tension de 1500V, pendant 30 minutes.

Après migration, les gels sont démoulés, puis stockés à -80°C dans 500 μ L de tampon d'équilibration (Tris-HCl 0,5M pH 6,8 - SDS 2,3% p/v) additionné de 50 μ L d'une solution de bleu de bromophénol (0,05% p/v).

Composés	Première dimension (IEF)
Urée	10 g
Eau bidistillée	6 mL
Acrylamide (29,2%) PDA (0,8%)	2,5 mL
Ampholines Bio-Rad pH 3 à 10	900 μ L
Ampholines Bio-Rad pH 5 à 7	100 μ L
Triton X100 (10%)	2 mL
APS (10%) (p/v)	40 μ L
Témed	20 μ L

Tableau 4: Composition des gels de première dimension.

2. Electrophorèse de deuxième dimension

Le SDS se fixe sur les chaînes polypeptidiques des protéines et leur confère la même charge électrique négative. De ce fait, on l'utilise pour séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Après confection du gel de séparation à 12,5% (Tableau 5), celui-ci est coulé entre 2 plaques de verre de 180 x 160 mm espacées de 1,5 mm. On dépose ensuite délicatement le gel d'IEF au sommet de la trame d'acrylamide. La migration s'effectue dans les cuves Bio-Rad Protean II. Les plaques sont fixées sur leur support, puis l'ensemble est placé dans la cuve contenant le tampon de migration de Laemmli (1970) modifié par Hochstrasser *et al.* (1988). Sa composition est la suivante : Tris 6 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; glycine 28,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; SDS 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La migration s'effectue à 350V, le voltage étant limitant.

Composés	Quantité pour 2 gels deuxième dimension (12,5%)
Eau bidistillée	19,1 mL
Acrylamide (29,2%) PDA (0,8%)	25 mL
Tris HCl 1,5M pH 8,8	15 mL
APS (10% p/v)	300 μ L
Temed	30 μ L

Tableau 5 : Composition des gels de deuxième dimension.

Lorsque le front de migration (bleu de bromophénol) est arrivé à l'extrémité des plaques, les gels sont démoulés et placés au moins une heure dans 200 mL d'un mélange éthanol 50% - acide acétique 12% (v/v) additionné de 100 μ L de formaldéhyde. Ce traitement permet la précipitation des protéines dans le gel ce qui les rend insolubles.

3. Révélation argentique des protéines

Les protéines sont révélées par coloration argentique selon la méthode de Blum *et al.* (1987). Le protocole détaillé dans le tableau 6 comprend 3 étapes principales :

- Prétraitement du gel par le thiosulfate : il permet la réduction des protéines et donc l'amélioration de la sensibilité et du contraste de la coloration.
- Imprégnation argentique : elle permet la formation des complexes protéines-nitrate d'argent qui sont indissociables contrairement à ceux formés entre l'argent et la matrice d'acrylamide. L'addition de formaldéhyde est indispensable pour le contraste et la sensibilité de la coloration.
- Révélation argentique : elle est en fait amorcée par un faible volume de révélateur qui est remplacé ensuite par le reste du même produit.

4. Séchage des gels

Deux feuilles de cellophane, ainsi que le gel, sont placés en agitation douce dans une solution de glycérol (5% v/v) pendant 5 minutes. Ce traitement évite de casser les gels lors du séchage. Le gel est ensuite positionné entre les deux feuilles dans un sécheur de gels (Modèle 543 Gel Dryer Bio-Rad), en prenant soin d'éliminer les bulles d'air. Le séchage sous vide dure deux heures à 80°C.

Étapes	Solutions	Durée du traitement
Fixation	- éthanol 50 % (v/v) - acide acétique 12 % (v/v) - formaldéhyde à 37 % (0,5 mL/L)	1 heure minimum
Rinçages	- éthanol 50 %	3 x 20 minutes
Prétraitement	- Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O (0,2 g/L)	1 minute
Rinçages	- H ₂ O distillée	3 x 20 secondes
Imprégnation	- AgNO ₃ (1 g/L) - formaldéhyde à 37 % (0,75 mL/L)	20 minutes
Rinçages	- H ₂ O distillée	2 x 20 secondes
Révélation	- Na ₂ CO ₃ (60 g/L) - Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O (4 mg/L) - formaldéhyde (37 %) (0,5 mL/L)	3 minutes
Rinçages	- H ₂ O distillée	3 x 20 secondes
Arrêt de la révélation	- acide acétique 12 % (v/v) - éthanol 50 %	10 minutes

Tableau 6: Révélation des protéines par coloration argentique, d'après Blum *et al.*, (1987).

5. Révélation des protéines au bleu de Coomassie

Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie (Tableau 7), ce qui permet leur utilisation en vue du séquençage.

Étapes	Solutions	Durée du traitement
Fixation - coloration	bleu de Coomassie 0,25% (p/v) 100 mL éthanol 96% 100 mL acide acétique 10%	12 heures
Décoloration	100 mL éthanol 96% 150 mL acide acétique 5%	2 x 30 minutes
	75 mL éthanol 96% 175 mL acide acétique 5%	2 x 30 minutes
	50 mL éthanol 96% 200 mL acide acétique 5%	2 x 30 minutes

Tableau 7: Révélation des protéines au bleu de Coomassie

6. Electrophorèse monodimensionnelle

Cette technique permet de séparer les protéines uniquement en fonction de leur masse moléculaire. La composition des gels est donnée dans le tableau 8. La quantité de protéines déposées est de 3 µg pour une révélation argentique et de 15 µg pour un transfert sur membrane.

Composés	Quantité pour 4 gels de séparation	Quantité pour 4 gels de concentration
Eau bidistillée	7,64 mL	3,05 mL
Acrylamide (29,2%) PDA (0,8%)	10 mL	0,65 mL
Tris HCl 1,5M pH 8,8	6 mL	
Tris HCl 0,5M pH 6,8		1,25 mL
APS (10% p/v)	120 µL	25 µL
Temed	12 µL	5 µL

Tableau 8: Composition des gels d'électrophorèse monodimensionnelle

7. Immunodétection des protéines

a. Electrotransfert sur membrane

L'électrotransfert sur membrane de nitrocellulose permet de fixer les protéines après séparation et de révéler spécifiquement certaines d'entre elles par un anticorps ou une lectine.

Après migration, les gels monodimensionnels sont équilibrés 5 minutes dans le tampon décrit par Towbin *et al.* (1979) (Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% (v/v)). Le transfert sur membrane de nitrocellulose est effectué à 100V pendant une heure à 4°C dans le même tampon. La membrane est ensuite saturée pendant une nuit dans le tampon de blocage (Tris HCl 50 mM ; NaCl 0,9% ; pH 7,4) additionné de polyvinylpyrrolidone (PVP 40) à 2%.

b. Révélation des protéines d'intérêt

La révélation des protéines d'intérêt a été réalisée à l'aide d'anticorps [anticorps dirigés contre l'invertase (don du professeur Sturm, Bâle, Suisse), anticorps dirigés contre les tubulines α et β (Sigma), anticorps dirigé contre les LTP (don du professeur De Vries, Wageningen, Pays-Bas)]. L'anticorps primaire dilué au 1/2000ème, est hybridé 2 heures dans un tampon: (Tris HCl 50 mM ; NaCl 0,9% ; pH 7,4) additionné de polyvinylpyrrolidone (PVP 40) à 2% et de 0,1% de Triton 100. Les membranes subissent ensuite 3 rinçages de 10 minutes dans le même tampon. L'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline est ensuite appliqué dilué au 1/2000ème dans les mêmes conditions que l'anticorps primaire. Après deux heures d'hybridation, la membrane est à nouveau rincée 3 fois pour éliminer complètement l'anticorps secondaire non lié. L'activité de la phosphatase alcaline est révélée par le système NBT-BCIP dont les éléments sont les suivants :

- para nitro blue tetrazolium chloride (NBT) à raison de 30 mg dans 1 mL de diméthyl formamide (DMF) à 70% pour 100 mL de tampon carbonate pH 9,8 (40 mM NaCO₃, 1 mM MgCl₂),

- 5 bromo 4 chloro 3 indolyl phosphate toluidine salt (BCIP) à raison de 15 mg dans 1 mL de DMF pour 100 mL de tampon carbonate.

Dès que la solution est prête, la membrane est immergée puis laissée au repos à l'obscurité. La réaction est arrêtée dans l'eau distillée pendant quelques minutes. La membrane est ensuite séchée et conservée à l'obscurité.

8. Coloration des gels en vue du séquençage

Les gels sont colorés selon le protocole décrit par Choi *et al.* (1996). Les spots correspondants aux protéines d'intérêts sont excisés du gel et conservés à -20°C. Le reste du gel est fixé de façon à ce que les protéines non excisées soient mises en évidence par révélation argentique. Cette méthode permet de s'assurer que les spots excisés correspondent bien aux protéines d'intérêts destinées au séquençage.

9. Caractérisation des protéines par MALDI-TV

Les spots ont ensuite été analysés en spectrométrie de masse (MALDI-TV) (Désorption -Ionisation par impact Laser Assistée par Matrice - Temps de Vol) après digestion tryptique. Cette partie du travail a fait l'objet d'une collaboration avec le Pr. H. Hondermarck (Centre de Biologie Cellulaire, USTL) et le Dr J. Lemoine (UMR 111, USTL). Les spectres obtenus ont été confrontés aux bases de données (SwissProt.r34, NCBI nr 9.4.97) par l'intermédiaire du logiciel MS-Fit développé par K. Clauser et P. Baker du laboratoire de spectrométrie de masse de l'université de Californie à San Francisco. Ce logiciel est accessible sur le serveur World Wide Web ExPaSy à l'adresse URL suivante <http://www.expasy.ch/www/tools.html>.

10. Analyse informatique des gels et des membranes

Les analyses des gels révélés à l'argent, des autoradiographies et des membranes après immuno-détection sont réalisées à partir d'une station de travail Sun Sparcstation 20. Grâce à un scanner (Sharp JX 330), les images sont numérisées et analysées avec le logiciel 2-D Analyzer (BioImage®) pour les électrophorèses bidimensionnelles et avec le logiciel Whole Band Analyzer (BioImage®) pour les électrophorèses monodimensionnelles. Le profil densitométrique a été réalisé pour chaque piste et a permis de déterminer la présence ou non d'une bande dans les cas litigieux.

D. Dosage enzymatique

1. Dosage de la glycérol kinase et de la NAD-glycérol 3 phosphate déshydrogénase.

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les feuilles de chicorée sont prélevées (2 g), broyées dans un mortier en présence d'azote liquide. La poudre est reprise dans un tampon d'extraction (0,5 M de saccharose, 1mM d'EDTA, 1mM MgCl₂, 10 mM KCl, 5 mM de dithiothréitol et 0,3 M TRIS-HCl, pH 7,5). Après une centrifugation à 5000 g pendant 10 min pour éliminer les parois et les débris cellulaires, l'homogénat est centrifugé à 30000 g pendant 30 min pour obtenir une fraction limpide destinée au dosage des enzymes.

L'absorbance est mesurée à 366 nm sur un spectrophotomètre double faisceau UVIKON 930 après une incubation de 10 min à une température de 25 °C en présence de l'extrait enzymatique.

L'activité de la glycérol kinase (EC 2.7.1.30) est mesurée dans un tampon $MgCl_2$ (20,8 %)-hydrazine (1,5 %) - glycine (0,2 %), pH 9,8, contenant 0,02 M d'ATP, 0,075 M de L- α -glycérol phosphate deshydrogénase (Sigma) et 0,1 M de glycérol (Kennedy, 1974; Bublitz et Wieland, 1974).

L'activité de la NAD-glycérol 3 phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.8) est mesurée par la méthode de Beisenherz *et al.* (1955) modifiée. Le tampon de dosage consiste en 0,05 M de triéthanolamine-HCl, pH 9,8 contenant 0,1 M de NADH et 0,2 mM de dihydroxyacétone phosphate.

2. Dosage des activités invertasiques

Ce protocole dérive de celui utilisé par Jorgensen et Andersen (1973) et Goupil *et al.* (1988).

Les tissus foliaires sont broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un micro pilon, en eppendorf. L'homogénat obtenu est resuspendu dans un tampon acétate de sodium 15 mM, pH 4,5 pour les invertases acides et à pH 7,5, pour l'invertase neutre. Une centrifugation à 5 000 g pendant 10 min permet d'obtenir deux fractions. La fraction supérieure soluble contient les invertases solubles acides (vacuolaires) et neutres (cytoplasmique) et la fraction inférieure l'invertase acide et pariétale. L'échantillon à doser est incubé pendant 30 min à 30°C en présence de saccharose 0,225 M. L'hydrolyse est bloquée en ajoutant successivement du sulfate de zinc 5 % et de l'hydroxyde de baryum 0,3 N. Le sulfite de baryum formé est éliminé par centrifugation pendant 5 min à 10 000 g. Le glucose est ensuite dosé par la méthode colorimétrique GOD-POD (Glucose oxydase-peroxydase, Sigma). Enfin, la réaction est stoppée en ajoutant de l'HCl 6 N après 10 min d'incubation à 30°C. La densité optique est mesurée à 530 nm

VII. Techniques de biologie moléculaire

A. Extraction des ARN totaux

Les fragments foliaires sont broyés en présence d'azote liquide, puis 5 mL de tampon isothiocyanate de guanidium (GIT) (tableau 9) sont ajoutés à la poudre obtenue. Lorsque l'ensemble redevient liquide, il est transféré dans un tube à centrifugation. Le mortier est rincé avec 5 mL de tampon GIT. Les tubes sont équilibrés avec du GIT puis centrifugés pendant 15 min., 15 000 g, à 4°C. Le surnageant est ajouté délicatement à 10 mL de tampon chlorure de césium (CsCl) (tableau 10) dans les tubes à ultracentrifugation. Les tubes sont équilibrés avec du GIT. Après l'ultracentrifugation (21 heures, 20°C et 120000 g), le surnageant est éliminé à l'aide d'une pompe à eau et les tubes sont nettoyés avec du papier filtre imbibé d'alcool. Le culot d'ARN est resuspendu dans 300 µL d'acétate de sodium 3 M pH 6 puis transféré dans un microtube auquel 750 µL d'éthanol absolu est ajouté. Après une nuit à -20°C, une centrifugation (5 min., 10 000 g, 4°C) est réalisée. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé à l'éthanol 70°. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est séché au Speed-Vac pendant 10 min. Celui-ci est ensuite resuspendu dans 300 µL d'H₂O diméthylpyrocarbonate (DMPC) puis congelé à -80°C.

4 extractions 50 mL	
GIT	23,6325 g
Acétate de sodium 3 M pH 6	0,4175
β-mercaptoéthanol	0,4175 mL
H ₂ O traitée DMPC	QSP 50 mL

Tableau 9 : Composition du tampon GIT.

4 extractions 45 mL	
CsCl	43,186 g
Acétate de sodium 3M pH 6	0,373 mL
H ₂ O traitée DMPC	QSP 45 mL

Tableau 10 : Composition du tampon chlorure césium

B. Dosage

Pour le dosage spectrophotométrique, 3 μL de l'échantillon sont dilués dans 297 μL d' H_2O DMPC. Les longueurs d'onde varient de 220 nm à 300 nm. Les ARN absorbent à 260 nm.

C. Northern Blot

1. Electrophorèse en gel d'agarose

Le matériel et les solutions utilisés doivent être impérativement stérilisés ou traités (DMPC ou H_2O_2 ou SDS 20%). Après préparation d'un gel à 1,5% d'agarose celui-ci est coulé sur une plaque en plexiglas puis des peignes sont installés. Lorsque le gel est polymérisé, les peignes sont enlevés et le gel est placé dans une cuve contenant 1,5 L de MOPS X 1 qui servira de tampon de migration. Les échantillons contiennent 20 μg d'ARN et 10 μL de tampon de charge (tableau 11) sont dénaturés à 98°C pendant 5 minutes puis déposés dans les puits du gel. La migration dure 5 heures à 120 V ou une nuit à 80 V.

Formamide	180 μL
MOPS 10 X	40 μL
Formaldéhyde 37%	65 μL
H_2O	45 μL
BET	10 μL
Glycérol	30 μL
BBP saturé dans H_2O	5 μL

Tableau 11 : Composition du tampon de charge.

2. Transfert sur membrane

En fin de migration, le gel est incubé dans deux bains de SSC X 10 pendant 20 minutes. Le gel est ensuite placé sur un pont en papier Whatman trempant dans du SSC X 10, une membrane Dupond est posée sur le gel puis des papiers filtres sur la membrane pour favoriser le transfert des ARN du gel vers la membrane. Après 12 heures de transfert la membrane est placée entre deux papiers Whatman stériles puis fixée à 80°C pendant 2h.

3. Marquage d'une sonde chaude

Les sondes hétérologues utilisées sont des ADNc insérés dans pBluescriptSKII+. L'amplification des ADNc se fait par PCR (polymerase chain reaction). La sonde correspondant à 50 ng de produit PCR dans 33 μ L d' H_2O est dénaturée pendant 10 minutes à 100°C puis placée dans la glace. Le marquage est réalisé à l'aide du kit T7 Quick Prime (Pharmacia), 10 μ L de Mix reagent, 1 μ L de T7 DNA polymérase (Kit Promega) et 4 μ L de ^{32}P sont ajoutés à la sonde puis placés à 37°C pendant 45 minutes. La sonde est purifiée à l'aide d'une colonne de Sephadex G50.

4. Hybridation

La membrane est imprégnée de SSC X 20 stérile avant la préhybridation permettant l'élimination du bromure d'éthidium (BET). La préhybridation dure 2 heures à 42°C, la membrane est roulée puis mise dans un tube à hybridation contenant 10 mL de tampon de préhybridation (tableau 12) + 200 μ L d'ADN de sperme de hareng (10 mg / mL) soniqué et dénaturé 10 minutes à 100°C pour saturer la membrane. Le tampon de préhybridation est éliminé puis remplacé par 10 mL de tampon d'hybridation (tableau 13), 200 μ L d'ADN de sperme de hareng (10 mg / mL) soniqué et dénaturé 10 minutes à 100°C et la sonde radioactive. L'hybridation dure une nuit à 42°C. La sonde peut être récupérée dans un tube de 50 mL de polypropylène et conservé à 4°C. La membrane est rincée avec 10 mL de SSC X 6 + 0,1% SDS pendant 5 minutes à 42°C. Le rinçage est renouvelé jusqu'à obtenir une radioactivité inférieure à 10 cpm ; la membrane est alors exposée sur un film à -80°C. La déshybridation de la membrane est réalisée dans du SDS 0,1% bouillant jusqu'à refroidissement. La membrane humide est conservée dans du Saran et une feuille d'aluminium.

20 X SSC	12,5 mL
Solution de Denhardt's 100 X	2,5 mL
Phosphate de sodium 1 M	1 mL
SDS 10%	2,5 mL
Formamide désionisée (4 %)	25 mL
H_2O	QSP 50 mL

Tableau 12 : Composition du tampon de préhybridation

20 X SSC	12,5 mL
Solution de Denhardt's 100 X	0,5 mL
Phosphate de sodium 1 M	1 mL
SDS 10%	2,5 mL
Formamide désionisée (4 %)	25 mL
Dextran sulfate	10 g
H ₂ O	QSP 50 mL

Tableau 13 : Composition du tampon d'hybridation.

D. Technique de PCR.

La PCR (polymérase chain reaction), permet d'amplifier rapidement de manière exponentielle des séquences d'ADN comprises entre deux amorces. Pour un échantillon, différents réactifs sont employés et le tableau 14 est donné à titre d'exemple. L'ADN est ensuite ajouté.

H ₂ O stérile	4,37 µL
DNTP 2,5 mM	0,6 µL
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µL
Amorce en 5' (5pmol/µL)	1 µL
Amorce en 3' (5pmol/µL)	1 µL
Tampon dilué 10 X	1,5 µL
Taq DNA polymérase (0,75U/µL)	0,03 µL
Volume final	15 µL

Tableau 14 : Mélange réactionnel destiné à une amplification par PCR.

L'ADN est ajouté à la concentration souhaitée dans 5 µL.

L'amplification se déroule selon des cycles dont le nombre est variable (30 cycles par exemple) dans un appareil Perkin Elmer. Les échantillons subissent une dénaturation initiale à 92,5°C pendant 4 min ; puis à chaque cycle : une dénaturation à 92,5 °C, 1 min, l'hybridation des amorces à 42 °C, 1 min et une élongation à 72 °C, 2 min. Une élongation de 6 min à 72°C termine la réaction.

E.Séquençage

A.Amplification préparative d'un insert par PCR

Le travail est ici réalisé à 4°C. L'amplification de l'insert est faite en réalisant un mélange réactionnel qui comprend les éléments communs de l'amplification qui sont la Taq polymérase, du tampon Taq, du MgCl₂, de l'eau stérile et les amorces M13 Reverse et Forward qui sont sur le plasmide pBluescript à proximité du site d'insertion de l'insert. L'ADN est ajouté en dernier à raison de 1 ou 2 µL (50 ng µL⁻¹ de produits PCR) par réaction d'amplification. Le tout est ensuite placé dans l'appareil à PCR Perkin Elmer® (Tableau 15).

	A	C	G	T
D/dNTP	1	1	2	2
Amorce	1	1	2	2
Tampon 5X	1	1	2	2
Enzyme diluée	1	1	2	2
ADN	1	1	2	2
Volume final	5	5	10	10

Tableau 15 : Réaction de séquençage pour chaque base ACGT.

L'amplification se déroule selon les cycles suivants.

15 cycles de :

10 secondes à 96°C puis

5 secondes à 55°C

60 secondes à 70°C

puis 15 cycles de :

10 secondes à 96°C

60 secondes à 70°C

B.Séquençage de l'insert

Nous utilisons ici un kit ABI PRISM Dye primer Cycle Sequencing Core Kit. La quantité d'ADN requise pour une réaction est de 30 à 90 ng de produit PCR. Les amorces utilisées sont les amorces T3 et T7 présentes sur le plasmide. Une goutte d'huile minérale est déposée sur chaque tube pour éviter l'évaporation lors des montées en températures.

Les produits séquencés selon la méthode de Sanger sont soumis à un analyseur de séquence automatique LI-COR® (LI-COR Inc).

Les séquences nucléotidiques obtenues et les séquences protéiques déduites sont alors comparées aux informations répertoriées dans diverses banques de données nucléotidiques (EPLN) et protéiques (SWALL).

PREMIERE PARTIE

Effet du glycérol sur l'induction des cellules embryogènes et la formation des embryons somatiques

I. Effet du glycérol sur la synchronisation de la première division des cellules embryogènes

A. Le contenu en saccharose et rendement en embryons somatiques

Des résultats obtenus au laboratoire montrent que l'embryogenèse somatique dans les feuilles de chicorée de l'hybride "474" est sensible à la source carbonée dans laquelle elle est induite (Couillerot *et al.*, 1993 ; Vasseur *et al.*, 1995). Ainsi les fragments foliaires sont d'abord cultivés dans un milieu de base additionné de saccharose à 30 mM et de glycérol à 330 mM pour favoriser l'induction et la synchronisation des divisions des cellules embryogènes, le transfert au cinquième jour de culture sur milieu frais dépourvu de glycérol permet le développement des embryons somatiques (Robatche-Claive *et al.*, 1992). La première étape de nos travaux a consisté en l'amélioration du rendement en embryons somatiques par augmentation de la concentration en saccharose. Le doublement de la concentration en saccharose, de 30 à 60 mM, augmente significativement ($P=0,05$) le rendement en embryons somatiques : 14,71 contre 9,58 ES mm² de limbe obtenus précédemment (Bellettre *et al.*, 1999). Au delà de 60 mM les embryons somatiques présentent un développement anormal.

Nous avons donc été amenés à vérifier si dans ce cas la synchronisation était toujours observée et si le glycérol restait indispensable au cours de la phase d'induction de l'embryogenèse somatique.

B. Les tissus foliaires au cinquième jour de culture

Les tissus foliaires sont incubés dans le milieu de base M17 additionné de 60 mM de saccharose et de 330 mM de glycérol

Des coupes histologiques sont réalisées sur des fragments foliaires de chicorée incubés 5 jours dans un milieu M17S60Gly330. Le matériel pariétal des cellules est coloré en vert par le fast-green. La safranine, quant à elle, colore le cytoplasme en rose, le noyau en rose vif tandis que le nucléole est visible sous la forme d'un point plus ou moins gros et coloré en rouge foncé.

Beaucoup de cellules des tissus foliaires n'ont pas réagi et possèdent un noyau en position latérale accolé à la membrane plasmique et qui contient un nucléole dont le diamètre est inférieur à 2,5 μm (figures 9A). D'autres types cellulaires sont également visibles à ce stade. Des cellules ont un noyau qui se déplace vers le centre de la cellule et qui augmente en volume (le nucléole a un diamètre compris entre 2,5 et 5 μm). Ces cellules sont considérées comme étant en voie de réactivation. Certaines cellules ont achevé leur réactivation, ces cellules montrant des caractéristiques de cellules méristématiques : un gros noyau central avec un nucléole volumineux de plus de 5 μm de diamètre, des vacuoles réduites et un cytoplasme trabéculaire dense. Les mêmes caractères de réactivation cellulaire sont observés lors de l'induction de l'embryogenèse somatique au niveau des cellules épidermiques de limbes d'*Helianthus smithii* (Lappara *et al.*, 1997) et ce type de cellule est qualifiée d'embryogène.

Au cinquième jour de culture, en plus de ces cellules non divisées, on peut observer des massifs cellulaires dont le diamètre est compris entre 30 et 40 μm , ce sont des proembryons (figure 9B). Au sein du fragment foliaire, ces embryons n'occupent guère un volume plus important qu'une cellule réactivée mais sont déjà constitués d'une vingtaine de cellules fortement colorées (Annexe I). Ces embryons sont bien délimités et isolés des cellules du mésophylle. Ils sont situés le plus généralement au voisinage d'un faisceau conducteur ou sur le bord des fragments foliaires.

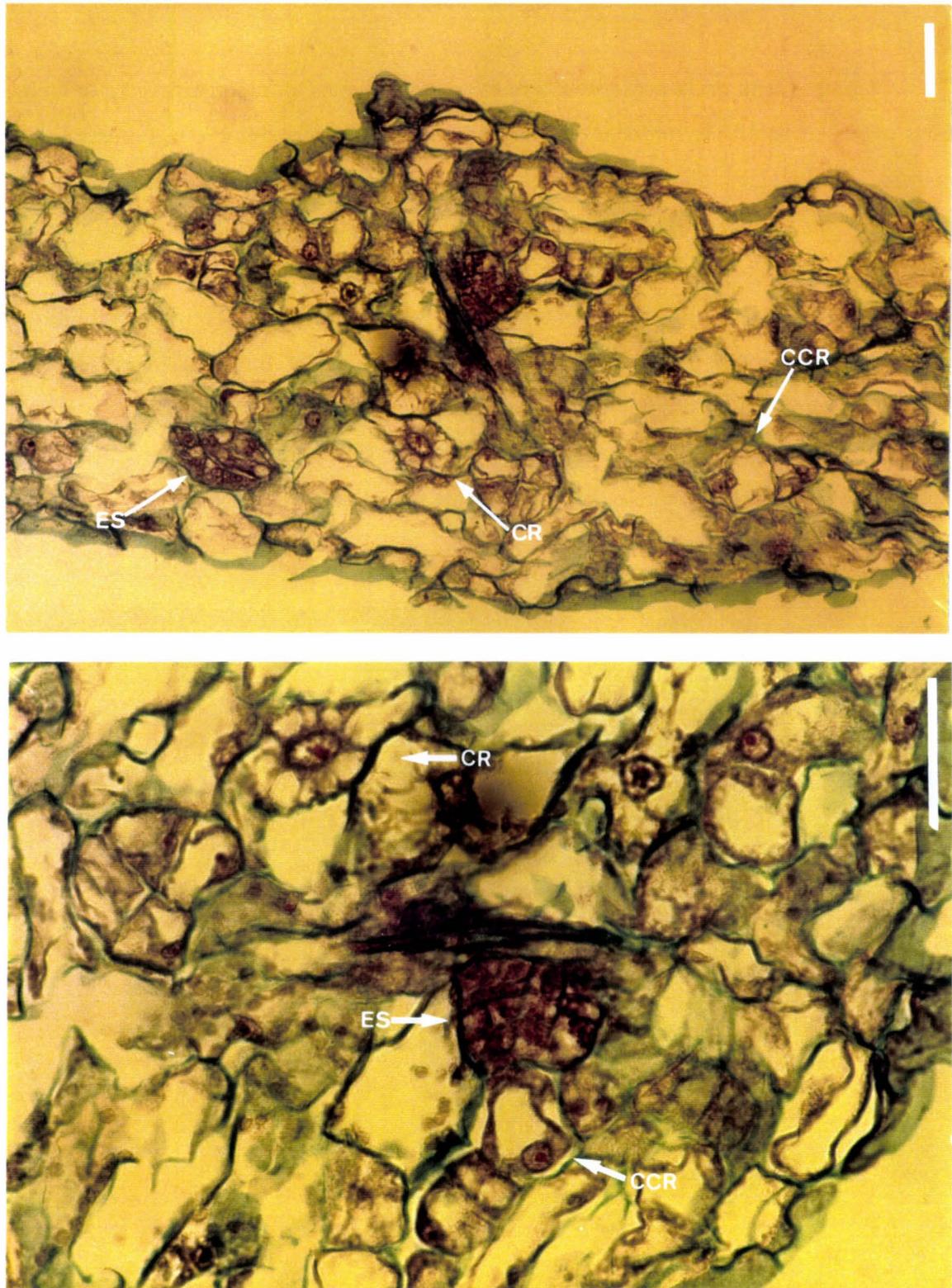


Figure 9 : Coupe transversale d'explants de feuilles de chicorée "474" cultivés cinq jours dans le milieu M17S60Gly330. Vue d'ensemble du limbe (A) et détaillée du parenchyme (B). Coloration safranine / fast-green. Barre 50 µm. ES : embryon somatique, CR : cellule réactivée, CCR : cellule en cours de réactivation.

C. Les tissus au quatrième jour de culture

Compte tenu de la présence d'embryons somatiques au cinquième jour de culture, nous avons recherché le moment de l'apparition des premiers embryons somatiques. Des coupes histologiques réalisées après 4 jours de culture en présence de glycérol sont présentées sur la figure 10. On observe des cellules en cours de réactivation ou réactivées sur l'ensemble du parenchyme foliaire. On peut observer une augmentation importante du volume nucléolaire et une fragmentation de la vacuole. Aucune division cellulaire des cellules embryogènes n'est observée à ce stade et aucun embryon n'est décelé au quatrième jour sur l'ensemble des limbes observés (27 fragments foliaires différents). Là encore, beaucoup de cellules ne présentent pas de signe de réactivation : leur vacuole occupe tout l'espace cellulaire et leur cytoplasme réduit est accolé à la paroi.

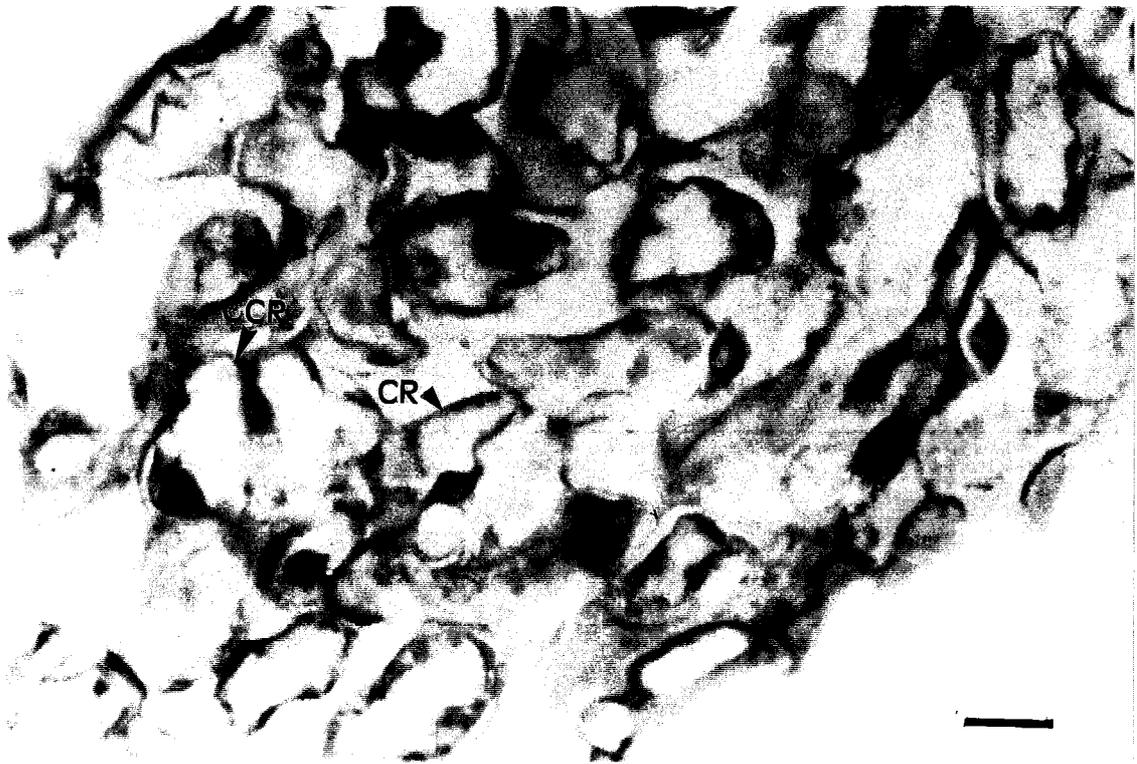


Figure 10 : Coupe transversale d'explants de feuilles de chicorée "474" cultivés quatre jours dans le milieu M17S60Gly330. Coloration safranine / fast-green. Barre 50 µm. ES : embryon somatique, CR : cellule réactivée, CCR : cellule en cours de réactivation.

D.Conclusion

Dans le milieu M17S60Gly330, la division de la cellule embryogène initiale survient environ 104 heures après le début de l'incubation des tissus dans le milieu d'induction (Annexe I). Comme l'ont montré Blervacq *et al.* (1995), la première division embryogène dans les feuilles de l'hybride '474' est symétrique. Dans un proembryon dépourvu de protoderme, les cellules filles deviennent de plus en plus petites au fur et à mesure des divisions (Dubois *et al.*, 1991).

L'observation des coupes cytologiques permet d'affirmer que le blocage de la division des cellules embryogènes n'est plus obtenue au cinquième jour de la culture.

II.Effet de l'augmentation de la concentration en glycérol sur la synchronisation de la première division des cellules embryogènes.

Afin de rechercher une possibilité de maintenir l'absence de division des cellules réactivées jusqu'au cinquième jour de culture et obtenir une synchronisation des premières divisions cellulaires, nous avons augmenté la concentration en glycérol dans le milieu de culture M17S60 de la phase d'induction. Les coupes histologiques sont réalisées au cinquième jour de culture.

A.Effet de l'apport de 495 mM de glycérol

La concentration en saccharose étant maintenue à 60 mM, 495 mM de glycérol sont ajoutés au milieu, soit une concentration 1,5 fois supérieure par rapport à la condition témoin (330 mM). Les résultats sont présentés sur la figure 11A.

Des cellules en voie de réactivation et des cellules réactivées sont visibles mais leur fréquence est moindre par rapport à la condition témoin. Ces cellules sont surtout situées à proximité des tissus conducteurs. Des structures embryonnaires qui présentent une coloration intense sont visibles en bordure des fragments foliaires. Ces embryons sont moins nombreux et ne comportent en moyenne qu'une dizaine de cellules. Les embryons à ce stade occupent un volume légèrement plus important que celui des cellules réactivées.

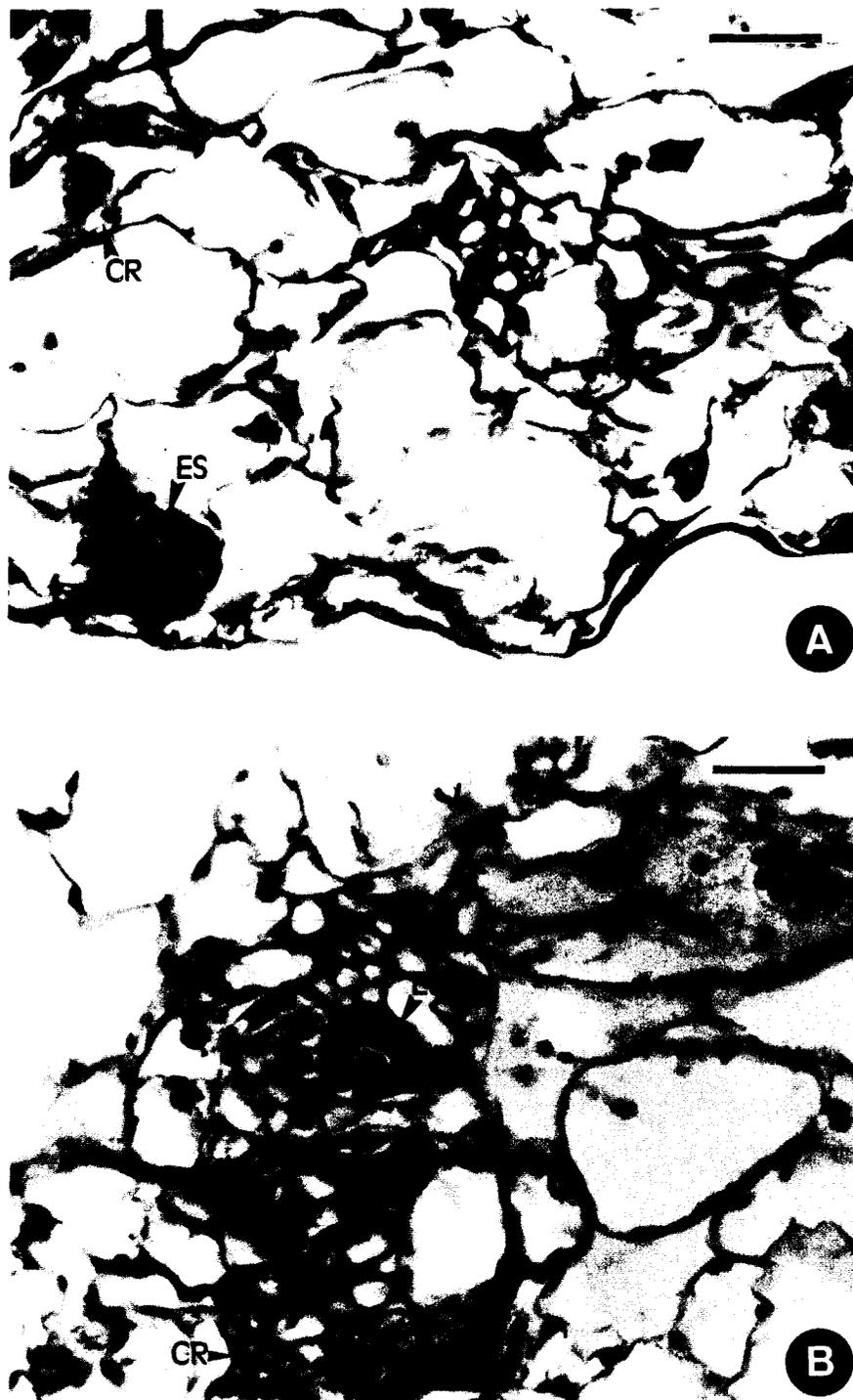


Figure 11 : Coupe transversale d'explants de feuilles de chicorée "474" après cinq jour d'incubation dans un milieu M17S60 additionné de 495 mM (A) ou 660 mM (B) de glycérol Barre = 50 µm. Coloration safranine / fast green. . ES : embryon somatique, CR : cellule réactivée, CCR : cellule en cours de réactivation.

B. Effet de l'apport de 660 mM de glycérol

La quantité de glycérol est doublée (660 mM) dans le milieu d'induction et les résultats sont présentés sur la figure 11B.

Des cellules réactivées sont encore visibles et en particulier au voisinage immédiat des vaisseaux conducteurs ; c'est uniquement près de ces tissus que nous observons des embryons. Guzzo *et al.* (1994 et 1995) remarquent que les cellules capables de former des masses proembryogènes sont situées à proximité des faisceaux vasculaires chez la carotte. Des observations similaires au cours de l'embryogenèse somatique des explants foliaires de cocotier confortent nos travaux (Buffard-Morel *et al.*, 1991). Ces proembryons ne comportent que peu de cellules et sont nettement isolés du reste des tissus foliaires. A ce stade et dans cette condition les embryons n'occupent pas un volume plus important que celui d'une cellule réactivée et non divisée. Au-delà de 660 mM, le glycérol provoque une nécrose des tissus foliaires.

Ainsi l'augmentation de la concentration de glycérol dans le milieu d'induction ne permet pas de bloquer les premières divisions mais les embryons sont d'autant moins nombreux que la concentration en glycérol est élevée. De plus on montre que l'augmentation des teneurs en glycérol retarde la division des cellules embryogènes.

III. Effet du glycérol sur la quantité et la qualité des embryons somatiques

Nous venons de voir que le glycérol permet le blocage des divisions des cellules embryogènes jusqu'au quatrième jour d'induction. Dans ces conditions le glycérol reste-t-il indispensable à la phase d'induction des cellules de chicorée ?

A. Les tissus foliaires au quatrième jour en absence de glycérol

Les tissus foliaires ont été incubés 4 jours dans un milieu M17S60 dépourvu de glycérol puis transférés sur milieu M17S60 pour une durée complémentaire de culture de 8

jours. La culture des fragments se fait dans les mêmes conditions: milieu liquide agité, à 35°C et à l'obscurité.

La figure 12 montre les limbes de chicorée après 4 jours d'incubation dans le milieu M17S60. On peut déjà remarquer des cellules en cours de réactivation, des cellules réactivées ainsi que des petits embryons somatiques. Les cellules réactivées sont également beaucoup plus nombreuses que dans les tissus cultivés dans le M17S60Gly330. Ces résultats montrent que la division des cellules embryogènes a eu lieu entre le troisième et le quatrième jour.

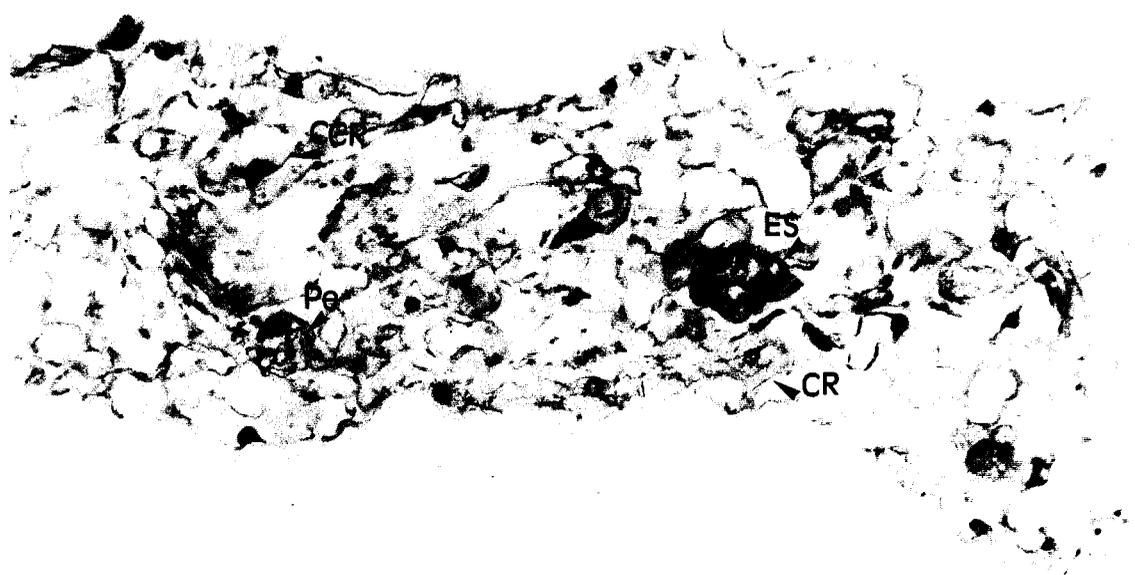


Figure 12 : Coupe transversale d'explants de feuille de chicorée "474" après quatre jours d'incubation dans un milieu M17S60 dépourvu de glycérol. Barre=50µm. Coloration : safranine / fast green. ES : embryon somatique, Pe : proembryon, CR : cellule réactivée, CCR : cellule en cours de réactivation.

B. Mise en place d'un nouveau protocole

Nous avons analysé les répercussions qualitatives et quantitatives sur un nouveau protocole de production d'embryons somatiques. Les fragments foliaires de chicorée sont

incubés 4 jours dans le M17S60 additionné ou non de 330 mM de glycérol puis transférés dans un milieu dépourvu de glycérol. Les embryons somatiques sont dénombrés sur les limbes après coloration au lugol et répartis selon leur diamètre dans 4 classes de taille. Les figures 13 et 14 montrent les résultats obtenus.

En présence de glycérol dans la phase d'induction, on dénombre 14,69 ES mm⁻² de limbe. Ceux ci ont une taille supérieure à 100 µm. La classe 2 est la plus représentée et constitue plus de 75 % des embryons dénombrés (Fig. 13A). Les plus gros n'ont pas encore atteint de stade de développement avancé et sont encore globulaires (Fig. 13A et 14A). En absence de glycérol dans le milieu de culture, toutes les classes de taille sont représentées en proportion équivalente. Les plus gros acquièrent une forme plus définie (proche des embryons cordiformes). Le nombre d'embryons somatiques est légèrement supérieur : 15,50 ES.mm⁻² de limbe (Fig. 13B et 14B).

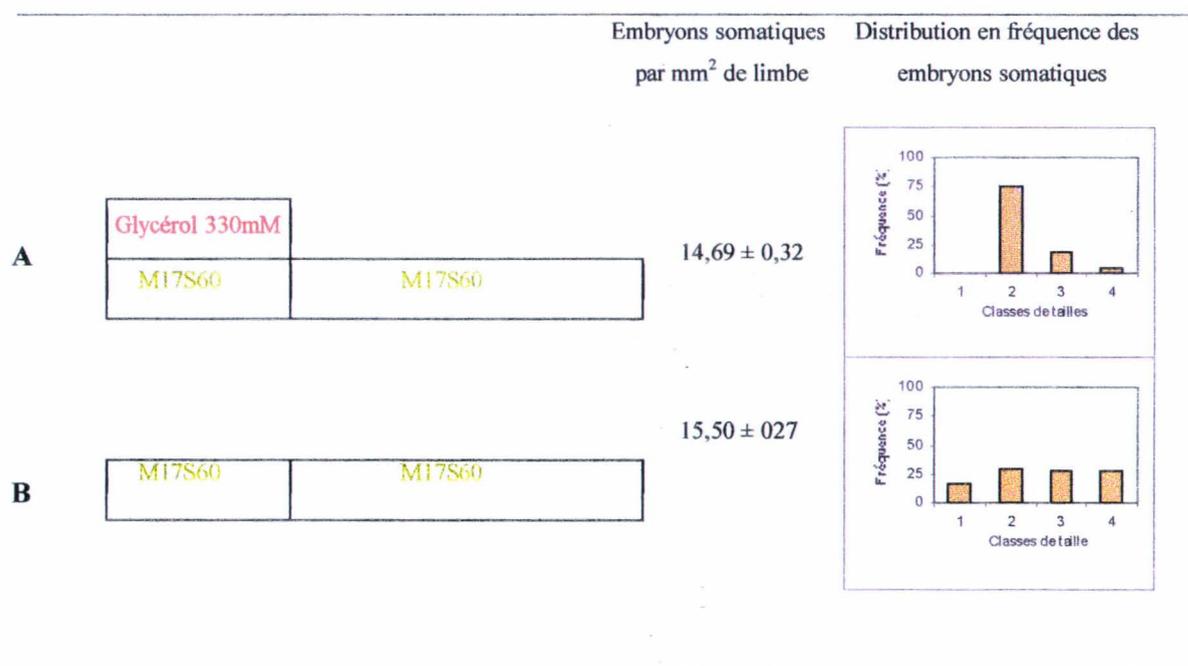


Figure 13 : Comparaison de la quantité et de la qualité des embryons somatiques et effet du glycérol. Les fragments foliaires “474” sont incubés 4 jours dans le M17S60Gly330 (A) ou le M17S60 (B) puis transférés 8 jours dans le M17S60. Le nombre d'embryons somatiques par mm² de limbe est compté au 12^{ème} jour de culture (moyenne ± écart type, n=270) et distribué par classes de taille 1 : ES ≤100µm ; 2 : 100<ES≤150µm ; 3 : 150<ES≤200µm ; 4 : ES>200µm.

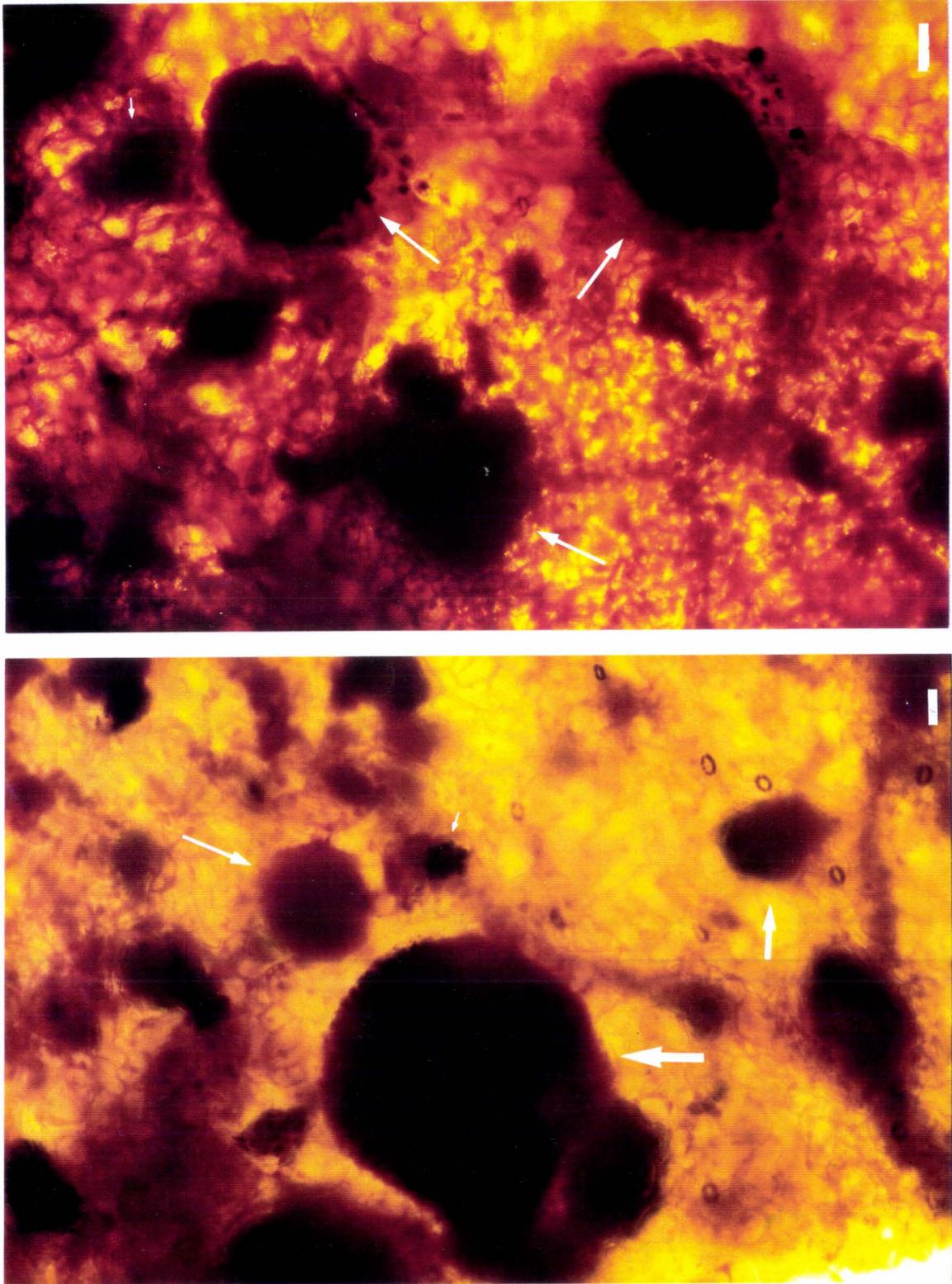


Figure 14 : Embryons somatiques (flèches) sur des explants de feuilles de chicorée hybride "474" au douzième jour de culture. Après quatre jours d'incubation dans le milieu M17S60Gly330 (A) ou quatre jours dans le M17S60 (B). Coloration au lugol.

IV. Conclusion

L'augmentation de la concentration en saccharose dans les milieux de culture permet d'augmenter le rendement en embryons somatiques chez la chicorée. Mais, l'observation des cellules en coupes cytologiques pendant la phase d'induction montre que le glycérol, même à forte concentration, ne bloque plus la division de la cellule embryogène. Nous avons de ce fait établi un nouveau système de culture en conservant 330 mM de glycérol pendant la phase d'induction mais en réduisant celle-ci à quatre jours (Fig. 15).

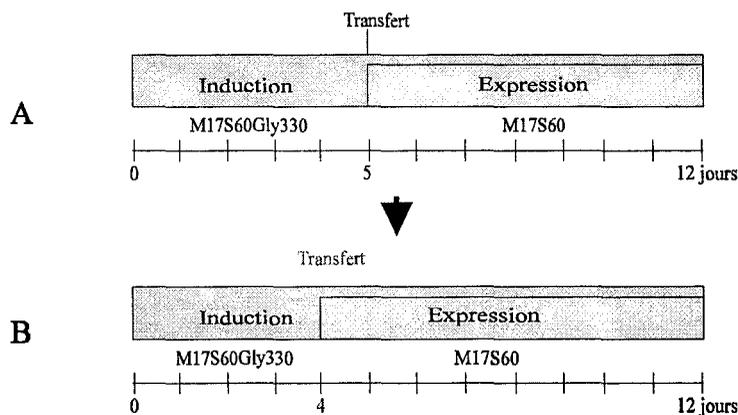


Figure 15 : Les différentes phases de la culture embryogène des fragments foliaires de chicorée : protocole classique (A) et protocole modifié proposé (B).

Ceci nous a permis par ailleurs, de mettre en place un système de culture parallèle qui n'utilise pas le glycérol au cours de la phase d'induction. Cette condition constituera un témoin tout au long de notre étude sur les effets du glycérol. L'utilisation d'un autre témoin non embryogène avec la variété Flash nous permettra de conclure sur les événements nécessaires à la réalisation de l'embryogenèse somatique, tant au niveau cytologique, biochimique, que moléculaire.

V. Etude histologique chez une variété non embryogène : la chicorée Flash

Des observations microscopiques préalables ont été réalisées sur des fragments de feuille de la variété Flash après coloration au lugol. Ils ne recèlent pas d'embryon somatique au douzième jour de culture. Des coupes histologiques ont été réalisées au quatrième jour de culture dans des conditions comparables à celles utilisées pour la chicorée "474".

A. Au quatrième jour de culture

Comme nous l'avons montré dans la première partie de ce mémoire, seules des cellules réactivées sont visibles au quatrième jour de culture dans les limbes de la chicorée hybride "474" quelle que soit la condition étudiée (Fig. 10 et 12). Lorsque les tissus foliaires sont induits 4 jours en absence de glycérol, des embryons somatiques sont déjà présents dans les tissus foliaires.

Les limbes de la variété Flash ne présentent aucune cellule réactivée au quatrième jour de culture ; en revanche, on peut remarquer la présence de plastides très abondants à la périphérie des cellules (Fig. 16A).

B. Au huitième jour de culture

Au huitième jour de culture la variété non embryogène présente des différences avec la chicorée "474" puisqu'aucun signe de différenciation cellulaire, même au niveau des cellules proches des tissus conducteurs, ne peut être observé (Fig. 16B).

A l'inverse, les tissus de la variété embryogène présentent des embryons somatiques pluricellulaires (Fig. 17A et B). Leur taille est de l'ordre de 90 à 300 μm . Après une induction en présence de 330 mM de glycérol, les embryons somatiques sont encore au stade globulaire (Fig. 17A). Lorsque les tissus sont induits en absence de glycérol, on peut remarquer que des embryons sont polarisés et s'orientent vers une forme plus définie (Fig. 17B).

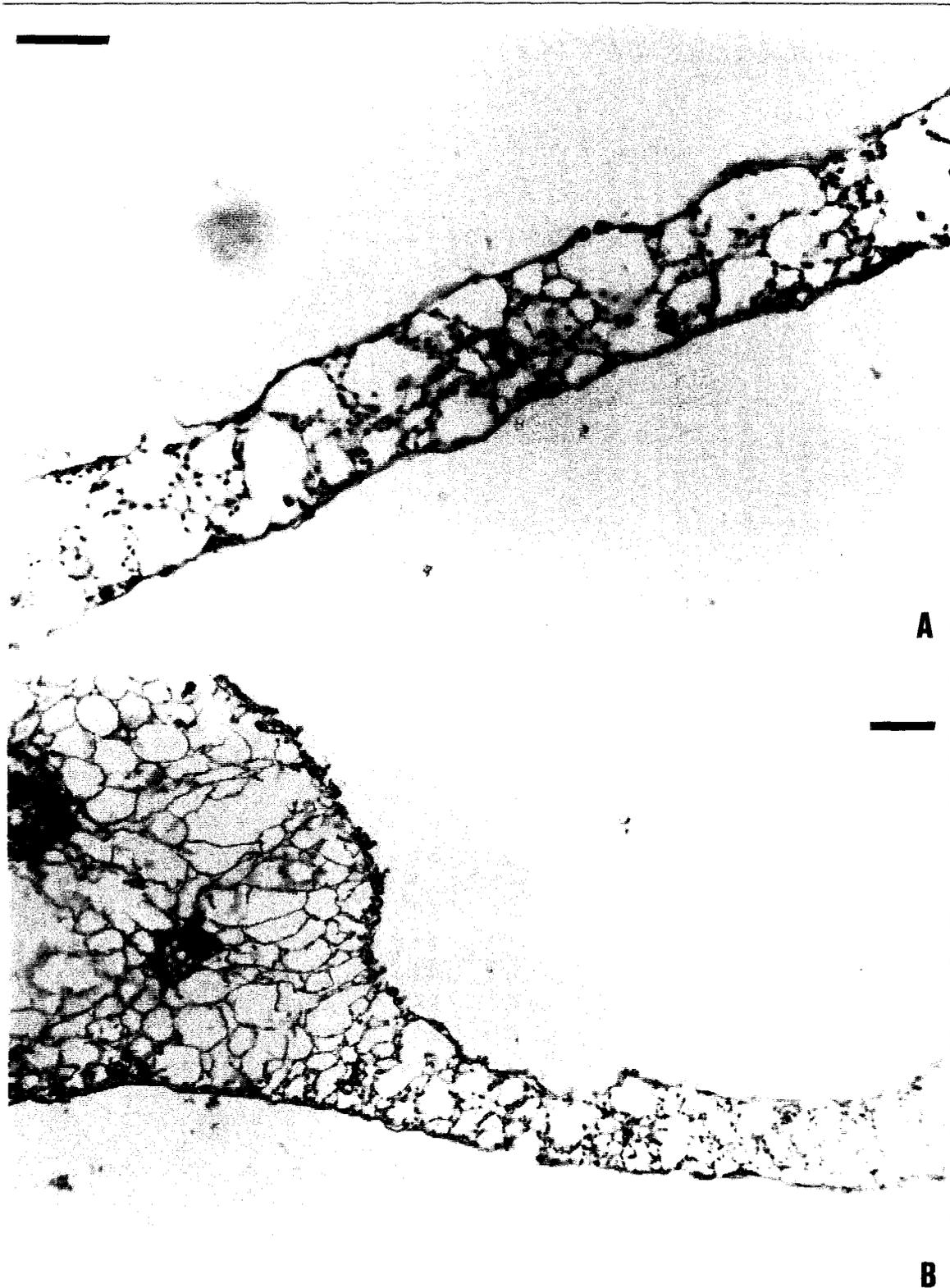


Figure 16: Coupe transversale d'un explant de feuille de chicorée de la variété Flash après 4 (A) ou 8 (4+4) jours de culture. Les fragments sont incubés 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 puis transférés sur milieu M17S60 4 jours. Coloration : Safranine /fast-green. Barre = 50 μ m.

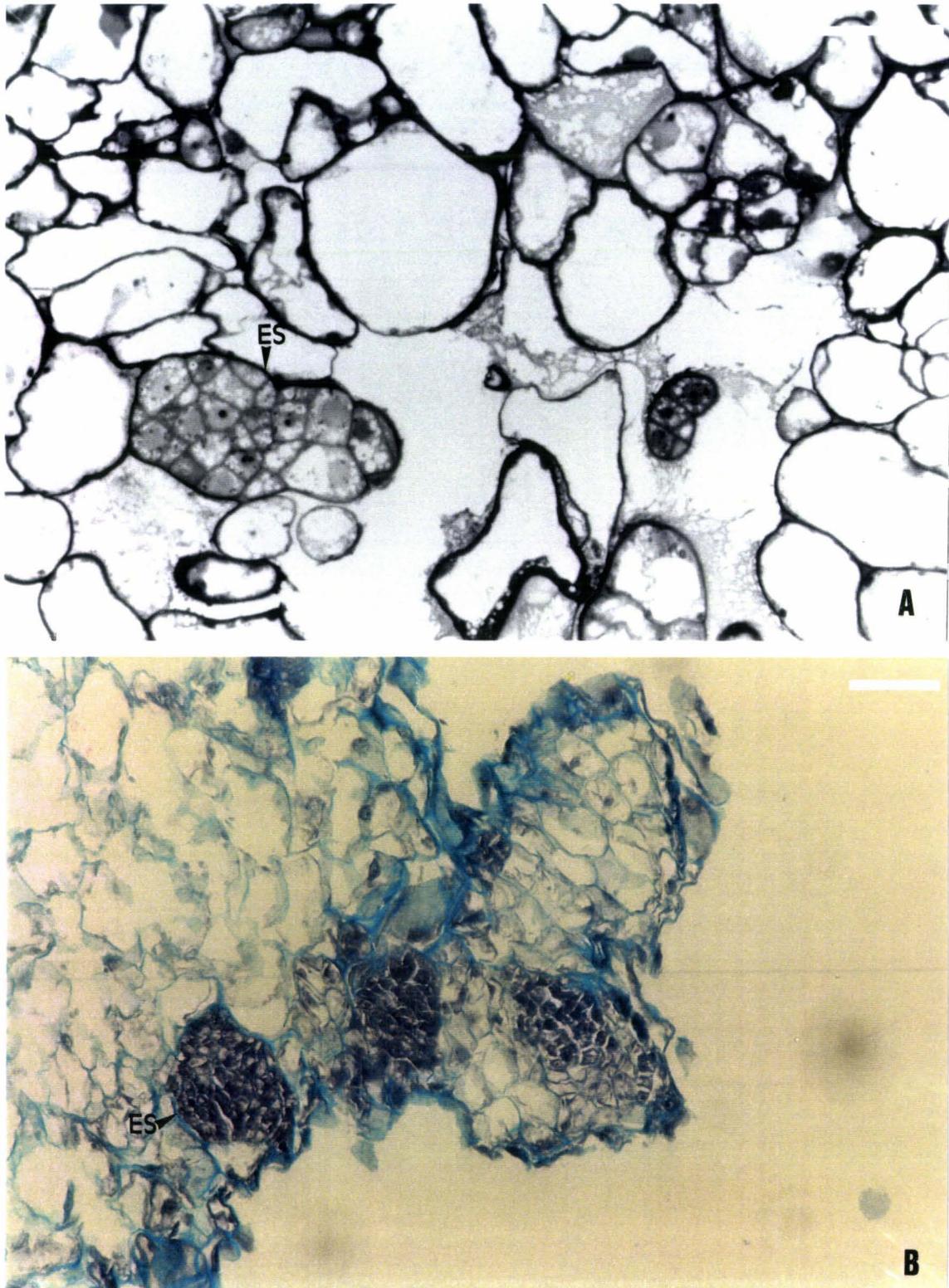


Figure 17 : Coupes transversales d'explant de feuilles de chicorée "474" au 8^{ème} jour de culture. Les fragments sont incubés 4 jours dans les milieux M17S60 (A) ou M17S60Gly330 (B) puis transférés sur milieu M17S60 4 jours. Coloration : Safranine /fast-green. Barre = 50 μ m.

C. Conclusion

Ces diverses observations nous permettent de conclure que la variété Flash n'est pas embryogène dans les conditions de culture imposées. Dans la suite de ce chapitre, nous nous sommes intéressés au blocage de la division des cellules embryogènes par le glycérol. Les cellules végétales ont un cytosquelette composé des microfilaments d'actine et des microtubules de tubulines indiscernables de ceux existant dans les cellules animales. L'organisation du cytosquelette conditionne l'entrée en mitose de la cellule. Il est fréquemment rapporté que le cytosquelette est altéré par les alcools chez les animaux. Le glycérol peut se fixer sur les tubulines et ainsi perturber l'entrée en mitose des cellules (Zabrecki et Cole, 1979). Chez la chicorée le blocage des divisions des cellules embryogènes pourrait s'expliquer par la présence du glycérol. Aussi, nous nous sommes proposés de d'analyser les effets biochimiques et morphologiques sur les tubulines et les microtubules du cytosquelette.

VI.Effet du glycérol sur les microtubules du cytosquelette au cours de la division des cellules embryogènes de chicorée "474"

A.Effets du glycérol sur la quantité de tubulines

Nous avons suivi l'évolution des tubulines accumulées au cours d'une cinétique d'embryogenèse somatique. Nous avons utilisé la technique du Western blot en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les sous-unités α et β des tubulines (Amersham)(Fig. 18 et 19). Les explants foliaires de chicorée ont été cultivés 4 jours dans un milieu M17S60 ou M17S60Gly330 puis transférés 8 jours sur un milieu M17S60 dépourvu de glycérol (Fig. 18 et 19).

1.Variations de l' α tubuline.

La révélation de la membrane après hybridation avec l'anticorps anti- α TUB (Fig. 18) sur les protéines tissulaires de la chicorée "474" montre que d'une façon générale, la quantité de tubuline α présente, augmente au cours de l'embryogenèse somatique. Durant les premiers jours de la culture, nous ne mesurons pas de différences quantitatives nettes

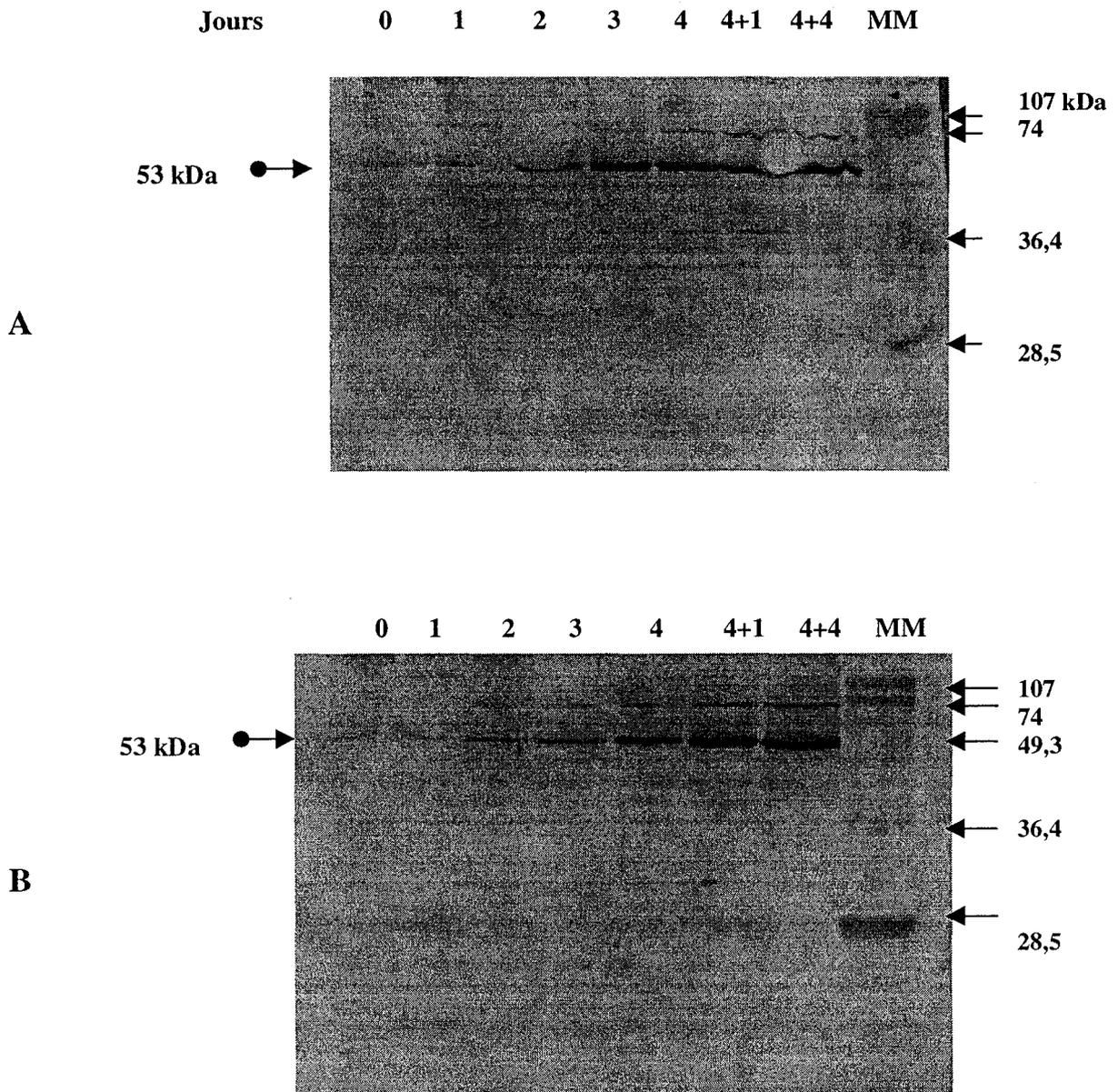


Figure 18 : Immuno-empreinte après hybridation avec un anticorps dirigé contre les tubulines α (53 kD) exprimées au cours de l'embryogenèse de fragments de limbes de chicorée "474". Les fragments sont cultivés 4 jours dans le M17S60 (A) ou dans le M17S60Gly330 (B) puis transférés 4 jours sur M17S60. MM : marqueurs de poids moléculaire : 107 kDa, phosphorylase B ; 74 kDa, sérum albumine bovine ; 49,3, ovalbumine ; 36,4 , anhydrase carbonique ; 28,5 , inhibiteur de trypsine de haricot.

entre les deux conditions de culture (Fig. 18A et B; Annexe II). Deux bandes protéiques de 53 kDa et 70 kDa sont mises en évidence par l'anticorps. Ces bandes sont déjà présentes avant la mise en incubation. D'après la littérature, seule la bande de 53 kD est généralement prise en considération par les auteurs. Le transfert dans le milieu frais provoque une élévation nette du taux de tubulines α .

2. Variations de la β tubuline

Dans les tissus foliaires de *Cichorium*, une bande protéique de 55 kDa est mise en évidence après hybridation avec l'anticorps anti β -TUB (figure 19). Le profil d'évolution de la protéine est similaire lorsque les limbes ont été cultivés en présence de glycérol (Fig. 19A) ou en absence de glycérol (Fig. 19B; Annexe III). La bande est détectée dès le jour 0. Nous pouvons observer dans les deux cas une diminution du taux de protéine au premier jour de la mise en culture par rapport aux tissus non-induits. Au deuxième jour nous enregistrons une chute du taux de β tubulines. A partir du troisième jour la bande protéique croît tout au long de la culture embryogène.

3. Conclusion

Ces expériences nous permettent de conclure que le glycérol a peu d'effet sur la production de tubulines α et β , même si la quantité de tubulines α augmente plus rapidement en absence de glycérol. Etant donné que nous sommes incapables de déceler une différence significative dans l'expression des tubulines nous avons tenté de mesurer la capacité des tubulines à s'organiser en microtubules.

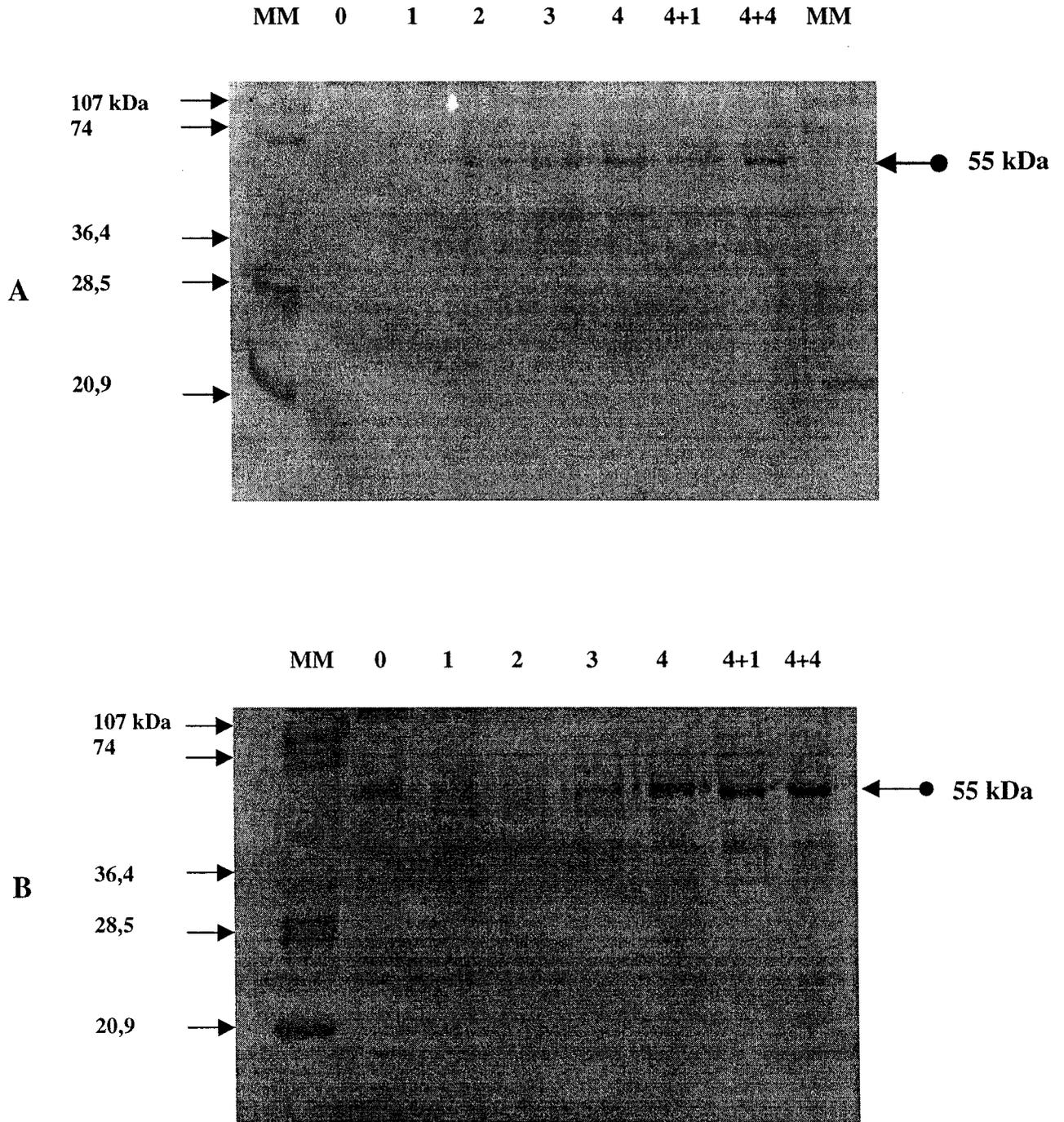


Figure 19 : Immuno-empreinte après hybridation par un anticorps dirigé contre les tubulines β (55 kD) exprimées au cours de l'embryogenèse de limbes de chicorée "474". Les fragments sont cultivés 4 jours dans le M17S60 (A) ou dans le M17S60Gly330 (B) puis transférés 4 jours sur M17S60: MM : marqueurs de poids moléculaire : 107 kDa, phosphorylase B ; 74 kDa, sérum albumine bovine ; 49,3, ovalbumine ; 36,4 , anhydrase carbonique ; 28,5 , inhibiteur de trypsine de haricot.

B.Effet du glycérol sur l'organisation en microtubules

Le glycérol n'ayant pas d'influence sur le taux de protéines exprimées au cours de l'embryogenèse somatique, nous avons analysé son effet sur la polymérisation des tubulines α et β en dimères, cette association permettant l'organisation en microtubules. Dans un premier temps, nous avons essayé d'adapter le protocole de Gaskin et Cantor (1974) sur la polymérisation *in vitro* des microtubules sur des cellules animales, mais les résultats ont été décevants. Il n'est malheureusement pas toujours facile d'adapter une manipulation au règne végétal. Les auteurs signalent toutefois que les dimères peuvent se former et engendrer des molécules de formes aberrantes ou encore non fonctionnelles *in vivo*. Par conséquent nous avons réalisé une expérience sur les cellules directement par visualisation du cytosquelette en microscopie à fluorescence.

La figure 20 montre une cellule cultivée dans le milieu d'induction M17S60. Le noyau, de cette cellule est petit et ne se place pas au centre (Fig. 20A). Après immunomarquage avec un anticorps anti α -tubuline on peut voir que le réseau est fin et présente des microtubules transverses et parallèles (Fig. 20B).

Après cinq jours d'induction dans un milieu favorable, les cellules commencent à présenter des cellules réactivées. Les noyaux des cellules se placent au centre de la cellule et ceci en présence ou en absence de glycérol (Fig. 20C et E). Les microtubules s'organisent autour du noyau dans le cas des cellules réactivées en absence de glycérol et forme un réseau bien défini (Fig. 20D). En revanche dans le cas de cellules qui sont induites en présence du glycérol, les microtubules ne présentent pas d'orientation particulière et forment des masses tubulaires désorganisées (Fig. 20F).

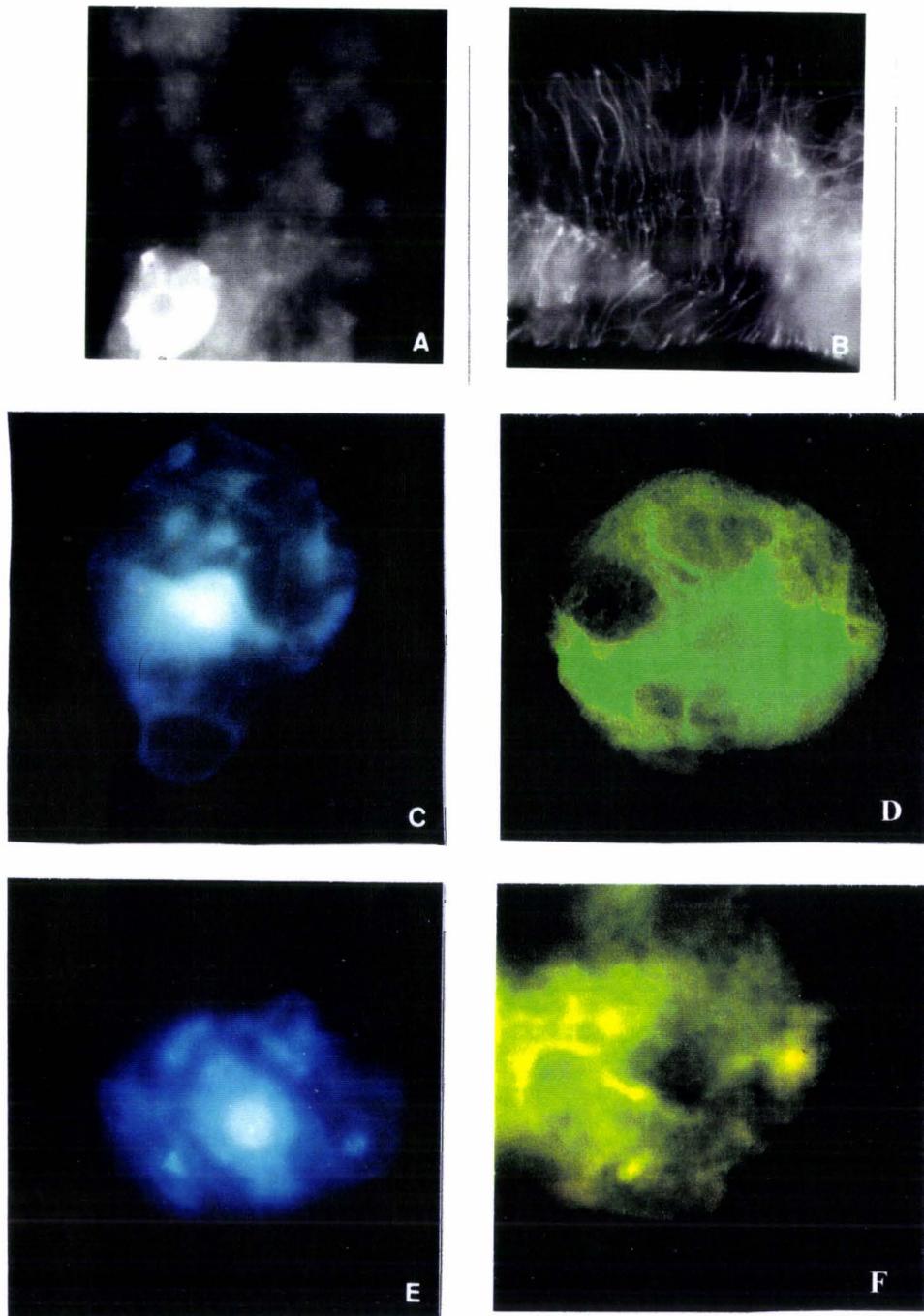


Figure 20 : Immunolocalisation des α -tubulines sur des cellules de chicorée hybride "474" après 4 jours d'incubation dans un milieu d'induction.

A : Cellule non réactivée sur un fragment de limbe incubé dans le M17S60 colorée au DAPI. On peut observer le noyau. B : Cellule non réactivée sur un fragment de limbe incubé dans le M17S60 après immunomarquage. Le réseau microtubulaire est parallèle.

C : Cellule réactivée dans le milieu M17S60, la coloration au DAPI met en évidence le noyau central.

D : : Cellule réactivée sur un fragment de limbe incubé dans le milieu M17S60. L'hybridation avec l'anticorps met en évidence un réseau microtubulaire qui s'oriente en étoile autour du noyau préparant l'entrée en mitose.

E : Cellule réactivée sur un fragment de limbe incubé dans le milieu M17S60Gly330. Après coloration au DAPI, on observe le noyau en position centrale.

F : Cellule réactivée sur un fragment de limbe incubée dans le M17S60Gly330. Le réseau microtubulaire est désorganisé et présente des masses de tubulines.

C. Conclusion

Les cellules réactivées présentent un cytosquelette organisé où le noyau central est prêt à entrer en division. Les tissus induits en présence ou en absence de glycérol présentent une évolution similaire de la quantité de tubulines. Nous pouvons ainsi conclure que le glycérol a peu d'effet sur la synthèse des tubulines. L'augmentation des synthèses protéiques après le transfert pourrait correspondre à la vague de la première division des cellules embryogènes et des embryons somatiques eux mêmes pour la condition d'induction synchrone, ces divisions cellulaires étant permanentes dans le cas d'une culture en absence de glycérol.

VII. Effet du glycérol sur le conditionnement des cultures embryogènes

Nous examinons les effets du glycérol au cours du conditionnement des cultures embryogènes (Belletre *et al.*, 1999). Le glycérol est apporté pendant la phase d'induction et / ou pendant la phase d'expression de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Les embryons somatiques sont dénombrés au douzième jour de culture après coloration au lugol et répartis en quatre classes de taille croissante. Les différentes conditions ainsi que les résultats obtenus à partir de trois répétitions différentes sont répertoriés sur la figure 21.

Au cours de la phase d'induction, le glycérol est toujours apporté à 330 mM. Il peut être combiné au saccharose 60 mM (Fig. 21 a, b, c, d et e) ou le remplacer en concentration équimolaire (Fig. 21 f, g, h, i et j).

A. Effet de l'apport de 330 mM de glycérol pendant la phase d'expression

Lorsque différentes combinaisons sont testées au cours de la phase d'expression, le glycérol a un effet significatif sur le nombre d'embryons somatiques ($P < 0,001$; test LSD). Les résultats montrent que le meilleur rendement est obtenu avec la condition classique qui permet d'obtenir $14,69 \text{ ES.mm}^{-2}$ de limbe (Fig. 21a). La plupart des embryons a un diamètre supérieur à $100 \mu\text{m}$. Lorsque le glycérol (330 mM) est maintenu tout au long de la culture, le nombre d'embryons décroît (Fig. 21b et 22A). Cette diminution est encore plus significative en l'absence de transfert dans un milieu neuf et correspond à environ 75

% du nombre d'embryons par rapport à la condition témoin (Fig. 21c et 22B). De plus les embryons ont une taille inférieure à 100 μm pour la majeure partie d'entre eux.

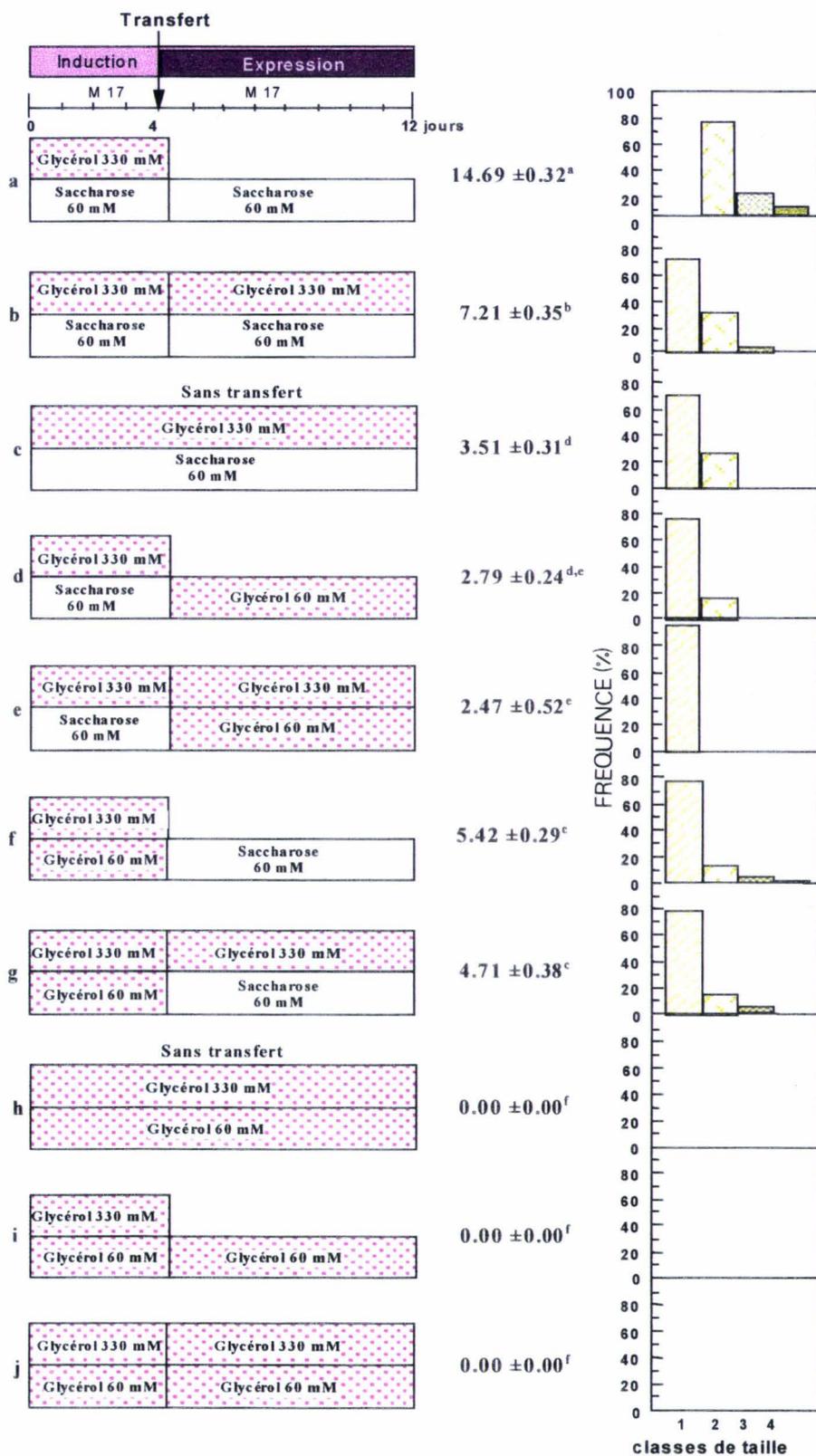
B. Le glycérol peut-il remplacer le saccharose ?

Lorsque le glycérol remplace le saccharose au cours de la phase d'expression à 60 mM (Fig. 21d) ou à 330 + 60 mM (Fig. 21e et 22C) les embryons sont de plus en plus rares et de très petites tailles.

Au cours de la phase d'induction, si le glycérol à 60 mM remplace le saccharose et s'ajoute aux 330 mM, le nombre d'embryons est réduit même lorsque les fragments foliaires sont transférés sur milieu M17 dépourvu de glycérol (Fig. 21f et 22D). Si le glycérol est maintenu tout au long de la culture mais en présence saccharose au cours de la phase d'expression (Fig. 21g), le nombre d'embryons est encore relativement important et représente 4,71 contre 7,21 ES.mm⁻² de limbe pour la condition b où les fragments sont induits en présence de saccharose.

Aucun embryon somatique n'est décelé quand le glycérol est la seule source carbonée des tissus foliaires du milieu d'induction et d'expression en absence (Fig. 21i) ou en présence de 330 mM avec (Fig. 21j) ou sans transfert (Fig. 21h) au quatrième jour.

Figure 21 : Effet du glycérol sur la quantité et la qualité des embryons formés au sein des explants des limbes de chicorée. Les tissus foliaires sont incubés pendant 4 jours dans le milieu M17 additionné de 330 mM de glycérol et 60 mM de saccharose (M17S60Gly330) puis transférés 8 jours sur différents milieux : M17S60 (a), M17S60Gly330 (b), M17S60Gly330 sans transfert (c), M17Gly60 (d) M17Gly330+60 (e), ou incubés pendant 4 jours dans le milieu M17 additionné de 330+60 mM de glycérol et transférés 8 jours sur M17S60 (f), M17S60Gly330 (g), M17S60Gly330 sans transfert (h), M17Gly60 (i) M17Gly330+60 (j). Le nombre d'embryons somatiques par mm² de limbe est compté au 12^{ème} jour de culture (moyenne \pm écart type, n=270) et distribué par classes de taille 1:ES [100 μm ; 2 : 100<ES150 μm ; 3 :150<ES[200 μm ; 4 : ES>200 μm . Les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P=0.05), en référence au test de LSD.



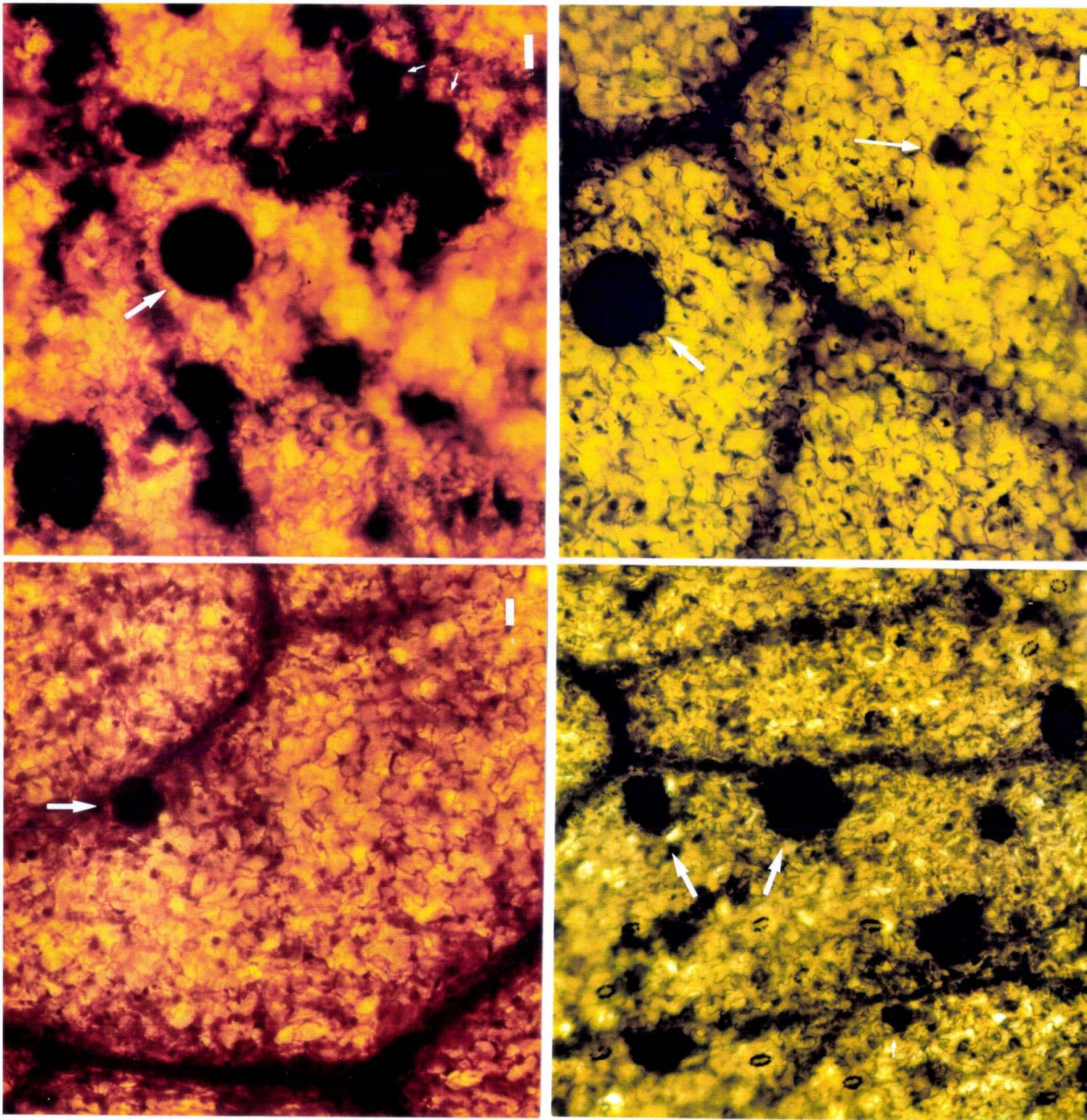


Figure 22 : Embryons somatiques (flèches) sur des fragments de feuilles de chicorée hybride "474" au douzième jour de culture. Les fragments foliaires ont été cultivés dans les conditions b (A), c (B), e (C) et f (D) de la figure 21. Coloration au lugol. Barre = 50µm

C.Conclusion

L'expression optimale en embryons somatiques est obtenue en présence de 60 mM de saccharose tout au long de la culture et lorsque le glycérol est limité à la phase d'induction de 4 jours. La présence de saccharose est indispensable à la formation des embryons somatiques dont le nombre varie selon qu'il y ait apport au cours de la phase d'induction ou d'expression. Le transfert des explants foliaires a un effet positif et le glycérol manifeste un effet inhibiteur lorsqu'il est appliqué en phase d'expression.

Des coupes semi-fines (Fig. 23) montrent qu'au quatrième jour pour les conditions e et f les tissus présentent des cellules réactivées ou en cours de réactivation. Par conséquent, le glycérol n'inhibe pas totalement l'induction de l'embryogenèse mais il empêche la division des cellules embryogènes. Des observations similaires sont faites sur des fragments de feuilles cultivées dans les conditions h, i et j.

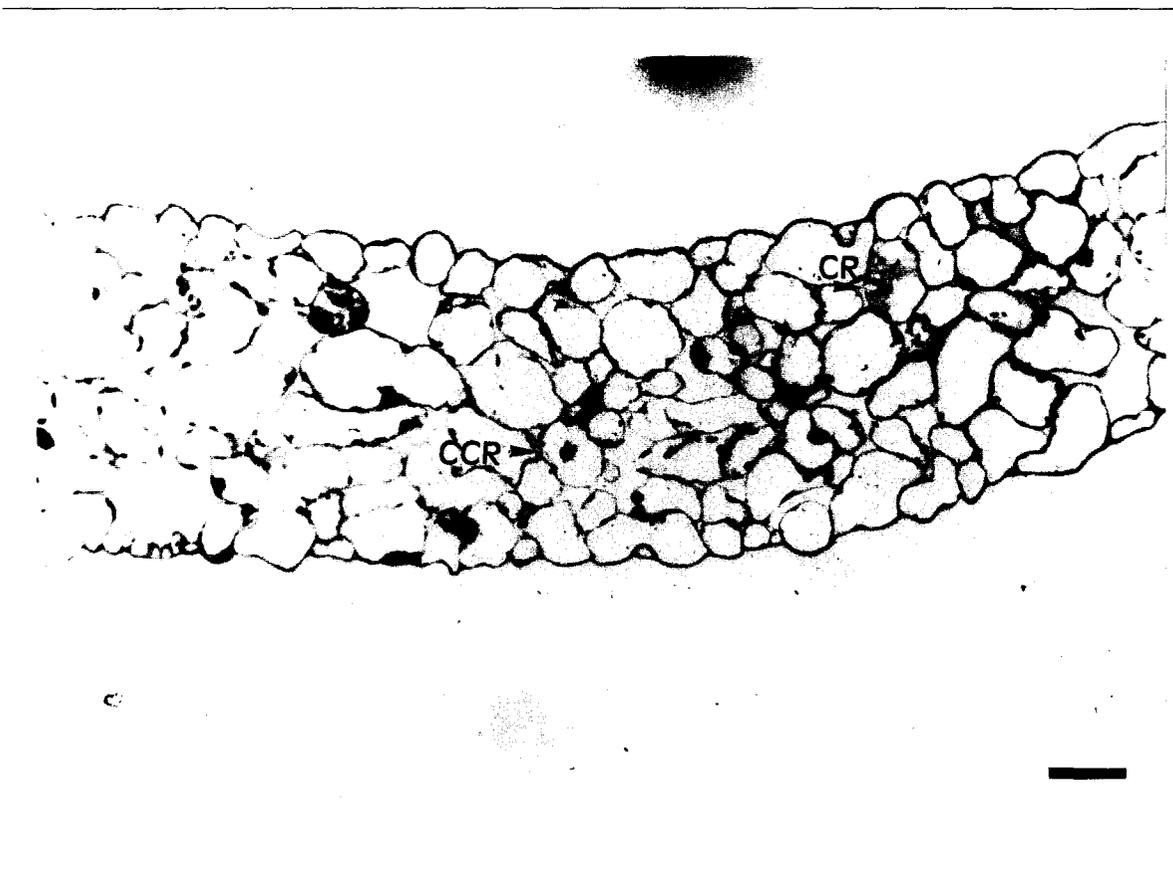


Figure 23 : Coupe transversale dans un fragment de limbe de chicorée "474" incubé 4 jours dans le M17 additionné de (60 + 330) mM de glycérol. Coloration bleu de toluidine Barre = 100 μ m.

Nous avons montré que le glycérol ne peut pas remplacer le saccharose et que seul il n'a aucune capacité à l'embryogenèse somatique, mais il peut cependant constituer une source carbonée suffisante pour l'induction des cellules embryogènes. Ces résultats laissent supposer que le glycérol est métabolisé au sein des tissus foliaires.

Résultats

Partie II

DEUXIEME PARTIE

Le métabolisme du glycérol et son implication au cours de l'embryogenèse somatique

Les polyols sont les molécules les plus représentées dans la nature (Wang *et al.*, 1996). On les rencontre chez les bactéries, les mammifères, les champignons, les algues et chez les plantes supérieures (Lewis et Smith, 1967 ; Bagnasco *et al.*, 1986). Différents rôles physiologiques sont proposés pour ces polyols dans les plantes, mais celui de la régulation osmotique est le plus souvent rapporté. Le mannitol par exemple est un régulateur osmotique chez *Apium graveolens* L. (Everard *et al.*, 1994). Même si peu d'informations sont données sur l'utilisation des polyols en culture *in vitro*, Gautheret (1948) a montré que le glycérol permet l'induction des cals chez *Daucus carota* et *Helianthus annuus*. Si le glycérol semble être le seul polyol utilisable comme source carbonée (Jones et Veliky, 1979), cela implique qu'il puisse être métabolisé au sein des tissus. Comme il est impliqué dans la mise en place de notre modèle d'embryogenèse, nous nous sommes donc intéressés à son métabolisme et à son devenir au cours de la culture d'explants foliaires en conditions embryogènes.

I. Evolution du glycérol

A. Dans les milieux de culture

Les milieux de culture sont analysés chaque jour au cours de l'incubation des fragments foliaires de chicorée hybride "474" quatre jours dans le milieu M17S60 ou le M17S60Gly330 puis après leur transfert pendant huit jours dans le milieu M17S60 dépourvu de glycérol. La figure 24 montre l'évolution de la teneur en glycérol séparé et quantifié par CLHP.

Les teneurs en glycérol diminuent progressivement de 330 à 257 mM au cours de la phase d'induction des embryons somatiques (Fig. 24A). On observe donc une diminution d'environ 25 % par rapport à la teneur initiale. Après le transfert sur un milieu M17S60, le glycérol n'est plus détecté. Le glycérol n'est jamais décelé dans les milieux d'induction et d'expression dépourvus de glycérol (Fig. 24B)

B. Dans les tissus foliaires

La figure 25 montre la cinétique d'évolution des concentrations en glycérol dans les fragments de chicorée au cours des quatre jours d'induction dans le M17S60Gly (Fig. 25A) ou le M17S60 (Fig. 25B) puis après le transfert pendant huit jours sur milieu dépourvu de glycérol. Les teneurs augmentent très rapidement au sein des tissus induits en présence de glycérol; nous décelons $158 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF dès le premier jour et $539 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF au quatrième jour de culture. Après le transfert, le glycérol chute brutalement et disparaît quasiment des fragments foliaires. En absence de glycérol dans le milieu d'incubation, la teneur en glycérol est voisine de $2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF.

Figure 24 : Cinétique d'évolution de la teneur en glycérol dans les milieux de culture. →

Les tissus foliaires sont incubés 4 jours dans les milieux M17S60Gly330 (A) ou le M17S60 (B) puis transférés 8 jours sur M17S60. Moyennes \pm écart type de 3x3 répétitions de 3 cultures indépendantes.

Figure 25 : Cinétique d'évolution des teneurs en glycérol dans les fragments foliaires de chicorée "474".

Les tissus foliaires sont incubés 4 jours dans les milieux M17S60Gly330 (A) ou le M17S60 (B) puis transférés 8 jours sur M17S60. Moyennes \pm écart type de 3x3 répétitions de 3 cultures indépendantes.

Figure 24

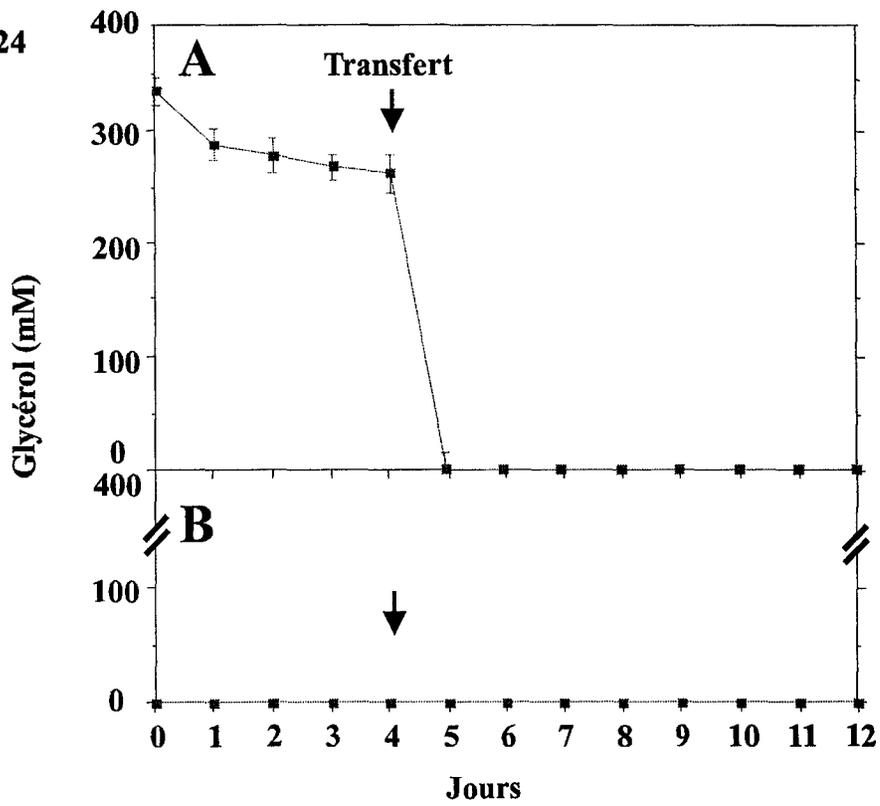
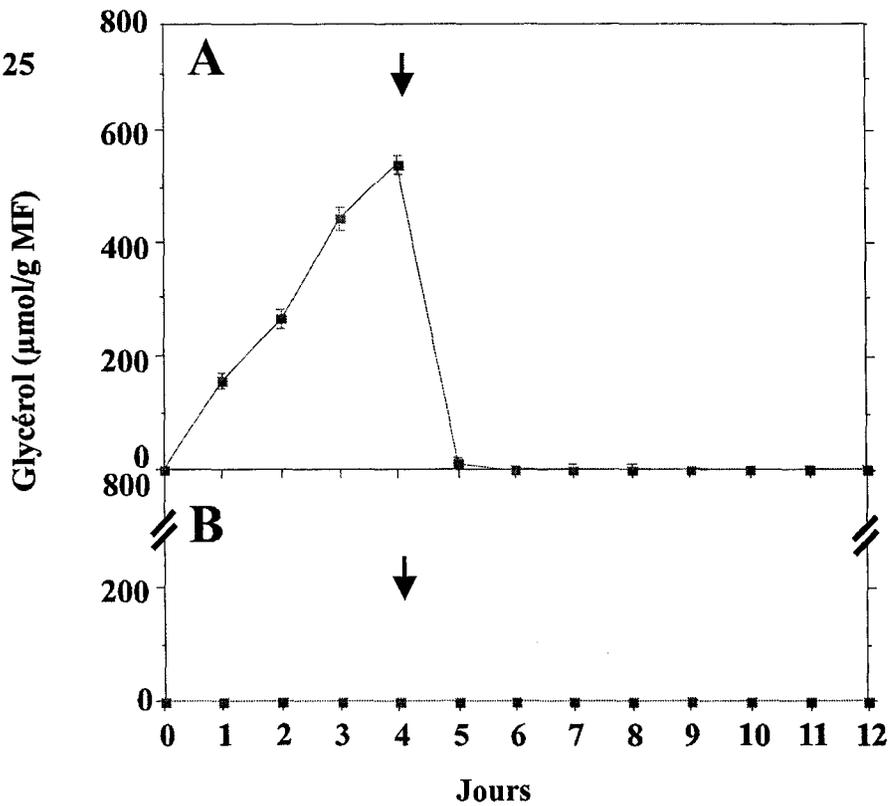


Figure 25



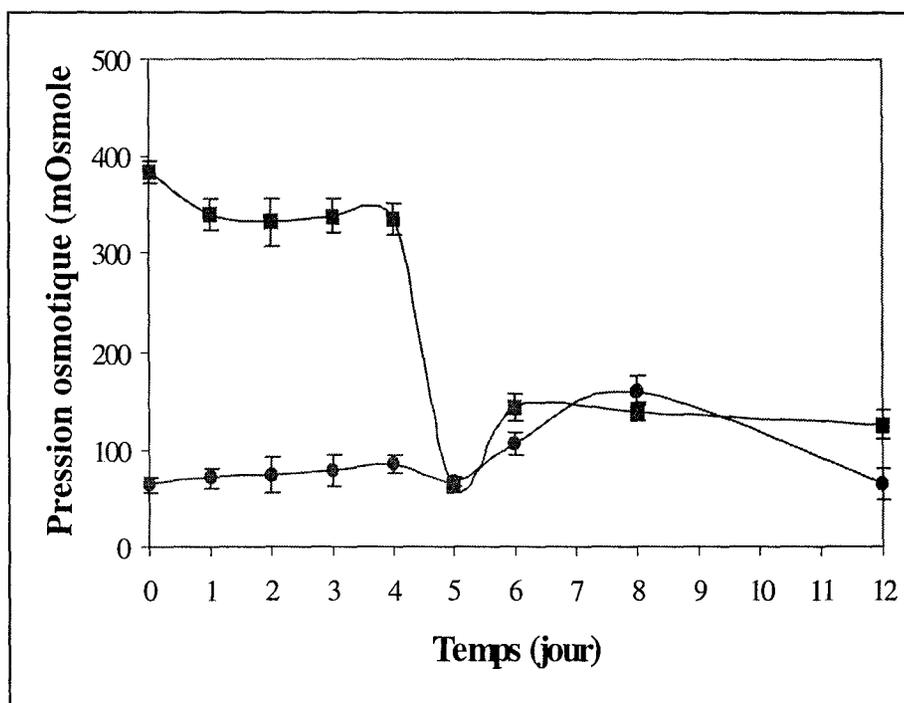


Figure 26: Evolution de la pression osmotique des milieux de culture au cours de l'embryogenèse somatique de tissus foliaires de chicorée hybride "474". Les limbes sont incubés 4 jours dans le milieu M17S60 (●) ou dans le milieu M17S60Gly330 (■) puis transférés 8 jours sur M17S60. Moyennes de 3 x 3 répétitions indépendantes \pm écart type.

C.Répercussion sur la pression osmotique dans les milieux de culture

Au moment de la mise en incubation des fragments foliaires du *Cichorium*, la pression osmotique du milieu de culture M17S60Gly330 est de 384 mOsmoles (Fig. 26). Elle diminue dès le premier jour de culture puis se stabilise jusqu'au quatrième jour (335 mOsmoles environ). La pression osmotique dans le milieu de transfert M17S60 est de 62,5 mOsmoles et passe à 147 mOsmoles au huitième jour de culture. Puis, elle diminue très peu pour atteindre 126 mOsmoles au douzième jour de culture. Le profil d'évolution obtenu après 4 jours dans le milieu M17S60 montre une augmentation lente de la pression

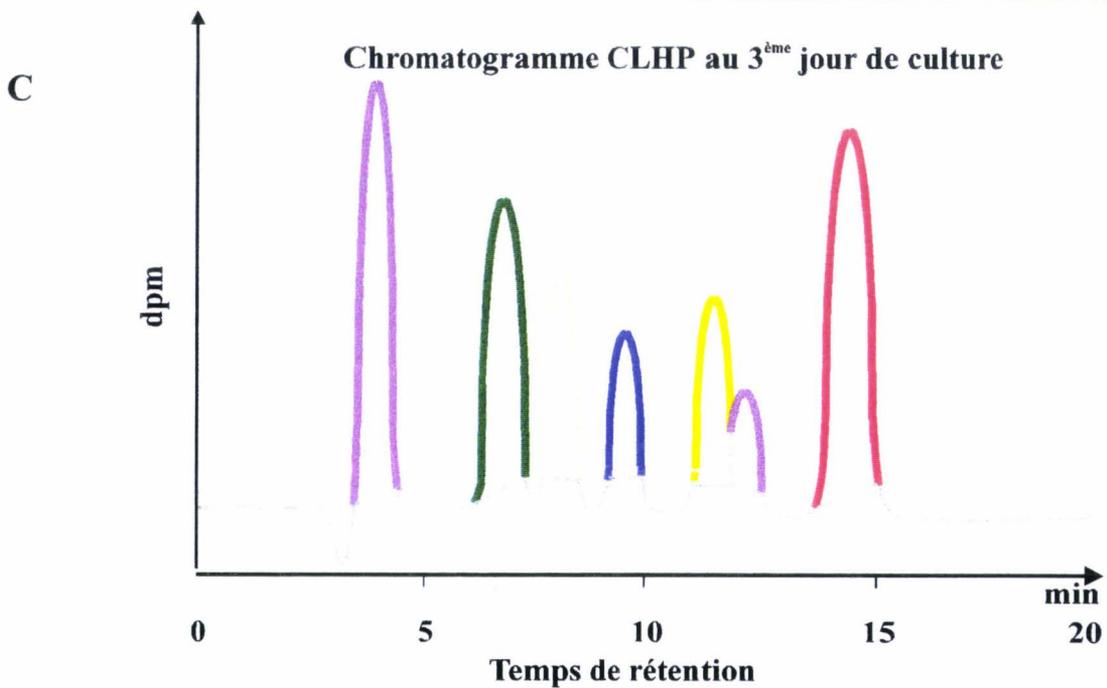
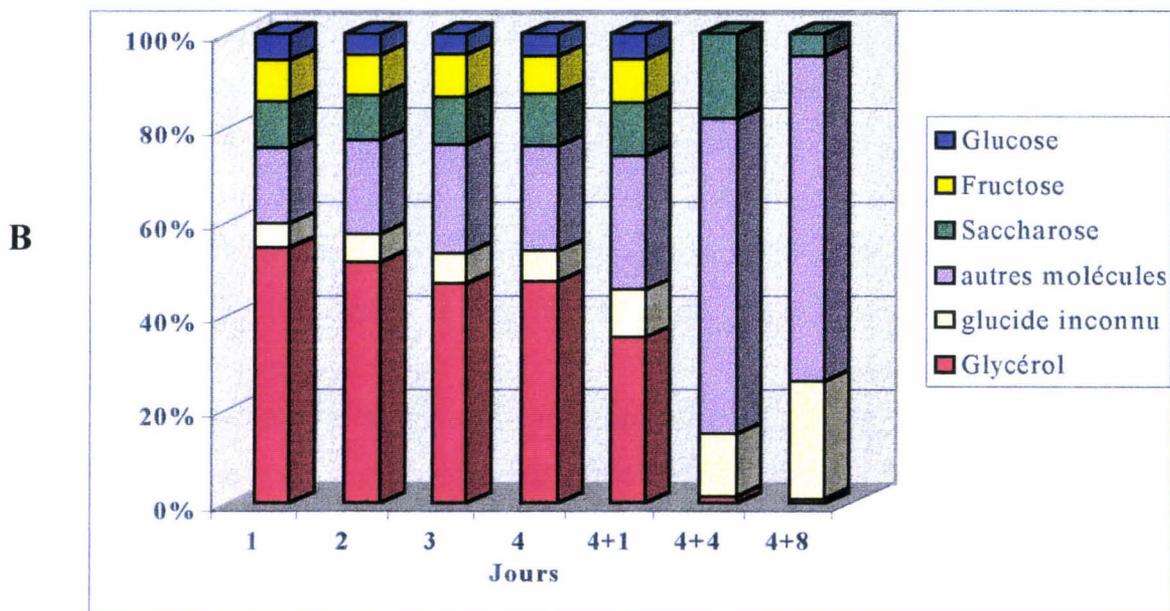
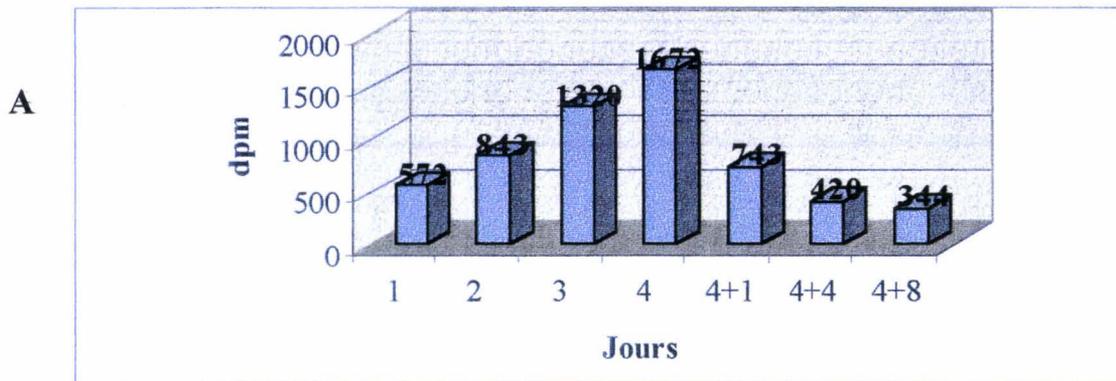
osmotique initiale (64 mOsmoles) qui évolue vers un pic au huitième jour à 160 mOsmoles. La pression osmotique a donc augmenté de 2,5 fois en 8 jours dans le milieu M17S60. Par la suite, la pression osmotique diminue vers des valeurs proches de la pression initiale (65 mOsmoles) au douzième jour de culture.

D.Conclusion

Le glycérol traverse le plasmalemme, puis le tonoplaste pour gagner la vacuole, par diffusion simple selon les gradients de concentrations ou par diffusion facilitée. La diffusion facilitée du glycérol a été mise en évidence chez les bactéries (Heller *et al.* 1980) et chez les champignons (Visser *et al.* 1988). Une expérience complémentaire nous a permis de conclure que le glycérol pénètre par diffusion facilitée. En effet l'utilisation de cyanure (1 M) ne bloque pas totalement l'entrée du glycérol dans les fragments foliaires de chicorée et nous notons une diminution de l'entrée du saccharose dans les tissus. L'embryogenèse somatique se trouve réduite en présence de cyanure: 6,4 ES mm⁻² de limbe.

Peu de glycérol est métabolisé au sein des tissus foliaires de chicorée. En effet, sur les 480 µL de glycérol, 106 µL disparaissent en 4 jours des 20 mL de milieu M17S60Gly330 où sont incubés les trois fragments de feuille (220 mg de MF au 4^{ème} jour) qui ne renferment que 7,8 µL de glycérol libre. Nous pouvons conclure que 20,4 % du glycérol ajouté au milieu de culture est métabolisé ou lié à d'autres molécules.

C'est le glycérol qui provoque l'élévation importante de la pression osmotique dans les milieux de culture. Comme nous l'avons vu au cours de la première partie de nos résultats, la présence du glycérol n'affecte pas le nombre d'embryons somatiques, mais nous pouvons supposer que la chute de la pression osmotique après le transfert provoque le démarrage de la division des cellules embryogènes. Dans les deux conditions, l'expression des embryons somatiques s'accompagne d'une élévation de la pression osmotique.



II. Devenir du glycérol marqué : Glycérol-¹⁴C



L'utilisation de glycérol-¹⁴C au cours d'une cinétique de l'embryogenèse somatique dans les feuilles de chicorée montre que le glycérol est métabolisé et entre dans la glycolyse (Fig. 27). La distribution des molécules-¹⁴C alcoolosolubles des tissus foliaires est exprimée en pourcentage par rapport à la quantité de molécules marquées totales dosées par CLHP en dpm (Fig. 27A et B). La figure 27C montre un profil type obtenu après extraction des sucres au troisième jour de culture.

Après 24 heures d'incubation 55 % des molécules marquées sont représentées par le glycérol dans les tissus. Une part importante (16 %) du glycérol-¹⁴C est convertie en molécules-¹⁴C inconnues ayant un temps de rétention de 4 min (Fig. 27B et C). Un premier pic est visible sur le chromatogramme en présence et en absence de glycérol et correspond à toutes les molécules que la colonne est incapable de séparer même si elles sont solubles dans l'alcool. Il faut noter qu'une injection de glycérol 3-phosphate pur provoque l'apparition d'un pic à ce niveau. Le second pic enregistré sur le chromatogramme (11,5 min ; Fig. 27C) pourrait correspondre à un produit de dégradation du fructose ou à des molécules phosphatées (G6P et F6P). La colonne utilisée ne sépare pas efficacement les molécules phosphatées par conséquent une analyse plus poussée permettrait de définir la nature exacte de ce(s) sucre(s). Dans les 24 premières heures un quart du glycérol-¹⁴C converti l'est sous forme de saccharose. Le fructose est toujours plus représenté que le glucose au cours de la cinétique. Ces hexoses et le saccharose ne varient pas ou peu et les molécules inconnues augmentent. Pendant les 4 jours de la phase d'induction le glycérol-¹⁴C diminue. Après le transfert dans un milieu M17S60 dépourvu de glycérol, les molécules inconnues sont les plus représentées. Les hexoses marqués disparaissent totalement des fragments au cours du développement des embryons somatiques ainsi que le glycérol libre. Au douzième jour on retrouve donc essentiellement le pic correspondant au glycérol 3-phosphate, un sucre et très peu de saccharose. Le taux de radioactivité diminue au cours de la phase d'expression (Fig. 27A). Il faut souligner qu'aucune molécule-¹⁴C autre que le glycérol-¹⁴C n'est présente dans les milieux de culture au cours de la cinétique d'embryogenèse somatique.

← **Figure 27: Devenir du glycérol-¹⁴C au cours de l'embryogenèse somatique dans les tissus foliaires de chicorée.** A : Radioactivité totale des extraits alcoolosolubles. Chaque valeur est la moyenne de trois observations. B : distribution en pourcentage du total des molécules-¹⁴C (en dpm du glycérol-¹⁴C+ glucose-¹⁴C+ fructose-¹⁴C+ saccharose-¹⁴C+ sucre inconnu-¹⁴C+ autres molécules marquées) dpm, désintégrations par minute). C : Radio chromatogramme des molécules-¹⁴C au 3^{ème} jour de culture.

III. Les enzymes du métabolisme du glycérol

Nous avons vu dans les données bibliographiques que le glycérol pouvait être converti en glycérol 3-phosphate par la glycérol kinase. Ce glycérol 3-phosphate est un carrefour métabolique vers la voie des lipides ou de la glycolyse ou encore de la néoglucogenèse par sa conversion possible en dihydroxyacétone phosphate grâce à la glycérol 3-phosphate deshydrogénase. Le taux de protéines intracellulaires variant très faiblement, nous avons mesuré les activités spécifiques des enzymes.

A. Mesure de l'activité de la glycérol kinase

Les changements d'activité spécifique de la glycérol kinase (EC 2.7.1.30) sont représentés sur la figure 28. Les quatre premiers jours de la phase d'induction sont accompagnés par une forte augmentation de l'activité de la glycérol kinase quand les tissus foliaires sont incubés dans le milieu de culture additionné de glycérol ; elle passe de 4 au moment de la mise en culture à 94 nmol/min/mg de protéines au jour 4. Le transfert provoque une chute de l'activité spécifique de la glycérol kinase (20 nmol/min/mg de protéines au cinquième jour) qui se maintient jusqu'au douzième jour (16 nmol/min/mg de protéines). En absence de glycérol, les valeurs sont faibles et de l'ordre de 15 nmol/min/mg de protéines tout au long du processus.

B. Mesure de l'activité de la glycérol 3-phosphate deshydrogénase

Nous avons choisi d'étudier préférentiellement les voies du métabolisme des sucres pour notre étude du catabolisme du glycérol, les voies métaboliques de la lipidogenèse étant étudiées au laboratoire par ailleurs (Axelle Blanckaert, thèse en cours).

La figure 29 montre l'effet du glycérol sur l'activité de la glycérol 3-phosphate deshydrogénase (EC 1.1.1.8). Pendant les premiers stades de l'embryogenèse dans les tissus foliaires de la chicorée, l'activité spécifique de la glycérol 3-phosphate deshydrogénase reste constante, que les tissus soient cultivés en présence ou en absence de glycérol. Après le transfert dans un milieu d'expression dépourvu de glycérol l'activité spécifique augmente de manière similaire pour les deux conditions jusqu'à atteindre environ 7 nmol/min/mg de protéines.

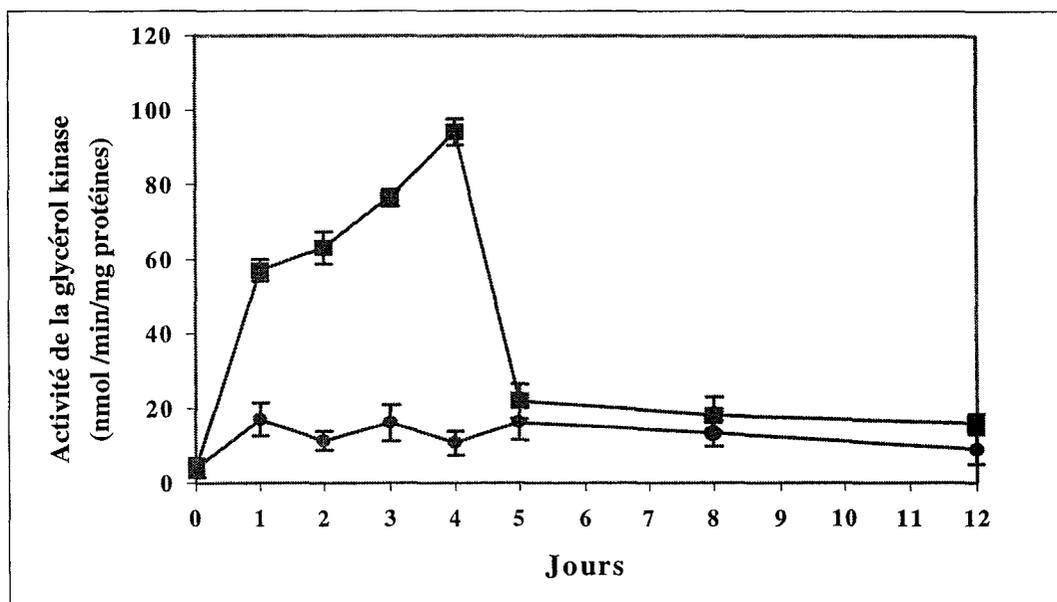


Figure 28 : Changements d'activité de la glycérol kinase au cours de l'embryogenèse somatique des fragments de limbes de chicorée. Les fragments foliaires ont été incubés 4 jours dans le M17S60Gly (■) ou dans le M17S60 (●) et transférés 8 jours dans un milieu dépourvu de glycérol M17S60. Moyennes de 9 fragments par condition et de 3 répétitions indépendantes. Les barres verticales représentent les écarts types.

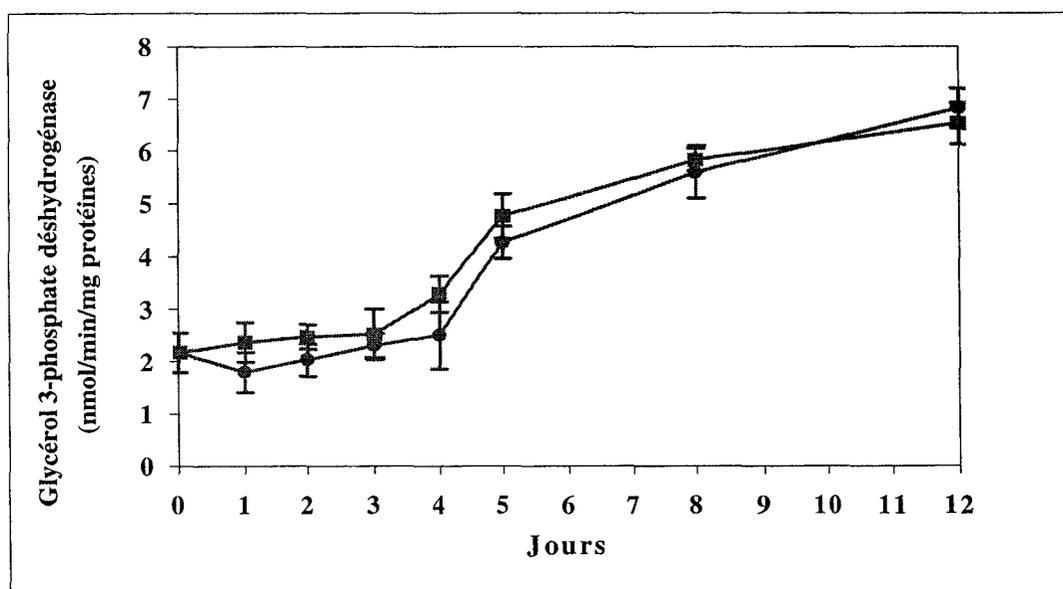


Figure 29 : Activité de la glycérol 3-phosphate déshydrogénase au cours de l'embryogenèse somatique dans des fragments de limbes de chicorée. Les fragments foliaires ont été incubés 4 jours dans le M17S60Gly (■) ou dans le M17S60 (●) et transférés 8 jours dans un milieu dépourvu de glycérol (M17S60). Moyennes de 9 fragments par condition et de 3 répétitions indépendantes. Les barres verticales représentent les écarts types.

C. Conclusion

Nous avons montré que le glycérol pénètre et s'accumule dans les tissus. L'utilisation de glycérol marqué et l'activité importante de la glycérol kinase en présence de glycérol prouvent que du glycérol est métabolisé dans les tissus foliaires au cours de l'embryogenèse somatique.

IV. Etude du métabolisme du glycérol par la RMN

A. Le glycérol et les molécules carbonées

La CLHP ne permet pas de séparer efficacement les molécules phosphatées; une étude par RMN permet à la fois de visualiser ces molécules ainsi que les molécules carbonées de types glucidique et lipidique.

Des fragments foliaires de chicorée hybride "474" sont cultivés 3 jours dans le milieu d'induction M17S60 additionné ou non de glycérol. Des extraits perchloriques des feuilles (8 g) sont analysés grâce à la RMN du ^{13}C . Les spectres obtenus sont visibles sur la figure 30. Pour une observation plus aisée, des agrandissements des zones d'intérêt (encadrement) sont consignés sur la figure 31.

Le glycérol est repérable facilement par ses deux résonances à 63,4 ppm et à 72,9 ppm correspondant respectivement aux $\text{C}_1 + \text{C}_3$ et au C_2 , la seconde raie représentant la moitié de la première (Fig. 30B). En absence de glycérol dans le milieu de culture sa présence est indétectable dans les fragments (Fig. 30A).

La figure 31 montre que la glutamine est l'acide aminé le plus représenté et en quantité égale quelle que soit la condition étudiée. On peut souligner l'absence d'alanine lorsque les tissus sont cultivés en présence de glycérol. On peut facilement identifier le saccharose qui possède 12 carbones visibles sous la forme de 12 raies (Fig. 31A et B) ainsi que les hexoses : glucose et fructose

Figure 30 : Spectres de RMN du ^{13}C obtenus à partir d'extraits perchloriques de tissus foliaires de chicorée "474". Les tissus foliaires sont incubés 3 jours dans le milieu M17S60 (A) ou le milieu M17S60Gly330 (B) avant extraction. Gln, glutamine ; GLY, glycérol ; ppm, partie par million.

Figure 31 : Agrandissement des zones spectrales de la figure 26. Ala, alanine ; F, fructose ; G, glucose ; Gln, glutamine ; GLY, glycérol ; S, saccharose ; X, composé inconnu. ppm, partie par million.

Figure 30

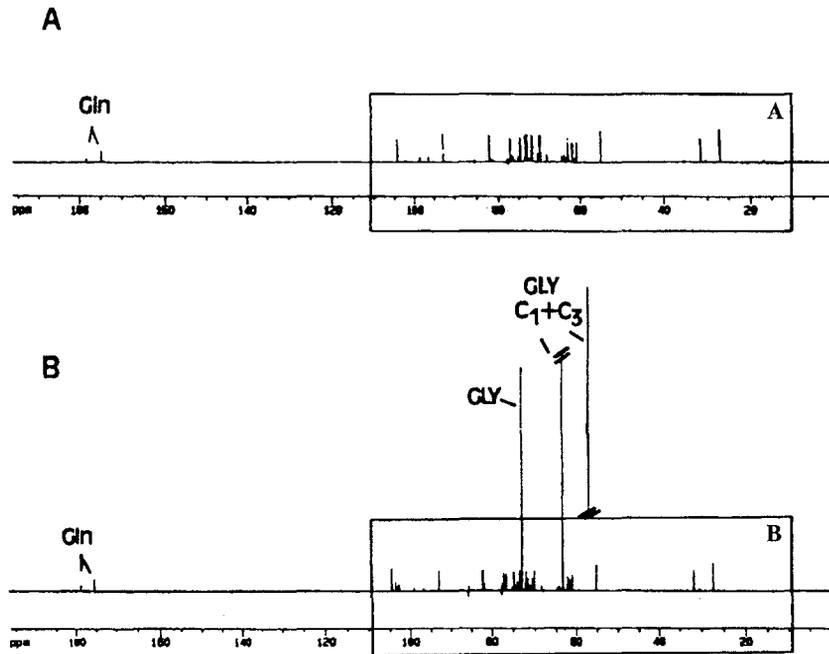
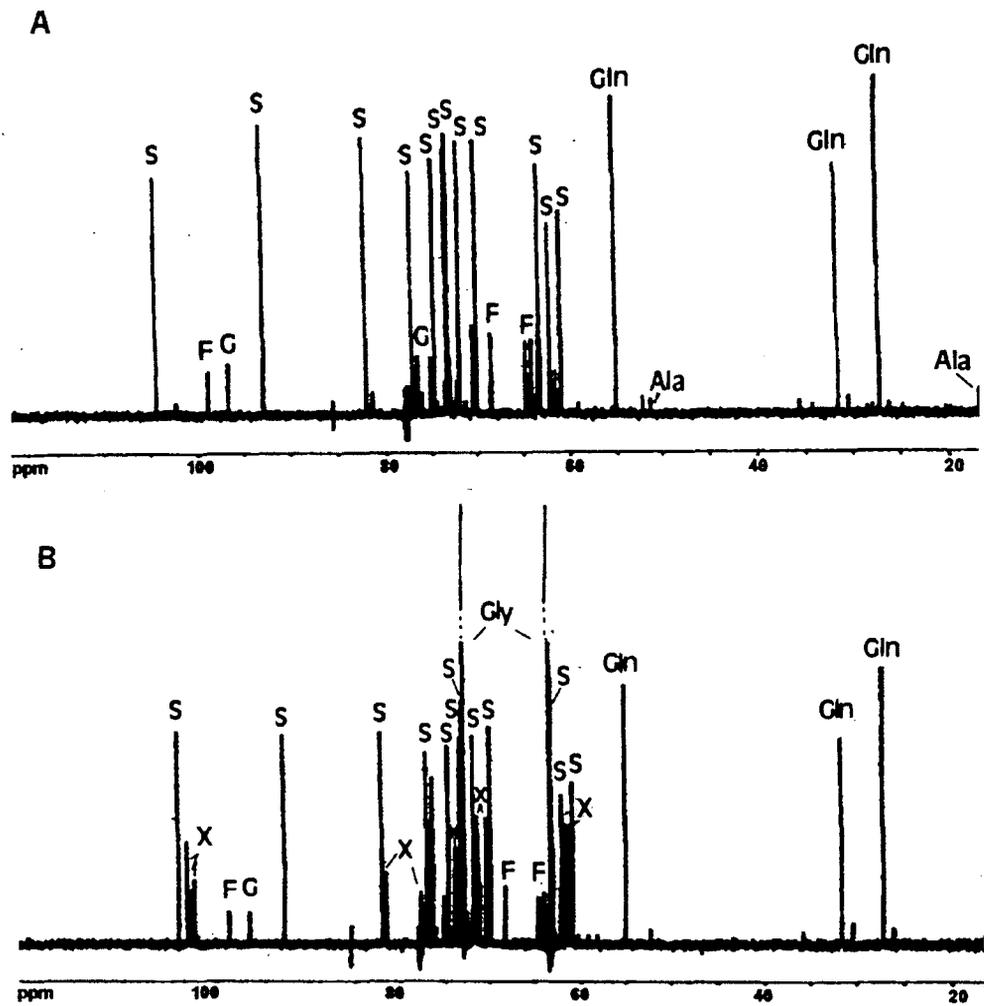


Figure 31



B. La phosphorylation du glycérol et les molécules phosphatées

La phosphorylation du glycérol en glycérol 3-phosphate par la glycérol kinase est analysée par la RMN au ^{31}P (figures 32 et 33).

Les profils obtenus sont typiques des analyses au ^{31}P . En effet, on note la présence d'UDP-glucose (-11, -12 ppm) ; celui-ci est précurseur du saccharose en s'associant au fructose. Les trois phosphodiester principaux (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol) sont également présents et dans des proportions identiques dans les deux conditions (à 0 et 1 ppm ; Fig. 32). Les différences remarquables se situent à 2,5 ppm. En effet on peut voir qu'en présence de glycérol, le phosphate inorganique dans les tissus foliaires représente un tiers de la quantité analysée dans les fragments cultivés dans le milieu d'induction sans glycérol. Ceci s'explique sans doute par la concentration massive de glycérol 3-phosphate dans les feuilles de chicorée (figure 33B).

En ce qui concerne les sucres, on peut souligner l'absence de mannose et de fructose 6-phosphate dans les limbes cultivés sur glycérol (figure 33A). Mais aussi, une quantité deux fois moins importante de glucose 6-phosphate comparativement à la condition sans glycérol (Fig. 33A et B).

Figure 32 : Spectres de RMN du ^{31}P d'extraits perchloriques de tissus foliaires de chicorée "474". Les limbes sont cultivés 3 jours dans le milieu M17S60 (A) ou le milieu M17S60Gly330 (B) avant extraction. Pi, phosphate inorganique ; GPE, glycérylphosphoryléthanolamine ; GPI, glycérylphosphorylinositol ; GPC, glycérylphosphorylcholine ; UDP-G, UDP-glucose. Ppm, partie par million.

Figure 33 : Agrandissements des zones spectrales d'intérêt de la figure 32. F6-P, fructose 6-phosphate ; G6-P, glucose 6-phosphate ; GLY 3-P, glycérol 3-phosphate ; M, mannose ; P-choline, Phosphoryl choline.

Figure 32

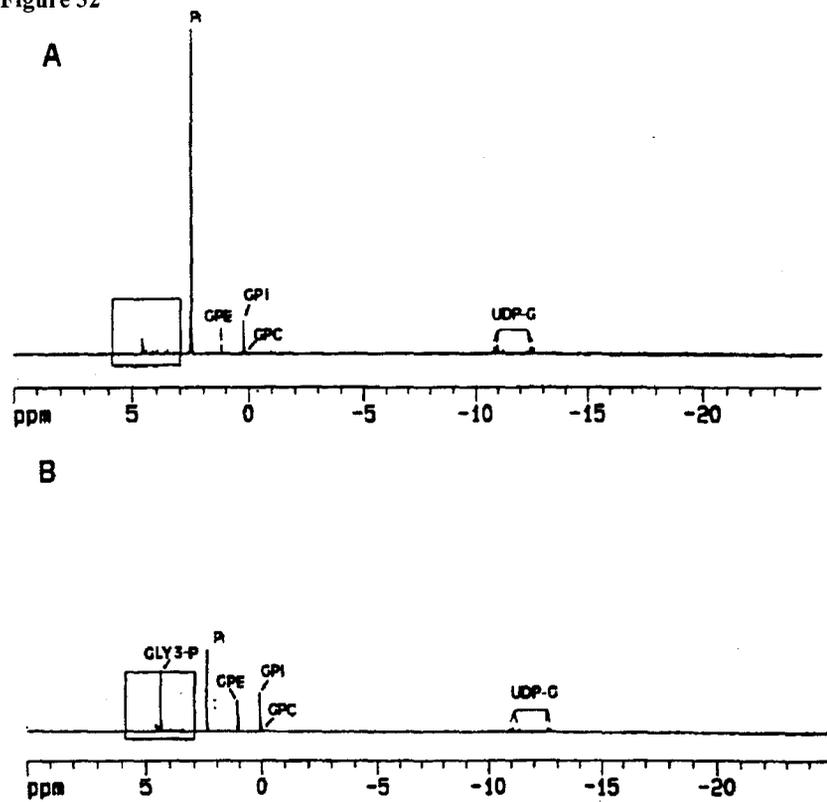
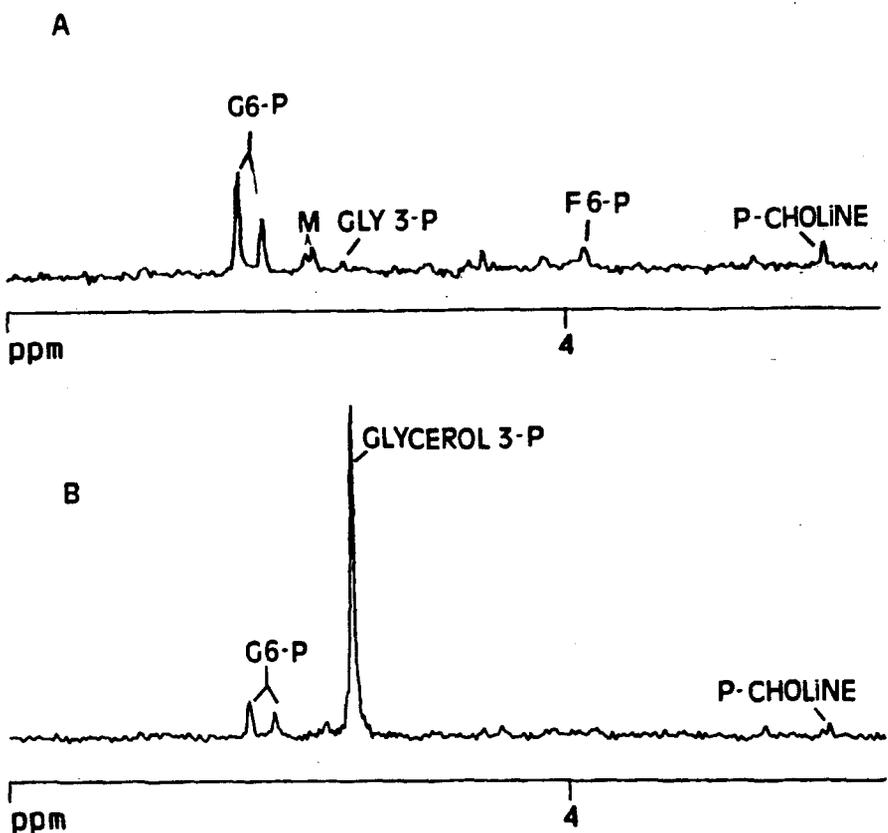


Figure 33



C.Conclusion

La chute du pool des hexoses phosphate pourrait s'expliquer chez la chicorée comme dans le cas des cellules d'érable où de fortes concentrations en glycérol 3-phosphate inhibent la glucose 6-phosphate isomérase (Aubert *et al.*, 1994)). Les auteurs démontrent alors une absence de néoglucogénèse en présence de glycérol comme seule source carbonée. On peut alors s'interroger sur l'inhibition de cette enzyme dans les feuilles de chicorée. Le fructose marqué décelé par CLHP ne peut provenir que de la néoglucogénèse. Le glucose marqué quant à lui ne peut provenir que du fructose 6-phosphate marqué. Par conséquent cette réaction démontre un fonctionnement de la glucose 6-phosphate isomérase et une néoglucogénèse dans les feuilles de chicorée (Fig. 34).

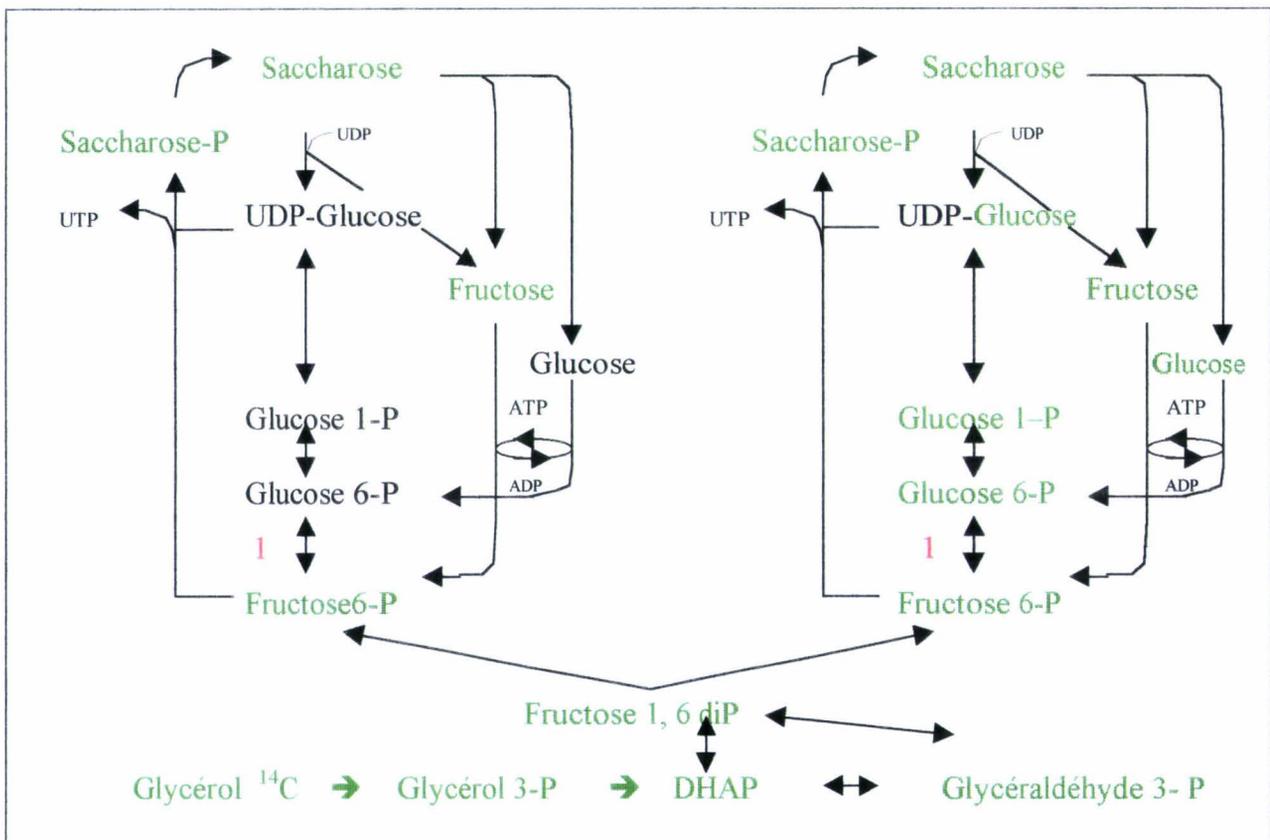


Figure 34: Marquage par le ^{14}C des molécules provenant du glycérol. En vert sont présentées les molécules marquées, le glycérol est marqué sur les 3 carbones. DiP, diphosphate.

1 : glucose 6- phosphate isomérase

V. Un autre effet du glycérol: l'accumulation intratissulaire d'un oligosaccharide

A. Détection par CLHP

1. Mise en évidence.

Les profils CLHP obtenus après injection d'extraits de feuilles de chicorée incubées dans un milieu enrichi en glycérol (M17S60Gly330) ou dépourvu de glycérol (M17S60) au cours de l'embryogenèse somatique, nous ont permis de mettre en évidence un composé jusqu'alors inconnu. En effet, nous montrons la présence d'un pic supplémentaire lorsque les tissus sont cultivés en présence de glycérol (Fig. 35). Les molécules sont caractérisées par leur temps de rétention par la colonne. Pour ce composé le temps de rétention se situe entre 7min45s et 8min15s.

2. Quantification

Nous avons quantifié ce composé à partir de l'inositol (témoin interne de l'appareil) et la cinétique des concentrations est représentée sur la figure 36.

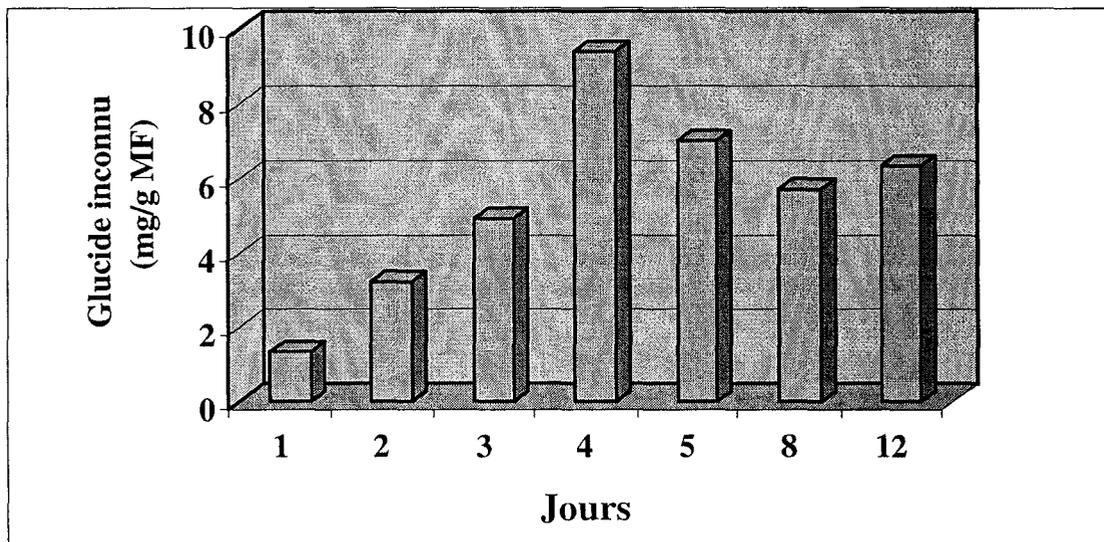


Figure 36: Accumulation du sucre inconnu au cours de l'embryogenèse somatique dans les tissus foliaires de chicorée "474". Les valeurs sont établies à partir d'un témoin interne le sorbitol à $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ puis rapporté à la masse de matière fraîche. Les résultats sont les moyennes de trois répétitions indépendantes.

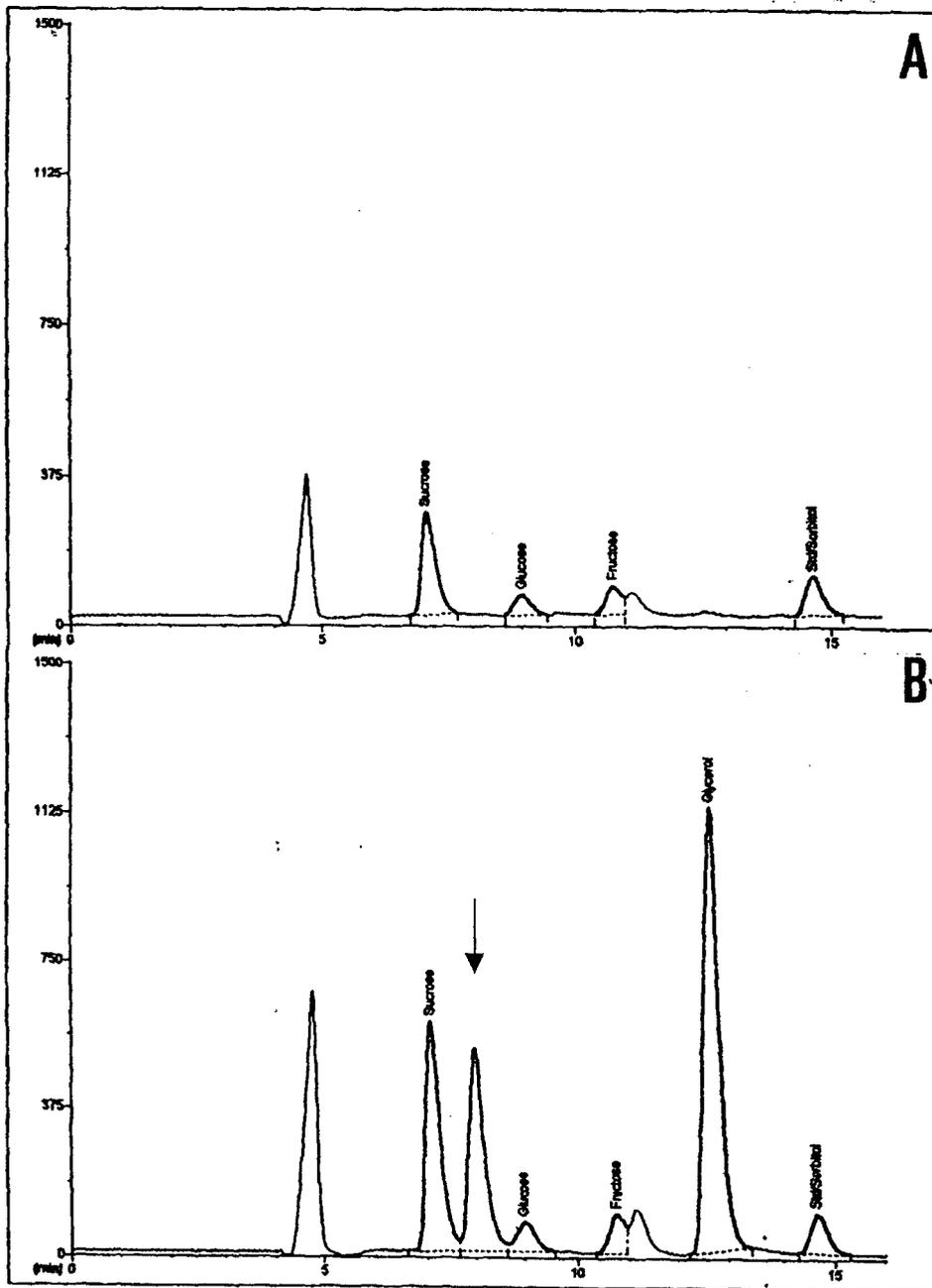


Figure 35 : Analyse par CPLH des molécules alcooliques solubles présents dans les fragments foliaires d'une chicorée embryogène cultivée *in vitro*. Les fragments ont été cultivés 3 jours sur milieu M17S60 (A) ou M17S60Gly 330 (B). Profil CLHP obtenu après injection de 20 μ L d'extrait. Flèche = apparition d'un nouveau composé.

Dans les tissus non induits, le composé X n'est pas détectable. La phase d'induction de l'embryogenèse somatique est caractérisée par la présence du composé après le premier jour de culture (environ 1,5 mg g⁻¹ de MF) puis, par l'accroissement de sa teneur jusqu'au quatrième jour (9,1 mg g⁻¹MF). Après transfert sur milieu neuf dépourvu de glycérol, la teneur reste élevée (6,5 ± 1 mg g⁻¹MF) jusqu'à la fin de la culture.

B. Détection en RMN et quantification

Ce composé inconnu est détectable en RMN, les spectres présentés sur la figure 31B montrent la présence de raies supplémentaires notées X. Ces raies sont visibles aux déplacements chimiques suivants : 62.13, 63.34, 71.5, 71.9, 73.43, 73.8, 102.66, 103.19 et 104.4. D'autre part la RMN peut donner une approximation de la molarité de la solution analysée. Au 3^{ème} jour de la culture, nous estimons qu'il y a 10 à 15 mM de ce composé inconnu.

C. Conclusion

Ces deux types de mise en évidence et de quantifications (4,93 g L⁻¹ par CLHP et 15 μmol g⁻¹MF par RMN) nous permettent de donner une estimation de la masse molaire de ce composé établie au troisième jour de l'induction des embryons somatiques : 329 g mol⁻¹. D'après la figure 27 le glycérol (ou un produit de son métabolisme) entrerait dans la composition de cette molécule puisque qu'elle est marquée. Hellebust (1976) rapporte que certaines algues telles que *Porphyra* ou *Ochromonas* synthétisent des hétérodimères de galactose et de glycérol comme osmorégulateur. Cette molécule est le O-α-galactopyranosyl-(1-1)-glycérol. Dans ce cas, le groupement aldéhyde du galactose réagit avec le groupement hydroxyle du carbone 1 du glycérol, mais la masse moléculaire de ce dimère (254) semble un peu faible par rapport à notre estimation. Ce résultat nous a amené à étudier la fonction alcool du glycérol. Nous avons incubé des fragments foliaires de chicorée en présence d'éthylène glycol et d'éthanol. Ces deux alcools pénètrent dans les tissus par diffusion facilitée et l'éthylène glycol peut emprunter des canaux membranaires (Chrispeels et Maurel, 1994). Le composé est présent et s'accumule au cours de la phase d'induction principalement comme dans le cas de la condition avec glycérol. C'est donc par sa fonction alcool que le glycérol agit au niveau de la synthèse de cette molécule. Ce composé a été découvert également sur des suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus*

cultivées en présence de glycérol (Aubert, 1994). L'auteur démontre que la molécule n'est synthétisée qu'après un apport initial de saccharose ou d'une autre source carbonée glucidique.

VI. Le métabolisme du glycérol chez la chicorée Flash non embryogène

A. Evolution du glycérol

Les fragments foliaires de chicorée non embryogène Flash, sont cultivées dans les mêmes conditions que l'hybride "474". La figure 37 présente l'évolution du glycérol dosé par CLHP dans les milieux de culture et dans les fragments foliaires dans lesquels ils ont été incubés. Nous notons qu'aucune trace de glycérol n'est décelée dans les milieux d'induction et d'expression M17S60 dépourvu de glycérol ainsi que dans les limbes de la variété Flash.

Nous pouvons observer que la concentration en glycérol diminue lentement du milieu de culture M17S60Gly330 au cours de la phase d'induction. Au quatrième jour 7 % du glycérol initialement ajouté a disparu (Fig. 37A). Au cours de la phase d'expression, le glycérol n'est plus détecté.

Le glycérol pénètre dans les explants foliaires de la chicorée non embryogène. Au quatrième jour nous détectons une teneur en glycérol de 317 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. Après le transfert sur milieu dépourvu de glycérol, nous décelons le polyol : 24 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF au huitième jour de culture.

Ainsi au quatrième jour de culture seulement 3,1 % du glycérol est métabolisé au sein des tissus foliaires de la chicorée Flash contre 20,4 % pour la chicorée "474". La différence majeure réside dans la présence de glycérol intratissulaire seulement chez la chicorée non embryogène après transfert sur milieu M17S60

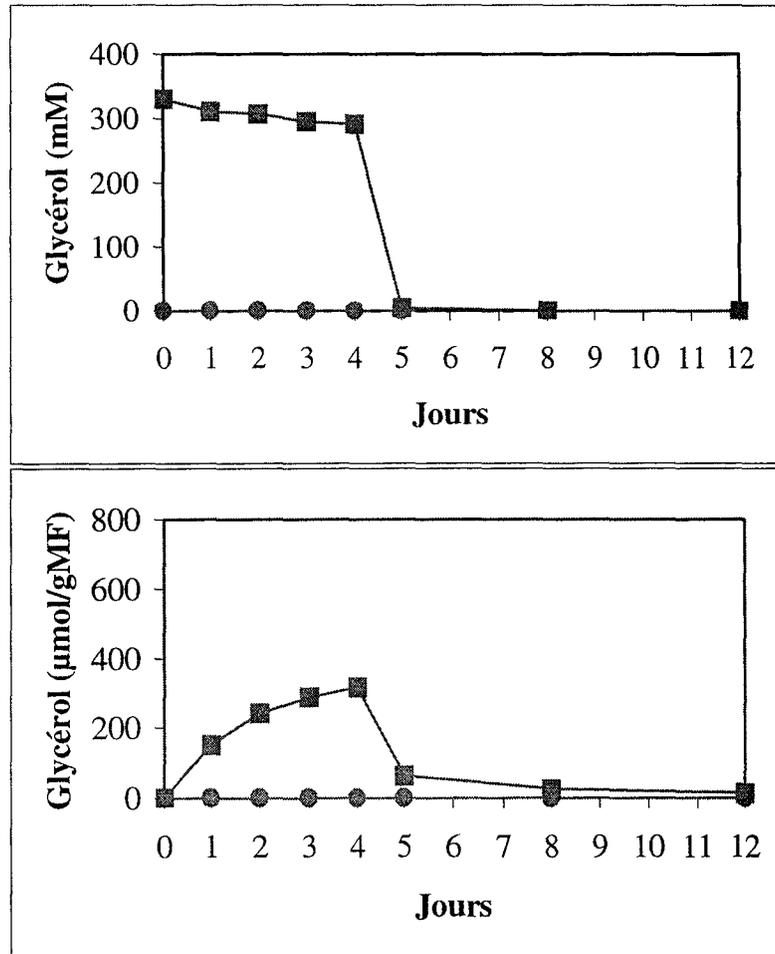


Figure 37 : Evolution de la teneur en glycérol dans les milieux de culture (A) et dans les fragments foliaires de la chicorée non embryogène Flash.

Les tissus foliaires sont incubés 4 jours dans les milieux M17S60Gly (■) ou dans le M17S60 (●) puis transférés 8 jours sur M17S60. Moyennes de 3x3 répétitions de 3 cultures indépendantes.

B. Conclusion

Le métabolisme du glycérol au sein des tissus embryogènes est six fois supérieur par rapport aux explants non embryogènes. Les teneurs élevées enregistrées après le transfert traduisent une baisse du catabolisme du glycérol. L'absence de cellules embryogènes et de structures embryonnaires chez la variété Flash laisse supposer que les tissus n'utilisent pas ou peu les métabolites carbonés dérivés du glycérol comme c'est le

cas pour produire l'énergie nécessaire à l'induction et au développement des cellules vers un processus embryogène.

C. Le produit X chez Flash

La figure 38 montre un profil CLHP obtenu au troisième jour de culture dans les tissus foliaires de chicorée Flash. Nous pouvons constater la présence du composé X précédemment étudié. Cette molécule ne peut donc pas être assimilée à un marqueur de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Sa présence pourrait toutefois expliquer l'inhibition partielle de l'embryogenèse somatique chez la chicorée "474", par exemple en se fixant aux tubulines ou encore en bloquant un système enzymatique nécessaire au déroulement de l'embryogenèse.

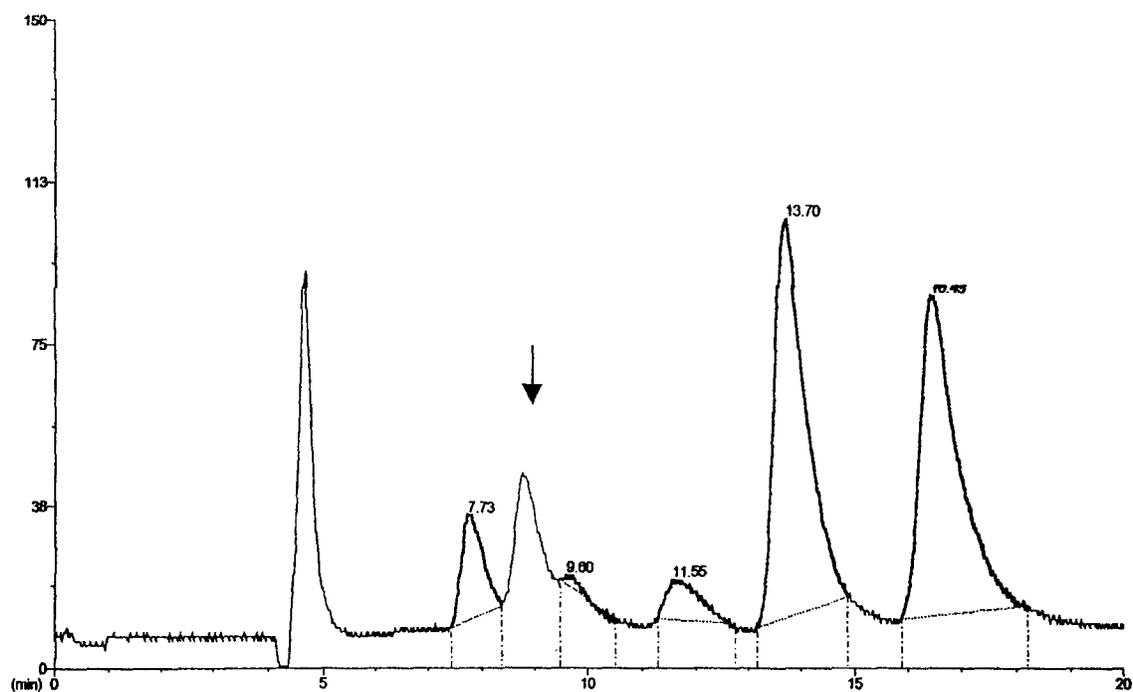


Figure 38 : Analyse par CPLH des molécules alcooliques solubles présentes dans les fragments foliaires d'une chicorée non embryogène cultivée *in vitro*. Les fragments ont été cultivés 3 jours sur milieu M17S60Gly 330. Profil. Flèche = apparition d'un nouveau composé.

Résultats

Partie III

TROISIEME PARTIE

Effet du glycérol sur le métabolisme carboné

Nous avons vu précédemment que le glycérol seul ne permet pas d'obtenir des embryons somatiques (Première partie, §VIB), bien qu'il puisse être converti en saccharose (Deuxième partie). Nous nous proposons maintenant d'analyser l'influence du glycérol sur le métabolisme carboné au cours de l'embryogenèse somatique.

I. Interaction du glycérol avec le métabolisme des sucres

A. Dans les milieux de culture

Les fragments foliaires sont incubés dans le milieu M17S60 ou dans le milieu M17S60 additionné de 330 mM de glycérol et transférés au quatrième jour de la culture embryogène sur un milieu d'expression dépourvu de glycérol pendant 8 jours. Les sucres alcooliques solubles sont analysés par HPLC. La figure 39 montre les résultats des dosages obtenus.

Dans la condition sans glycérol un tiers de la concentration en saccharose initialement de 60 mM est retrouvée dans le milieu de culture au quatrième jour. Après le transfert dans un milieu neuf M17S60, le saccharose est rapidement métabolisé et disparaît au neuvième jour de la culture embryogène (Fig. 39B). Les teneurs en hexoses, faibles au cours des deux premiers jours de la phase d'induction, augmentent fortement pour atteindre 35 mM au moment du transfert. Le glucose et le fructose augmentent lentement et régulièrement jusqu'à la fin de la phase d'expression des embryons somatiques.

La concentration en saccharose diminue plus lentement lorsque les feuilles de chicorée sont incubées dans le milieu contenant du glycérol (Fig. 39A) et avant le transfert sur milieu M17S60 on détecte encore 35 mM de saccharose. Au cours de la seconde phase le profil est sensiblement identique à la condition témoin. Le glucose et le fructose augmentent de manière concomitante et d'abord très lentement au cours de la phase d'induction. Au quatrième jour de la phase embryogène, leurs teneurs sont voisines de 10 mM, soit un quart de celles observées en absence de glycérol. Au-delà du sixième jour les teneurs en hexoses augmentent plus nettement et suivent un profil similaire à la condition sans glycérol.

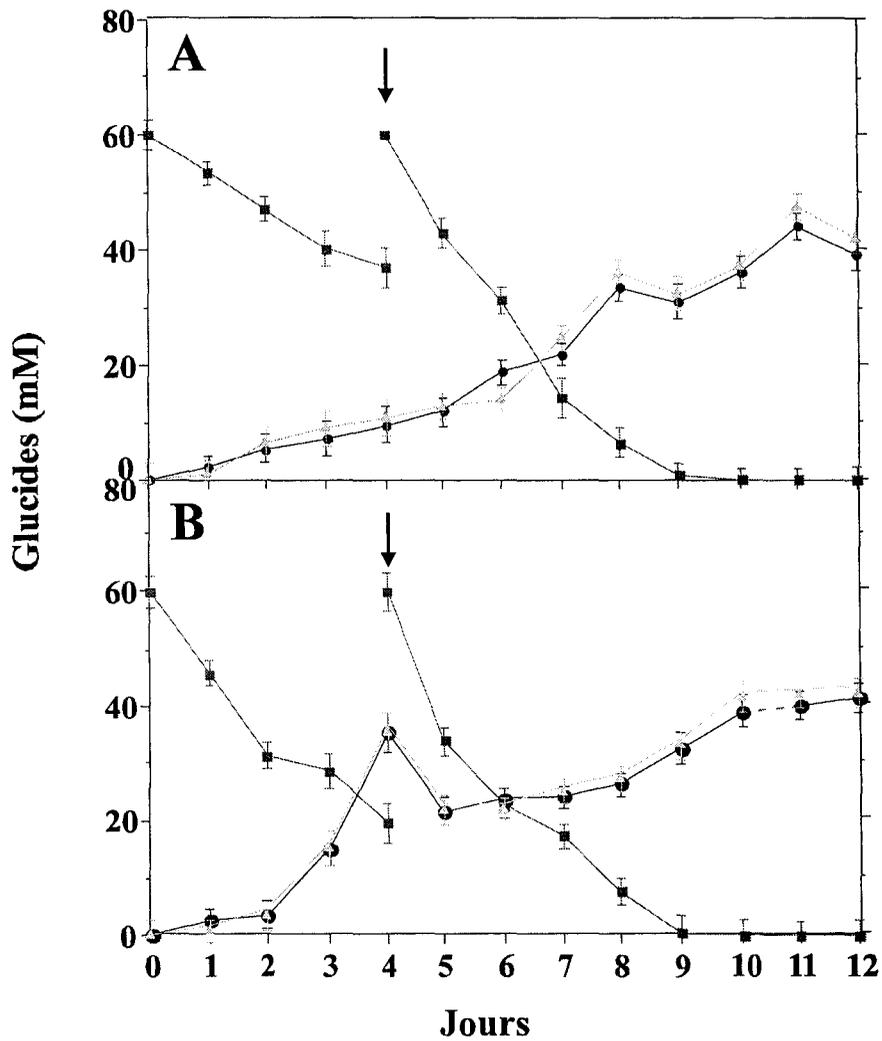


Figure 39 : Evolution du taux de saccharose (■), de glucose (●) et de fructose (◐) dans les milieux de culture des fragments foliaires de chicorée "474" au cours de l'embryogenèse somatique. Incubation de 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 (A) ou M17S60 (B) puis transfert (Flèche) pendant 8 jours dans le milieu M17S60. Moyenne (\pm écart type) de 3 cultures de 3 répétitions indépendantes.

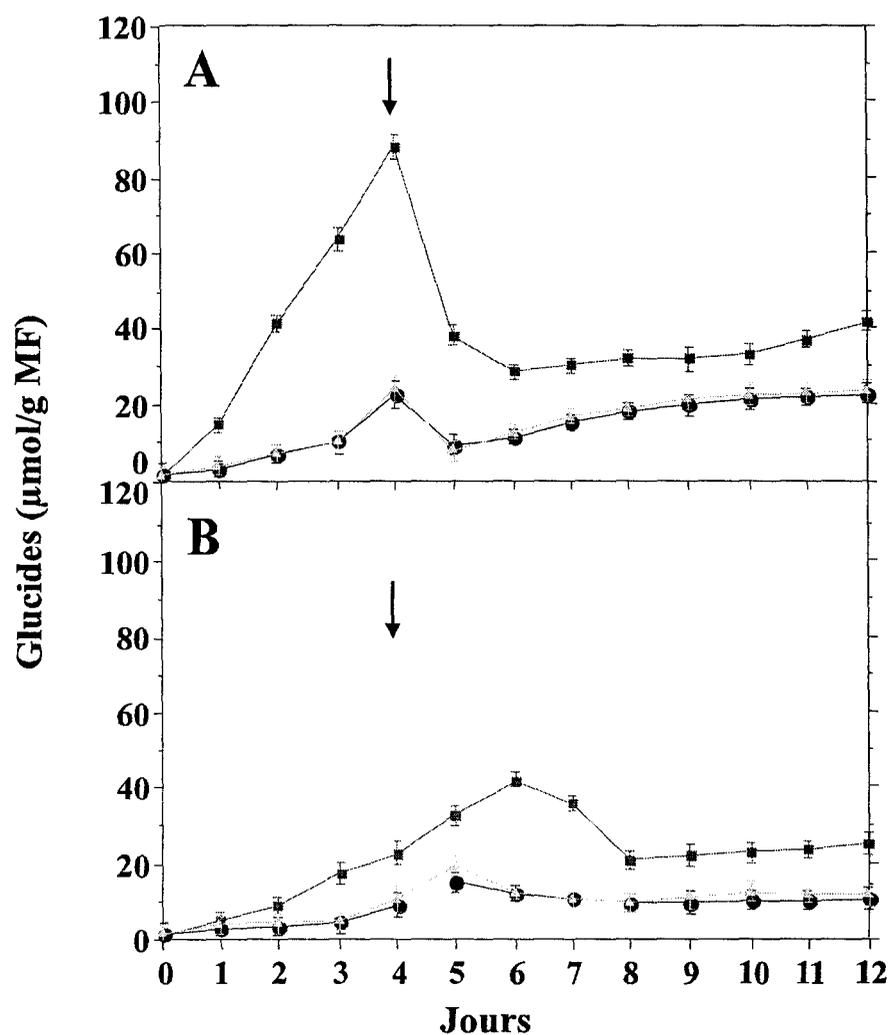


Figure 40 : Evolution du taux de saccharose (■), glucose (●) et fructose (△) dans les fragments foliaires de chicorée "474" au cours de l'embryogenèse somatique. Incubation de 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 (A) ou M17S60 (B) puis transfert (Flèche) pendant 8 jours dans le milieu M17S60. Moyenne (\pm erreur standard) de 3 cultures de 3 répétitions indépendantes.

B. Dans les tissus foliaires

Les sucres sont en très faibles quantités, voisines de $1,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF au moment de la mise en culture. En présence de glycérol dans le milieu, le saccharose s'accumule fortement dans les tissus foliaires jusqu'au quatrième jour où il atteint une concentration de $89 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF (Fig. 40A). Au-delà du transfert, on observe un plateau à des concentrations de l'ordre de $30 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF. Dans la condition sans glycérol en revanche, la concentration en saccharose augmente très faiblement. Avant le transfert on ne mesure que $19 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF (Fig. 40B), soit 5 fois moins que dans la condition avec glycérol. Le saccharose s'accumule jusqu'au sixième jour ($42 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF) puis diminue nettement jusqu'au huitième jour pour se stabiliser jusqu'à la fin de la culture ($20 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF).

Au cours de la phase d'induction des embryons somatiques, les teneurs en glucose et fructose sont deux fois plus élevées en présence de glycérol (Fig. 40A et B). Après le transfert, les hexoses augmentent encore faiblement dans les feuilles pré cultivées en présence de glycérol : $20 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF à la fin de la culture embryogène (Fig. 40A). Dans la condition sans glycérol, les concentrations en fructose et en glucose restent plus faibles au cours de l'expression des embryons somatiques (environ $10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF).

II. Effet du glycérol sur les activités de l'invertase

Les observations précédentes concernant les effets du glycérol sur les sucres, nous ont amenés à étudier l'enzyme impliquée dans le catabolisme du saccharose : l'invertase (EC 3.2.1.26). Il existe trois formes de l'invertase, définies par leur pH optimum et leur localisation au sein de la cellule ; les invertases acides sont pariétales ou vacuolaires et l'invertase neutre est cytoplasmique. Compte tenu des différentes propriétés des invertases, les activités ont été mesurées dans les fractions solubles et dans les fractions pariétales à différents pH.

Les activités sont données en $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines ou en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines. Le taux de protéines totales n'évoluant que très faiblement au cours de la cinétique de la culture embryogène.

Les activités des invertases acides sont mesurées à pH 4,5 et ceci quelle que soit la fraction donnent des valeurs inférieures à $1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéines. Des résultats similaires sont obtenus lorsque la mesure est effectuée à pH 7,5 pour l'enzyme neutre.

A.Effet du glycérol sur l'activité de l'invertase neutre cytoplasmique

La figure 41 présente l'activité de l'invertase neutre au cours de l'embryogenèse somatique dans les tissus foliaires de chicorée. Au moment du prélèvement des explantats, l'activité invertasique est faible : $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines. Après la mise en culture, on enregistre toujours une forte augmentation des activités. Au cours de la phase d'induction sur milieu sans glycérol, l'activité invertasique diminue pour atteindre $17,4 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéines au quatrième jour. Après le transfert des feuilles sur milieu neuf, on note un accroissement continu de l'activité jusqu'à la fin de la culture ($27,5 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéines au quatrième jour). En présence de glycérol, l'activité qui a augmenté brusquement au début de l'induction reste élevée jusqu'au troisième jour puis décline au moment du transfert pour augmenter à nouveau jusqu'à la fin de la culture.

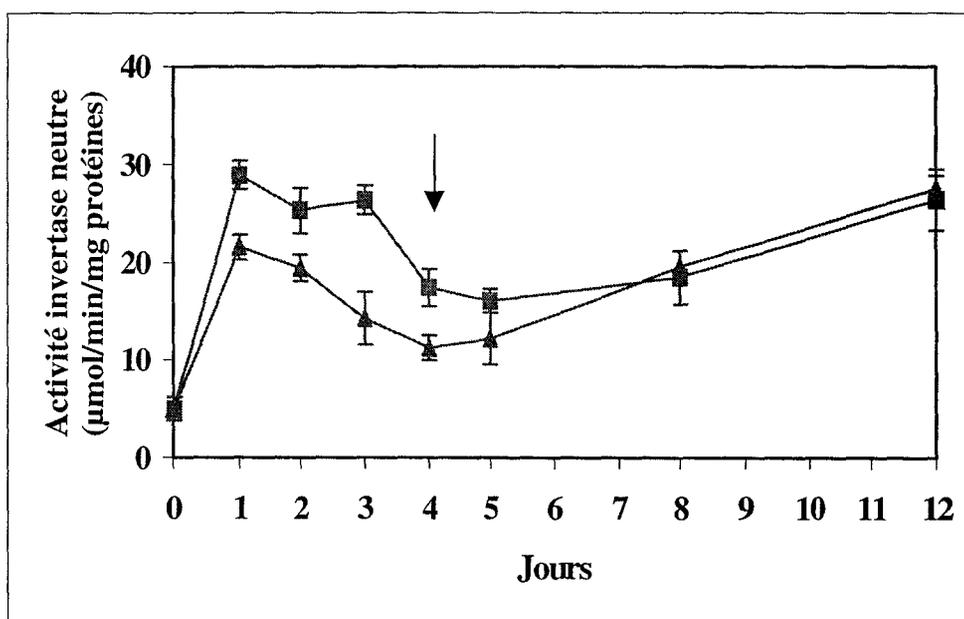


Figure 41 : Activité invertasique neutre mesurée dans les fragments foliaires de chicorée "474". Les limbes sont incubés 4 jours dans le M17S60 (Δ) ou le M17S60Gly330 (■) puis transférés (Flèche) 8 jours sur milieu dépourvu de glycérol.

B. Effet du glycérol sur les activités des invertases acides

1. Mesure de l'activité invertasique vacuolaire

Les profils des activités obtenus dans les deux conditions sont semblables jusqu'au douzième jour de culture (Fig. 42). A partir du premier jour de culture, l'activité de l'invertase acide soluble augmente pour atteindre $22,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines au sixième jour de culture dans la condition sans glycérol, celle-ci décroît progressivement jusqu'à la fin de la culture. Lorsque les tissus foliaires sont incubés dans le milieu de base additionné de glycérol, l'activité spécifique augmente jusqu'à $20,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines le jour suivant le transfert sur milieu d'expression. Après le cinquième jour dans le milieu d'expression on note une diminution de l'activité de l'invertase acide soluble et ceci quelle que soit la condition.

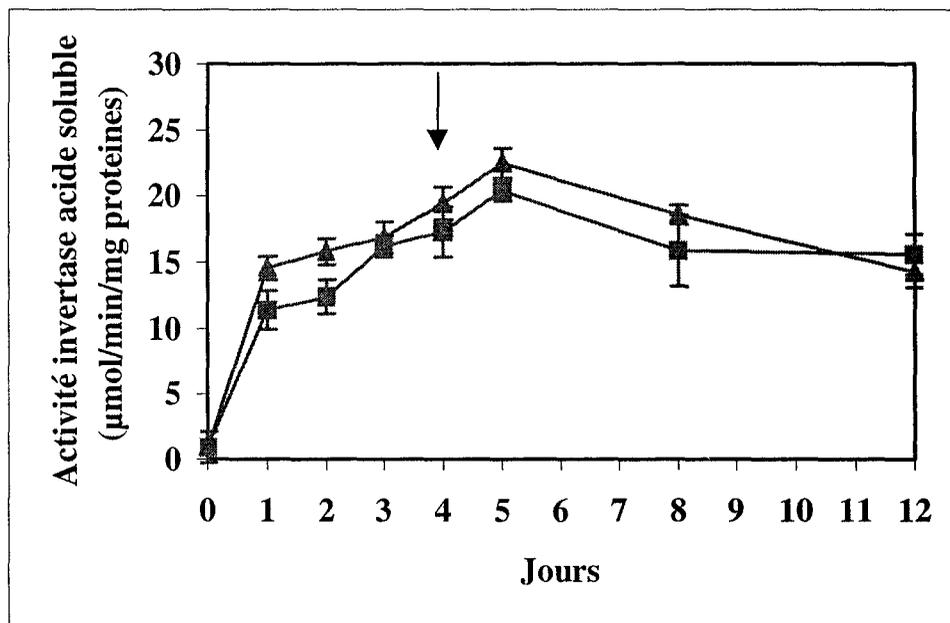


Figure 42 : Activité invertasique acide et soluble mesurée dans les fragments foliaires de chicorée "474". Les limbes sont incubés 4 jours dans le M17S60 (Δ) ou le M17S60Gly330 (■) puis transférés (Flèche) 8 jours sur milieu dépourvu de glycérol.

2.Mesure de l'activité invertasique pariétale

La figure 43 montre l'activité de l'invertase acide insoluble. Dans les deux conditions, une très forte augmentation au premier jour de l'embryogenèse (environ $95 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines), traduit une réponse au stress de la mise en culture. Au-delà de ce point les profils obtenus sont différents. En effet, en absence de glycérol au cours de l'induction des embryons somatiques, l'activité est élevée et supérieure à $90 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines. Après un jour de transfert sur milieu frais, l'activité invertasique diminue fortement et atteint $19,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines au jour 12. La présence du glycérol au cours de la phase d'induction de l'embryogenèse provoque au contraire une chute de l'activité dès le second jour de la mise en culture ($40 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines) voire une inhibition totale de l'activité de l'enzyme au troisième jour. L'activité de l'invertase reprend faiblement au quatrième jour puis plus nettement au-delà du transfert dans le milieu M17S60 (les valeurs sont supérieures à $45 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines) pour diminuer ensuite.

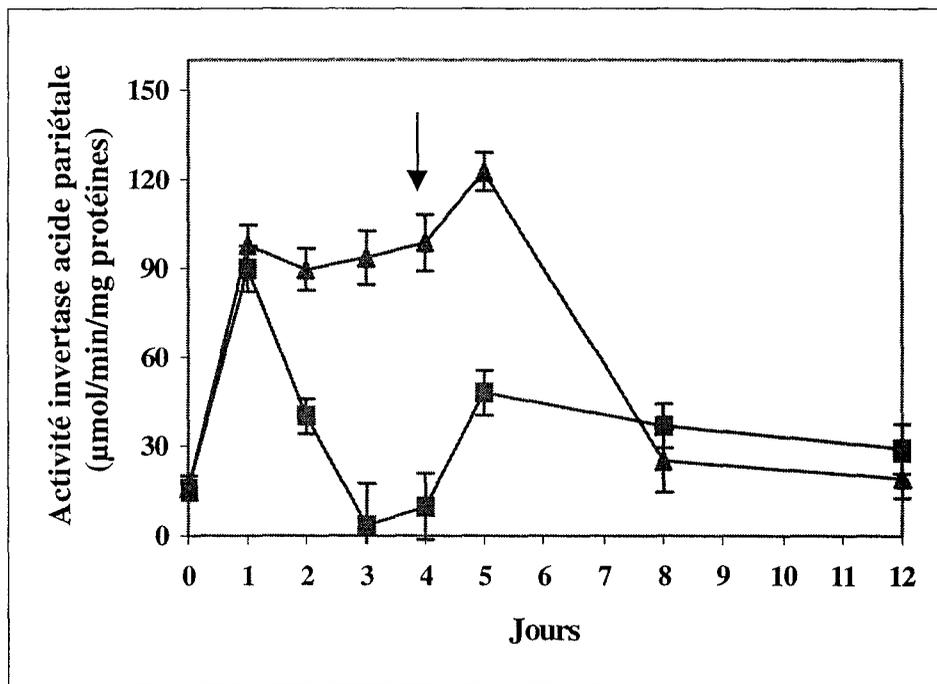


Figure 43 : Activité de l'invertase acide et pariétale mesurée dans les fragments foliaires de chicorée "474". Les limbes sont incubés 4 jours dans le M17S60 (Δ) ou le M17S60Gly330 (■) puis transférés (Flèche) 8 jours sur milieu dépourvu de glycérol.

C.Conclusion

Nous avons montré que le glycérol perturbait fortement le métabolisme du saccharose dans les tissus foliaires. Le saccharose s'accumule dans les tissus au cours de la phase d'induction. Le métabolisme est repris après le transfert des feuilles sur un milieu dépourvu de glycérol. Ceci nous a amené à montrer que les invertases intra cellulaires ne sont pas modifiées en présence de glycérol, mais qu'en revanche l'invertase acide pariétale est inhibée au cours de la phase d'induction. Nous avons montré que l'induction de l'embryogenèse somatique chez la chicorée était caractérisée par une augmentation de l'activité des invertases acides et une diminution de l'invertase neutre. La phase d'expression montre au contraire que l'invertase cytoplasmique neutre est très active et que les invertases acides ont une activité décroissante. Le blocage de l'activité de l'invertase acide pariétale ne semble pas définitif et le glycérol n'est plus limitant dès le quatrième jour. Nous allons dans la suite de ce chapitre nous intéresser plus spécifiquement à l'invertase acide pariétale.

III.Etude de l'effet du glycérol sur l'invertase acide pariétale

A.Purification et révélation par Western blot

1.Purification de la protéine

La protéine a été partiellement purifiée dans le but d'être séquencée, la digestion trypsique devant nous permettre d'obtenir des séquences peptidiques afin de déterminer des amorces dégénérées en vue d'une amplification par PCR. L'invertase pariétale acide a été extraite des feuilles entières de chicorée "474" cultivées en serre. Le matériel est broyé, homogénéisé et la fraction pariétale est purifiée par utilisation successive de précipitation à l'ammonium sulfate, par chromatographie sur con A-Sepharose et sur colonne échangeuse d'anions. Les activités enzymatiques sont mesurées pour chaque fraction. La purification est résumée dans le tableau 16. La protéine a été purifiée 28,85 fois avec une activité spécifique retrouvée de 85,9 U mg⁻¹ de protéines.

	Activité spécifique (U/mg de protéines)	Facteur de purification	Activité totale	Rendement %
Extrait brut	2,92	1	3700	100
Précipitation au (NH₄)₂SO₄, 70 %	9.46	3.23	1087	29.37
Con A-Sepharose	76.38	26.15	152.77	4.12
DEAE-Sepharose	85.9	28.85	98.93	2.78

Tableau 16: Etapes de purification de l'invertase acide pariétale

Chaque fraction protéique active ainsi purifiée a été soumise à une électrophorèse en SDS puis colorée à l'argent ou au bleu de Coomassie pour le séquençage (Fig. 44). Les fractions purifiées présentent plusieurs bandes polypeptidiques dont une très large à 68 kD. Le séquençage de la protéine n'a pas abouti en revanche la protéine qui présente une large bande est reconnue par un anticorps dirigé contre l'invertase acide pariétale de carotte (Sturm, 1990 ; Fig. 45).

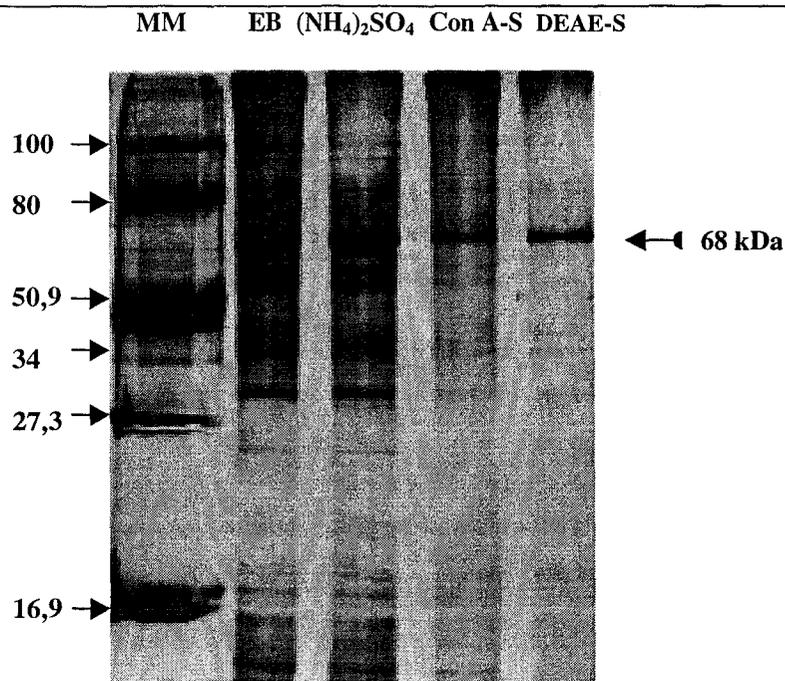


Figure 44 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des différentes fractions purifiées de l'invertase de chicorée. MM = Marqueur moléculaire (kDa), Phosphorylase B, 100 ; BSA, 80 ; Ovalbumine, 50,9 ; Anhydrase carbonique, 34 ; Inhibiteur trypsique de pois, 27,3 ; lysozyme, 16,9. EB, extrait brut, (NH₄)₂SO₄, précipitation au sulfate d'ammonium 70 %, con A-S, chromatographie sur colonne con A-sépharose, DEAE-S, colonne DEAE sépharose échangeuse de cations. Coloration argentique.

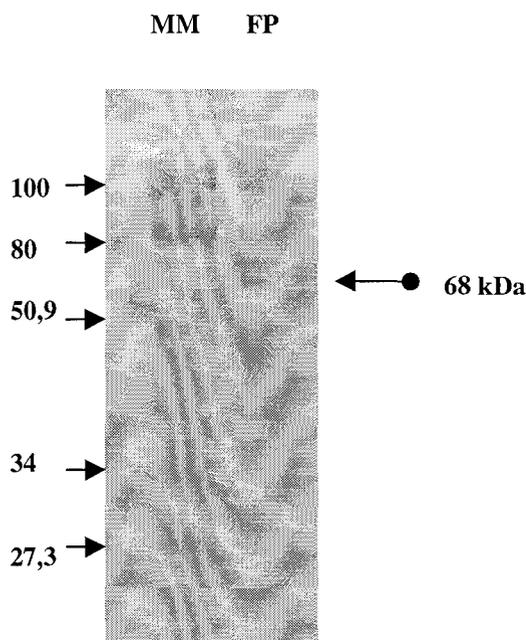


Figure 45 : Immunodetection de l'invertase acide pariétale de chicorée (68 kD) après hybridation avec un anticorps dirigé contre l'invertase acide pariétale de carotte. MM = Marqueur moléculaire (kDa), Phosphorylase B, 100 ; BSA, 80 ; Ovalbumine, 50,9 ; anhydrase carbonique, 34 ; Inhibiteur trypsique de pois, 27,3 ; lysozyme, 16,9. Hybridation après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. Dépôt de 15 µg d'extrait purifié (FP, fraction purifiée).

2. Etude du taux de l'invertase au cours de l'embryogenèse somatique

Les tissus foliaires sont incubés quatre jours dans le M17S60 ou le M17S60Gly puis transférés huit jours dans le M17S60. L'extraction des protéines est réalisée sur des tissus non induits et durant tous les jours de la phase d'induction puis après le transfert aux jours 5, 8 et 12 après le transfert. La figure 46 montre les résultats obtenus après migration des protéines sur gel de polyacrylamide en SDS-PAGE puis électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. Nous avons utilisé des anticorps monoclonaux fournis par le Professeur Sturm (Bâle) et obtenus après purification d'une invertase acide et pariétale de carotte. Nous avons établi des profils d'intensité intégrée au cours de la cinétique afin de pouvoir comparer deux à deux les conditions avec et sans glycérol (Fig. 47).

La protéine est peu exprimée dans les tissus non-induits. Lorsque les fragments de limbes sont cultivés en absence de glycérol, nous observons une augmentation de la quantité d'invertases. Après le transfert, nous pouvons noter une stabilisation du taux de protéine jusqu'à la fin de la culture (Fig. 46A). En présence de glycérol, une forte augmentation de la quantité de protéine est notée au premier jour par rapport aux tissus non-induits. Si au deuxième jour la quantité est plus faible, nous constatons une augmentation de l'invertase au troisième jour (Fig. 46B). Au quatrième jour la quantité de protéine diminue à nouveau. Au delà du transfert sur milieu d'expression dépourvu de glycérol le profil est assez similaire à la condition précédente (Fig. 46A et B).

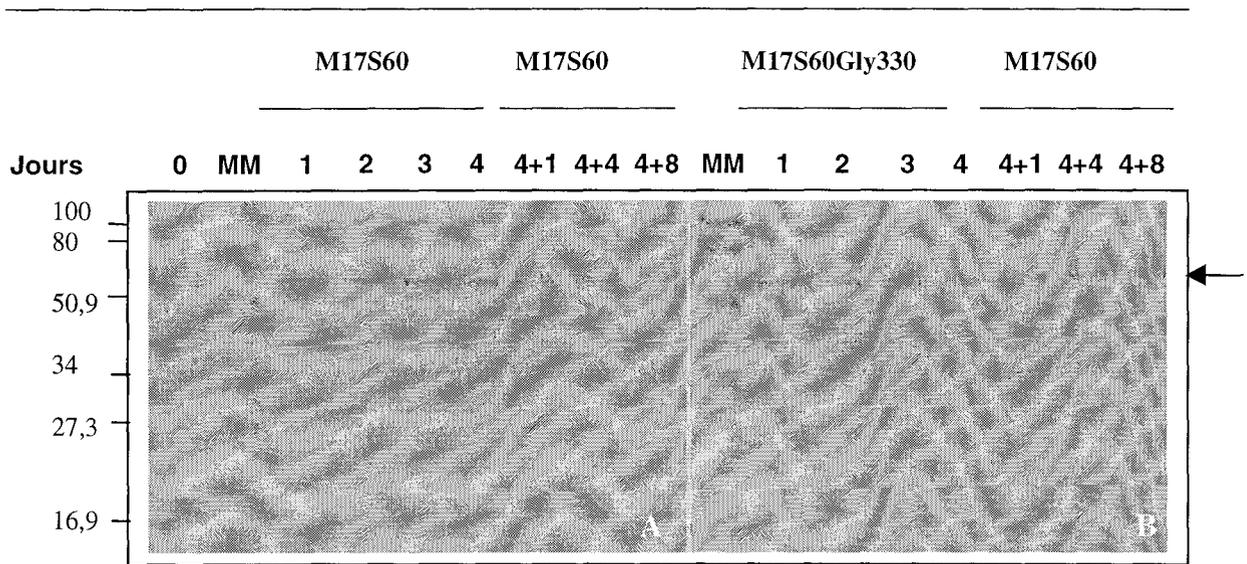


Figure 46: Cinétique d'immunodétection de l'invertase pariétale acide dans les feuilles de chicorée embryogène. Les fragments foliaires sont incubés 4 jours dans le M17S60 (A) ou le M17S60Gly330 (B) puis transférés 8 jours sur M17S60. MM = Marqueur moléculaire (kDa), Phosphorylase B, 100 ; BSA, 80 ; Ovalbumine, 50,9 ; Anhydrase carbonique, 34 ; Inhibiteur trypsique de pois, 27,3 ; lysozyme, 16,9. Hybridation après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. Chaque piste est chargée avec 15 µg de protéines.

Effets du glycérol sur le métabolisme carboné

EM_PL:PSZ83339	Z83339	P.sativum mRNA	(485)	[f]	255	128	350	322.0	5.8e-11
EM_PL:AF050128	Af050128	Zea mays cell	(4412)	[f]	253	145	340	299.8	1.1e-10
EM_PL:AF091550	Af091550	Hamamelis vir	(522)	[f]	427	172	343	315.1	1.3e-10
EM_PL:AF050631	Af050631	Zea mays inve	(2036)	[f]	210	145	340	304.4	1.3e-10
EM_PL:CRCIN1	X81792	C.rubrum CIN1 mRN	(1952)	[f]	174	87	333	298.1	3.1e-10
EM_PL:LELIN6	X91390	L.esculentum mRNA	(725)	[f]	317	174	335	305.8	3.1e-10
EM_PL:AT11033	U11033	Arabidopsis thal	(2571)	[f]	520	205	331	294.6	3.6e-10
EM_PL:LELIN5	X91389	L.esculentum mRNA	(725)	[f]	291	217	333	303.9	3.9e-10
EM_PL:STBETFRUA	Z21486	S.tuberosum mR	(1949)	[f]	222	222	329	294.4	4.9e-10
EM_PL:ATBDF	X70691	A.thaliana gene fo	(558)	[f]	515	205	331	303.6	5.3e-10
EM_PL:AF030420	Af030420	Triticum aest	(1994)	[f]	199	146	328	293.4	5.5e-10
EM_PL:AF091549	Af091549	Hamamelis vir	(522)	[f]	396	172	330	303.0	6.1e-10
EM_PL:CIPINVERT	Y11124	C.intybus mRNA	(1796)	[f]	401	169	326	292.1	7.2e-10
EM_PL:AF091548	Af091548	Hamamelis vir	(515)	[f]	391	172	325	298.5	1.1e-09
EM_PL:AF043346	Af043346	Zea mays cell	(6997)	[f]	113	113	319	277.7	1.2e-09
EM_PL:AF030421	Af030421	Triticum aest	(1563)	[f]	149	114	291	260.5	4.8e-08
EM_PL:CIFRUCTOS	Y11176	C.intybus mRNA	(2103)	[f]	283	178	289	256.9	5.6e-08
EM_PL:BVBIN46	X81797	B.vulgaris BIN46	(751)	[f]	274	215	272	247.2	5.5e-07
EM_PL:AF091547	Af091547	Hamamelis vir	(511)	[f]	319	120	272	249.4	6e-07
EM_PL:ACINV7	Y11230	A.cepa mRNA for i	(564)	[f]	60	60	232	211.8	6.8e-05
EM_PL:AC005698	Ac005698	Genomic seque	(18006)	[f]	183	118	222	182.3	9.4e-05
EM_PL:ATBETAFRU	X99111	A.thaliana gen	(11937)	[f]	220	118	222	184.7	0.0001
EM_PL:AF043347	Af043347	Zea mays cell	(5535)	[f]	108	73	223	190.1	0.00011
EM_PL:BVBIN35	X81795	B.vulgaris BIN35	(753)	[f]	133	93	225	203.6	0.00015
EM_PL:ATBFRUC	X95537	A.thaliana mRN	(2092)	[f]	220	118	222	194.9	0.00016
EM_PL:ATBFRUCT	X89454	Arabidopsis tha	(1890)	[f]	220	118	222	195.4	0.00017
EM_PL:CRCIN3	X81794	C.rubrum CIN3 gen	(775)	[f]	151	111	221	199.7	0.00023

Figure 48: Homologies de séquences avec des clones d'invertase du règne végétal.

```

EM_PL:DCBFRUCT X69321 D.carota (Queen Anne's Lace) Inv (6648 nt)
  initn: 707 init1: 707 opt: 936 Z-score: 849.7 expect() 1.7e-41
  85 ;00 % identity in 480 nt overlap (1-469:4510-4986)

                                10      20      30
/net/n      TGGGGTAACATTGTATGGGCGCATTCCGGTA
              ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
EM_PL: TTTTATCAGTACAATCCCAAGGGTGCAGTGTGGGGTAATATTGTATGGGCCCATTCGGTG
  4480      4490      4500      4510      4520      4530

                                40      50      60      70      80
/net/n TCAAAGATCTAATCAACTGGATACCGCTAGAACCAGCACTCTAACCATCGAAGCCATT-
              :: : :: : ::::::::::: ::::::::::: :: : :: : :: : :: : :: : :: :
EM_PL: TCGACTGACTTGATCAACTGGACACCGCTCGAGCCTGCAATCTTCCATCCAAACCATTT
  4540      4550      4560      4570      4580      4590

                                90      100      110      120      130      140
/net/n --CCAGTACCGTTGCTGGTCCGGTTCCGCCACGGTCCTTCCCGGTGAGAAACCGGTCATT
              : :: : ::::::::::: :: : :: : ::::::::::: :: : :: : :: :
EM_PL: GATAAATATGGATGCTGGTCCGGTTCAGCGACTATCCTTCCAGGTAATAAGCCTGTAATA
  4600      4610      4620      4630      4640      4650

```

Effets du glycérol sur le métabolisme carboné

```

150      160      170      180      190      200

/net/n TTGTACACCCGATTAAGGGTGGGGGGGGGGAAGGAGGGGAGGAAGTTTTTTTTTTTCA
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EM_PL: CTCTATACTGG--AATTGTAGAAGGCCCTCCAAAAAATGTACAAGTTCAAAACATGCT
      4660      4670      4680      4690      4700      4710

      210      220      230      240      250      260

/net/n ATACCCGAAGACTATTCAGATCCAAACCTAACAAAAATGGATCAAACCCGATGACAATCCC
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EM_PL: ATCCCGCCAACCTTCTGATCCTTACCTTCGGAAGTGGATCAAACCCGATAACAACCCC
      4720      4730      4740      4750      4760      4770

      270      280      290      300      310      320
/net/n ATCTTAAAACCAACCCATGGGGAGAATGTGTTTGCTTTCCGTGACCCAACAACCCGCTGG
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EM_PL: TTAGTCGTTGCCAACAATGGGGAAAAATGCCACAGCTTCCGGGACCCGACCACAGCATGG
      4780      4790      4800      4810      4820      4830

      330      340      350      360      370      380
/net/n ATGGACTAAAGTGGTCAATGGGAATTCACAATTTGGTAGTAAGCAGGAGCGATTAGGAGTG
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EM_PL: TTGGACAAAAGTGGGCACCTGGAAAATGTGGTTGGTAGTAAGAGGAACCGAAGAGGAATT
      4840      4850      4860      4870      4880      4890

      390      400      410      420      430      440
/net/n TCGTATTTGTACAGAAGCCCGGATTTTATTTAATTTGGACCTGGTTGATCACCCGTTGCA-
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EM_PL: GCGTATTTGTACAGGAGTAAAGATTTTATTTAAATGGACCAAGGCTAAACACCCGATCCAT
      4900      4910      4920      4930      4940      4950

      450      460      470
/net/n --CCAG--AAAGA--AAATGTGGGAATGTT
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EM_PL: TCCCAGGCTAACACTGGAATGTGGGAATGTCCTGATTTTTTCCCAGTATCACTGAAGGGA
      4960      4970      4980      4990      5000      5010

```

Figure 49 : Exemple d'homologie de séquence obtenues entre le clone Inv17 d'invertase de chicorée et l'invertase extracellulaire de carotte (85 % ; Sturm, 1990).

SWALL: <u>INV3_DAUCA</u> Q39693 BETA-FRUCTOFURAN (583) 323 198 325 455.6 4.7e-18
SWALL: <u>INV2_DAUCA</u> Q39692 BETA-FRUCTOFURAN (592) 305 196 314 440.3 3.4e-17
SWALL: <u>P93201</u> P93201 INVERTASE (LIN7) (FR (244) 299 199 308 438.1 4.4e-17
SWALL: <u>P93200</u> P93200 INVERTASE (LIN6) (FR (241) 293 193 306 435.5 6.2e-17
SWALL: <u>Q43171</u> Q43171 BETA-FRUCTOFURANOSID (582) 293 193 306 429.3 1.4e-16
SWALL: <u>O82119</u> O82119 ACID INVERTASE (EC 3 (582) 293 193 306 429.3 1.4e-16
SWALL: <u>Q43855</u> Q43855 BETA-FRUCTOFURANOSID (575) 294 188 303 425.3 2.3e-16
SWALL: <u>INV1_DAUCA</u> P26792 BETA-FRUCTOFURAN (592) 281 196 301 422.3 3.4e-16
SWALL: <u>Q43799</u> Q43799 BETA-FRUCTOSIDASE (E (580) 285 186 294 412.8 1.1e-15
SWALL: <u>P93202</u> P93202 INVERTASE (LIN8) (FR (245) 276 186 289 411.9 1.3e-15
SWALL: <u>INV1_PEA</u> Q43089 BETA-FRUCTOFURANOS (555) 272 167 285 400.7 5.4e-15
SWALL: <u>Q43079</u> Q43079 CELL WALL INVERTASE (582) 272 167 285 400.3 5.6e-15
SWALL: <u>P93199</u> P93199 BETA-FRUCTOFURANOSID (241) 265 180 280 399.5 6.3e-15
SWALL: <u>Q43172</u> Q43172 BETA-FRUCTOFURANOSID (587) 266 175 280 393.4 1.4e-14
SWALL: <u>AAC99429</u> Aac99429 BETA-FRUCTOFURAN (170) 271 178 271 389.5 2.3e-14
SWALL: <u>AAD02510</u> Aad02510 CELL WALL INVERT (593) 260 176 276 387.8 2.8e-14
SWALL: <u>O81189</u> O81189 INVERTASE. 5/99 (593) 260 176 276 387.8 2.8e-14
SWALL: <u>Q9ZSW8</u> Q9zsw8 BETA-FRUCTOFURANOSID (171) 268 174 268 385.4 3.9e-14
SWALL: <u>P93490</u> P93490 CELL WALL INVERTASE (161) 258 167 267 384.4 4.4e-14
SWALL: <u>Q43856</u> Q43856 CELL WALL INVERTASE (581) 263 174 272 382.4 5.6e-14
SWALL: <u>O81118</u> O81118 CELL WALL INVERTASE (584) 271 180 271 381.0 6.8e-14
SWALL: <u>Q43866</u> Q43866 BETA-FRUCTOFURANOSID (584) 268 166 268 376.8 1.2e-13
SWALL: <u>INVA_MAIZE</u> P49174 BETA-FRUCTOFURAN (590) 250 172 263 369.9 2.8e-13
SWALL: <u>AAD26974</u> Aad26974 PUTATIVE INVERTA (588) 259 177 260 365.7 4.8e-13
SWALL: <u>AAD21446</u> Aad21446 PUTATIVE INVERTA (588) 259 177 260 365.7 4.8e-13
SWALL: <u>CAB43403</u> Cab43403 BETA-FRUCTOFURAN (587) 254 173 257 361.6 8.1e-13
SWALL: <u>Q38801</u> Q38801 INVERTASE. 5/99 (590) 254 173 257 361.6 8.2e-13
SWALL: <u>Q9ZTL2</u> Q9zt12 CELL WALL INVERTASE (591) 239 161 252 354.6 2e-12
SWALL: <u>Q9ZTQ5</u> Q9ztq5 CELL WALL INVERTASE (586) 237 146 251 353.3 2.3e-12
SWALL: <u>AAC99431</u> Aac99431 BETA-FRUCTOFURAN (171) 225 128 241 348.1 4.6e-12
SWALL: <u>AAC99433</u> Aac99433 BETA-FRUCTOFURAN (173) 225 128 241 348.0 4.7e-12
SWALL: <u>Q9ZSW6</u> Q9zsw6 BETA-FRUCTOFURANOSID (173) 225 128 241 348.0 4.7e-12
SWALL: <u>Q42648</u> Q42648 BETA-FRUCTOFURANOSID (250) 214 148 240 344.0 7.7e-12
SWALL: <u>Q9ZP42</u> Q9zp42 CELL WALL INVERTASE (577) 247 155 237 334.1 2.8e-11
SWALL: <u>Q9ZTQ4</u> Q9ztq4 CELL WALL INVERTASE (597) 228 138 233 328.3 5.8e-11
SWALL: <u>Q43076</u> Q43076 BETA-FRUCTOFURANOSID (170) 210 112 225 326.0 7.8e-11
SWALL: <u>Q9ZR55</u> Q9zr55 INVERTASE (EC 3.2.1. (550) 209 127 223 315.1 3.2e-10
SWALL: <u>Q9ZR54</u> Q9zr54 FRUCTOSIDASE (EC 3.2 (581) 168 110 216 305.0 1.1e-09
SWALL: <u>Q42646</u> Q42646 BETA-FRUCTOFURANOSID (250) 185 103 208 299.8 2.2e-09
SWALL: <u>Q9ZSW7</u> Q9zsw7 BETA-FRUCTOFURANOSID (169) 184 105 200 291.5 6.5e-09
SWALL: <u>Q42720</u> Q42720 BETA-FRUCTOFURANOSID (661) 166 113 202 284.8 1.5e-08
SWALL: <u>Q42719</u> Q42719 BETA-FRUCTOFURANOSID (661) 165 113 201 283.4 1.8e-08
SWALL: <u>Q42721</u> Q42721 BETA-FRUCTOFURANOSID (661) 165 113 201 283.4 1.8e-08
SWALL: <u>Q9ZSW5</u> Q9zsw5 BETA-FRUCTOFURANOSID (171) 119 71 192 280.4 2.7e-08
SWALL: <u>INV1_MAIZE</u> P49175 BETA-FRUCTOFURAN (670) 149 87 194 273.7 6.4e-08

Figure 50 : Homologies de séquences avec les invertases des banques de données du règne végétal. Quelques protéines sont vacuolaires ou cytoplasmiques.

tggggtaacattgtatgggcgcatcgggtatcaaagatctaactggataccgcta
 W G N I V W A H S V S K D L I N W I P L
 gaaccagcactccaaccatcgaagccattccagtaccggttgctgggtccggttccgccacg
 E P A L Q P S K P F Q Y R C W S G S A T
 gtccttcccgggtgagaaaccgggtcattttgtacacccgattaaggggtgggggggggggaa
 V L P G E K P V I L Y T R L R V G G G E
 ggaggggaggaagtttttttttttcaatacccgaagactattcagatccaaacctaaca
 G G E E V F F F S I P E D Y S D P N L T
 aatggatcaaaccgatgacaatcccattcttaaaccaaccatgggggagaatgtgttt
 K W I K P D D N P I L K P T H G E N V F
 gctttccgtgaccaacaaccgctggatggaccaaagtgggtcaatgggaattcacaatt
 A F R D P T T A W M D Q S G Q W E F T I
 ggtagtaagcaggagcgattaggagtgtcgtatgttacagaagcccggattttattaat
 G S K Q E R L G V S Y L Y R S P D F I N
 tggaccctgggtgatcaccggtgcaccagaaagaaaatgtgggaatggt
 W T L V D H P L H Q K E N V G M

Figure 51 : Séquençage partiel de l'invertase acide pariétale de chicorée. Séquence nucléotidique et traduction en acides aminés.

2.Northern blot

Par hybridation avec la sonde homologue de chicorée, on détecte un signal positif situé à 2 kb. La figure 52 montre que dans les tissus foliaires de chicorée embryogène "474" non-induits, le taux d'expression des ARNm de l'invertase pariétale acide est très faible. Lorsque les tissus foliaires sont cultivés en absence de glycérol au cours de la phase d'induction le taux d'ARNm est très élevé au premier jour de culture. Cette élévation serait le reflet du stress causé par la mise en culture des limbes. L'expression du gène de l'invertase augmente ensuite jusqu'au quatrième jour. Après le transfert, l'expression augmente un peu et reste constante au cours de la phase d'expression des embryons somatiques. Lorsque les tissus foliaires sont incubés en présence de glycérol au cours de la phase d'induction, le taux d'expression augmente très légèrement. Après le transfert sur un milieu frais dépourvu de glycérol, l'expression est légèrement inférieure. Au jour 0 et au

jour 8(4+4) la diminution observée sur la figure 52A est dû à la quantité d'ARN déposée, le taux d'ARNr à ce jour étant très inférieur aux autres jours (Fig. 52B); le rapport permet de confirmer que l'expression est constante au cours de la cinétique d'expression.

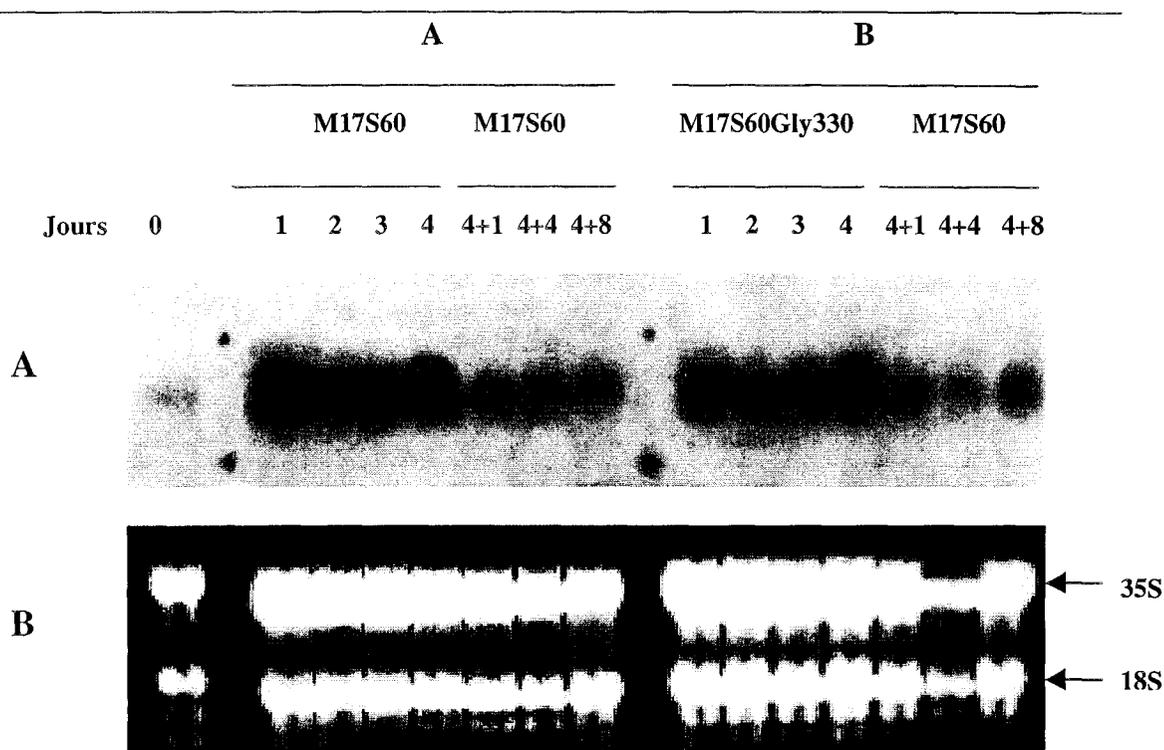


Figure 52 : Analyse par Northern blot de l'expression de l'invertase acide pariétale au cours de l'embryogenèse dans les feuilles de chicorée (A). Dépôt de 20 µg d'ARN total par piste, hybridation par une sonde marquée (^{32}P) du clone INV17 d'invertase pariétale. Les pointes des flèches noires et blanches représentent les marqueurs de taille après coloration à l'encre de Chine (18 et 26 respectivement). (B) Les ARNr sont visibles sous UV en présence de BET.

IV Chez la chicorée non embryogène Flash

A. Dosage des sucres alcoolosolubles

Les sucres alcoolosolubles sont dosés comme précédemment par CLHP dans les explants et dans les milieux d'incubation des fragments foliaires (Fig. 54).

Au cours de la phase d'induction les teneurs en saccharose diminuent dans les milieux d'incubation des feuilles de Flash. Nous notons une diminution légèrement

supérieure en absence de glycérol. Au quatrième jour, la quantité de saccharose diminue progressivement et de façon identique au cours de la phase d'expression dans les milieux de culture M1760 (Fig. 53B) et M17S60Gly330 (Fig. 53A). Parallèlement les quantités d'hexoses décelées dans les milieux augmentent au cours de la cinétique pour atteindre un maximum au douzième jour avec 15 mM dans les deux conditions (Fig. 53A et B).

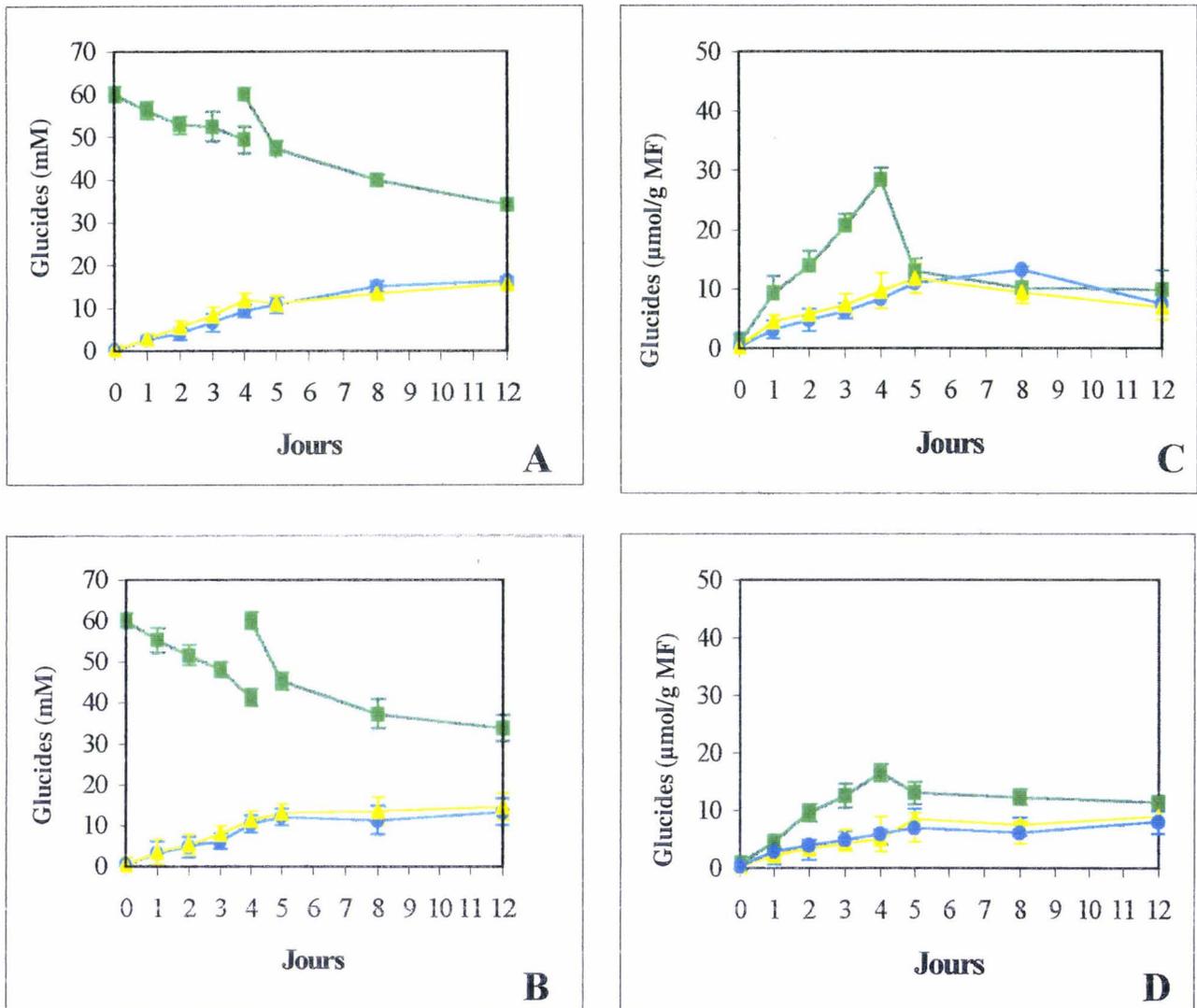


Figure 53 : Evolution du taux de saccharose (■), de glucose (●) et de fructose (▲) dans les milieux de culture des fragments foliaires de chicorée "474" au cours de l'embryogenèse somatique. Incubation de 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 (A et C) ou M17S60 (B et D) puis transfert (Flèche) pendant 8 jours dans le milieu M17S60. Moyenne (\pm écart type) de 3 cultures de 3 répétitions indépendantes.

Dans les fragments foliaires de la chicorée non-embryogène Flash incubés dans le M17S60Gly330, le saccharose pénètre et s'accumule. Au quatrième jour on trouve 28,5 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$, ce qui représente un tiers de la teneur mesurée chez la chicorée embryogène "474" au même stade de culture. Dans les fragments de limbes de Flash induits en absence de glycérol, les teneurs en saccharose sont semblables à celles observées dans les feuilles de "474" pendant la phase d'induction mais restent plus faibles pendant la phase d'expression. Dans les deux conditions et tout au long de la cinétique, les teneurs en glucose et fructose sont largement inférieures à celles observées chez "474".

B. Dosage des activités invertasiques

Les activités des invertases acides et de l'invertase neutre sont mesurées comme précédemment dans les tissus foliaires de Flash. La figure 54 présente les résultats obtenus.

L'activité de l'invertase neutre et cytoplasmique est relativement constante dans les tissus foliaires de chicorée Flash placés en condition embryogène. Les activités sont plus faibles que pour la "474" et de l'ordre de 6,5 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines (Fig. 54A).

L'invertase acide vacuolaire présente des activités similaires lorsque les tissus foliaires sont incubés dans un milieu d'induction M17S60 ou M17S60Gly330. Les valeurs sont voisines de 6,5 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines. Après le transfert les activités sont toujours stables et évoluent de la même manière (Fig. 54B).

Nous notons de nouveau que le glycérol est sans effet sur les activités des invertases intracellulaires.

Les activités de l'invertase acide pariétale sont consignées sur la figure 54C. Au cours de la phase d'induction l'activité de l'enzyme diminue très légèrement dans les explants incubés dans le M17S60 alors qu'elle chute fortement dès le deuxième jour de culture pour la condition avec glycérol. Après le transfert des fragments sur milieu M17S60, les activités se stabilisent et sont similaires pour les deux conditions (13,5 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines). Il faut toutefois souligner que ces activités sont 6 fois inférieures pour la chicorée Flash que pour la "474".

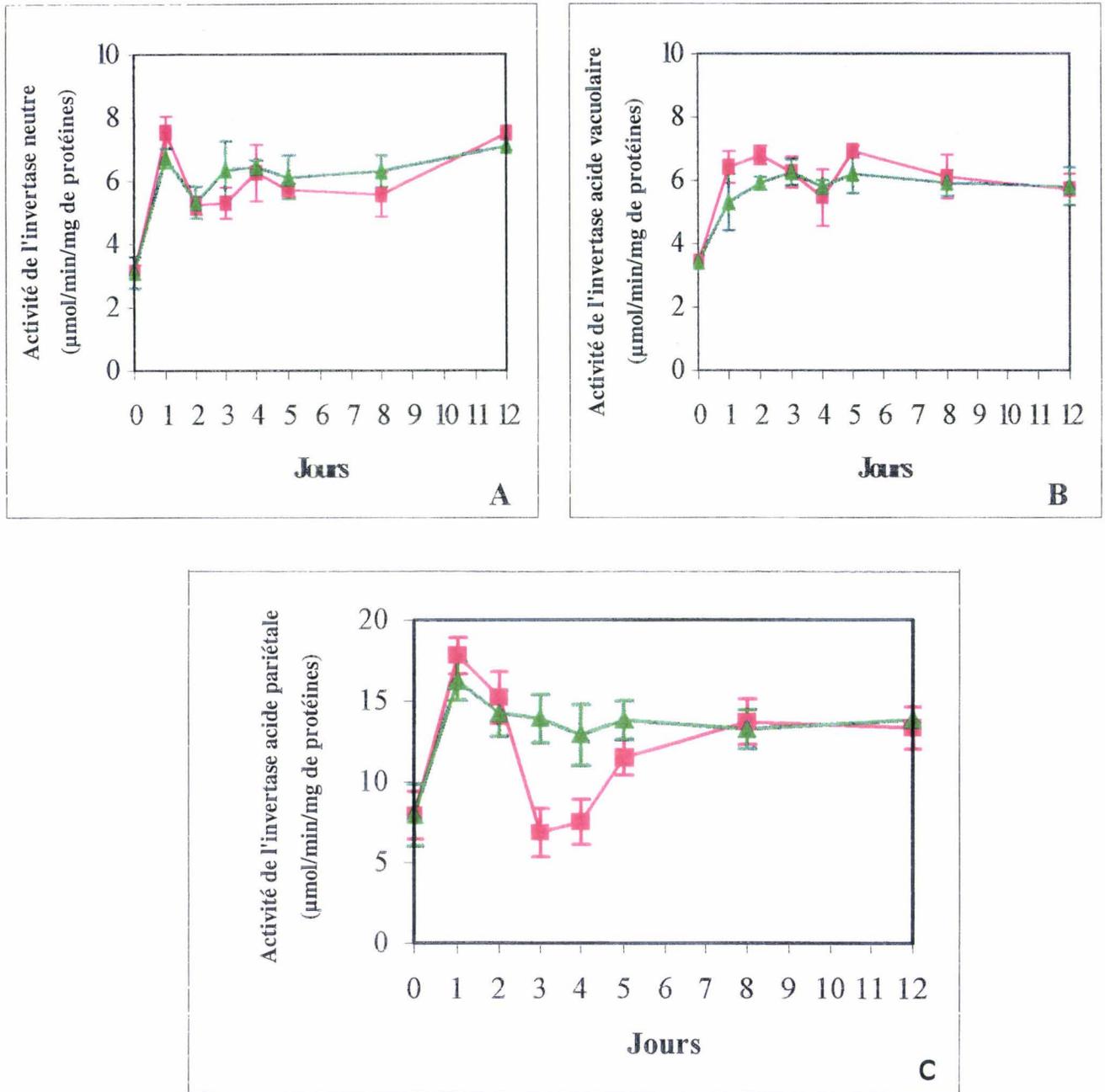


Figure 54 : Activité de l'invertase acide et pariétale mesurée dans les fragments foliaires de chicorée Flash. Les limbes sont incubés 4 jours dans le M17S60 (Δ) ou le M17S60Gly330 (\blacksquare) puis transférés (Flèche) 8 jours sur milieu dépourvu de glycérol.

C. Conclusion

Ces résultats montrent que le glycérol provoque une accumulation de l'invertase pariétale acide dans les tissus foliaires de chicorée au cours de la phase d'induction des embryons (Fig. 46 et 47). Parallèlement l'activité enzymatique est partiellement inhibée au cours des phases précoces du processus embryogène (Fig. 43). L'étude de la synthèse des ARNm de l'invertase pariétale acide nous permet de conclure que le glycérol est sans effet sur le gène de l'invertase (Fig. 52). Nous avons par ailleurs isolé un fragment d'ADNc de cette invertase de la chicorée qui fera l'objet d'une soumission aux banques de données pour recevoir un numéro d'accès. Les résultats obtenus chez la chicorée "474" et la variété Flash montrent que c'est le glycérol, un produit de son métabolisme ou un inhibiteur qui agit sur l'invertase pariétale acide au cours de la phase d'induction. Les effets du glycérol sur le métabolisme du saccharose, le système invertasique et leurs conséquences sur la cellule embryogène sont résumés sur la figure 55.

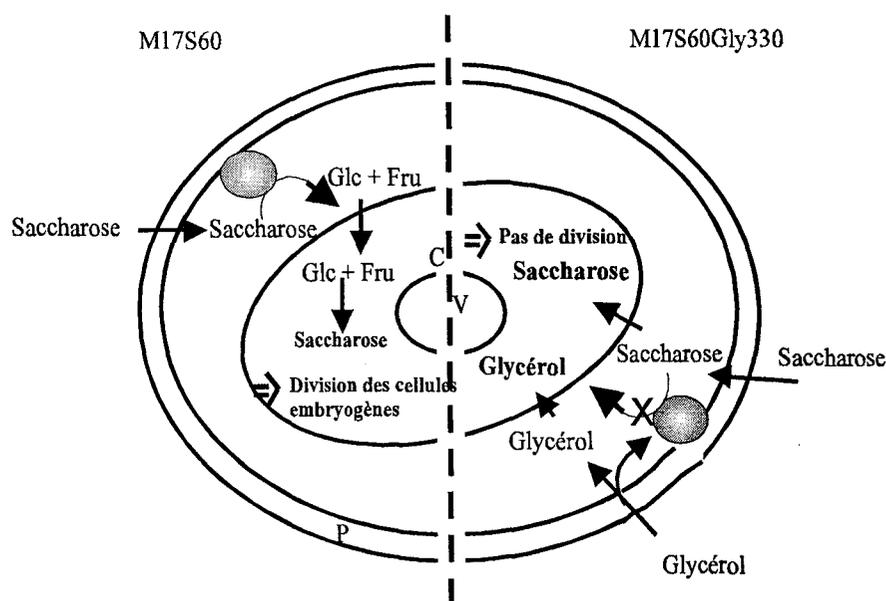


Figure 55 : Résumé des effets du glycérol sur l'invertase pariétale acide et ses conséquences au cours de l'embryogenèse somatique. V: vacuole; C: Cytoplasme; P: paroi pecto-cellulosique.

Résultats

Partie IV

QUATRIEME PARTIE

Contribution du glycérol à la recherche de marqueurs précoces de l'embryogenèse somatique chez la chicorée

Ce chapitre concerne la recherche de marqueurs précoces de l'embryogenèse somatique. Nous avons choisi d'analyser des profils d'expression protéique au cours de la culture des tissus foliaires de la chicorée pour remonter ensuite aux gènes impliqués.

Nous avons utilisé la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle pour notre recherche. Ce procédé nous permet d'observer des modifications de l'expression des gènes survenues au cours du phénomène étudié. Au cours de notre étude nous avons été amenés à observer des phénomènes impliqués dans le processus embryogène mais directement liés à la présence du glycérol. Dans ce chapitre le glycérol va être un outil pour la recherche de marqueurs précoces. En effet, le glycérol permettant de bloquer la première division lors du processus d'embryogenèse somatique dans les tissus foliaires de la chicorée, les différences observées en présence ou en absence de glycérol devraient être accentuées. Ceci implique également de rechercher des différences entre le *Cichorium* hybride 474 et un témoin non embryogène (variété Flash) afin de corréler les caractères embryogènes des protéines tissulaires ou extracellulaires détectées.

I. Analyse des protéines extracellulaires après révélation argentique

Des protéines extracellulaires détectées au cours de l'embryogenèse somatique chez la carotte (De Vries *et al.*, 1988a et b ; Van Engelen *et al.*, 1991), le *Citrus* (Gavish *et al.*, 1991), la vigne et le maïs (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992a et b, 1993), le pin (Domon *et al.*, 1994) et chez la chicorée (Helleboid *et al.*, 1995, 1998) sont susceptibles d'être des marqueurs du phénomène. Par conséquent nous avons dans un premier temps, étudié les protéines excrétées dans les milieux de culture.

A. Chez l'hybride "474"

Au cours de la cinétique d'embryogenèse somatique des différences reproductibles sont observées entre les profils protéiques des milieux d'incubation des fragments foliaires cultivés en présence ou non de glycérol. La figure 56 montre des électrophorégrammes de protéines extraites des milieux de culture ayant contenu des explants incubés 3 jours dans le M17S60 (Fig. 56A) et dans le M17S60Gly330 (Fig. 56B). L'analyse des gels révèle la présence d'une centaine de polypeptides. Le nombre total de protéines augmente au cours de la cinétique, les masses moléculaires vont de 8 à 110 kDa et les points isoélectriques sont compris entre 3 et 8 (Fig. 56). Les profils protéiques des milieux de culture montrent des différences quantitatives et qualitatives dans les 2 conditions expérimentales retenues.

Afin de faciliter notre étude, une zone d'intérêt a été délimitée sur les gel. Les protéines identifiées précédemment et reliées au processus d'embryogenèse ont été replacées. Il s'agit des chitinases (CHI) et des β -1,3 glucanases (E38).

L'annexe IV présente un gel d'électrophorèse bidimensionnelle de marqueurs protéiques standards (Bio Rad). Des comigrations des extraits protéiques avec ces marqueurs permettront de définir les points isoélectriques et les masses moléculaires des protéines d'intérêt.

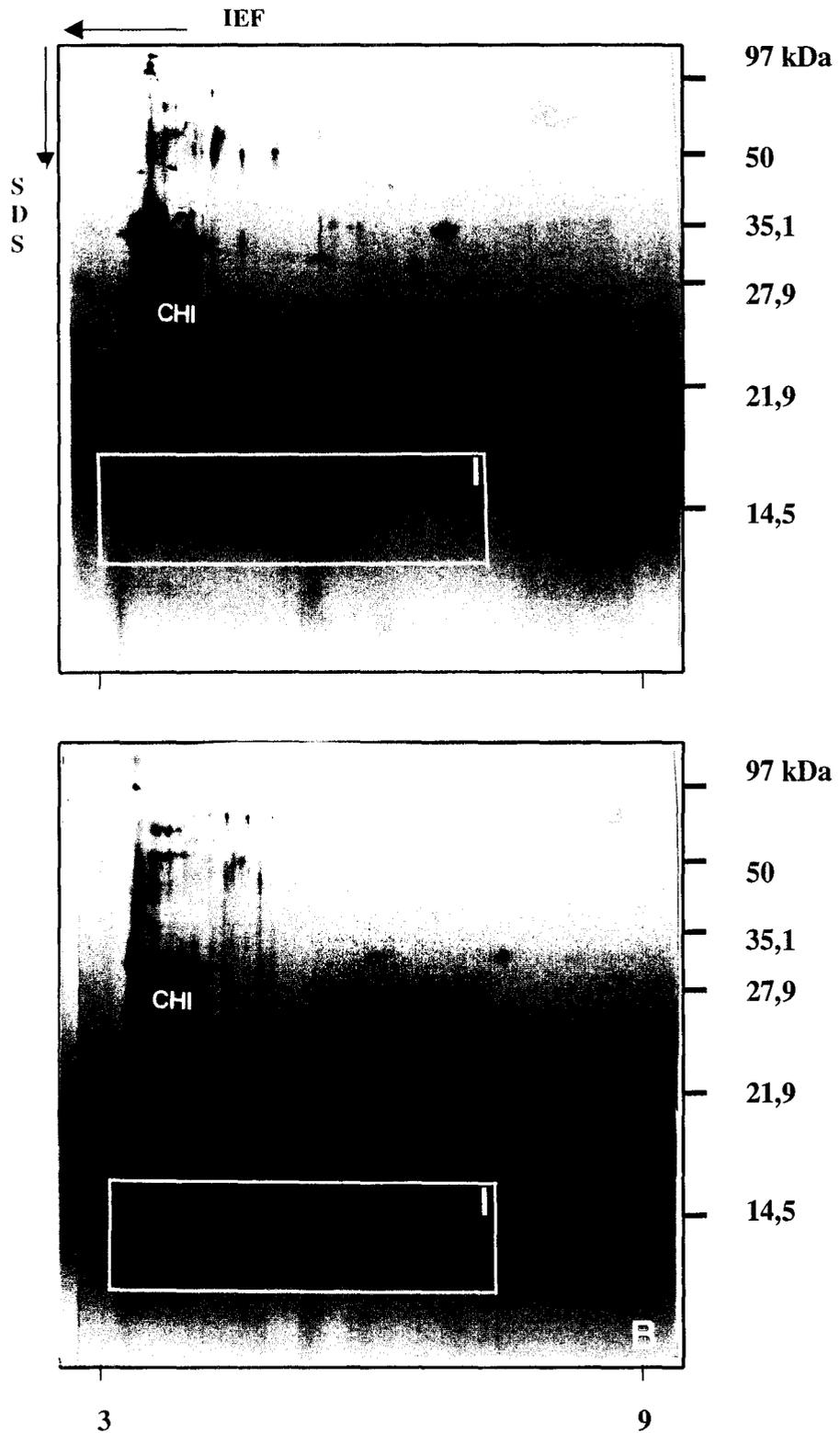


Figure 56 : Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines extraites des milieux de culture des fragments foliaires de chicorée hybride "474" cultivés 3 jours dans le milieu M17S60 (A) ou dans le M17S60Gly (B). Coloration argentique. Rectangle = zone d'étude délimitée.

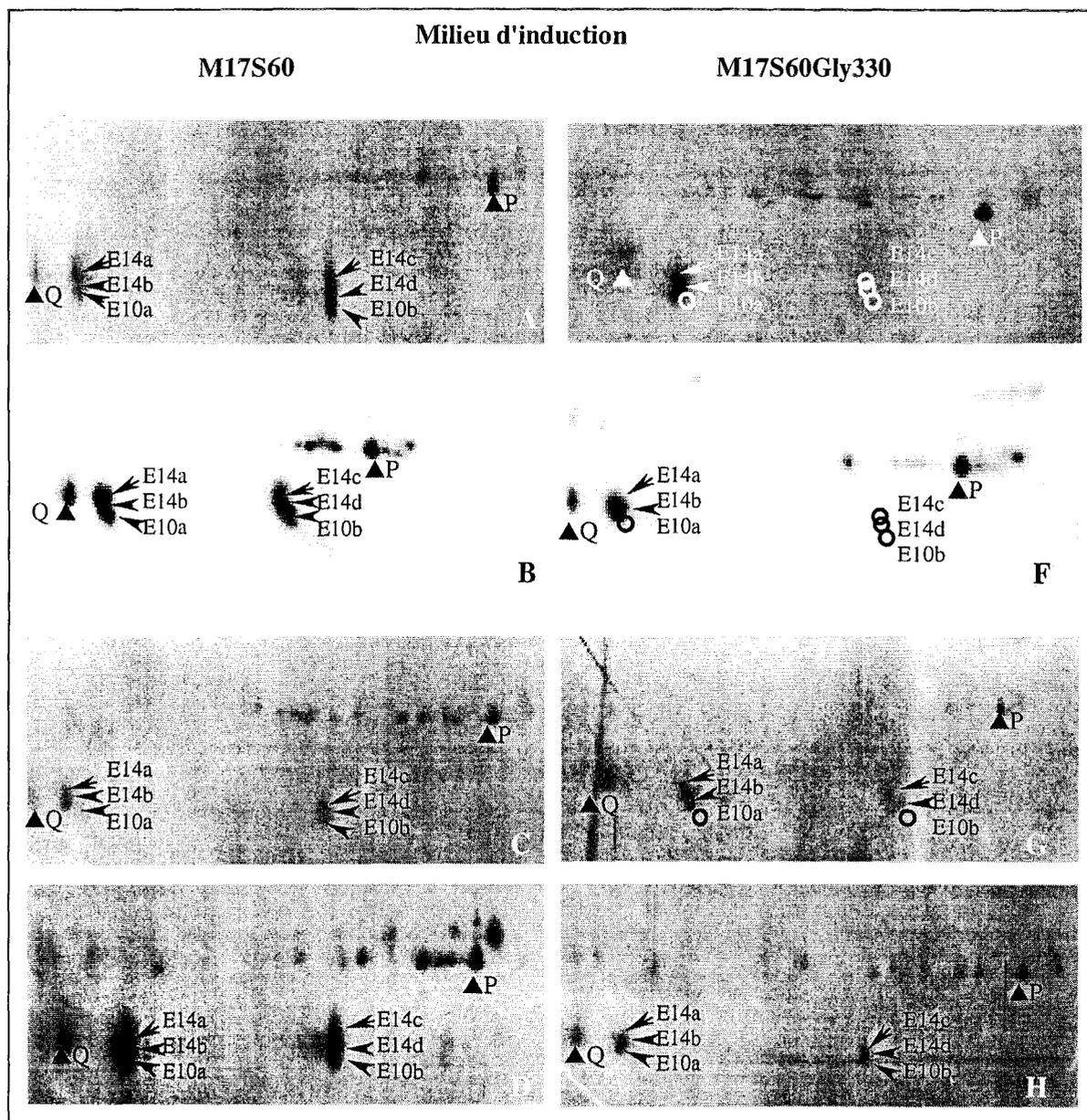


Figure 57 : Agrandissement de la zone I de la figure 56. Les électrophorogrammes bidimensionnels des protéines extraites des milieux de culture de tissus foliaires de *Cichorium* hybride "474" induits 2, 3 et 4 jours dans un milieu M17S60 (A, B, C) ou dans un milieu M17S60Gly330 (E, F, G) puis transférés sur milieu d'expression M17S60 pendant 4 jours (D et H). Coloration argentique. Les différents symboles indiquent la présence des polypeptides (▲), l'apparition de nouveaux polypeptides est indiquée par une flèche (➤) et son absence par un cercle (○).

Les profils protéiques dans la région sélectionnée sont observés au cours d'une cinétique de culture en présence (M17S60Gly330) ou absence (M17S60) de glycérol dans le milieu d'induction des fragments foliaires. Les protéines ont été extraites des milieux à 2, 3, 4, et 8 (4+4) jours pour chaque condition (3 répétitions par extrait). Afin de pouvoir comparer tous les échantillons la même quantité de protéines est déposée au cours de l'IEF (120 µg de protéines extracellulaires totales par tube).

Dans la zone étudiée, des protéines sont visibles dès le début de la culture et ceci quelle que soit la condition étudiée : elles sont notées P et Q. Ces polypeptides présentent des accumulations croissantes au cours de la cinétique (Fig. 57A à H). Dans les milieux de culture additionnés ou non de glycérol un groupe de protéines de poids moléculaire identique à la protéine P (20 kDa) s'échelonne entre les pH allant de 5,5 à 7,0.

Dans la région I sélectionnée, deux polypeptides acides de 14 kDa (14a et 14b ; Fig. 57A à H) sont présents dans les milieux d'induction M17S60 et M17S60Gly330 (Fig. 57A à C et E à G). Après le transfert dans les milieux dépourvus de glycérol, ces protéines sont toujours visibles (Fig. 57D et H). Elles ont un point isoélectrique proche de 4,5. Dans cette zone de pH un petit polypeptide de 10 kDa (10a) est présent dès le deuxième jour de culture dans les milieux d'induction dépourvus de glycérol (Fig. 57A à D). Cette protéine E10a n'est détectée qu'au huitième jour dans le milieu d'expression lorsque les fragments de chicorée ont été d'abord induits en présence de glycérol (Fig. 57H).

Un second groupe de protéines de 14 et 10 kDa, dans une zone de pH voisine de 6,5, est observé. Celles-ci sont nommées 14c, 14d et 10b. Ce triplet protéique est visible sur les électrophorégrammes des milieux M17S60 dès le second jour de l'induction et leur accumulation se poursuit tout au long de la culture embryogène (Fig. 57A à D). L'excrétion des protéines de 14 kDa est retardée au quatrième jour en présence de glycérol (Fig. 57G et H) et la protéine E10b n'est détectée que dans un milieu dépourvu de glycérol (Fig. 57H).

Afin de vérifier si les polypeptides détectés peuvent être reliés au processus d'embryogenèse somatique chez la chicorée, des fragments foliaires de la variété non embryogène ont été cultivés dans les mêmes conditions que l'hybride "474".

B. Chez la variété Flash

La figure 58 présente les électrophorégrammes des protéines extracellulaires après 3 jours d'incubation des fragments foliaires de chicorée Flash dans le milieu M17S60Gly330, puis au jour 8 (4+4) dans le milieu M17S60. Les profils protéiques diffèrent de ceux obtenus avec la chicorée "474". Alors que les polypeptides déterminés P et Q présentent des profils d'accumulation croissante chez cette chicorée, aucun polypeptide n'a pu être identifié et comparé comme étant les protéines de 10 ou 14 kDa et ceci quel que soit le point isoélectrique.

C. Conclusion

Les observations effectuées sur les coupes cytologiques et l'étude des protéines extracellulaires sur la chicorées non embryogène Flash nous permet quelques remarques. On peut souligner l'absence de β -1,3 glucanases à 38 kDa, ces protéines ayant été reliées à l'embryogenèse somatique chez la chicorée "474" par Helleboid *et al.* (1998). L'apparition des polypeptides de E14c, E14d et E10b dès le début de la culture dans les milieux d'incubation des fragments foliaires embryogènes de "474" en absence de glycérol et leur détection plus tardive en présence de glycérol tend à prouver que ceux-ci seraient en relation avec l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Ils ne sont jamais détectés chez la variété non embryogène. Il nous a paru essentiel de caractériser ces polypeptides de faible masse moléculaire.

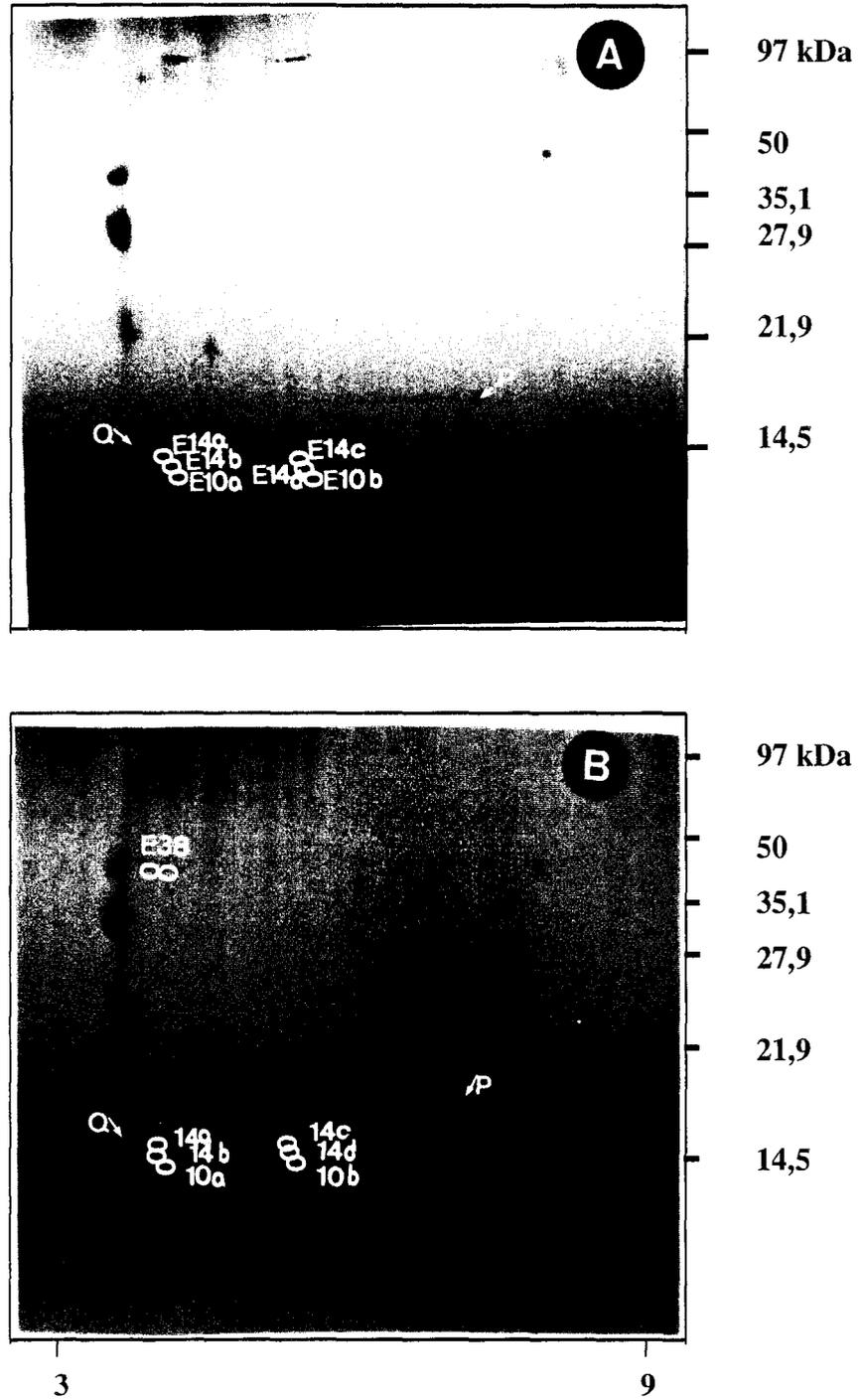


Figure 58 : Electrophorégrammes des polypeptides extraits des milieux de culture de la chicorée Flash aux jours 3 (A) et 8 (B) de la culture embryogène. Coloration argentique.

III. Caractérisation des protéines 10a et 10b et 14a, b, c et d excrétées par les fragments foliaires de chicorée "474"

Les protéines 10a et b ainsi que les protéines 14a, b, c et d pouvant être reliées au processus embryogène, des électrophorèses bidimensionnelles préparatives d'extraits protéiques des milieux de culture correspondant au huitième jour de culture ont été réalisées afin d'accumuler une quantité suffisante de protéines purifiées.

Pour l'identification des protéines de 10 et 14 kDa, les échantillons ont subi une digestion trypsique. Le spectre obtenu par spectrométrie de masse, la masse moléculaire et le point isoélectrique des polypeptides sont pris en compte.

A. Les protéines de 10 kDa

Le séquençage de la protéine de 10 kDa n'a pas abouti. D'après la littérature, cette protéine (ou ces protéines) pourrait(ent) correspondre à des LTP (lipid transfer protein). Un séquençage à partir de gel monodimensionnel a été réalisé au laboratoire et des homologies de séquences avec ces protéines ont pu être observées (Axelle Blanckaert, thèse en cours).

Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la quantité de ces protéines au cours d'une cinétique embryogène par utilisation d'anticorps dirigés contre des LTP de carotte fournis par le Professeur De Vries (Wageningen).

1. Electrophorèse monodimensionnelle et coloration argentique

Les protéines des milieux de culture après dialyse et lyophilisation sont extraites puis reprises dans un tampon de Laemmli (1970) modifié. Ces protéines sont ensuite séparées par électrophorèse monodimensionnelle (Fig. 59).

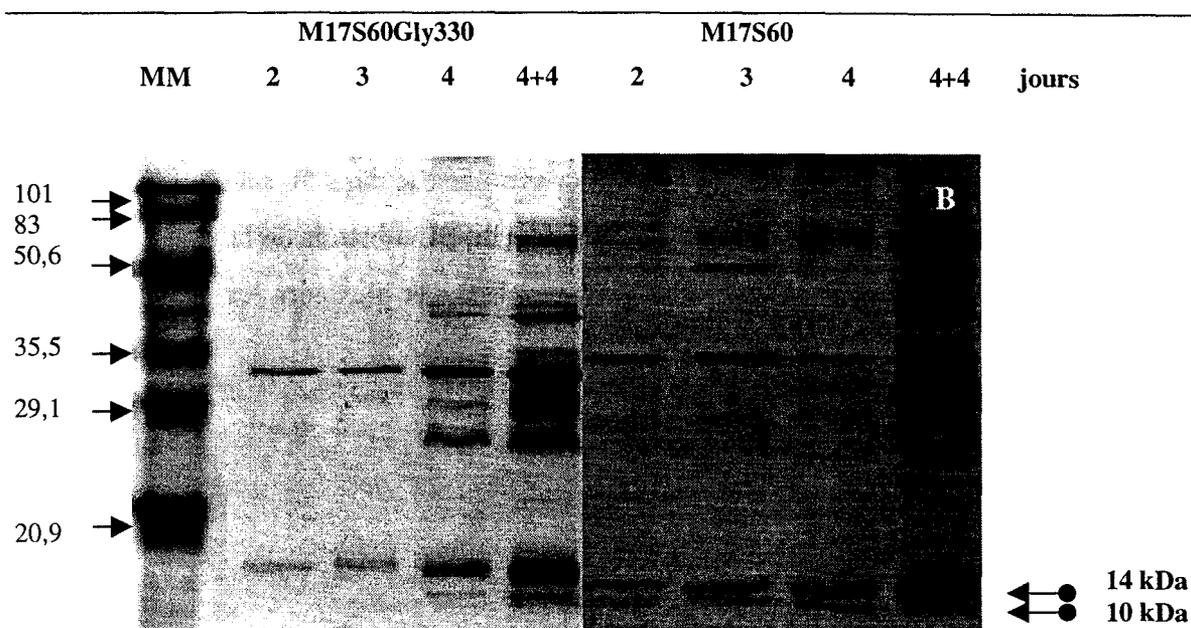


Figure 59 : Electrophorèse monodimensionnelle des protéines du milieu de culture de feuilles de chicorée "474". Après induction des fragments dans les milieux M17S60Gly330 (A) ou le M17S60 (B) pendant 2, 3, 4 jours puis transférés pendant 4 jours sur M17S60. MM : marqueur moléculaire (kDa), Phosphorylase B, 101; BSA, 83 ; Ovalbumine, 50,6 ; Anhydrase carbonique, 35,5 ; Inhibiteur trypsique de pois, 29,1 ; Lysozyme, 20,9. Coloration argentique. Dépôt de 20 µg de protéines totales par piste.

La révélation argentique permet de visualiser deux bandes protéiques de 10 et 14 kDa. La bande de 10 kDa correspondrait aux LTP. Elle n'est visible à l'argent qu'au quatrième jour de culture en présence de glycérol et dès le jour 2 en absence de glycérol dans le milieu. Les bandes de 10 et 14 kDa sont excisées des gels et déposées séparément dans deux puits après avoir été révélées au bleu de Coomassie. L'anticorps anti LTP de carotte reconnaît spécifiquement la bande de 10 kDa

2. Révélation immunologique

- pour la condition avec glycérol

Après transfert sur membrane de nitrocellulose, la bande protéique de 10 kDa est détectée au troisième jour de la phase d'induction de l'embryogenèse celle-ci est observée après le transfert sur milieu dépourvu de glycérol. Il semble curieux de ne pas déceler les protéines à l'argent et de pouvoir noter une reconnaissance par l'anticorps au troisième

jour (Fig. 60). Il s'agit là vraisemblablement d'une sensibilité plus importante à la révélation argentique.

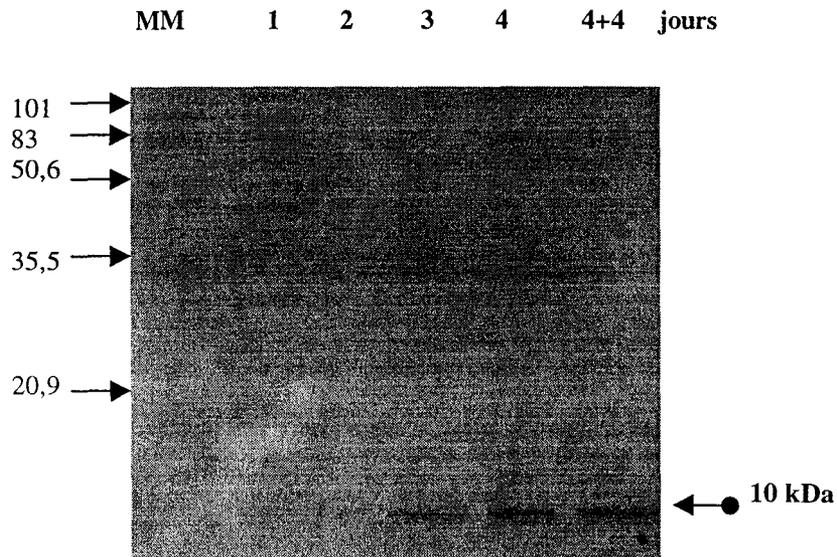


Figure 60 : Immunoblot des protéines extracellulaires des feuilles de chicorée "474" au cours de l'embryogenèse somatique. Les tissus sont incubés 1, 2, 3 et 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 puis transférés pendant 4 jours dans le milieu M17S60. MM = Marqueur moléculaire (kDa), Phosphorylase B, 101 ; BSA, 83 ; Ovalbumine, 50,6 ; Anhydrase carbonique, 35,5 ; Lysozyme, 20,9. Hybridation après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose avec un anticorps anti LTP. Dépôt de 15 µg de protéines totales.

- Pour la condition sans glycérol

L'anticorps reconnaît les protéines de transfert de lipide dès le deuxième jour de la culture (quantité très faible au jour 2). La quantité de protéines exprimées est croissante tout au long de l'embryogenèse somatique (Fig. 61).

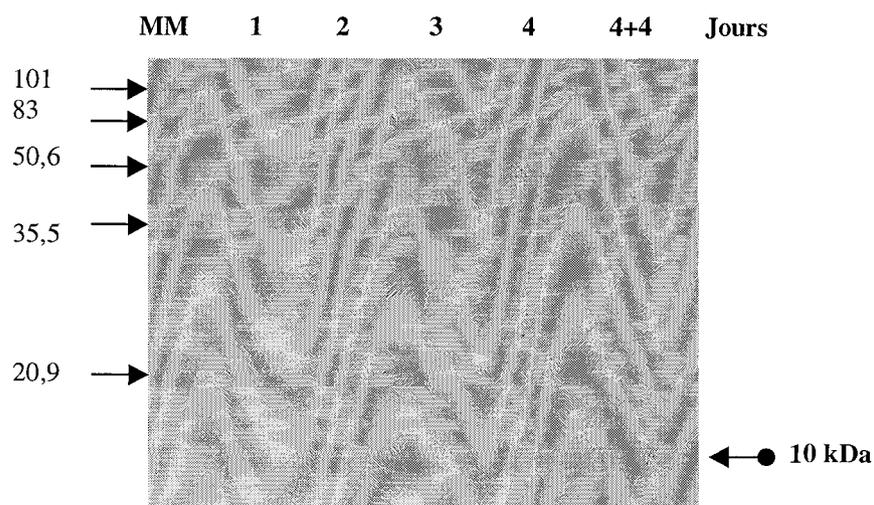


Figure 61 : Immunoblot des protéines extraites des milieux de culture des feuilles de chicorée “474”. Les tissus sont incubés 1, 2, 3 et 4 jours dans le milieu M17S60 puis transférés pendant 4 jours dans le milieu M17S60. MM = Marqueur moléculaire (kDa), Phosphorylase B, 101 ; BSA, 83 ; Ovalbumine, 50,6 ; anhydrase carbonique, 35,5 ; lysozyme, 20,9. Hybridation après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose avec un anticorps anti LTP de carotte. Dépôt de 15 µg de protéines totales.

3. Chez la chicorée Flash

Une expérimentation témoin à partir de la chicorée non embryogène Flash a été mise en place. Les immunoblots réalisés à partir des protéines extracellulaires des chicorées “474” et Flash sont préparés et révélés simultanément.

Les protéines sont extraites des milieux d'incubation de feuilles de Flash au jour 4 en présence de glycérol et après transfert 4 jours sur milieu d'expression M17S60. La figure 62 montre la révélation de la membrane après hybridation par l'anticorps anti-LTP. Aucune bande protéique n'apparaît au cours de la cinétique.

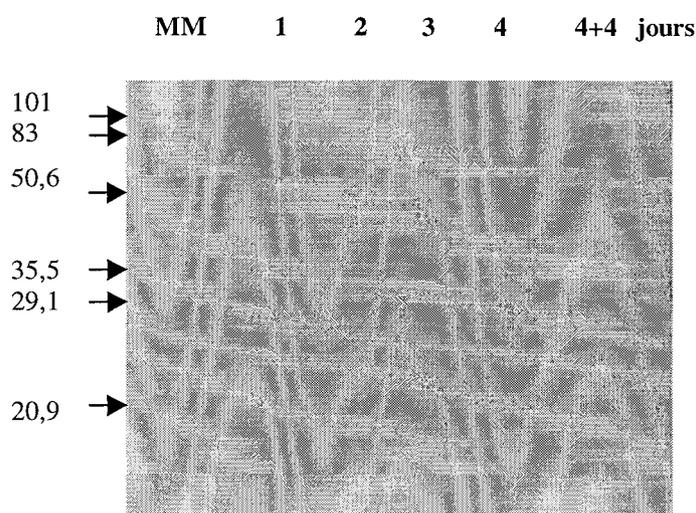


Figure 62 : Immunoblot des protéines extraites des milieux de culture des feuilles de chicorée Flash. Les tissus sont incubés 1, 2, 3 et 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 puis transférés pendant 4 jours dans le milieu M17S60. MM = Marqueur moléculaire (kDa), Phosphorylase B, 101 ; BSA, 83 ; Ovalbumine, 50,6 ; Anhydrase carbonique, 35,5 ; Inhibiteur trypsique de pois, 29,1 ; Lysozyme, 20,9. Hybridation après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et hybridation à l'aide d'un anticorps anti LTP de carotte. Dépôt de 15 µg de protéines totales.

B. Les protéines de 14 kDa

1. Séquençage partiel

Le séquençage concerne les protéines de 14 kDa de la région la plus "acide" (pH 4,8; 14a et b) et de la partie "neutre" (pH 6; 6,5; 14c et d) des électrophorégrammes présentés sur la figure 58.

Les protéines 14 a et b et 14 c et d ont été séquencées et présentent des similitudes. Les séquences polypeptidiques obtenues (DYGSNVAAL) ont été soumises à trois banques de données (SwissProt.r34, EMBL, Swall) et des homologues de séquences ont été trouvés avec des protéines de faibles poids moléculaires de la classe 1 des PR protéines (Pathogenesis related protein ; Tableau 17).

Organisme	% d'homologies	N° d'accession EMBL	Auteurs
<i>Hordeum vulgare</i>	85	Q05968	Muradov <i>et al.</i> , 1993
<i>Hordeum vulgare</i>	85	P35793	Muradov <i>et al.</i> , 1994
<i>Hordeum vulgare</i>	85	Q43489	Bryngelsson <i>et al.</i> , 1994
<i>Triticum aestivum</i>	85	O82714	Molina <i>et al.</i> , 1998

Tableau 17: Homologies de séquences entre la protéine de 14 kDa de chicorée et les PR-protéines du règne végétal.

Le séquençage a été réalisé à partir de spot révélé en électrophorèse bidimensionnelle. Un second séquençage a été réalisé après coloration à l'argent. Le spectre obtenu est présenté en annexe. Les polypeptides pourraient correspondre à une PR protéine d'après leur masse mais ne présentent pas d'homologie avec les PR protéines séquencées chez *Arabidopsis thaliana* (ce séquençage ne permet que la comparaison de masses polypeptidiques après digestion trypsique avec la banque d'*Arabidopsis thaliana*).

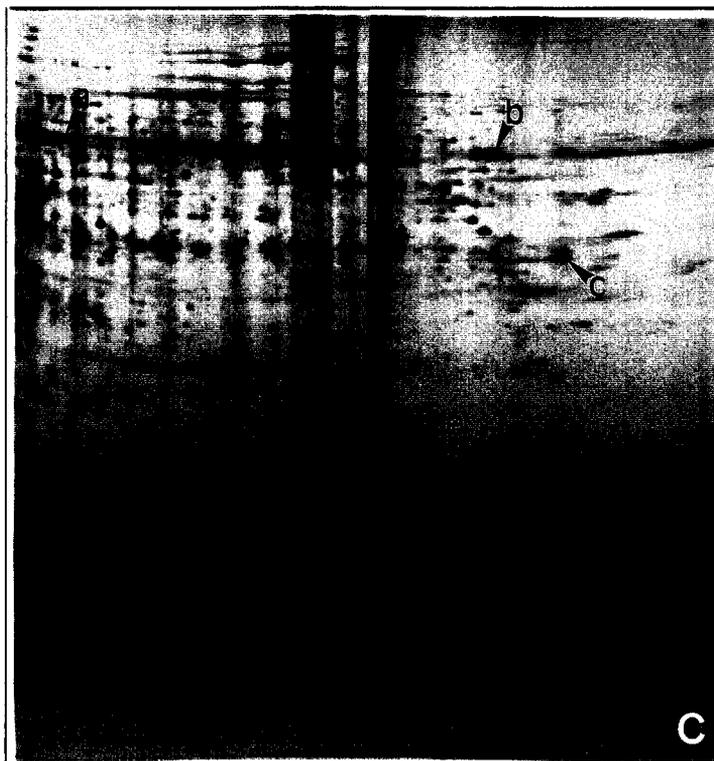
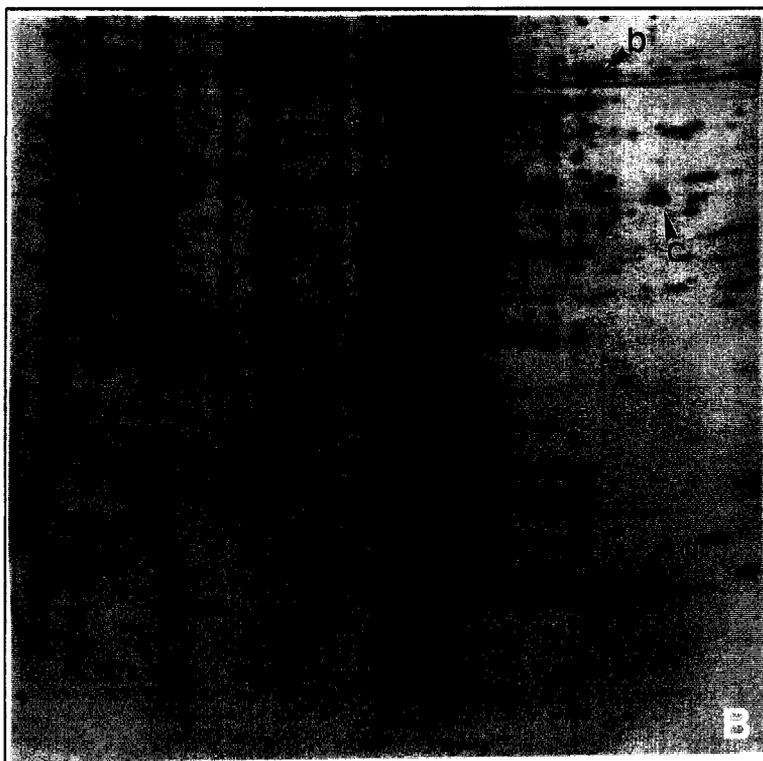
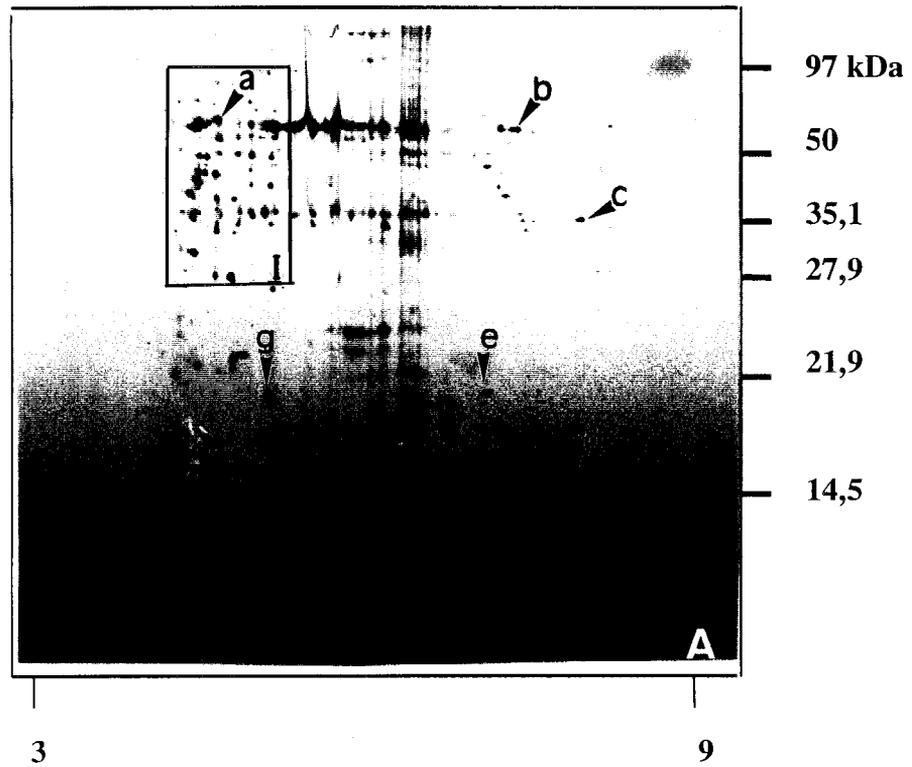
2. Conclusion

Le pourcentage d'homologie (85 %) permet d'affirmer que les protéines E14a et b et E14c et d sont des PR protéines de classe 1. Ce sont les mêmes protéines ou peut être des isoformes qui se distinguent probablement par des modifications post traductionnelles (glycosylation, phosphorylation,...).

IV. Analyse des protéines tissulaires

A. Après révélation argentique

Au cours de la cinétique étudiée, des différences reproductibles et significatives sont observées entre les profils protéiques des feuilles induites en présence ou en absence de glycérol. La figure 63 montre des profils protéiques de fragments foliaires de chicorée avant l'induction (Fig. 63A), et au huitième jour de culture après incubation quatre jours dans le M17S60Gly330 (Fig. 63B) ou dans le M17S60 (Fig. 63C). L'analyse des gels



révèle la présence de plus 1000 polypeptides. Les polypeptides sont séparés selon une gamme de pH allant de 3,5 à 8 et selon leurs masses moléculaires allant de 10 à 150 kDa. La plupart des protéines détectées au jour 0 sont également présentes au jour 8.

Cependant, les profils protéiques révèlent des différences quantitatives et qualitatives selon la condition de culture. Notre étude a tout d'abord consisté à répertorier l'effet du glycérol sur des protéines ayant déjà été identifiées et associées à l'embryogenèse somatique de la chicorée. Ces protéines sont nommées par la lettre E suivie d'un nombre correspondant à leur masse moléculaire. Il s'agit des polypeptides, E17a et E17b, E22, E27, E28, E36a, E36b E38a et E38b. Au cours de notre étude nous avons été amenés à identifier de nouveaux polypeptides qui pourraient être reliés au processus embryogène.

B.Analyse de la zone I

Cette zone délimitée sur la figure 63 se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 30 à 70 kDa et les pH s'échelonnent de 3,5 à 5 unités. Cette zone a été particulièrement étudiée au laboratoire par Boyer *et al.* (1994) et Helleboid *et al.* (1995). Cette région comporte les polypeptides reliés à l'embryogenèse somatique : E27, E28, E36a, E36b, E38a et E38b. La figure 64 montre l'agrandissement de la région I au troisième jour de culture en présence (64A) ou en absence (64B) de glycérol. Ces protéines n'apparaissent qu'à partir du troisième jour de la culture et le glycérol n'a pas d'effet sur leur présence. Nous pouvons toutefois noter une différence quantitative supérieure en absence de glycérol.

Figure 63 : Electrophorégrammes d'extraits protéiques de feuilles de chicorée "474" avant l'induction (A) , au huitième jour de culture après une induction préalable de 4 jours dans le M17S60Gly330 (B) ou le M17S60 (C).

Coloration argentique. Afin de faciliter la comparaison des profils protéiques, quelques polypeptides présents sur tous les gels ont été sélectionnés et signalés par les lettres a à g.

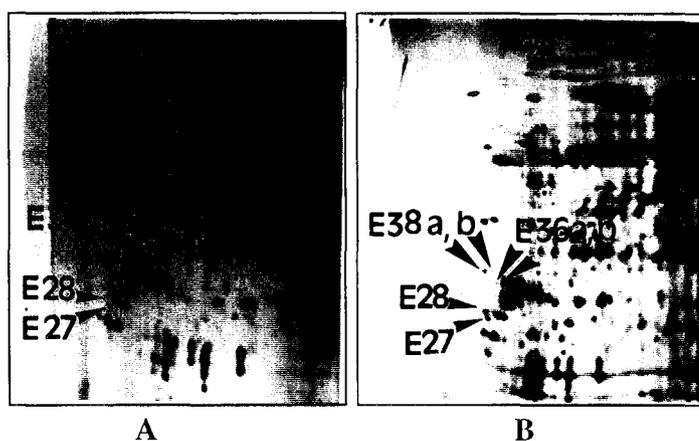


Figure 64 : Agrandissement de la région I de la figure 63. Les protéines sont extraites des tissus foliaires après 3 jours d'incubation dans le milieu M17S60Gly330 (A) ou le milieu M17S60 (B). Coloration argentique.

Nous avons résumé les variations quantitatives des polypeptides dans le tableau 18 au cours de la cinétique.

Protéine		Jour 0	J1	J2	J3	J4	J8(4+4)
E38a	M17S60	-	-	-	+++	++	+
	M17S60Gly330	-	-	-	++++	+	+
E38b	M17S60	-	-	-	++	+	+
	M17S60Gly330	-	-	-	+++	+	+
E36a	M17S60	-	-	±	+	+	+
	M17S60Gly330	-	-	±	+	+	+
E36b	M17S60	-	-	±	+	+	+
	M17S60Gly330	-	-	±	+	+	+
E28	M17S60	-	-	-	++	+	+
	M17S60Gly330	-	-	-	+	+	+
E27	M17S60	-	-	-	++	+	+
	M17S60Gly330	-	-	-	+	+	+

Tableau 18: Influence du glycérol sur l'évolution quantitative des protéines d'intérêt et influence du glycérol.

Si les protéines de 27,28 et 36 kDa n'ont pas encore été séquencées, les protéines E38a et E38b ont été identifiées comme des β -1,3 glucanases (Helleboid *et al.*, 1998).

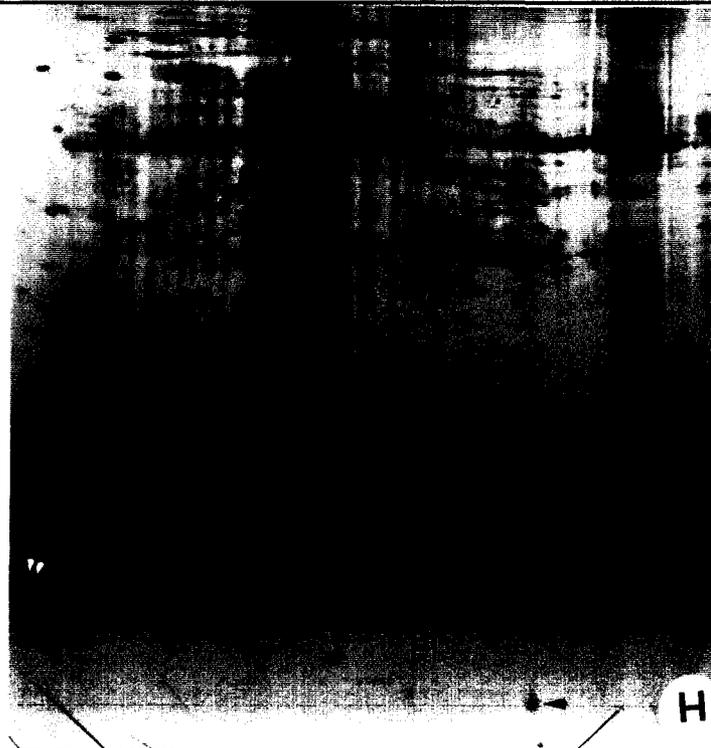
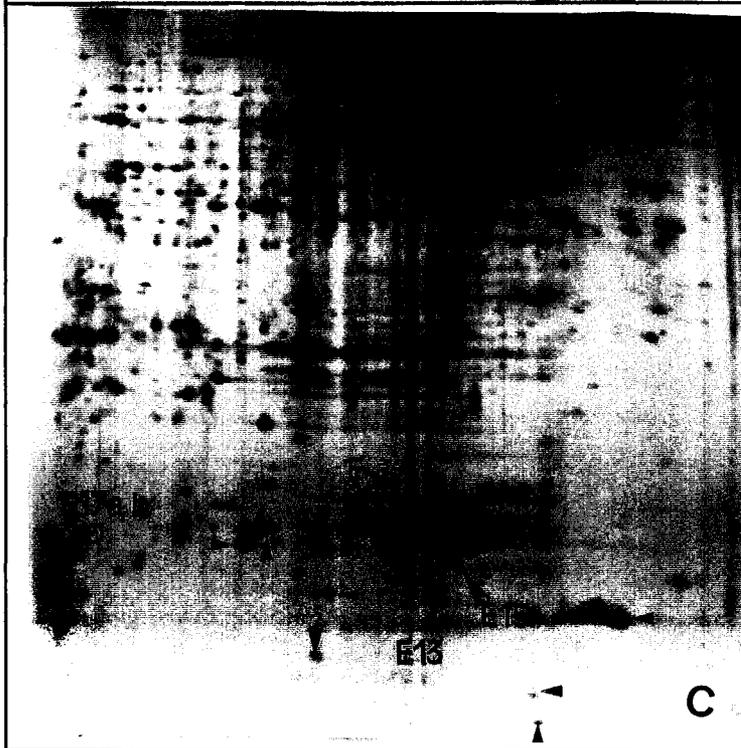
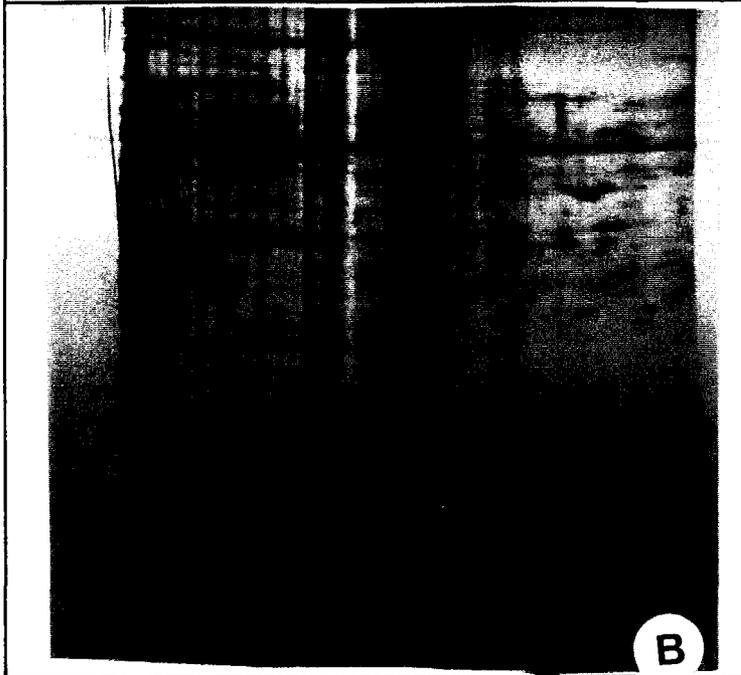
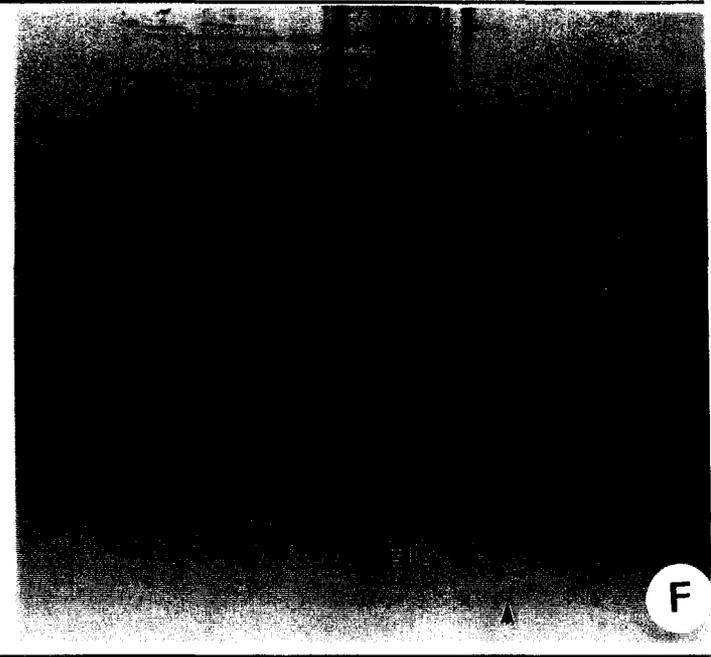
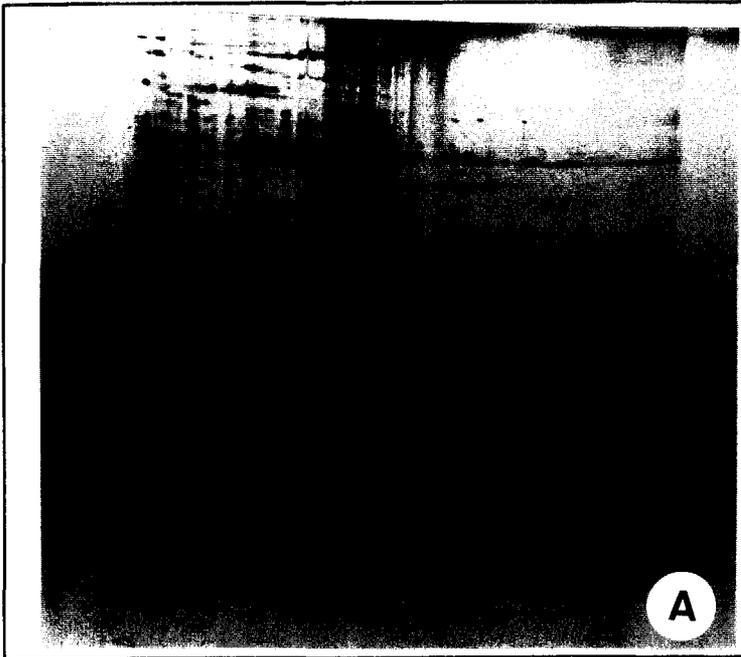
C. Analyse des autres parties du gel

Dans la zone de points isoélectriques s'échelonnant de 5 à 8, pour les protéines de hautes masses moléculaires, aucun polypeptide n'a jusqu'alors été identifié au laboratoire comme étant lié au processus d'embryogenèse somatique. Aussi, nous nous sommes plus spécialement intéressés aux polypeptides ayant une masse moléculaire située entre 10 et 30 kDa et s'échelonnant sur toute la gamme de pH (Fig. 65).

Les profils protéiques sont comparés au cours d'une cinétique de culture dans le milieu d'induction M17S60Gly330 (Fig. 65A, B, C, D) ou dans le M17S60 (Fig. 65F, G, H, I) puis après un transfert de 4 jours sur milieu M17S60 sans glycérol (Fig. 65E et J). Les polypeptides décrits sont repérés dans les tissus non induits (Fig. 63A) et la quantification relative est réalisée par informatique (voir Matériel et Méthodes). Au cours de la cinétique, les polypeptides 1, 2 et 8 voient leur intensité diminuer. Alors que 1 et 2 disparaissent totalement des tissus à partir du troisième jour dans la condition sans glycérol (Fig. 65H, I et J) le polypeptide 1 diminue mais ne disparaît pas en présence de glycérol. Les protéines 3, 5 et 15 présentent des profils d'accumulation croissants tout au long de la cinétique et ceci quelle que soit la condition d'induction (Fig. 65A à J). La majeure partie des polypeptides montre des profils constants (4, 6, 7, 9 à 14) et le glycérol est sans effet sur leur présence (Fig. 65A à J).

D. Les polypeptides d'intérêt

Dès le troisième jour de la culture en absence de glycérol, on détecte un polypeptide de 22 kDa précédemment caractérisé comme protéine de stress thermique (HSP, heat shock protein) et reliée au processus d'embryogenèse somatique (Fig. 65D et E). Lorsque les tissus sont induits en présence de glycérol, cette protéine n'est détectable qu'à partir du quatrième jour de culture.



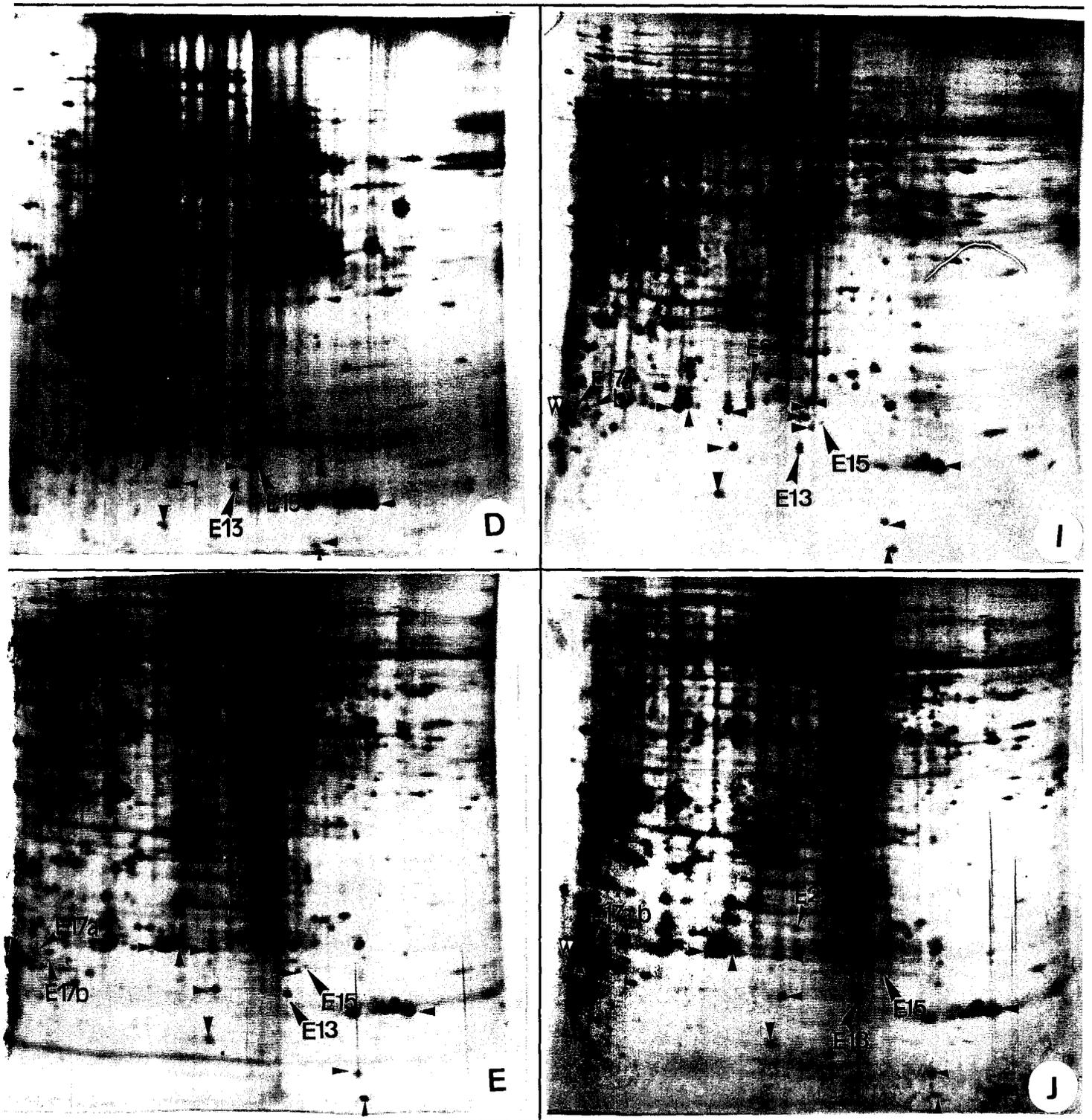


Figure 65 : Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines extraites des tissus foliaires de *Cichorium* hybride "474" induits 1,2,3 et 4 jours dans un milieu M17S60Gly330 (A, B, C et D) ou dans un milieu M17S60 (F, G, H et I) puis transférés 4 jours sur milieu d'expression M17S60 (E et J). Les différents symboles indiquent la présence des polypeptides ; l'apparition de nouveaux polypeptides est indiquée par une flèche (►) et son absence par un cercle (O). Les polypeptides 1 à 15 sont repérés sur la figure 63A puis uniquement par une pointe de flèche afin d'alléger la figure. L'orientation indique si l'expression est constante (►), augmente (▲), diminue (▼) ou s'annule (∇). Coloration argentique.

Dans les tissus foliaires cultivés en absence de glycérol, deux protéines de 17 kDa, de points isoélectriques acides (4,5) notées E17a et E17b, apparaissent au quatrième jour (Fig. 65I et J). En présence de glycérol dans le milieu, ces protéines ne sont repérables qu'après le transfert et elles sont nettement visibles au jour 8 (Fig. 65E).

E. De nouveaux polypeptides marqueurs ?

1. Mise en évidence chez la chicorée "474"

Sur la figure 65, on constate l'apparition de deux nouveaux polypeptides au cours de l'embryogenèse dans les tissus foliaires de chicorée qui sont absents des tissus non induits (Fig. 63A). Ces polypeptides sont nommés E13 et E15 (Annexe V). Les points isoélectriques de ces polypeptides sont de 6,8 pour E15 et 6,5 pour E13. La protéine E13 est détectable dès le début de la culture dans les limbes induits en absence de glycérol (Fig. 65F à J). La présence de glycérol dans le milieu d'induction, retarde l'apparition de la protéine E13 au troisième jour de la culture (Fig. 65C). Elle présente ensuite un profil d'accumulation croissant (Fig. 65D et E). Le polypeptide de 15 kDa quant à lui, apparaît au deuxième jour de la culture, que les tissus soient cultivés dans le M17S60Gly330 (Fig. 65A à D) ou le M17S60 (Fig. 65H à I) et reste présent pendant l'expression des embryons somatiques dans les deux conditions (Fig. 65E et J).

2. Chez la chicorée Flash

La figure 66 présente les profils protéiques tissulaires de la variété Flash au niveau de la zone d'intérêt précédemment décrite. On peut repérer les polypeptides 3, 7 et d (Fig. 63A et 65). Les prélèvements sont effectués aux jours 4 et 8 (4+4) pour être comparés avec la chicorée "474". Les polypeptides E13 et E15 ne sont jamais détectés au cours de la culture alors que le polypeptide E22 de stress thermique est présent sur les profils (Fig. 66A et B). Une comigration des extraits protéiques des variétés "474" et Flash au huitième jour de culture (Fig. 67) permet de conclure que les polypeptides E13 et E15 sont spécifiques de l'hybride "474" et qu'ils semblent pouvoir être reliés au processus embryogène chez la chicorée.

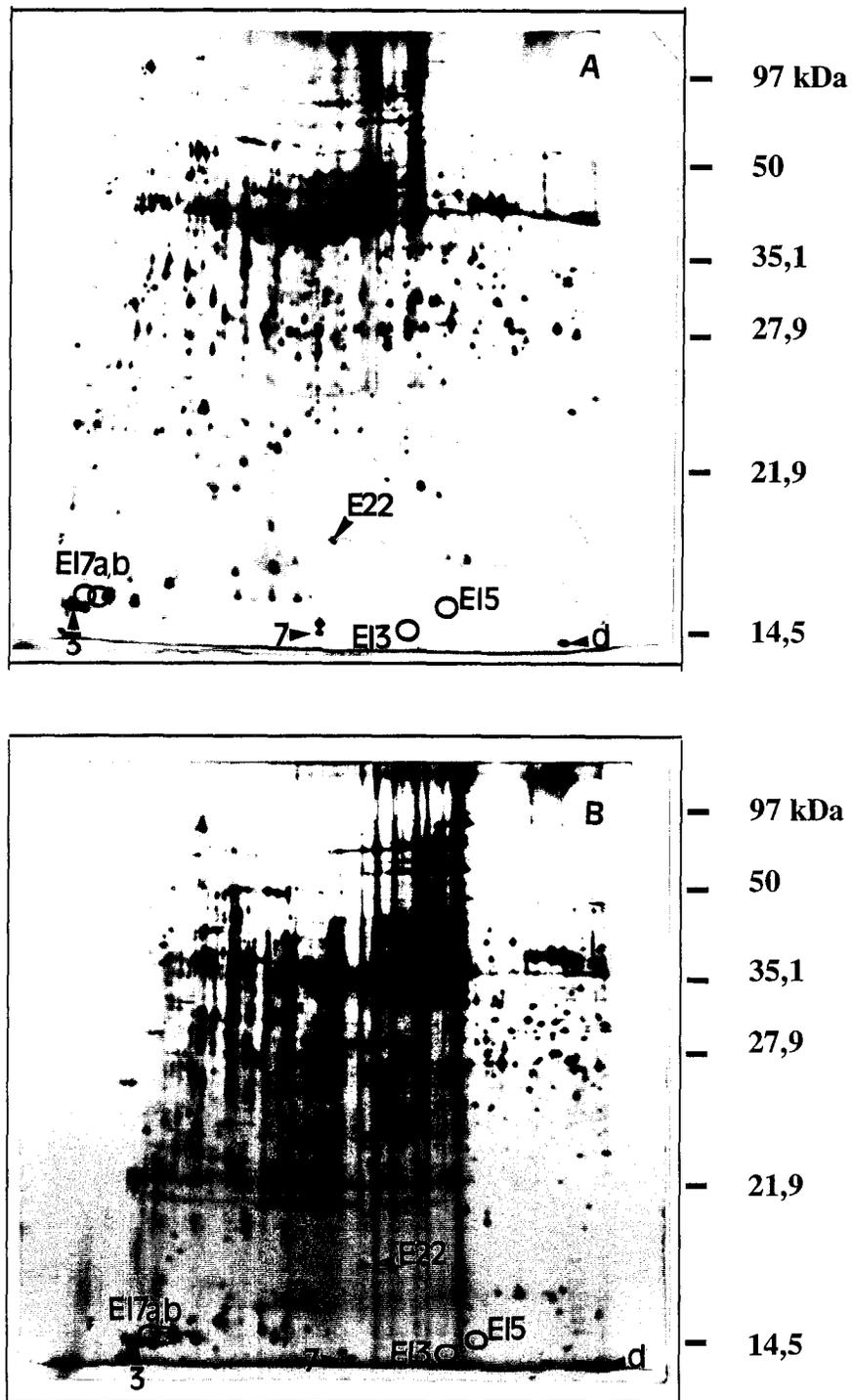


Figure 66: Electrophorégrammes bidimensionnels des tissus foliaires de chicorée Flash. Les limbes sont induits 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 (A) et transférés dans un milieu M17S60 pendant 4 jours (B). Coloration argentique.

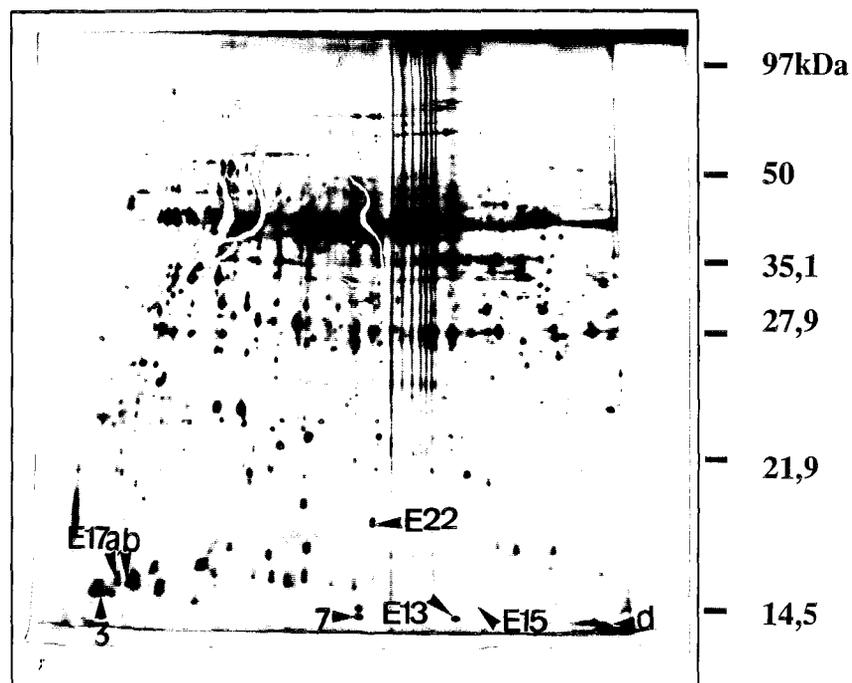


Figure 67: Electrophorogramme bidimensionnel des tissus foliaires de chicorées "474" et Flash. Les limbes des deux variétés sont induits 4 jours dans le milieu M17S60Gly330 et transférés dans un milieu M17S60 pendant 4 jours. Les protéines extraites subissent une co-migration. Coloration argentique.

F. Conclusion

Au vu des résultats obtenus en présence et en absence de glycérol dans le milieu de culture et par comparaison aux profils protéiques obtenus chez la chicorée Flash, il semble que les protéines E13 et E15 soient de bons candidats au titre de marqueurs de l'embryogenèse somatique chez la chicorée.

Discussion - Conclusions

Discussion, conclusions et perspectives

Nous avons au cours de nos travaux exploré divers aspects de l'embryogenèse chez la chicorée. Cette étude, loin de résoudre le problème du déterminisme de l'embryogenèse somatique et du développement des embryons, nous permet d'obtenir un certain nombre d'éléments utiles à la compréhension du phénomène et ouvre des perspectives pour poursuivre les investigations chez la chicorée.

L'optimisation de la culture embryogène

L'augmentation du rendement en embryons somatiques, à la suite du doublement de la concentration en saccharose, est la conséquence de l'accentuation du phénomène et constitue ainsi un outil capital aux travaux sur l'embryogenèse somatique. L'observation des coupes histologiques nous a permis de vérifier, ainsi que l'ont observé Dubois *et al.* (1991), la nature directe et unicellulaire de l'embryogenèse somatique chez le *Cichorium* hybride. De même que la réactivation primaire de nombreuses cellules avoisinant les tissus conducteurs. Ces cellules, qualifiées d'embryogènes, possèdent un cytoplasme dense, une vacuole fragmentée, un noyau central volumineux et un nucléole bien visible. Ces cellules vont s'isoler du reste du tissu par un dépôt de callose pariétal (Dubois *et al.*, 1990). Cet isolement va provoquer l'expression de la totipotence cellulaire (Décout, 1998) et une série de mitoses qui vont aboutir à la formation de proembryons sans protoderme (de taille inférieure à 250 μm) présentant des cellules de plus en plus petites. Chez *Cichorium* comme chez *Pennisetum americanum* (Vasil et Vasil, 1982) les divisions des cellules embryogènes correspondent à un reclonement de la cellule initiale avant de montrer une augmentation du volume du proembryon. Nous avons montré que le passage de 30 à 60 mM de saccharose dans le milieu de culture provoque une vague de divisions cellulaires plus précoce. Ainsi le blocage de la première mitose des cellules embryogènes décrit par Robatche-Claive *et al.* (1992) n'est plus obtenu jusqu'au cinquième jour d'induction dans un milieu M17S60Gly330. Toutefois nous montrons que la première division cellulaire a lieu quelques heures après le quatrième jour en présence de glycérol alors que des fragments de limbe incubés dans un milieu dépourvu de glycérol présentent déjà des

divisions des cellules embryogènes et des embryons somatiques à ce stade la culture. De plus au douzième jour de culture toutes les classes de taille sont représentées sur les tissus dans un milieu M17S60 traduisant une absence totale de synchronisation. L'augmentation de la concentration en glycérol s'avérant inefficace pour bloquer les cellules embryogènes, la réduction de la durée de la phase d'induction à 4 jours dans un milieu M17S60 enrichi en glycérol 330 mM est à ce jour adoptée au laboratoire.

Le glycérol et les microtubules, éléments déterminants de la mitose des cellules embryogènes

D'un point de vue cytologique la première phase de culture des feuilles en présence de glycérol, montre une migration du noyau vers le centre de la cellule et donc une préparation à l'entrée en mitose. D'un point de vue biochimique et histologique, nous avons montré que le glycérol n'intervient pas sur le taux de tubulines mais que sa présence perturbe le réseau des microtubules. Chez les animaux un blocage de la division cellulaire lié à la fixation du glycérol sur les tubulines a été démontré par Dinsdale *et al.* (1992). L'éthanol et ses dérivés sont responsables d'une désorganisation du cytosquelette et en particulier de la polymérisation des microtubules chez les mammifères (Jennett *et al.*, 1980 ; Smith *et al.*, 1987 ; Yoon *et al.*, 1998). D'autres part, Yeung (1995) souligne que les microtubules pourraient avoir un rôle de marqueur dans le processus d'embryogenèse somatique chez le riz. L'orientation et la distribution des microtubules jouent un rôle déterminant dans le processus d'induction des embryons somatiques chez *Medicago sativa* (Dijak et Simmonds, 1988), chez le pois (Schulz, 1988) et le riz (Zee *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 1997) ainsi que dans la polarité cellulaire chez le pois notamment (Hush *et al.*, 1990 ; Hush et Overall, 1992). La modification de l'organisation de la structure spatiale des microtubules dans les tissus de chicorée induits dans un milieu avec ou sans glycérol confortent ces observations. Une étude sur la polymérisation *in vitro* des microtubules, telle que celle décrite par , serait nécessaire pour définir si le glycérol affecte la synthèse du dimère de tubulines α et β ou s'il engendre une structure anarchique des microtubules.

Le glycérol permet l'induction embryogène mais le saccharose reste nécessaire au déroulement du programme embryogène

Nos résultats montrent que le saccharose est indispensable pour l'obtention et le maintien de la croissance des embryons somatiques. Le glycérol ajouté dans les milieux n'a pas qu'un rôle d'osmoticum. En effet, l'induction embryonnaire est possible lorsque le glycérol est utilisé comme seule source carbonée mais celui-ci ne permet pas la poursuite du développement des embryons somatiques dans les tissus foliaires du *Cichorium* hybride "474". Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Strickland *et al.* (1987) sur des cultures cellulaires de *Medicago sativa* où le glycérol n'améliore pas le rendement en comparaison du saccharose. Pourtant chez différentes variétés de *Citrus* le glycérol est la source carbonée privilégiée pour une bonne réponse embryogène (Ben Hayyim et Kochba, 1982 ; Ben Hayyim et Neumann, 1983 ; Vu *et al.*, 1993). Lorsque les tissus sont induits en présence de saccharose, le glycérol (330 mM) ajouté au milieu d'expression n'empêche plus la division des cellules embryogènes, mais retarde le développement des embryons somatiques. Le glycérol peut constituer une source d'énergie suffisante pour induire les cellules embryogènes, mais seul il ne permet pas le développement des embryons somatiques.

Le métabolisme du glycérol et ses conséquences sur l'embryogenèse somatique

La possibilité d'utiliser du glycérol comme source carbonée nous a conduit à étudier son métabolisme au cours de l'embryogenèse somatique. Le glycérol est transporté de manière passive dans les tissus foliaires de chicorée dans lesquels il s'accumule. Les teneurs élevées en glycérol libre dans les feuilles s'expliquent par la nécessité qu'ont les cellules de créer un équilibre avec le milieu extérieur (384 mM), comme l'ont montré Wang *et al.* (1995) avec un autre polyol, le sorbitol, qui permet l'ajustement osmotique dans les feuilles de pommier (Wang et Stutte, 1992). La présence du glycérol entraîne une élévation de la pression osmotique. De fortes augmentations sont parfois favorables à l'embryogenèse comme chez *Helianthus annuus* (Jeannin *et al.*, 1993) et selon Wetherell (1984) un stress osmotique provoque la plasmolyse des cellules embryogènes qui s'isolent pour évoluer en embryon. Nos résultats seraient davantage en accord avec les travaux de Litz (1986) sur les suspensions

cellulaires de *Carica*, où une osmolarité élevée au cours de l'induction ou lors des stades précoces de l'embryogenèse somatique inhibe la différenciation des cellules embryogènes, voire même perturbe le développement normal des embryons somatiques.

L'incubation de jeunes plantes de *Cucurbita maxima* en présence de glycérol-¹⁴C entraîne une production très importante de saccharose-¹⁴C indiquant que le glycérol peut s'orienter vers la voie de la gluconéogenèse (Beevers 1956, 1961). Cette voie est confirmée en 1983 par MacDonald et ap Rees qui ajoutent de faible quantité de glycérol marqué à leurs suspensions cellulaires de *Glycine max*. Chez les bactéries et les mammifères, un tel métabolisme est initié par la glycérol kinase. Le produit de cette réaction est le glycérol 3-phosphate qui est le carrefour métabolique (Lin 1976, 1977). Chez les plantes supérieures, Hippman et Heinz (1976) démontrent pour la première fois la présence de cette enzyme dans des extraits de feuilles de *Pisum sativum*. En 1987, Sadava et Moore mesurent l'activité de la glycérol kinase et caractérisent l'enzyme à partir de tissus de *Cucumis sativa*. Chez le *Cichorium*, la glycérol kinase est très active dans les feuilles en condition embryogène et l'enzyme semble directement activée par son substrat. Il n'existe que des traces de glycérol libre dans les tissus foliaires cultivés en absence de glycérol, l'activité mesurée tend à prouver que le glycérol n'est qu'un état transitoire et qu'il est très rapidement converti par la glycérol kinase. L'activité spécifique de la glycérol 3 phosphate déshydrogénase reste constante au cours de la phase d'induction et ceci quelle que soit la condition de culture. Le glycérol n'a donc pas d'effet sur cette enzyme. Après le changement de milieu, celle-ci est beaucoup plus active dans les tissus. Sans doute est-elle directement impliquée dans le processus de développement des embryons somatiques, dans l'anabolisme du saccharose pour constituer des réserves pour les embryons d'une part et dans le catabolisme des sucres par la formation de pyruvate et d'énergie d'autre part mais aussi dans la lipidogenèse (Fig. 3).

L'analyse des molécules carbonées et phosphatées des fragments foliaires de chicorée en RMN, permet de confirmer le transport du glycérol et sa phosphorylation très rapide en glycérol 3-phosphate. Le spectre en RMN ³¹P montre l'activité intense de la glycérol kinase qui serait localisée dans le cytoplasme (Aubert *et al.*, 1994). En utilisant du glycérol-³H sur des plantules de *Brassica napus*, Perry et Harwood (1993), démontrent l'orientation préférentielle du glycérol 3-phosphate pour la synthèses des lipides. Nos résultats dans les

feuilles de *Cichorium* confirmeraient cette hypothèse. Peu de glycérol 3-phosphate serait converti en DHAP au début de la culture. On peut remarquer une faible teneur du glycérol 3-phosphate en absence de glycérol dans le milieu d'induction. Cela est sans doute le résultat d'une conversion de la dihydroxyacétone phosphate en glycérol 3-phosphate pour la synthèse des phospholipides. On pense en particulier dans le cas des cellules de chicorée, à la phosphatidylcholine puisque nous détectons une teneur relativement importante en phosphoryl-choline. La phosphatidylcholine est le phospholipide membranaire majeur pour la synthèse de membrane. Dans la condition sans glycérol, les cellules embryogènes se divisent, la croissance est relancée, les cellules alimenteraient en choline les synthèses membranaires. On constate que la quantité de glycéryl-phosphoryléthanolamine (GPE) est deux fois moins importante en absence qu'en présence de glycérol dans les milieux (Fig. 32A et B). Cette accumulation du phosphodiester pourrait s'expliquer par une dégradation intense de la phosphatidyléthanolamine par les lipides acyl hydrolases (Galliard, 1980). Le GPE est ensuite hydrolysé par une estérase qui libère le glycérol 3-phosphate et de l'éthanolamine qui se phosphoryle rapidement (Bligny *et al.*, 1989). Ce catabolisme des phospholipides permettrait l'alimentation de la chaîne respiratoire par le métabolisme des acides gras. De tels résultats suggèrent un blocage en amont de la glycolyse que nous démontrons dans la troisième partie des résultats.

Par ailleurs, nous avons montré que la présence du glycérol, de part sa fonction alcool, conduisait à la synthèse d'un nouveau composé de type glucidique dans la constitution duquel intervient le glycérol ou un produit de son métabolisme. Ce composé pourrait correspondre à un hétérodimère de glycérol et d'un sucre comme c'est le cas chez les algues (Hellebust, 1976). Ce composé pourrait être synthétisé en réponse au choc osmotique ou encore pour entrer dans la composition pariétale. Il a été récemment montré que le glycérol entrait dans la composition de la subérine chez les tubercules de pomme de terre et dans les fibres de coton. Les auteurs suggèrent que le glycérol doit être considéré comme un monomère de subérine chez tous les végétaux supérieurs (Moire *et al.*, 1999). La caractérisation de cet oligosaccharide serait intéressante. Nous avons tenté de l'isoler sur couche mince afin de réaliser une chromatographie en phase gaz pour déterminer sa composition. L'action de diverses enzymes (glucanases, invertases,...) permettra de déterminer le type de liaison.

Le glycérol et le métabolisme carboné au cours de l'embryogenèse somatique

-Les sucres

Les analyses des sucres alcoolosolubles dans les milieux de culture montrent que le saccharose disparaît et parallèlement nous observons un transport de ce saccharose dans les explants foliaires. La présence du glycérol modifie fortement l'hydrolyse du saccharose en particulier au cours de la phase d'induction. Il est souvent rapporté que des teneurs élevées en saccharose favorisent l'embryogenèse somatique. Ce n'est pas le cas chez la chicorée cultivée en présence du glycérol qui favorise l'accumulation de saccharose et tend à inhiber le phénomène d'embryogenèse. D'autre part, la présence élevée de glucose et de fructose est peut être responsable de la diminution du nombre d'embryons somatiques différenciés, ces deux sources carbonées n'étant pas favorables à l'embryogenèse chez la chicorée (Couillerot *et al.*; 1993) mais aussi chez *Eleusine coracana* (Eapen et George, 1990) ou *Solanum melongena* (Gleddie *et al.*, 1983). Dans des cellules embryogènes de *Daucus carota* (Dijkema *et al.*, 1990) le glucose et le fructose, formes privilégiés d'entrée des glucides dans les tissus doivent même régénérer du saccharose avant d'être ultérieurement métabolisés.

-Les invertases

Les différences enregistrées au cours de la phase d'induction laissent supposer que les invertases jouent un rôle important dans les phénomènes de différenciation cellulaire. L'embryogenèse somatique chez la chicorée serait caractérisée par une diminution de l'activité de l'invertase acide au cours du développement des embryons somatiques et une augmentation de l'invertase basique. Ces résultats ont déjà été observés chez la carotte et d'autres espèces d'Apiacées au cours de l'embryogenèse somatique (Ricardo et Ap Rees, 1970 ; Silva *et al.*, 1988). Halperin et Jansen (1967) obtiennent des résultats similaires en comparant l'embryogenèse somatique et zygotique toujours chez la carotte.

Une activité élevée de l'invertase pariétale, en relation avec le taux d'auxines, induirait le processus de différenciation de cellules somatiques en cellules embryogènes et favoriserait la division et le développement en embryon (Weil et Raush, 1990). Chez la chicorée le blocage de la division pourrait s'expliquer par une modification du métabolisme du saccharose due à la présence du glycérol.

L'analyse du Northern blot permet de conclure que le glycérol est sans effet sur l'activité du gène de l'invertase pariétale. Par conséquent, la présence du glycérol pourrait intervenir au niveau de la protéine elle-même, par exemple en bloquant le site actif de celle-ci en tant qu'inhibiteur compétitif. Le besoin en hexoses nécessiterait alors une synthèse massive de l'enzyme et après le transfert sur milieu frais l'inhibition serait levée. Nous pouvons également penser que le glycérol induit la synthèse d'un (ou plusieurs composés) qui agirait(ent) sur l'activité de la protéine au niveau du site actif ou de la structure de la protéine. Nous pensons ici au composé de type glucidique découvert dans les tissus et étudié au cours de la deuxième partie des résultats. Il est intéressant d'observer que dans des conditions de stress réduit (en absence de glycérol), le taux de protéines de même que la synthèse d'ARNm de l'invertase pariétale, augmentent nettement au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique.

L'invertase marqueur de l'embryogenèse somatique ?

Le terme de marqueur est souvent assez vague et plusieurs conceptions de ce terme sont envisageables. Dans la littérature, de nombreux travaux mettent en cause des enzymes lors de l'induction de l'embryogenèse somatique (Chibbar *et al.*, 1988 ; Coppens et Dewitte, 1990 ; Rao *et al.*, 1990 ; ...). Un marqueur doit être identifiable dès la phase d'induction ou mieux de pré-induction, c'est à dire avant que le phénomène physiologique soit apparent. La notion d'invertase comme marqueur de l'embryogenèse somatique est évoquée chez la carotte par Sadava et Ricardo (1992). Les auteurs se basent sur l'aspect quantitatif de l'activité de l'invertase sur des lignées embryogènes et non embryogènes. Dans ces conditions, le marqueur ne suit pas une loi de tout ou rien et il est donc difficilement exploitable. Il ne nous semble pas que l'invertase soit un marqueur d'une phase d'acquisition ou de développement de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. L'activité de l'enzyme serait plutôt le résultat d'une cascade d'événements consécutifs au stress de la mise en culture et liés de près ou de loin à la différenciation cellulaire vers un programme embryogène. Toutefois, les différences enregistrées au cours de notre étude en particulier entre les chicorées embryogènes et non embryogènes, prouvent que le métabolisme du saccharose est nécessaire au bon déroulement

du processus d'embryogenèse somatique chez la chicorée. Les stades précoces sont caractérisés comme nous l'avons vu précédemment par une augmentation de l'activité de l'invertase acide pariétale et le développement des embryons somatiques au contraire par une diminution de cette activité.

Mise en évidence de nouveaux marqueurs protéiques

Les protéines extracellulaires

L'utilisation du glycérol combinée à une étude chez la chicorée Flash non embryogène a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs protéiques dans les milieux de culture. Ces polypeptides se divisent en deux groupes de 10 et 14 kDa.

Un séquençage des protéines de 10 kDa sur gel monodimensionnel (Axelle Blanckaert, thèse en cours) a permis d'identifier ces protéines comme des protéines de transfert de lipide. Le rôle de ces LTP chez les plantes supérieures cultivées *in vitro* n'a pu être corrélé aux fonctions *in vivo* à ce jour. Chez la carotte, Sterck *et al.* (1991), supposent que ces LTP seraient impliquées dans le transport de monomères de cutine. La cuticule entourerait les embryons somatiques après formation du protoderme. Ces résultats sont confirmés par Meijer *et al.* (1993) qui démontrent que la LTP précédemment découverte pouvait transporter des phospholipides membranaires *in vitro* qui seraient excrétés à l'extérieur des tissus. Ceci implique donc que les LTP interviendraient dans des stades plus tardifs de l'embryogenèse somatique. Chez la chicorée la présence du protoderme à la surface des embryons n'est notée qu'au dixième jour de culture (Dubois *et al.*, 1991); la présence des LTP au cours des stades précoces laissent supposer que ces protéines ne possèdent pas les mêmes fonctions que chez la carotte. Leur excrétion dans les milieux de culture pourrait être due à un phénomène de stress environnemental et non à l'embryogenèse somatique elle-même. En effet, il a été démontré que certains gènes sont spécifiquement induits par un choc thermique, des concentrations élevées en sels ou encore un traitement hormonal chez l'orge et la tomate (Plant *et al.*, 1991 ; Hugues *et al.*, 1992 ; Torres-Schumann *et al.*, 1992). Chez la chicorée une température élevée est indispensable à l'induction des embryons somatiques et pourrait expliquer la présence de ces protéines (Décout *et al.*, 1992).

Le groupe de protéines de 14 kDa a été identifiée comme appartenant à la classe 1 des Pathogenesis Responsive proteins. Des suspensions cellulaires de tabac ou de potiron expriment de manière constitutive des PR-protéines qui sont excrétés dans les milieux de culture (Antoniw *et al.*, 1981 ; Esaka *et al.*, 1990). Dans les milieux de culture de chicorée, différents polypeptides ont déjà été mis en évidence. Ils appartiennent à la classe 2 et 4 des PR-protéines: il s'agit des β -1,3 glucanases (Helleboid, 1998), mais aussi des chitinases. Dans des suspensions cellulaires de *Citrus*, Gavish *et al.* (1991) ont décrit des PR-protéines de classe 2 liés au processus d'embryogenèse somatique ; toutefois, ils ne signalent aucune différence au niveau des chitinases entre des lignées embryogènes ou non-embryogènes. En utilisant un antisérum dirigé contre les polypeptides acides de la classe des PR1 de tabac, ils montrent que les polypeptides qui réagissent sont strictement présents au niveau des suspensions embryogènes. Les PR protéines de la classe 1, n'ont pas de fonction particulière définie. Certains auteurs les associent cependant aux phénomènes de développement (Lotan et Fluhr, 1990b, Neale *et al.*, 1990, Ori *et al.*, 1990). Les PR protéines ainsi mises en évidence chez la chicorée pourraient être directement impliquées dans l'induction et le développement des structures embryogènes.

Protéines tissulaires

Au niveau tissulaire, trois classes de polypeptides peuvent être distinguées : les protéines constitutives, les protéines dont l'expression décroît ou augmente et enfin les polypeptides nouvellement synthétisés au cours du processus embryogène. La majorité des protéines révélées appartient aux deux premières catégories. Les différences observées au niveau quantitatif peuvent s'expliquer par une faible vitesse de renouvellement de ces polypeptides.

Pour les protéines qui apparaissent spécifiquement au cours de l'embryogenèse somatique, les variations quantitatives peuvent s'expliquer par la présence du glycérol. En effet, la protéine E22 apparaît plus tardivement en sa présence, mais elle est également détectée chez la variété Flash non embryogène. Nous pouvons supposer que ce polypeptide est riche en certains acides aminés et que le glycérol intervient au niveau des voies de synthèse de ceux-ci. Dans les

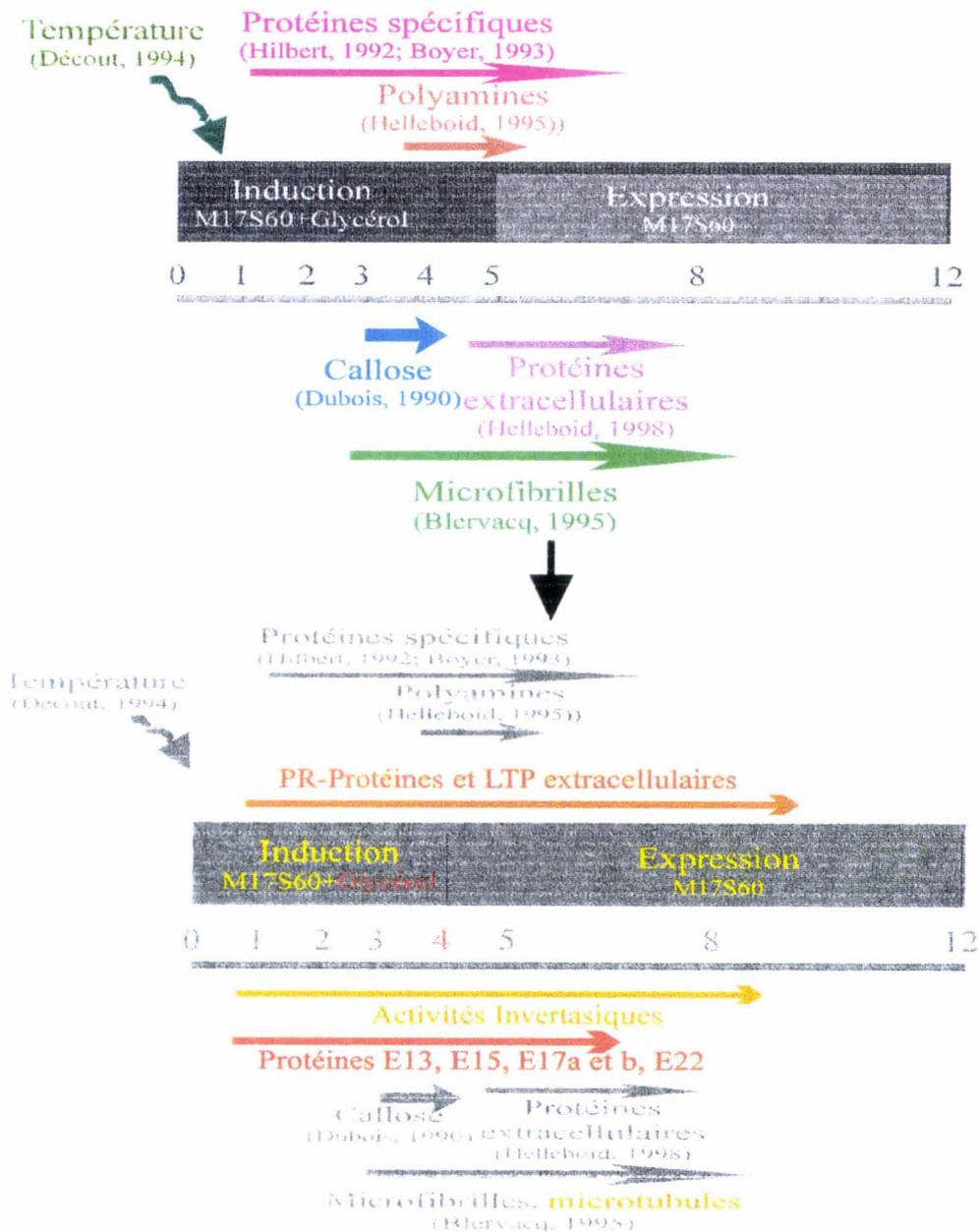
cellules d'érable, le glycérol et plus particulièrement le glycérol 3-phosphate inhibent la synthèse des acides aminés branchés dérivés de l'aspartate (Aubert *et al.*, 1994). La synthèse de E22 se trouve alors retardée.

La protéine E22 est une protéine liée au choc thermique (Décout, 1998); la culture étant réalisée à 35°C, sa présence n'est de ce fait pas surprenante. En revanche, nous n'expliquons pas le délai d'apparition de ce polypeptide en présence de glycérol sinon qu'il est impliqué dans le processus embryogène. Des protéines de stress thermique sont rarement associées au processus de morphogenèse, cependant, Györgyey *et al.* (1991) montrent que des protéines de stress thermique de faibles masses moléculaires joueraient un rôle spécifique, mais non précisé, au cours de l'induction des embryons somatiques chez la luzerne. Dans le cas de culture androgénétique, Bouchard *et al.* (1993) rapportent que de telles protéines sont directement impliquées dans le développement des microspores. Chez *Brassica napus* une liaison directe entre les protéines de choc thermique et l'embryogenèse haploïde peut être établie (Cordewener *et al.*, 1995).

Les protéines E17a et E17b n'ont pu être identifiées par séquençage. Leur présence a déjà été notée lorsque les tissus foliaires sont cultivés en milieu statique sans glycérol à partir du cinquième jour de culture (Décout, 1998). Leur présence au quatrième jour en milieu agité et leur retard d'apparition en présence de glycérol confirme que ces protéines sont en rapport avec le processus d'embryogenèse somatique chez la chicorée.

Les polypeptides tissulaires E13 et E15 sont synthétisés *de novo* ou peut-être apparaissent-elles comme de nouvelles isoformes suite à des modifications post-traductionnelles. Cependant leur absence chez la variété Flash fait de ces polypeptides des marqueurs de l'embryogenèse somatique chez la chicorée. Les polypeptides E13 et E15 ne sont pas détectés chez la variété Flash et ils sont à ce titre, comme les polypeptides E17a et b à associer au processus d'embryogenèse somatique.

En conclusion, nous avons abordé nos travaux de l'embryogenèse somatique de manière originale par l'étude du glycérol. Si notre travail ne répond pas de façon nette aux questions posées sur le déterminisme de l'embryogenèse somatique chez la chicorée, il contribue à fournir de nombreuses informations utiles à la compréhension du phénomène. Enfin, l'utilisation du glycérol au cours de la phase d'induction s'est avérée efficace et incontestable dans la recherche de marqueurs précoces. Nous pouvons ainsi améliorer et compléter le modèle chicorée.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aleith F. and Richter G.**, 1990. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta*, **183**: 17-24.
- Alizadeh S. and Mantell S.H.**, 1991. Early cellular events during direct somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solanum aviculare* Forst. *Ann. Bot.*, **67**: 257-263.
- Ammirato P.V.**, 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspension culture techniques and hormone requirements. *Bio/Technol.*, **1**: 68-74.
- Antoniw J.F., Kueh J.S.H., Walkey D.G.A, and White R.F.**, 1981. The presence of pathogenesis-related proteins in callus of Xanthi-nc tobacco. *Phytopath.*, **101**: 179-184.
- Aubert S., Gout E., Bligny R. and Douce R.**, 1994. Multiple effects of glycerol on plant cell metabolism. *J.Biol.Chem.*, **269**: 21420-21427.
- Babbar S.B. and Gupta S.C.**, 1986. Effect of carbon source on *Datura metel* microspore embryogenesis and the growth of callus raised from microspore-derived embryos. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **181**: 331-338.
- Bagnasco S., Balaban R., Fales H.M., Yang Y.M. and Burg M.**, 1986. Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *Journal of Biological Chemistry*, **261**: 5872-5877.
- Barron E. and Stumpf P.K.**, 1962. The biosynthesis of triglycerids in plants. *Biochem. Biophys. Acta*, **60**: 329-337.
- Beevers H.**, 1956. Utilisation of glycerol in the tissue of the germinating Castor bean. *Plant Physiol.*, **31**: 440-445.
- Beevers S H.**, 1961. Metabolic production of sucrose from fat. *Nature*, **191**: 433-436.
- Bellettre A., Couillerot J.P. and Vasseur J.**, 1999. Effects of glycerol on somatic embryogenesis in *Cichorium* leaves. *Plant Cell Rep.*, **18**: Sous presse.
- Ben-Amotz A. and Mordhay A.**, 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophitic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.*, **51**: 875-878.
- Ben-Hayyim G. and Kochba.**, 1982. Growth characteristics of tolerance of *Citrus* callus cell subjected to NaCl stress. *Pl. Sci. Lett.*, **27**: 87-94.
- Ben-Hayyim G. and Neumann H.**, 1983. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. *Z. Pflanzenphysiol.*, **110**: 331-337.
- Blervacq A.S., Dubois J., Dubois J. and Vasseur J.**, 1995. First divisions of somatic embryogenesis cells in *Cichorium* hybrid "474". *Protoplasma*, **186**: 163-168.

- Bligny R., Foray M.F., Roby C. and Douce R.**, 1989. Transport and phosphorylation of choline in higher plant cells. Phosphorus-31 magnetic resonance studies. *J.Biol.Chem.*, **264**: 4888-4895.
- Blum H., Beier H and Gross H.J.**, 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-99.
- Bouchard R.A., Frappier J.R.H., Liu L., Raizada M., Atkinson B.G. and Walden D.B.**, 1993. Developmentally-modulated expression of transcripts from stress-inducible gene families during microsporogenesis and gametophyte development in *Zea mays* L. *Maydica*, **38**: 135-144.
- Boulineau F., Kelechian V., Dore C. et Desprez B.**, 1994. Les chicorées. Sauve qui peut, sauve qui veut. INRA eds **6-7**: 26-28.
- Boyer C., Hilbert J.L. and Vasseur J.**, 1993. Embryogenesis related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium* *Plant Science*, **93**: 41-43.
- Boyer C., Hilbert J.L. and Vasseur J.**, 1994. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of the changes in protein patterns during early somatic embryogenesis in *Cichorium* tissues. *Plant Physiol.*, **13**: 183-189.
- Bradbeer D. and Stumpf P.K.**, 1960. Fat metabolism in higher plants. XIII. Phosphatidic acid synthesis and diglyceride phosphokinase activity and mitochondria from peanut cotyledons. *J. Lipid Res.*, **1**: 214-220.
- Briens M. and Larher F.**, 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free-proline. *Plant Cell Environ.*, **5**: 287-292.
- Bublitz C. and Wieland O.**, 1974. Enzymes of carbohydrate metabolism. *In: Method in Enzymology, Carbohydrates*. H.U.Bergmeyer, ed., Academic Press, New York, **10**: 354-361.
- Buffard-Morel J., Verdeil J.L. et Pannetier C.**, 1991. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. *Canadian Journal of Botany*, **70**: 735-741.
- Chaleff R.S. and Parsons M.F.**, 1978. Isolation of a glycerol-utilizing mutant of *Nicotiana tabacum*. *Genetics*, **89**: 723-728.
- Chen L.J. et Luthe D.S.**, 1987. Analysis of proteins from embryogenic and non- embryogenic rice (*Oriza sativa* L.) calli. *Plant Science*, **48**: 181-188.
- Cheniae G.**, 1965. Phosphatidic acid and glyceride synthesis by particles from spinach leaves. *Plant Physiol.*, **40**: 235-252.
- Choi J.H., Liu L.S., Borkid C. and Sung Z.R.**, 1987. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 1906-1910.
- Chrispeels MJ. And Maurel C.**, 1994. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells, *Plant Physiol.*, **105**: 9-13.

- Cordewener J.H.V., Booij H., Van der Zandt H., Van Engelen F., Van Kammen A. and De Vries S.**, 1991. Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxydase isoenzymes. *Planta*, **184**: 478-486.
- Couillerot J.P., Décout E., Warnot F., Dubois J. et Vasseur J.**, 1993. Evolution des polyamines libres en relation avec la source carbonée et l'embryogenèse somatique chez un *Cichorium* hybride. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **316**, série III, 299-305.
- Coutos-Thévenot P., Goebel-Tourand I., Mauro M.C., Jouanneau J.P., Boulay M., Deloire A. and Guern J.**, 1992a. Somatic embryogenesis from grapevine cells. I- Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **29**: 125-133
- Coutos-Thévenot P., Jouenne T., Maes O., Guerbette F., Grosbois M., Le Caer J.P., Boulay M., Deloire A., Kader J.C. and 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-Thévenot P., Maes O., Jouenne T., Mauro M.C., Jouanneau J.P., Boulay M., Deloire A. and Guern J.**, 1992b. Extracellular patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situation. *Plant Science*, **86**: 137-145.
- Cowan A.K., Rose P.D. and Horne L.G.**, 1992. *Dunaliella salina* : a model system for studying the response of plant cells to stress. *J. Exp. Bot.*, **43**: 257, 1535-1547.
- Davies H.V. and Chapman J.M.**, 1979. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. The influence of embryonic axis and testa on protein and lipid degradation. *Planta*, **146**: 579-584.
- De Jong A., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammen A.**, 1988. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Develop*, **2**: 462-476.
- De Vries S.C., Booij H., Janssens R., Vogels R., Saris L., Lo Schiavo F. and Van Kammen A. and De Vries S.**, 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, **4**: 425-433.
- De Vries S.C., Booij H., Meyerink P, Huisman G., Wilde H.D., Thomas T.L. and Van Kammen A.**, 1988a. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, **176**: 196-204.
- Décout E.**, 1993. "Embryogenèse somatique chez le *Cichorium* hybride "474": Evolution des polyamines". DEA GEBM Compiègne.
- Décout E., Dubois T., Guedira M., Dubois J., Audran J-C. and Vasseur J.**, 1994. Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. *J.Exp.Bot.*, **45**: 1859-1865.

- Deng Z., Zhang W. and Wang S.**, 1990. High frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration from cellular calli and protoplasts in *Citrus*. *Acta Biol. Exp. Sin.*, **23**: 143-145.
- Dijak M. and Simmonds D.H.**, 1988. Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Science*, **58**: 183-191.
- Dijkema C., Booij H., De Jager P.A., De Vries S.C., Schaafsma T.J. and Van Kammen A.**, 1990. Aerobic hexose metabolism in embryogenic cell lines of *Daucus carota* studied by ¹³C-enriched substrates. *In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, ed., 343-348.
- Domon J.M., Dumas B., Lainé E., Meyer Y., David A. and David H.**, 1995. Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. *Plant Physiol.*, **108**: 141-148.
- Dublin P.**, 1982. Embryogenèse somatique directe par fragments de feuilles de caféier arabusta. *Café, Cacao, Thé*, **25**: 237-242.
- Dubois T., Guedira M., Dubois J. and Vasseur J.**, 1990. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*. Is callose an early marker ? *Ann. Bot.*, **65**: 539-545.
- Dubois T., Guedira M., Dubois J. and Vasseur J.**, 1991. Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, **162**: 120-127.
- Dubois. T, Dubois J., Guedira M. et Vasseur J.**, 1988. Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium*: effets de la température et origine des embryoïdes. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **307**, série III, 669-675.
- Dudits D., Bogre L. and Gyorgyey J.**, 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J.Cell.Biol.*, **99**: 475-484.
- Eapen S. and George L.**, 1990. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in Finger Millet. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **22**: 87-93.
- El Maâtaoui M., Espagnac H. and Michaux-Ferrière N.**, 1990. Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of Cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. *Ann. Bot.*, **66**: 183-190.
- Esaka M., Enoki K., Kouchi B. and Sasaki T.**, 1990. Purification and characterization of abundant secreted protein in suspension cultured pumpkin cells. Abundant secreted protein may be a chitinase. *Plant Physiol*, **93**: 1037-1041.

- Everard J.D., Gucci R., Kann S.C., Flore J.A and Loescher W.H.**, 1994. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.*, **106**: 281-292.
- Feirer R.P., Mignon G. and Litvay J.D.**, 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science*, **223**: 1433-1435.
- Fellers J.P., Guenzi A.C. and Porter D.R.**, 1997. Markers protein associated with somatic embryogenesis of wheat callus cultures. *Journal of Plant Physiol.*, **151**: 201-208.
- Finer J.J.**, 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on an high sucrose containing medium. *Plant Cell Report*, **6**: 372-374.
- Franz G., Hatzopoulos P., Jones T.J., Krauss M. and Sung Z.R.**, 1989. Molecular and genetic analysis of an embryogenic gene, DC8, from *Daucus carota* L. *Mol. Gen. Genet.*, **218**: 143-151.
- Fujii S.**, 1991. The growth and intracellular ionic composition of *Dunaliella tertiolecta* in magnesium-rich media. *Plant Cell Physiol.*, **32**: 549-554.
- Galiba G. and Yamada y.**, 1988. A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissue culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Report*, **7**: 55-58.
- Garcia-Agustin P., Benaches-Gastaldo M.J. and Primo-Millo**, 1992. Lipid mobilization in *Citrus* cotyledons during germination. *J. Plant Physiol.*, **140**: 1-7.
- Gaskin F. and Cantor C.**, 1974. Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J.Mol.Biol*, **89**: 737-758.
- Gautheret R.J.**, 1948. Sur l'utilisation du glycérol par les cultures de tissus végétaux. *Compt. rend. soc. biol.*, **142**: 808-810.
- Gautheret R.J.**, 1959. Culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson, ed., Paris, 256p.
- Gavalas N.A., Caravatas S. and Manetas Y.**, 1982. Factors affecting a fast and reversible inactivation of photosynthetic phosphoenol pyruvate carboxylase. *Photosynthetica*, **16**: 49-58.
- Gavish H., Vardi A. and Fluhr R.**, 1988. Alternative model system for plant embryogenesis. In: The second international congress of plant molecular biology, Jerusalem, Abstract, **467**.
- Gavish H., Vardi a. and Fluhr R.**, 1991. Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar callus. *Physiol. Plant.*, **82**: 606-616.
- Gekko K. and Timasheff S.N.**, 1981a. Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, **20**: 4667-4676.

- Gekko K. and Timasheff S.N.**, 1981b. Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry*, **20**: 4677-4686.
- Giroux R.W. and Pauls K.P.**, 1997. Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, **33**: 393-404.
- Gleddie S., Keller W. and Setterfield G.**, 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena*. *Can. J. Bot.*, **61**: 656-666.
- Godt D.E. and Roitsch T.**, 1997. Regulation of tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol.*, **115**: 273-282.
- Goupil P., Croisille Y., Croisille F. and Ledoigt G.**, 1988. Jerusalem artichoke invertases. Immunocharacterization of a soluble form and its putative precursor. *Plant science*, **54**: 54-64.
- Goupil P., Hatzopoulos P., Franz G., Hempel F.D., You R. and Sung Z.R.**, 1992. Transcriptional regulation of a seed-specific carrot gene, DC8. *Plant Molecular Biology*, **18**: 1049-1063.
- Grout B.W., Chann K.W. and Simpkins I.**, 1976. Aspects of growth and metabolism in a suspension culture of *Acer pseudoplatanus* L. grown on a glycerol carbon source. *J. Exp. Bot.*, **27**: 77-86.
- Guedira M., Dubois T., Dubois J. et Vasseur J.**, 1989. Embryogénèse somatique directe à partir de cultures d'anthères du *Cichorium* (Asteraceae). *Can. J. Bot.*, **67**: 970-976.
- Guedira M., Dubois T.; Dubois J. et Vasseur J.**, 1990. Influence du saccharose sur le rendement, la morphologie et le développement des embryons somatiques chez *Cichorium*. *C.R.Acad.Sci.Paris*, **310**: 453-459.
- Guzzo F., Baldan B., Levi M., Sparvolli E., Lo Schiavo F., Terzi M. and Mariani P.**, 1995. Early cellular events during induction of carrot explants with 2,4-D. *Protoplasma*, **185** :28-36.
- Guzzo F., Baldan B., Mariani P., Lo Schiavo F. and Tarzi M.**, 1994. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J. Exp. Bot.*, **45** :1427-1432.
- Györgyey J., Gartner A., Nemeth K., Magyar Z., Hirt H., Herberle-Bors E. and Dudits D.**, 1991. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, **16**: 999-1007.
- Hahne G., Mayer J.E. and Lörz H.**, 1988. Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass *Dactylis aglomerata* L. *Plant Science*, **55**: 267-279.
- Halperin W. and Jensen W.A.**, 1967. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cells cultures. *J.Ultrastruct.Res.*, **18**: 428-443.
- Hanning G.E. and conger B.V.**, 1982. Embryoid and plantlet formation from leaf segments of *Dactylis glomerata* L., *Theor. Appl. Genet.*, **63**:155-159.

- Hatzopoulos P., Fong F. and Sung Z.R.**, 1990. Abscisic acid regulation of DC8, a carrot embryogenic gene. *Plant Physiol.*, **94**: 690-695.
- Heirwegh K.M.G, Banerjee N., Van Nerum K. and De Langhe E.**, 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cichorium intybus* L. (witloof, Compositae). *Plant Cell Rep.*, **4**: 108-111.
- Helleboid S., Bauw G., Belingheri L., Vasseur J. and Hilbert J.L.**, 1998. Extracellular β -1-3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta*, **205**: 56-63.
- Helleboid S., Couillerot J.P., Hilbert J.L. and 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.
- Hellebust J.A.**, 1976. Osmoregulation. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, **27**: 485-505.
- Heller R.**, 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, **14**: 1-223.
- Hilbert J.L, Dubois T. and Vasseur J.**, 1992. Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiol. and Biochemistry*, **30**: 733-741.
- Hilbert J.L. and Martin F.**, 1988. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus*. *New Phytol.*, **110**: 339-346.
- Hildebrandt A.C. and Riker A.J.**, 1949. The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, Paris-Daisy, periwinkle, sunflower, and tobacco tissue *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, **36**: 75-85.
- Hippman H. and Heinz E.**, 1976. Glycerol kinase in leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* **79**: 408-418.
- Hochstrasser D.F., Harrington M.G., Hochstrasser A.C., Miller M.J. and Merrill C.R.**, 1988. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **173**: 424-435.
- Huang A.H.C. and Moreau R.A.**, 1978. Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination. *Planta*, **141**: 111-116.
- Huang A.H.C.**, 1975. Enzymes of glycerol metabolism in the storage tissues of fatty seedlings. *Plant Physiol.*, **55**: 555-558.
- Huang B.Q., Ye X.L., Zee S.Y. and Yeung E.C.**, 1997. Early events in rice somatic embryogenesis: changes in cortical microtubule distribution and orientation. *In vitro Cell Development Biology-Plant*, **33**: 275-279.
- Hugues M.A, Dunn M.A., Pearce R.S., White A.J. et Zhang L.**, 1992. An abscisic- acid response, low temperature barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. *Plant cell environ.*, **15** : 961-965.

- Hush J.M. and Overall R.L.**, 1992. Re-orientation of cortical F-actin is not necessary for wound-induced microtubule re-orientation and cell polarity establishment. *Protoplasma*, **169**: 97-106.
- Hush J.M., Hawes C.R. and Overall R.L.**, 1990. Interphase microtubules re-orientation precedes a new cell polarity in wounded pea roots. *Journal of cell science*, **96**: 47-61.
- Hutchinson M.J., Murr D., Krishnaraj S., seneratna T and Saxena P.K.**, 1997. Does ethylene play a role in thidiazuron-regulated somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures ? *In vitro Cell Dev.Biol.Plant*, **33**: 136-141.
- Hutton D. and Stumpf P.K.**, 1969. Fat metabolism in higher plants XXXVII. Characterization of the β -oxidation systems from maturing and germinating castor bean seeds. *Plant Physiol.*, **44**: 508-516.
- Jeannin G., Bronner R. et Hahne G.**, 1993. Embryogenèse somatique induite sur l'embryon zygotique immature de tournesol cultivé *in vitro*: rôle du saccharose. XIIème colloque de la section française de l'IAPTC, Montpellier, 16/17 novembre 1993, 18p.
- Jones A. and Veliky I.A.**, 1980. Growth of plant cell suspension cultures on glycerol as a sole source of carbon and energy. *Can. J. Bot.*, **58**: 648-657.
- Jorgensen O.S. and Andersen B.**, 1973. An improved glucose oxidase-peroxysade coupled assay for β -fructosidase activity. *Analytical Biochem.*, **53**: 141-145.
- Kaczyna F. and Megnet T.R.**, 1993. The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophycées). *Hydrobiologia*, **268**: 57-64.
- Karabourniotis G., Manetas Y. and Gavalas N.A.**, 1983. Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. *Plant Physiol.*, **73**: 735-739.
- Keller B., Sauer N. and Lamb C.J.**, 1988. Glycine-rich cell wall proteins in bean: Gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.*, **7**: 3625-3633.
- Kennedy E.P.**, 1974. Enzymes of lipid metabolism. *In: Method in enzymology: Lipids.* H.U.Bergmeyer, ed., Academic Press, New York, **5**:476- 480.
- Kikuchi A., Satoh S., Nakamura N. and Fujii T.**, 1995. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. *Plant cell Reports*, **14**: 279-284.
- Kiyosue T., Satoh S., Kamada H. and Harada H.**, 1992. Immunological detection of an embryogenic cell protein (ECP31) during stress induced somatic embryogenesis in carrot. *Can. J. Bot.*, **70**: 651-653.
- Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kamada H. and Harada H.**, 1993. cDNA cloning of ECP40, an embryogenic cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, **21**: 1053-1068.

- Kochba J. and Spiegel-Roy H.**, 1977. The effect of auxins, cytokinins and inhibitors of embryogenesis in habituated ovular callus of the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.*, **81**: 283-288.
- Kochba J., Spiegel-Roy H., Neumann H. and Saad S.**, 1978. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, ethephon, CCC and alar and its suppression by GA₃. *Z. Pflanzenphysiol.*, **89**: 427-432.
- Kochba J., Spiegel-Roy H., Neumann H. and Saad S.**, 1982. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. *Z. Pflanzenphysiol.*, **105**: 359-368.
- Krall J.P., Edwards G.E. and Andreo C.S.**, 1989. Protection of pyruvate, Pi-Dikinase from maize against cold lability by compatible solutes. *Plant Physiol.*, **89**: 280-285.
- Kysely W. and Jacobsen H.J.**, 1990. Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **20**: 7-14.
- Laemmli U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Laparra H., Bronner R. and Hahne G.**, 1997. Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heiser. *Protoplasma*, **196**: 1-11.
- Lawlor H.J., McComb J.A. and Borowitzka**, 1989. Tissue culture of *Ecklonia radiata* (Phaeophyceae, Lamiriales): effects on growth of light, organic carbon source and vitamins. *J. Appl. Phycol.*, **1**: 105-112.
- Lazzeri P.A., Hildebrand D.F. and Collins W.J.**, 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional physical and chemical factors. *Plant cell tissue and Organ culture*, **10**: 209-220.
- Lewis D.H. and Smith D.C.**, 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytol.*, **66**: 143-184.
- Lin Y.H. and Huang A.H.C.**, 1983. Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **225**: 360-369.
- Lin Y.H., Moreau R.A. and Huang A.H.C.**, 1982. Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacyl-glycerol in the cotyledons of soybean seedlings growth. *Plant Physiol.*, **70**: 108-112.
- Lin Y.H., Wimer L.T. and Huang A.H.C.**, 1983. Lipase in lipid bodies of corn scutella during seedling growth. *Plant Physiol.*, **73**: 460-463.
- Litz R.E.**, 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **111**: 969-972.
- Lo Schiavo F., Giuliano G., De Vries S.C., Genga A., Bollini R., Pitto L., Cozzani F., Nuti-Ronchi V. and Terzi M.**, 1990. A carrot cell wall variant temperature sensitive for somatic

- embryogenesis reveals a defect in the glycolysation of extracellular proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **223**: 385-393.
- Lotan R and Fluhr R.**, 1990. Xylanase , a novel elicitor of pathogenesis related proteins in tobacco, uses a non ethylene pathway for induction. *Plant Physiol.*, **95**: 811-817.
- Lu C.C., Currah L. and Peffley E.B.**, 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid *Allium fistulosum* x *A. cepa* F1 hybrid onions. *Plant Cell Reports*, **7**: 696-700.
- Mac Donald F.D. and Ap Rees T.**, 1983. Labelling of carbohydrate by ¹⁴C glycerol supplied to suspension cultures of soybean. *Phytochemistry*, **22**: 1141-1143.
- Maeshima M. and Beevers H.**, 1985. Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean. *Plant Physiol.*, **79**: 489-493.
- Manetas Y.**, 1982. Changes in properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from the CAM plant *Sedum praealtum* DC. upon light/dark transition and their stabilization by glycerol. *Photosynth. Res.*, **3**: 321-333.
- Manetas Y., Petropoulos Y. and Karabourniotis G.**, 1986. Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase of C₄ halophytes. *Plant Cell Environ.*, **9**: 145-151.
- Maretski A. and Thom M.**, 1978. Characteristics of galactose-adapted sugarcane cell line grown in suspension culture. *Plant Physiol.*, **61**: 544-548.
- Masuda H., Oohashi S.I., Tokuji Y. and Mizue Y.**, 1995. Direct embryo formation from epidermal cells of carrot hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*, **145**: 531-534.
- Mazliak P.**, 1968. Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures, MASSON ed., Paris, 139-153.
- Meijer E.A., De Vries S.C., Sterck P., Gadella Jr D.W.J., Wirtz K.W.A. and Hendriks T.**, 1993. Characterization of the non-specific lipid transfer protein EP2 from carrot (*Daucus carota* L.). *Mol. Cell Biochem.*, **123**: 159-166.
- Meijer E.G.M. and Brown D.C.W.**, 1987. A novel system for rapid high frequency in somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol. Plant.*, **69**: 591-596.
- Menendez-Yuffa A. and Garcia de Garcia E.**, 1997. Morphogenetic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma*, **199**: 208-214.
- Michaux-Ferrière N., Grout H. and Carron M.P.**, 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Amer.J.Bot.*, **79**: 174-180.
- Minocha S.C., Papa N.S., Khan A.J. and Samuelsen A.I.**, 1991. Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. III. Effects of methylglyoxal bis(guanyldrazone). *Plant Cell Physiology*, **32**: 395-402.

- Moire L., Schmutz A., Buchala A., Yan B., Stark R.E. and Ryser U.**, 1999. Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiology*, **119**: 1137-1146.
- Montague M.J., Koppenbrik J.W. and Jaworski E.G.**, 1978. Polyamin metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*: I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.*, **62**: 430-433.
- Morel G. and Wetmore R.H.**, 1951. Fern callus tissue culture. *Amer.J.Bot.*, **38**: 141-143.
- Murashige T. and Skoog F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- Muto S. and Beevers H.**, 1974. Lipase activities in castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.*, **54**: 23-28.
- Nadel B.L., Altman A. and Ziv M.**, 1990. Regulation of somatic embryogenesis in celery suspensions, 2. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronised cell cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **20**: 119-124.
- Nakamura T., Taniguchi T. and Maeda E.**, 1992. Studies on somatic embryogenesis in coffee by scanning electron microscope. *Japanese Journal of Crop Science*, **66**: 476-486.
- Nash D., Paleg L.G. and Wiskich J.T.**, 1982. Effect of proline, betaine and some other solutes on the heat stability of mitochondrial enzymes. *Aust. J. Plant Physiol.*, **9**: 47-57.
- Neale A.D., Wahleithner J.A., Lund M., Bonnett H.T., Kelly A., Meeks-Wagner D.R., Peacock W.J. and Dennis E.S.**, 1990. Chitinase, b-1,3 glucanase, osmitin and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell*, **2**:673-674.
- Nickell L.G. and Burkholder P.R.**, 1950. Atypical growth of plants II. Growth *in vitro* of virus tumors of *Rumex* in relation to temperature, pH and various sources of nitrogen, carbon and sulfur. *Amer. J. Bot.*, **37**: 538-547.
- Nielsen K.A. and Hansen I.B.**, 1992. Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley.
- Nishisawa S., Sakai A., Amano O.Y. and Matsuzawa T.**, 1992. Cryopreservation of *Asparagus officinalis* L.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *Cryo-Letters*, **13**: 379-388.
- Nomura K. and Komamine A.**, 1985. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.*, **79**: 988-991.
- Nomura K. and Komamine A.**, 1986. Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. *Oxford Surv.Plant.Mol.Cell.Biol.*, **3**:456-466.
- Nouaille C. et Pétiard V.**, 1988. Semences artificielles: rêves et réalités. *Biofutur*, **avril**: 33-38.

- Ori N., Sessa G., Lotan T, Himmelhoch S. and Fluhr R,** 1990. A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J.***9**:3429-3436.
- Ory R.L.,** 1969. Acid lipase of the castor bean. *Lipids*, **4**: 177-185.
- Paleg L.G., Douglas T.J., Van Daal A. and Keech D.B.,** 1981. Proline, betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol.*, **8**: 107-114.
- Pedroso M.C. and 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.
- Pedroso M.C. and Pais M.S.,** 1995a. Explant region specific embryogenic competence and plant recovery in *Camellia japonica* L. *In Vitro Cell Development Biology*, **31**: 8-14.
- Pedroso M.C. and Pais M.S.,** 1995b. Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **43**: 147-154.
- Pedroso M.C., Hilbert J.L., Vasseur J. and Pais M.S.,** 1995c. Polypeptides associated with the induction of direct somatic embryogenesis in *Camellia japonica* leaves. Identification of embryo-specific polypeptides. *J. Exp. Bot.*, **46**: 1579-1584.
- Péllissier B., Bouchefra O., Pepin R. and Freyssinet G.,** 1990. Production of isolated somatic embryos from sunflower thin cell layers. *Plant Cell Reports*, **9**: 47-50.
- Perry H.J. and Harwood J.L.,** 1993. Use of (2-³H) glycerol precursor in radiolabelling studies of acyl lipids in developing seeds of *Brassica napus*. *Phytochem.*, **34**: 69-73.
- Plant A.L, Cohen A.S., Moses M.S. and Bray E.A.,** 1991. Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced gene of tomato. *Plant Physiol.*, **97** : 900-906.
- Podesta F.E. and Andreo C.S.,** 1989. Maize leaf phospho-enolpyruvate carboxylase. Oligomeric state and activity in the presence of glycerol. *Plant Physiol.*, **90**: 427-433.
- Pramanik S.K. and Bewley J.D.,**1996. Post-transcriptional regulation of protein synthesis during alfalfa embryogenesis: Proteins associated with the cytoplasmique polysomal and non-polysomal mRNAs (messenger ribonucleoprotein complex). *J. Exp. Bot.*, **47**: 1871-1879.
- Reinert J.,** 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften*, **45**: 344-345.
- Robaina R.R., Garcia-Reina G. and Luque A.,** 1990. The effects of the physical characteristics of the culture medium on the development of red deaweeds in tissue culture. *Hydrobiologia*, **204**: 137-142.

- Robatche-Claive A.S., Couillerot J.P., Dubois J., Dubois T. and Vasseur J., 1992.** Embryogenèse somatique directe dans les feuilles du *Cichorium* hybride "474": synchronisation de l'induction. C.R. Acad. Sci. Paris, **314**, série III, 371-377.
- Roberts L.W. and Baba S., 1982.** Glycerol and *myo*-inositol as carbon sources for the induction of xylogenesis in explants of *Lactuca*. Can. J. Bot., **60**: 1204-1206.
- Roberts L.W., 1976.** Cytodifferentiation in plants. Xylogenesis as a model. Cambridge University Press, London.
- Roitsch T., Bittner M. and Godt D.E., 1995.** Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue specific expression suggests a role in sink source regulation. Plant Physiol., **108**: 285-294.
- Rugini E., 1988.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). Plant Cell Tissue and Organ Cult. , **14**: 207-214.
- Sadava D. and Moore K., 1987.** Glycerol metabolism in higher plants: glycerol kinase. Biochem. Biophys. Res. Com., **143**: 977-983.
- Sagare A.P., Suhasini K. and Krishnamurthy K.V., 1995.** Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Sci., **109**: 87-93.
- Salahas G., Manetas Y. and Gavalas N.A., 1990.** Effects of glycerol on the *in vitro* stability and regulatory activation/inactivation of pyruvate, orthophosphate dikinase of *Zea mays* L. Photosynthesis Research., **26**: 9-17.
- Scala J. and Semersky F.E., 1971.** An induced fructose-1,6-diphosphatase from cultured cells of *Acer pseudoplatanus* (english sycamore). Phytochemistry, **10**: 567-570.
- Schmidt E.D.L., Guzzo F., Toonen M. and De Vries S.C., 1997.** A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell competent to form embryos. Development, **124**: 2049-2062.
- Schulz A., 1988.** Vascular differentiation in the root cortex of peas: premitotic stages of cytoplasmic reactivation. Protoplasma, **143**: 176-187.
- Selioneti E., Nikolopoulos D. and Manetas Y., 1987.** Organic cosolutes as stabilizers of phosphoenolpyruvate carboxylase in storage: an interpretation of their action. Aust. J. Plant Physiol., **14**: 203-210.
- Shirahashi K., Hayakawa S. and Sugiyama T., 1978.** Cold lability of pyruvate orthophosphate dikinase in the maize leaf. Plant Physiol., **62**: 826-830.
- Silva M.P. and Ricardo C.P.P., 1992.** β -fructosidases and *in vitro* dedifferentiation-redifferentiation of carrot cells. Phytochem., **31**: 1507-1511.

- Stamatakis K., Gavelas N.A. and Manetas Y.**, 1988. Organic cosolutes increase the catalytic efficiency of from *Cynodon dactylon* L. Pers., apparently through self-association of the enzymatic protein. *Aust. J. Plant Physiol.*, **15**: 621-631.
- Starrantino A. and Caponnetto P.**, 1991. Effect of cytokinins on embryogenic callus formation from undeveloped ovules of orange. *Acta Hort.*, **280**: 191-194.
- Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., Van Kammen A. and De Vries S.C.**, 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*, **3**: 907-921.
- Stewart F., Mapes M. and Smith J.**, 1958. Growth and organised development of cultured cells. *A. J. Bot.*, **45**: 693-713.
- Stirn S. and Jacobsen H.J.**, 1987. Marker proteic for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Reports* **6**: 50-54.
- Stolarz A., Macewicz J. and Lorz H.**, 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, **137**: 347-357.
- Strickland S., Nichol J.W., McCall C.M. and Stuart D.A.**, 1987. Effect of carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. *Plant Science*, **48**: 113-121.
- Strickland S.G., Nichol J.W., Mac Call C.M. and Stuart D.A.**, 1987. Effect of carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. *Plant Science*, **48**: 113-121.
- Stumpf P.K. and Bradbeer C.**, 1959. Fat metabolism in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **10**, 197-222.
- Stumpf P.K. and Conn E.E.**, 1988. Hexose phosphate metabolism. In: *The biochemistry of plants, a comprehensive treatise*, **14**: 21, Stumpf P.K., ed., Academic press New York.
- Stumpf P.K.**, 1955. Fat metabolism in higher plants III. Enzymatic oxydation of glycerol. *Plant Physiol.*, **30**, 55-58.
- Sturm A. and Chrispeels M.**, 1990. CDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and infection. *Plant Cell*, **2**: 1107-1119.
- Sung Z.R. and Okimoto R.**, 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proceedings of National Academy of Science USA*, **78**: 3683-3687.
- Swedlund B. and Locy R.D.**, 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in two-year old cultures of *Zea diploperennis*. *Plant Cell Reports*, **7**: 144-147.
- Toonen M.A.J., Schmidt E.D., Hendriks T., Verhoeven H.A., van Kammen A. and De Vries S.C.**, 1994. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures video cell tracking. *Planta*, **194**: 565-572.

- Towbin H., Staehelin T.V. and Gordon J.**, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **76**: 4350-4353.
- Uedan K. and Sugiyama T.**, 1976. Purification and characterization of phospho-enolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.***57**: 906-910.
- Van Engelen F.A., Sterk P., Booij H., Cordewener J.H.G, Rook W., Van Kammen A.B. and De Vries S.C.**, 1991. Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. *Plant Physiol.*, **96**: 705-712.
- Vardi A., Spiegel-Roy P. and Galun E.**, 1982-a. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.*, **62**: 171-176.
- Vardi A., Spiegel-Roy P., Ben-Hayyim and Galun E.**, 1982-b. Protoplasts derived plants and fusion experiments in different *Citrus* species. 5th Int. Congress on Plant and Tissue Cell Culture, Tokyo, Japan.
- Vasil I.K., Hildebrandt A.C. and Riker A.J.**, 1964. Endive plantlets from freely suspended cells and cell groups grown *in vitro*. *Science*, **146**: 76-77.
- Vasil V. and Vasil I.K.**, 1987. Formation of callus and somatic embryos from protoplasts of a commercial hybrid of maize (*Zea mays* L.), *Theor. Appl. Genet.*, **73**: 793-798.
- Verma D.C. and Dougall D.K.**, 1977. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiol.*, **59**: 81-85.
- Vieitez A.M. and Barciela J.**,1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **21**: 267-274.
- Visser J., VanRooijen R., Dijkema C., Swart K. and Sealy-Lewis H.M.**, 1988. Glycerol uptake mutants of the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *J.Gen.Microbiol.*, **134**: 655-659.
- Vu J.C.V., Niedz R.P. and Yelonowsky G.**, 1993. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis, and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of "Hamlin" sweet orange. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **33**: 75-80.
- Wang L., Huang B., He M. and Hao S.**, 1990. Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta*. *Ann.Bot.*, **65**: 271-276.
- Wang Z., Quebedeaux B. and Stutte G.W.**, 1996. Partitioning of [¹⁴C]glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. *Aust. J. Plant Physiol*, **23**: 245-251.
- Weber N. and Taylor D.C.**, 1990. Biosynthesis of triacylglycérols in plant cell and embryo cultures: their significances in the breeding of oil plants. *In: Progress in plant cellular and molecular*

- biology. (Proceedings of the international congress on plant tissue and cells culture. Amsterdam, The Netherlands: 24-29 juin 1990), H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas, eds. Kluwer Acad. Publish., Dordrecht, Boston, London: 324-331.
- Weil M. and Rausch T.**, 1990. Cell wall invertase in tobacco crown gall cells. *Plant Physiol.*, **94**: 1575-1581.
- Wetherell D.F. and Dougall D.K.**, 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.*, **37**: 97-103.
- Wetherell D.F.**, 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultures wild carrot cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **3**: 221-227.
- Wilde H.D., Nelson W.S., Booij H., De Vries S.C and Thomas T.L.**, 1988. Gene expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta*, **176**: 205-211.
- Williams E.G. and Maheswaran G.**, 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenetic group. *Ann. Bot.*, **57**: 443-462.
- Wurtele E.S., Wang H., Durgerian S., Nikolau B.J and Ulrich T.H.**, 1993. Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol.*, **102**: 205-247.
- Yeung E.C.**, 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A., ed. *In vitro embryogenesis*. Dordrecht, Netherlands: kluwer Academic Publishers; 1995: 205-247.
- Yoon Y., Török N., Krueger E., Oswald B. and McNiven M.A.**, 1998. Ethanol-induced alterations of the microtubule cytoskeleton in hepatocytes. **274**: 757-756.
- Zabrecky and Cole R.D.**, 1979. Tubulin does not bind glycerol irreversibly. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **91**: 755-760.
- Zee S.Y., Tam P.C. and Huang J.W.**, 1996. Cellular changes in rice scutellum epithelial cells. In: Xu, Z.H.; Chen Z.H., eds. *Plant Biotechnology for sustainable development and agriculture*. Beijing, China: China Forestry Publishing House, 139-143.
- Zimmerman J.L.**, 1993. Somatic embryogenesis : A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, **5**: 1411-1423.
- Zivy M.**, 1986. Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent, In: *Recent progress in two-dimensional electrophoresis*, Galteau M.M. and Siest G. Eds., Presses Universitaires de Nancy, Nancy, 69-72.

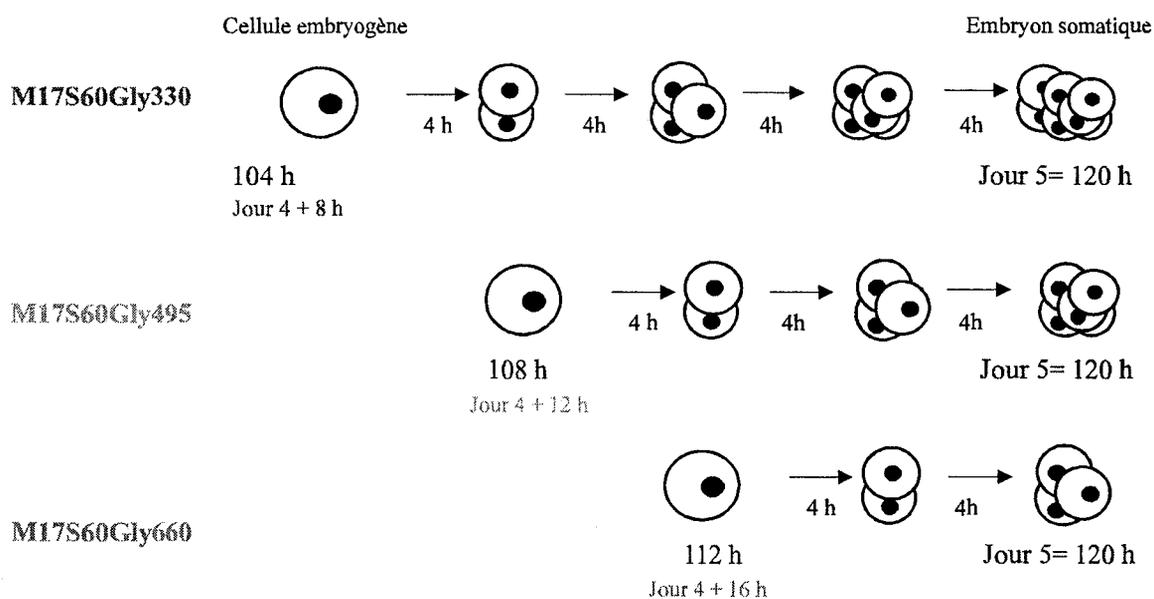
Annexes

Annexe I

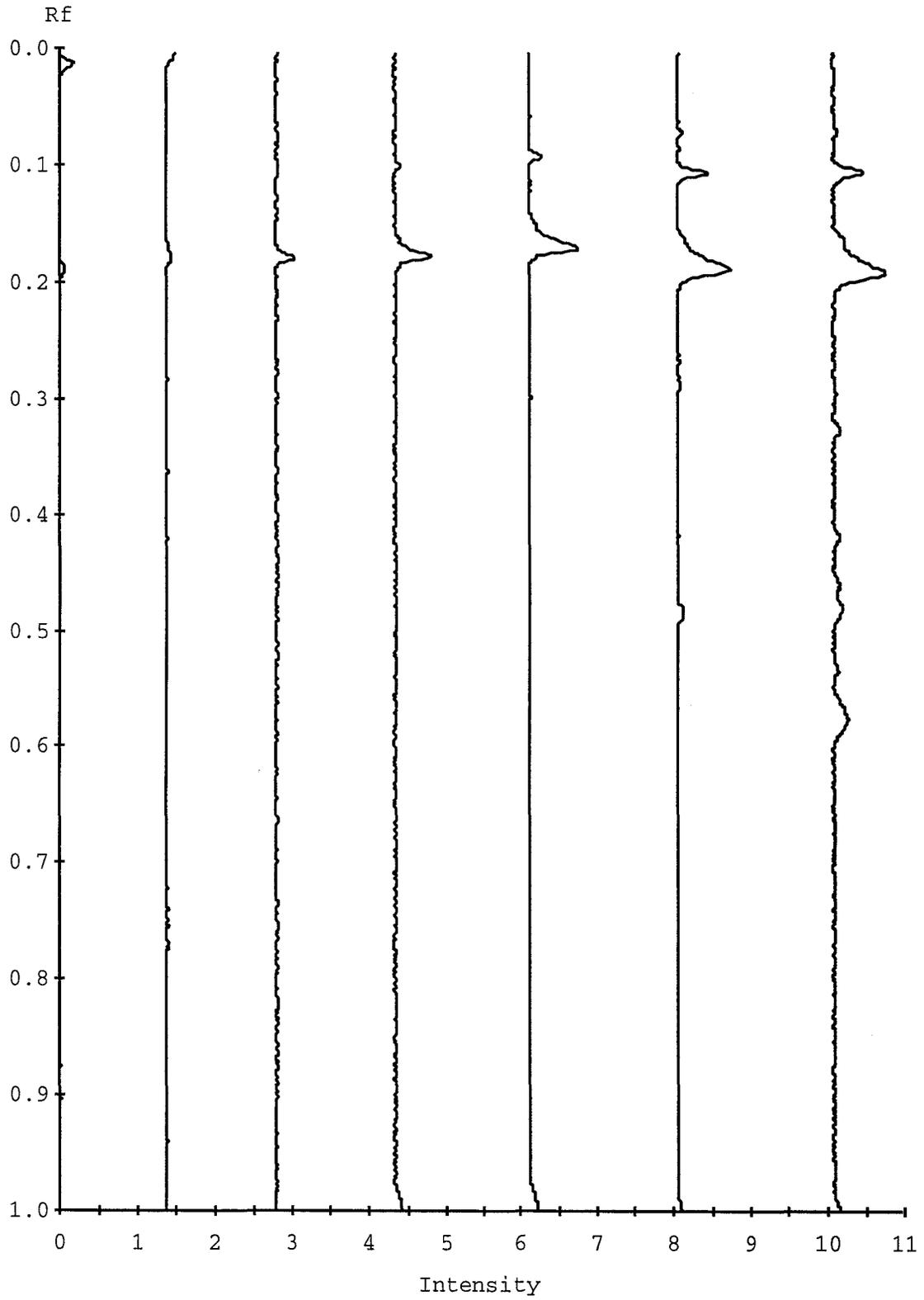
On considère une cellule comme une sphère et on calcule le volume d'une cellule embryogène, d'un embryon somatique et des cellules qui le composent (Fig. 9). Ces calculs ont pour but de déterminer à quel moment est survenue la première division de la cellule embryogène.

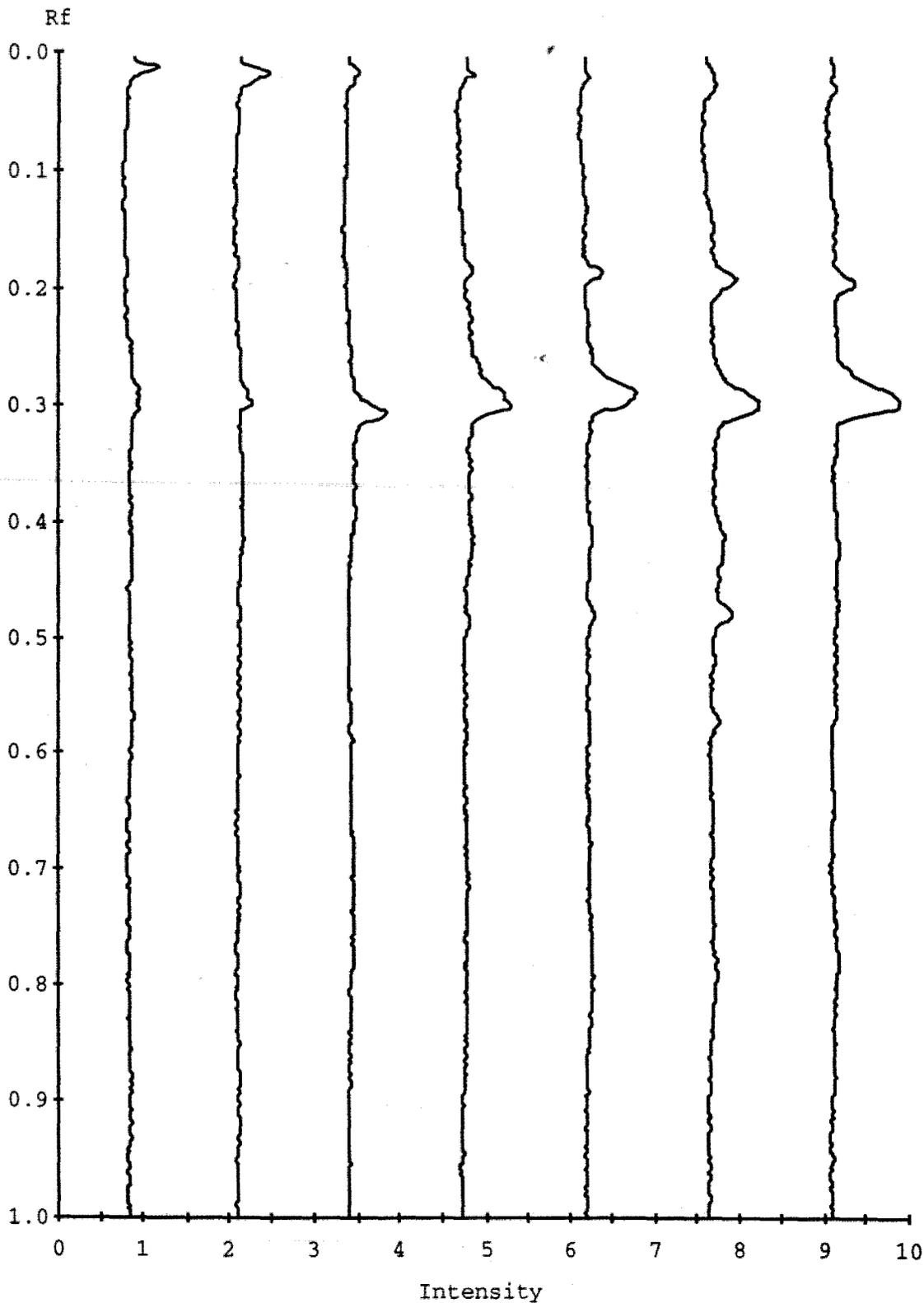
- Volume d'une cellule embryogène : $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3 = \frac{4}{3} \times \pi \times 60^3 = 904\,320 \mu\text{m}^3$.
- Volume d'un embryon somatique : $\frac{4}{3} \times \pi \times 70^3 = 1\,436\,027 \mu\text{m}^3$.
- Volume d'une cellule embryonnaire : $\frac{4}{3} \times \pi \times 20^3 = 65\,416 \mu\text{m}^3 \Leftrightarrow 1\,436\,027 / 65\,416 \approx 20$ cellules.

La cellule embryogène initiale aurait donc subi 4 divisions successives. Si on considère qu'un cycle cellulaire chez la chicorée dure 4 heures (Dubois, communication personnelle), la division a lieu entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour.



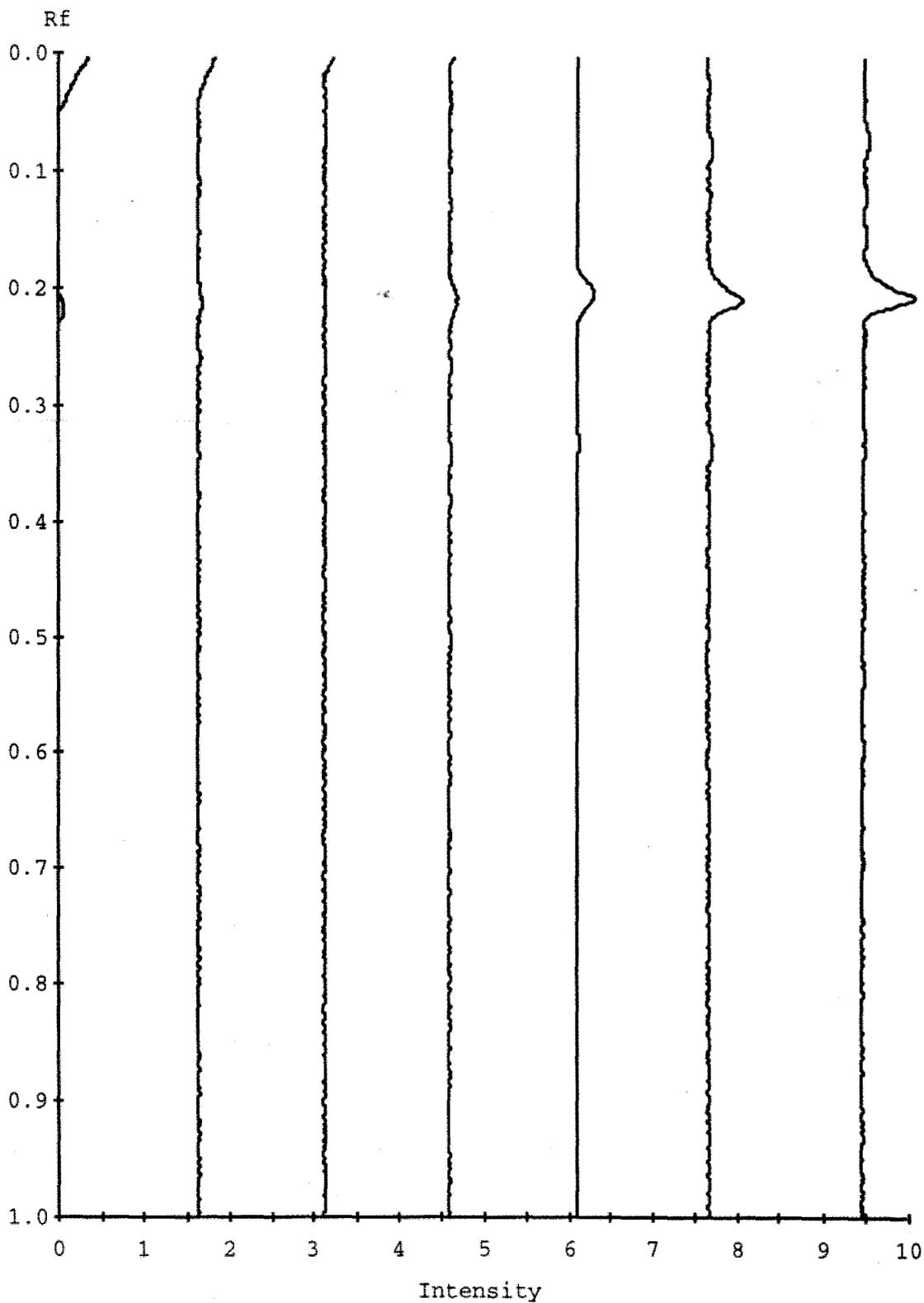
Annexe II



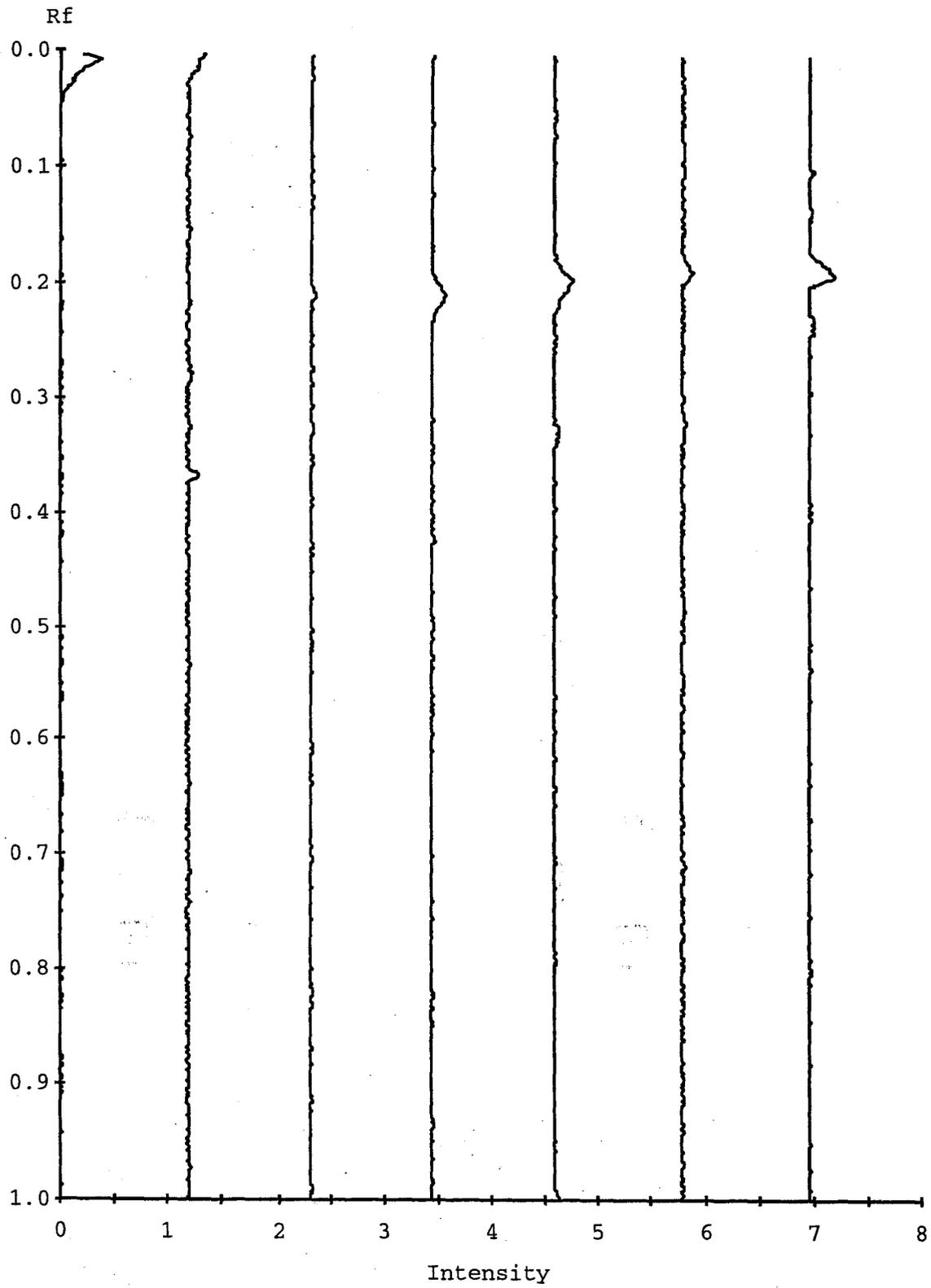


— alphasubG:1 — alphasubG:2 — alphasubG:3
— alphasubG:4 — alphasubG:5 — alphasubG:6
— alphasubG:7

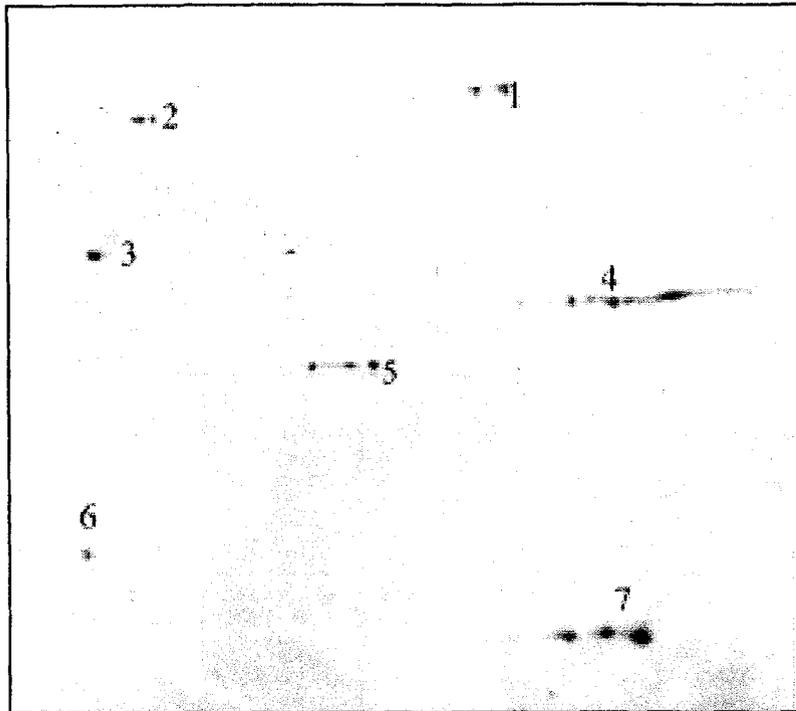
Annexe III



betatubS:2 betatubS:3 betatubS:4
betatubS:5 betatubS:6 betatubS:7
betatubS:8



betatubG:2 betatubG:3 betatubG:4
betatubG:5 betatubG:6 betatubG:7
betatubG:8

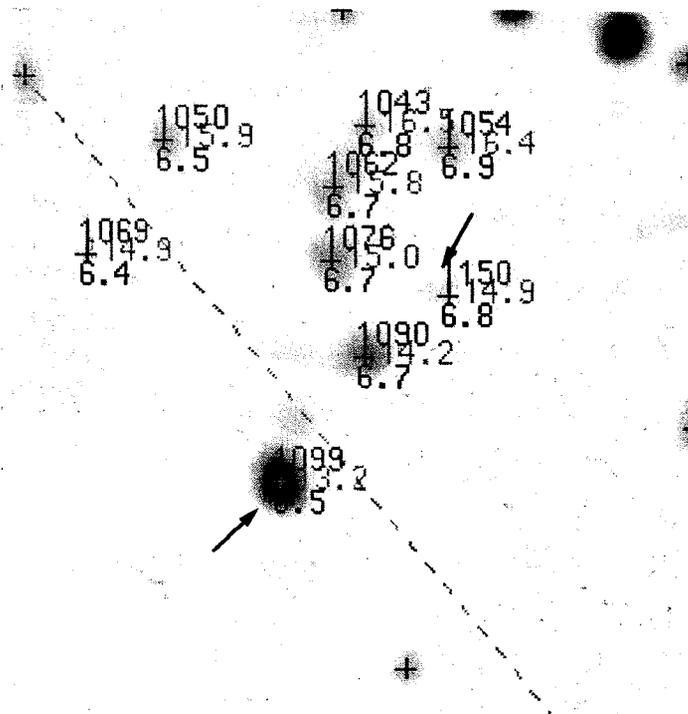
Annexe IV

Marqueurs protéiques standards de deuxième dimension après révélation argentique (Bio-Rad®).

	Protéines standards	Point isoélectrique	Masses moléculaire
1	Hen egg white conalbumin	6 ; 6,3 ; 6,6	76
2	Bovine serum albumin	5,4 ; 5,5 ; 5,6	66,2
3	Bovine muscle actin	5 ; 5,1	43
4	GAPDH rabbit muscle	8,3 ; 8,5	36
5	Bovine carbonic anhydrase	5,9 ; 6	31
6	Soybean trypsin inhibitor	4,5	21,5
7	Equine myoglobin	7	17,5

Annexe V

Détermination des points isoélectriques et des masses moléculaires des protéines d'intérêt E13 et E15 par informatique.



Publications

J. Bellettre · J.-P. Couillerot · J. Vasseur

Effects of glycerol on somatic embryogenesis in *Cichorium* leaves

Received: 30 January 1998 / Accepted after revision 25 February 1999

Abstract Direct somatic embryogenesis was induced in leaf cells of a *Cichorium* hybrid (*Cichorium intybus* L. var. *sativum* × *Cichorium endivia* L. var. *latifolia*) through a two-step procedure. Leaf tissue explants were cultured for 5 days in M17 liquid medium supplemented with 30 mM sucrose and 330 mM glycerol (M17S30Gly330 medium). Synchronised divisions of embryogenic cells occurred after transfer for 7 days into glycerol free-medium (M17S30). By doubling the sucrose concentration (60 mM) in the presence of glycerol (M17S60Gly330) during the induction step, embryogenesis increased and the length of the induction step was reduced from 5 to 4 days. Compared to sucrose, glycerol as carbon source during the induction and the expression steps had an inhibitory effect on the embryogenic response. During culture, glycerol was not detected in M17S60 medium and was at a low level in leaf fragments incubated in this medium. Initially applied as an osmoticum, glycerol disappeared from M17S60Gly330 medium during the 4-day induction period and penetrated into the tissues where most of it was metabolised. Furthermore, glycerol modified carbohydrate metabolism, particularly during the induction period of embryogenesis. Sucrose hydrolysis was affected in the medium and sucrose and hexose contents in tissues were higher than in glycerol-free medium. The effects of glycerol as a osmoticum and as a molecule itself are discussed.

Key words Carbohydrate metabolism · Chicory · Glycerol · Somatic embryogenesis

Abbreviations SE Somatic embryo

Introduction

The most commonly used carbohydrate in plant tissue or cell culture is sucrose. In somatic embryo (SE)-forming cultures of different species, a variety of carbon sources have been tested and studies have revealed sucrose to be generally the best source of carbon for embryogenesis (Verma and Dougall 1977; Gleddie et al. 1983; Eapen and George 1993), including embryogenesis in *Cichorium* (Couillerot et al. 1993). It has also been found that glycerol-pretreated cultures of selected species of *Citrus* will undergo prolific embryogenesis (Vardi et al. 1982) and in a few cases, glycerol has been reported as the preferred carbon source for this species (Ben-Hayyim and Neumann 1983).

Leaf tissues of the *Cichorium* hybrid "474" offer a new attractive model of somatic embryogenesis which is direct, rapid (less than 12 days), abundant (more than ten embryos per mm² of leaf), with embryos of unicellular origin (Vasseur et al. 1995). Several factors have been identified that can influence or are directly correlated with this regeneration pathway, including callose deposition in cell walls of embryogenic cells (Dubois et al. 1990), specific proteins (Hilbert et al. 1992; Helleboid et al. 1995), polyamines (Couillerot et al. 1993) and temperature (Decout et al. 1994). What makes this system attractive is that by the addition of 330 mM glycerol as osmoticum to the synthetic culture medium containing 30 mM sucrose (induction medium), the first division of embryogenic cells is synchronised after the leaf fragments are transferred to the same medium free of glycerol for embryo expression (Robatche-Claive et al. 1992).

Here we describe improved embryogenesis in the presence of glycerol during the induction step with increased glycerol and sucrose concentrations. Glycerol effects during the two steps of the culture on embryo yield were also studied. Finally, we investigated glycerol

Communicated by I. Negrutui

J. Bellettre · J.-P. Couillerot (✉) · J. Vasseur
Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogénèse
Végétales, USTL-INRA, Université des Sciences et
Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve D'Ascq cedex,
France
E-mail: couillerot@univ-lille1.fr,
Fax: +33-3-20336044

Springer-Verlag – Heidelberg

Plant Cell Reports 057

Mskr.-Seiten: 11

Seitenzahl: 6

Druckerei: Zechner Speyer

Versand: 11.5.99

erol interaction with carbohydrate metabolism and its own utilisation by leaf tissues.

Materials and methods

Material and culture conditions

The plant material was obtained from a clone of the *Cichorium* hybrid "474" (*Cichorium intybus* L. var. *sativum* × *Cichorium endivia* L. var. *latifolia*) propagated by somatic embryogenesis (Dubois et al. 1988). The plantlets grown from root embryos (Dubois et al. 1990) were subcultured on solid Heller (1953) medium containing 30 mM sucrose, 2.25 mM inositol and vitamins (Morel and Wetmore 1951), with a proton flux rate of 50 $\mu\text{mol s}^{-1}$ and 12/12 h photoperiod (24°C during the light period, 20°C in darkness). Leaf fragments of 6-week-old plantlets were cultured for 5 days at 35°C in darkness in 20 ml of an agitated basal M17 medium for embryo induction (Dubois et al. 1991), supplemented with 60 mM sucrose and 330 mM glycerol (M17S60Gly330). This pretreatment prevented the first division of embryogenic cells which was only observed after transfer of leaf tissues to glycerol-free medium (M17S60). The cultures were stopped after 7 days in the expression medium. In further experiments, sterilised glycerol was added only during the first step or throughout the culture.

Estimation of embryogenesis

Leaf fragments were fixed in formaldehyde:acetic acid:ethanol solution (3.5:6.5:100, by vol) on the 12th day of culture and were stained with lugol (2% I₂ and 6% KI wt/vol). SEs were counted under a light microscope and the frequency (%) was distributed in four size classes (class 1: SE ≤ 100 μm ; class 2: 100 < SE ≤ 150 μm ; class 3: 150 < SE ≤ 200 μm ; class 4: SE > 200 μm).

Paraffin sections

Leaves were cut into 5–10 × 5 mm pieces. Samples were dehydrated in an ethanol series and embedded in paraffin 52–54°C (Merck). Sections 7 μm thick were stained with safranin/fast green. Observations were performed by transmitted light microscopy.

Extraction and analysis of carbohydrates and glycerol

Samples were weighed, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until analysis. Frozen tissues were ground in a Potter blender. Carbohydrates and glycerol were extracted with 95% ethanol (1 ml/100 mg fresh weight) at 20°C for 5 min. After centrifugation (30000g, 10 min, 20°C), the pellet was re-extracted with 0.5 ml 95% ethanol. The two supernatants were combined and dried under vacuum. Carbohydrates and glycerol were solubilised in 2 ml 0.01 M sorbitol (used as the internal standard) and passed through a 0.45- μm Millipore filter.

Soluble carbohydrates and glycerol were analysed in 100- μl aliquots of filtered extract by HPLC. The chromatographic system consisted of a solvent degasser Spectra SYSTEM SCM400 (Spectra Physics, San Jose, Calif.), a Spectra SYSTEM P4000 pump, a column (300 × 6.5 mm) Waters Sugar-PAK I (Waters Millipore, Milfort, Mass.) maintained at 85°C and a differential refractometer. Distilled water containing 50 mg l⁻¹ calcium-EDTA was used as the solvent at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹.

Osmolarity determination

Osmolarity was determined by an automatic osmometer (Roebbling, Berlin, Germany) which used the freezing point of aqueous solutions. A 300-mOsmol sucrose solution was used as standard.

Data collection and statistical analysis

SEs induced per square millimetre of each explant were counted 12 days after culture initiation. A total of 90 areas (10 areas from three replicates of three explants per treatment) were analysed by ranking of treatment means to determine whether the results were statistically significant using the least-significant-difference test.

Results and discussion

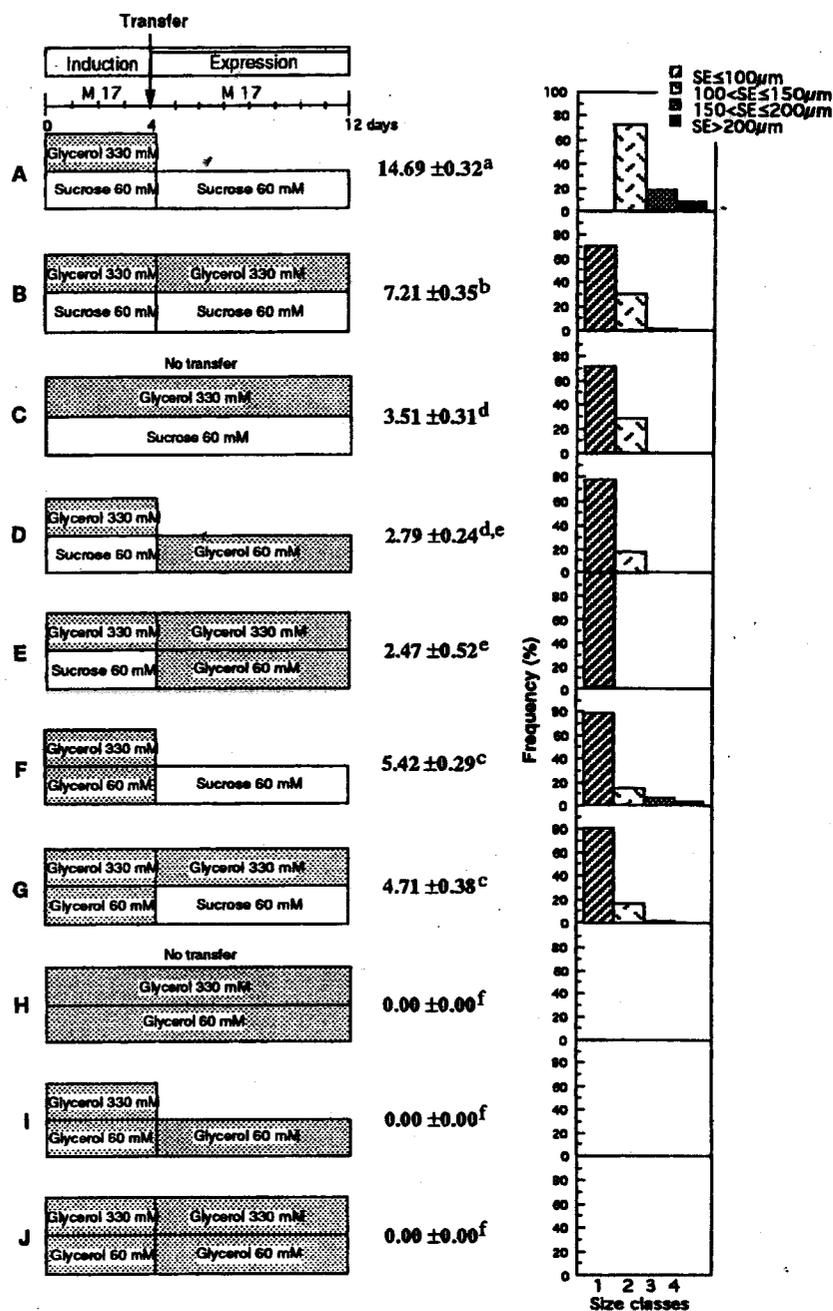
Improvement of embryogenesis by increased sucrose and glycerol concentrations

Previous studies demonstrated that somatic embryogenesis in *Cichorium* is sensitive to the carbohydrate source in which it is incubated (Couillerot et al. 1993; Vasseur et al. 1995). Sucrose was found to be the most efficient carbon source for the induction of SEs. Leaf tissues were usually induced for 5 days in M17 medium containing 330 mM glycerol and then transferred to M17 medium for 7 days. By doubling the initial sucrose concentration from 30 to 60 mM, the yield of SEs at day 12 was significantly ($P=0.05$) and considerably improved (14.71 ± 0.28 against 9.58 ± 0.54 SEs mm⁻²). The absence of first division of the embryogenic cells described by Robatche-Claive et al. (1992) until the 5th day was only maintained until the 4th day in M17S60Gly330 (Fig. 1B) because embryogenic cells coexisted at day 5 with pluricellular SEs (Fig. 1A). Furthermore, higher concentrations of glycerol [495 (Fig. 2A) and 660 mM (Fig. 2B)] did not block the initial mitosis of the embryogenic cells; above 660 mM, tissues were necrosed. However, an increase in glycerol concentration delayed the first division of the reactivated cell. Moreover, the embryogenic cell and SEs were observed closer to the vascular bundle. Our results are in agreement with those observed during somatic embryogenesis of coconut (Buffard-Morel et al. 1991) and carrot (Guzzo et al. 1994, 1995). In leaf tissues incubated for 4 days and transferred for 8 days in M17S60 without glycerol, the yield of embryos was not significantly higher (15.5 ± 0.27 SEs mm⁻²), but no synchronisation of the first division of the embryogenic cells was obtained. Following these data, the embryogenesis induction step was henceforth reduced to 4 days.

Glycerol and sucrose are important in the induction phase of embryogenesis

We screened the effects of glycerol applied during the induction and/or the expression steps of *Cichorium*

Fig. 3 Screening of the glycerol effect on somatic embryogenesis. Tissues were incubated for 4 days in M17 medium supplemented with 50 mM sucrose and 330 mM glycerol (M17S60Gly330) and then cultivated for 8 days in various media: M17S60 (A), M17S60Gly330 (B), M17S60Gly330 without transfer (C), M17Gly60 (D), M17Gly330+60 (E), or incubated for 4 days in M17 medium supplemented with 330+60 mM glycerol (M17Gly330+60) and then cultivated for 8 days in various media: M17S60 (F), M17S60Gly330 (G), M17Gly330+60 (H), without transfer, M17Gly60 (I), M17Gly330+60 (J). The number of somatic embryos (SE) mm^{-2} of leaf was counted at day 12 (mean \pm SE, $n=270$) and distributed in size classes. Means with the same letters are not significantly different ($P=0.05$) as determined by F-LSD test



Moreover, embryo sizes suggested induction of embryogenic cells after transfer. When glycerol was the only carbon source in the expression medium in the absence (Fig. 3I) or in the presence of 330 mM glycerol with (Fig. 3J) or without transfer at day 4 (Fig. 3H), no embryo was observed at day 12. Our results agree with those obtained by Strickland et al. (1987) with embryogenic *Medicago sativa* cells in culture, in which glycerol did not improve embryogenesis compared to sucrose. No embryos were observed in *Cichorium* "474" leaf fragments incubated in glycerol as the only carbon source, while it might be preferred for the *Citrus* embryogenesis response (Ben-Hayyim and Kochba 1982; Ben-Hayyim and Neumann 1983; Vu et al. 1993). It was concluded that glycerol and sucrose

were both important in the induction phase. Used to synchronise embryogenic cell division, glycerol alone did not stimulate embryogenesis. We investigated if glycerol effects on somatic embryogenesis were due to the molecule glycerol as such, to its utilisation, to the osmotic stress it may cause or to its interaction with carbohydrate metabolism.

Glycerol interaction with carbohydrate metabolism in media and leaf tissues

The glycerol influence on carbohydrate metabolism was studied by incubating leaf fragments in M17S60Gly330 or in M17S60 media and transferring

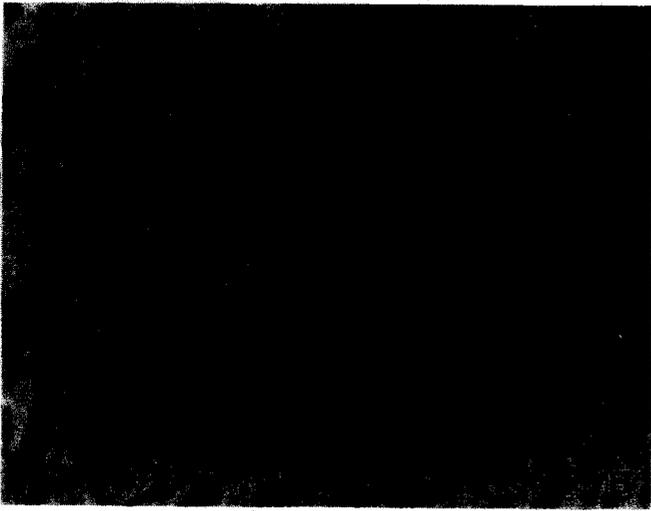
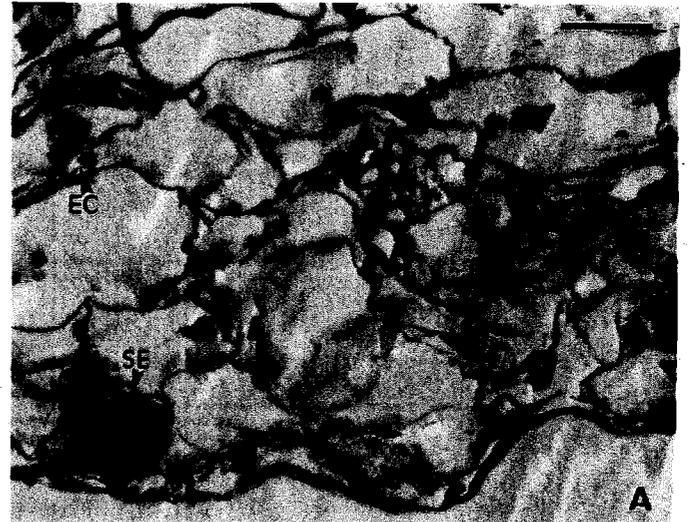


Fig. 1 Effect of glycerol on embryogenic cell first division. Transversal 7- μm -thick sections of *Cichorium* leaf fragments showing early stages of embryogenesis in M17S60 medium supplemented with 330 mM glycerol at day 5 (A), and at day 4 (B). Sections were stained with safranin-fast green (EC embryogenic cell, SE, somatic embryo, bar 20 μm)

Fig. 2 Stimulation by glycerol of somatic embryogenesis of *Cichorium* leaf. Transversal 7- μm -thick sections of *Cichorium* leaf fragments incubated for 5 days in M17S60 medium supplemented with 495 (A) and 660 mM (B) glycerol. Sections were stained with safranin-fast green (EC embryogenic cell, SE somatic embryo, bar 20 μm)

embryogenesis. Through the induction period, glycerol was tested at 330 mM supplemented with 60 mM sucrose or with 60 mM glycerol in place of sucrose (Fig. 3). During the 8 days of the embryogenesis expression step, different combinations of sucrose and glycerol were tested. The analysis of variance revealed a significant effect ($P < 0.001$) of glycerol concentration on embryo number. Results show that 60 mM sucrose supplemented with 330 mM glycerol during 4 days induction and transfer to an expression medium containing 60 mM sucrose gave the highest embryo yields (Fig. 3A). Most embryos had a diameter $> 100 \mu\text{m}$ (size classes 2-4). When 330 mM glycerol was present in M17S60 medium during the 12 days of culture with a transfer, after day 4 (Fig. 3B), the number of embryos was appreciably less. Without transfer, the number of embryos was even lower, prob-

ably because the carbon source and the inorganic nutrients were limiting (Fig. 3C). Furthermore, under those conditions, about 70% of the embryos had a diameter $< 100 \mu\text{m}$ (size class 1). Embryos were rare in leaf tissues incubated in transfer medium in which 60 or 330 + 60 mM glycerol was the only carbon source (Fig. 3D, E). The presence of glycerol during the expression step dramatically reduced embryo yield and affected their development. Babbar and Gupta (1986) reported similar results during haploid embryo production from *Datura metel* microspores cultured on glycerol-containing medium.

Glycerol (60 mM) tested as a replacement for sucrose in the induction medium supplemented by 330 mM glycerol as osmoticum had a drastic inhibitory influence on embryogenic response despite transfer to the sucrose-containing expression medium (Fig. 3F, G).

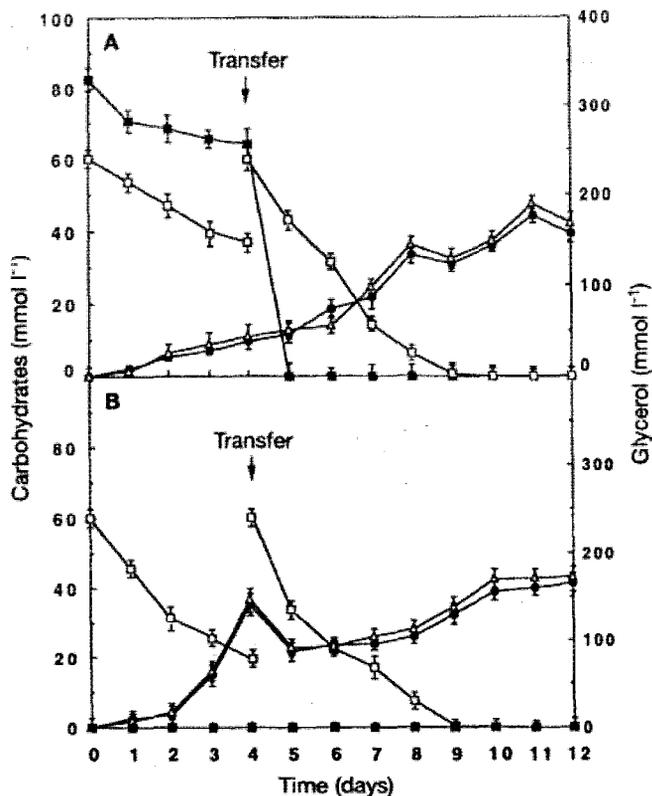


Fig. 4 Levels of sucrose (□), glucose (●), fructose (Δ) and glycerol (■) in the media for *Cichorium* leaf tissues incubated for 4 days in M17S60Gly330 (A) or in M17S60 (B) and transferred for 8 days to M17S60. Mean (\pm SE) of three cultures of three explants for each culture with three replications

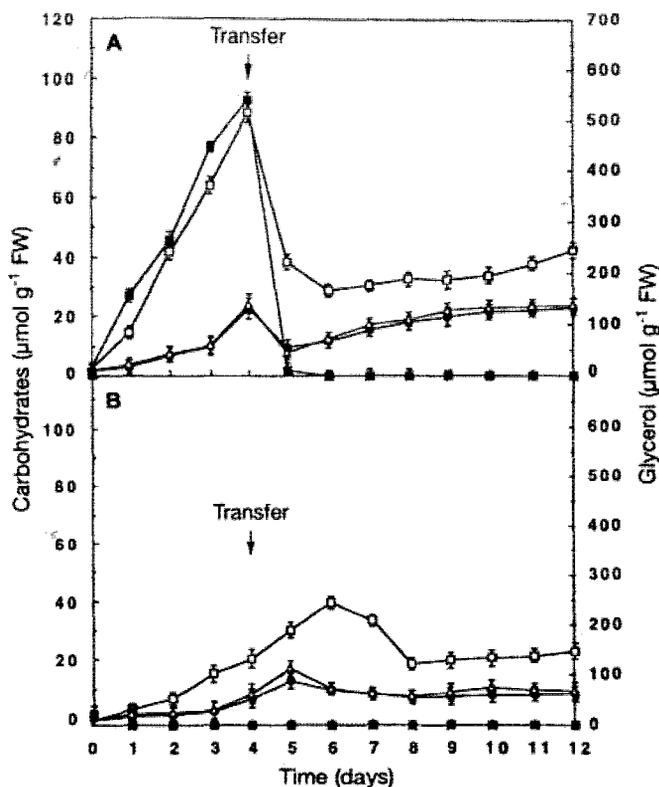


Fig. 5 Levels of sucrose (□), glucose (●), fructose (Δ) and glycerol (■) in *Cichorium* leaf tissues incubated for 4 days in M17S60Gly330 (A) or M17S60 (B) and transferred for 8 days to M17S60. Mean (\pm SE) of three cultures of three explants for each culture with three replications (FW fresh weight)

them at day 4 into M17S60 medium devoid of glycerol for 8 days. Addition of glycerol to the medium induced a notable rise in osmolarity (384 against 62 mOsmol in glycerol-free medium). HPLC analyses of the neutral sugars and glycerol in the media are shown in Fig. 4. The glycerol concentration in the medium declined from 330 to 257 mM during the induction step (Fig. 4A), while it was never detected in glycerol-free medium (Fig. 4B). After transfer to M17S60 medium, glycerol in the medium disappeared (Fig. 4A). The presence of glycerol in the medium modified sucrose metabolism (Fig. 4A, B). About 65% of the sucrose disappeared from the glycerol-free induction medium against about 35% in medium containing glycerol. Glucose and fructose levels increased slowly and concurrently to reach about 10 mM at day 4 in M17S60Gly330 whereas they reached about 35 mM in M17S60. The importance of hexose levels in the medium without glycerol resulted from sucrose hydrolysis through a higher invertase activity in leaf tissues (data not shown). After transfer, similar sucrose and hexose profiles were observed. Sucrose content decreased steadily in the media from day 5 to disappear by day 9, while glucose and fructose levels rose gradually to reach about 45 mM at day 12.

Carbohydrate and glycerol were extracted daily from leaf tissues cultured as previously (Fig. 5). No significant levels of endogenous water-soluble carbohydrate or glycerol (less than 1.5 μ mol g⁻¹ fresh weight) were recovered from *Cichorium* leaves before incubation. In leaf fragments cultured for 4 days in M17S60 induction medium, glycerol remained slightly detectable (about 2 μ mol g⁻¹ fresh weight) while the sucrose content rose gradually (22 μ mol g⁻¹ fresh weight at day 5, Fig. 5B). Elevated levels of glycerol and sucrose were recovered from leaf fragments incubated in M17S60Gly330 medium, especially between days 2 and 4 (539 and 88 μ mol g⁻¹ fresh weight, respectively; Fig. 5A). During the initial 4 days, glucose and fructose levels were twofold higher in M17S60Gly330 than in the glycerol-free condition (Fig. 5A, B). Such glycerol and carbohydrate levels in tissues incubated in the presence of glycerol reflected the reaction to osmotic stress and the inhibition of invertase activity in tissues (data not shown), the hexose/sucrose ratio remaining lower than in the glycerol-free condition (52% and 86% at day 4, respectively). After transfer, the carbohydrate profiles of the leaf fragments in both culture types were similar, but in glycerol-pretreated tissues, the carbohydrate fall coincided with the synchronised resumption of cell division.

When comparing the concentration of the glycerol in the medium and in the explants through the culture period, it can be concluded that most of the imported glycerol was metabolised by tissues. In suspension cultures of *Glycine max*, added [^{14}C]glycerol was not only absorbed for lipid synthesis. MacDonald and ApRees (1983) reported the labelling of free sugars, starch, structural polysaccharides, organic acids and proteins, and some of the [^{14}C] entered the respiratory pathways. These aspects are now under investigation in *Cichorium* leaf tissues.

In a previous study, Robatche-Claive et al. (1992) demonstrated that sucrose and non-absorbed mannitol at the same concentration as used here with glycerol (330 mM) were unable to block the first mitosis of embryogenic cells. Even if osmotic stress may encourage embryogenesis, as described for *Daucus carota* by Wetherell (1984) and for *Helianthus annuus* by Jeannin et al. (1993), the lack of first division shown in *Cichorium* was not a result of increased osmolarity caused by glycerol but due to the presence of the molecule itself. Though initially supplied to the induction medium as an osmoticum, glycerol modified carbohydrate metabolism, was also transported into the tissues, and can provide carbon and energy for leaf tissues undergoing embryogenesis.

Acknowledgements The authors thank Dr. Théo Hendriks (Agricultural University Wageningen, Netherlands) for critical reading of the manuscript.

References

- Babbar SB, Gupta SC (1986) Effects of carbon source on *Datura metel* microspore embryogenesis and the growth of callus raised from microspore-derived embryos. *Biochem Physiol Pflanzen* 181:331-338
- Ben-Hayyim G, Kochba J (1982) Growth characteristics of tolerance of *Citrus* callus cell subjected to NaCl stress. *Plant Sci Lett* 27:87-94
- Ben-Hayyim G, Neumann H (1983) Stimulatory effects of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. *Z Pflanzenphysiol* 110:331-337
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1991) Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. *Can J Bot* 70:735-741
- Couillerot JP, Decout E, Warnot F, Dubois J, Vasseur J (1993) Evolution des polyamines libres en relation avec la source carbonée et l'embryogenèse somatique chez un *Cichorium* hybride. *CR Acad Sci Paris* 316:299-305
- Decout E, Dubois T, Guedira M, Dubois J, Audran JC, Vasseur J (1994) Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured in vitro. *J Exp Bot* 45:1859-1865
- Dubois T, Dubois J, Guedira M, Vasseur J (1988) Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium*: effets de la température et origine des embryoides. *CR Acad Sci Paris* 307:669-675
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker? *Ann Bot* 65:539-545
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*: A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma* 162:120-127
- Eapen S, George L (1993) Somatic embryogenesis in peanut: influence of growth regulators and sugars. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35:151-156
- Gleddie S, Keller W, Setterfield G (1983) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena*. *Can J Bot* 61:656-666
- Guzzo F, Baldan B, Mariani P, Lo Schiavo F, Terzi M (1994) Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J Exp Bot* 45:1427-1432
- Guzzo F, Baldan B, Levi M, Sparvoli E, Lo Schiavo F, Terzi M, Mariani P (1995) Early cellular events during induction of carrot explants with 2,4-D. *Protoplasma* 185:28-36
- Hellebois S, Couillerot JP, Hilbert JL, Vasseur J (1995) Inhibition of direct somatic embryogenesis by α -difluoro-methylarginine in a *Cichorium* hybrid: effects of polyamine content and proteins patterns. *Planta* 196:571-576
- Heller R (1953) Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 14:1-223
- Hilbert JL, Dubois T, Vasseur J (1992) Detection of embryogenesis related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiol Biochem* 30:733-741
- Jeannin G, Bonner R, Hahne G (1993) Embryogenèse somatique induite sur l'embryon zygotique immature de tournesol cultivé in vitro: rôle du saccharose. 12th Coll Fr IAPTC, Montpellier, 16/17 november 1993
- MacDonald FD, ApRees T (1983) Labelling of carbohydrate by [^{14}C] glycerol supplied to suspension cultures of soybean. *Phytochemistry* 22:1141-1143
- Morel G, Wetmore RH (1951) Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38:141-143
- Robatche-Claive AS, Couillerot JP, Dubois J, Dubois T, Vasseur J (1992) Embryogenèse somatique directe dans les feuilles du *Cichorium* hybrid "474": synchronisation de l'induction. *CR Acad Sci Paris* 314:371-377
- Strickland SG, Nichol JW, McCall CM, Stuart DA (1987) Effects of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Sci* 48:113-121
- Vardi A, Spiegel-Roy P, Galun E (1982) Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor Appl Genet* 62:171-176
- Vasseur J, Dubois J, Hilbert JL, Couillerot JP (1995) Somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium* species). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology of agriculture and forestry*, vol 31. Somatic embryogenesis and synthetic seed II. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 125-137
- Verma DC, Dougall DK (1977) Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiol* 59:81-85
- Vu JCV, Niedz RP, Yelenovsky G (1993) Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis, and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of "Hamlin" sweet orange. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:75-80
- Wetherell DF (1984) Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultures of wild carrot cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 3:221-227



Influence of ABA on nitrate reductase activity and carbohydrate metabolism in chicory roots (*Cichorium intybus* L.)

Pascale Goupil^{1,3}, Denis Loncle¹, Nathalie Druart¹, Anne Bellettre² and Serge Rambour¹

¹Laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétales, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

²Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse Végétales, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 8 April 1998; Accepted 10 June 1998

Abstract

Young chicory plants transferred to abscisic acid (ABA)-containing media displayed changes in nitrate and carbohydrate metabolism. The hormone (10^{-7} M) rapidly promoted nitrate reductase (NADH:NR, EC 1.6.6.1) activity (NRA) in roots. The hormonal effects on NRA were not responsive to dose concentrations (10^{-8} to 10^{-4} M) and were not related to the intracellular nitrate content. Furthermore, the ABA-regulated NRA was not modulated by a phosphorylation/dephosphorylation mechanism.

ELISA experiments using NR antibodies showed that the NR protein accumulated in ABA-treated roots. Northern blot analysis of NR mRNA indicated that the response to exogenous ABA was, at least in part, at the level of transcription and the NR mRNA accumulation was accompanied by cytosolic glutamine synthetase (GS1) overexpression.

Since NRA can be controlled by sucrose and the availability of the reducing power, the carbohydrate metabolism was analysed simultaneously in the chicory roots. HPLC analysis and invertase assays showed that exogenous ABA modified the neutral invertase activity and the carbohydrate levels as well. Sucrose hydrolysis was increased and the levels of both glucose and fructose dramatically decreased in the presence of ABA suggesting a relationship between both nitrate and sucrose metabolism.

Key words: Abscisic acid, carbohydrates, *Cichorium*

intybus L., glutamine synthetase, neutral invertase, nitrate reductase.

Introduction

Plants assimilate nitrogen as a source for growth and metabolism. Nitrogen is mainly absorbed as nitrate which is reduced to ammonium by nitrate reductase (NR) in the cytosol and nitrite reductase in the plastids. The nitrate assimilation pathway consumes as much as 25% of the energy of photosynthesis (Solomonson and Barber, 1990). Consequently, most fast-growing plants reduce nitrate in their leaves where the main part of the reducing power arises directly from light via ferredoxin (Beevers and Hageman, 1980). When nitrate assimilation occurs in the roots, high amounts of photosynthates must be imported and oxidized to provide the required reductants, energy and carbon skeletons. NR is a substrate inducible enzyme but its activity can be altered by several environmental, hormonal or metabolic factors. The enzyme is subject to several levels of regulation including control of gene expression and post-translational modification (Hoff *et al.*, 1994; Kaiser and Huber, 1994).

Cichorium intybus L. var. Witloof is a biennial plant which develops a rosette of leaves and a tuberous root during the first growing period. Nitrogen metabolism in young plants has been studied at both physiological and molecular levels. NRA was shown to be predominant in roots and low in leaves (Dorchies and Rambour, 1985). Northern analysis showed that, besides the nitrate

³To whom correspondence should be addressed. Fax: +33 3 20 33 60 44. E-mail: Pascale.Goupil@pop.univ-lille1.fr
Abbreviations: ABA, abscisic acid; GS, glutamine synthetase; NR, nitrate reductase; NRA, nitrate reductase activity.

inducibility of the NR gene (*nra*), a higher transcription activity occurred in the roots. *In situ* hybridization localized *nra* mRNA in the cortex at low nitrate concentration (0.2 mM) whereas it was mainly localized within the vascular tissues at high nitrate concentration (5 mM) (Palms *et al.*, 1996). Chicory possesses a NADH-specific NRA which has been shown to be enhanced by 10^{-4} M ABA in chicory suspension cells (Chraïbi *et al.*, 1995). The recent molecular cloning of NR cDNAs (Palms *et al.*, 1996) from chicory has provided a molecular probe for studying the influence of mechanical stress and growth factors on the expression of *nra* in the plant model used in this study (Vuylsteker *et al.*, 1997).

In recent years, numerous investigators have reported on changes in gene expression induced by ABA and/or water deficit in vegetative tissues of a range of species (reviewed by Skriver and Mundy, 1990; Bray, 1993). However, few studies have reported on a change in nitrate assimilation and ABA seemingly elicits a variety of responses on NRA in plant systems. At relatively high concentrations, it reduced NRA in etiolated leaves of barley (Lu *et al.*, 1992), in potato plants (Palmer, 1985) and in *Agrostemma githago* (Kende *et al.*, 1971). Conversely, it was shown to stimulate NRA in potato tuber slices (Palmer, 1981). Water stress which reduced NRA in corn (Morilla *et al.*, 1973), is also known to bring about dramatic increases in the ABA level. The ABA regulation of NR has been poorly studied at the molecular level. One paper describes a transcriptional regulation of NR mRNA levels by cytokinin-*abscisic acid* interaction in etiolated barley leaves (Lu *et al.*, 1992). The present paper dissects the molecular mechanism in roots. ABA increases radial growth of roots under stress conditions i.e. drought, compacted soil (Hartung and Davies, 1991; Vartanian *et al.*, 1994). The effect of externally applied ABA on the nitrogen and carbon metabolism in young chicory roots is examined here.

The mechanisms by which plant cells transduce ABA signals is far from being completely elucidated although the use of molecular and genetic approaches gained new insights into the molecular basis of the hormone action. Recent progress in our understanding of the ABA response pathway were described (for review see Giraudat *et al.*, 1994; Quatrano *et al.*, 1997). Authors produced evidence that phosphorylation/dephosphorylation cascades were involved in ABA signal transduction (Leung *et al.*, 1997). Since NR is a phosphorylation-regulated enzyme (Glaab and Kaiser, 1996), an attempt was made in this work to find out whether ABA influences NRA at the post-translational level.

Materials and methods

Plant material

Chicory plants (*Cichorium intybus* L. var. Witloof cv. Flash) were grown in growth chambers under a 16 h light

($14 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/8 h dark period at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ on Heller's solid medium containing 7 mM KNO_3 (Heller, 1953). Three-week-old plants presenting three leaves were transferred about 3 h after the onset of the photoperiod to new Heller's solid media supplemented or not with ABA. One mM \pm -*cis*-ABA (Sigma Chemical Co.) was dissolved in a solution of DMSO/water (10:90, v/v) and added to growth media at final concentrations ranging from 10^{-8} to 10^{-4} M.

Nitrate reductase assays

The *in vivo* NRA was assayed according to Jaworski (1971). Roots (100–200 mg fresh-weight (FW)) were harvested at various time points after the plants were transferred to the ABA-containing media and incubated in 2 ml of a mixture containing 0.1 M K-phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 M KNO_3 and 1.2% 1-propanol for 30 min at 28°C in the dark. The colorimetric determination of the reaction was achieved by mixing 0.5 ml of the incubation solution with 0.5 ml of aqueous 10 mM *N*-1-naphthyl-ethylene-diamine-dihydrochloride and 0.5 ml sulphanimide (11 mM in 3 M HCl). Absorbance was measured at 540 nm. Activities were expressed as nmol NO_2^- released $\text{g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$.

For *in vitro* assays, 1 g of fresh roots was harvested and frozen in liquid nitrogen. The crude extract was collected with ground root tissues suspended in the extraction buffer containing 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 μM leupeptin, 0.5 mM PMSF, and 10% (w/v) Polyclar AT with the 1:2 ratio. The standard reaction mixture contained 400 μl of 50 mM HEPES-KOH pH 7.5 buffer containing 10 mM KNO_3 , 0.2 mM NADH, 10 μM FAD, and 100 μl crude extract. Modulation of the activation status of NR *in vitro* was performed by adding either 2 mM EDTA or 5 mM MgCl_2 to the standard reaction mixture. Incubations were carried out at 30°C for 5 min and were stopped by adding 50 μl of 0.5 M Zn-acetate. Ten μM of methosulphate phenazine was added to eliminate any excess of NADH. Nitrite was measured as above and NRA was expressed as nmol NO_2^- released $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. Proteins were measured according to Bradford (1976) with bovine serum albumin as a standard.

Immunological quantification of the NR protein

NR protein levels were estimated by the two-site ELISA procedure according to Chérel *et al.* (1986) using monoclonal anti-NR ZM96(9)25 and S6 polyclonal anti-NR maize antibodies. The cross-reaction of these antibodies with the chicory NR was first verified by Western blot analysis and immunoprecipitation assays.

Nitrate determination

Lyophilized tissues were ground in microfuge tubes and suspended in 1 ml boiling distilled water. After a short centrifugation at 10000 g, nitrate extracted in the supernatant was measured according to Cataldo *et al.* (1974).

Extraction of RNA and Northern blot analysis

Total RNA was extracted from 1 g FW roots frozen in liquid nitrogen as described by Verwoerd *et al.* (1989). Denatured samples were electrophoresed on 1.5% agarose formaldehyde gels and transferred by capillary action to Hybond- N^+ membranes (Amersham) using $20 \times$ SSPE buffer ($1 \times$ SSPE: 180 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 pH 7.5, 1 mM EDTA (Sambrook *et al.*, 1989). The probe was labelled by using the T7-Quick prime kit (Promega). The blot was hybridized at

0°C with ^{32}P -labelled cDNA probes of chicory NR and tobacco cytosolic GS (GSI) according to Church and Gilbert (1984). Membranes were then exposed to Kodak X-Omat AR films (Amersham) at -80°C using intensifying screens.

Invertase assays

Roots were ground in microfuge tubes with liquid nitrogen and suspended in 15 mM Na-acetate buffer pH 4.5 (for acidic invertase assay) or pH 7.5 (for neutral invertase assay). Insoluble material was discarded after a 5 min centrifugation at 10000 g. The supernatant was assayed in presence of 225 μM sucrose according to Goupil *et al.* (1988). The glucose released in the reaction was measured by the colorimetric method of glucose oxidase and peroxidase as described by Jørgensen and Andersen (1973). Invertase activities were expressed as nmol sucrose hydrolysed $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protein. Protein content was measured as mentioned above.

Carbohydrate analysis

Approximately 200 mg of frozen roots were mixed with 2 ml 95% ethanol. The insoluble material was removed by centrifugation 10 min at 30000 g and ethanol was evaporated in a Speedvac. The residue was suspended in 1 ml of 0.1% sorbitol used as internal standard and filtrated for HPLC analysis.

Carbohydrates were separated and quantitatively analysed by isocratic HPLC on a 0.65×30 cm Sugar-Pak 1 column (Waters, Millipore) at 85°C with water as eluant (0.5 ml min^{-1}) equipped with a differential refractometer (Knauer, type 198).

Results

ABA influences NRA, NR protein and NO_3^- levels

In vitro NRA was measured in chicory roots after transferring the plants to media with or without 10^{-7} M ABA (Fig. 1A). The time-course of NRA was made during the light period from about 3 h after the onset of the photoperiod. NRA declined during the experiment in the controls. The most probable explanation of this decline is that plant transplantation to the new solid media with or without ABA produced a mechanical stress giving rise to a restrained nitrate metabolism. Indeed, NRA kept higher levels in untransplanted plants with fluctuations as the photoperiod progressed (Fig. 2). Significant difference in NRA could be detected in roots between ABA-treated and -untreated plants. Exogenous ABA stimulated NRA to a maximum at 4 h after the transfer, with the ABA effect being lower at the end of the time-course, i.e. 8 h after the transfer of the plants to the ABA-containing medium. Specific activity was enhanced by about 156% in the presence of ABA. The time-course of NRA in untransplanted chicory plants also showed a high level of activity 4 h after the beginning of the experiment. In transplanted plants, the role of ABA could be to restore the NRA under stress conditions.

The ABA response was also observed at the NR protein level (Table 1). The amount of extractable NR protein from roots treated for 4 h with ABA increased about 2-fold compared to the control.

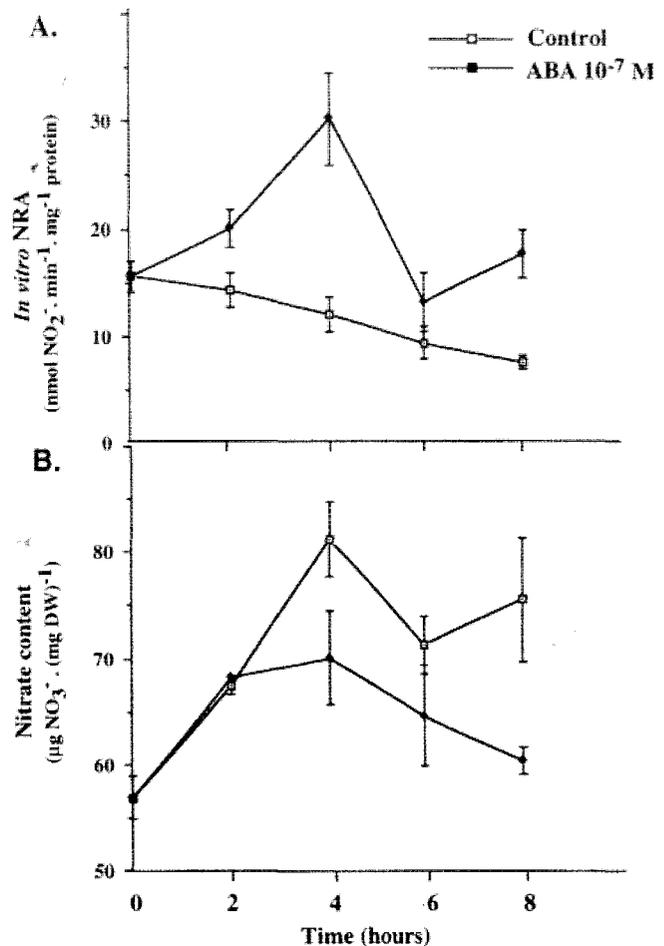


Fig. 1. Time-course of NRA measured *in vitro* with EDTA (A) and NO_3^- level (B) in roots of chicory plants transferred to media containing or not 10^{-7} M ABA. Means \pm SE are presented ($n=3$ for A, $n=4$ for B).

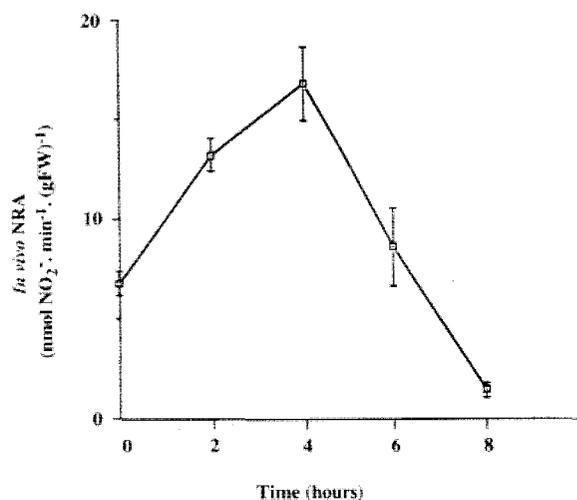


Fig. 2. Time-course of NRA measured *in vivo* in roots of untransplanted chicory plants. The NRA measurements started 3 h after the onset of the photoperiod (T_0). Means \pm SE ($n=3$).

Table 1. Effect of ABA on NR protein content in chicory roots

Two-sites ELISA experiments were conducted on root crude extracts of chicory plants transferred for 4 h to media without ABA (Control) or containing 10^{-7} M ABA. NR protein contents were expressed as ng mg^{-1} total soluble protein. Data presented are the result of two independent experiments.

	Control	ABA 10^{-7} M	Ratio
NR protein contents	71.3	140.4	1.97
	60.6	158.7	2.61

In order to find out a possible regulatory effect of ABA by a reversible phosphorylation-dephosphorylation mechanism of NRA, *in vitro* NRA was assayed in the presence of either Mg^{2+} ions or EDTA. In the presence of Mg^{2+} ions, the activity of phosphorylated NR is inhibited by a protein-protein interaction with an inhibitory protein (Mackintosh *et al.*, 1995; Bachmann *et al.*, 1996). Therefore, the ratio between NRA measured with Mg^{2+} ions and NRA measured with EDTA corresponds to the ratio between active NR and total extractable NRA (activation rate). In control roots, NRA was about $6 \text{ nmol NO}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein with EDTA in the reaction mixture and the activation rate due to dephosphorylation was about 54% (Table 2). In roots of ABA-treated plants, NRA reached $31 \text{ nmol NO}_2^- \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein with EDTA and the activation rate was about 48%. These data show that ABA did not significantly modify the NR activation rate generated by a post-translational phosphorylation-dephosphorylation mechanism.

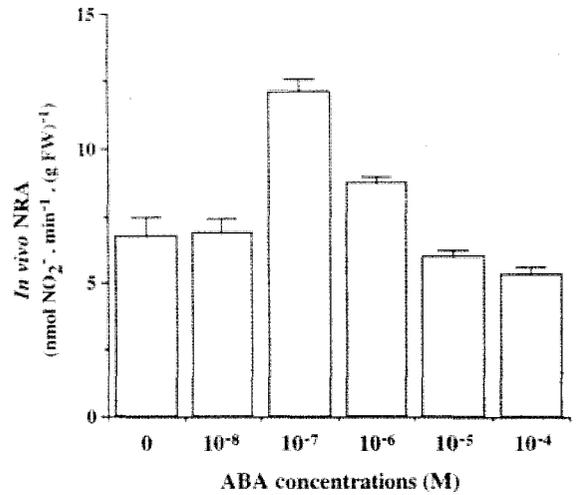
Moreover, no correlation could be established between the NO_3^- level within the chicory roots and their NRA. The nitrate level within the roots increased during the first hours after the transfer of the plants to a new nitrate-containing medium and then decreased more or less until the end of the time-course (Fig. 1B). In the presence of 10^{-7} M ABA, levels of nitrate in root tissues were lower, suggesting either a higher consumption or a lower absorption of NO_3^- in ABA-treated roots of chicory.

A dose-response experiment was conducted at the time interval displaying higher ABA-induced NR activation, i.e. 4 h after the transfer of the plants to the ABA-containing medium (Fig. 3). NRA in roots did not

Table 2. Effect of ABA on *in vitro* NRA modulated by Mg^{2+} ions

In vitro NRA was assayed with either EDTA or Mg^{2+} ions 4 h after the transfer of chicory plants to the ABA-containing medium. Activities in roots were expressed as $\text{nmol NO}_2^- \text{ released min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ total soluble proteins. The activation rate corresponds to the ratio of NRA with Mg^{2+} /NRA with EDTA $\times 100$. Mean \pm SD for three determinations.

	Control	ABA 10^{-7} M
<i>In vitro</i> NRA with EDTA	6.41 ± 0.61	31.1 ± 2.55
<i>In vitro</i> NRA with Mg^{2+}	3.46 ± 0.54	14.9 ± 4.45
Activation rate (%)	54	48

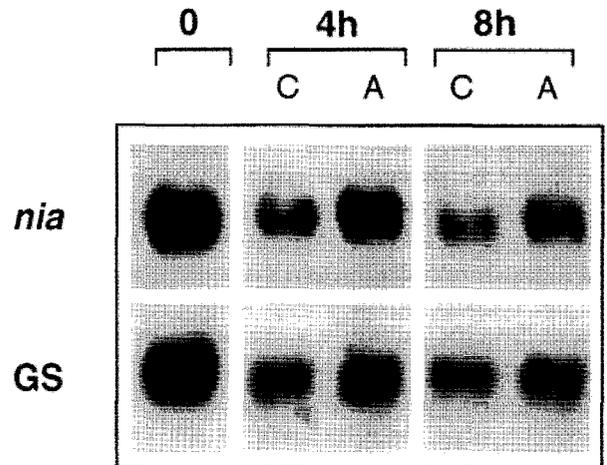
**Fig. 3.** ABA-dose response of *in vivo* NRA in roots of chicory plants transferred for 4 h to media containing different concentrations of ABA. Data represent means of three repeats \pm SE.

respond to increasing ABA concentrations in a linear fashion since high concentrations (10^{-4} and 10^{-5} M) of the growth factor seemed to slightly decrease NRA. However, lower ABA concentrations (10^{-7} and 10^{-6} M) were required to promote hormonal activation.

ABA overexpresses *nia* and *GS1* in chicory roots

In order to approach the molecular mechanism underlying NRA regulation by ABA, the influence of ABA at the transcriptional level was investigated. Northern blot analysis was performed on total root RNA hybridized with chicory NR cDNA probe (Fig. 4).

The steady-state level of NR mRNA changed during the course of the light period in controls. Expression of

**Fig. 4.** ABA activation of the *nia* and *GS1* genes in chicory roots. Northern blot analysis of total RNA extracted from roots of chicory plants transferred for 4 h and 8 h to media without ABA (C) or containing 10^{-7} M ABA (A) and probed with ³²P-labelled cDNA probes of chicory NR (*nia*) and tobacco *GS1* (*GS*). All lanes were loaded with $10 \mu\text{g}$ total RNA.

nia was high at the beginning of the photoperiod and rapidly decreased thereafter to lower levels. As reported by Lillo (1991), the initial peak in NR mRNA levels can be in response to an endogenous rhythm. Moreover, the mechanical stress generated by plant transplantation should account for the drop in NR mRNA levels in controls.

ABA significantly enhanced the amount of NR transcripts in roots at the time interval displaying high NRA that was 4 h following the transfer of the plants to the ABA-containing medium. NR transcript levels decreased at the end of the experiment in ABA conditions.

In order to find out if ABA affected the assimilation of ammonium produced within the roots, the expression of cytosolic GS (GS1) was analysed. This enzyme catalyses the amination of glutamate and constitutes the major point of entry of ammonium into an organically combined form in plant tissue. Total mRNA was hybridized with a tobacco GS1 probe (Fig. 4). In the presence of exogenous ABA, the amount of GS1 mRNA was also enhanced 4 h after the transfer of the plants to the hormone-containing medium and decreased thereafter.

Carbohydrate metabolism is affected during ABA treatment

The effect of ABA on sucrose metabolism was analysed in chicory roots transferred for 2 h and 4 h to media with or without 10^{-7} M ABA. Figure 5 represents endogenous soluble sugar levels in roots quantitatively measured by HPLC. Sucrose was metabolized during the experiment regardless of the presence of ABA. Sugar patterns changed in presence of ABA (Fig. 5B) compared to the controls (Fig. 5A). First, ABA increased the conversion of sucrose into glucose and fructose within the first 4 h of the transfer. Indeed, the sucrose level was decreased by about 20% in the presence of 10^{-7} M ABA. Second, ABA drastically increased the consumption of reduced sugars. In roots not submitted to exogenous ABA, the glucose and fructose levels reached $4.4 \mu\text{mol}$ and $5.8 \mu\text{mol}$ FW g^{-1} , respectively. In roots treated with 10^{-7} M ABA, the levels of monosaccharides became undetectable.

In subsequent experiments, a correlation between the carbohydrate levels and sucrose hydrolysing enzymes such as invertases was investigated. Acidic and neutral invertase activities were assayed in the same experimental conditions. Acidic invertase activity, displayed the same pattern regardless of the presence of ABA (Fig. 6A). Conversely, the neutral invertase activity seemed to be regulated by 10^{-7} M ABA. The level of neutral invertase activity increased within the first 2 h after plants were transferred onto the ABA-containing medium; it reached a maximum after 4 h and subsequently slowly decreased (Fig. 6B). Neutral invertase activity in roots was approximately 4-fold higher in ABA-treated plants.

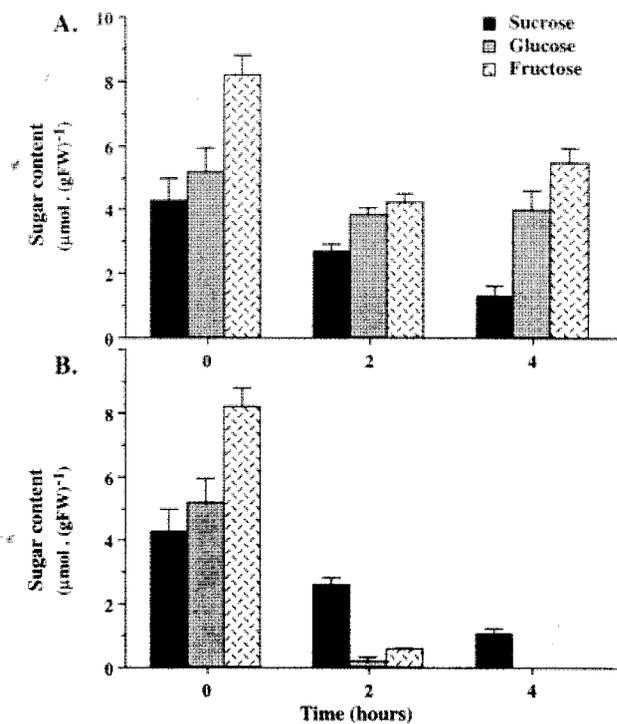


Fig. 5. Changes in soluble carbohydrate levels (sucrose, glucose, fructose) of roots from chicory plants transferred for various times (0, 2 h, 4 h) to media without ABA (A) or containing 10^{-7} M ABA (B) measured by HPLC analysis. Means of two significant experiments are shown \pm SE.

Discussion

The presence of ABA in media containing nitrate caused a stimulation of nitrate metabolism in chicory plant roots with higher level of NRA accompanied by a parallel accumulation of the NR protein. NRA peaked 4 h after the transfer of the plants in the ABA-containing medium. After the peak, NRA decrease may be due to local ABA depletion in the culture medium or to processes associated with glutamine feedback since synthesis of GS1 mRNA was also activated in the presence of ABA. The ABA effect on NRA could be related to the photoperiod since ABA stimulation peaked at the same time interval displaying a high level of activity in untransplanted plants.

Since the level of nitrate was lower in ABA-treated plants than in controls, nitrate availability seemed not interfere with the regulation of NRA at least in the course of the experiment. As NRA was higher in plants grown with ABA than in controls, their lower level of nitrate could readily be explained by a higher consumption of the substrate. Nevertheless, ABA might impair NO_3^- uptake as already shown by Chraïbi *et al.* (1995) in chicory suspension cell cultures. Using $^{15}\text{NO}_3^-$, these authors observed that 10^{-4} M ABA increased both *in vivo* and *in vitro* NRA and exerted an inhibitory effect on nitrate uptake.

In these experiments, the expression of the *nia* gene in

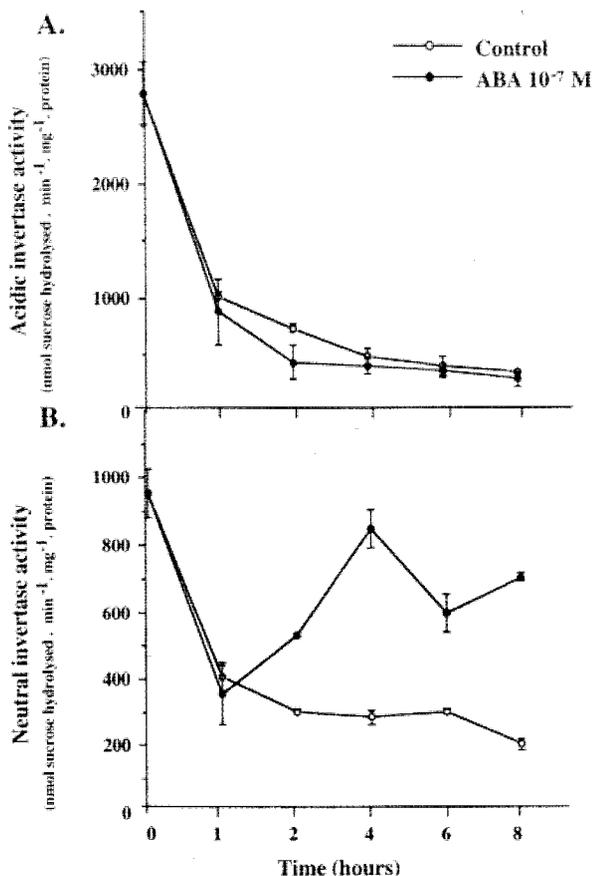


Fig. 6. Time-course of acidic invertase (A) and neutral invertase (B) activities measured in roots from chicory plants transferred for various times to media containing or not 10^{-7} M ABA. Means of three repeats are shown \pm SE.

chicory roots was enhanced by ABA. In barley, ABA suppressed *in vitro* NRA and reduced transcription of *nia* in etiolated leaves exposed for at least 3 h to light, but no difference could be detected between water-treated and ABA-treated leaves in the dark. Moreover, the ABA effect on transcription of the *nia* gene in barley was dose-responsive (Lu *et al.*, 1992). In chicory, the dose-response experiments for NRA revealed that concentrations of ABA in a physiological range were necessary to induce stimulation of NRA. These results suggest that in chicory roots, NR regulation by ABA does not just interfere in the expression of *nia*. Increased NRA in the presence of ABA could be due at least in part, to an increasing availability of reductants at the site of nitrate assimilation. Indeed, there was a good correlation between the sucrose metabolism and the nitrate reduction process in the presence of ABA.

In ABA-treated plants, stimulation of NR was concomitant with a higher consumption of sucrose and a dramatic loss of the reducing sugar levels. Exogenous application of ABA to soybean leaves was shown to inhibit fructose-1,6-bisphosphatase which is one of the key points

regulating sucrose synthesis (Cheikh and Brenner, 1992). If such an inhibition might operate in ABA-treated chicory plants, the carbon flux might be diverted to catabolic pathways supplying the triose-phosphate pool which might provide NADH and ATP, the former used by NR, the latter by GSI. In plant tissues, sucrose can be subject to cleavage by neutral invertase and sucrose synthase in the cytoplasm, and acidic invertase in the vacuole, the tonoplast or the cell wall. In these experimental conditions, acidic invertase activity was not modified in ABA-treated plants. Sucrose hydrolysis was, rather, directed by neutral invertase since its activity increased at the same time interval displaying sucrose depletion. Interestingly, NRA was enhanced at the same time. These data are in agreement with data obtained on chicory cells in which ABA modified the intracellular carbohydrate metabolism and inhibited acidic invertase (Chraïbi *et al.*, 1992). Neutral invertase is a cytosolic enzyme which has been isolated in several species including chicory (Van den Ende and Van Laere, 1995). The enzyme seems to be confined to mature storage tissues of sucrose-accumulating plants and active in slow growing tissues such as tuberous roots. ABA which is known as a growth retardant should preferentially regulate neutral instead of acidic invertases which are mainly active in fast growing tissues.

Strong evidence has been presented that protein (de)phosphorylation plays an important role in ABA action. The ABA-insensitive locus *ABI-1* from *Arabidopsis* has been found to be a PP2C-type phosphatase (Leung *et al.*, 1997). Also, evidence shows that the phosphorylation/dephosphorylation reaction may regulate NRA in cells. Recent data demonstrated that PPI and PP2A protein phosphatases are involved in this NR metabolic control (Mackintosh, 1992; Huber *et al.*, 1992; Glaab and Kaiser, 1996). Moreover, key enzymes of the carbohydrate pathway are controlled by protein phosphorylation (Huber and Huber, 1992) and this may be critical to the carbon fluxes between sucrose and amino acids. In this report, it has been shown that, based on the sensitivity of NR to Mg^{2+} inhibition (Huber *et al.*, 1994), changes in chicory NRA in the presence of ABA were not influenced by a protein phosphorylation/dephosphorylation mechanism. As ABA enhanced both the NR protein and the NR mRNA levels, one can assume that ABA induced a *de novo* synthesis of NR and not a post-translational modification of the NR protein. Since the ABA-mediated effect on mRNA stability has already been reported on the *Em* wheat ABA-inducible gene (Williamson and Quatrano, 1988), post-transcriptional regulation can not be ruled out.

The molecular basis of the modulation of *nia* gene by ABA will be better understood by analysing the *nia* promoter and characterizing the *cis*-acting elements

implicated in the regulation of NR by ABA. Such analysis is presently underway.

In conclusion, in chicory roots, 10^{-7} M ABA promoted enhanced NRA, NR protein and NR-mRNA levels. It thus upregulates NR at a transcriptional level and work is presently underway to analyse *cis*-elements which might be involved. Nevertheless, ABA modified sucrose metabolism as well, so that besides transcriptional regulation of *nra*, a metabolic control may operate. Changes in the sucrose metabolism may provide reductants and energy as well, whereas reversible covalent modifications seemingly do not operate.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr G Conejo (INRA, Montpellier) for the gift of the anti-NR maize polyclonal antibody; Dr M Caboche (INRA, Versailles) for the gift of the anti-NR maize monoclonal antibody and Dr B Hirel (INRA, Versailles) for the generous gift of tobacco GSI cDNA.

References

- Bachmann M, Huber JL, Liao P-C, Gage DA, Huber SC. 1996. The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Letters* **387**, 127-31.
- Beevers L, Hageman RH. 1980. Nitrate and nitrite reduction. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry of plants*. New York: Academic Press, 115-68.
- Bradford MM. 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-54.
- Bray EA. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* **103**, 1035-40.
- Cataldo DA, Schrader LE, Youngs VL. 1974. Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. *Crop Science* **14**, 854-6.
- Chérel I, Marion-Poll A, Meyer C, Rouze P. 1986. Immunological comparisons of nitrate reductases of different plant species using monoclonal antibodies. *Plant Physiology* **81**, 376-8.
- Cheikh N, Brenner ML. 1992. Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiology* **100**, 1230-7.
- Chraïbi A, Palms B, Druart N, Goupil P, Gojon A, Rambour S. 1995. Influence of abscisic acid on nitrogen partitioning, sucrose metabolism and nitrate reductase activity of chicory suspension cells. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1525-33.
- Church G, Gilbert W. 1984. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **81**, 1991-5.
- Dorchies V, Rambour S. 1985. Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* L. var Witloof à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*. *Physiologie Végétale* **23**, 25-35.
- Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris P-C, Bouvier-Durand M, Vartanian N. 1994. Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Molecular Biology* **26**, 1557-77.
- Glaab J, Kaiser WM. 1996. The protein kinase, protein phosphatase and inhibitor protein of nitrate reductase are ubiquitous in higher plants and independent of nitrate reductase expression and turnover. *Planta* **199**, 57-63.
- Goupil P, Croisille Y, Croisille F, Ledoigt G. 1988. Jerusalem artichoke invertases. Immunocharacterization of a soluble form and its putative precursor. *Plant Science* **54**, 54-64.
- Hartung W, Davies WJ. 1991. Drought-induced changes in physiology and ABA. In: Davies WJ, ed. *Abscisic acid: physiology and biochemistry*. Bios Scientific Publishers Ltd, 63-75.
- Heller R. 1953. Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Annales de Sciences Naturelles, Botanique végétale* **14**, 1-223.
- Hoff T, Truong H-N, Caboche M. 1994. The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant, Cell and Environment* **17**, 489-506.
- Huber SC, Huber JL. 1992. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiology* **99**, 1275-8.
- Huber JL, Huber SC, Campbell WH, Redinbaugh MG. 1992. Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **296**, 58-65.
- Huber JL, Redinbaugh MG, Huber SC, Campbell WH. 1994. Regulation of maize leaf nitrate reductase activity involves both gene expression and protein phosphorylation. *Plant Physiology* **106**, 1667-74.
- Jaworski EG. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **43**, 1274-9.
- Jorgensen OS, Andersen B. 1973. An improved glucose oxidase-peroxydase coupled assay for β -fructosidase activity. *Analytical Biochemistry* **53**, 141-5.
- Kaiser WM, Huber SC. 1994. Post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiology* **106**, 817-21.
- Kende H, Hahn H, Kays SE. 1971. Enhancement of nitrate reductase activity by benzyladenine in *Agrostemma githago*. *Plant Physiology* **48**, 702-6.
- Leung J, Merlot S, Giraudat J. 1997. The *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* **9**, 759-71.
- Lillo C. 1991. Diurnal variation of corn leaf nitrate reductase: an experimental distinction between transcriptional and post-transcriptional control. *Plant Science* **73**, 149-54.
- Lu J-L, Ertl JR, Chen C-M. 1992. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiology* **98**, 1255-60.
- Mackintosh C. 1992. Regulation of spinach nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1137**, 121-6.
- Mackintosh C, Douglas P, Lillo C. 1995. Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Physiology* **107**, 451-7.
- Morilla CA, Boyer JS, Hagenan RH. 1973. Nitrate reductase activity and polysomal content of corn (*Zea mays* L.) having lower water potential. *Plant Physiology* **51**, 817-24.
- Palmer CE. 1981. Influence of abscisic acid on nitrate accumulation and nitrate reductase activity in potato tuber slices. *Plant Cell Physiology* **22**, 1541-51.
- Palmer CE. 1985. The relationship of abscisic acid to nitrate reductase activity in the potato plant. *Plant Cell Physiology* **26**, 1167-74.
- Palms B, Goupil P, de Almeida J, Van Der Straeten D, Van Montagu M, Rambour S. 1996. Evidence for the nitrate-

- dependent spatial regulation of the nitrate reductase gene in chicory roots. *Planta* **200**, 20–7.
- Quatrano RS, Bartels D, Ho THD, Pagès M.** 1997. New insights into ABA-mediated processes. *The Plant Cell* **9**, 470–5.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Skriver K, Mundy J.** 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell* **2**, 503–12.
- Solomonson LP, Barber MJ.** 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**, 225–53.
- Van den Ende W, Van Laere A.** 1995. Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* **93**, 241–8.
- Vartanian N, Marcotte L, Giraudat J.** 1994. Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **104**, 761–7.
- Verwoerd TC, Dekker BMM, Hoekema A.** 1989. A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research* **6**, 2362.
- Vuyisteker C, Leleu O, Rambour S.** 1997. Influence of BAP and NAA on the expression of nitrate reductase activity in excised chicory roots. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1079–85.
- Williamson JD, Quatrano RS.** 1988. ABA-regulation of two classes of embryo-specific sequences in mature wheat embryos. *Plant Physiology* **86**, 208–15.

