



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale  
"Ressources, Procédés, Produits, Environnement"

## Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de  
**Docteur de l'Université Henri Poincaré, NANCY-I**  
**en Biologie Forestière**

par

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

**Marie-Noëlle JORDY**

### **Les variations saisonnières au sein des apex caulinaires du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) depuis la graine jusqu'à l'état adulte**

Travaux effectués au Laboratoire de Biologie Forestière, Faculté des Sciences-Nancy I

Soutenance publique le 5 décembre 2000  
A la Faculté des Sciences Nancy I - Amphithéâtre 5

Membres du Jury :

Rapporteurs :	M. Georges DUCREUX	Professeur, Université Paris Sud
	M. Jean-Daniel VIEMONT	Professeur, Université Angers
Examineurs :	M. Olivier MONTEUUIS	Chercheur - HDR, CIRAD Forêt, Montpellier
	M. Marc PAQUES	Directeur de Recherche, AFOCEL, Nangis
	M. Edgar WAGNER	Professeur Université de Fribourg en Brigsau (Allemagne)
	M. Jean-Michel FAVRE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I

*Ce travail a été réalisé avec le soutien financier du programme spécifique RTD de la Commission Européenne, Agriculture et Pêche (FAIR), 3-CT-96-1445, "Development, validation and application of molecular, morphological and physiological markers for juvenile and mature state characterisation in woody plant species". Ces travaux ne reflètent pas nécessairement ses vues et en aucun cas, la politique future de la Commission dans ce domaine.*

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

Mes remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de cette thèse:

- J-M Favre qui m'a fait confiance pour atteindre les objectifs de la thèse et du projet CEE

- et messieurs les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont apporté à mes travaux et les remarques constructives qu'ils m'ont apportées le jour de ma soutenance.

....mais aussi à...

- E. De Faye qui a participé à la mise en place du projet,

- toutes les personnes des équipes européennes qui ont participé au projet CEE : Jolana, Suzy, Donato, Milvia, Gerard, René, Ana, Edgar, Enrique., Roberto, ... avec qui j'ai partagé bien sûr les connaissances, mais aussi l'entente, la bonne humeur, et de super souvenirs.

- R. Zegzouti, J-P Bedell et surtout Anas Mansour pour leurs apports techniques.

- L'AFOCEL (Castelnau-le-Médoc et Nangis) pour m'avoir fourni le matériel d'étude avec l'aide de M. Pâques, de P. Alazard et son équipe qui ont assumé la tâche périlleuse de prélever les bourgeons au sommet des pins adultes et de L. Harvengt pour les embryons somatiques.

- Virginie Acheré, Anne-Marie Trontin, Valérie's "Legué et Tchung, PFR, Sylvain Jeandroz, Jean-Claude Pargney, Carole Kaupp... En bref, toute l'équipe de joyeux chercheurs qui m'a entourée!

- Fabrice, ses parents et les miens, et aussi toute la famille et amis qui se sont démenés le jour J pour venir me soutenir.

- et encore à Fabrice pour m'avoir aussi soutenue avant et après la soutenance!

## SOMMAIRE

### CHAPITRE I: INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

### CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES 7

#### II.1- MATÉRIEL 8

II.1.1 – LES SEMIS , LES PLANTS JUVÉNILES ET ADULTES 8

II.1.2 - LES EMBRYONS SOMATIQUES ET ZYGOTIQUES CULTIVÉS *IN VITRO* 9

#### II.2- MÉTHODES 10

II.2.1 - OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES 10

II.2.2 - MICROSCOPIE À BALAYAGE 10

II.2.3 - MICROSCOPIE PHOTONIQUE 10

II.2.4 - EXPÉRIENCES ANNEXES : ETUDE DE LA CATALASE 14

### CHAPITRE III: DE L'EMBRYON MATURE AU SEMIS 16

#### III.1 – INTRODUCTION 17

III.1.1 - GRAINE ET JEUNES SEMIS 17

III.1.2- EMBRYONS SOMATIQUES 22

III.1. 3 - OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 23

#### III.2 – RESULTATS 25

III.2.1- EMBRYONS ZYGOTIQUES CONTENUS DANS L'ENDOSPERME 25

III.2.2 - EMBRYONS SOMATIQUES ET ZYGOTIQUES EXCISÉS 34

#### III.3 - DISCUSSION 38

III.3.1- GERMINATION ET CROISSANCE POST-GERMINATIVE DES GRAINES 38

III.3.2 - CROISSANCE DES EMBRYONS SOMATIQUES ET DES EMBRYONS ZYGOTIQUES EXCISÉS 56

III.3.3 – SCHÉMA RÉCAPITULATIF DES ÉCHANGES MÉTABOLIQUES PENDANT LA GERMINATION ET LA CROISSANCE POST-GERMINATIVE 63

### CHAPITRE IV : DES PLANTS JUVÉNILES, AUX ADULTES VÉGÉTATIFS ET REPRODUCTEURS EVOLUTION SAISONNIÈRE DE L'EXTRÉMITÉ APICALE DES BOURGEONS 65

#### IV.1- INTRODUCTION 66

IV.2- RESULTATS 69

IV.2.1 – MORPHOLOGIE DES EXTRÉMITÉS APICALES CAULINAIRES	69
IV.2.2- MORPHOMÉTRIE DE L' APEX DU BOURGEON TERMINAL	74
IV.2.3- RÉPARTITION DES RÉSERVES	81
<b>IV.3 - DISCUSSION</b>	<b>87</b>
IV.3.1 - IDENTIFICATION DES PÉRIODES D' ACTIVITÉ	87
IV.3.2 - EVOLUTION DU CONTENU EN RÉSERVES	97
IV.3.3 - RELATION ENTRE LES VARIATIONS SAISONNIÈRES DE L'ORGANOGENÈSE ET DE LA GESTION DES MÉTABOLITES : HYPOTHÈSE	102
<b><u>CHAPITRE V: CONCLUSION GÉNÉRALE</u></b>	<b>109</b>
<b>V.1 – SYNTHÈSE</b>	<b>110</b>
V.1.1 – ORGANOGENÈSE	110
V.1.2 – LES RÉSERVES	111
V.1.3 - ORGANOGENÈSE ET GESTION DES RÉSERVES AMYLACÉES: HYPOTHÈSES	114
<b>V.2 – PROCESSUS IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION DE L' APEX AU COURS DE LA VIE DE LA PLANTE ?</b>	<b>116</b>
<b><u>CHAPITRE VI: BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>119</b>

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
 BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
 Rue du Jardin Botanique  
 54600 VILLERS-LES-NANCY

## Liste des figures et tableaux

face à p.8:	<b>figure 1:</b> Morphologie de la tige portée par des plants d'âges différents
face à p.8:	<b>figure 2:</b> Stade de prélèvement des semis
face à p. 9:	<b>figure 3:</b> Les périodes de prélèvement sélectionnées en fonction de l'activité d'élongation et d'organogénèse
p.9	<b>figure 4 :</b> Sites de prélèvement sur les plants
p.11.	<b>figure 5:</b> Zones étudiées dans l'apex
face à p.19	<b>figure 6:</b> Transformation des lipides en carbohydrates dans les tissus de réserves de la graine.
face à p 20	<b>figure 7:</b> Activité des enzymes du cycle glyoxalique intermédiaires entre le catabolisme des acides gras et la gluconéogénèse.
face à p. 25	<b>figure 8:</b> Morphologie des apex caulinaires depuis la graine jusqu'au semis observé au MEB : mise en évidence de l'activité organogène
p. 26	<b>figure 9:</b> Diamètre du SAM pendant la germination et la post-germination
face à p.27	<b>figure 10 :</b> Evolution parallèle de la distribution des triglycérides et de la catalase.
face à p.29	<b>figure 11 :</b> Evolution du contenu en grains d'aleurone et en amidon pendant la germination et la post-germination.
p. 33	<b>figure 12:</b> Mise en évidence des différentes isoformes de la catalase au cours de la croissance post-germinative (gel natif PAGE)
face à p.36	<b>figure 13:</b> Distribution des réserves et évolution de l'apex des embryons somatiques et zygotiques excisés
p 40	<b>figure 14:</b> Evolution de la distribution des triglycérides, des grains d'aleurone et des tanins pendant la germination et la croissance post-germinative
p. 42	<b>figure 15:</b> Protéines de réserves liées aux oléosomes ( <i>d'après Bethke et al., 1998</i> )
p. 45	<b>figure 16:</b> formation d'amidon à partir du saccharose ( <i>d'après Schaffer et Petreikov, 1997</i> )
p. 47	<b>figure 17:</b> Evolution de la distribution de l'amidon pendant la germination et la croissance post-germinative
p. 54	<b>figure 18:</b> Evolution parallèle du contenu en lipides et en amidon pendant la germination et la post-germination
face à p.64	<b>figure 19 :</b> Schéma récapitulatif des échanges pendant la germination et la croissance post-germinative
p. 66	<b>figure 20:</b> description du cycle morphogénétique des plants juvéniles et adultes de pin maritime
p. 68	<b>figure 21:</b> Site de prélèvement des bourgeons sur les plants à différents stades de développement
face à p.70	<b>figure 22:</b> Evolution de la morphologie de l'apex de plant juvéniles au cours de la seconde saison de végétation
face à p.72	<b>figure 23:</b> Evolution de la morphologie de bourgeons de plant adulte au cours d'une saison végétative
face à p.75	<b>figure 24:</b> Evolution de la taille du SAM en fonction des saisons
face à p.76	<b>figure 25:</b> Comparaison de la taille du SAM entre les apex de plants juvéniles, adultes végétatifs et adultes reproducteurs
face à p.77	<b>figure 26:</b> Evolution saisonnière du pourcentage d'ébauches foliaires classées en fonction de leur taille
face à p.78	<b>figure 27:</b> Estimation semi-quantitative de la teneur en ARN sur des coupes longitudinales radiales du dôme apical
face à p.81	<b>figure 28:</b> Localisation des triglycérides dans les apex des adultes reproducteurs.
face à p.82	<b>figure 29 :</b> Evolution de la distribution des réserves polysaccharidiques dans les apex de plants juvéniles en fonction de la période de prélèvement
face à p.83	<b>figure 30:</b> Etude semi-quantitative de la distribution de l'amidon au sein de l'apex caulinaire
face à p.84	<b>figure 31:</b> Evolution du contenu en polysaccharides dans les apex des adultes végétatifs et adultes reproducteurs.
face à p.85	<b>figure 32:</b> Evolution des tanins dans les apex
face à p.86	<b>figure 33:</b> Evolution de la surface relative en tanins contenus dans le parenchyme médullaire sub-apical
p. 90	<b>figure 34:</b> Modifications de l'apex caulinaire lié aux différentes activités
p. 96	<b>figure 35:</b> Schéma représentant l'évolution de la distribution des triglycérides au cours des saisons identique chez les matériels juvéniles et adultes
face à p 99	<b>figure 36:</b> Evolution de la distribution des réserves amylacées
face à p.103	<b>figure 37:</b> Variations possibles de l'intensité des sources et des puits au niveau du bourgeon terminal entre les périodes de prélèvement de matériel adulte
p. 32	<b>Tableau 1:</b> Activité spécifique de la catalase dans la graine puis dans la plantule de <i>Pinus pinaster</i> au cours de la croissance post-germinative.
p.34	<b>Tableau 2 :</b> Morphométrie de l'apex caulinaire des embryons somatiques :
face à p. 63	<b>Tableau 3 :</b> Paramètres susceptibles d'affecter le développement ou la croissance des embryons en conditions <i>in vitro</i> et propositions d'amélioration du milieu de germination
p. 75	<b>Tableau 4 :</b> Variation de la hauteur du SAM en fonction de sa situation de dominance
p. 80	<b>Tableau 5 :</b> Estimation des périodes d'activité au sein de l'apex caulinaire
p. 94	<b>Tableau 6:</b> Interprétation en terme de source-puits des variations saisonnières des activités de croissance et d'organogénèse au niveau du bourgeon terminal matériels juvéniles et adultes.
p. 107	<b>Tableau 7:</b> Quelques critères de différenciation entre les différents types de matériel

## Liste des abréviations

**c:** cotylédons  
**h:** hypocotyle  
**r:** radicule  
**mr:** méristème racinaire  
**bg/bl:** bourgeon latéral  
**pg:** primordium gemmaire  
**ap:** aiguilles primaires  
**éc:** écailles  
**é:** ébauches  
**sam:** méristème apical caulinaire  
= **SAM:** shoot apical meristem  
**cmc:** méristème d'attente  
ou méristème central  
**mm:** méristème médullaire  
**p:** primordia  
**pz:** anneau initial  
ou méristème latéral  
**sm:** méristème apical  
d'un bourgeon latéral  
**pm:** parenchyme médullaire  
**pc:** parenchyme cortical  
**pcb:** procambium  
**vs:** système vasculaire

**al:** grain d'aleurone  
**am:** grain d'amidon  
**t:** tanins  
**fc:** file de cellules contenant  
des tanins vacuolaires  
**gp:** tanins granulaires  
**vp:** tanins vacuolaires

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
**BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES**  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

**Les variations saisonnières  
au sein des apex caulinaires du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.)  
depuis la graine jusqu'à l'état adulte**

**Marie-Noëlle Jordy**

**Résumé de thèse:**

Les apex caulinaires de pin maritime ont été étudiés à plusieurs stades de la vie de l'arbre afin d'identifier les modifications qui y interviennent. L'examen de bourgeons terminaux a donc été réalisé pendant une saison végétative sur des semis, des plants juvéniles et des plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs. La formation d'ébauches foliaires et la production de bourgeons latéraux résultant de l'activité du méristème apical ont été suivies par une analyse morphométrique (taille du méristème, estimation semi-quantitative du contenu en ARN...), en parallèle avec le contenu en réserves insolubles.

Nous avons ainsi montré que la formation d'un cycle morphogénétique s'accompagne toujours de l'accumulation d'amidon dans le parenchyme médullaire sous-jacent au méristème, avec un maximum pendant la période d'activité optimale. À l'inverse, les triglycérides sont accumulés en abondance dans le bourgeon pendant la période de ralentissement d'activité, tous les territoires de l'apex en contiennent à l'exception des ébauches foliaires et du méristème latéral. Ces réserves sont ensuite hydrolysées lors de la post-germination ou bien lors de l'entrée en croissance de la pousse au printemps selon un modèle spatio-temporel spécifique.

Cette régularité dans les stockages de réserves en relation avec les périodes d'activité permet néanmoins de différencier les matériels juvéniles des matériels adultes. En effet, l'activité du méristème mise en évidence par les paramètres morphométriques et le contenu relatif en ARN indique des périodes d'organogenèse différentes chez les matériels juvéniles et reproducteurs. Il y a en effet, 2 périodes d'organogenèse marquées par une période de ralentissement en juillet chez les juvéniles alors que chez les adultes, l'activité organogène est continue, avec un maximum observé en juillet. L'accumulation d'amidon étant simultanée avec la période d'activité méristématique, la présence d'amidon en abondance dans les apex caulinaires est révélatrice des différences entre juvéniles et adultes.

Le suivi de la croissance post-germinative a également permis de comparer la croissance des embryons zygotiques aux embryons somatiques. Les résultats obtenus soulignent le rôle de l'endosperme dans la croissance post-germinative de l'embryon.

*Pinus pinaster* apical buds were studied at different stages of the life: seedlings, juvenile, adult vegetative and adult reproductive plants. Needle formation and lateral bud production resulting from the shoot apical meristem (SAM) activity were analysed with some morphometric parameters, and the distribution of storage compounds.

The morphogenetic cycle is concomitant with starch storage in pith parenchyma against the SAM. The accumulation was maximum during the most active period of organogenesis. In contrast, triglycerides were stored during the slowest active period, distributed in the whole shoot apex except in the lateral meristem and the needle primordia. This kind of reserve was depleted during the post-germinative growth or during the spring growth following a specific spatio-temporal pattern.

Storage compound during the SAM activity periods allow to discriminate juvenile and adult materials. Juvenile material exhibited 2 organogenesis periods during one growth season with a maximum in spring and autumn, while this activity was unceasing in adult material with a maximum in summer. The abundance of starch at these periods facilitated the discrimination between the 2 kinds of materials.

Examination of the shoot apex of zygotic and somatic embryo during the post-germinative growth allowed also to underline the role of the megagametophyte during this period.

# **CHAPITRE I**

## **Introduction générale**

Le pin maritime représente 10% environ de la surface boisée en France dont la majeure partie est localisée en Aquitaine, où il représente l'essentiel de la ressource forestière (75%: source : IFN 1994). Sa rusticité et sa tolérance à l'anoxie racinaire en font une espèce intéressante pour le boisement sur sols sableux et acides tel que ceux du massif landais (Baradat & Parstuszka, 1992). Exploité entre 35 et 70 ans, il fournissait, au moins jusqu'en 1999, l'une des productions les plus importantes de bois d'œuvre et de bois d'industrie en France (Guyon, 1998 ; Baradat & Parstuszka, 1992). Néanmoins, cette ressource majeure a été fortement touchée par la tempête du 25-26 décembre 1999. C'est pourquoi, la production massive de plants reste une priorité à l'heure actuelle.

Deux voies peuvent être envisagées : ou bien l'utilisation de semis issus de peuplements classés ou de vergers à graines, ou bien l'utilisation de plants issus de la multiplication végétative. Cette deuxième voie permet de reproduire un maximum de caractéristiques du plant donneur satisfaisant les critères de sélection retenus (croissance rapide, rectitude du tronc, résistance aux insectes ravageurs...). La multiplication végétative peut être réalisée en faisant appel à des techniques horticoles parmi lesquelles le greffage, le marcottage, le bouturage, ou bien par le biais des micro-méthodes comme le micro-greffage, le micro-bouturage et l'embryogenèse somatique. La plupart de ces techniques sont applicables au pin maritime :

- Une technique intermédiaire entre le bouturage et le marcottage permet d'induire l'émergence de racines adventives sur la tige de pin après décortication annulaire et traitement à l'auxine dans un environnement humide (David & Angeli, 1953).
- Le micro-bouturage à partir de bourgeons axillaires peut également donner naissance à des individus capables de s'enraciner et de former des plants (David, 1966 ; Dumas, 1987).
- Le micro-greffage du méristème apical caulinaire sur des semis cultivés *in vitro* (Dumas, Francllet & Monteuis, 1989) et,
- la régénération *in vitro* par bourgeonnement adventif sur euphylls (Dumas & Monteuis, 1991) ou sur cotylédons (Monteuis & Dumas, 1992) ont également été réussis.

- Enfin, l'embryogenèse somatique a pu être induite à partir d'embryons zygotiques immatures (Bercetche & Pâques, 1995).

L'efficacité de ces méthodes repose sur les capacités d'organogenèse ou de néo-organogenèse des organes et des tissus utilisés. Celles-ci dépendent de l'âge des individus donneurs. Ainsi, un individu juvénile est plus facilement multiplié qu'un adulte. Chez le pin maritime, l'état juvénile est caractérisé par un appareil photosynthétique constitué d'euphylls et de pseudophylls portées par des rameaux courts (brachyblastes), tandis que chez les adultes, seules les pseudophylls assurent ce rôle (Kremer *et al.*, 1990). La différenciation cellulaire qui conduit à la formation des fleurs lorsque la maturité florale est acquise peut induire selon l'espèce, une récalcitrance à la multiplication végétative (Trippi, 1963a). Ainsi l'homogénéisation des pièces foliaires photosynthétique puis la formation des fleurs chez les individus adultes reproducteurs sont autant d'étapes dans la vie du pin maritime qui sont susceptibles d'induire une diminution de l'aptitude à la multiplication végétative. Ces événements se succèdent naturellement en fonction de l'**âge chronologique**.

Néanmoins, à un âge chronologique donné, cette aptitude n'est pas égale dans toutes les parties d'une même plante (Hackett, 1985). Ainsi, le bouturage d'hypocotyles isolés à partir de semis de pin, *P. strobus* et *P. taeda*, ayant déjà formé un épicotyle de plusieurs centimètres, est plus aisé que celui de l'épicotyle du même plant (Diaz-Sala *et al.*, 1996 ; Goldfarb *et al.*, 1998). De même, les bourgeons situés dans la partie supérieure du houppier de séquoia géant sont plus récalcitrants au bouturage que ceux situés à la base de l'arbre (Monteuuis, 1988) et des résultats similaires ont été obtenus sur différentes espèces de pin (Hackett, 1985). Les branches portant les bourgeons récalcitrants, ont été fabriquées par un méristème plus âgé que celui qui a fabriqué les branches basales, c'est pourquoi, on attribue à ces 2 types de matériel un **âge ontogénique** différent alors qu'ils appartiennent au même arbre.

L'époque du prélèvement des explants est enfin, très importante pour induire le processus de rajeunissement. Chez le séquoia géant par exemple, En effet, le micro-bouturage est réalisable en période de repos et au débourrement lorsque les explants sont prélevés sur des plants juvéniles, et uniquement au débourrement sur les plants adultes (Monteuuis, 1987a). Cette particularité s'accompagne de changements biochimiques et histo-cytologiques qui permettent de définir l'**âge physiologique** (Monteuuis & Bon, 1998).

Ainsi, l'aptitude à la multiplication végétative dépend de nombreux facteurs manifestement complexes. A titre d'exemple, le nombre de boutures de *Castanea vulgaris* est optimal à n'importe quel moment de l'année dans la partie basale de l'arbre où des caractéristiques juvéniles sont observées, et uniquement en automne pour les explants issus de la partie apicale de l'arbre (Trippi, 1963a). Différents marqueurs d'états juvéniles ou matures ont ainsi été mis en évidence : la morphologie des pièces foliaires (Trippi, 1963 bc, Monteuis & Dumas, 1992), la présence d'une protéine de juvénilité et le taux de glycosylation des protéines dans les apex de séquoia géant (Bon, 1988 ; Faure, 1993), une quantité variable d'un facteur G de nature phénolique (Paton, 1983 in Favre 1998), le contenu en ARN des apex (Monteuuis & Gendraud, 1987), la stimulation ou l'inhibition d'enzymes (Trippi, 1963d)... De plus, comme en témoignent les résultats de Trippi (1963a) ou de Monteuis (1987a), les variations saisonnières peuvent induire des modifications de l'âge physiologique. C'est pourquoi, nous proposons d'aborder la recherche de marqueur en étudiant les variations saisonnières de plants issus de graines et de différents âges.

Le développement d'un végétal peut être représenté comme le résultat de la combinaison de différentes activités - différenciation cellulaire, production et utilisation de métabolites, etc.- dont l'intensité varie différemment au cours de l'âge (Favre, 1998). L'étude de l'apex et plus particulièrement du méristème apical caulinaire (SAM) s'impose dans ce type de recherche (Monteuuis & Bon, 1998) car le SAM est à l'origine de chacune des pièces qui constituent le bourgeon puis le rameau, et donc, l'ensemble des organes dont les caractéristiques sont utilisées pour définir des marqueurs morphologiques de juvénilité ou de maturité. De plus, le SAM peut être prélevé pour réaliser des micro-greffes (Dumas, Francllet & Monteuis, 1989). Enfin, l'implication des différents territoires qui composent le SAM dans la détermination des modes de fonctionnement juvénile ou mature a été évoquée mais peu d'études lui ont été consacrées jusqu'à présent (Favre, 1998 ; Monteuis & Bon, 1998). Nous avons donc orienté notre travail vers la caractérisation histocytologique du SAM par sa morphologie, son contenu en ARN et en différents métabolites de réserves.

En nous basant sur la description précise de la morphologie des plants de pin maritime réalisée par Kremer (1990), nous avons défini 4 types de matériels :

- les semis,
- les plants en seconde saison de végétation présentant des caractéristiques juvéniles,
- les plants adultes végétatifs

- et enfin les plants adultes ayant différenciés des inflorescences femelles (=adultes reproducteurs).

Le choix des paramètres testés sur ces différents matériels a été déterminé en fonction de plusieurs critères :

- la rapidité et la facilité de détermination des paramètres qui définissent la morphologie de l'apex et tout particulièrement du méristème apical caulinaire,
- la connaissance de marqueurs déjà testés sur des greffes tel que l'estimation de la quantité d'ARN révélateurs de l'activité mitotique dans le SAM (Riding, 1976)
- l'identification par des tests histochimiques, de substances présentes dans les semis dont nous voulions faire le suivi au cours de la vie de la plante : lipides, grains d'aleurone, amidon et tanins.

Les périodes de prélèvement de l'ensemble de ces matériels ont été choisies en fonction des phases de repos ou d'activité des apex caulinaires. Chez les semis, ces événements se succèdent sur quelques mois, tandis que les autres types de matériels utilisés présentent des cycles de croissance répartis sur une année. Ceci nous a conduit à diviser notre travail en deux parties :

- La première est consacrée à l'étude des semis depuis l'imbibition de la graine jusqu'à la période de repos hivernal. Au cours de la discussion, une attention particulière est tout d'abord donnée à la compréhension des phénomènes physiologiques intervenant pendant la croissance post-germinative. L'étude des lipides a été approfondie, notamment par l'étude de l'expression de la catalase impliquée dans la dégradation des réserves lipidiques. Ensuite, l'étude d'embryons somatiques et d'embryons zygotiques excisés a permis de vérifier la présence des différents critères caractérisant les plantules au début de la croissance post-germinative, de discuter les différences qui opposent chaque matériel et de rechercher les causes de ces différences. Enfin, un modèle des mécanismes physiologiques intervenant dans l'endosperme et la plantule est proposé pendant la croissance post-germinative. Les modifications de l'apex caulinaire observées pendant cette période ont été des raisons supplémentaires pour poursuivre notre étude à ce niveau.

- La seconde partie est consacrée à l'étude des plants juvéniles, adultes végétatifs et reproducteurs. Nous abordons alors, pour chaque paramètre étudié, la comparaison de ces trois matériels pour un stade de prélèvement donné et la comparaison des variations saisonnières de chaque matériel. Les résultats sont discutés dans le but de comprendre les

phénomènes qui induisent la formation des différents marqueurs, les variations saisonnières de la distribution de différentes réserves et les variations de l'organogenèse au cours de l'année.

## **CHAPITRE II**

### **Matériel et Méthodes**

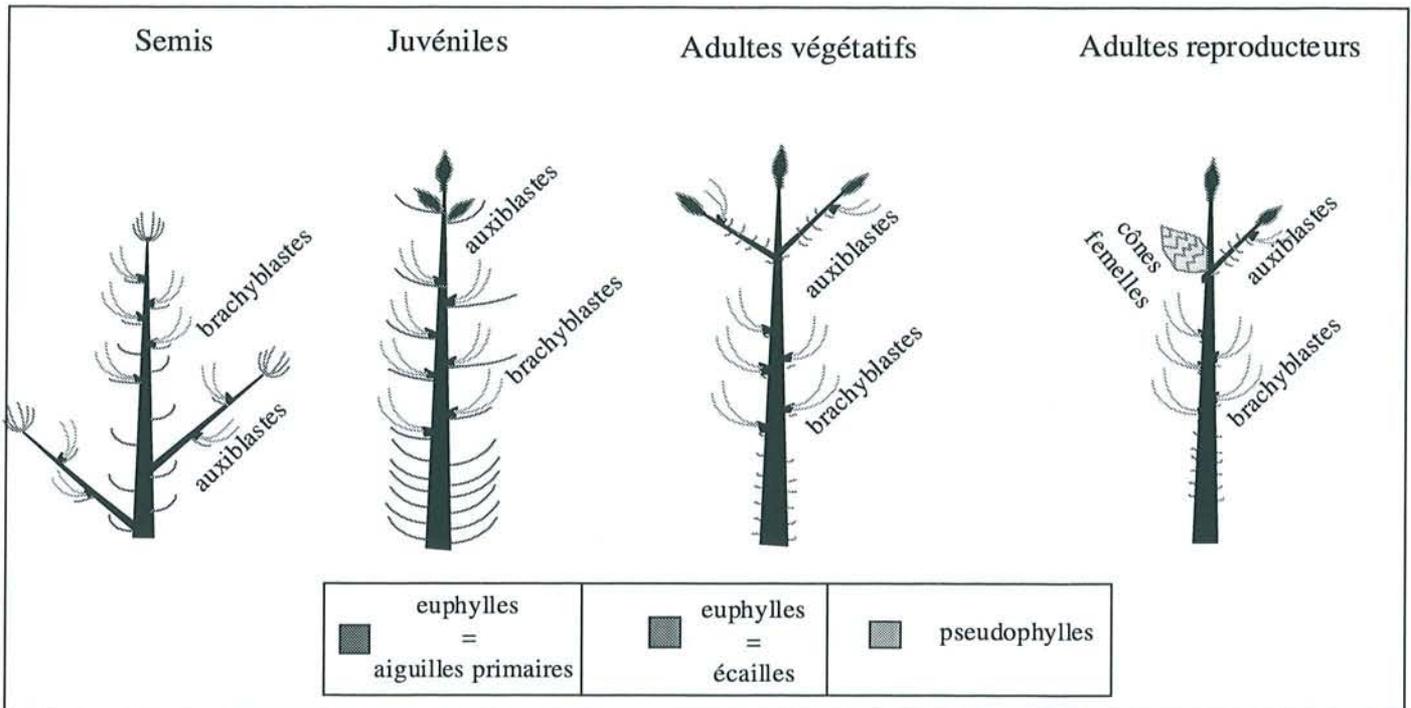


figure 1: Morphologie de la tige portée par des plants d'âges différents

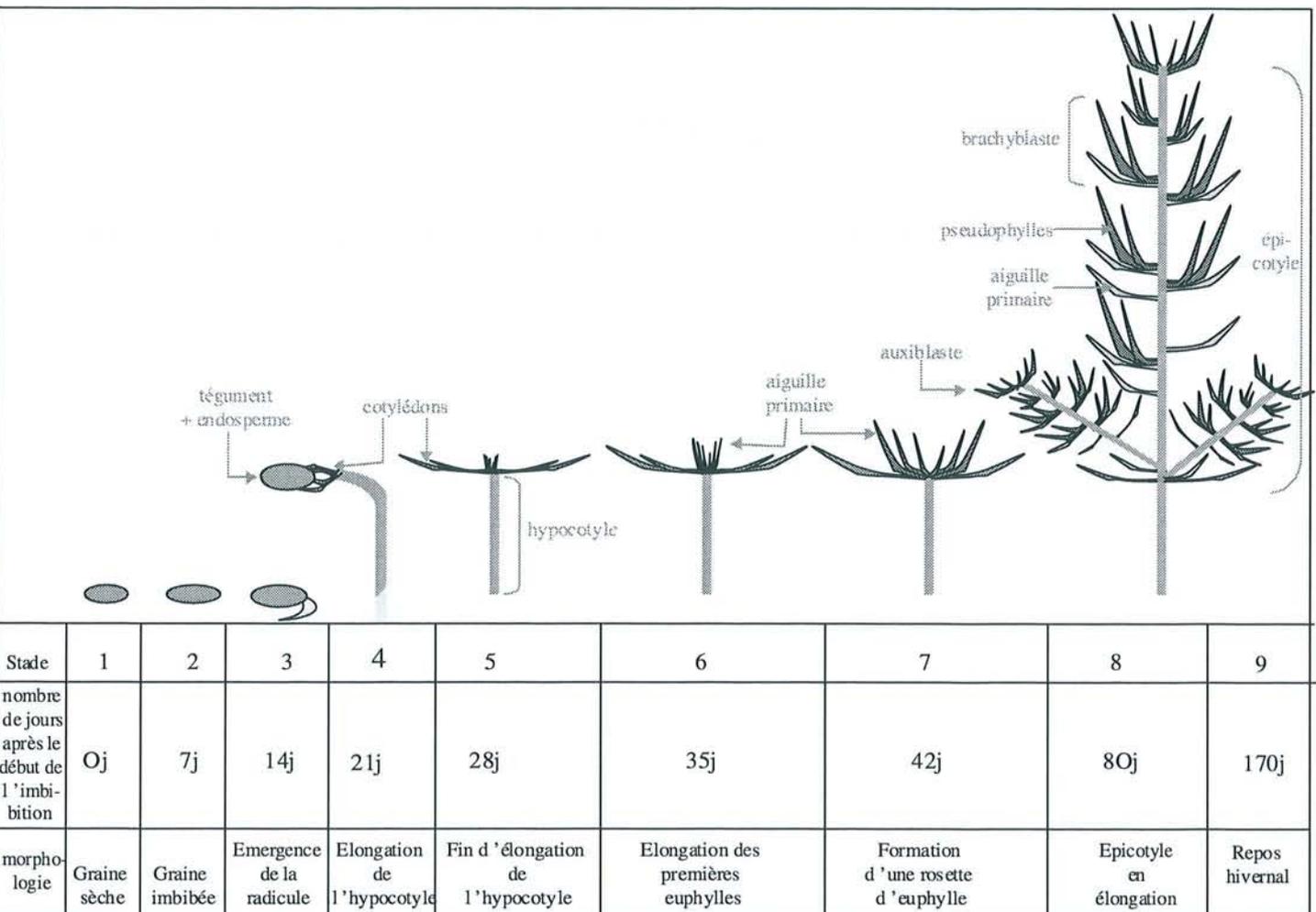


figure 2: Stade de prélèvement des semis

## **II.1- Matériel**

### **II.1.1 – Les semis , les plants juvéniles et adultes**

Quatre types de matériel ont été utilisés (figure 1):

- des plants en première saison de végétation (depuis la germination jusqu'au semis) présentant l'ensemble des caractéristiques morphologiques de juvénilité (euphylls, auxiblastes formés à la base de l'épicotyle et brachyblastes formés sporadiquement dans la partie supérieure),
- des plants en seconde saison de végétation (« plants de 1 an ») présentant des morphologies intermédiaires entre celle des plants en première saison de végétation et celle des plants plus âgés, nous les qualifierons de plants juvéniles,
- des plants en 3 ou 4<sup>ème</sup> saison dont le cycle morphogénétique est typiquement celui décrit plus haut, c'est à dire, des écailles à aisselle vide à la base suivies d'écailles axillant systématiquement des brachyblastes, et enfin un pseudo-verticille d'aiguilles axillant des auxiblastes (des cônes femelles sont très rarement observés) , nous les qualifierons de plants adultes végétatifs
- des plants de 20 à 25 ans, dont le cycle morphogénétique est identique au précédent mais sur lesquels les cônes femelles sont fréquemment observés.

La majorité de ce matériel a été fournie par l'Association Forêt Cellulose (AFOCEL) de Castelnau-le-Mèdoc et récolté à l'aide d'une nacelle sur le domaine de Sore entre décembre 1997 et avril 1999.

#### **II.1.1.1 - Les périodes de prélèvement**

Dans le cadre du premier chapitre, les embryons des graines sèches puis les plantules de graines germées sont étudiées. Au cours de la croissance post-germinative, notre étude a été restreinte à la zone apicale. Neuf stades de prélèvement ont alors été définis et sont présentés dans la figure 2.

Concernant les plants juvéniles et adultes, les prélèvements ont été effectués à plusieurs reprises au cours de l'année et en fonction des périodes de croissance décrites à partir de matériel adulte (David, 1966 ; Kremer & Roussel, 1986): figure 3

- en mars, période de débourrement (a)

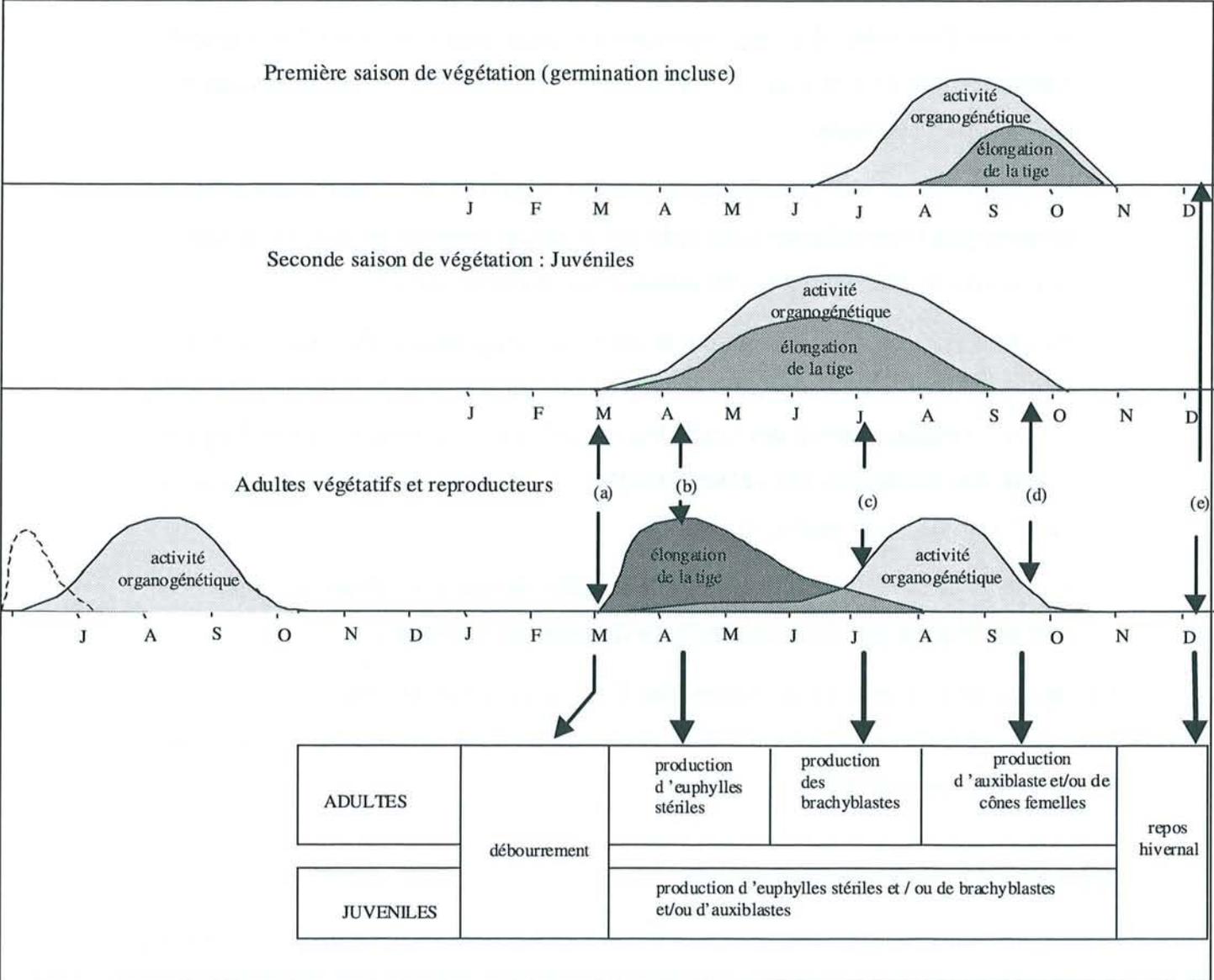


Figure 3: Les périodes de prélèvement sélectionnées en fonction de l'activité d'élongation et d'organogénèse

- en avril, période d'élongation de la tige (b)
- en juillet, fin d'élongation de la tige et organogenèse (c)
- en octobre ou novembre, fin de la période d'organogenèse (d)
- en décembre, période de repos (e)

### II.1.1.2 - Les sites de prélèvements sur la plante :

Dans le cas des graines puis des semis, les plantules sont étudiées dans leur ensemble, puis au fur et à mesure de la croissance dans l'hypocotyle et enfin, uniquement dans l'apex caulinaire.

Les apex caulinaires sont récoltés au sommet du plant. Dans le cas des plants en seconde saison de végétation, le prélèvement est effectué sur l'axe A1, alors qu'il est effectué sur les 2 axes A2 les plus proches du sommet notamment pour des raisons pratiques (figure 4).

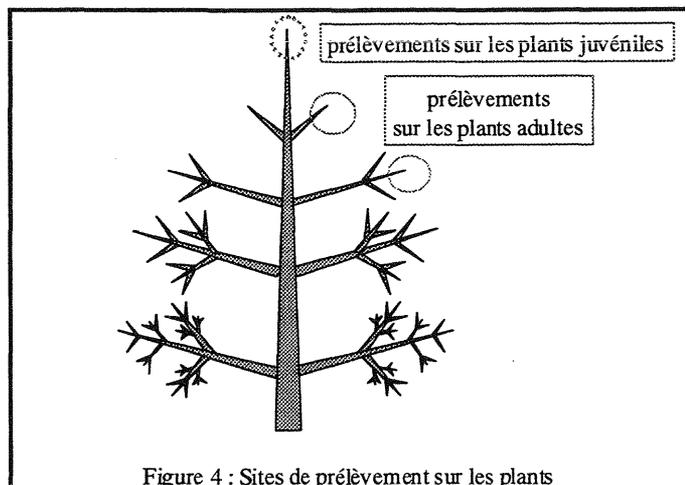


Figure 4 : Sites de prélèvement sur les plants

### II.1.2 - Les embryons somatiques et zygotiques cultivés *in vitro*

Les embryons somatiques déshydratés de *Pinus pinaster* sont obtenus à partir d'embryons zygotiques immatures (Bercetche & Pâques, 1995). Notre étude a été réalisée sur embryon du clone T325 fournit par l'AFOCEL Nangis. Ces embryons et des embryons zygotiques dont l'endosperme est supprimé (=embryons excisés) ont été cultivés dans les mêmes conditions sur un milieu de germination décrit par Margara (1977).

Ces 2 types de matériels sont comparés aux embryons zygotiques non excisés cultivés sur du papier filtre imbibé d'eau distillée jusqu'à l'émergence de la radicule puis sur substrat organique et minéral (mélange : argile et tourbe).

Les embryons non hydratés et les plantules prélevées 7 jours puis 11 jours après le début de l'hydratation sont étudiés à l'aide de toutes les techniques utilisées en microscopie photonique précisées dans le paragraphe suivant. Des plantules dont les euphylls sont en élongation (embryons somatiques prélevés 50 jours après le début de l'hydratation) sont également observées, mais, uniquement pour l'étude des triglycérides et de la morphologie de l'apex.

## **II.2- Méthodes**

### **II.2.1 - Observations morphologiques**

Après la récolte, la forme des euphylls (aiguilles ou écailles), la séquence des unités de croissance, et la présence de bourgeons latéraux sont observées avant fixation et dissection.

### **II.2.2 - Microscopie à balayage**

Afin de suivre l'organogenèse des apex caulinaire des embryons et des semis, les apex sont fixés pendant 9 heures dans une solution contenant 2,5% de glutaraldéhyde tamponnée à l'aide de 0,1M de phosphate de sodium (pH 7,2). Les échantillons sont ensuite lavés dans du tampon phosphate et post-fixés dans du tétr oxyde d'osmium à 4% (p/v) dilué dans le tampon phosphate (0,1M) pendant 1 heure à 4°C (Roland J.C & Vian B., 1991).

Après déshydratation progressive dans l'acétone, les échantillons sont placés dans un bain de 1,1,1,3,3,3,-hexaméthylsilazan ( $C_6H_{19}NSi_2$ ) provoquant la dessiccation (Bray *et al.*, 1993), puis séchés à l'air ambiant et fixés sur support métallique.

Après métallisation à l'or, les échantillons sont observés au Microscope Electronique à Balayage (Hitachi S. 2500).

### **II.2.3 - Microscopie photonique**

#### **II.2.3.1 – Préparation des échantillons**

##### **II.2.3.1.1 - Fixation**

Ainsi, 3x10 échantillons sont fixés pour chaque type de matériel. Un premier lot est fixé dans un mélange F.A.A contenant 10% formaldéhyde (v/v), 5% acide acétique (v/v) et 50% éthanol 95% (v/v) pendant 48h puis conservé dans l'éthanol (70%). Un second lot de

2x10 échantillons est fixé dans un mélange extemporané de 2 solutions à volume égale (CRAF), la première contenant 20 mM CrO<sub>3</sub> et 1,5% Acide Acétique (v/v), et la seconde, 10% Formaldéhyde (v/v). Les échantillons peuvent être conservés plusieurs mois dans le même liquide et doivent être rincés avant utilisation (Randolph, 1935).

### ***II.2.3.1.2 - Imprégnation – Inclusion – Coupes***

Un lot d'échantillon fixé dans chacun des 2 fixateurs est progressivement déshydraté dans l'éthanol, puis progressivement imprégné de roticlear® (solvant du paraplast). Après imprégnation dans un mélange solvant-paraplast à température ambiante pendant au moins 4h, les échantillons sont déposés dans le paraplast liquide à 54 C° pendant 24h puis sont inclus. Des coupes longitudinales radiales de 7µm sont ensuite effectuées et fixées sur une lame à l'aide de 0,01% d'eau gélatinée (p/v). Le paraplast est éliminé des échantillons après un bain dans du roticlear, et rinçage dans l'éthanol 100%. Toutes les coupes sont réalisées dans le plan longitudinal radial, et sont prêtes pour les colorations après rinçage dans l'eau distillée.

Un second lot d'échantillon fixé dans le CRAF est utilisé pour réaliser des coupes longitudinales radiales de 40 à 60µm à l'aide d'un microtome à congélation. Ces coupes sont utilisées pour la mise en évidence des triglycérides.

### **II.2.3.2 - Colorations**

#### ***II.2.3.2.1 - Mise en évidence de l'ARN et de l'ADN : Test de Brachet (Clark, 1981)***

Les coupes d'échantillons fixés dans le FAA sont colorées pendant 10 minutes dans le mélange de 0,5% de vert de méthyle (p/v) et de 0,05% de pyronine (p/v), puis rincées à l'eau froide. Après déshydratation, les échantillons sont conservés entre lame et lamelle à l'aide d'Eukit. Un contrôle est effectué sur quelques coupes par l'action de ribonucléase diluée à 10<sup>-5</sup>% dans du tampon SSC 20X (3 M de NaCl et 0,3M de citrate de sodium) pendant 1 heure à 37C°, puis rincées dans du SSC 20X pendant 15 minutes avant coloration (Morel, 1992). Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle à l'aide d'une goutte d'Eukit. Ce test permet de révéler L'ADN en bleu/vert, et l'ARN en rose.

#### ***II.2.3.2.2 - Mise en évidence des polysaccharides et des protéines (Lillie & Fullmer, 1976)***

Les coupes du premier lot d'échantillons fixés dans le CRAF subissent d'abord une oxydation des polysaccharides par 0,5% d'acide périodique (p/v) pendant 15 minutes, puis un rinçage dans l'eau distillée et sont, enfin, colorées pendant 30 minutes dans le réactif de Schiff (0,5% Fuschine basique (p/v), 15% HCl (1N) (v/v), 1,3% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (p/v)). Après rinçage dans 0,5% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (p/v) pendant 6 minutes, puis dans l'eau distillée pendant 30 minutes, les coupes sont montées entre lame et lamelle à l'aide d'Eukit. Les polysaccharides dont l'amidon, sont colorés en rose par cette technique.

Une partie des échantillons est également colorée par 0,1% Amido Black (p/v) dilué dans 7% d'acide acétique (v/v) pendant 30 secondes avant montage entre lame et lamelle, afin de mettre en évidence les réserves protéiques, notamment les grains d'aleurone par une coloration bleue.

#### ***II.2.3.2.3 - Mise en évidence des triglycérides (Lillie & Fullmer, 1976)***

Les coupes à congélation sont colorées pendant 10 minutes dans une solution constituée de 40% d'eau distillée et de 60% de solution saturée d'Oil red O dans l'isopropanol 99%. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle à l'aide de 50% glycérol (v/v). Les triglycérides sont alors colorés en rouge.

#### ***II.2.3.2.4 - Mise en évidence des tanins***

La présence de chrome contenue dans le fixateur CRAF colore les tanins (Locquin & Langeron, 1978; Bussoti *et al.*, 1998). De plus, les tanins ont la propriété de chélater les ions métalliques (Asfari, Burgard & Vicens, 1993), ce qui permet de révéler les tanins en jaune à brun. De plus, nous avons remarqué une forte affinité de ces composés pour la pyronine, nous permettant de révéler les tanins en rose ou violet sur les coupes colorées par le test de Brachet.

#### **II.2.3.3 - Analyse d'image**

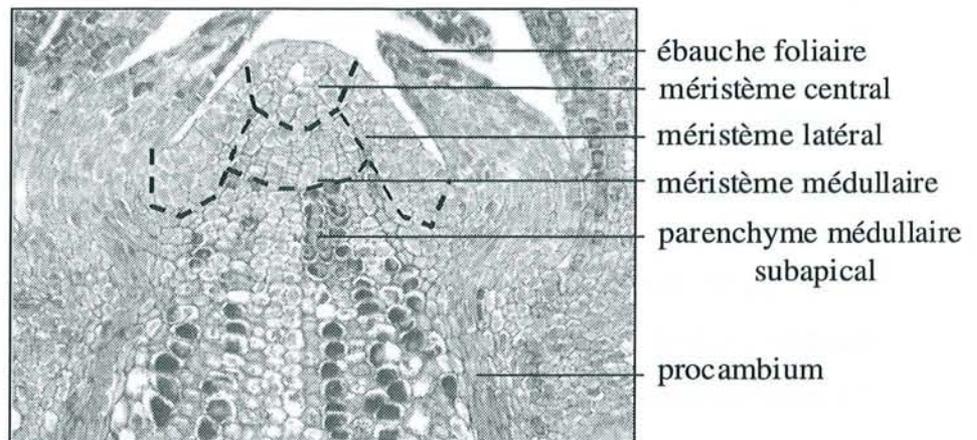


figure 5a: zonation du méristème (coupe longitudinale radiale)

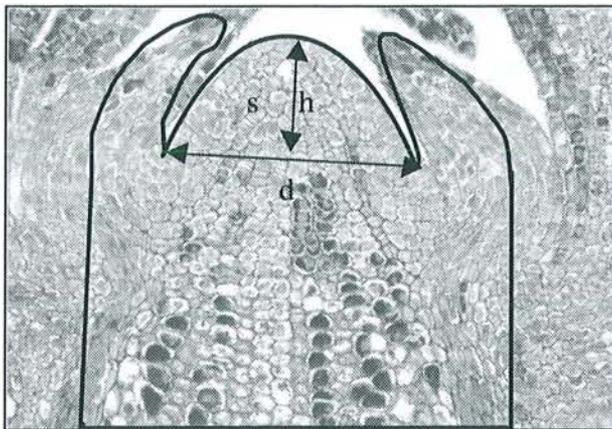


figure 5b: zones observées pour l'étude de la morphométrie et de la distribution de l'amidon (coloration PAS, h : hauteur du SAM, d:diamètre, s: surface)

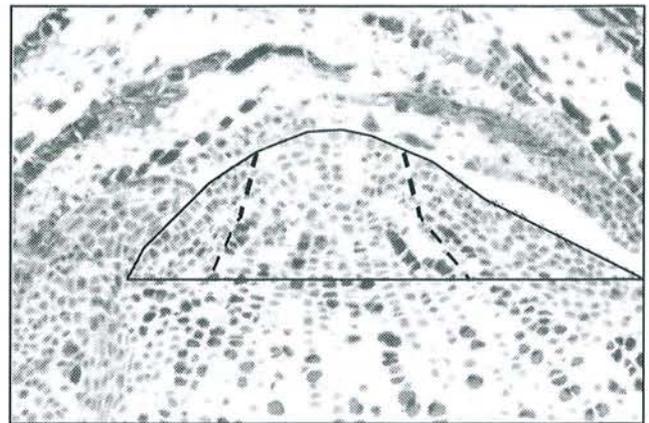


figure 5c : délimitation des zones observées pour estimer la surface de coloration de l'ARN par le test de Brachet

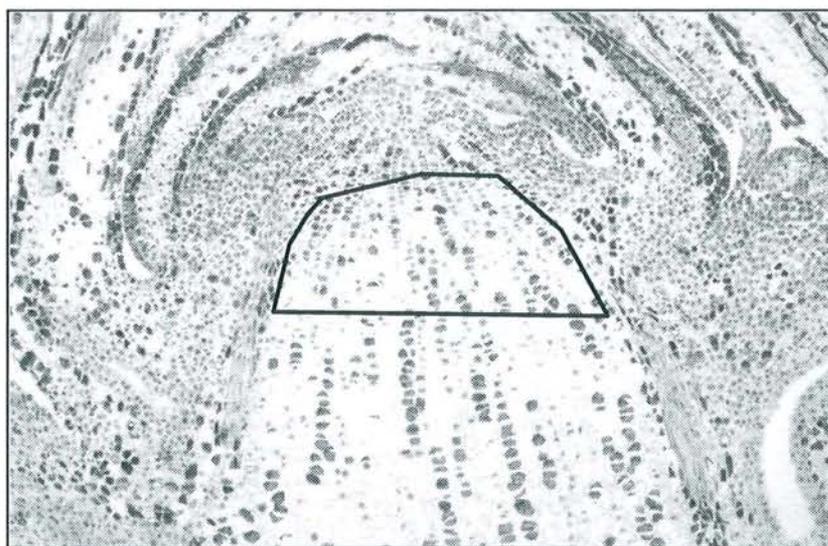


figure 5d: zones observées pour l'étude des tanins

Les coupes sont observées sur Optiphot 2 (Nikon). L'image des apex est capturée à l'aide d'une caméra CCD ou d'un appareil photo numérique Nikon D1, puis elle est traitée à l'aide de Visilog 2. La figure 5a rappelle les différents territoires de l'apex caulinaire.

**Les paramètres morphométriques** tels que la surface, la hauteur et le diamètre mesuré à la base du dôme méristématique sont présentés figure 5b.

**Pour l'étude des apex colorés par le test de Brachet**, les zones illustrant la présence de l'ARN sont plus sombres par rapport aux autres zones. La surface de ces zones est évaluée dans le dôme méristématique et rapportée à la surface totale du méristème. Les précipités tanniques encore plus fortement colorés et localisés dans le méristème médullaire, ne sont pas inclus dans cette mesure. (figure 5c)

**Pour l'étude de la répartition des réserves amylicées**, les zones d'accumulation et la densité des grains dans les zones délimitées dans la figure 5b sont notées à partir d'observations réalisées au microscope, puis des mesures sont effectuées à l'aide de la station d'analyse d'image afin de fournir des données semi-quantitatives de nos observations :

- la grosseur des grains d'amidon est estimée en mesurant la surface de 30 grains du parenchyme médullaire sub-apical. Cette mesure est répétée sur 3 échantillons.
- la distance séparant le sommet du dôme apical des premiers grains d'amidon est également mesurée.

**Pour l'étude des triglycérides**, leur répartition est notée pour l'ensemble de l'apex à partir d'observation au microscope photonique.

**Enfin, la forme des tanins et leur répartition** sont également décrits. La mesure de la surface de tanins dans une section du parenchyme médullaire sub-apical et du méristème médullaire rapportée à la surface à la surface sélectionnée fournit une estimation de la quantité de tanin dans cette zone (figure 5d).

Il est indispensable de préciser qu'il ne s'agit pas d'une étude strictement quantitative puisque aucun dosage n'a été effectué mais la description des différents paramètres cités ci-dessus, permet de faire une estimation de la quantité de tanins et de l'accumulation d'amidon qui a pour finalité la comparaison des différents matériels.

#### **II.2.3.4 - Analyse statistique**

Le but est d'établir un test statistique permettant de mettre en évidence une différence significative entre 2 populations représentées chacune par un groupe d'échantillon.

Nous proposons pour ce test, comme hypothèse nulle  $h_0$  que les deux groupes d'échantillons appartiennent à la même population. Mais étant donné les effectifs réduits dans les 2 groupes, nous n'utilisons pas une distribution normale pour tester cette hypothèse. La comparaison de l'aléa  $t_{\text{calculé}}$  de Student au  $t_{\text{théorique}}$  défini par les tables permet alors de rejeter ou d'accepter l'hypothèse  $h_0$  au seuil d'erreur fixé à 10%.

Ainsi, ce test permet, notamment, de savoir avec un seuil d'erreur de 10%, si oui ou non les apex récoltés à la même période de l'année sur des plants d'âges différents sont statistiquement identiques.

#### **II.2.4 - Expériences annexes : Etude de la catalase**

Afin d'approfondir les connaissances sur l'utilisation des réserves lipidiques pendant la germination et la croissance post-germinative, la distribution et la mesure de l'activité catalasique sont suivis.

##### **II.2.4.1 - Extraction des protéines :**

Après broyage dans l'azote liquide, l'extraction est réalisée à l'aide de 1/10 (p/v) de solution tamponnée composée de 0.1 M de tampon phosphate de potassium (pH 7.2), 2 mM EDTA, 8 mM  $MgCl_2$ , 4 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100 et 2% (p/v) PVPP. Des concentrations de 0.1% et de 0.5% (v/v) en détergent ont été testées, mais les mesures de l'activité catalasique ne fournissent pas de résultats reproductibles.

Après centrifugation à 4°C à 14000 g pendant 10 min, le surnageant est dialysé pendant une nuit à l'aide de 1000 volumes de 0,1M de tampon phosphate de potassium (pH 7,2) contenant 2 mM d'EDTA. Les extraits dialysés sont utilisés pour la mesure de l'activité catalasique et la migration sur gel natif PAGE.

#### **II.2.4.2 - Mesure de l'activité enzymatique:**

L'activité catalasique est déterminée par la mesure de la dégradation de  $H_2O_2$  mesurée à une longueur d'onde de 240nm ( $\epsilon$ :  $0.0036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Havir et McHale, 1987). La réaction débute après l'ajout d'une solution composée d'un millilitre de 50mM de phosphate de potassium (pH 7,0) et de 12,5 mM d' $H_2O_2$ . Le contenu en protéine est déterminé par la méthode de Lowry *et al.* (1951) modifiée selon Peterson (1977), en utilisant le serum albumine bovine comme témoin. Au moins 3 mesures ont été réalisées pour chaque stade et tissus étudiés.

#### **II.2.4.3 - Electrophorèse**

Les iso-enzymes de la catalase (CAT) sont identifiées sur un gel natif PAGE contenant 6% d'acrylamide. Une quantité définie de protéines (5 à 10  $\mu\text{g}$ ) sont déposées sur le gel et l'électrophorèse est réalisée à l'aide de 0.03 M de tampon Tris-glycine (pH8,8) à 4°C en utilisant le système Mini-Protean Bio-Rad. La coloration des zones contenant de l' $H_2O_2$  permet d'évaluer l'activité catalasique (Chandlee & Scandalios, 1983). Ainsi, la coloration est obtenue après un prétraitement des gels dans une solution de 0,01 % (v/v) d' $H_2O_2$  pendant 10 min, et révélation dans le colorant composé de 1% (p/v)  $FeCl_3$  et 1% (w/v)  $K_3Fe(CN)_6$  dans l'eau distillée.

#### **II.2.4.4 - Coloration de l'activité catalasique sur coupes fraîches**

Des coupes longitudinales axiales de 60 $\mu\text{m}$  d'épaisseur réalisées au microtome à congélation sont effectuées sur du matériel frais et déposées dans une solution de 0,01% (v/v) d' $H_2O_2$  pendant 20 secondes. Les coupes sont alors, colorées dans une solution de 1% (p/v)  $FeCl_3$  et de 1% (p/v)  $K_3Fe(CN)_6$  pendant 15 s. Après rinçage à l'eau distillée, l'activité catalasique est mise en évidence par l'absence de coloration (test négatif) tandis que les zones contenant encore de l' $H_2O_2$  sont colorées en bleu (Acevedo & Scandalios, 1991).

## **CHAPITRE III**

**De l'embryon mature au semis**

## III.1 – INTRODUCTION

### III.1.1 - Graine et jeunes semis

#### III.1.1.1- Morphologie de la graine et des jeunes semis de pin.

La graine de pin est constituée d'un tissu de réserve haploïde (l'endosperme = megagametophyte) entourant l'embryon et protégé par des téguments protecteurs. L'embryon est formé par la racicule, l'hypocotyle, plusieurs cotylédons et les apex racinaire et caulinaire. L'apex caulinaire comprend uniquement un dôme méristématique, aucune ébauche foliaire n'étant observée (Camefort, 1956 ; Fosket & Miksche, 1966 ; Riding, 1972 ; Cecich & Horner, 1977). Chez d'autres espèces, telle que le cèdre du Liban, des primordia foliaires sont déjà présents dans l'embryon mature (Buchholz & Old, 1933). Chez *P. radiata* et *P. banksiana*, les premières ébauches foliaires apparaissent pendant l'élongation de la racicule soit quelques jours après l'imbibition (Riding, 1972 ; Cecich & Horner, 1977). De nouvelles pièces foliaires sont encore initiées lorsque l'hypocotyle et les cotylédons s'allongent (Riding, 1972) puis, pendant l'allongement de l'épicotyle (Kremer, 1984).

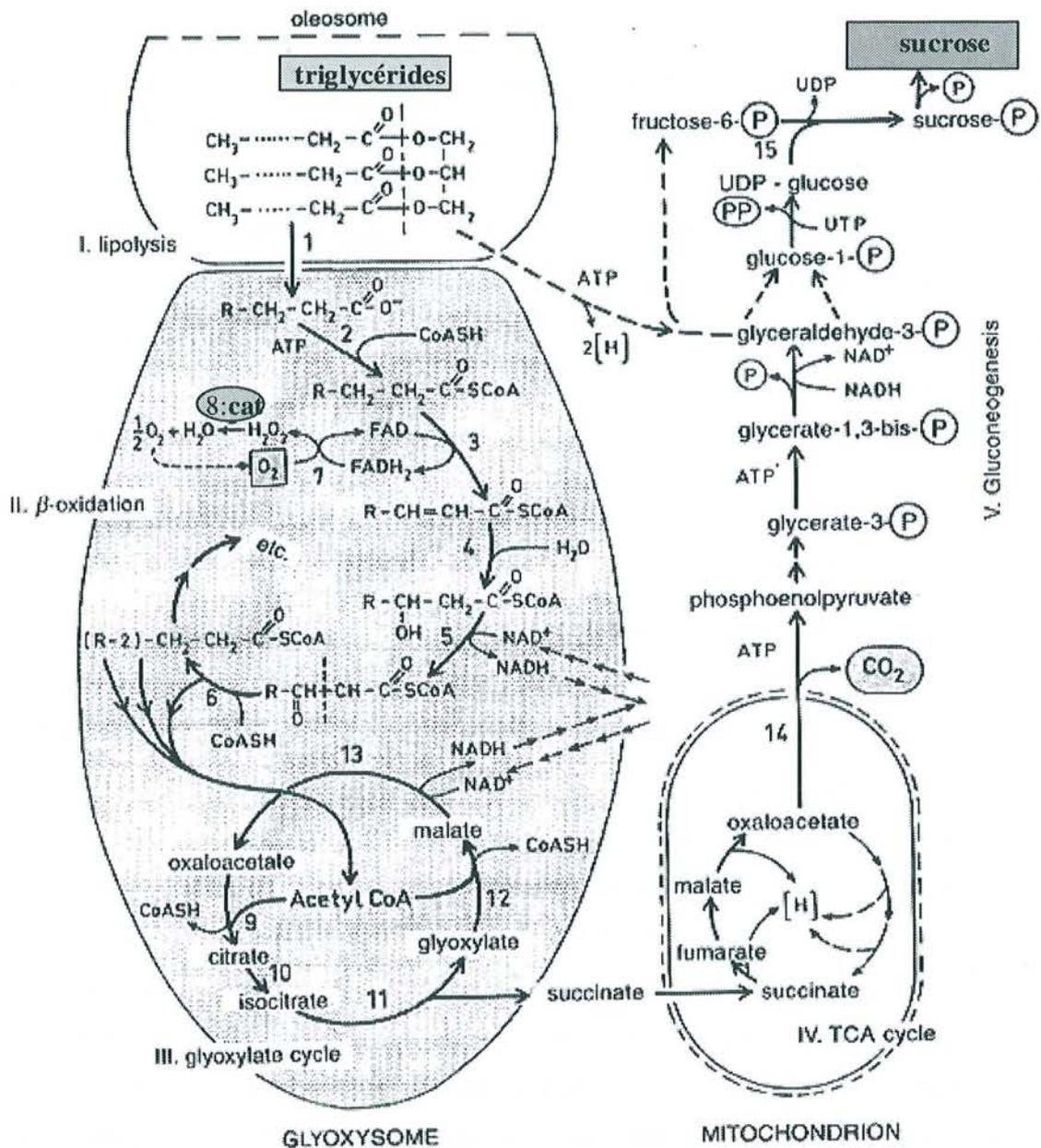
#### III.1.1.2- Les réserves de la graine et leur devenir pendant la germination et la post-germination

La graine mature des Pinacées est caractérisée par sa richesse en réserves réparties à la fois dans l'embryon et dans l'endosperme (Nyman, 1965 ; Ching, 1970 ; Simola, 1974). Ces réserves sont constituées majoritairement de lipides et de protéines. Une faible quantité d'amidon est parfois observée dans la graine (Murphy & Hammer, 1994) , par exemple chez *Pinus taeda*, dans l'endosperme (Stone & Gifford, 1999), chez *Pinus banksiana*, des amyloplastés éparses sont également observés dans les cotylédons et l'apex caulinaire (Durzan, Mia & Ramaiah, 1971 ; Mia & Durzan, 1974). Ceci n'est pas vérifié chez toutes les espèces. Aucun grain d'amidon n'est détecté dans les cotylédons de *Pinus sylvestris* (Simola, 1974) ni dans l'apex caulinaire de *Pinus radiata* (Riding et Gifford., 1973). Le contenu en amidon et sa répartition dans la graine des espèces de pin semblent donc

spécifiques de l'espèce. Du saccharose est également accumulé dans les graines matures de *Pinus taeda* à la fois dans l'embryon et dans l'endosperme mais il représente une minorité des réserves (Stone & Gifford, 1999) qui sont à 59%, constituées de triglycérides. 80% de ceux-ci sont concentrés dans l'endosperme - représentant ainsi 27% de son poids sec – tandis que les 20% restants représentent 40% du poids sec de l'embryon. De la même façon, 80% des réserves protéiques de la graine sont accumulées dans l'endosperme (Groome, Axler & Gifford, 1991) et représentent respectivement 19,6 % et 13,1% du poids sec de l'endosperme et de l'embryon (Stone & Gifford, 1997).

#### **III.1.1.2.1- Réserves protéiques**

Les réserves protéiques sont contenues dans des globules protéiques ou grains d'aleurone (protein bodies) qui résulteraient de l'accumulation de chaînes polypeptidiques dans les vacuoles pendant la formation de la graine (Stone & Gifford, 1997). Ces globules sont délimités par une membrane et constitués d'une matrice protéique associée à un globoïde formé essentiellement de phytine, composé riche en minéraux (phosphates, calcium, potassium et magnésium) qui, hydrolysé, fournit l'acide phosphorique nécessaire à la phosphorylation de nombreux métabolites (Bethke *et al.*, 1998). Les phytates sont observés dans les cotylédons de *P. banksiana* (Durzan, Mia & Ramaiah, 1971) et les cotylédons et l'endosperme de *P. sylvestris* (Simola, 1974). Dans les graines de *P. contorta* et de *P.taeda*, la matrice protéique contient des protéines solubles et insolubles. Les protéines insolubles sont formées en majorité d'une globuline de 47 kDa et d'une protéine cristalline de 60 kDa similaires à la gluteline des dicotylédones. Cette protéine de 60 kDa représente 80 % des protéines insolubles. Elle est caractérisée par une structure quaternaire, formées d'hétérodimères de 37,5 et 22,5 kDa comprenant plusieurs ponts disulphures (Lammer & Gifford, 1989 ; Groome, Axler & Gifford, 1991 ; Allona *et al.*, 1994 ; Stone & Gifford, 1997). Les protéines cristallines sont identiques dans l'endosperme et l'embryon alors que les protéines solubles sont de masses moléculaires différentes dans ces mêmes tissus (Lammer & Gifford, 1989). Pendant la germination et la post-germination, l'hydrolyse des protéines de réserve libère des acides aminés qui permettent la formation de protéines constitutives et de protéines enzymatiques impliquées dans la dégradation des réserves contenues dans l'embryon et dans l'endosperme (Groome, Axler & Gifford, 1991). Dans l'endosperme où la quantité



**figure 6: Transformation des lipides en carbohydrates dans les tissus de réserves de la graine.**

Cinq étapes sont définies :

- I. lipolyse : production de glycérol et d'acides gras dans l'oléosome
- II.  $\beta$ -oxydation des acides gras sur la face interne de la membrane du glyoxysome : implication de la catalase
- III. cycle glyoxalique et production du succinate dans la matrice du glyoxysome. Le NADH produit par la  $\beta$ -oxydation et le cycle glyoxalique est transporté vers le cytosol vers la mitochondrie
- IV. cycle de Krebs dans la mitochondrie
- V . gluconéogénèse dans le cytosol

- 1 : lipase, - 2 : acyl coA, - 3 : acyl CoA oxydase, - 4 : enoylhydratase, - 5 : hydroxyacyl dehydrogenase
- 6 : ketoacylthiolase, - 7 : acyl CoA oxydase, - 8 : catalase, - 9 : citrate synthase,
- 10 : aconitate hydratase, - 11 : isocitrate lyase, - 12 : malate synthase, -13 : malate deshydrogénase
- 14 : phosphoenolpyruvate carboxykinase, - 15 : sucrose phosphate synthase

(D'après Mohr et Schopfer (1995))

d'acides aminés n'augmente pas, l'hydrolyse des protéines cristallines riches en arginine est accompagnée de la formation de protéines "tampons" qui seraient, selon les auteurs, une forme transitoire de réserves protéiques (Lammer & Gifford, 1989). A l'inverse, dans les plantules en germination de *P. banksiana* et de *P. taeda*, la quantité d'acides aminés et plus particulièrement celle de l'arginine, augmente (Ramaiah, Durzan & Mia, 1971 ; Lammer & Gifford, 1989 ; King & Gifford, 1997 ; Stone & Gifford, 1997). L'arginine est ainsi, exporté depuis l'endosperme vers l'embryon immédiatement après sa production suite à l'hydrolyse des réserves (Lammer & Gifford, 1989 ; Allona *et al.*, 1994 ; King & Gifford, 1997). Puis, l'activité de l'arginase nécessaire à la métabolisation de l'arginine augmente dans la partie caulinaire de l'embryon conduisant à l'augmentation de la quantité en protéines totale dans l'embryon. Les protéines solubles sont notamment accumulées dans la partie caulinaire de l'embryon (King et Gifford, 1997; Stone & Gifford, 1997).

La présence des phytates permet de caractériser les grains d'aleurone des graines de pin à l'échelle ultrastructurale. En microscopie photonique, la forme globulaire des grains d'aleurone et leur coloration par des réactifs tels que l'amido black sont caractéristiques et permettent le suivi de leur répartition au cours de la germination et de la post-germination.

#### **III.1.1.2.2- Réserves lipidiques**

Les oléosomes contiennent les réserves lipidiques. Ces organites font l'objet de recherches approfondies, notamment au niveau de leur composition (Tzen et al, 1993 ; Peng & Tzen ; 1998). Ils sont composés d'une matrice de triglycérides entourée d'une monocouche de phospholipides, eux même associés à une protéine alcaline nommée oléosine. Les oléosomes isolés de l'endosperme de *P. edulis* sont également associés à une faible quantité de lipase acide (EC 3.1.1.3), en accès direct avec son substrat (Hammer & Murphy, 1993). La composition de ces globules reste encore imprécise sur de nombreux points ; ils pourraient contenir notamment des molécules de reconnaissance des lipases (Hoppe & Theimer, 1997).

L'hydrolyse des triglycérides par la lipase acide fournit du glycérol et des acides gras qui sont pour la plupart, des acides gras polyinsaturés de 18 à 20 atomes de carbone chez les conifères. Chez les pins, les acides gras majoritaires sont l'acide linoléique et l'acide oléique (Hammer & Murphy, 1994). Dans la plante, ces acides gras sont utilisés dans la synthèse de nouvelles molécules ou dégradés dans les glyoxysomes (figure 6).



Le processus de dégradation des acides gras débute par la  $\beta$ -oxydation. Puis l'acétyl coA produit est converti en malate et en oxalate par le cycle glyoxylique. L' $H_2O_2$  généré par la  $\beta$ -oxydation est toxique pour la cellule. La catalase (EC 1.11.1.6) intervient alors pour l'éliminer (figure 6) (Morh & Schopfer, 1995). Les mécanismes du cycle glyoxylique ne sont pas encore totalement élucidés. Escher et Widmer (1997) ont proposé récemment un modèle de fonctionnement où le cycle glyoxylique ne constituerait plus un turn-over (figure 7). Quoi qu'il en soit, les composés issus de ces réactions sont dirigés vers la synthèse de saccharose. Classiquement, il est admis que le succinate est dirigé vers la mitochondrie, qu'il entre dans le cycle de Krebs, et que le phosphoenolpyruvate produit participe à la gluconéogenèse dans le cytoplasme. Escher et Widmer (1997) propose que le malate et le succinate produits dans le glyoxysome puissent être dirigés respectivement vers la synthèse de saccharose dans le cytoplasme et vers la formation d'acide oxaloacétique dans la mitochondrie permettant le fonctionnement de la chaîne respiratoire (figure 7).

Le glycérol produit par l'hydrolyse des triglycérides est également dégradé pour former du saccharose ou être utilisé dans la glycolyse après oxydation en aldéhydes.

La diminution de la quantité des lipides totaux et des triglycérides dans la graine en germination a été quantifiée sur plusieurs espèces de pin telles que *P. ponderosa*, *P. taeda*... (Ching, 1970 ; Kao, 1973 ; Groome, Axler & Gifford, 1991 ; Hammer & Murphy, 1994 ; Stone & Gifford, 1999). L'étude ultrastructurale de plantule de *P. banksiana* et *P. sylvestris* en croissance a bien illustré ce phénomène tout en montrant l'hydrolyse des réserves, l'implication des glyoxysomes et la formation de vacuoles après fusion des oléosomes et épuisement des réserves (Simola, 1974 ; Cecich, 1979 ; Huang, 1992). En revanche, peu d'études histocytologiques ont été entreprises pour suivre l'évolution du contenu en réserves lipidiques. De plus, les quelques études réalisées en microscopie photonique sur les plantules de pins sont restreintes à la partie apicale caulinaire (Riding & Gifford, 1973 ; Cecich, 1979). C'est pourquoi, nous nous proposons, au moins au début de la croissance post-germinative, d'étudier la plantule dans sa totalité. En outre, la spécificité du Noir soudan utilisé dans ces travaux est actuellement controversée car celui-ci colore également des composés ionisés (Llewellyn, 1998). L'oil red O utilisé dans notre étude ne présente pas cet inconvénient (Lison, 1960 ; Llewellyn, 1998) et semble plus approprié pour suivre la répartition des triglycérides au cours de la germination et de la post-germination et la comparer aux observations réalisées sur d'autres espèces de pin.

### **III.1.1.2.3- Néosynthèse d'amidon**

Parallèlement à la mobilisation des réserves lipidiques et protéiques, de nombreuses études ont montré l'existence d'une néosynthèse d'amidon chez diverses espèces de pin et chez d'autres espèces : *P. banksiana* (Durzan, Mia & Ramaiah, 1971), *P. edulis* (Murphy & Hammer, 1994), *P. radiata* (Riding & Gifford, 1973), *P. sylvestris* (Simola, 1974), *P. taeda* (Stone & Gifford, 1999), et d'autres conifères également riches en protéines et lipides de réserves tel que *Abies alba* (Kovac & Kregar, 1989). Les grains d'amidon sont accumulés en forte quantité dès l'émergence de la radicule dans différents tissus de l'embryon : dans les cotylédons et l'apex caulinaire chez *P. banksiana* (Durzan, Mia & Ramaiah, 1971, Mia & Durzan, 1974), dans la radicule, le parenchyme cortical bordant les cordons procambiaux et le mésophylle des cotylédons chez *P. taeda* (Stone & Gifford, 1999), dans le parenchyme médullaire chez *P. edulis* (Murphy & Hammer, 1994), et uniquement dans la radicule chez *P. sylvestris* (Simola, 1974). La distribution de l'amidon semble donc, dépendre de l'espèce. En outre, la cinétique d'accumulation de l'amidon a été essentiellement étudiée par des dosages biochimiques, et illustrée par des études cytologiques effectuées pour la plupart, à un seul stade de croissance de la plantule. Il est donc, intéressant de connaître la répartition de l'amidon au cours du développement de la plantule de *P. pinaster* afin de mieux connaître l'évolution de l'allocation des réserves.

### **III.1.1.2.4 - Les tanins**

Des polyphénols sont détectés au cours de différentes étapes de la vie de la plante. Ainsi, Scalbert, Monties et Favre (1988) décrivent la présence de polyphénols dans différentes parties de plants de chêne adultes et dans des cals issus de la même espèce. La nature de ces composés varie cependant en fonction du matériel étudié. Hutzler *et al.* (1998) ont de plus, montré que les composés phénoliques sont distribués dans des zones spécifiques et que leur nature varie en fonction des stades de développement de l'organe considéré, et des conditions environnementales.

Les tanins sont des polyphénols de masse moléculaire importante ayant la capacité de se complexer avec des hydrates de carbone et des protéines (Porte, 1989). Ces molécules ont la particularité de chélater les ions métalliques (Asfari, Burgard, Vicens, 1993). Le traitement d'un échantillon végétal dans une solution contenant du sulfate de fer ou du

dichromate de potassium permet de colorer les tanins qu'il contient (Johansen, 1940, Jensen, 1962 ; Locquin & Langeron, 1978; Bussoti *et al.*, 1998).

Deux types de tanins sont identifiables en fonction de leur sensibilité à l'hydrolyse chimique ou enzymatique : d'une part les tanins condensés, non hydrolysables composés de catéchines et de leucoanthocyanidines, d'autre part, les tanins non condensés formés de gallotanins .

La présence de tanins condensés a été observée dans la partie basale d'embryons somatiques d'épicéa (Svobodová *et al.*, 1999) et de mélèze (Guttman *et al.*, 1996). De plus, ces auteurs ont montré que l'accumulation de tanins était plus importante dans des embryons privés de facteurs de développement pendant le traitement de maturation tel que l'acide abscissique. A notre connaissance, la présence de tanins dans les embryons zygotiques n'a jamais été rapportée. En revanche, l'accumulation de tanins est observée dans les bourgeons de pin sylvestre où elle est considérée comme une forme de réserve (Hejnowicz, 1979). L'accumulation de tanins est également une réaction fréquente de l'organisme végétal face à un stress (Bussoti *et al.*, 1998)

### **III.1.2- Embryons somatiques**

Des embryons somatiques peuvent être produits à partir de plusieurs types d'explants : embryons zygotiques, cellules somatiques et cellules gamétophytiques (macrospores ou microspores).

La culture des explants au contact d'un milieu d'initiation conduit à la multiplication des cellules et à la formation de tissus embryogènes lesquels sont multipliés sur un milieu de prolifération. Puis, ces amas cellulaires s'organisent au contact avec le milieu de maturation. A titre d'exemple, chez le mélèze, les étapes de la maturation sont les suivantes:

- formation d'un embryon globulaire jouxtant le suspenseur,
- puis, initiation des cotylédons
- et enfin allongement des cotylédons et formation du dôme apical (Guttman *et al.*, 1996)

Les embryons somatiques matures aptes à germer présentent généralement un taux d'hydratation relativement réduit qui leur confèrent la possibilité d'être cryopréservé. La réussite du processus de maturation dépend de plusieurs facteurs :

- le génotype dont sont issues les graines immatures à l'origine des embryons somatiques (Bercetche & Pâques, 1995 ; Ramarosandratana *et al.*, 1999)
- la période de prélèvement et l'état de l'explant, notamment le contenu en réserves (Lelu *et al.*, 1999 ; Choi *et al.*, 1997 ; Reidiboym-Talleux & Grenier De March, 1999)
- l'atmosphère gazeuse (Bercetche & Pâques, 1995) et la composition du milieu de culture en composé gélifiant, en hydrates de carbone, en azote organique, en régulateurs de croissance et en osmoticum (Lai & McKersie, 1993 ; Bercetche & Pâques, 1995 ; Svobodová *et al.*, 1999 ; Lelu *et al.*, 1999).

Les embryons somatiques de *P. pinaster* peuvent être obtenus à partir de cultures embryogènes issues de cellules de l'endosperme ou des cellules situées à l'interface du suspenseur et de l'embryon zygotique immature (Bercetche & Pâques, 1995).

La comparaison du développement des embryons zygotiques et somatiques a été de nombreuses fois abordées, notamment afin de comprendre le processus d'embryogenèse somatique (Taylor *et al.*, 1990). La culture d'embryons zygotiques dissociés de l'endosperme et cultivés dans les conditions de germination identiques à celles des embryons somatiques, a été également utilisée afin de comprendre les interactions existantes entre l'embryon et l'endosperme (Durzan, Mia & Ramaiah, 1971 ; Durzan & Ramaiah, 1971 ; King & Gifford, 1997 ; Stone & Gifford, 1999).

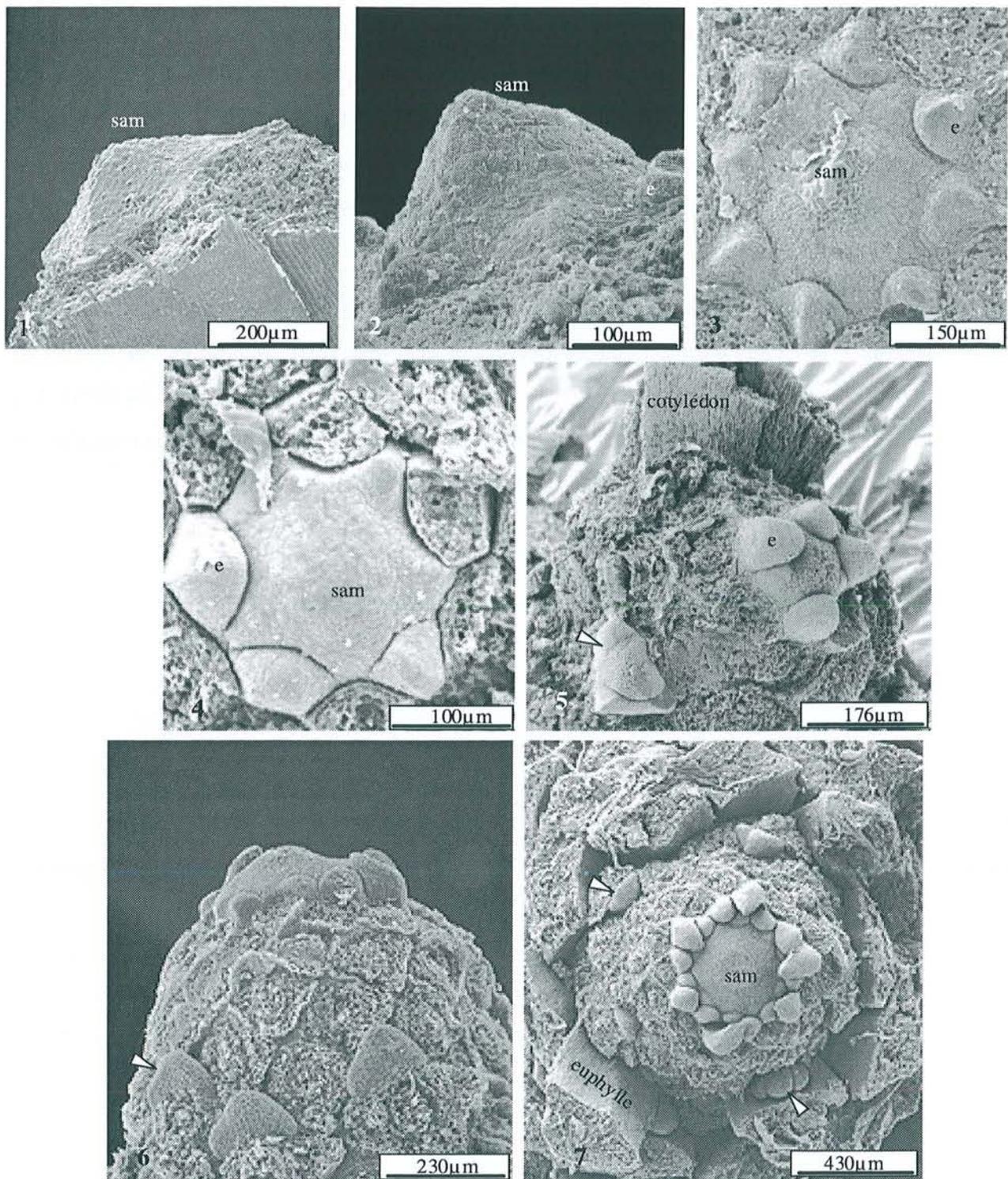
### **III.1. 3 - Objectifs de l'étude**

Ce chapitre s'articule en deux parties.

Dans un premier temps, nous avons considéré les embryons zygotiques pendant l'imbibition puis pendant la croissance post-germinative. Le suivi de la répartition des grains d'aleurone, des triglycérides, des tanins et des grains d'amidon d'abord dans l'embryon puis progressivement au niveau de la partie apicale caulinaire du semis a été réalisé en parallèle avec l'étude de la morphométrie du SAM et de l'apparition de nouveaux organes à l'apex de la plante. Ces observations ont permis d'étudier les liens entre la morphologie et la physiologie de la plantule de pin maritimes. D'autre part, nous

avons étudié en collaboration avec F. Bagnoli, S. Danti et M. Racchi (Université de Florence), la catalase dont les variations d'activité sont couplées à la dégradation des lipides. Cette étude a eu pour objet, le suivi de l'activité, l'identification d'iso-enzymes et la localisation *in situ* de l'activité catalasique en adaptant une technique élaborée par Acevedo et Scandalios (1991) adaptée par nos soins à des coupes réalisées au cryomicrotome.

Nous envisagerons dans un deuxième temps, la comparaison des premiers stades de croissance des embryons zygotiques excisés et des embryons somatiques au travers du suivi de la répartition des réserves et de la caractérisation morphométrique du SAM. Les résultats obtenus de cette façon, seront discutés en fonction des observations effectuées sur les embryons zygotiques cultivés en présence de l'endosperme.



**Figure 8: Morphologie des apex caulinaires depuis la graine jusqu'au semis observé au MEB : mise en évidence de l'activité organogène (sam : méristème apical caulinaire ; e : ébauche)**

**8.1:** profil du SAM d'embryon déshydraté -**8.2:** profil du SAM pendant l'elongation de la racicule -  
**8.3 :** vue aérienne de ce même apex. Un pseudo-verticille d'ébauches foliaires formé - **8.4:** vue aérienne de l'apex pendant l'elongation de l'hypocotyle. Production de nombreuses euphylls - **8.5:** Profil de l'apex de plantule à la fin de l'elongation de l'hypocotyle. SAM de petite taille. Peu d'ébauches adjacentes. Un bourgeon latéral en formation (flèche) -**8.6 et 8.7:** Apex caulinaire de profil (8.6) et vue aérienne (8.7) pendant l'elongation de l'hypocotyle. SAM large. Nombreuses ébauches foliaires en périphérie. Nombreux bourgeons latéraux à différents stades de formation (flèche)

## III.2 – RESULTATS

### III.2.1- Embryons zygotiques contenus dans l'endosperme

#### III.2.1.1 - Morphologie et morphométrie

##### *III.2.1.1.1 – Développement de la plantule et du semis (figure 8)*

L'évolution de l'apex au cours de la croissance post-germinative est présentée dans la.

Les embryons présentent un méristème apical caulinaire (SAM) dépourvu d'ébauches foliaires. La formation des ébauches foliaires débute lorsque la radicule émerge. L'hypocotyle s'allonge ensuite, d'abord en forme de crosse, il se redresse ensuite et les cotylédons se déploient. Deux à trois pseudoverticilles d'ébauches foliaires sont alors visibles autour du SAM. Ces ébauches s'allongent lorsque l'hypocotyle a terminé son élongation (soit environ 20 jours après le début de l'imbibition) et forment des euphylls chlorophylliennes de 3 cm environ. La formation des premiers bourgeons latéraux a lieu à l'aisselle des euphylls en élongation. L'épicotyle s'allonge ensuite. A l'aisselle des premières euphylls formées, les auxiblastes se développent. Les euphylls situées au-dessus présentent une aisselle vide alors que, plus haut, certaines d'entre elles axillent des brachyblastes en développement.

En outre, au lieu de suivre une croissance définie, les brachyblastes proches de la base de l'épicotyle présentent souvent une croissance prolongée aboutissant à la mise en place de plusieurs euphylls après l'élongation des deux pseudophylls.

##### *III.2.1.1.2 - La taille du méristème (figure 9)*

Dans la graine sèche, les embryons présentent un apex caulinaire en forme de dôme de 340µm (+/- 38) de diamètre et de 97,5 µm de haut (+/- 29). Après une légère augmentation pendant l'imbibition, les dimensions du dôme méristématique diminuent pendant l'élongation de l'hypocotyle, et cette diminution est synchrone avec la formation des premières euphylls. Il semble donc que **ces euphylls soient préformées dans le méristème de l'embryon avant la germination**. Leur entrée en croissance aboutirait

alors, à la réduction de la taille du dôme méristématique et les divisions cellulaires intervenant pendant cette période ne suffiraient pas pour l'entretien d'une taille stable du méristème. Elles seraient destinées uniquement à l'organogenèse et à la différenciation de 2 à 3 spires d'euphylls jusqu'à une période avancée de la post-germination.

Le phénomène s'inverse après l'élongation des tissus préformés dans la graine et à partir du stade 8 correspondant à l'élongation de l'épicotyle. En effet, la taille du dôme méristématique augmente pour atteindre 410 $\mu\text{m}$  de diamètre (+/- 45). Cette augmentation indique une modification du fonctionnement du méristème pendant cette période.

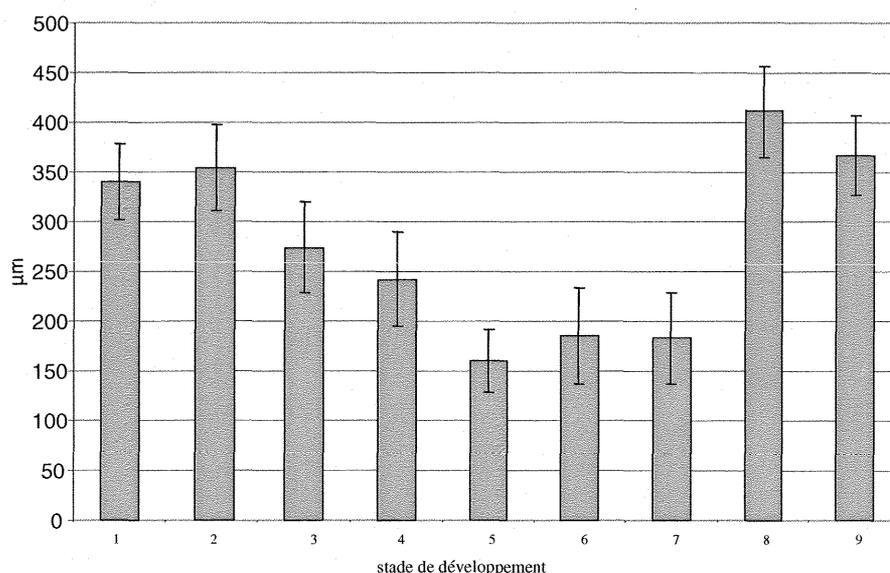


figure 9: Diamètre du SAM pendant la germination et la post-germination

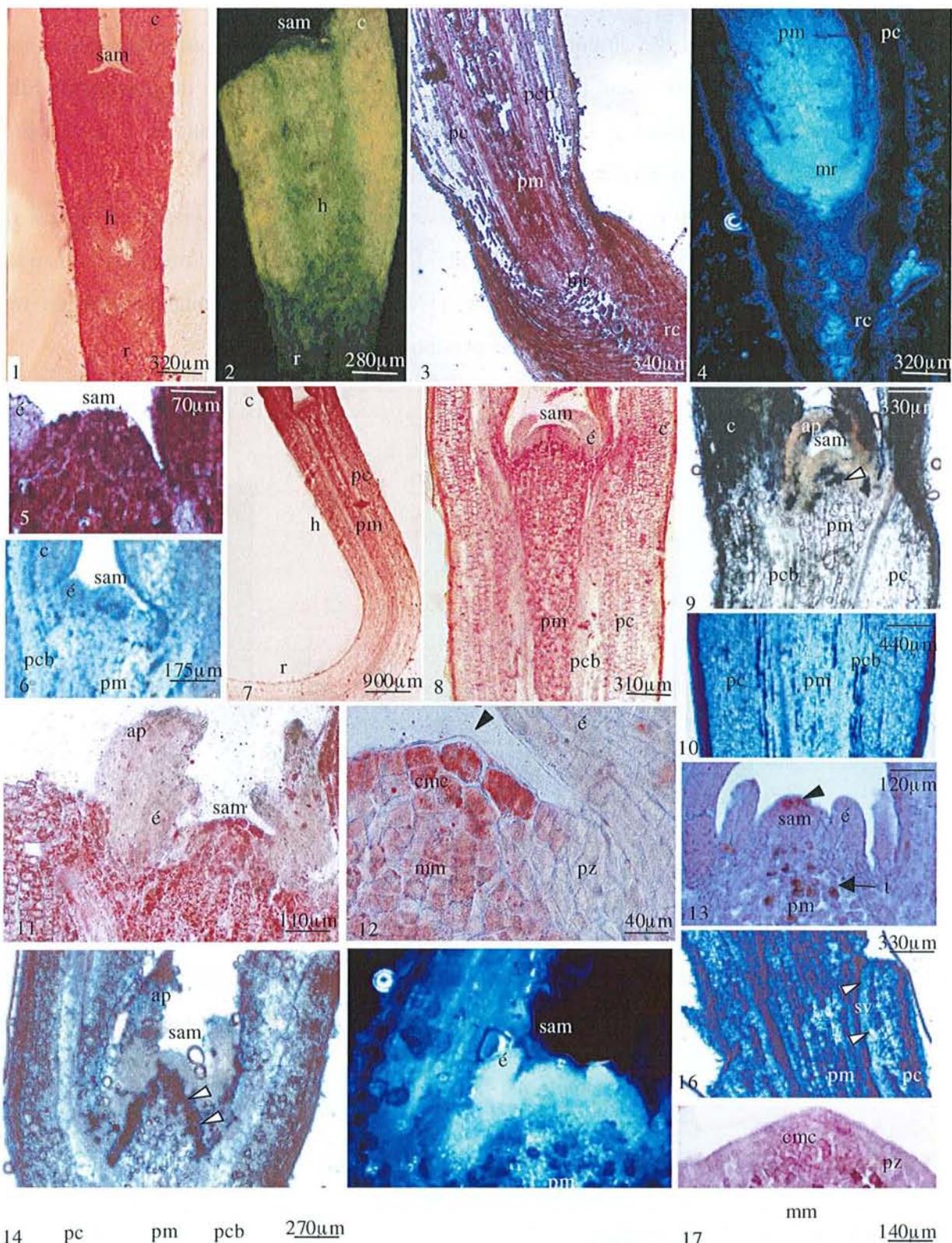
Il est intéressant de noter que la période pour laquelle la taille du méristème est minimale correspond à l'initiation des bourgeons qui donneront des auxiblastes (fin de l'élongation de l'hypocotyle).

### III.2.1.2- Evolution du contenu en réserve et autre composé

#### III.2.1.2.1 - Les réserves protéiques

L'évolution des réserves protéiques est présentée figure 11 (p.29).

Les grains d'aleurone présents dans l'ensemble de l'embryon déshydraté (11-1) ont des tailles différentes selon le tissu dans lequel ils sont observés : petits dans le méristème apical caulinaire (SAM), le méristème racinaire et les cordons procambiaux ( $4,2 \mu\text{m}^2$  (+/-



**figure 10 : Evolution parallèle de la distribution des triglycérides et de la catalase.**

Triglycérides: 10-1, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 17 - Catalase: 10-2, 4, 6, 9, 10, 14, 15, 16

**10-1, 2 : embryon déshydraté**, 1- triglycérides dans l'ensemble de l'embryon, 2- catalase dans le cortex, la moelle et les cotylédons. **10-3 à 10-6 : stade émergence de la racine**, 3- lipides hydrolysés dans la racine sauf dans le méristème racinaire, 4- catalase présente sur les sites de stockage des lipides, 5- lipides dans le sam, absent dans les ébauches, 6- catalase détectée dans l'ensemble de l'apex caulinaire et plus particulièrement dans le procambium, **10-7 à 10-12 : stade élancement de l'hypocotyle**, 7- vue d'ensemble de la plantule montrant l'hydrolyse des lipides dans la racine, 8: triglycérides dans l'apex caulinaire, sauf dans les aiguilles; davantage de triglycérides dans la moelle par rapport au cortex, 9- catalase dans la partie apicale de l'hypocotyle, dans l'ensemble du sam, et non détectées dans les cellules de la moelle adjacentes au sam (flèche). (Cf. suite de la légende p.27)

2,2)), ils sont plus gros dans les cotylédons et les parenchymes médullaire et cortical ( $32,7 \mu\text{m}^2 (+/-16,8)$ )(figure 11-3).

Les grains d'aleurone disparaissent du SAM pendant l'imbibition (figures 11-4 et 11-5) puis, dans la radicule pendant son émergence (stade 3), et enfin dans l'hypocotyle et dans les cotylédons pendant l'élongation de l'hypocotyle (stade 4). Les derniers grains d'aleurone sont détectés dans les cotylédons alors que ceux-ci sont encore en élongation.

### *III.2.1.2.2 - Les réserves lipidiques*

Les embryons secs ou imbibés, contiennent des triglycérides dans l'ensemble des tissus et particulièrement au niveau de l'apex caulinaire, (figure 10-1).

Les réserves lipidiques disparaissent ensuite progressivement :

- Lorsque la radicule émerge (stade 3), les lipides sont présents dans l'ensemble de la plantule à l'exception des ébauches foliaires en formation (figure 10-5) et de la radicule en élongation (figure 10-3) alors que le méristème racinaire en contient encore d'importantes quantités.

- Au stade 4, les triglycérides disparaissent de l'hypocotyle en élongation de façon acropète (figure 10-7), plus rapidement dans le parenchyme cortical que dans le parenchyme médullaire (figure 10-8). On observe en effet, que la limite de coloration à l'œil red O est plus haute dans le parenchyme cortical que dans parenchyme médullaire.

---

<sup>1</sup> (**figure 10 suite**) 10: détail de l'hypocotyle, détection de la catalase plus importante dans le parenchyme médullaire, 11- triglycérides présents dans la moelle et dans le SAM sauf dans l'anneau initial et dans les ébauches; 12: détail du SAM, triglycérides fortement colorés dans les cellules périphériques du SAM au niveau du méristème central, anneau initial dépourvu de ces réserves. **11-13 à 14 fin d'élongation de l'hypocotyle**, 13- triglycérides présents uniquement dans les cellules périphériques du SAM, 14- catalase détectée uniquement dans le procambium, le SAM et les ébauches foliaires; faible activité détectée dans la moelle séparée du SAM par des cellules où la détection de l'activité catalasique est nulle (flèches). **11-15 à 17: stade élongation de l'épicotyle**, 15- catalase uniquement dans le SAM et les ébauches foliaires, 16- catalase détectée uniquement dans le système vasculaire (flèches), 17: triglycérides dans le SAM, seul l'anneau initial en est dépourvu.

A l'apex, les flancs du méristème caulinaire, les primordia foliaires, ainsi que les aiguilles primaires nouvellement formées sont dépourvus de réserves. Les cellules superficielles du méristème central sont plus intensément colorées que les cellules adjacentes (figures 10-11 et 10-12). Les lipides sont répartis de façon homogène dans le méristème médullaire et dans le méristème central et confinés contre la membrane plasmique des cellules du parenchyme médullaire sub-apical.

- Lorsque l'élongation de l'hypocotyle est terminée (stade 5), la formation de nouvelles ébauches foliaires continue. La coloration caractéristique des triglycérides subsiste dans 2 à 3 cellules situées à la surface du méristème central dans la majorité des échantillons (figure 10-13).

- Au stade suivant caractérisé par l'étalement des euphylls formées antérieurement, la formation d'une rosette d'euphylls et l'initiation des premiers bourgeons latéraux (stade 7), l'apex ne contient plus de triglycérides.

- Cependant, au stade 8, lorsque les auxiblastes s'allongent et que les bourgeons axillaires supérieurs se différencient en brachyblastes, des lipides apparaissent à nouveau à l'apex des plants. Seuls les cellules centrales du méristème apical, le méristème médullaire et le parenchyme médullaire adjacent sont concernés, mais l'intensité de la coloration est relativement faible par rapport aux premiers stades étudiés (figure 10-17).

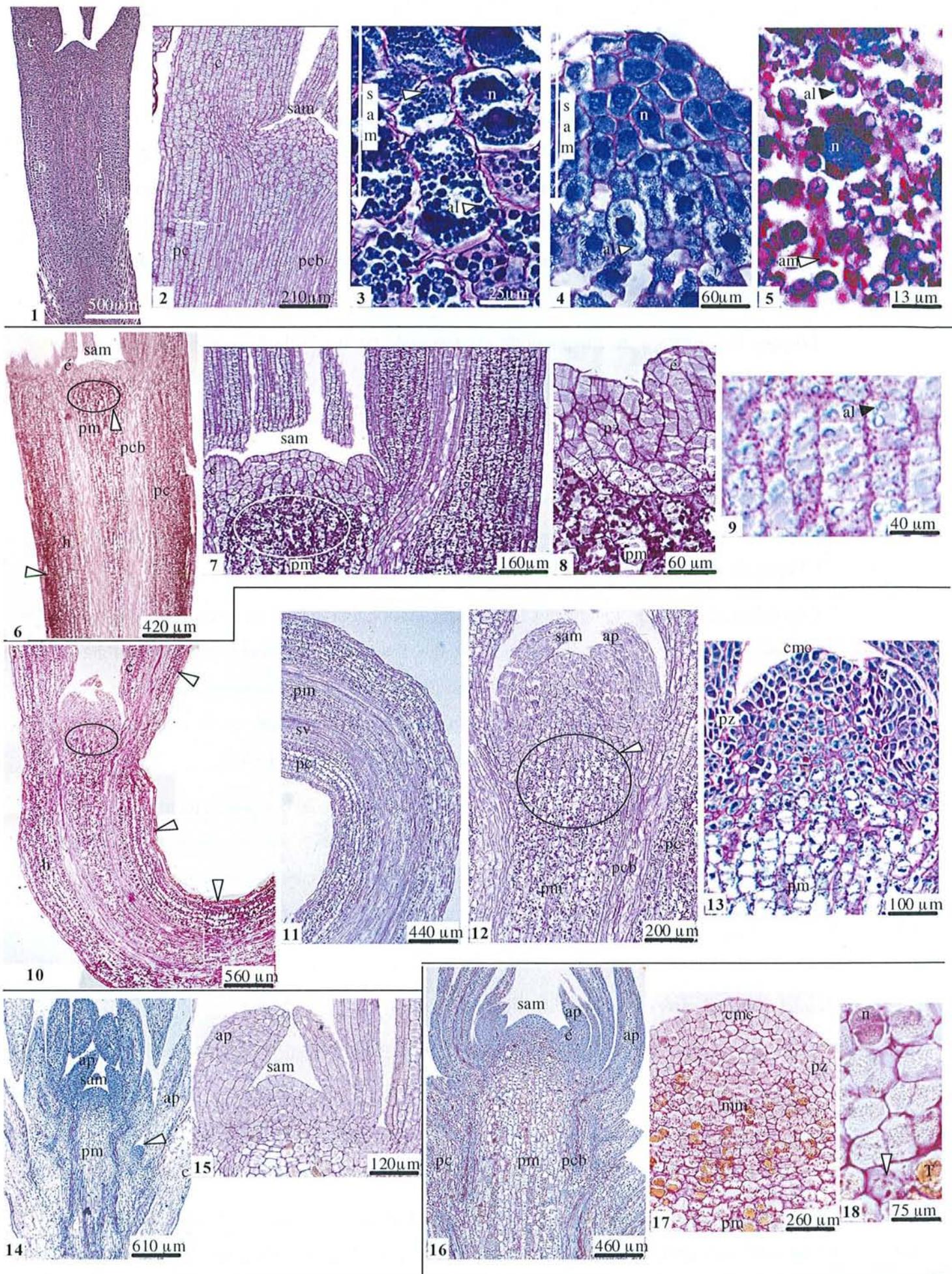
- L'apex des plants récoltés pendant le repos hivernal (stade 9) est intensément coloré. La distribution des lipides est analogue à celle observée au cours des premiers stades de la croissance post germinative. Ainsi, l'ensemble de l'apex est coloré à l'exception des flancs du méristème et des ébauches en formation.

### **III.2.1.2.3- Les réserves amyloacées** (figure 11, suite)

- L'embryon déshydraté ne présente pas de réserve polysaccharidique (figure 11-2).

- Cependant, dès l'imbibition, quelques grains d'amidon de petite taille ( $1,87 \mu\text{m}^2$  (+/- 0,66)) apparaissent dans tous les tissus de l'embryon (figure 11-5). Dans la columelle de la coiffe, les grains d'amidon sont de plus grande taille ( $3,25 \mu\text{m}^2$  (+/- 1,24)).

- Lorsque la racicule s'allonge, des grains d'amidon plus nombreux et de taille supérieure ( $6,46 \mu\text{m}^2$  (+/- 2,61)) s'accumulent dans l'embryon. L'accumulation des grains est plus importante dans des zones privilégiées :



**figure 11 : Evolution du contenu en grains d'aleurone et en amidon pendant la germination et la post-germination.**  
 (Cf. légende p.29)

- le parenchyme médullaire sub-apical caulinaire adjacent au SAM ( figure 11-7, 10-8) et le parenchyme cortical de la radicule (figure 11-6) pour un premier lot d'échantillons
- le parenchyme médullaire sub-apical caulinaire adjacent au SAM et la partie externe du parenchyme cortical de l'hypocotyle pour un second lot.

Certains tissus sont néanmoins, dépourvus de grains d'amidon à cette période: les cotylédons, les méristèmes apical caulinaire et racinaire, les cordons procambiaux ainsi que les cellules de la coiffe entourant la colummelle.

- L'accumulation des grains d'amidon s'accroît au cours de l'élongation de l'hypocotyle. Le parenchyme cortical de l'hypocotyle et le parenchyme médullaire sub-apical sont

---

**<sup>2</sup> figure 11 : Evolution du contenu en grains d'aleurone et en amidon pendant la germination et la post-germination.**

11-1, -3, -4, -5, -9, -13, -16 : double coloration des protéines (bleu) et des polysaccharides (fushia).

11-14 : coloration des protéines. 11-2, -6, -7, -8, -10, -11, -12, -15-, -17, -18 : coloration des polysaccharides

**11-1 à 11-3 : embryon déshydraté:** 1- vue d'ensemble: coloration intense des protéines due à la richesse en grains d'aleurone, 2- apex caulinaire dépourvu d'amidon, 3- détail de la limite SAM/moelle, présence de grains de petite taille dans le SAM. **11-4 à 11-5 : imbibition:** 4- détail du SAM montrant l'absence de grain d'aleurone dans cette zone, 5- cellules de cotylédon contenant de nombreux grains d'aleurone, et des grains d'amidon de petite taille. **11-6 à 11-9 : émergence de la radicule:** 6- vue d'ensemble d'un hypocotyle: forte accumulation d'amidon, particulièrement dans le parenchyme cortical, et dans le parenchyme médullaire adjacent au SAM, 7- détail de l'apex caulinaire: parenchyme cortical (++) et parenchyme médullaire (+++) contiennent une importante quantité d'amidon, 8- détail du SAM montrant l'absence d'amidon 9- détail de cotylédon montrant encore la présence de grains d'aleurone. **11-10 à 11-13 : élongation de l'hypocotyle,** 10- accumulation d'amidon dans l'hypocotyle et l'apex caulinaire, 11- détail de l'hypocotyle, 12- détail de l'apex, accumulation dans la moelle et le cortex, 13- absence de grains d'aleurone dans l'apex. **11-14 à 11-15 : fin d'élongation de l'hypocotyle,** 14- vue d'ensemble: bourgeon latéral en formation (flèche), nombreuses euphylls formées, 15- aucune réserve détectée. **11-16 à 11-18 : élongation de l'épicotyle,** 16- vue d'ensemble, 17- détail de l'apex: SAM large et présence d'amidon dans le méristème médullaire et surtout dans le parenchyme médullaire adjacent, 18- détail du méristème latéral et du parenchyme médullaire: absence d'amidon dans le méristème latéral.

particulièrement concernés comme dans le second lot du stade précédent (figures 10-10, 10-12). Les grains d'amidon ne sont jamais détectés dans le méristème apical caulinaire.

- Lorsque l'hypocotyle est allongé, il ne reste que quelques grains d'amidon sur la périphérie interne du parenchyme cortical de la partie caulinaire de la plantule.

- Enfin, au stade 6-7 correspondant à la formation d'une rosette d'euphylls, les apex des plants sont totalement dépourvus d'amidon. Cette situation est cependant, passagère.

- Lors de l'élongation de l'épicotyle, l'amidon s'accumule en effet, dans le cortex et le parenchyme médullaire des semis, et plus particulièrement dans la zone sub-apicale caulinaire. Puis, à la fin de la saison de végétation (décembre), les grains d'amidon subsistent essentiellement dans cette partie.

En résumé, une importante accumulation transitoire et ascendante d'amidon est observée lors de l'élongation des organes préformés dans l'embryon. L'apex caulinaire et plus particulièrement le parenchyme médullaire sub-apical forment une zone de stockage de l'amidon à la fois au cours du développement post-germinatif et lors de la croissance de l'épicotyle. Dans une moindre mesure, le parenchyme médullaire et le cortex constituent également des zones provisoires de réserve.

#### ***III.2.1.2.4 - Les tannins***

La fixation du matériel végétal dans un milieu contenant des ions chromés, permet de mettre en évidence des polyphénols sous forme de précipités. Les embryons déshydratés et imbibés ne contiennent pas ce type de précipité. Les tannins apparaissent pendant l'émergence de la radicule dans les vacuoles des cellules épidermiques et des cellules situées en périphérie des cordons procambiaux. Lorsque l'hypocotyle est allongé, certaines cellules du parenchyme médullaire sub-apical adjacent au SAM et de l'extrémité des ébauches foliaires en élongation se distinguent également par la présence de tanins.

Des tanins sont également observés dans le méristème médullaire et les parenchymes médullaire et cortical pendant l'élongation de l'épicotyle et lors du repos hivernal.

#### **III.2.1.3- Etude de l'activité catalasique**

### *III.2.1.3.1- Localisation in situ de l'activité catalasique (figure 10 suite)*

Les embryons déshydratés et imbibés présentent une activité catalasique généralisée avec, cependant, des zones moins actives : le SAM, les cordons procambiaux, et la coiffe racinaire (figure 10-2).

Lors de l'émergence de la radicule, la localisation de l'activité catalasique est modifiée. L'activité n'est, en effet, plus observée dans la radicule en croissance (figure 10-4). Les méristèmes caulinaire et racinaire et les cordons procambiaux sont toujours réactifs de même que les parenchymes médullaire et cortical et les cotylédons (figures 10-4, 10-6).

Au stade 4, l'activité catalasique localisée dans les parenchymes de l'hypocotyle en élongation régresse. Par contre, elle subsiste à proximité de l'apex caulinaire où, comme nous l'avons vu précédemment, une accumulation des triglycérides est observée (figure 10-9). On remarque que l'activité catalasique se maintient plus longtemps dans le parenchyme médullaire que dans le parenchyme cortical indiquant une inhibition de l'activité catalasique dans ce dernier (figure 10-10). Le SAM est toujours le siège d'une intense activité catalasique.

Lorsque l'hypocotyle est allongé (stades 6-7), l'activité a fortement régressée dans les parenchymes. Elle se maintient dans les tissus conducteurs, le SAM et les ébauches foliaires adjacentes (figure 10-14). En revanche, les aiguilles en élongation ne sont pas réactives. Il est intéressant de noter la non-réactivité particulièrement marquée des cellules situées entre le SAM et le parenchyme sub-apical et dont la plupart sont caractérisées par la présence de tannins.

La répartition de l'activité catalasique est identique dans l'apex des plants en cours d'élongation de l'épicotyle (stade 8) (figure 10-15). Au niveau de l'épicotyle, elle est détectée uniquement dans le système vasculaire (figure 10-16).

En résumé, nous avons observé d'une part, la diminution progressive de l'activité catalasique dans les parenchymes des tissus préformés de l'embryon, d'autre part, le maintien d'une activité catalasique permanente au niveau du SAM, des ébauches foliaires nouvellement formées et des tissus conducteurs.

**III.2.1.3.2 - Mesure de l'activité catalasique et identification des isoformes de la catalase (Travaux réalisés en association avec F. Bagnoli, S. Danti et M. Racchi, Université de Florence)**

L'activité catalasique totale a été mesurée dans différents tissus au cours de la croissance post-germinative aux stades graine déshydratée (1), élongation de l'hypocotyle (4), début d'élongation des euphylls (6) et élongation de l'épicotyle (8).

Le tableau 1 montre une forte augmentation de l'activité catalasique dans l'endosperme et dans l'embryon jusqu'au stade 4 puis une diminution au cours des stades suivants. Au stade 4, l'activité est faible dans la racine et importante dans l'hypocotyle et les cotylédons. Un gradient d'activité ascendant est ainsi mis en évidence.

Puis, lorsque l'élongation des tissus préformés est terminée (stade 6), l'activité diminue dans l'hypocotyle. Enfin, ce n'est qu'au stade 8 correspondant à l'élongation de l'épicotyle, que l'activité mesurée dans les cotylédons décroît sensiblement.

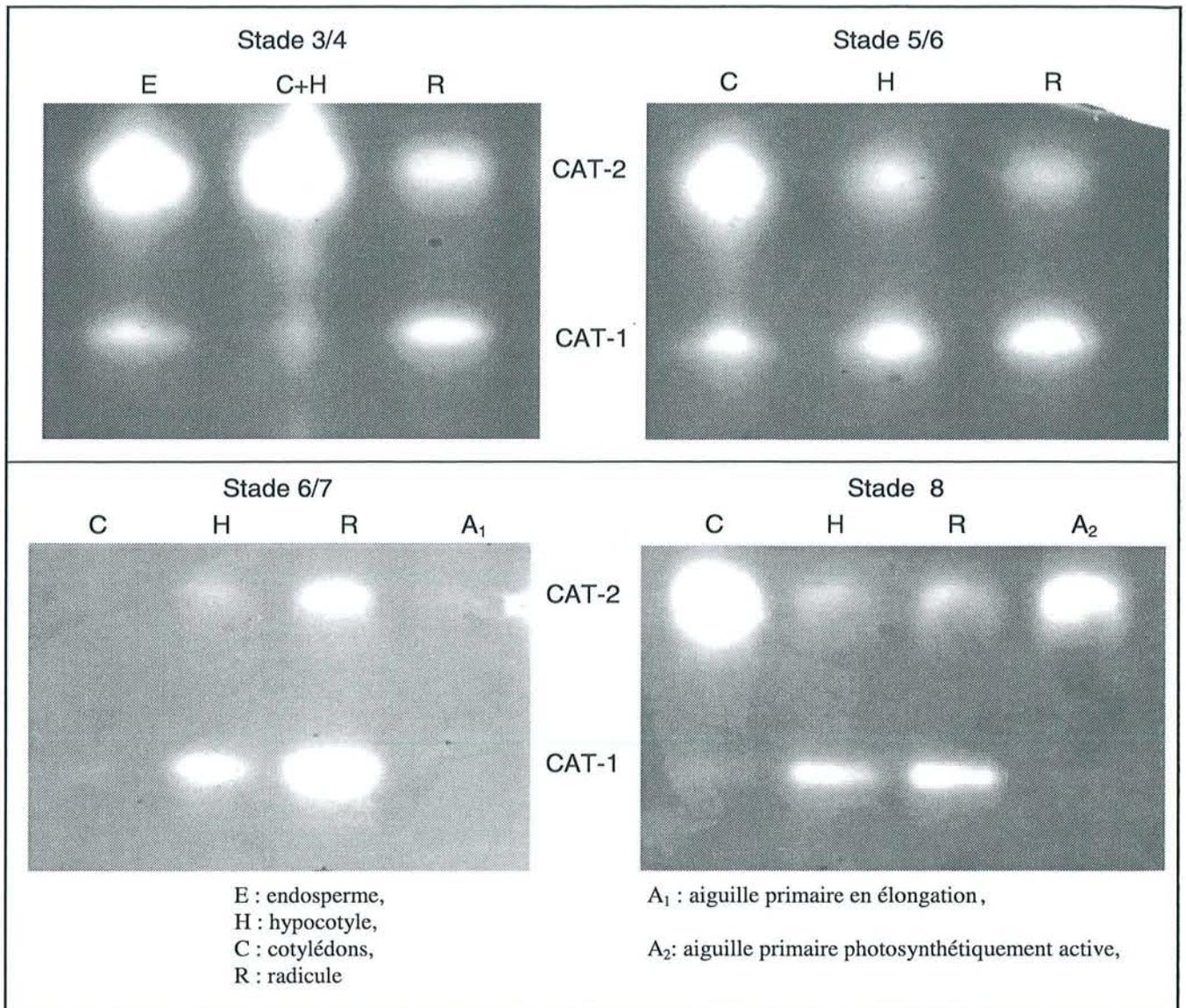
**Tableau 1:** Activité spécifique de la catalase dans la graine puis dans la plantule de *Pinus pinaster* au cours de la croissance post-germinative.

Valeurs moyennes exprimées en U/mg protéines

<b>Tissus</b>	<b>stade 1</b> <i>graine sèche</i>	<b>stade 4</b> <i>élongation de l'hypocotyle</i>	<b>stade 6</b> <i>rosette des premières euphylls</i>	<b>stade 8</b> <i>épicotyle en élongation</i>
<b>Graine</b>	31.43 ±5.1			
<b>Endosperme</b>		50.38 ± 8.2		
<b>Cotylédons</b>		136.30 ±15.1	40.61±4.4	7.49 ±0.7
<b>Hypocotyle</b>		73.12 ±14.1	3.12 ±2.8	12.96 ±0.8
<b>Racine</b>		31.01 ±1.6	9.18 ±1.6	12.24 ±0.6
<b>Euphylls</b>			1.66 ±0.1	11.76 ±2.6

*d'après Jordy et al. (2000)*

L'activité catalasique révélée sur des gels non dénaturants permet de mettre en évidence plusieurs isoformes de la catalase dans les extraits protéiques. Le nombre d'isoformes et l'intensité de leur activité varie au cours des stades étudiés (figure 12).



*d'après Jordy et al. (2000)*

**figure 12: Mise en évidence des différentes isoformes de la catalase au cours de la croissance post-germinative (gel natif PAGE)**

Dans la graine sèche, 4 isoformes sont détectées (non montré). Seules 2 d'entre elles restent actives pendant la croissance post-germinative :

- La première bande de migration, CAT 1, est détectée constamment dans la racine et la tige, et transitoirement, dans les tissus en fin de mobilisation des lipides.
- La seconde, CAT 2, migre plus lentement. Initialement présente dans tous les tissus préformés de l'embryon, son activité s'estompe au cours de leur croissance, avant d'augmenter dans les cotylédons et les euphylls au stade 8 (élongation de l'épicotyle).

En résumé, les variations de l'activité catalasique mesurée au cours de la croissance post-germinative semblent résulter des variations d'activité des isoformes de la catalase.

### III.2.2 - Embryons somatiques et zygotiques excisés

Après avoir étudié des embryons zygotiques en association avec l'endosperme, nous avons suivi les premières étapes de la croissance d'embryons zygotiques excisés et d'embryons somatiques placés dans des conditions de culture identiques.

#### III.2.2.1 - Morphologie

##### III.2.2.1.1- Les embryons somatiques

La lignée embryogène T325 (AFOCEL) utilisée dans notre expérience et, dans les conditions de culture appliquées, produit des embryons somatiques dont 20% peuvent être convertis en plantules. Les embryons deshydratés ou cultivés depuis 7 jours présentent, en majorité, un méristème apical plat ou légèrement bombé formé de 2 à 3 couches de cellules (figures 13-1 à 13-6). Après 11 jours de culture sur le milieu de germination, délai correspondant à l'obtention de l'émergence de la radicule pour les graines, des initia foliaires qui donneront les aiguilles primaires apparaissent de part et d'autres du SAM. De plus, la taille du SAM a augmenté indiquant un éventuel soulèvement du méristème (tableau 2, figure 13-9).

**Tableau 2 : Morphométrie de l'apex caulinaire des embryons somatiques :**

	largeur (µm)	hauteur (µm)
ES deshydratés	290 (+/-90)	43(+/-34)
ES hydratés (7 j)	280 (+/-142)	40 (+/-40)
ES en croissance (11j)	370 (+/-70)	80 (+/-15)

Lorsque les euphylls débutent leur élongation, de nouvelles ébauches foliaires se forment. Le SAM a, alors la forme d'un dôme. A ce stade, l'hypocotyle mesure moins de 1 cm alors que pour des semis issus de graines, il est 4 à 5 fois plus haut au stade équivalent. Certains de ces échantillons présentent 2 méristèmes apicaux caulinaires produisant au moins un pseudoverticille d'euphylls dont les plus âgées sont en élongation (figures 13-12 et 13-13). Ces observations indiquent une dichotomie précoce du méristème qui pourrait se produire pendant la maturation ou bien, lors de la germination lors d'un éventuel « soulèvement » du méristème apical.

#### ***III.2.2.1.2 - Les embryons zygotiques excisés***

Des embryons zygotiques privés de leur endosperme sont cultivés dans les mêmes conditions que les embryons somatiques.

Chez ces embryons excisés, l'élongation de l'hypocotyle est identique à celle des embryons somatiques. Dans les 2 cas, en effet, la taille de l'hypocotyle est réduite à la fin de son élongation. En revanche, la formation précoce des euphylls pendant les premières étapes de la croissance, et les paramètres morphométriques du méristème ne sont pas affectés par l'élimination de l'endosperme.

### **III.2.2.2-Cytophysiologie**

#### ***III.2.2.2.1 - Les embryons somatiques***

Les embryons somatiques déshydratés contiennent à la fois des réserves lipidiques (figures 13-5 et 13-6) et amylacées (figures 13-3 et 13-4), mais aucun globule protéique n'est détecté (figures 13-1 et 13-2). La coloration des triglycérides est relativement faible par rapport à celle observée dans les embryons zygotiques déshydratés ce qui indiquerait une moindre mise en réserve des lipides.

Les embryons cultivés 7 jours sur le milieu de germination ne semblent pas différents.

En revanche, après 11 jours de culture sur le milieu de germination, les réserves lipidiques s'épuisent dans tous les tissus sauf dans le parenchyme médullaire sub-apical de la tige (figures 13-11 et 13-12). Les grains d'amidon ont totalement disparu (figure 13-8).

Au stade de l'élongation des euphylls, l'apex des plantules ne contient aucune réserve lipidique ou polysaccharidique (figures 13-13).

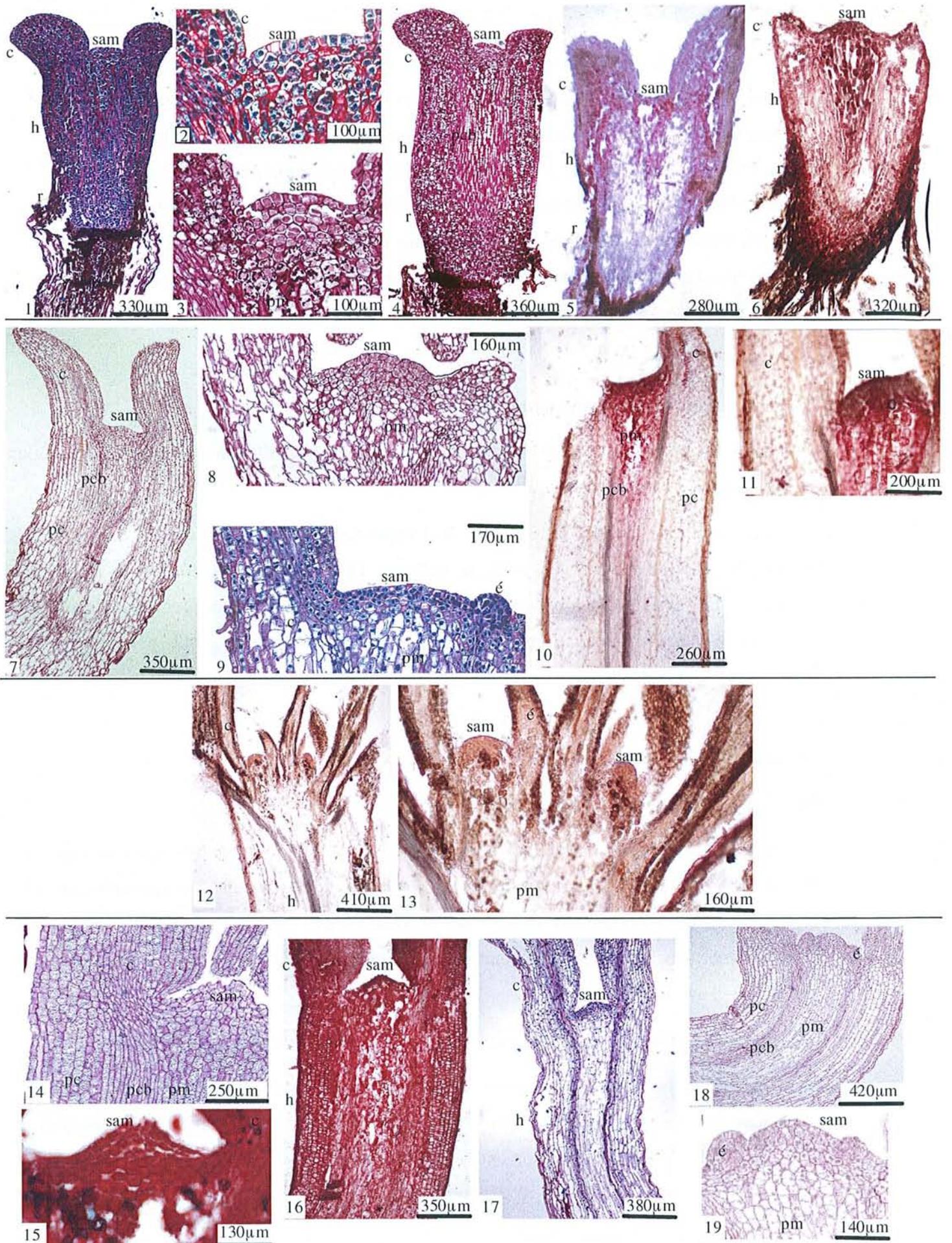


figure 13: Morphologie et contenu en réserves des embryons somatiques et zygotiques excisés  
(Cf. légende p.36)

### III.2.2.2.2 - Les embryons zygotiques excisés

Les embryons zygotiques déshydratés sont initialement riches en réserves lipidiques et protéiques. Comme dans les embryons contenus dans l'endosperme, la mobilisation des réserves dans les embryons excisés a lieu au cours de la croissance de la plantule. Ainsi, la disparition des réserves lipidiques dans la radicule et les ébauches foliaires en formation est observée lors du prélèvement effectué après 11 jours de culture sur le milieu de germination (figure 13-16 à 13-17).

---

#### <sup>3</sup> figure 13: Distribution des réserves et évolution de l'apex des embryons somatiques et zygotiques excisés

figures 13.1 à 13.13 : Embryons somatiques , 13.14 à 13.19 : Embryons zygotiques excisés

figures 13-1, 2, 9, 17: double coloration des polysaccharides et des protéines – figures 13- 3, 4, 7, 8, 14, 18, 19: coloration des polysaccharides – figures 13- 5, 6, 10, 11, 12, 13, 15 : coloration des triglycérides

– **1 à 6 : embryons somatiques déshydratés.** 1 : vue d'ensemble: détection des protéines intense mais aucun grain d'aleurone observé. - 2 : détail de l'apex: méristème légèrement bombé, aucun grains d'aleurone dans les tissus. - 4 : vue d'ensemble, - 3 : détail de l'apex : nombreux grains d'amidon sauf dans le méristème apical.- 5 : triglycérides présents dans les cotylédons, le cortex et la moëlle, densité de coloration relativement faible par rapport aux embryons zygotiques, - 6 : cas particulier, méristème en forme de dôme et coloration des réserves lipidiques importante. – **7 à 11 : 11 jours après le début de l'imbibition,** - 7 : vue d'ensemble; - 8 : détail de l'apex: méristème bombé, absence d'amidon. - 9 : détail de l'apex : aucun grains d'aleurone, ébauche foliaire visible. - 10 : vue d'ensemble: réserves lipidiques présentes dans le parenchyme médullaire adjacent au SAM; 11 : détail de l'apex. - **12 à 13 : début de l'élongation des euphylls :** cas particulier. 12 : vue d'ensemble, 13 : détail de l'apex : 2 méristèmes caulinares ; chacun entouré de plusieurs ébauches foliaires dont les plus âgées sont en élongation. - **14 à 19 : Embryons zygotiques excisés.** 14 - 15 : embryons déshydratés; 14 : détail de l'apex: absence d'amidon, grains d'aleurone nombreux. 15 : détail de l'apex, stockage important de triglycérides dans l'ensemble des territoires. - **16 à 19 : 11 jours après le début de l'imbibition.** 16 et 17 : Hypocotyle et apex caulinaire. 16: Triglycérides présents dans tout les tissus (ébauches foliaires non visibles dans cette coupe, mais triglycérides absents dans ces zone). 17 : absence de réserves polysaccharidiques et protéiques. 18 - 19 : Amidon absent dans l'hypocotyle – 18: vue d'ensemble – 19: apex caulinaire

En revanche, aucune réserve polysaccharidique n'est formée dans le parenchyme médullaire et le cortex, à l'inverse des embryons zygotiques cultivés en association avec l'endosperme (figures 13-18 à 13-19).

L'endosperme semble donc exercer un rôle important dans le processus d'accumulation des réserves polysaccharidiques dans la plantule en croissance.

### III.3 - DISCUSSION

#### III.3.1- Germination et croissance post-germinative des graines

##### III.3.1.1- Morphologie et morphométrie

Dans la graine déshydratée, l'apex caulinaire des embryons est entouré des futurs cotylédons. Les premiers primordia foliaires qui donneront des aiguilles primaires, apparaissent très tôt au cours de la croissance de la plantule (stade 3 : émergence de la racicule). Puis, 2 à 3 pseudoverticilles de nouvelles ébauches foliaires se forment pendant l'élongation de l'hypocotyle.

Ces résultats, obtenus chez le pin maritime confirment les observations réalisées sur d'autres espèces: *P. radiata*, *P. banksiana* ... (Camefort, 1956 ; Fosket & Miksche, 1966 ; Riding, 1972 ; Cecich & Horner, 1977). Cela permet de supposer que les plantules du genre *Pinus* présentent toutes ce type de développement.

Au niveau des caractéristiques morphologiques du SAM, nous avons observé une faible augmentation de taille pendant la période d'imbibition. Un phénomène identique a été observé chez *P. radiata* (Riding ; 1972) et *P. banksiana* (Cecich & Horner, 1977). Cette augmentation précoce serait due principalement à un élargissement des cellules et non à une augmentation de l'activité mitotique méristématique (Cecich & Horner, 1977).

Une importante diminution de la taille du SAM se produit ensuite au moment de la formation des premières ébauches foliaires. Les divisions cellulaires sont majoritairement observées dans les primordia foliaires au cours de cette période (Riding, 1972). Ces observations suggèrent une insuffisance des divisions cellulaires pour entretenir la taille du SAM pendant la croissance post-germinative et une préformation des premières ébauches dans le SAM des embryons matures. Ce type de fonctionnement permettrait à la plantule d'économiser une partie de son patrimoine énergétique et de l'utiliser pour la formation des ébauches et l'élongation des tissus préformés de l'embryon.

Lorsque l'hypocotyle est allongé, plusieurs jours sont nécessaires avant que l'épicotyle s'allonge à son tour. Pendant cette période, les premières euphylls formées s'allongent

puis des bourgeons axillaires se différencient ; la taille du méristème est minimale. Le SAM présente donc une activité ralentie au moment où les organes photosynthétiques qu'il a produit se développent. L'allongement des tissus préformés puis l'élongation des aiguilles et la formation de bourgeons latéraux semblent ainsi associés au ralentissement de l'entretien du dôme méristématique puis de l'activité du SAM.

Par la suite, un élargissement du SAM est observé pendant l'élongation de l'épicotyle. Simultanément, de nouvelles ébauches foliaires sont initiées. Il y a donc un changement de fonctionnement de l'activité mitotique qui permet à la fois l'entretien du SAM et la formation de nouveaux initia foliaires.

### **III.3.1.2- Métabolisme des réserves**

#### ***III.3.1.2.1- Les réserves contenues dans l'embryon et leur devenir pendant la germination et la croissance des tissus préformés: du stade 1 au stade 7***

**Les triglycérides et de nombreux globules protéiques sont répartis dans l'ensemble de l'embryon déshydraté.**

Deux types de globules protéiques sont observés dans l'embryon. Petits au niveau de l'apex caulinaire et des cordons procambiaux, ils sont plus gros dans les cotylédons et les parenchymes médullaire et cortical. Une répartition identique a été décrite dans l'apex caulinaire de *P. radiata* mais les autres tissus n'ont, semble t'il pas été étudiés (Riding et Gifford, 1973). Stone et Gifford (1997) ont également signalé, chez *Pinus taeda*, la présence de globules protéiques plus gros dans la zone centrale de l'endosperme que dans les zones périphériques.

Pour les lipides, au contraire, nous avons observé une répartition uniforme dans les embryons. Cependant, chez *P. banksiana*, Cecich et Horner (1977) ont observé, en microscopie électronique, la présence d'oléosomes de plus petite taille dans le SAM en comparaison aux tissus adjacents. La technique cytologique que nous avons utilisée pour mettre en évidence les triglycérides ne permettrait pas de déceler d'éventuelles différences de taille. Seule une étude ultrastructurale permettrait de valider les précédentes observations sur *P. pinaster*.

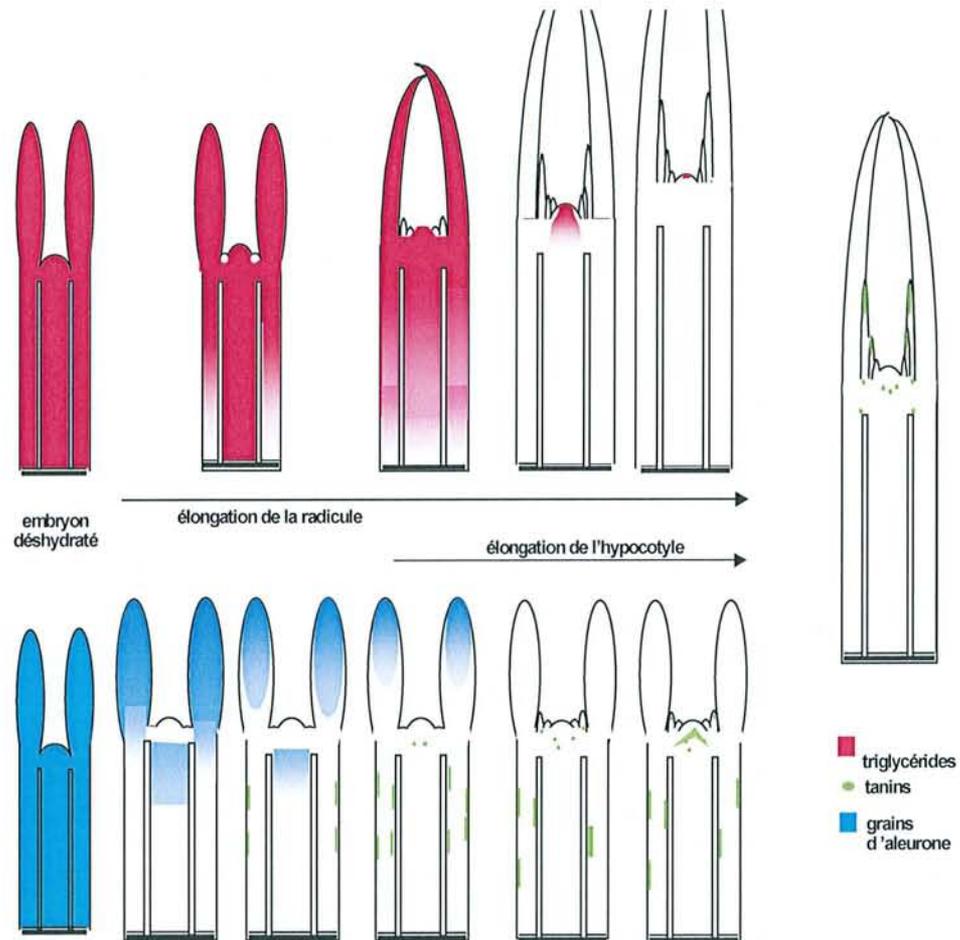


Figure 14: Evolution de la distribution des triglycérides, des grains d'aleurone et des tanins pendant la germination et la croissance post-germinative

**Les réserves lipidiques et protéiques sont progressivement mobilisées au cours de la croissance post-germinative de la plantule (figure 14). Cette mobilisation est ordonnée dans le temps et dans l'espace.**

Elle débute dans la radicule dès son émergence pour ces 2 types de réserves, ce qui confirme les observations réalisées sur *P. taeda* (Stone & Gifford, 1997 ; 1999), *P. sylvestris* (Simola, 1974) et *P. halepensis* (Pargney & Thalouarn, 1978). Selon Stone et Gifford (1997, 1999), les réserves contenues dans les embryons de *P. taeda* sont également mobilisées dans l'hypocotyle pendant cette même période mais la vitesse de dégradation serait plus importante dans la radicule.

Chez *P. pinaster*, la mobilisation des réserves se poursuit dans l'hypocotyle et les cotylédons au fur et à mesure de leur élancement.

Ces observations suggèrent que :

- **1- la mobilisation ordonnée des réserves lipidiques et protéiques contenues dans l'embryon, est fortement liée à la croissance des tissus qui les contiennent. L'apport énergétique nécessaire à la croissance serait, au moins en partie, fourni par la mobilisation de composés présents sur les sites de croissance et donc accessibles rapidement.**

ou bien que,

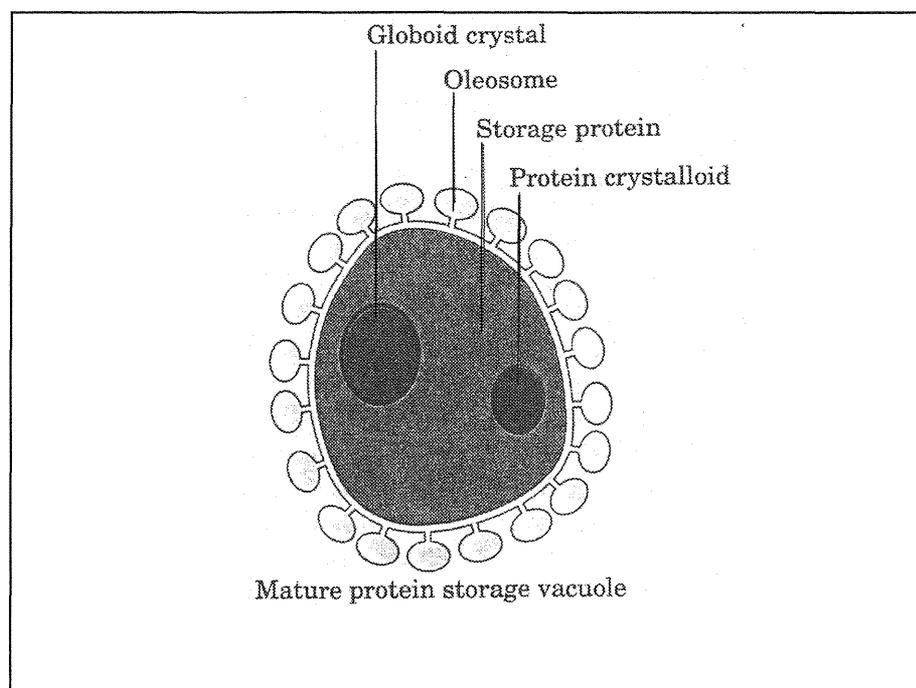
- **2- la mobilisation des réserves de l'embryon est régulée par l'endosperme. Celui-ci reste en contact avec l'embryon jusqu'à la fin de l'élongation de l'hypocotyle et est repoussé le long de l'axe embryonnaire en même temps qu'il exporte ses réserves vers la plantule. King et Gifford (1997) et Gifford *et al.* (1998) ont, en effet, montré que les relations entre l'endosperme et l'embryon ne sont pas limitées au transfert des réserves mais aussi à une régulation du métabolisme azoté de l'embryon par l'endosperme.**

Les dynamiques de distribution des triglycérides et des globules protéiques diffèrent aussi l'une de l'autre dès la germination puisque l'hydrolyse des protéines se produit précocement (stade imbibition) alors que la mobilisation des réserves lipidiques ne débute que lors de l'entrée en croissance de la plantule (stade 3).

Ce sont les petits globules protéiques contenus dans le SAM et les cordons procambiaux qui sont d'abord hydrolysés. Stone & Gifford (1997) ont également décrit une hydrolyse précoce des réserves protéiques dans les tissus conducteurs et les cellules de l'endosperme en contact avec l'embryon de *P. taeda*. Or, ces cellules correspondent à des zones de transfert entre l'endosperme et l'embryon. Une hydrolyse rapide et précoce dans ces tissus, leur permettrait d'assurer rapidement leur fonction de transport. En effet, l'hydrolyse de la majorité des réserves de l'endosperme a lieu après la disparition des globules protéiques dans ces zones spécifiques (Stone & Gifford, 1997). Au niveau du SAM, la disparition précoce des réserves protéiques pendant l'imbibition pourrait être liée à l'initiation des premières ébauches foliaires qui sont visibles au stade suivant. King et Gifford (1997) ont détecté la présence d'acides aminés néoformés dans la plantule très tôt au cours de la germination. Ces acides aminés pourraient résulter de l'hydrolyse des globules protéiques situés dans le SAM.

La totalité des globules protéiques de la plantule disparaît au stade 4 (correspondant à l'élongation de l'hypocotyle) alors que les réserves lipidiques ne sont totalement mobilisées que lorsque tous les éléments préformés dans l'embryon se sont allongés (stade 6). La mobilisation des réserves protéiques semble ainsi, plus rapide que celle des triglycérides.

L'étude ultrastructurale d'embryons de Pin sylvestre a aussi montré que la protéolyse précède la lipolyse (Simola, 1974 ; Cecich & Horner, 1977). La rapidité et la précocité de la mobilisation des réserves protéiques permettraient ainsi, la formation d'acides aminés disponibles rapidement pour la croissance de la plantule. Selon d'autres travaux, les relations entre les réserves lipidiques et protéiques pourraient ne pas être limitées à leur mobilisation synchronisée. En effet, parmi les produits de l'hydrolyse des grains d'aleurone, certains composés pourraient être impliqués dans la lipolyse. En outre, bien que généralement les oléosomes soient étudiés indépendamment des globules protéiques (Huang, 1992), Bethke *et al.* (1998) ont proposé un modèle où les oléosomes font partie intégrante des « vacuoles de stockage des protéines » (figure 15)



**figure 15: Protéines de réserves liées aux oléosomes (d'après Bethke *et al.*, 1998)**

Une étude ultrastructurale et biochimique permettrait de confirmer de telles observations chez le pin, mais, d'ores et déjà, une relation étroite entre le métabolisme des réserves protéiques et lipidiques peut être envisagée grâce à l'évolution de la distribution spatiale de chacune de ces réserves.

**Des différences dans la dynamique de mobilisation des réserves protéiques et lipidiques peuvent aussi être observées au niveau de l'apex caulinaire.**

En effet, la totalité des globules protéiques présents initialement est mobilisée pendant l'imbibition. A l'inverse, la mobilisation des triglycérides est échelonnée dans le temps et se termine à la fin de l'élongation de l'hypocotyle.

Le premier territoire dans lequel les triglycérides sont hydrolysés correspond au méristème latéral qui perd ses réserves après l'émergence des premières ébauches foliaires (stade 4). L'accumulation de triglycérides n'y est jamais observée au cours des stades suivants. Les réserves lipidiques ne sont donc pas observées dans les zones actives où les divisions mitotiques sont nombreuses.

Concernant les autres sites du SAM, le stockage des lipides y perdure plusieurs jours après l'émergence des premiers primordia foliaires (jusqu'au stade 6). Ainsi, les lipides se maintiennent dans le méristème médullaire jusqu'au stade 5 et dans le méristème central jusqu'au stade 6. La mobilisation des réserves lipidiques initialement présentes dans la graine permettrait ainsi les activités d'organogenèse et d'élongation de l'hypocotyle. L'évolution spatio-temporelle de la mobilisation des réserves dans le SAM peut résulter de ces 2 types d'activité. A la fin de l'élongation des tissus préformés, les dernières réserves lipidiques situées à la périphérie du méristème central pourraient indiquer une entrée en activité tardive de ces cellules.

Au stade 7 marqué par l'allongement des premières euphylls, une absence totale de lipides est observée au niveau de l'apex caulinaire. A ce stade, la taille du SAM est minimale, et la production d'ébauches foliaires semble ralentie. La formation de bourgeon latéraux et l'allongement des euphylls nécessitent néanmoins, un apport en nutriment qui ne peut plus être approvisionné par les réserves de la graine. La photosynthèse au niveau des cotylédons et de l'hypocotyle alimenterait alors ces processus.

**L'ensemble de ces résultats montre une dynamique spatio-temporelle de la mobilisation des lipides dans l'apex de pin maritime au cours de la croissance post-germinative. Lors de la croissance post-germinative, les réserves s'épuisent selon une dynamique permettant les activités d'élongation et d'organogenèse. Ces phénomènes peuvent être considérés en terme d'équilibre source-puits. Les puits correspondent aux sites et aux périodes d'organogenèse, à l'élongation des aiguilles et à la formation**

des bourgeons latéraux. La source provient des réserves de la graine qui s'épuisent progressivement tandis que la plante devient autotrophe grâce à la photosynthèse.

### *III.3.1.2.2 - Néosynthèse de réserves glucidiques et lipidiques*

*III.3.1.2.2.1- Pendant la germination jusqu'au déploiement des cotylédons (du stade 2 au stade 7)*

#### *III.3.1.2.2.1.1 – Apparition des réserves glucidiques*

♣ Selon certains travaux, l'amidon est déjà présent dans les graines sèches (Nyman, 1965 ; Durzan, Mia & Ramaiah, 1971). Les quantités détectées sont cependant relativement faibles, de l'ordre de 3% chez *P. edulis* par exemple (Murphy & Hammer, 1994). Pour notre part, aucune réserve amyliacée n'est observée à ce stade. Cette situation peut être due à la limite de détection de ces composés, mais elle peut aussi révéler une particularité de l'espèce ou encore résulter de la conservation des graines à 4 C°. En effet, Häggman *et al.* (1999) ont montré chez *Pinus sylvestris*, que le contenu en amidon de l'endosperme diminue lorsque les graines sont soumises au froid.

Pendant l'imbibition et la croissance post-germinative, une accumulation d'amidon est clairement observée dans la plantule. Elle s'effectue en deux temps et diffère en intensité selon la période considérée :

- **d'abord pendant l'imbibition**, l'accumulation est faible
- **puis pendant l'élongation des tissus préformés**: où l'accumulation est forte mais provisoire.

♣ Les substrats nécessaires à la production d'amidon peuvent provenir de l'activité photosynthétique ou bien de la mobilisation des réserves de la graine. En effet, l'hydrolyse des triglycérides produit, via la gluconéogenèse, du saccharose qui peut être exporté et utilisé pour la respiration et la croissance (Murphy, Rutter & Hammer, 1992). Les étapes conduisant à la synthèse d'amidon à partir du saccharose sont rappelées figure 16

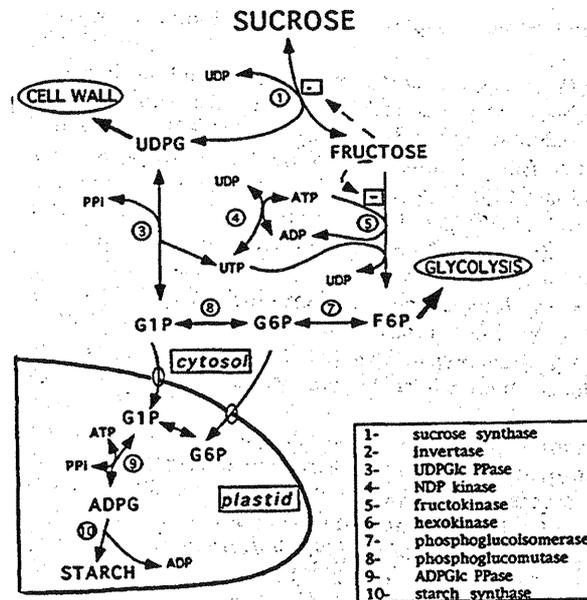


figure 16: formation d'amidon à partir du saccharose (d'après Schaffer et Petreikov, 1997)

◆ Au cours de l'imbibition :

Aucun verdissement des cotylédons, indicateur de l'activité photosynthétique, n'est observé alors que la précocité de la photosynthèse dans les cotylédons contenus dans la graine a été évoquée chez d'autres conifères (Kovac & Kregar, 1989).

L'amidon observé à ce stade résulte donc obligatoirement d'un apport de saccharose. Les dosages effectués sur *P. taeda* montrent que la quantité de saccharose initialement présente dans l'endosperme, diminue pendant la période d'imbibition. En outre, l'hydrolyse des réserves lipidiques débute juste avant l'émergence de la racine (Stone & Gifford, 1999). **Ainsi, la faible accumulation d'amidon pendant l'imbibition pourrait résulter du transfert de saccharose initialement présent dans l'endosperme des graines sèches.** Un mécanisme similaire a été observé dans les germinations de tournesol où les sucres totaux des cotylédons sont utilisés pour approvisionner l'axe embryonnaire, alors que les lipides ne sont pas encore mobilisés (Balasaraswathi & Sadasivam, 1997). Il convient de souligner cependant, que cette hypothèse n'a pas été évoquée par Stone et Gifford.

◆ Pendant l'élongation des tissus préformés :

Les hydrolysats issus des réserves lipidiques de l'endosperme sont exportés jusqu'à l'embryon et peuvent fournir les substrats nécessaires pour la synthèse d'amidon (Ching, 1966 ; Kao, 1970 ; Stone & Gifford, 1999). Quant aux propres réserves de l'embryon, les

acides gras produits par l'hydrolyse des triglycérides ne suivent pas le processus de dégradation décrit classiquement (figure 6). En effet, l'isocitrate lyase et la malate synthétase, toutes 2 impliquées dans le cycle glyoxylique sont peu actives dans l'embryon (Mullen & Gifford, 1995 a et b). La gluconéogenèse productrice de saccharose approvisionnée par les produits du cycle glyoxylique est donc également affectée (Hammer & Murphy, 1994 ; Stone & Gifford, 1999). Les acides gras produits dans l'embryon pourraient participer directement à l'élaboration d'autres molécules lipidiques ou encore fournir via la  $\beta$ -oxydation, de l'énergie nécessaire à la croissance (Schmid, Andrews & Ohlrogge, 1997). Ainsi, Stone et Gifford (1999) suggèrent l'existence d'une répartition des tâches entre l'embryon et l'endosperme.

Il faut souligner que les cotylédons verdissent pendant cette période et donc que la photosynthèse peut constituer une source de substrats pour l'amylogénèse, mais cette contribution est probablement réduite au début de la croissance. En effet, nous avons observé une accumulation tardive d'amidon dans les cotylédons. Leur élongation pourrait constituer aussi un puits vis à vis des photosynthétats qu'ils produisent.

**Par conséquent, l'amidon observé au cours de la croissance des tissus préformés semble majoritairement produit via l'hydrolyse des réserves lipidiques de l'endosperme. Le saccharose produit est exporté jusqu'à l'embryon et accumulé sous forme d'amidon pendant la croissance post-germinative.**

Le fait qu'il n'y ait pas d'amidon dans les embryons excisés de *P. pinaster* va bien dans ce sens. Mais cela n'est pas suffisant pour affirmer que les précurseurs de la synthèse d'amidon dans l'embryon sont issus de l'endosperme. En effet, comme nous l'avons déjà souligné, l'endosperme pourrait avoir un rôle régulateur sur la croissance de l'embryon et la suppression de ces relations inhiberait l'accumulation d'amidon dans l'embryon (King & Gifford, 1997 ; Gifford *al.*, 1998).

III.3.1.2.2.1.3 - Evolution de la distribution de l'amidon (figure 17)

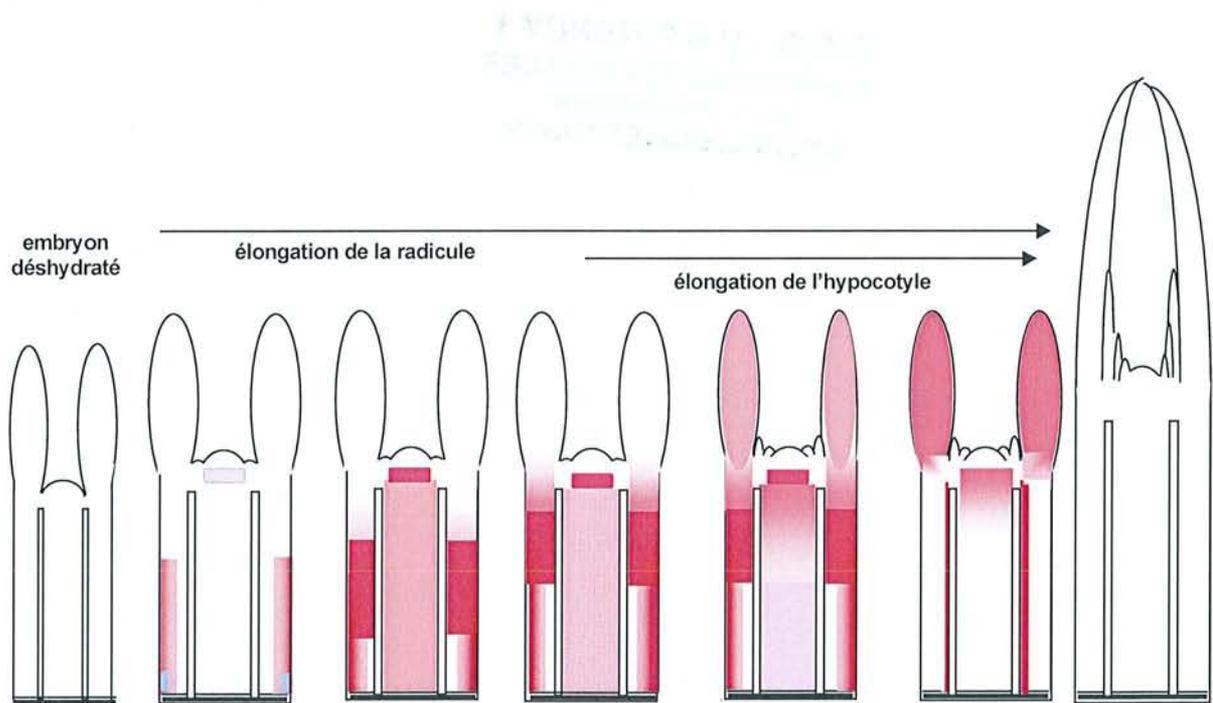


figure 17: Evolution de la distribution de l'amidon pendant la germination et la croissance post-germinative

**La distribution des réserves amyloacées varie dans le temps et dans l'espace. Ainsi, l'amidon est accumulé dans l'ensemble des tissus dans les embryons imbibés et dans des zones privilégiées pendant la croissance post-germinative.**

Pendant cette phase, les grains d'amidon ne sont jamais détectés dans le méristème apical caulinaire ni dans les cordons procambiaux. Ils sont observés en revanche, en grande quantité :

- d'abord dans le parenchyme cortical de la racicule et le parenchyme médullaire adjacent au méristème apical caulinaire
- puis dans l'ensemble du parenchyme cortical de l'hypocotyle et toujours dans le parenchyme médullaire adjacent au méristème apical caulinaire
- et enfin, dans les cotylédons.

**On observe donc une accumulation privilégiée de l'amidon dans le parenchyme cortical de la radicule et de l'hypocotyle lorsque ces organes débutent leur croissance.**

De la même façon, les réserves lipidiques s'épuisent d'abord dans la radicule puis dans l'hypocotyle, dans le parenchyme cortical puis dans le parenchyme médullaire. Les zones d'accumulation d'amidon se superposent aux sites d'hydrolyse des triglycérides qui sont pour l'essentiel, déterminés par les puits que constituent les tissus préformés en croissance.

Cette superposition pourrait être attribuée au transport du saccharose sur les sites d'hydrolyse des triglycérides. Pendant l'imbibition, l'amidon produit à partir du saccharose importé est réparti dans tout l'embryon alors que l'activité d'élongation et l'hydrolyse des triglycérides ne sont pas encore observés. A l'inverse, pendant la croissance des tissus préformés, le saccharose importé est stocké sous forme d'amidon dans des zones privilégiées où l'hydrolyse des triglycérides est observée. Ce processus d'hydrolyse des réserves lipidiques pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'utilisation du saccharose pour la croissance, et induire ainsi le stockage des sucres sous forme d'amidon.

En outre, les variations de la surface de la plantule en contact avec l'endosperme pourraient avoir une incidence sur le transfert des produits de l'hydrolyse. Au début de la période de croissance post-germinative, l'endosperme est uniquement en contact avec les cotylédons (Stone & Gifford, 1999). Mais lorsque la plantule croît, elle augmente de volume alors que celui de l'endosperme varie peu. De plus, l'endosperme est repoussé le long de l'axe embryonnaire pendant cette période. Le transfert de saccharose depuis l'endosperme jusqu'à l'embryon est soumis à ce mouvement et les zones de la plantule qui ne sont plus en contact avec l'endosperme n'accumuleraient plus l'amidon.

Cas particulier : le parenchyme médullaire sub-apical

Le stockage d'amidon n'est jamais observé dans le SAM pendant la croissance post-germinative. En revanche, le parenchyme médullaire sub-apical apparaît comme une zone d'accumulation privilégiée. Il est intéressant de noter que ce réservoir se forme en même temps que les premières ébauches foliaires se développent. Cette différenciation au sein de l'apex entre région apicale et région sous-apicale rappelle les descriptions d'apex végétatif de chénopodes âgés qui montrent un pH intracellulaire plus basique dans la zone sub-apicale (Albrechtova *et al*, 1997).

**En résumé, l'accumulation d'amidon dans les tissus préformés est transitoire. La distribution de l'amidon résulterait ainsi, de l'utilisation de ces réserves suite à**

**l'entrée en croissance des tissus préformés et de la quantité synthétisée en fonction de :**

- **la quantité de substrat disponible,**
- **la position de l'endosperme et les rapports entretenus avec l'embryon,**
- **des sites de croissance et d'hydrolyse des lipides de réserve.**

#### *III.3.1.2.2.2- Néosynthèse des réserves pendant l'élongation de l'épicotyle (stade 8 et 9)*

Après l'épuisement total des réserves dans l'apex caulinaire, les triglycérides et l'amidon sont de nouveau accumulés pendant l'élongation de l'épicotyle. Les lipides sont répartis dans le parenchyme médullaire sub-apical, le méristème médullaire et le méristème central alors que les réserves amylicées sont accumulées dans le parenchyme médullaire sub-apical. Le méristème latéral et les nouvelles ébauches foliaires restent dépourvus de réserves lipidiques et amylicées. Pendant le repos hivernal, la distribution des réserves amylicées est légèrement modifiée et les grains d'amidon sont observés uniquement dans le parenchyme médullaire sub-apical alors que les triglycérides sont accumulés davantage dans les zones identiques à celles observées 2 mois plus tôt mais aussi dans l'ensemble des parenchymes médullaire et cortical de l'apex caulinaire.

Par conséquent, l'amidon et les triglycérides sont produits sur les sites de stockage initiaux. Contrairement à ce qui est décrit pendant la période d'élongation des tissus préformés, leur localisation mutuelle ne semble pas liée.

Nous confirmons, néanmoins la **fonction de réserve en triglycérides du SAM** déjà décrite dans de précédentes études (Curtis & Popham, 1972 ; Riding & Gifford, 1973 ; Cecich, 1979). L'accumulation de ces réserves a lieu dans l'ordre inverse de leur dégradation. **En effet, l'hydrolyse des réserves est ascendante et l'accumulation est descendante puisqu'elle débute dans le SAM et se poursuit dans les tissus sous-jacents.**

### *III.3.1.2.3 - Rôle de la catalase pendant la mobilisation des réserves de la plantule lors de la croissance post-germinative (Jordy et al., sous presse)*

L'hydrolyse des réserves contenues dans la graine implique le fonctionnement de nombreuses enzymes. Ainsi, la mobilisation des lipides produit des acides gras dont la  $\beta$ -oxydation provoque la formation de  $H_2O_2$  qui est dégradé grâce à la catalase (Huang *et al.*, 1983). La diminution de la quantité de triglycérides dans la graine de pin, la mesure de la quantité d'acides gras formés et de l'activité de la catalase ont été étudiées séparément (Kao, 1973 ; Groome, Axler & Gifford, 1991 ; Hammer & Murphy, 1994 ; Stone & Gifford, 1999). En revanche, elles n'ont jamais été étudiées conjointement. Il n'y a donc pas de preuve directe de l'implication de cette enzyme dans le métabolisme des acides gras résultant de l'hydrolyse des triglycérides contenus dans la graine de pin.

L'étude que nous avons réalisée en association avec l'équipe de M. L. Racchi (Université de Florence), nous permet de vérifier au moins en partie, ces relations. La localisation des triglycérides a donc été entreprise en parallèle avec la mesure de l'activité catalasique, son histolocalisation et l'identification des isoformes de la catalase.

Ainsi, une augmentation de l'activité catalasique accompagne l'hydrolyse des triglycérides au cours de la croissance des tissus préformés confirmant l'implication de la catalase dans ce processus.

Les variations d'activité au cours de cette période sont divisés en 3 phases et peuvent résulter de phénomènes différents :

- Après 7 jours d'imbibition, elle s'accroît dans l'endosperme alors que la mobilisation des triglycérides débute.
- Pendant l'élongation de l'hypocotyle, l'activité de la catalase est encore importante à la fois dans l'endosperme et la plantule et varie selon le tissu. En effet, la plus faible activité est observée dans la racine, alors que l'hydrolyse des réserves lipidiques s'achève dans cette partie. **Une majorité de l'activité catalasique observée pendant la post-germination peut alors être attribuée à la mobilisation des acides gras et par extension, des triglycérides pendant cette période.**
- Après l'élongation de l'hypocotyle, l'expansion des cotylédons et la chute de l'endosperme, l'activité spécifique de la catalase devient faible, alors que l'ensemble des réserves lipidiques est hydrolysé. **Le semis acquiert alors son indépendance**

**phototrophique et l'essentiel de l'activité catalasique est probablement lié à la photorespiration, également productrice d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les peroxyosomes des cellules photosynthétiques (Willekens et al, 1995).**

La présence de plusieurs isoformes de la catalase a été observée dans le maïs en croissance (Acevedo & Scandalios, 1991) et l'endosperme de graines de *P. taeda* pendant l'imbibition (Mullen & Gifford, 1993). Chez *P. pinaster*, nous avons détecté **4 isoformes faiblement actives dans les graines sèches**. Le même nombre d'isoforme a été mis en évidence dans l'endosperme isolé de graines imbibées de *P. taeda* (Mullen & Gifford, 1993). Les mesures étant effectuées sur la graine entière, la localisation de ces isoformes n'a pu être précisée.

**Pendant la croissance post-germinative, seules 2 isoformes restent actives dans la plantule. Leur activité varie au cours du temps et en fonction des tissus.**

CAT 2, l'iso-enzyme de masse moléculaire la plus importante, est active dans les cotylédons et les autres tissus préformés de la plantule pendant la croissance des tissus préformés puis, essentiellement dans les cotylédons et les aiguilles primaires matures, lors de la croissance de l'épicotyle. CAT 1, est également active dans tous les tissus pendant leur élongation puis, elle est détectée uniquement dans l'hypocotyle et la racicule.

Par conséquent, ces 2 isoformes sont actives dans la plantule pendant la post-germination en même temps que les réserves lipidiques sont mobilisées pour assurer la croissance des tissus préformés dans la graine. L'implication de ces 2 iso-enzymes dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras est donc confirmée :

- d'une part, par la diminution de l'intensité du signal de CAT 2 dans la racicule, puis dans les cotylédons entre les stades 4 et 6, en parallèle avec l'hydrolyse des triglycérides dans ces tissus, et,
- d'autre part, par la diminution de l'activité de CAT 1 dans les tissus où l'hydrolyse des lipides s'achève.

CAT 1 pourrait succéder à CAT 2 dans le processus de mobilisation des réserves lipidiques.

Lorsque ces réserves sont mobilisées, les premières aiguilles primaires s'allongent et CAT 2 n'y est pas exprimée. En revanche, au stade suivant (stade 8), elle est fortement active dans les aiguilles primaires lorsqu'elles cessent de s'allonger et atteignent leur maturité. CAT 2 semble donc associée au développement du processus photosynthétique.

Les cotylédons présentent également une importante activité de CAT 2 au stade 8, alors qu'au stade précédent, aucune activité de cette isoforme n'y était observée. L'apparition d'une nouvelle activité de CAT 2 dans les cotylédons peut résulter de la photosynthèse également assurée par ces tissus. Mais, la croissance du plant après l'élongation de l'hypocotyle s'accompagne aussi de la sénescence des cotylédons. Acevedo et Scandalios (1996) suggèrent que l'augmentation de l'activité catalasique dans les soies de maïs pollinisé, est l'expression d'une augmentation de la respiration pendant la sénescence accélérée. Cependant, Del Rio *et al.* (1998) ont montré la disparition quasi totale de la catalase au cours de la sénescence de la feuille de pois. Nos résultats sont donc en accord avec l'hypothèse d'une augmentation de l'activité catalasique liée à la sénescence accélérée mais nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'une photosynthèse encore active dans les cotylédons.

Une activité de CAT 1 est détectée à la fois dans la radicule et l'hypocotyle à tous les stades étudiés, en particulier après épuisement des réserves initialement présentes dans la graine. Acevedo et Scandalios (1991) ont également extrait une isoforme de la catalase nommée CAT 3, dans la tige de maïs. Après histolocalisation de l'activité catalasique dans le système vasculaire, les auteurs proposent l'implication de CAT3 dans le processus de lignification.

Nous avons également mis en évidence une activité catalasique dans la tige et localisé *in situ* l'activité catalasique dans les tissus conducteurs. L'identification de CAT 1 et CAT 2 dans la tige à un stade où les réserves lipidiques sont épuisées suggère que ces 2 iso-enzymes sont impliquées dans le processus de lignification analogue à celui proposé pour la CAT 3 de maïs.

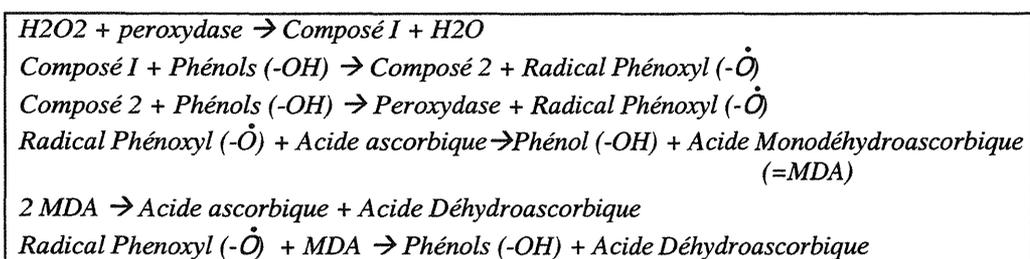
**En résumé, au 2 processus dans lesquels la catalase est fortement impliquée, à savoir, la  $\beta$ -oxydation et la photorespiration, s'ajouterait un rôle dans la lignification (Acevedo & Scandalios, 1991). CAT 1 et CAT 2 assureraient la détoxification des glyoxysomes après hydrolyse des lipides de réserve. Puis, la fonction des deux isoformes serait modifiée : CAT 1 et CAT 2 seraient impliquées dans le processus de lignification et CAT 2 dans la photorespiration. CAT 2 pourrait également intervenir dans le processus de sénescence des cotylédons. L'isolement de ces isoformes et leur immunolocalisation pourrait, de ce point de vue, être intéressante.**

Le test histocytologique que nous avons utilisé a permis de mettre en évidence l'activité catalasique sur des coupes longitudinales d'embryons et d'apex de plantules de pin. Néanmoins, ce test n'est pas spécifique et il peut également révéler des peroxydases. C'est pourquoi, les observations sont complétées par une analyse de l'activité catalasique.

Ainsi, le test révèle une activité catalasique dans tous les tissus de l'embryon, plus faible dans le procambium et le SAM. Pendant la croissance des tissus préformés, l'activité régresse progressivement dans les tissus où l'hydrolyse des triglycérides est achevée.

Elle reste intense dans le système vasculaire, le SAM et les ébauches foliaires en formation et est indépendante du processus d'hydrolyse des triglycérides dans ces tissus. Comme nous l'avons vu plus haut, CAT 1 et CAT 2 pourraient toutes 2 être à l'origine de l'activité catalasique détectée dans les tissus conducteurs. En revanche, pour ce qui concerne l'apex caulinaire, la mesure de l'activité et la recherche d'isoforme n'ayant pas été réalisée, l'état actuel de nos travaux ne permet pas de connaître l'origine exacte de l'activité visualisée. En effet, la forte activité observée dans le SAM pourrait résulter, notamment de l'activité des peroxydases impliquées dans la dégradation de l'auxine localisée à l'apex (Richter, 1993).

Le test histocytologique réalisé révèle également l'absence d'activité catalasique dans des zones où l'hydrolyse des lipides est en cours comme, par exemple, dans les cellules du parenchyme médullaire sub-apical. Or, dans un même temps, ces cellules se chargent en tanins. L'absence de révélation de l'activité catalasique dans cette zone pourrait être attribuée à la chélation des ions métalliques utilisés pour la coloration par les tanins (Asfari, Burgard & Vicens, 1993). De plus, des composés polyphénoliques peuvent contribuer à la dégradation du peroxyde d'oxygène grâce au système peroxydase/polyphénols/ascorbate (Takahama & Oniki, 1997) rappelés ci-dessous :



*D'après Takahama et Oniki (1997)*

Il serait donc intéressant d'identifier les tanins localisés à l'apex afin de vérifier s'ils sont impliqués dans un tel processus. Quoiqu'il en soit, l'absence de détection de l'activité

peroxydatique dans les apex de *P. pinaster* alors que les triglycérides ne sont pas encore totalement hydrolysés dans cette zone pourrait résulter d'un artéfact.

Les limites du test histocytologique rendent la localisation de l'activité catalasique délicate et l'immunolocalisation de CAT1 et de CAT2 pourrait être à nouveau intéressante en particulier pour connaître l'implication de ces isoformes dans le fonctionnement de l'apex caulinaire. Grâce à la mesure de l'activité catalasique et à l'identification d'isoformes de la catalase dans différents tissus, notre étude permet d'illustrer l'implication de la catalase notamment dans la mobilisation des réserves lipidiques pendant la croissance post-germinative.

#### *III.3.1.2.4 - Synthèse: Dynamique de la mobilisation et de l'accumulation des réserves pendant le développement de la plantule (figure 18)*

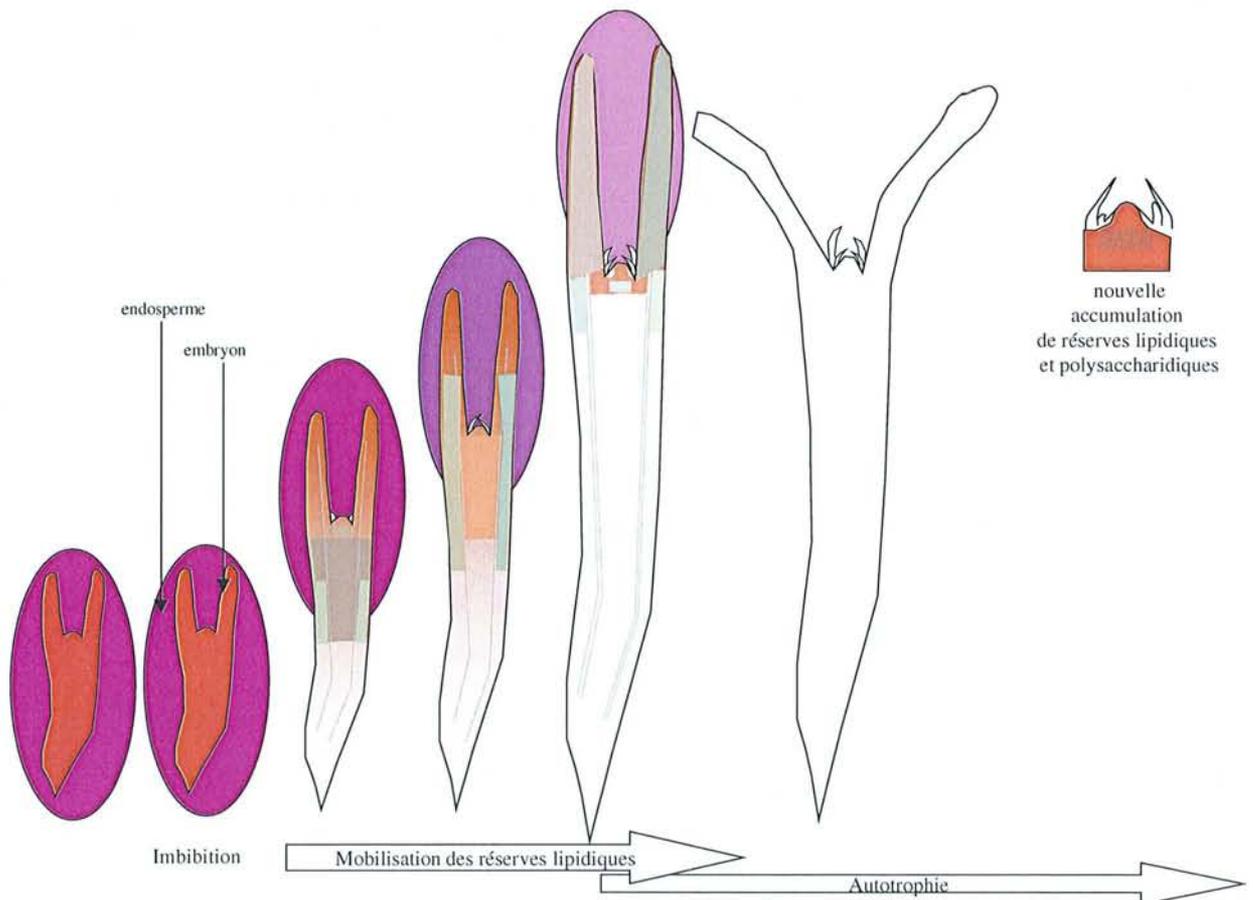


figure 18: Evolution parallèle du contenu en lipides (rouge) et en amidon (vert) pendant la germination et la post-germination

◆ Pendant l'imbibition, le saccharose initialement contenu dans l'endosperme est transféré vers l'embryon et stocké sous forme d'amidon en faible quantité. Les grains d'aleurone contenus dans le SAM sont dégradés.

◆ Puis, lors de l'émergence de la racine, plusieurs événements simultanés ont lieu :

- l'embryon hydrolyse ses réserves protéiques et ses réserves lipidiques dans les zones de croissance (la racine et les ébauches foliaires néoformées). Ce qui induit une augmentation de l'activité catalasique.
- les produits de l'hydrolyse des réserves de l'endosperme sont exportés vers l'embryon. Au moins une partie de ces hydrolysats est stockée sous forme d'amidon dans la racine et dans le parenchyme sous-jacent au SAM.
- Des tanins sont produits le long du système vasculaire et dans les cellules épidermiques en contact avec l'endosperme. Ces deux zones sont potentiellement impliquées dans le transfert des flux : la première dans les flux internes de l'embryon et la seconde, dans les flux externes provenant de l'endosperme.

◆ Au cours de l'élongation de l'hypocotyle :

- l'endosperme est repoussé à l'extrémité de la plantule, et il continue à exporter les produits de l'hydrolyse des triglycérides et des protéines de réserve,
- les réserves protéiques de l'embryon sont totalement hydrolysées,
- les réserves lipidiques stockées dans l'hypocotyle sont hydrolysées et fournissent l'énergie nécessaire à l'activité des nouveaux sites de croissance,
- 2 isoformes de la catalase (CAT1 et 2) sont actives sur les sites d'hydrolyse des lipides,
- l'amidon synthétisé à partir du saccharose fourni par l'endosperme est stocké dans l'hypocotyle et dans les cotylédons
- l'amidon stocké dans la racine pendant son émergence est hydrolysé.

Quant au SAM :

- il produit de nouvelles ébauches
- son volume diminue,
- les triglycérides sont hydrolysés dans l'anneau initial, puis dans le méristème médullaire indiquant l'activation progressive de ces cellules

- l'activité catalasique est visualisée dans tous ses territoires et dans les ébauches foliaires,
  - le parenchyme médullaire sub-apical accumule une importante quantité d'amidon
- ◆ A la fin de l'élongation de l'hypocotyle, et lorsque les cotylédons sont déployés :
- le contact entre la plantule et l'endosperme cesse après hydrolyse totale de ses réserves
  - les triglycérides de la plantule et l'amidon stocké dans l'hypocotyle et dans les cotylédons est également hydrolysé,
  - les premières ébauches foliaires formées s'allongent pour former des aiguilles photosynthétiquement actives, et les premiers bourgeons latéraux se différencient.

Concernant le SAM :

- il présente une taille minimale,
- il hydrolyse ses dernières réserves lipidiques dans les cellules périphériques du méristème d'attente indiquant l'activation tardive de ces cellules,
- il serait le siège d'une activité catalasique dans tous ses territoires
- le parenchyme médullaire sous-jacent mobilise les réserves amylacées, tandis que des tanins sont formés dans certaines cellules.

◆ Lorsque l'élongation de l'épicotyle est avancée :

- de nombreuses euphylls ont été produites,
- le volume du SAM a augmenté et de nouvelles ébauches foliaires sont formées,
- des triglycérides et des grains d'amidon s'accumulent dans le SAM, comme pendant l'élongation de l'hypocotyle,
- des tanins s'accumulent dans certaines cellules du parenchyme médullaire,
- l'activité catalasique est détectée. Elle résulterait de l'implication de cette enzyme dans le processus de lignification (CAT 1 et 2), de photorespiration (CAT 2), et de sénescence accélérée (CAT 2).

### **III.3.2 - Croissance des embryons somatiques et des embryons zygotiques excisés**

### III.3.2.1 – Morphologie comparée

Bien que de taille réduite, les embryons somatiques déshydratés du clone T325 présentent une morphologie proche des embryons zygotiques matures. Mais, les cotylédons y sont moins nombreux et le SAM présente une forme variable, plate ou légèrement bombée. Ce type de variabilité morphologique a aussi été décrit chez *Picea abies*. Elle peut dépendre des lignées embryogènes et du stade de maturation (Svobodová *et al.*, 1999).

Quoiqu'il en soit, la formation des premières ébauches foliaires et l'augmentation de la taille du méristème est observée 11 jours après le début de l'hydratation des embryons somatiques. La production d'ébauches foliaires dans les embryons somatiques indique un fonctionnement du SAM proche de celui des embryons zygotiques excisés ou non. Par contre, à l'inverse des embryons zygotiques, les cellules du SAM des embryons somatiques se multiplient pour accroître le volume de l'apex.

En outre, ces phénomènes ne sont pas forcément liés à la conversion en plantule. En effet, 20% des embryons du clone utilisé peuvent être convertis alors que notre étude porte sur un faible nombre d'échantillons. Il est donc possible que les embryons convertibles aient pu échapper à nos observations.

### III.3.2.2 - Etude cytophysiologique: le contenu en réserve

#### III.3.2.2.1- Les embryons déshydratés

La présence de triglycérides est plus faible dans les embryons somatiques matures que dans les embryons zygotiques, ce qui est confirmée par les dosages de Feirer, Conkey et Verhagen (1989) sur des embryons de *P. taeda*. De même, aucun grain d'aleurone n'est observé dans les embryons somatiques à l'inverse des embryons zygotiques qui en sont abondamment chargés. En revanche, de nombreux grains d'amidon sont détectés dans les embryons somatiques alors qu'il n'y en a pas dans les embryons zygotiques à ce stade.

Concernant l'absence de grain d'aleurone, sans dosage de protéines de réserves (dans la mesure où cette manipulation est possible), il est difficile de confirmer l'absence effective de protéines de réserves dans les embryons somatiques. En outre, les techniques histologiques que nous avons utilisées présentent des limites soulignées par Yeung (1999). L'inclusion dans la paraffine n'apporte pas une résolution maximale et certains détails

peuvent échapper à notre attention tels que les grains d'aleurone en formation. L'absence de globules protéiques identiques à ceux identifiés dans les embryons zygotiques reste, cependant, avérée. **Ainsi, le contenu en réserves lipidiques, polysaccharidiques et protéiques des embryons somatiques diffère de celui des embryons zygotiques matures.**

◆ Les différences entre les embryons somatiques et les embryons zygotiques deshydratés peuvent être attribuées à une maturation incomplète.

En effet, les embryons somatiques ne semblent pas avoir suivi l'ensemble du processus d'accumulation des réserves. En effet, une importante accumulation transitoire d'amidon a lieu pendant la maturation des embryons zygotiques de graines riches en triglycérides telles que les graines de soja, de moutarde, et de colza (Adams, Rinne & Fjerstad, 1980 ; Fischer *et al.*, 1988 ; Da Silva *et al.*, 1997). Ce processus semble faire partie intégrante du mécanisme de mise en réserve des triglycérides lors de la formation des embryons zygotiques, mais il pourrait également permettre à l'embryon en formation d'assurer la fonction de puits pour des finalités autres que la synthèse des lipides (Da Silva *et al.*, 1997). De plus, l'accumulation des réserves lipidiques est précédée par la formation d'amidon dans les embryons somatiques d'épicéa (Svobodová *et al.*, 1999). L'abondance d'amidon et la quantité de triglycérides réduite dans les embryons somatiques deshydratés de *P. pinaster* pourraient indiquer un arrêt de l'accumulation des triglycérides alors que l'amidon accumulé n'est pas encore mobilisé.

La formation des réserves protéiques est plus précoce que l'accumulation des réserves lipidiques pendant la formation de l'embryon zygotique dans la graine de pin (Johnson *et al.*, 1987). Ainsi, l'absence de détection des grains d'aleurone dans les embryons somatiques peut également résulter d'une maturation incomplète. Cette hypothèse est également appuyée par l'augmentation du volume du SAM pendant la croissance. En effet, il est admis que la formation du dôme méristématique a lieu pendant la maturation (Svobodová *et al.*, 1999).

Une maturation incomplète pourrait alors résulter d'un fonctionnement variable du métabolisme des embryons somatiques ou encore de conditions de maturation non optimales.

◆ Le milieu de maturation joue un rôle essentiel dans l'établissement des conditions favorable à une bonne maturation des embryons. La composition de ce milieu peut avoir

un effet sur l'accumulation des réserves dans l'embryon somatique et la morphologie de l'apex. Le milieu de maturation utilisé pour la maturation des embryons somatiques que nous avons étudié contient notamment, de l'ABA, du saccharose pour unique source d'hydrate de carbone, et de la glutamine (Ramarosandratana *et al.*, 2001).

◇ Parmi les composés du milieu de maturation, l'acide abscissique (ABA) et le polyéthylène glycol (PEG) peuvent exercer une influence sur ce processus.

En effet, outre l'effet de l'acide abscissique sur la germination précoce, l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et l'induction de la dormance, ce régulateur de croissance améliore la synthèse des protéines de stockage et inhibe la mobilisation des réserves dans la graine (Bewley & Black, 1994 ; Carrier *et al.*, 1999). Son rôle dans l'accumulation des réserves protéiques est confirmé dans les embryons somatiques en développement chez le mélèze (Gutmann *et al.*, 1996). La synthèse d'acides gras et de lipides dans l'embryon zygotique en développement serait également liée à son augmentation (Carrier *et al.*, 1999). En outre l'acide abscissique est naturellement produit dans les embryons zygotiques pendant leur développement (Kapik *et al.*, 1995 ; Carrier *et al.*, 1999). Ce composé présent dans le milieu de maturation des embryons somatiques étudiés, ne peut être à l'origine des différences observées dans le contenu en réserve entre les embryons somatiques et zygotiques étudiés.

En revanche, le polyéthylène glycol (PEG) associé à l'acide abscissique est également un promoteur de l'accumulation de triglycérides et de protéines de réserves et en particulier dans les embryons somatiques de *Picea glauca* (Attree, Pomeroy et Fowke, 1992; 1994 ; Misra *et al.*, 1993). Enfin, la formation du dôme méristématique est accélérée par l'ajout de PEG dans le milieu de maturation (Svobodová *et al.*, 1999). L'absence de ce composé dans le milieu de maturation pourrait être à l'origine des différences que nous avons observées entre les embryons zygotiques et les embryons somatiques.

◇ Outre l'action de l'ABA et du PEG, la concentration en composé gélifiant (Lelu *et al.*, 1999) et la composition du milieu en éléments nutritifs peuvent exercer une influence sur le processus de maturation. Parmi ces éléments, les sources de carbone et azote organique sont importants :

– La quantité de sucre utilisé dans le milieu de maturation peut avoir un effet sur le développement de l'embryon (Bercetche & Pâques, 1995, Ramarosandratana *et al.*, 1999). Les sucres les plus fréquemment utilisés sont le saccharose ou le maltose (Anandarajah &

McKersie, 1990). Ces 2 composés ont été utilisés pour obtenir des embryons somatiques matures de *P. pinaster* (Bercetche & Pâques, 1995 ; Ramarosandratana *et al.*, 1999). Mais, la nature du sucre, et en particulier le maltose, favorise la maturation de certaines lignées cellulaires (Salajova, Salaj & Kormutak, 1999). Le choix du sucre et sa concentration dans le milieu de maturation de *P. pinaster* a ainsi été fixé (Ramarosandratana *et al.*, 1999): il s'agit du maltose pour certaines lignées, et indifféremment du maltose ou du saccharose pour la lignée T325 que nous avons utilisé. Cependant, ces même auteurs soulignent que cette exigence dépend de la concentration en polyéthylène glycol (PEG) dans le milieu. Ces embryons somatiques réagissent donc différemment lorsque d'autres composants sont ajoutés au milieu de maturation. Dans notre étude, le saccharose forme l'unique source en hydrate de carbone, et pourrait comme le PEG être à l'origine des différences entre les embryons zygotiques et les embryons somatiques matures que nous avons étudié.

- Quant à la source d'azote organique (glutamine, proline, arginine ou alanine), elle peut jouer aussi un rôle sur la croissance pondérale des embryons, et de l'accumulation des protéines de réserve (Lai, Senaratna & McKersie, 1992; Lai & McKersie, 1993). Dans notre étude, la présence de protéines de réserves riches en arginine dans la graine, nous suggère d'utiliser plutôt l'arginine au lieu de la glutamine.

En conclusion, l'optimisation du milieu de maturation est très complexe et, comme nous l'avons vu plus haut, peut varier en fonction des lignées embryogènes. Cette optimisation devrait permettre une augmentation de la mise en réserve dans les embryons somatiques de *P. pinaster*, mais elle pourrait aussi améliorer le taux de conversion des embryons en plants. En effet, l'augmentation de la quantité de réserves protéiques dans les embryons somatiques matures induit, chez *Medicago sativa*, une amélioration du taux de conversion en plants (Lai & McKersie, 1993). Cependant, l'augmentation du contenu en réserve n'a pas toujours cet effet. En effet, une augmentation du contenu en triglycérides obtenue en appliquant divers traitements sur les embryons somatiques de l'arachide ne fournit qu'un nombre faible de plantules aptes à l'enracinement (Mhaske, Chengalrayan & Hazra, 1998). Ainsi, même si l'on obtient des embryons somatiques riches en réserves, il faut être prudent quant à l'utilisation de ce paramètre en tant qu'indicateur de qualité des embryons somatiques. De plus, les éléments inducteurs de l'accumulation des réserves tel que l'acide abscissique peuvent être antagoniste de la germination. D'autre part, les embryons somatiques et zygotiques peuvent présenter une morphologie et un contenu en réserve

identique mais des différences du métabolisme peuvent avoir lieu sans pour autant être visible au travers de notre étude.

### *III.3.2.2.2 - Les embryons en croissance*

Au cours de la croissance, les embryons somatiques matures et les embryons zygotiques excisés sont cultivés sur un milieu de germination contenant : divers éléments minéraux, des vitamines, du myo-inositol et, 2% de saccharose (p/v), pour unique source de carbone (Margara, 1977). Les embryons mobilisent alors, rapidement leur réserves.

Onze jours après le début de l'hydratation, le parenchyme cortical des embryons somatiques ne contient plus de triglycérides. Cette disparition est également observée dans les embryons zygotiques en croissance mais à un stade de croissance plus avancé. Il semble donc, que la mobilisation des lipides est plus précoce pour les embryons somatiques. Ce phénomène pourrait être dû à la plus faible quantité de triglycérides initialement stockée dans les embryons qui serait donc plus rapidement hydrolysée.

La quantité de triglycérides diminue également pendant la germination des embryons somatiques (ES) et les embryons zygotiques excisés (EZx) de *Picea glauca* (Carrier *et al.*, 1997). L'acide linoléique est un acide gras naturellement libéré dans les graines en germination de cette espèce (Carrier *et al.* 1999). Il n'est formé dans les ES et des EZx qu'en présence de saccharose dans le milieu de germination (Carrier *et al.*, 1997). Des dosages de l'acide linoléique dans les embryons somatiques et zygotiques excisés de *P. pinaster* pourraient donner le même type résultat. Ce qui soulignerait l'importance du saccharose dans le milieu de germination.

Dans notre étude, nous avons pu également observer l'absence d'amidon dans les embryons somatiques et zygotiques excisés en croissance alors que les embryons zygotiques cultivés au contact de l'endosperme en contiennent abondamment pendant cette période. Les dosages biochimiques effectués sur des embryons zygotiques excisés de *P. taeda* confirment ces observations (Stone & Gifford, 1999). Un second point commun entre les embryons somatiques et zygotiques excisés, est qu'ils présentent tous les 2, une croissance plus faible que celle des embryons zygotiques associés à l'endosperme pendant la germination et la post-germination (hypocotyle de taille réduite). L'accumulation d'amidon semble donc avoir une origine commune pour les 2 types de matériel, et un rôle important dans le développement des embryons. Comme nous l'avons précisé plus haut,

l'accumulation transitoire d'amidon est aussi observée pendant la maturation des graines riches en triglycérides (Murphy & Hammer, 1994 ; Da Silva, 1997). Elle pourrait donc exercer un rôle important dans la maturation comme dans la croissance des embryons somatiques.

La dégradation de l'amidon peut être réalisée par phosphorolyse ou par hydrolyse produisant notamment du maltose. Dans les graines en germination, il semble que ce processus d'hydrolyse soit intense (Richter, 1992). Dans les graines de pin maritime, la dégradation de l'amidon synthétisé pendant la croissance post-germinative pourrait aussi produire du maltose. Ce sucre serait alors directement accessible sur les sites de croissance. Il serait donc, intéressant d'ajouter du maltose au milieu de culture contenant déjà du saccharose afin d'améliorer les conditions de germination des embryons somatiques.

Le milieu de germination peut également être optimisé par:

- un apport en arginine. En effet, l'endosperme de *P. taeda* fournit de l'arginine à l'embryon zygotique en même temps que le pool d'acides aminés de l'embryon augmente. Ce pool ne varie pas dans les embryons zygotiques excisés (King & Gifford, 1997).

- un apport de régulateur de croissance. Il a été montré que la gibbéréline et l'acide abscissique étaient impliquées dans l'hydrolyse des réserves protéiques et lipidiques dans les graines de céréales (Bethke *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'acide abscissique, fortement accumulé dans les graines de *Picea glauca* en formation induit la synthèse de l'acide linoléique (Zou *et al.*, 1995 ; Carrier *et al.*, 1999). En outre, ce composé est formé également pendant la croissance des embryons (Carrier, 1997). Une telle accumulation et fonction de l'acide abscissique peut donc être envisagée sur les embryons de *P. pinaster*. Ayant déjà souligné le rôle de l'endosperme dans la croissance post-germinative du pin (III.1.2.2.1), l'action régulatrice évoquée pourraient également être exercée par des régulateurs de croissance. Des test effectués sur des embryons zygotiques excisés en présence d'acide abscissique permettrait, au moins en partie, de vérifier le rôle de ce régulateur.

◇ L'augmentation de la surface de contact entre le milieu de culture et l'embryon constitue le dernier paramètre sur lequel il serait possible de jouer pour améliorer la croissance post-germinative.

En effet, celle-ci est importante chez les embryons zygotiques contenus dans la graine. L'endosperme a alors un effet notable sur l'accumulation d'amidon dans la plantule en

	Conditions actuelles de germination des embryon somatiques et zygotiques excisés	Connaissances acquises sur la maturation	Connaissances acquises sur la germination	Proposition d'amélioration des conditions de germination
Source azotée	Azote minéral		Transfert d'acides aminés depuis l'endosperme vers l'embryon Arginine : principal acide aminé transporté (King & Gifford, 1997)	Apport en azote organique : Arginine
Source en hydrate de carbone	Saccharose	Amidon accumulé transitoirement , exerce un rôle important dans le développement de l'embryon (Da Silva <i>et al.</i> , 1997)  Maltose contribue à la maturation de certaines lignées cellulaires pendant l'embryogénèse somatique (Salajova, Salaj & Kormutak, 1999; Ramarosandratana <i>et al.</i> , 1999)	Amidon synthétisé puis utilisé dans les tissus en croissance Amidon : rôle important dans la croissance (Murphy & Hammer, 1994)  Maltose peut résulter de la dégradation de l'amidon  Saccharose transféré depuis l'endosperme vers l'embryon (Stone & Gifford, 1999) Saccharose impliqué dans la régulation de la mobilisation des réserves et dans la production d'acides gras tel que l'acide linoléique (Carrier, 1997)	Apport en hydrate de carbone : Saccharose + Maltose
Régulateur de croissance		Acide Abscissique : impliqué dans la synthèse d'acides gras tels que l'acide linoléique (Zou <i>et al.</i> , 1995 ; Carrier <i>et al.</i> , 1999)	Acide linoléique formé pendant la germination (Carrier, 1997) : <i>Y a t'il régulation de la formation de cet acide gras par l'acide abscissique pendant la croissance post-germinative comme cela a été observé dans la graine en formation ?</i>  La gibbéréline et l'acide abscissique sont impliquées dans la régulation de l'hydrolyse des réserves de céréales en germination (Bethke <i>et al.</i> , 1998)	Essai avec régulateurs de croissance de nature et de concentration variable
Surface de contact avec la source	Surface de l'embryon posé sur le milieu gélifié		Embryon entouré de la source de réserve que constitue l'endosperme	Brumisation du milieu nutritif

Tableau 3 : Paramètres susceptibles d'affecter le développement ou la croissance des embryons en conditions *in vitro* et propositions d'amélioration du milieu de germination

croissance, notamment lors du glissement de l'endosperme le long de la plantule. Les sites d'accumulation de ces réserves sont alors liés à la position de l'endosperme.

En outre, King et Gifford (1997) ont suggéré que le transfert de composés de l'endosperme vers l'embryon est proportionnel à la surface de contact entre ces 2 territoires. Ainsi, chez *Picea glauca*, seulement 25% du saccharose contenu dans le milieu gélosé utilisé pour la germination des embryons zygotiques excisés est consommé (Carrier *et al.*, 1997).

**Ces éléments nous permettent de proposer différentes techniques pour améliorer les conditions de germination (tableau 3). Elles consistent en :**

- **l'apport d'extraits d'endospermes récoltés sur des germinations à différents stades sur les embryons somatiques au fur et à mesure de leur croissance**

**ou**

- **l'apport de solution nutritive contenant des composés similaires à ceux identifiés dans l'endosperme au cours de la croissance post-germinative.**

**enfin**

- **une brumisation régulière de solution nutritive sur des embryons somatiques afin d'augmenter la surface d'absorption de ces embryons.**

### **III.3.3 – Schéma récapitulatif des échanges métaboliques pendant la germination et la croissance post-germinative (figure 19)**

A partir des résultats que nous avons obtenus concernant la répartition des réserves dans les embryons zygotiques et somatiques, et des informations apportées par d'autres auteurs (King & Gifford, 1997 ; Stone & Gifford, 1997 ; 1999 ; Carrier *et al.*, 1997 ; 1999...), il est possible de proposer un modèle synthétique du fonctionnement métabolique intervenant dans l'endosperme et dans la plantule pendant la germination et la croissance post-germinative. Ce modèle est présenté figure 19.

L'endosperme décharge progressivement ses réserves principalement sous forme d'arginine et de saccharose dans la plantule. Les cotylédons puis toute la périphérie de la plantule en contact avec l'endosperme forment la zone de transfert des métabolites. Le saccharose importé dans l'embryon induit la synthèse d'amidon sur les nouveaux sites de croissance et l'accumulation d'acide linoléinique. Les triglycérides initialement présents dans l'embryon sont hydrolysés fournissant au moins en partie l'énergie nécessaire sur les nouveaux sites de croissance. Après épuisement de ces réserves, l'amidon assurerait alors

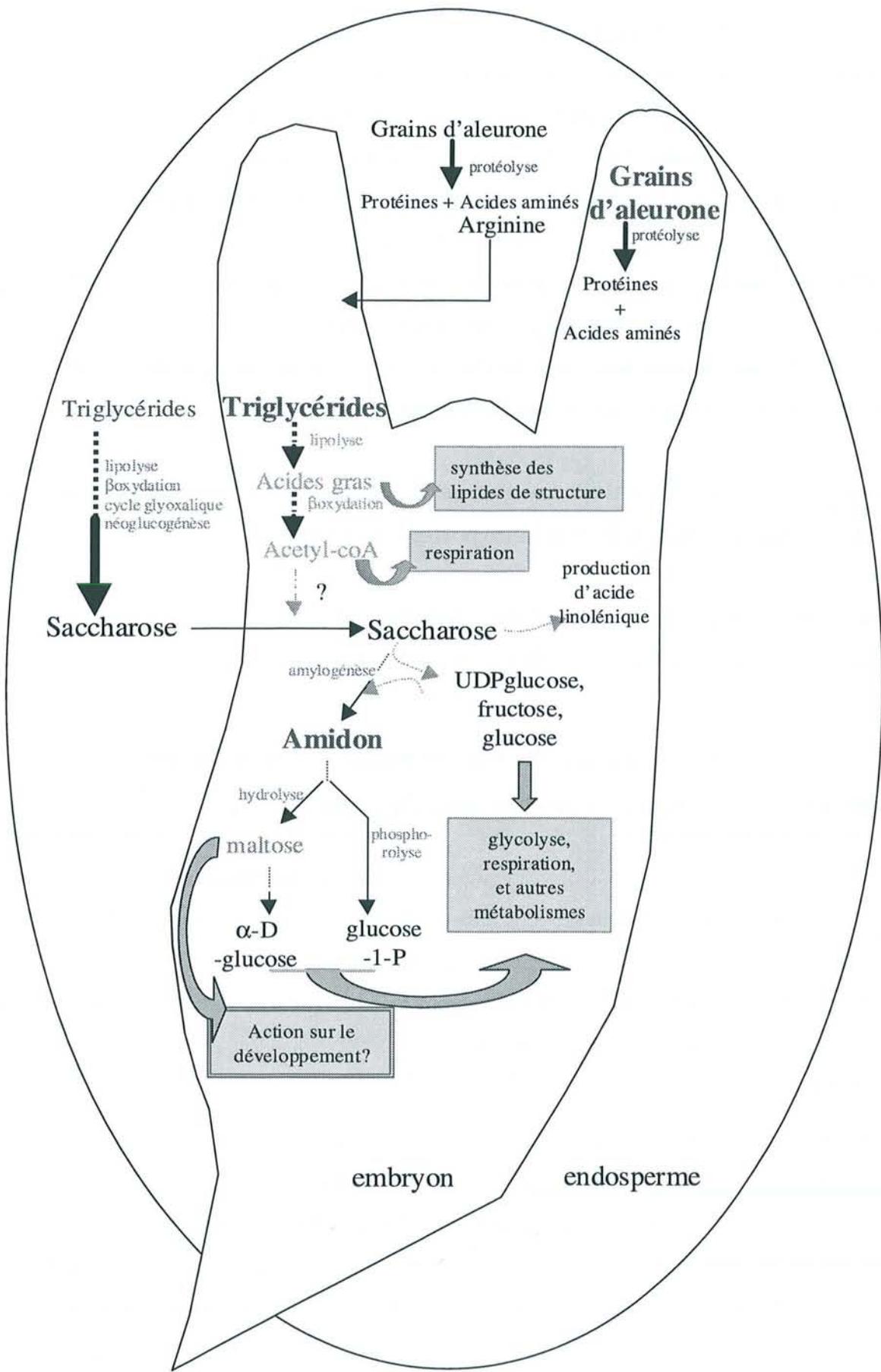


figure 19 : Schéma récapitulatif des échanges pendant la germination et la croissance post-germinative

ce rôle. La dégradation de l'amidon s'effectuerait essentiellement par hydrolyse qui après l'action de l'amylase, fournissant du maltose puis du glucose après action de la maltase. Le maltose produit pourrait ensuite, exercer un rôle important dans la croissance de l'embryon.

Pour confirmer ce modèle, on pourrait:

- réaliser des tests de croissance d'embryons excisés en présence de maltose (en application locale ou généralisée sur l'embryon)
- doser du maltose sur les embryons excisés et non excisés
- étudier le fonctionnement de la maltase (y a t'il inhibition de cette enzyme dans les embryons en croissance ?)
- doser l'acide linoléique dans les embryons excisés cultivés en présence de saccharose exogène (Carrier *et al.*, 1997)

L'utilisation des réserves initialement présentes dans la graine et la néosynthèse de l'amidon ont lieu sur les sites de croissance qui évoluent au cours de la croissance post-germinative. L'apex apparaît, en revanche, comme une zone de stockage stable même si l'importance de ce stockage varie en fonction des stades de développement. Ainsi, le parenchyme médullaire sous-jacent au SAM accumule régulièrement de l'amidon, et l'ensemble des territoires apicaux sauf les ébauches foliaires et le méristème latéral, forme un réservoir de triglycérides.

Le fonctionnement du SAM présente 2 phases pendant la 1<sup>ère</sup> saison de végétation. En effet, lors de la dépendance vis à vis des réserves de la graine, le SAM développe des ébauches foliaires probablement préformées provoquant une diminution de son volume. Puis, lorsque les réserves sont épuisées et que la plante est autotrophe : le SAM s'élargit, il produit des ébauches foliaires et stocke de nouvelles réserves.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

## **CHAPITRE IV :**

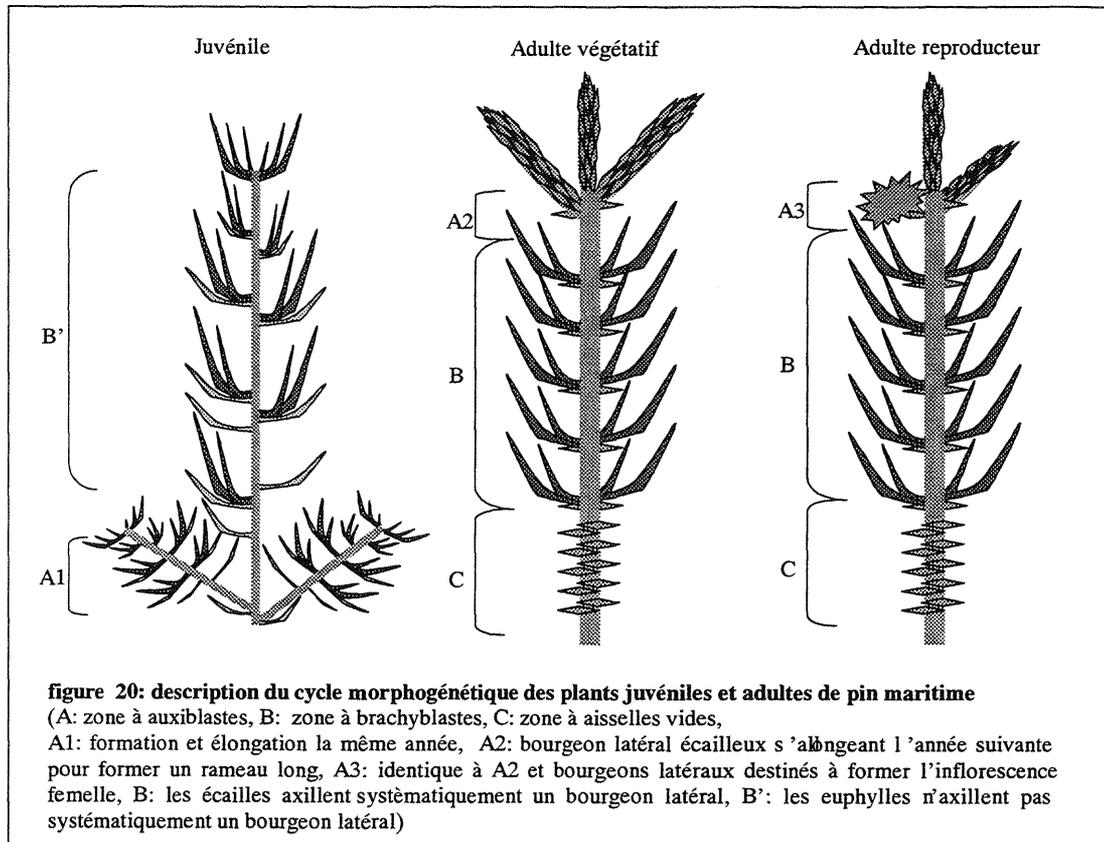
**Des plants juvéniles, aux adultes végétatifs et  
reproducteurs :**

**Evolution saisonnière de l'extrémité apicale des bourgeons**

## IV.1- INTRODUCTION

L'activité du méristème apical conduisant à l'élaboration des différents organes de la plante est saisonnière. Les euphylls fabriquées pendant la saison de végétation peuvent présenter une aisselle vide, ou bien axiller des brachyblastes (rameaux à croissance définie différenciant plusieurs écailles puis 2 aiguilles chlorophylliennes appelées pseudophylles) ou des auxiblastes (rameau à croissance indéfinie). La succession de ces différents complexes foliaires le long de l'axe de la tige constitue un cycle morphogénétique (Debazac, 1966 ; Curtis & Popham, 1972).

Ce cycle morphogénétique varie au cours de la vie des plants de pin (figure 20). Chez *P. pinaster*, les plants en première saison de végétation portent des auxiblastes à la base du cycle morphogénétique, alors que les brachyblastes sont distribués sporadiquement et localisés plus haut le long de l'axe. Les plants de 3 ans et plus, présentent, à la base du cycle, une succession d'euphylls à aisselle vide, puis d'euphylls axillant toutes des brachyblastes et enfin un pseudoverticille d'euphylls axillant des auxiblastes ou bien des cônes femelles (Kremer, 1990).



Les plants juvéniles se distinguent également des plants adultes par la morphologie des euphylls sous forme d'aiguilles chlorophylliennes chez les plants juvéniles et réduites à des écailles chez les plants adultes.

Les rapports entre la croissance et l'organogenèse évoluent aussi au cours de la vie des plants (Kremer, 1990):

- chez les plants juvéniles : les ébauches foliaires peuvent s'allonger aussitôt après leur formation (= croissance libre), ou bien après un temps de latence (croissance discontinue) ou encore après le repos hivernal (= croissance prédéterminée)
- chez les plants adultes : la croissance est principalement prédéterminée.

Lorsque cette croissance est prédéterminée ou discontinue, les organes latéraux néoformés (euphylls + bourgeons axillaires) sont accumulés dans un bourgeon terminal. Les nœuds et les entre-nœuds ainsi formés ne s'allongeront que plus tard et donneront naissance à la tige. Ainsi, les différences de croissance qui peuvent être utilisées pour marquer les phases de développement, sont déterminées pour une part importante par l'activité du SAM. Il est donc important de voir si, au niveau du méristème lui-même, on peut aussi observer des variations liées à la juvénilité ou à la maturité du matériel.

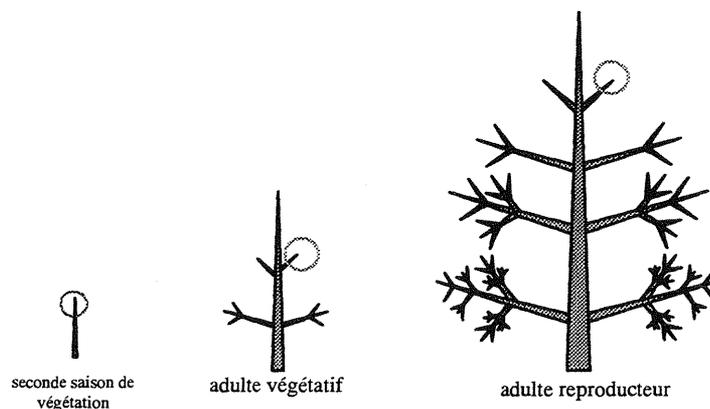
Les travaux de Monteuuis (1987), par exemple, ont montré que des fluctuations de taille du SAM peuvent être associées au stade de développement chez le Séquoia géant. En outre, la taille du SAM mesurée sur des plants de pin maritime de 1 an peut être utilisée avec d'autres paramètres tels que la longueur des entre-nœuds pour estimer la hauteur de ces plants à l'âge de 5 ans (Kremer et Xu, 1989).

Par ailleurs, l'aspect externe des bourgeons de pins adultes, le volume du méristème apical et le contenu en réserve de l'apex changent au cours des saisons (David, 1966 ; Owston, 1969 ; Curtis et Popham, 1972 ; Cecich, 1980 ; Rodionov, 1988 ; Krasowski et Owens, 1990). Si l'on veut étudier les variations de fonctionnement au niveau de l'apex, il est donc indispensable de prendre en compte non seulement l'âge des plants, mais aussi la période de prélèvement.

Enfin, chez *Pinus strobus* et *P. resinosa*, la taille du bourgeon et du méristème varient en fonction de la distance qui sépare le bourgeon du sommet de l'arbre (Owston, 1969 ; Riding, 1976b). Il est donc nécessaire d'effectuer les prélèvements de bourgeons de pin maritime en tenant compte de cet "effet position" pour étudier, notamment, les variations morphométriques au sein de l'apex

Dans ce chapitre, et dans le prolongement de l'étude effectuée sur les semis, nous nous sommes donc intéressés à l'étude des apex chez des plants plus âgés. Nous avons choisi de travailler sur des bourgeons de plants juvéniles et de plants adultes dont les caractéristiques ont été rappelées plus haut. En outre, 2 types de matériels adultes ont été définis: les végétatifs prélevés sur des plants de 3 ou 4 ans dont les axes latéraux ne se différencient pas ou rarement en cônes femelle, et les reproducteurs prélevés sur des plants de 20 ans qui portent des cônes femelles (figure 20).

Afin de tenir compte de "l'effet position", les extrémités apicales ont été prélevées au sommet de l'arbre sur l'axe A1 dans le cas des juvéniles et sur un axe A2 sur les plants adultes. De cette façon, les apex étudiés sur des plants juvéniles et sur les plants adultes ont tous été formés 1 à 2 années plus tôt (figure 21). La description des périodes de croissance par Kremer (1986) nous a alors permis de fixer des stades de prélèvement au débourrement, pendant et à la fin de l'élongation de la tige, à la fin de la période d'organogenèse et au repos.



**Figure 21: Site de prélèvement des bourgeons sur les plants à différents stades de développement**

A partir de ce matériel, nous avons noté la morphologie externe des bourgeons, puis nous avons effectué une description histocytologique de leur partie apicale. Cette description se rapporte alors à la rosette d'euphylls chlorophylliennes chez les juvéniles, et à l'extrémité du bourgeon écailleux chez les adultes (figures 22, 23). Puis, nous avons effectué une analyse de la morphométrie du SAM, de la taille des ébauches foliaires néoformées et adjacentes au SAM, et de la coloration du SAM par le test de Brachet qui met en évidence

l'ADN et l'ARN puisqu'il a été montré chez le séquoia, que la quantité d'ARN augmente dans les apex pendant la saison de végétation (Monteuuis, 1987). En outre, cette teneur peut être considérée comme indicatrice de l'activité du SAM. Ainsi, sur des coupes histologiques, la surface marquée par la présence d'ARN rapportée à la surface du dôme méristématique permet de faire une estimation semi-quantitative de ce composé. L'ensemble de ces résultats nous a alors permis de rechercher:

- les périodes d'activité des apex de chaque matériel
- et les paramètres qui permettraient de différencier ces 3 types de matériel.

Comme chez les semis, nous avons également entrepris l'étude des tanins et des réserves polysaccharidiques et lipidiques mais l'étude des réserves protéiques n'a pas été abordée car la coloration des protéines n'a pas révélé la présence de grain d'aleurone dans les zones observées. La recherche de tanins se justifie d'autant plus dans le cas des matériels juvéniles et adultes que de précédentes études ont montré des variations saisonnières dans la répartition des polyphénols au sein des apex de diverses espèces ligneuses (Owens et Molder, 1976 ; Hejnowicz, 1979 ; Bilková, Albrechtová et Opartná, 1999). En outre, l'étude des polysaccharides a rarement été entreprise sur les apex de pin adulte (Hejnowicz, 1979 ; Rodionov, 1988). L'utilisation d'un système d'analyse d'image a ainsi permis d'accéder à une analyse semi-quantitative des tanins et de l'amidon. Quant aux triglycérides, nous avons uniquement décrit leur répartition.

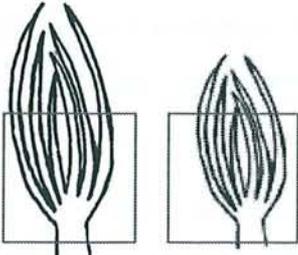
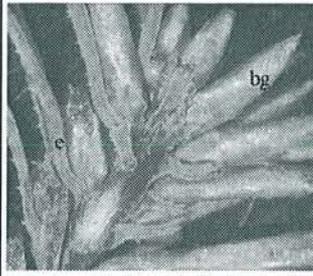
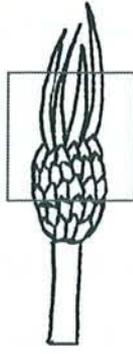
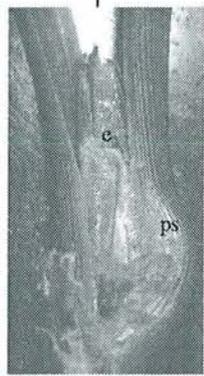
Ainsi, les périodes d'activité et la dynamique de répartition des réserves dans les extrémités apicales ont été étudiées en parallèle permettant de vérifier, comme chez les semis, les liens entre l'activité de l'apex et la gestion des réserves chez des arbres d'âges différents.

## **IV.2- RESULTATS**

### **IV.2.1 – Morphologie des extrémités apicales caulinaires**

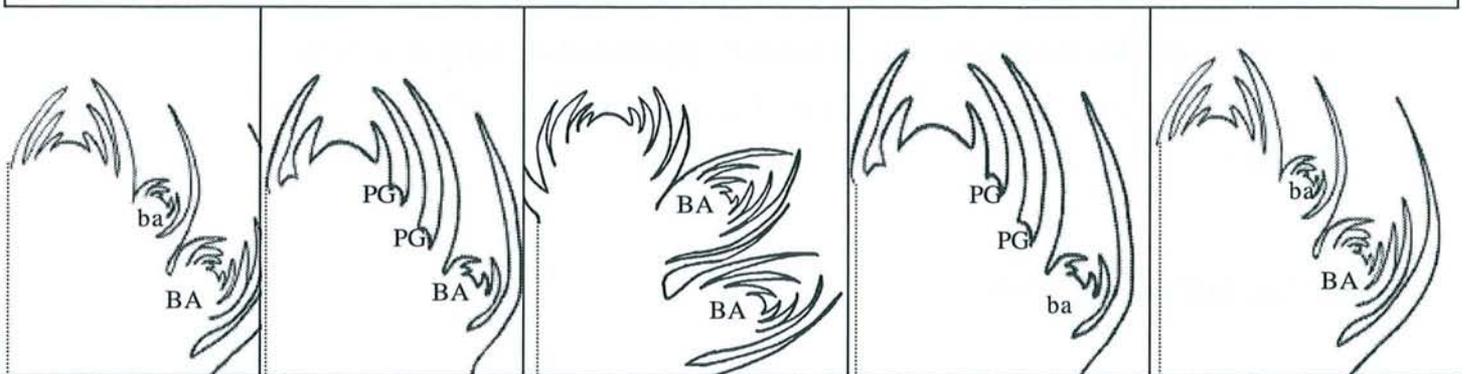
#### **IV.2.1.1 - Les plants juvéniles**

La morphologie externe des extrémités de la tige de plants juvéniles évolue au cours de l'année au niveau de la forme des euphylls situées à l'apex et de l'état de développement

MARS	AVRIL	JUILLET	NOVEMBRE	DECEMBRE
 <p>Aiguilles longues chlorophylliennes</p>	 <p>Aiguilles longues chlorophylliennes</p>	 <p>Aiguilles chlorophylliennes de différentes tailles</p>  <p>Nombreux bourgeons axillaires (bg) au niveau de l'apex. Les entre noeuds ne sont pas allongés, l'apex forme un bourgeon d'1 cm environ. (e:euphyll)</p>	 <p>Ecailles + Aiguilles chlorophylliennes</p>  <p>Reprise de croissance des brachyblastes après élongation des pseudophylles (ps)</p>	 <p>Ecailles + Aiguilles chlorophylliennes</p>

**figure 22a: Forme générale de l'extrémité apicale**

L'encadré rouge indique la zone observée pour la description de la coupe longitudinale



**figure 22b: Schéma de l'apex: Coupe longitudinale**

BA: bourgeon axillaire; ba : bourgeon axillaire moins développé; PG: primordium gemmaire; ES: écailles stériles

**figure 22: Evolution de la morphologie de l'apex de plant juvéniles au cours de la seconde saison de végétation**

des bourgeons axillaires situés dans cette même zone et observés en microscopie photonique (figure 22a).

◆ La forme des euphylls :

De mars à juillet, l'extrémité de la tige est entourée d'euphylls chlorophylliennes formant des aiguilles de taille relativement homogène de l'ordre de 3 cm. En juillet, une certaine hétérogénéité s'installe, et dans certains échantillons, la taille des euphylls situées à l'apex est réduite à environ 0,5 cm. Enfin, en octobre et en décembre, l'apex est composé d'euphylls écailleuses non chlorophylliennes à la base, surmontées d'aiguilles chlorophylliennes. Ce n'est donc qu'à la fin de la saison de végétation que l'extrémité de la tige acquiert l'aspect de bourgeon écailleux.

◆ L'état de développement des ébauches foliaires et des bourgeons axillaires à l'extrémité de la tige (figure 22b):

La dynamique de production des pièces latérales de l'apex peut être décrite de la façon suivante: Les ébauches foliaires néoformées peuvent axiller des primordia gemmaires qui initient ensuite, des pièces foliaires et forment des bourgeons latéraux en développement. Lorsqu'ils seront formés, ces bourgeons latéraux s'allongeront plus ou moins selon leur devenir (brachyblastes ou auxiblastes) et formeront les rameaux latéraux. Nous avons observé une variation saisonnière de ce phénomène chez les plants juvéniles:

◇ En mars, on observe plusieurs ébauches foliaires qui axillent des bourgeons axillaires ayant déjà produit plusieurs euphylls. Ces pièces foliaires sont séparées du SAM par des ébauches plus récentes.

◇ En avril, le SAM a produit de nouvelles ébauches foliaires qui axillent des primordia gemmaires,

◇ En juillet, l'étude morphologique montre une succession d'euphylls axillant des bourgeons latéraux au niveau de l'apex. Le bourgeon terminal ainsi formé présente plusieurs nœuds et entre-nœuds qui ne sont pas encore allongés et mesure ainsi 1 cm environ. Après observation au microscope photonique, on peut distinguer, comme en mars, des ébauches foliaires qui axillent des bourgeons latéraux et qui sont séparées du dôme apical par quelques ébauches foliaires plus récentes. Ces bourgeons axillaires sont cependant plus développés qu'en mars. Ces observations montrent que

l'émergence de primordia gemmaires n'a pas lieu à cette période, et qu'au contraire, les bourgeons latéraux initiés depuis le printemps ont produit plusieurs ébauches foliaires.

◇ En octobre/novembre, l'apex caulinaire est identique à celui observé en avril, indiquant une nouvelle formation d'ébauches foliaires et de primordia gemmaires.

◇ En décembre, le bourgeon terminal ne semble pas avoir évolué à l'échelle macroscopique. Cependant, lorsque le bourgeon terminal est disséqué, la zone à primordia gemmaires est remplacée par des bourgeons ayant produit plusieurs pièces foliaires .

En résumé, la taille des euphylls et leur propriété assimilatrice diminue au cours de la seconde saison de végétation. L'apex caulinaire devient tardivement écailleux et plusieurs bourgeons axillaires s'y développent. Parmi les périodes de prélèvement étudiées, avril et octobre coïncident avec la formation des primordia gemmaires correspondant aux futurs bourgeons latéraux.

En outre, nous avons noté, en examinant la morphologie externe des extrémités caulinaires récoltés en automne, que les brachyblastes qui portent déjà des pseudophylles allongées, reprennent leur croissance alors que généralement, ce type de ramification stoppe son développement après élongation des pseudophylles.

#### **IV.2.1.2- Les plants adultes végétatifs et reproducteurs**

##### ***IV.2.1.2.1 – Présence/ Absence des futurs auxiblastes***

A l'opposé des plants juvéniles, les bourgeons de plants adultes sont tous écailleux et peuvent porter à leur base des bourgeons latéraux écailleux également, qui s'allongeront l'année suivante pour former des auxiblastes. Ces bourgeons n'existent pas sur tous les prélèvements effectués sur les plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs. C'est pourquoi, nous avons noté la présence ou l'absence de bourgeons latéraux sur 250 échantillons examinés pour chaque âge considéré.

**L'importance respective de ces 2 catégories varie en fonction du type de matériel. Ainsi, sur les plants adultes végétatifs, 95% des bourgeons prélevés sont entourés de bourgeons latéraux alors que ce chiffre est de seulement 60% chez les plants adultes reproducteurs.**

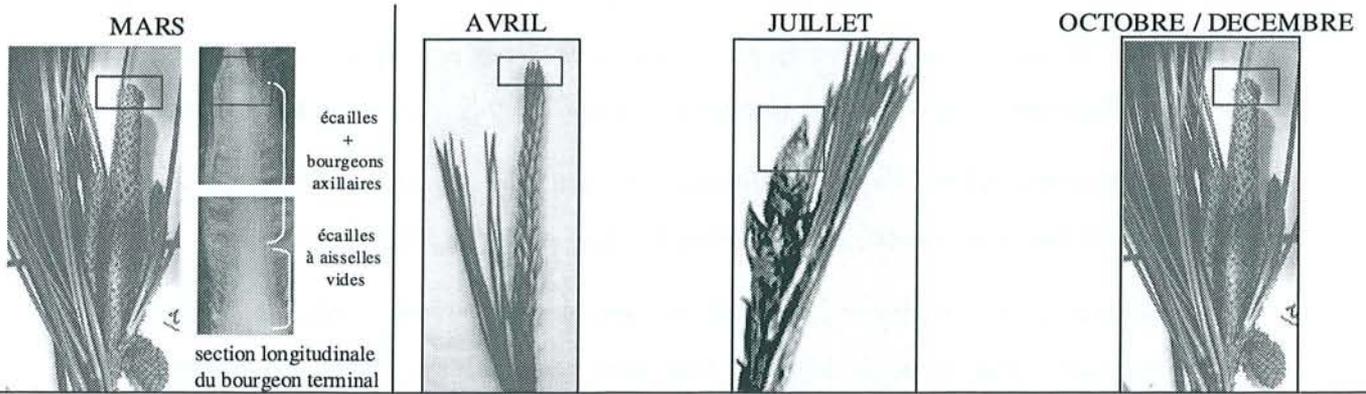


figure 23a : Aspect du bourgeon terminal au cours des différents stades de prélèvement (l'encadré rouge indique la zone décrite sur la coupe longitudinale)

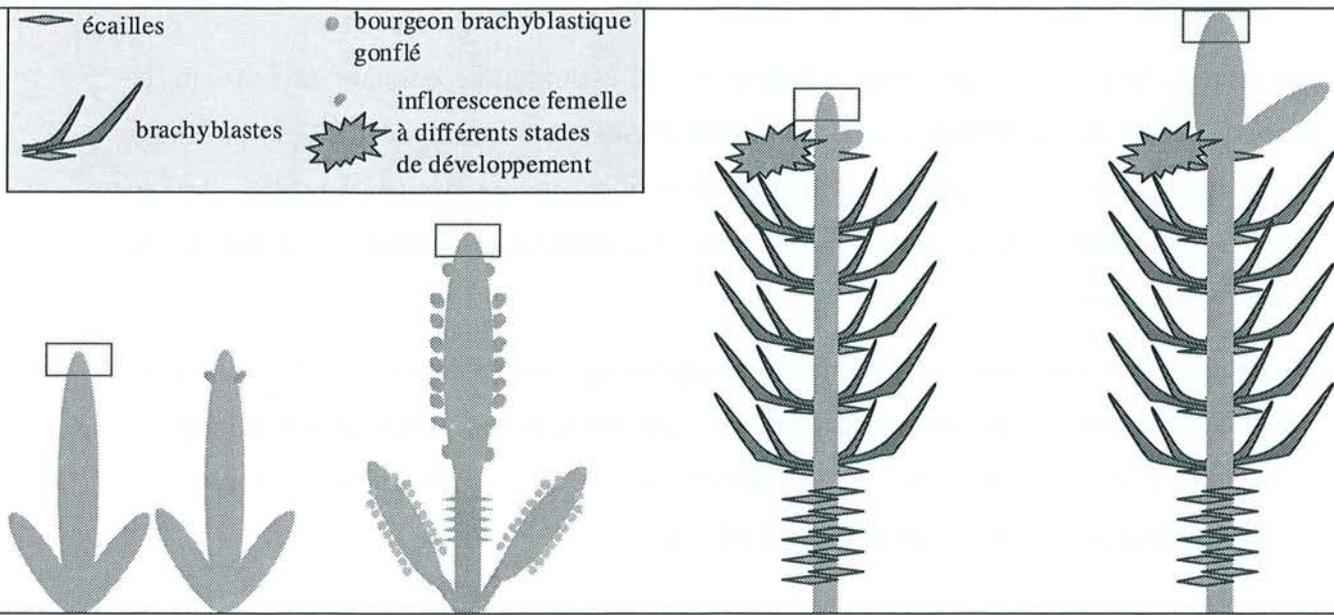
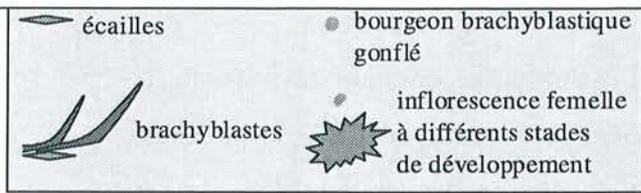


figure 23b : Schéma de l'apex caulinaire (bourgeons + tige nouvellement formée) (l'encadré rouge indique la zone décrite sur la coupe longitudinale)

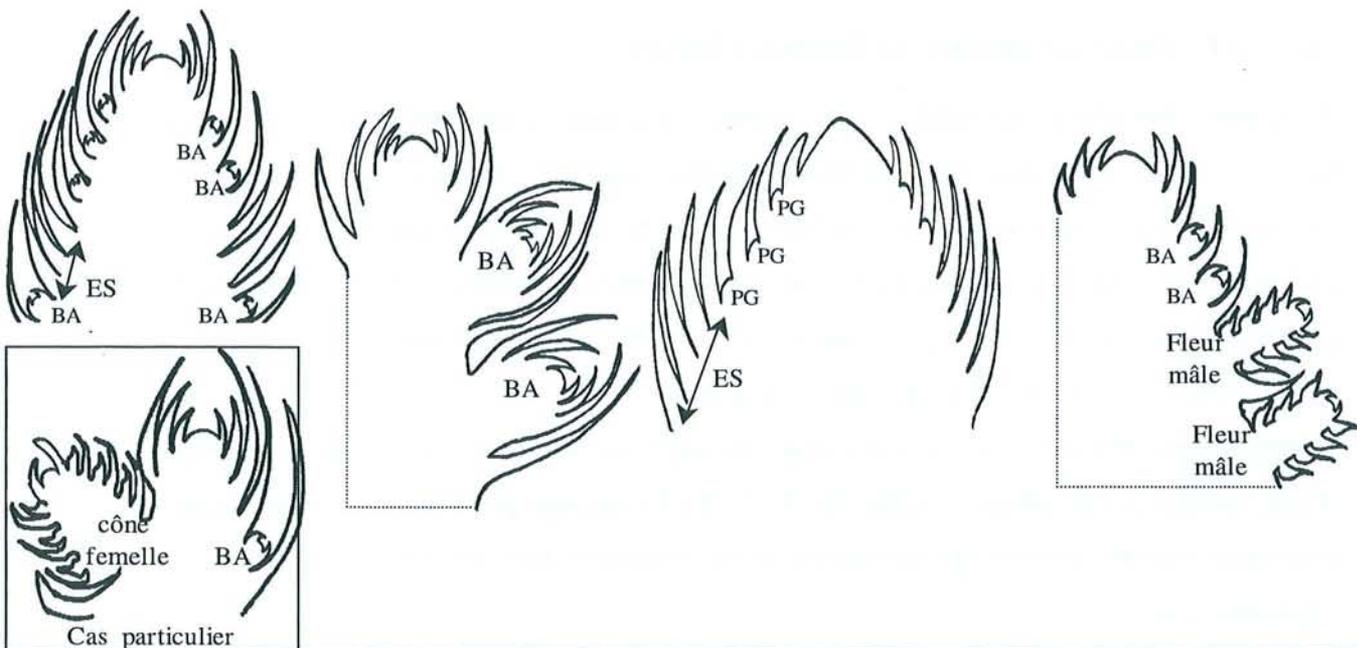


figure 23c : Schéma de l'extrémité du bourgeon: coupe longitudinale de l'apex (BA: bourgeon axillaire; PG: primordium gemmaire; ES: écaïlles stériles)

Figure 23: Evolution de la morphologie de bourgeons de plant adulte au cours d'une saison végétative

Ces résultats montrent une tendance à la diminution du nombre de bourgeons latéraux situés dans la partie supérieure du houppier en fonction de l'âge du plant.

#### *IV.2.1.2.2 – Morphologie du bourgeon terminal*

Contrairement aux apex de plants juvéniles, l'extrémité de la tige forme un bourgeon écailleux tout au long de l'année. De plus, le nombre de nœuds et d'entre-nœuds contenus dans le bourgeon terminal est parfois si important que nous avons dû étudier, à l'échelle cytologique, uniquement la partie apicale de ce bourgeon. Les bourgeons terminaux de plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs présentent une morphologie similaire. Celle-ci évolue au cours de la saison de végétation. Les observations sont présentées ici pour chaque stade de prélèvement en décrivant d'abord la morphologie "externe" des bourgeons puis leur contenu au niveau de l'apex après examen en microscopie photonique (figure 23):

◇ En mars, ➤ les bourgeons terminaux mesurent jusqu'à 10 cm (figures 23a et 23b).

➤ l'examen histologique de l'extrémité des bourgeons (figure 23c) a montré 2 types de situations (de bas en haut) :

- 1- Des écailles axillent des bourgeons axillaires qui ont eux-même différenciés plusieurs ébauches foliaires. Dans certains cas, ces bourgeons latéraux correspondent à des futurs cônes femelles reconnaissables par leurs écailles ovulifères. Cette séquence d'ébauches axillant des bourgeons est suivie d'une succession d'écailles stériles (=écailles à aisselle vide).
- 2- Une série d'ébauches foliaires à aisselle vide apparaissent aussi mais elles sont suivies d'une succession d'écailles axillant des bourgeons axillaires qui ont différenciés une à 2 ébauches foliaires seulement, et qui, étant donné leur position, donneront naissance aux brachyblastes.

◇ En avril, ➤ les bourgeons terminaux et les bourgeons auxiblastiques sont en élongation, mais seule la partie basale du bourgeon qui est pourvue d'écailles stériles, est allongée. En outre, les bourgeons axillaires situés au-dessus de cette zone, sont gonflés (figures 23a, 23b).

➤ Au niveau de l'apex, les bourgeons axillaires se sont enrichis en pièces foliaires. En revanche, aucun primordium gemmaire n'est encore visible (figure 23c).

◇ En juillet, ➤ la tige nouvellement allongée porte un bourgeon terminal ne mesurant plus que 2 cm. Un cône femelle lignifié est quelque fois observé à la base du bourgeon terminal. Des bourgeons auxiblastiques de l'ordre de 0,5 cm apparaissent au même niveau (figures 23a, 23b).

➤ Au niveau de l'apex, il y a eu formation de nouvelles ébauches foliaires et en plus, l'émergence de primordia gemmaires à l'aisselle de celle-ci. Comme elles sont précédées d'écailles à aisselle vide, ces primordia gemmaires formeront, plus tard des brachyblastes (figure 23c).

◇ En octobre et décembre, ➤ la taille des bourgeons terminaux et auxiblastiques s'est accrue (jusqu'à 10 cm), ce qui indique encore une néoformation de pièces foliaires depuis le mois de juillet (figures 23a, 23b).

➤ L'examen de l'extrémité supérieure du bourgeon terminal montre que les bourgeons latéraux ont différencié plusieurs ébauches foliaires. Nous avons noté aussi la présence exceptionnelle de plusieurs fleurs mâles en formation dans certains échantillons en octobre, et de un ou deux cônes femelles en formation en décembre (figure 23c).

En conclusion, plusieurs types d'activité se succèdent au niveau de la partie terminale de la tige pendant une saison végétative qui peuvent être visible au niveau de la morphologie externe:

- l'élongation des entre-nœuds au printemps au niveau du bourgeon terminal et des bourgeons auxiblastiques développés l'année précédente,
- le gonflement des bourgeons brachyblastiques puis l'élongation des pseudophylles au printemps
- et la formation de nouvelles ébauches et bourgeons axillaires pendant la saison de végétation

L'examen de l'extrémité des bourgeons a permis de préciser ce dernier type d'activité :

- Les écailles à aisselle stérile seraient ainsi formées au printemps.

- Puis, les primordia gemmaires émergent dès le début de l'été et formeront vraisemblablement des brachyblastes étant donné la présence de plusieurs écailles stériles sous-jacentes.
- Les cônes femelles en formation ne sont observés qu'en décembre ou en mars, et prennent naissance probablement à la fin de la saison de végétation. Les bourgeons auxiblastiques naissent à la même époque mais il n'est possible de les différencier des bourgeons brachyblastiques qu'en juillet de l'année suivante et de ne les voir s'allonger que 2 années plus tard.

Il paraît donc possible de déterminer le devenir de certains bourgeons en formation en fonction de leur position.

## **IV.2.2- Morphométrie de l'apex du bourgeon terminal**

### **IV.2.2.1 - La taille du méristème**

#### ***IV.2.2.2.1 - Relation entre la taille du méristème et la morphologie du bourgeon***

Comme nous l'avons signalé précédemment, les bourgeons sont différents selon le type de matériel adulte. Ainsi, parmi les bourgeons terminaux récoltés en mars :

- chez les plants adultes végétatifs, une grande majorité est formée de bourgeon terminal entouré de bourgeons latéraux, et dans environ 50% des cas, le bourgeon terminal est dominant
- chez les plants adultes reproducteurs, une première moitié est formée de bourgeons terminal seul, et l'autre moitié, de bourgeon entouré de bourgeons latéraux. Aucun classement n'a été effectué pour ces derniers concernant la situation de dominance.

Ces observations nous ont conduit à analyser la taille du SAM sur ces différents types de bourgeon. Pour cela, nous avons classé la hauteur du méristème en fonction de l'appartenance de l'échantillon au groupe « bourgeon terminal seul » ou « bourgeon terminal dominant entouré par des bourgeons latéraux » pour les prélèvements de mars (tableau 4).

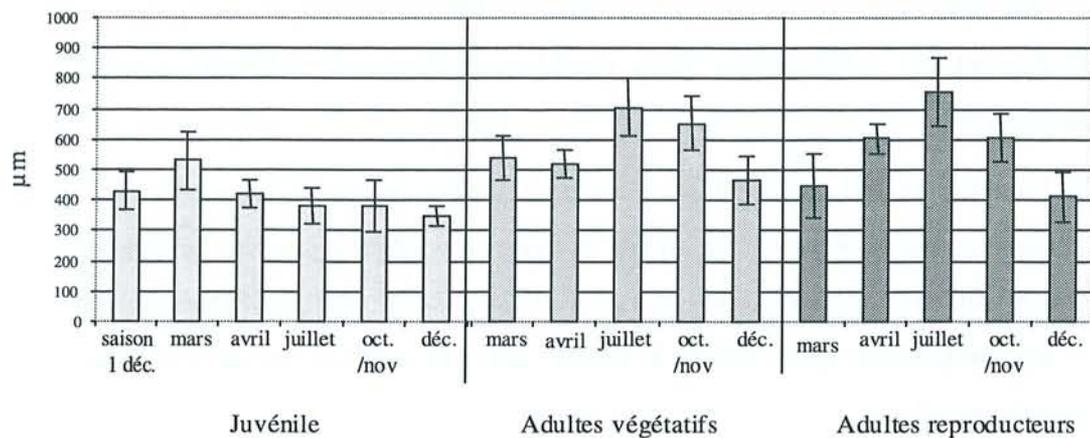


Figure 24a : diamètre du méristème

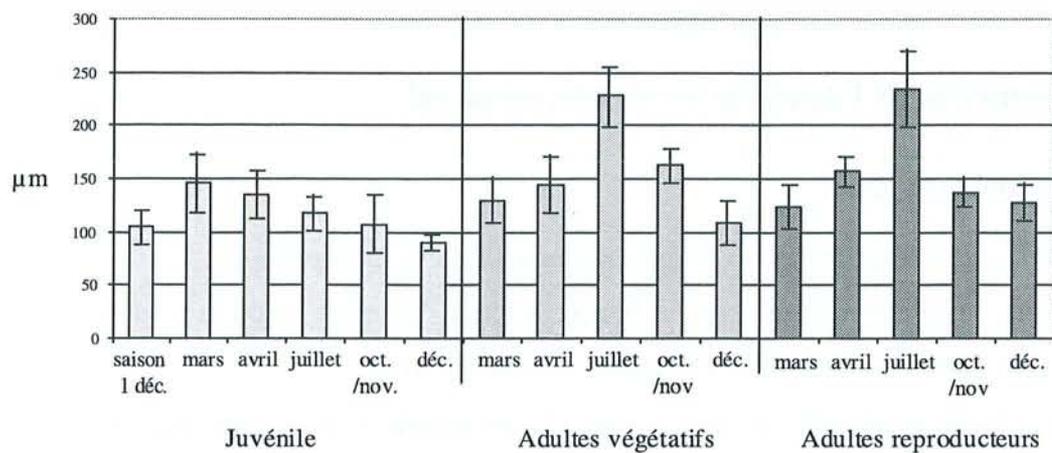


Figure 24b: hauteur du méristème

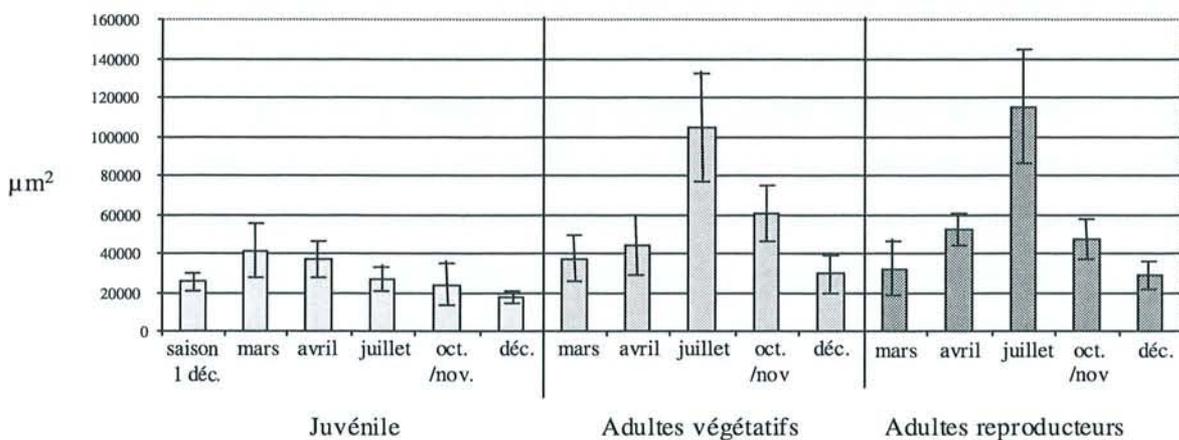


Figure 24c : surface du méristème

Figure 24: Evolution de la taille du SAM en fonction des saisons

**Tableau 4 : Variation de la hauteur du SAM en fonction de sa situation de dominance**

	bourgeon terminal dominant	bourgeon terminal seul	bourgeon terminal dominé et bourgeon terminal seul
<b>adultes végétatifs</b> <i>pourcentage de bourgeon hauteur du SAM (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	48.5% 130 (+/-17) <b>b</b>		51.5% 119 (+/-13) <b>a</b>
<b>adultes reproducteurs</b> <i>pourcentage de bourgeon hauteur du SAM (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	54% 130 (+/-30) <b>b</b>	46% 120(+/-11) <b>a</b>	

Application du test de Student fixé à 10% de seuil d'erreur:

a: les groupes portant cette mention appartiennent statistiquement à la population "a"

b: les groupes portant cette mention appartiennent statistiquement à la population "b"

Chez les adultes reproducteurs, les bourgeons terminaux dominants présentent une hauteur moyenne du méristème de 130  $\mu\text{m}$  (+/-30), alors que les bourgeons terminaux seuls ne mesurent que 120  $\mu\text{m}$  (+/-11).

Des résultats identiques sont obtenus pour les bourgeons dominants chez les adultes végétatifs. Par contre, aucune comparaison n'a pu être faite sur les bourgeons terminaux seuls car leur nombre est réduit. En revanche, les bourgeons terminaux entourés de bourgeons latéraux dominants présentent un SAM de taille identique à celle observée sur les bourgeons terminaux seuls de plants adultes reproducteurs.

Ces observations indiquent que la taille du méristème apical caulinaire semble liée à la situation de dominance du bourgeon qui le porte. L'apex tend à développer un méristème de plus grande taille lorsque celui-ci est en situation de dominance par rapport aux bourgeons latéraux. L'analyse des bourgeons adultes reproducteurs prélevés en juillet confirme ces observations.

#### ***IV.2.2.2.2 - Etude de la taille du SAM en fonction des saisons et du matériel juvénile, adulte végétatif ou adulte reproducteur***

Une étude plus approfondie de la taille du SAM a également été entreprise. La taille est évaluée à l'aide de 3 paramètres: diamètre, surface et hauteur. Les résultats obtenus peuvent être envisagés d'une part en fonction des variations saisonnières et d'autre part en fonction du type de matériel.

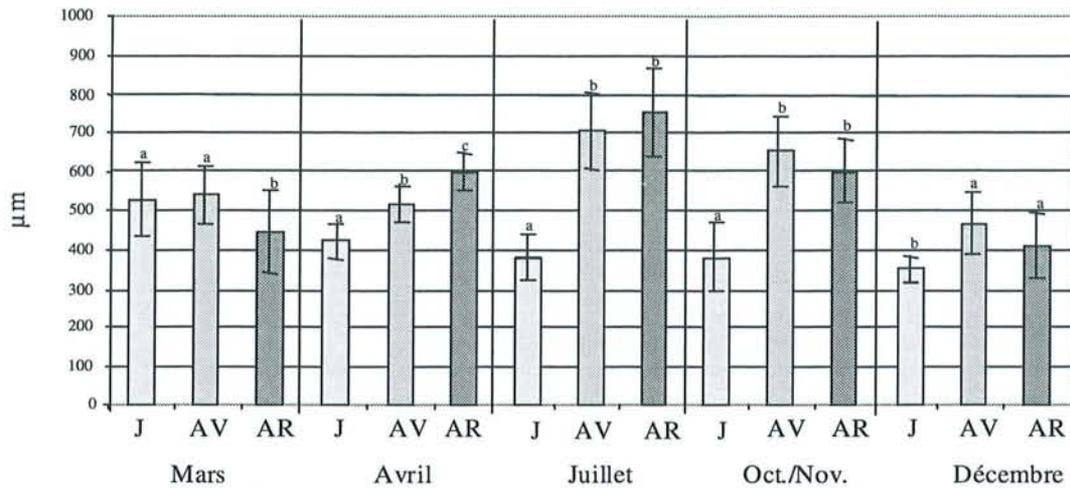


Figure 25a : Comparaison du diamètre du SAM entre les juvéniles, adultes végétatifs et reproducteurs

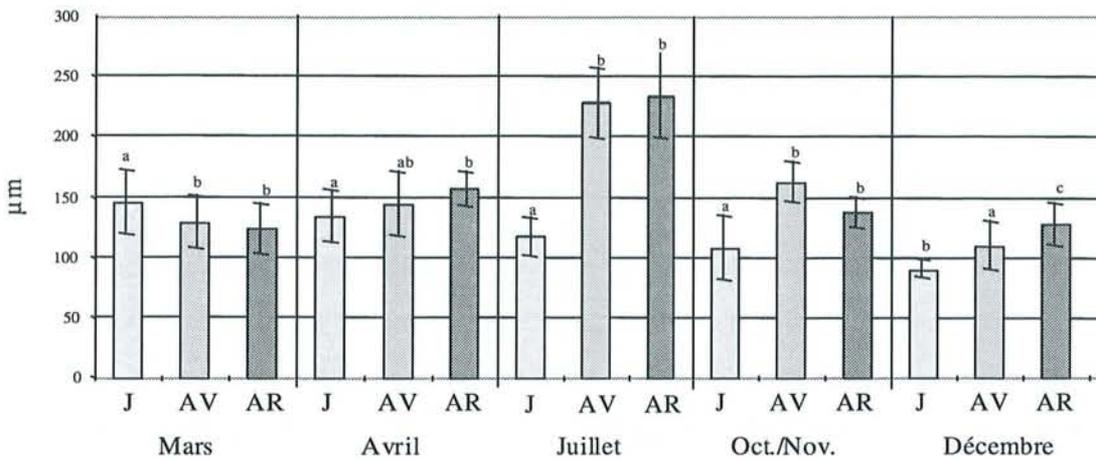


Figure 25b : Comparaison de la hauteur du SAM entre les juvéniles, adultes végétatifs et reproducteurs

**Figure 25: Comparaison de la taille du SAM entre les apex de plants juvéniles, adultes végétatifs et adultes reproducteurs**

a, b, c : se réfèrent à la comparaison statistique par le test de Student (seuil d'erreur fixé à 10%) entre les juvéniles, les adultes végétatifs et les adultes reproducteur pour chaque stade  
 ex: en mars, le diamètre du SAM des plants juvéniles est différent de celui des plants adultes végétatifs, qui est lui même différents des adultes reproducteurs

J: juvénile, AV: adulte végétatif, AR: adulte reproducteur

◆ Evolution saisonnière (figure 24)

Chez les plants juvéniles, on observe des variations des 3 paramètres et en particulier de la hauteur. Ces variations sont cependant peu marquées. Ainsi, de décembre à mars-avril, la hauteur du méristème augmente puis diminue progressivement jusqu'à l'hiver suivant.

Les plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs montrent des variations de la taille du SAM plus marquées. En décembre, les 3 paramètres mesurés sont minimum en hiver et maximum en été avec une augmentation qui débute au printemps, et une diminution visible dès l'automne.

Quelque soit le type de matériel, la morphométrie des apex caulinaires varie au cours de la saison de végétation. Mais ces variations s'expriment de façon différente selon le type de matériel considéré. Chez les juvéniles, une taille maximale est atteinte au printemps et seulement en été chez les adultes végétatifs et adultes reproducteurs.

Ces variations entre les juvéniles et les adultes indiquent un fonctionnement du méristème différent selon l'âge du matériel. Ces résultats sont également indicateurs de l'activité organogène du SAM. En effet, lorsque la taille du méristème diminue d'un stade à l'autre, cela indique la formation de nouvelles ébauches entre les 2 stades, par contre, lorsque la taille du SAM augmente entre 2 stades, nous ne pouvons utiliser la taille du SAM dans ce but.

De cette façon, il est possible d'en déduire que :

- chez les juvéniles, le méristème semble actif au printemps mais les variations sont faibles,
- chez les adultes, le méristème est actif en été et en automne.

◆ Comparaison entre les âges (figure 25) :

◇ En mars, les méristèmes des plants juvéniles sont de plus grande taille que ceux des adultes mais la différence n'est pas suffisante pour les discriminer clairement.

◇ En avril, au contraire, la taille du SAM augmente avec le stade de maturité. Elle est supérieure chez les adultes par rapport aux juvéniles et cette différence est nette pour le paramètre largeur. Ce paramètre permet également de différencier les adultes végétatifs des adultes reproducteurs.

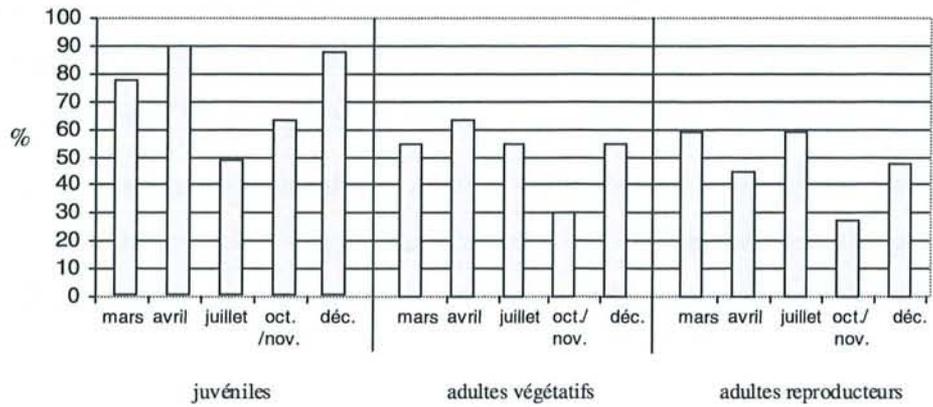


Figure 26a: Pourcentage d'ébauches de classe 1

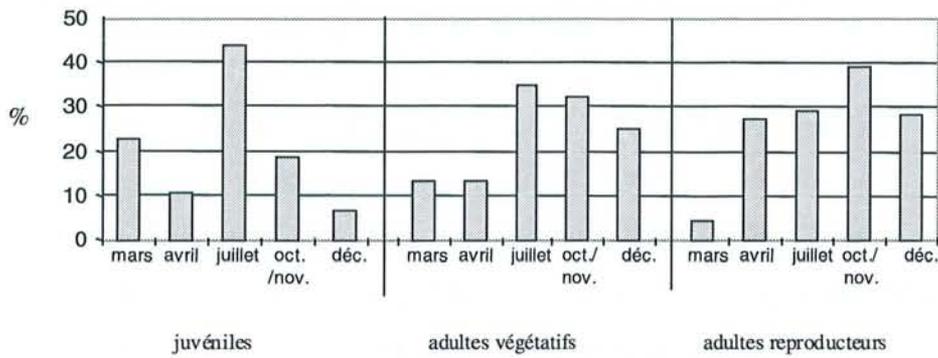


Figure 26b: Pourcentage d'ébauches de classe 2

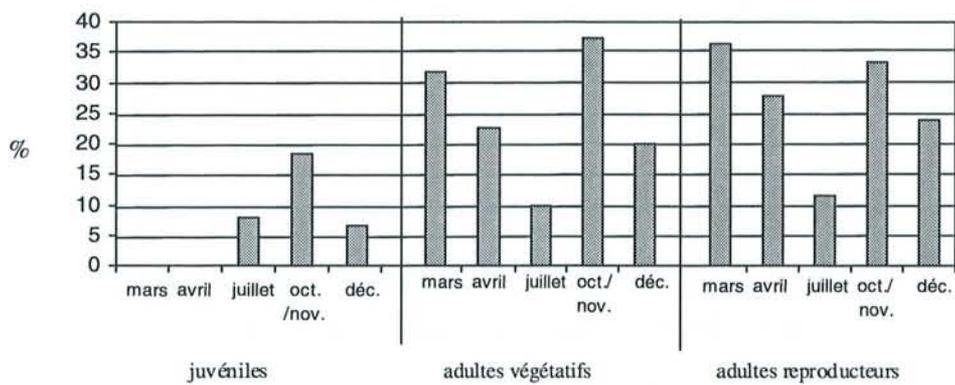


Figure 26c: Pourcentage d'ébauches de classe 3

Figure 26: Evolution saisonnière du pourcentage d'ébauches foliaires classées en fonction de leur taille

(J: juvénile; AV: adulte végétatif, AR: adulte reproducteur)

◇ En juillet, la différence entre les adultes et les juvéniles est encore plus marquée suite à l'importante augmentation de la taille du SAM. Par contre, nous ne pouvons, cette fois différencier les adultes végétatifs des adultes reproducteurs.

◇ La différence s'atténue enfin en automne et en hiver.

Il est donc possible de différencier les 3 types de matériels, en utilisant en particulier, le paramètre largeur. Le SAM récoltés sur les plants juvéniles peut donc être différencié de ceux récoltés sur les plants adultes, et cela à tous les stades étudiés, mais il existe une période optimale correspondant à l'été. En revanche, la différenciation entre les SAM des plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs n'est possible qu'au printemps, pendant l'élongation de la tige.

#### **IV.2.2.2 - Hauteur des ébauches foliaires adjacentes au SAM**

La mesure de la hauteur des ébauches foliaires nouvellement formées et adjacentes au SAM varie en fonction des saisons du type de matériel considéré. Etant donné l'importance des fluctuations observées, nous avons regroupé les mesures selon 3 classes :

Classe 1 :  $h \leq 105 \mu\text{m}$

Classe 2 :  $105 < h \leq 240 \mu\text{m}$

Classe 3 :  $h > 240 \mu\text{m}$  (avec  $h$ =hauteur des ébauches)

Le pourcentage d'ébauches appartenant à chacune de ces 3 classes est donné dans la figure 26. Ainsi, de fortes variations sont observées en fonction du matériel.

◇ Chez les plants juvéniles : La majorité des ébauches foliaires observées sont de petite taille tout au long de l'année, conduisant notamment au printemps à l'absence des ébauches de la classe 3 sur les apex récoltés au printemps. On note cependant, en été, une diminution du nombre d'ébauches appartenant à cette classe.

◇ Chez les plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs, l'évolution est sensiblement la même pour les 2 types de matériel et les variations sont particulièrement marquées pour la classe 3. Le pourcentage d'ébauches de cette classe est maximal en mars et en octobre et minimal en juillet.

Ces résultats montrent qu'il est possible de différencier les apex en fonction de leur origine en mesurant la taille des ébauches foliaires nouvellement formées. En effet, les ébauches de la 1<sup>ère</sup> classe sont globalement plus nombreuses chez les juvéniles, ayant pour conséquence, l'absence d'ébauche foliaire de la classe 3 en mars et avril. Le printemps

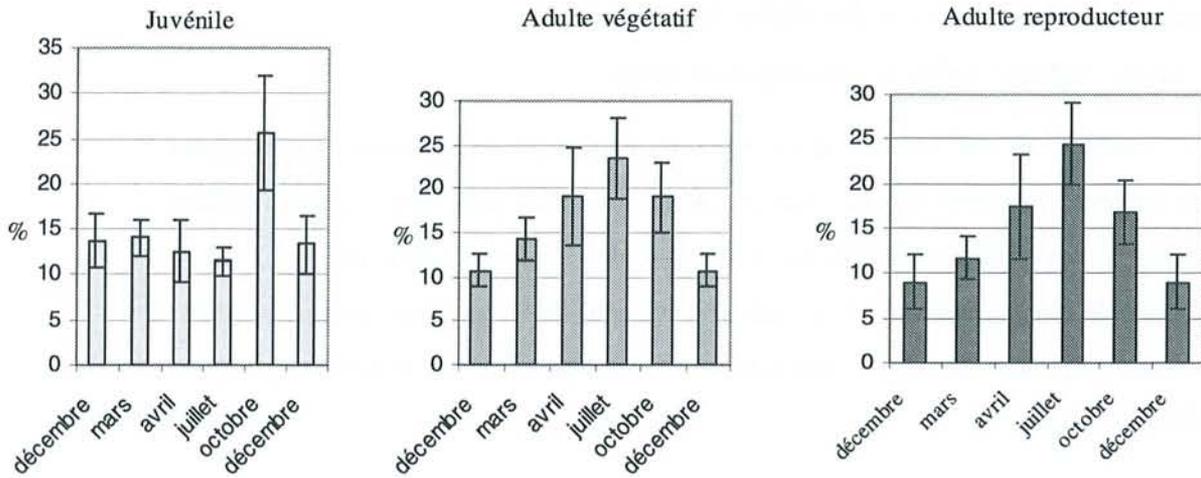


Figure 27a : Evolution saisonnière du pourcentage de surface du SAM coloré par le test de Brachet pour chaque âge

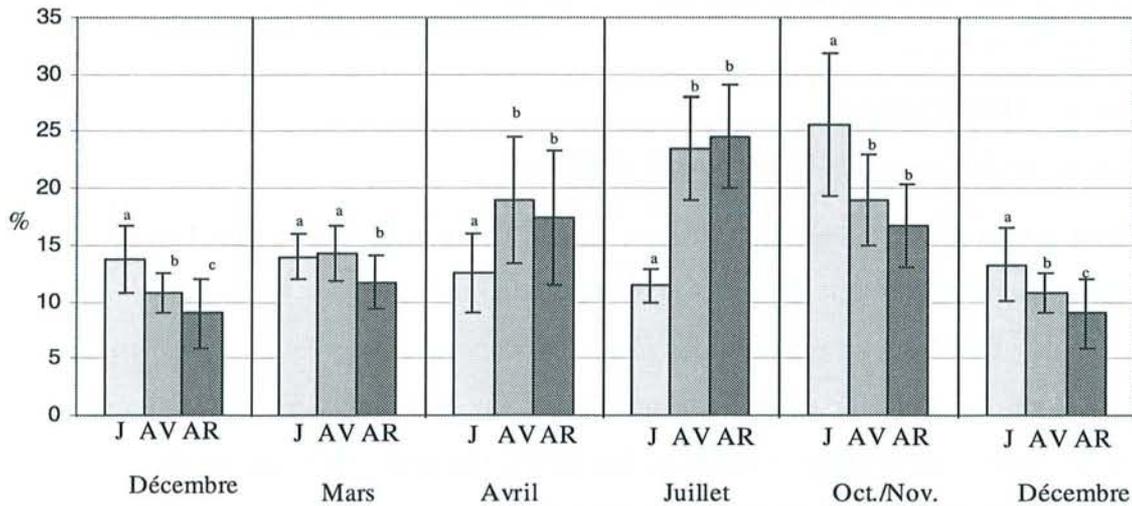


Figure 27b: Pourcentage de surface du SAM réactif au test de Brachet : Comparaison entre les âges

**Figure 27: Estimation semi-quantitative de la teneur en ARN sur des coupes longitudinales radiales du dôme apical**

a, b, c : se réfèrent à la comparaison statistique par le test de Student (seuil d'erreur fixé à 10%) entre les juvéniles, les adultes végétatifs et les adultes reproducteur pour chaque stade  
 ex: en octobre, la surface relative moyenne d'ARN dans les apex de plants juvéniles est supérieure à celle des adultes végétatifs et adultes reproducteurs,

J: juvénile, AV: adulte végétatif, AR: adulte reproducteur

semble donc être une période toute indiquée pour différencier les apex des plants juvéniles de ceux des plants adultes.

Au travers de cette étude, il est également possible de préciser les diverses activités qui ont lieu au sein de l'apex. En effet, si le nombre d'ébauches foliaires appartenant à la classe 3 augmente d'une période de prélèvement à l'autre, cela indique que l'activité d'élongation des ébauches s'est accrue entre ces 2 périodes. Au contraire, si c'est le nombre d'ébauches foliaires de la classe 1 qui augmente, cela indique la formation de nouvelles ébauches foliaires entre les deux stades et donc une activité organogène du SAM.

En appliquant ce raisonnement, il est possible de déduire que :

◇ chez les juvéniles,

- le SAM produit des ébauches foliaires entre mars et avril
- l'activité d'élongation des ébauches foliaires s'accroît entre avril et juillet,
- et le SAM produit à nouveau des ébauches foliaires entre octobre/novembre et décembre.

◇ chez les adultes végétatifs et reproducteurs,

- le SAM produit des ébauches foliaires de mars à juillet
- puis l'activité d'élongation des ébauches foliaires s'accroît,
- l'activité du méristème est ensuite mise en évidence entre octobre et décembre.

#### **IV.2.2.3 – Zonation intra-méristématique du dôme apical après coloration de l'ARN**

Les différences cytologiques au sein du méristème ont été révélées par le test de Brachet qui montre que le méristème latéral et le méristème médullaire sont riches en ARN. Pour évaluer l'activité du SAM, nous avons estimé par une étude semi-quantitative, les variations de surface répondant positivement au test de Brachet rapportée à la surface du dôme apical. Cette estimation peut être utilisée en tant qu'indicateur de l'activité cellulaire du dôme apical ce qui est confirmé par une coloration intense des protéines.

Il apparaît ainsi, que chez les plants juvéniles, la surface colorée reste stable (autour de 13%) de décembre à juillet. Elle double ensuite, en octobre avant de retrouver sa valeur initiale en décembre. Ces observations indiquent que le SAM des plants juvéniles est actif en octobre.

La surface relative du SAM coloré varie de la même façon pour les plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs. Comme dans le cas des plants juvéniles, l'évolution de la zonation intra-méristématique révélée par le test de Brachet est saisonnière. Ainsi, le pourcentage moyen de surface active dans le dôme apical augmente de mars à juillet puis diminue progressivement pour atteindre sa valeur initiale en hiver. Le maximum est atteint en été, et le minimum en hiver.

Ces résultats montrent donc, que l'activité au sein du SAM est réduite en hiver et plus importante pendant la saison de végétation pour tous les types de matériel. En revanche, la période d'activité maximale est observée en été pour les adultes, et en automne pour les juvéniles. Cette différence permet de différencier le matériel adulte du matériel juvénile pendant toute la saison de végétation, excepté au moment du débourrement. Il est plus difficile par contre, de différencier les adultes végétatifs des adultes reproducteurs étant donné l'évolution similaire du paramètre étudié. L'application du test de Student permet néanmoins de montrer une différence peu marquée en décembre et en mars entre les "adultes végétatifs" et les "adultes reproducteurs".

#### **IV.2.2.4 – Synthèse des données obtenues sur l'activité de l'apex**

Ces différents paragraphes font ressortir plusieurs types d'activité de l'apex caulinaire. Celles-ci ont lieu à des périodes différentes selon le paramètre considéré et le type de matériel étudié. Le tableau 5 résume ces différentes activités.

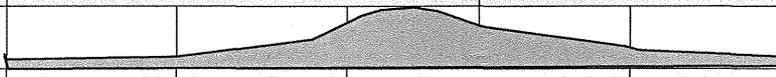
Ainsi, l'examen morphologique et morphométrique indique :

- chez les juvéniles, une production active d'ébauches foliaires au printemps et en automne (mars/avril et octobre/novembre) avec une différenciation de primordia gemmaire en avril et en octobre/novembre. Les ébauches foliaires néoformées s'allongent entre avril et juillet et entre octobre et décembre. Au mois de juillet, les ébauches foliaires adjacentes au SAM sont allongées et on observe une production d'ébauches foliaires au niveau des bourgeons axillaires, ce qui pourrait indiquer un ralentissement de l'activité du SAM à cette période.
- chez les adultes, les ébauches foliaires sont produites pendant toute la saison de végétation et les primordia gemmaires sont formés dès le début de l'été. En automne, les ébauches foliaires proches du SAM s'allongent et les bourgeons axillaires s'enrichissent en nouvelles pièces foliaires.

**Tableau 5 a : Estimation des périodes d'activité au sein de l'apex caulinaire de plants juvéniles**

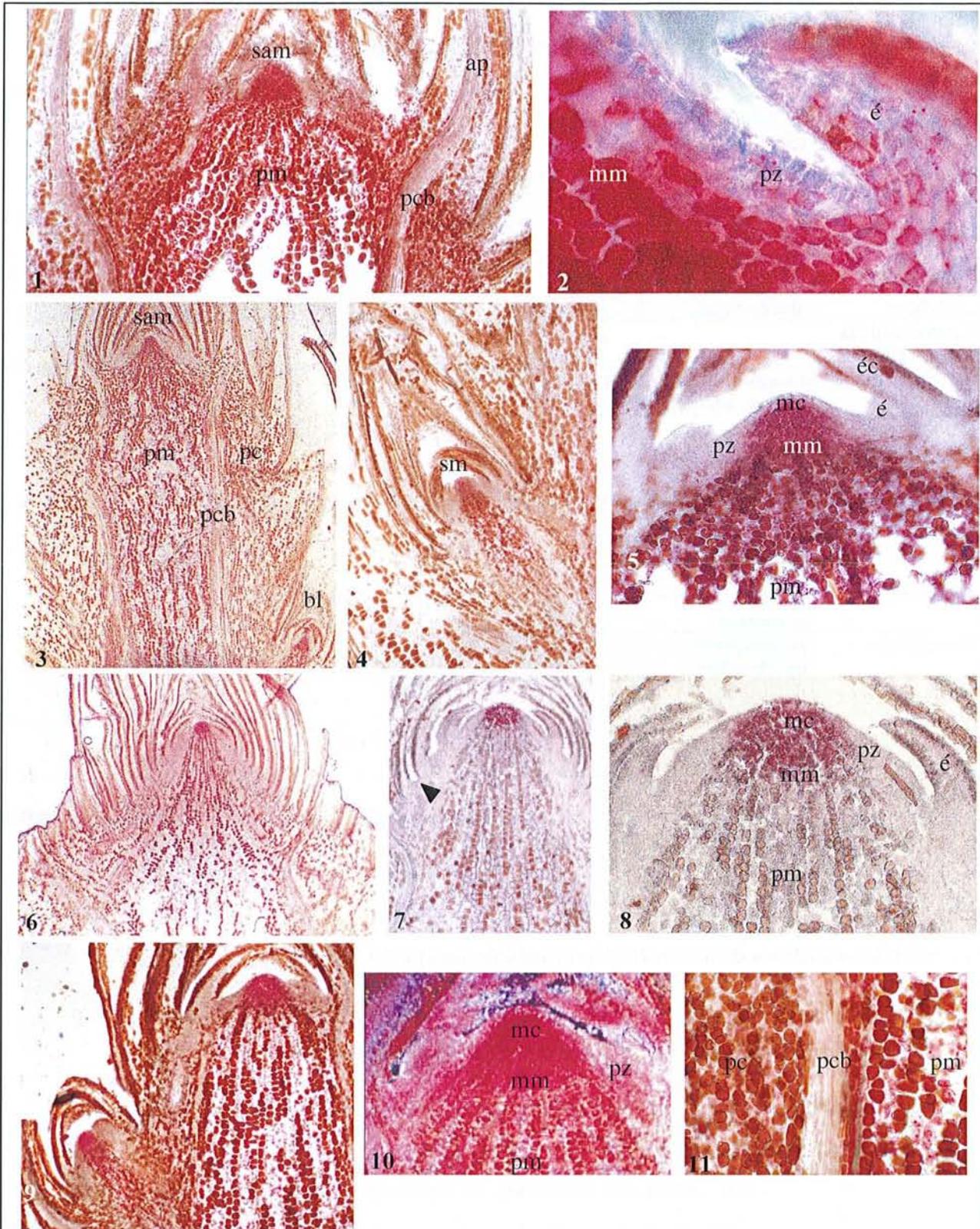
<i>Paramètre étudié</i>	<i>Activité déduite de ces paramètres</i>	mars	avril	juillet	oct./nov.	déc.
Morphologie :	initiation des primordia gemmaires		+++++		+++++	
Morphologie :	production des ébauches		+++++		+++++	
Taille du SAM :	production des ébauches	+ + + +				
Taille des ébauches :	production des ébauches		+++++		+++++	
Estimation de la teneur en ARN						
	Elongation des ébauches foliaires adjacentes au SAM			++++		

**Tableau 5 b: Estimation des périodes d'activité au sein de l'apex caulinaire de plants adultes**

<i>Paramètre étudié</i>	<i>Activité déduite de ces paramètres</i>	mars	avril	juillet	oct./nov.	déc.
Morphologie :	initiation des primordia gemmaires			+++++		
Morphologie :	production des ébauches		+++++	+++++		
Taille du SAM :	production des ébauches			+++++		
Taille des ébauches :	production des ébauches	+++++			+++++	
Estimation de la teneur en ARN						
	Elongation des ébauches foliaires adjacentes au SAM			+++++		

Le suivi des variations de la zonation intra-méristématiques a révélé :

- chez les juvéniles, une activité intense en octobre/novembre uniquement, en concomitance avec la seconde période d'activité organogène, en octobre/novembre.
- chez les adultes : - l'activité augmente progressivement au printemps en même temps que se forment les écailles stériles
  - elle atteint son maximum en juillet qui est une période organogène intense au cours de laquelle se différencient, notamment, des primordia gemmaires,
  - puis elle diminue progressivement en automne, alors que les apex produisent encore des ébauches foliaires.



**figure 28: Localisation des triglycérides dans les apex des adultes reproducteurs. (identique chez les juvéniles et les adultes végétatifs). 1- 2: mars et décembre;** 1- vue d'ensemble : lipides de réserve présents dans le sam, le parenchyme médullaire et le cortex; 2- détail du SAM : forte accumulation dans le méristème central et le méristème médullaire; absentes dans les ébauches et le méristème latéral- **3-4-5: avril;** 3: vue d'ensemble: triglycérides absents dans le cortex; 4: bourgeon latéral en formation: triglycérides accumulés dans le méristème et la moelle sous jacente; 5: détail du SAM: identique à la figure 28-2- **6-7-8: juillet;** 6 : vue d'ensemble; 7: détail de l'apex: lipides de réserve absents dans le parenchyme médullaire; et les primordia gemmaires (flèche) 8: détail du SAM: triglycérides dans le méristème central essentiellement, absents dans le méristème latéral. **9-10-11: octobre.** 9- vue d'ensemble: accumulation importante dans le SAM et le méristème apical du bourgeon latéral (zone centrale). 10: détail du SAM; 11: détail du cortex et de la moelle: triglycérides présents dans la moelle essentiellement

Il y a donc un décalage entre les périodes d'activité organogène déduite à partir des paramètres morphologiques et morphométriques, et la zonation intra-méristématique décrite sur les plants juvéniles. Au contraire, chez les plants adultes, l'estimation semi-quantitative de l'ARN indicatrice de l'activité cellulaire concorde tout à fait avec l'activité organogène.

## **IV.2.3- Répartition des réserves**

### **IV.2.3.1 - Les triglycérides**

La répartition des triglycérides dans l'apex caulinaire varie au cours des saisons (figure 28). Cette évolution est identique chez les plants juvéniles, adultes végétatifs et adultes reproducteurs:

◇ En mars (débourrement), les triglycérides sont détectés intensément dans le bourgeon. Seuls le méristème latéral, les ébauches foliaires et les écailles en sont dépourvus (figures 28-1, 28-2).

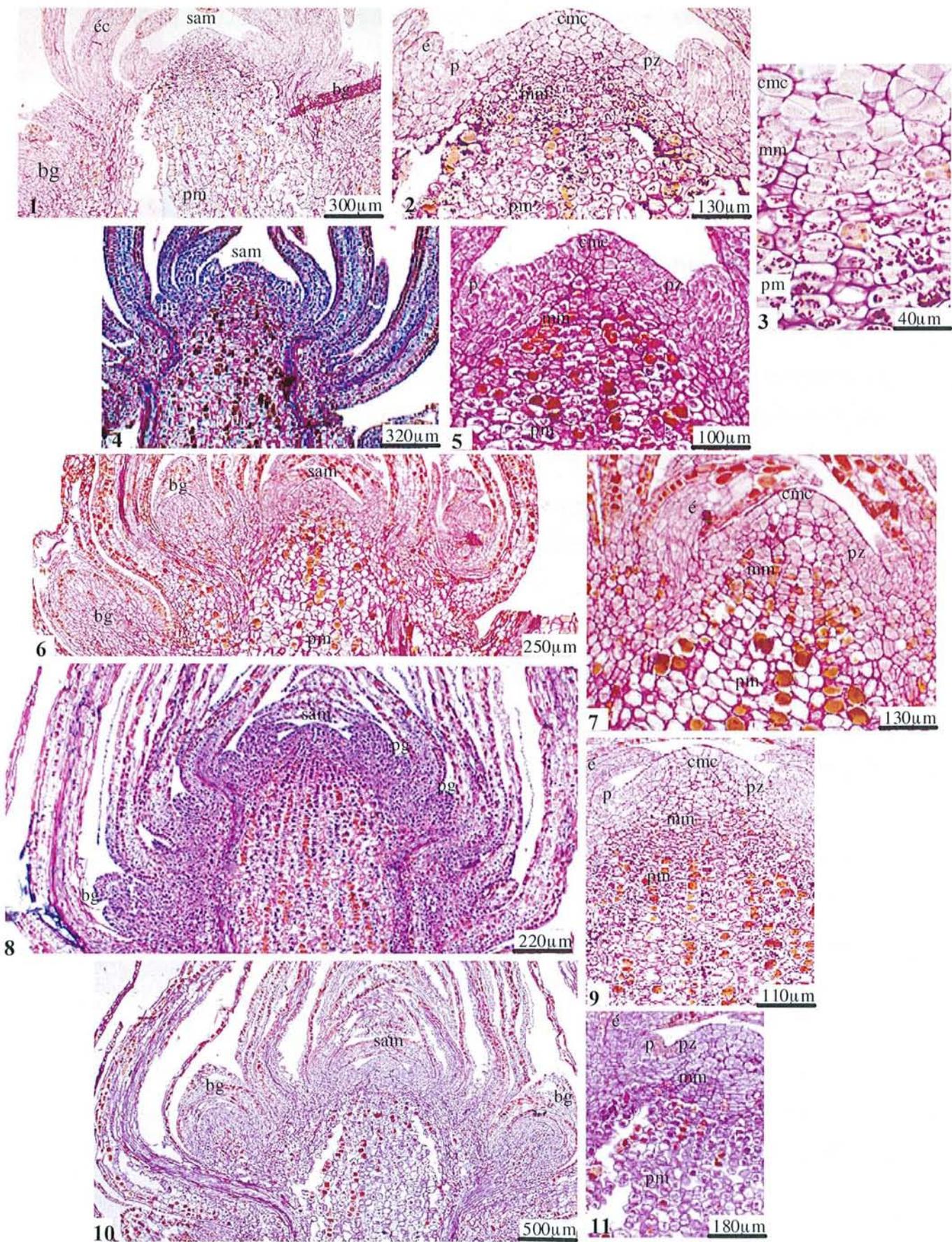
◇ En avril (élongation de la tige), les triglycérides régressent. Le parenchyme cortical et les tissus conducteurs en deviennent également dépourvus (figures 28-3, 28-4, 28-5).

◇ En juillet (fin d'allongement de la tige), les réserves lipidiques ne sont plus détectées que dans le méristème central (figures 28-6, 28-7, 28-8).

◇ En octobre/novembre (fin de la saison végétative), les triglycérides apparaissent de nouveau dans le méristème médullaire et le parenchyme médullaire (figures 28-9, 28-10, 28-11).

◇ Enfin, en décembre (repos hivernal), cette évolution s'accroît et on observe de nouvelles réserves accumulées dans le parenchyme cortical et les tissus conducteurs (figures 28-1, 28-2).

Il y a donc concordance entre l'utilisation des réserves lipidiques stockées dans l'apex et la croissance de la tige printanière. Une nouvelle accumulation intervient en automne, de telle sorte que, le bourgeon est chargé de triglycérides en hiver.



**Figure 29 : Evolution de la distribution des réserves polysaccharidiques dans les apices de plants juvéniles en fonction de la période de prélèvement (Cf. légendes p.82)**

### IV.2.3.2 - Les réserves amyloées

Comme chez les semis, nous avons observé une accumulation de grains d'amidon dans l'apex, principalement dans le parenchyme médullaire sub-apical. Leur taille dans cette zone privilégiée et leur répartition dans l'ensemble de l'apex, évoluent en fonction des saisons, et du type de matériel. L'évolution de la répartition des grains d'amidon est présentée figure 29 pour les juvéniles et figure 31 pour les adultes. La taille des grains et la distance qui les séparent du dôme apical sont présentés figure 30.

#### ◆ Chez les plants juvéniles

◇ En mars, la quantité de grains d'amidon est relativement importante. Les grains d'amidon sont répartis principalement dans l'ensemble du parenchyme médullaire, et à la base du méristème médullaire. Quelques grains de petite taille peuvent parfois être observés dans le méristème d'attente. La densité et la taille des grains est plus importante dans le parenchyme médullaire sub-apical que dans le méristème médullaire (figures 29-1 à 29-3).

◇ En avril, la présence d'amidon s'accroît et l'ensemble du méristème médullaire en contient. Cet accroissement est marqué notamment, par une augmentation de la taille des grains situés dans le parenchyme médullaire sub-apical (figures 29-4, 29-5, 30).

---

#### Figure 29 : Evolution de la distribution des réserves polysaccharidiques dans les apex de plants juvéniles en fonction de la période de prélèvement

1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11: coloration des polysaccharides en rose et des tanins en marron.

4, 8: double coloration des protéines (bleu) et des polysaccharides.

**29-1 à 29-3 : mars**, 1- vue d'ensemble: accumulation d'amidon dans le parenchyme médullaire et en particulier à proximité du SAM, 2-détail de l'apex 3-détail du SAM, forte accumulation dans le méristème médullaire et dans le parenchyme médullaire sous-jacent. **29-4 à 29-5 : avril**, 4- vue d'ensemble: primordia gemmaires en formation, 5- détail de l'apex SAM: forte accumulation d'amidon dans le méristème médullaire et le parenchyme médullaire sous-jacent. **29-6 à 29-7 : juillet**, 6- vue d'ensemble, aucun primordium gemmaire, 7- détail de l'apex: aucun grain d'amidon détecté. **29-8 à 29-9 : novembre**, 8- vue d'ensemble: plusieurs primordia gemmaires, 9- détail de l'apex: nombreux grains d'amidon dans le méristème médullaire et le parenchyme médullaire. **29-10 à 29-11 : décembre**, 10- vue d'ensemble, bourgeon latéraux formé à proximité du SAM, 11- détail de l'apex: accumulation d'amidon dans le méristème médullaire et le parenchyme médullaire adjacent

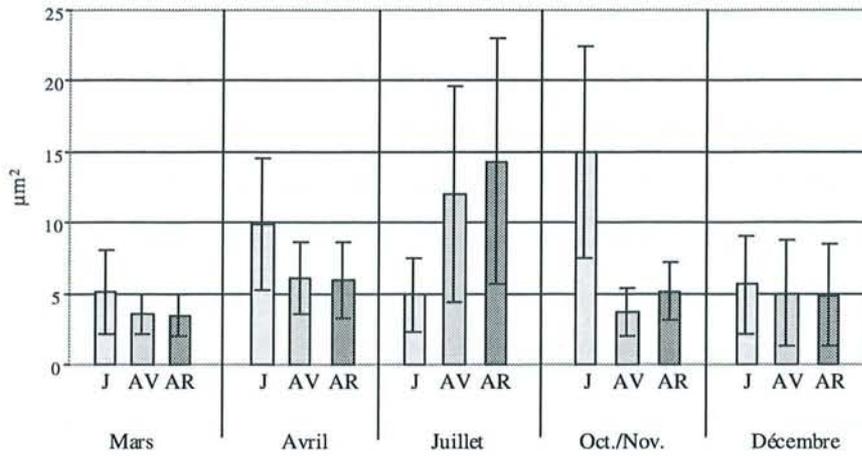


Figure 30a : Surface moyenne des grains d'amidon dans la zone de référence du parenchyme médullaire

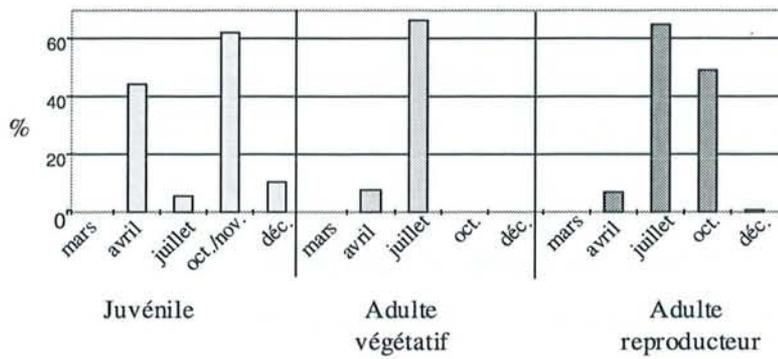


Figure 30b : Pourcentage de grains d'amidon dont la surface est supérieure à  $10\mu\text{m}^2$

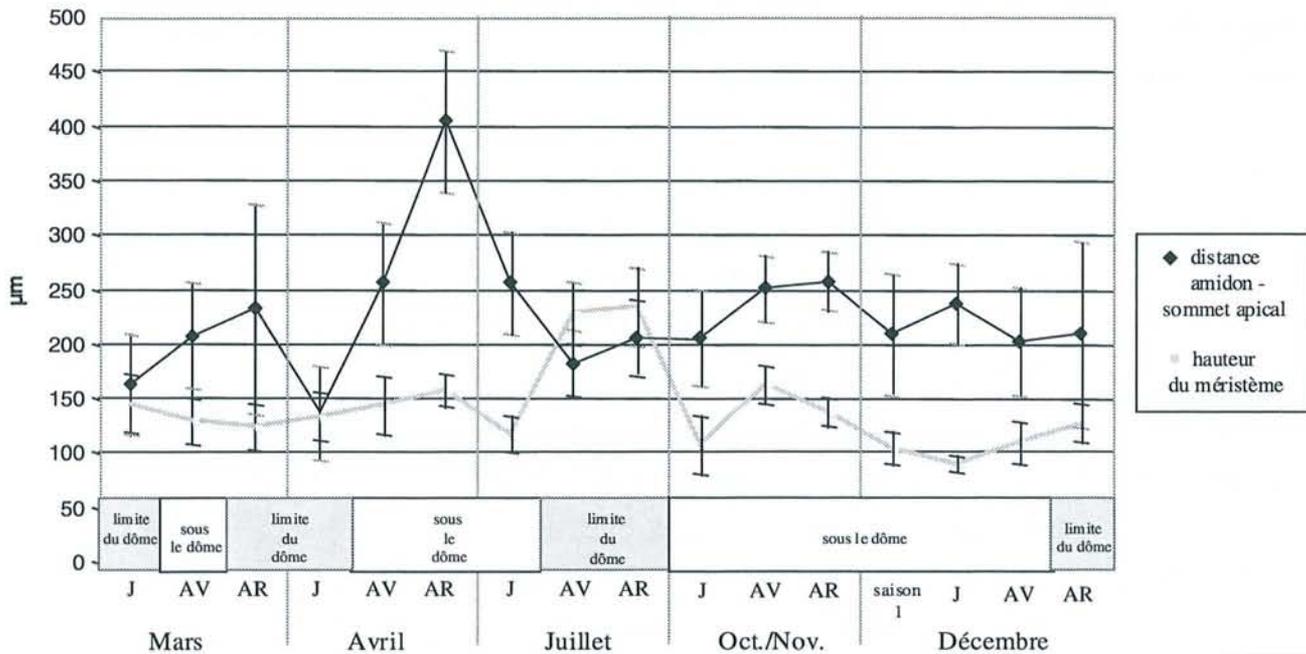


Figure 30c: Distance moyenne séparant le sommet apical des premières cellules contenant des grains d'amidon et hauteur du dôme méristématique

Figure 30: Etude semi-quantitative de la distribution de l'amidon au sein de l'apex caulinaire

◇ En juillet, l'amidon disparaît dans sa quasi-totalité. Quelques grains de petite taille, sont néanmoins observés dans le parenchyme médullaire sub-apical (figures 29-6, 29-7, 30).

◇ En octobre/novembre, une nouvelle accumulation importante est observée et une situation identique à celle du mois d'avril peut être décrite. Par exemple, la taille des grains est importante (figures 29-8, 29-9, 30).

◇ En décembre, l'amidon disparaît de nouveau de telle sorte que les grains sont de petite taille et ne sont plus détectés que dans le parenchyme médullaire sub-apical (figures 29-10, 29-11).

Par conséquent, les apex de plants juvéniles accumulent de l'amidon pendant la saison végétative: au printemps (mars et surtout avril) et en automne, périodes durant lesquelles les primordia gemmaires se différencient.

#### ◆ **Chez les plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs**

Pour ce qui concerne les plants adultes, les apex de plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs présentent une distribution d'amidon similaire dans la majorité des stades étudiés:

◇ Ainsi, en mars, les grains d'amidon sont répartis à la base du méristème médullaire et dans le parenchyme médullaire principalement dans la zone sub-apicale où ils présentent une taille relativement faible. La présence de quelques grains est à noter à la périphérie du méristème central chez les adultes végétatifs uniquement (figures 30, 31-1, 31-2).

◇ En avril, l'amidon apparaît dans le parenchyme médullaire des 2 types de matériel adultes végétatifs et adultes reproducteurs.

Mais dans le cas des adultes végétatifs, des grains d'amidon sont stockés en abondance dans la zone sous-jacente au SAM. Dans ce cas, la taille des grains est multipliée par 2 et leur densité semble plus importante (figures 30, 31-3, 31-4).

Chez les adultes reproducteurs, des grains éparses de même taille peuvent être observés dans des cellules du parenchyme médullaire éloignées du dôme apical (figure 31-5).

◇ En juillet, l'amidon est observé en abondance dans les 2 types de matériel. Le parenchyme médullaire sub-apical constitue alors une importante zone de stockage commune aux adultes végétatifs et aux adultes reproducteurs. La taille des grains est maximale à ce stade (figures 30, 31-6, 31-7, 31-8).

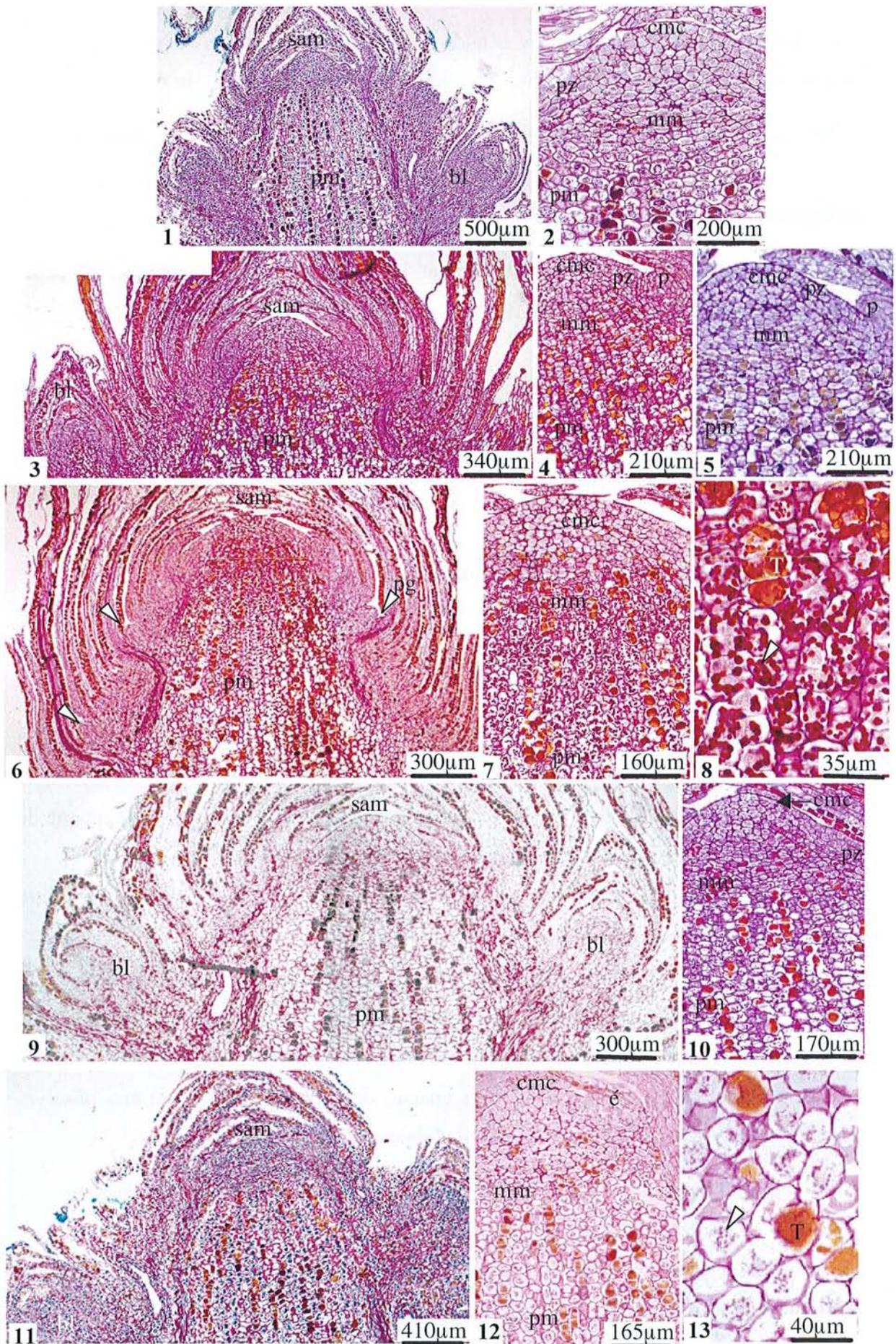


Figure 31: Evolution du contenu en polysaccharides dans les apex des adultes végétatifs et adultes reproducteurs (Cf légende p.84)

◇ En octobre/novembre, l'accumulation s'affaiblit. Les grains sont répartis dans l'ensemble du parenchyme médullaire sans pouvoir distinguer de zone de stockage privilégiée. La taille des grains d'amidon et leur accumulation sont plus faibles chez les adultes végétatifs que chez les adultes reproducteurs (figures 30, 31-9, 31-10).

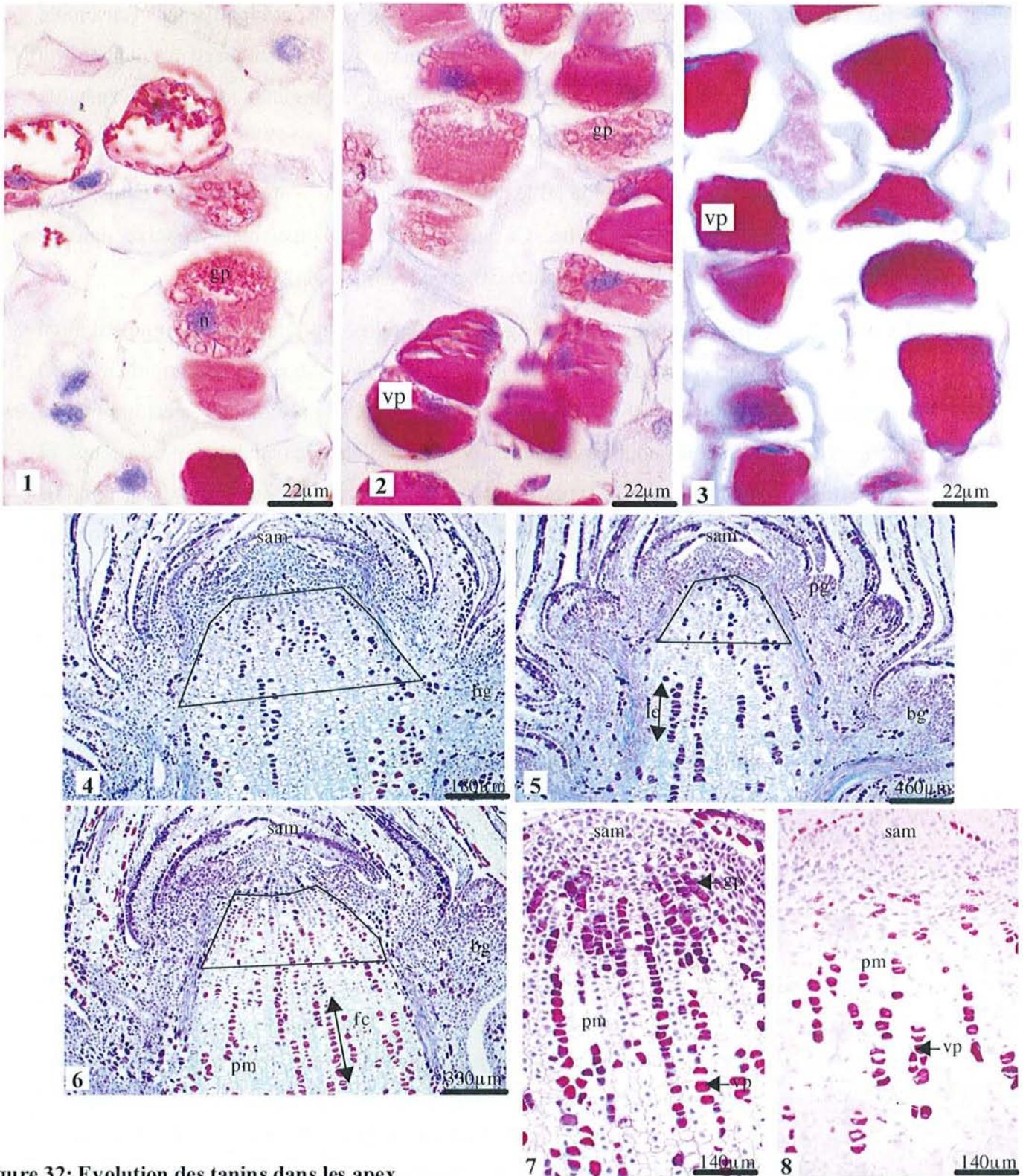
◇ En décembre, l'accumulation et la taille des grains d'amidon sont encore plus faibles pour les 2 catégories de matériel adulte. Ce stockage est principalement observé dans le parenchyme médullaire sub-apical (figures 30, 31-11, 31-12, 31-13).

En résumé, les apex de plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs accumulent aussi des réserves amylacées pendant la saison de végétation, mais avec un maximum en été au moment où l'on peut observer des primordia gemmaires. Cette accumulation est importante dès le printemps chez les adultes végétatifs, et plus tard chez les adultes reproducteurs, ce qui permet de distinguer ces 2 types de matériel en avril, par leur contenu en amidon. L'accumulation la plus faible est observée, comme chez les juvéniles pendant la période de repos. De plus, le parenchyme médullaire sous-jacent au SAM reste une zone d'accumulation privilégiée.

---

<sup>1</sup> **Figure 31: Evolution du contenu en polysaccharides dans les apex des adultes végétatifs et adultes reproducteurs.**

**31-1 à 31-2: mars**, 1-: bourgeons latéraux en développement sur bourgeon apical de plant adulte végétatif, 2-détail de l'apex: quelques grains détectés dans le méristème médullaire et le parenchyme médullaire. **31-3 à 31-5: avril**, 3- vue d'ensemble d'un bourgeon terminal prélevé sur un plant adulte, 4- détail de l'apex de plant adulte végétatif, nombreux grains d'amidon dans le parenchyme médullaire et plus particulièrement la zone sous jacente au SAM, 5- détail de l'apex de plant adulte reproducteur, peu de grains. **31-6 à 31-8: juillet**, 6- vue d'ensemble d'un bourgeon terminal prélevé sur un plant adulte, les flèches indiquent les primordia gemmaires 7- détail de l'apex caulinaire présentant un stockage important d'amidon dans le méristème médullaire et dans le parenchyme médullaire, 8-cellules du parenchyme médullaire adjacentes au méristème médullaire: gros grains d'amidon abondant (flèche). **31-9 à 31-10 : octobre**, 9: vue d'ensemble d'un bourgeon de plant adulte végétatif, 10- détail de l'apex : grains d'amidon en moindre quantité par rapport à juillet, aucune zone de stockage privilégiée dans le parenchyme médullaire. **31-11 à 31-12: décembre**, 11- vue d'ensemble d'un bourgeon prélevé sur un plant adulte végétatif, 12-détail de l'apex : quelques grains d'amidon dans le parenchyme médullaire, 13- cellules du parenchyme médullaire contenant des grains de petite taille (flèche)



**Figure 32: Evolution des tanins dans les apex**

(zone encadrée= zone de référence pour l'étude semi-quantitative)

**32-1 à 32-2: cellules du parenchyme médullaire observé sur un apex de plant juvénile récolté en mars**, 1: tanins granulaires dans les cellules adjacentes au SAM, (gp), 2-: tanins granulaires et vacuolaires (vp) dans les cellules plus éloignées du SAM. **32-3: cellules du parenchyme médullaire observé sur un apex de plant adulte**, lignée de cellules contenant des tanins vacuolaires. **32-4 à 32-6: vue d'ensemble des apex récoltés en octobre-novembre**, 4- prélèvement sur un plant juvénile, 5- prélèvement sur un plant adulte végétatif, 6- prélèvement sur un plant adulte reproducteur, la moelle présente de nombreuses lignées de cellules (lc) contenant des tanins vacuolaires. **32-7 à 32-8: détail de l'apex de plants adultes végétatifs**, 7-juillet, 8- décembre.

La comparaison entre les différents matériels est facilitée lorsqu'on se base sur la distance qui sépare le dôme apical et la hauteur de celui-ci qui est assez indicatrice des variations saisonnières (figure 30b). A titre d'exemple, en avril, la distance qui sépare le sommet du dôme apical et les premiers grains d'amidon augmente avec l'âge du matériel.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

#### IV.2.3.3 - Les tanins

La mesure de la surface relative des tanins dans le parenchyme médullaire adjacent au SAM permet d'estimer leur quantité au sein de cette zone de référence. Ainsi, nous avons pu observer des variations saisonnières propres à chaque type de matériel (figure 33).

◇ Chez les juvéniles, l'accumulation est minimale en hiver et pendant la période de ralentissement d'activité organogène en juillet. On observe également une faible accumulation en avril, période d'initiation de primordia gemmaires. En revanche, l'accumulation est maximale en mars et en octobre/novembre, périodes de formation d'ébauches foliaires (Cf. tableau 5a).

◇ Chez les adultes, l'accumulation est aussi minimale en hiver. Elle est plus importante pendant toute la saison de végétation pendant laquelle il y a production d'ébauches foliaires. Elle augmente en juillet au moment où les primordia gemmaires sont initiés. Elle atteint ainsi son maximum en juillet chez les adultes végétatifs, et augmente encore jusqu'en octobre chez les adultes reproducteurs.

D'autres types de variations sont aussi observés au niveau de l'apparence des tanins. En effet, l'accumulation de tanin a lieu dans la vacuole de cellules spécialisées et peut se présenter sous plusieurs formes (figure 32) :

- les tanins granulaires (GP) constitués de plusieurs granules au sein d'une même vacuole
- les tanins "vacuolaires" (VP), où l'ensemble du volume vacuolaire est rempli de ces composés.

Ces 2 formes varient en fonction du matériel et du territoire observé dans l'apex. En effet, chez les 3 types de matériels, les tanins sont sous la forme de GP dans le méristème médullaire et de VP dans le parenchyme médullaire qui en dérive.

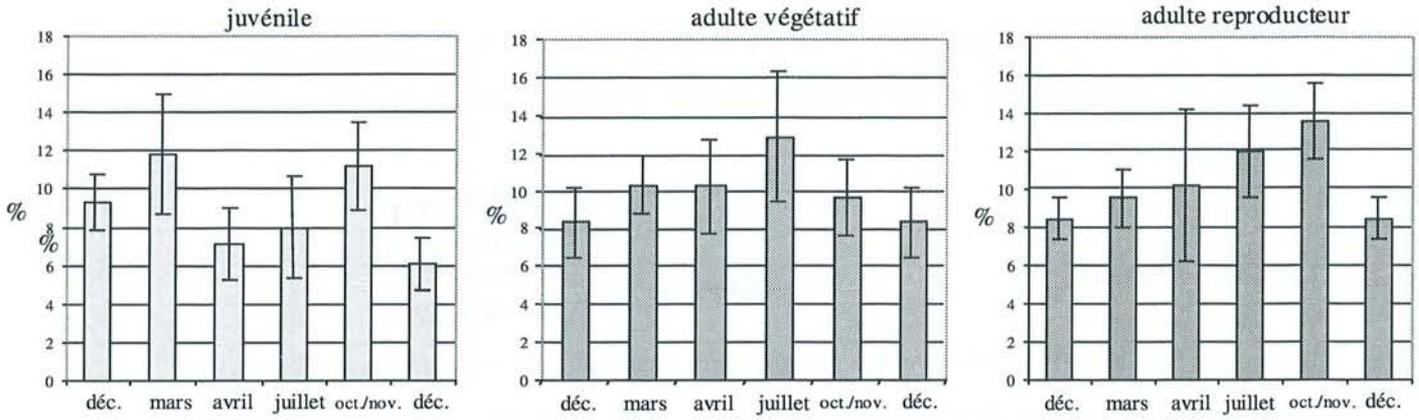


Figure 33 a : Evolution saisonnière de la surface du parenchyme médullaire sub-apical contenant des tanins

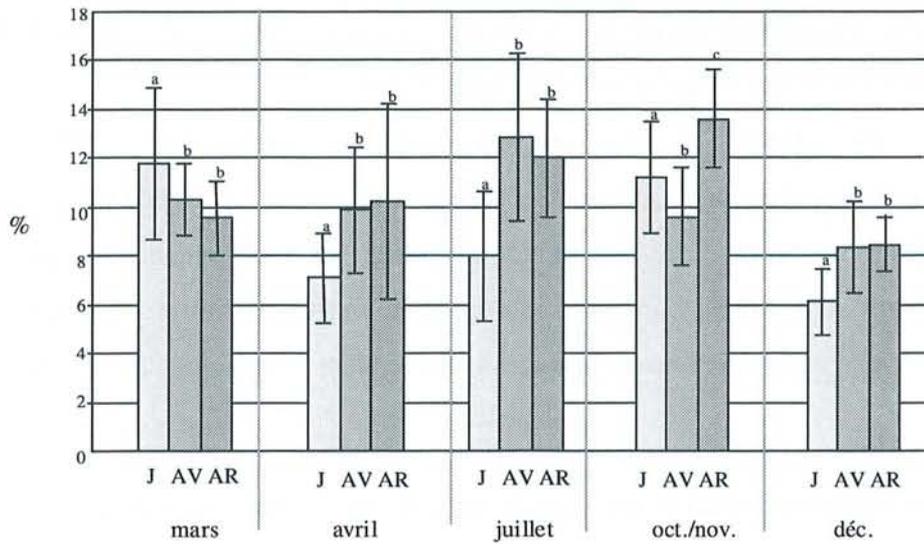


Figure 33b : Pourcentage de surface du parenchyme médullaire contenant des précipités tanniques : Comparaison entre les âges

a, b, c : se réfèrent à la comparaison statistique par le test de Student (seuil d'erreur fixé à 10%)

entre les juvéniles, les adultes végétatifs et les adultes reproducteur pour chaque stade

ex: en mars, la surface relative présentant des tanins chez les plants juvéniles est supérieure à celle des adultes végétatifs et des adultes reproducteurs

J: juvénile, AV: adulte végétatif, AR: adulte reproducteur

Figure 33: Evolution de la surface relative en tanins contenus dans le parenchyme médullaire sub-apical

Les GP sont fortement accumulés au printemps et en automne chez les matériels juvéniles, et au printemps et en été chez les adultes. Pendant ces périodes, cette forme de tanin est aussi observée dans le parenchyme médullaire sous apical.

Les VP sont particulièrement réactifs à la pyronine utilisé pour le test de Brachet, chez tous les types de matériel, sauf en mars et avril de la seconde saison de végétation. Les cellules du parenchyme médullaire contenant des VP sont, pour ces 2 stades d'exception, souvent séparées les unes des autres. Par contre, à partir de juillet de la seconde saison de végétation, puis à tous les stades de prélèvement des matériels adultes, des files de plusieurs cellules successives accumulent des VP.

Le nombre de cellules impliquées dans ces files est plus ou moins important selon la saison. Ainsi, chez les adultes, ce nombre est, dans la zone de référence fixée pour l'estimation semi-quantitative de la teneur en tanin, de l'ordre de 20 cellules tannifères en juillet (figure 32-7), et de seulement 5 cellules en octobre (figure 32-8). En octobre, on constate aussi, qu'au-delà de la zone de référence, le parenchyme médullaire contient des files formées d'une 20<sup>aine</sup> de cellules tannifères, comme en juillet dans la zone de référence (figure 32-5). Ces observations indiquent un ralentissement de la production de tanins dans la zone sous-jacente au SAM (= zone de référence) en automne. En outre, le nombre de cellules tannifères impliquées dans ces files tannifères est plus faible en octobre chez le matériel adulte végétatif que chez le matériel adulte reproducteur, ce qui permet de différencier les matériels adultes.

En conclusion, l'accumulation des tanins dans la zone de référence sous-jacente au SAM a lieu pendant la saison végétative et semble associée à l'intensité de l'activité organogène du SAM, ce qui permet de distinguer les matériels juvéniles et adultes, quel que soit le stade de prélèvement. Dans cette même optique, nous pouvons également différencier les 2 types de matériels adultes mais uniquement en octobre.

## IV.3 - DISCUSSION

### IV.3.1 - Identification des périodes d'activité

#### IV.3.1.1- Les plants juvéniles

##### ◆ *Morphologie*

L'étude morphologique des apex de plants en seconde saison de végétation a montré que les échantillons étudiés possèdent des euphylls chlorophylliennes caractéristiques de l'état juvénile jusqu'au mois de juillet puis la plupart des euphylls deviennent écailleuses.

Ainsi, au cours de la seconde saison de végétation, la taille des euphylls et leur capacité photo-assimilatrice diminuent. Ces diminutions s'accompagnent en automne, de la formation d'un bourgeon au moins en partie, écailleux où sont accumulés plusieurs nœuds et entre-nœuds qui ne s'allongeront que l'année suivante. L'apex des plants juvéniles suit alors une croissance prédéterminée (Jablanczy, 1971 ; Kremer, 1990) à la fin de la seconde saison de végétation.

**Un tel lien entre la longueur des euphylls et la croissance peut aussi être envisagé pour les périodes qui précèdent : Ainsi, une forte élongation des euphylls chlorophylliennes observées au printemps pourrait être liée à une croissance libre, et une élongation plus réduite des euphylls chlorophylliennes observée en juillet pourraient être liées à une croissance discontinue. En outre, nos résultats indiquent l'existence d'une période de ralentissement de l'activité organogénétique de l'apex en juillet. Les observations de Illy et Castaing (1966) indiquent aussi un ralentissement de la croissance en hauteur des semis de pin maritime à cette même période. Ces informations nous permettent de confirmer l'existence d'une croissance discontinue (Jablanczy, 1971 ; Kremer, 1990) et de situer, en juillet, la période de latence avant élongation des nœuds et des entre-nœuds.**

L'apex fonctionnerait de la façon suivante au cours de la seconde saison de végétation :

Au printemps, le SAM produit d'abord des ébauches foliaires qui s'allongent aussitôt (= croissance libre), puis, des ébauches foliaires qui sont accumulées dans un bourgeon qui devient latent en été. Ensuite, les nœuds et les entre-nœuds qu'il contient s'allongent (croissance discontinue) tandis que le SAM reprend son

activité organogène, ce qui a pour conséquence la formation d'un bourgeon partiellement écaillé qui s'allongera l'année suivante (croissance prédéterminée).

◆ *2 périodes d'organogenèse identifiées*

Les périodes de production d'ébauches foliaires par le SAM, sont, donc situées entre mars et avril, et en octobre/novembre, ce qui est toujours en accord avec la description de la croissance en hauteur mesurée par Illy et Castaing (1966). Pour trouver ces 2 périodes; nous avons étudié la morphologie de l'apex, et observé une légère diminution de la taille du SAM entre mars et avril et une augmentation du nombre d'ébauches foliaires de taille réduite entre mars et avril et entre juillet et décembre. **Ces 2 périodes sont accompagnées de la formation de primordia gemmaires à l'aisselle des ébauches néoformées.**

**Les périodes d'organogenèse ainsi décrites sont partiellement confirmées par l'évaluation semi-quantitative de la quantité relative d'ARN sur une coupe longitudinale radiale du SAM.** On observe bien une augmentation de ce paramètre pendant la saison de végétation confirmant les observations de Monteuis (1987) sur le séquoia géant. Mais ce phénomène n'est observé qu'à la seconde période d'organogenèse en automne. A l'inverse, la quantité relative d'ARN est stable pendant la première période d'organogenèse, et elle est peu importante par rapport à celle observée en automne. Cette différence peut être attribuée notamment :

- à un problème de détection. La surface relative d'ARN pourrait avoir été sous-estimée. Des test biochimiques permettraient de le vérifier.
- ou, à un ralentissement de l'activité méristématique au moment du prélèvement en avril. En effet, nous avons pu décrire une production d'ébauches foliaires entre mars et avril, mais pas au moment même du prélèvement en avril. Cette hypothèse peut donc être vérifiée par des prélèvements plus nombreux et plus rapprochés au printemps.
- ou à un fonctionnement de l'apex différent au cours de l'année. La croissance libre n'induirait pas de variation de la quantité moyenne d'ARN mesurée sur un ensemble d'échantillons. La croissance prédéterminée s'exprimerait alors par une augmentation de la surface de cellules actives dans le SAM.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

### IV.3.1.2 - Les plants adultes végétatifs et reproducteurs

#### IV.3.1.2.1 - Description des activités de croissance et d'organogénèse

A l'opposé du matériel juvénile dont les bourgeons ne mesurent jamais plus de 1 cm, chez les adultes, le bourgeon terminal écaillé peut mesurer jusqu'à 10 cm en fin de saison de végétation. Ce qui nous a conduit à faire une description globale de ces bourgeons puis à observer uniquement leur extrémité apicale. Ainsi, les évolutions saisonnières de la morphologie du bourgeon terminal et de la morphométrie des apex sont similaires chez les plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs. Il ressort de cette étude, l'existence de plusieurs phénomènes qui se succèdent au cours d'une saison de végétation (figure 34) :

#### - A l'échelle macroscopique :

- **Au printemps**, on observe l'élongation des entre-nœuds du bourgeon terminal et des bourgeons auxiblastiques développés l'année précédente et initiés 2 ans plus tôt,

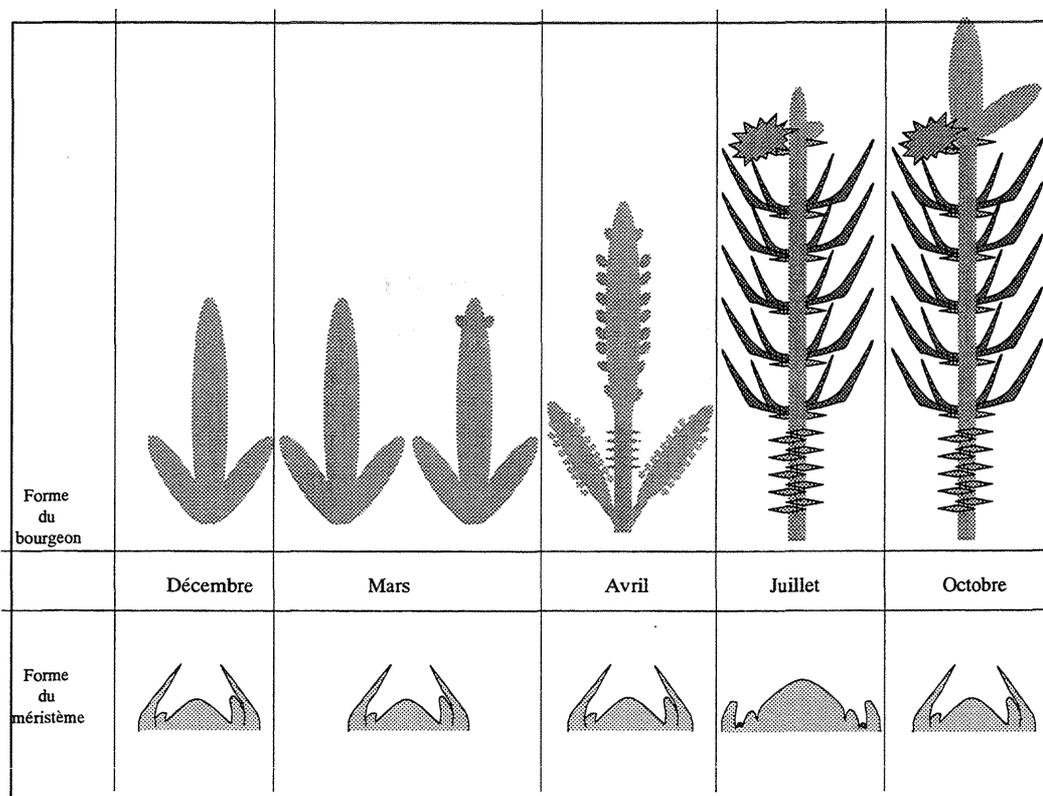
Cette élongation débute à la base du bourgeon au niveau de la zone d'écailles à aisselle vide, avec le "gonflement" simultané des bourgeons axillaires situés au-dessus de cette zone.

Puis elle se poursuit de façon acropète et s'accompagne de l'élongation des pseudophylles initiées par les bourgeons brachyblastiques qui étaient gonflés au début de la période d'élongation.

- **En été et en automne**, on observe une accumulation de nouveaux organes dans le bourgeon terminal et dans les bourgeons auxiblastiques initiés l'année précédente.

#### - A l'échelle microscopique, on observe :

- la formation de nouvelles ébauches foliaires **pendant toute la saison de végétation**,
- l'initiation des primordia gemmaires **en été**, suivi de leur développement en bourgeons axillaires **en automne**,
- et enfin, l'augmentation du volume du dôme apical au **printemps**.



**figure 34: Modifications de l'apex caulinaire lié aux différentes activités**

La période de formation des nouveaux organes a été déduite de l'examen de la succession des organes néoformés qui, au terme de la saison de végétation forme un cycle morphogénétique "miniature". La teneur en ARN varie dans le SAM en fonction de ces périodes :

◇ Ainsi, en avril, les ébauches de bourgeons axillaires en développement au sein de l'apex sont éloignés du SAM par plusieurs écailles à aisselle vide. Le fait qu'en juillet, on observe des primordia gemmaires à l'aisselle de nouvelles ébauches au-dessus d'écailles à aisselle vide est un argument supplémentaire pour situer la formation des écailles à aisselle vide entre mars et juillet, pendant la période d'élongation du bourgeon formé l'année précédente.

La teneur en ARN à ce stade est alors intermédiaire entre le minimum observé en hiver, et le maximum observé en été.

◇ Puis, en été, on observe un changement de fonctionnement de l'apex caractérisé par la formation de primordia gemmaires à l'aisselle de nouvelles écailles produites. Nous pouvons alors en déduire que la formation des écailles axillant les brachyblastes a lieu pendant cette période alors que l'activité du

méristème indiquée par le test de Brachet est maximale et que le processus d'élongation est terminé.

◇ La présence de cônes femelles en formation, dont les écailles ovulifères sont apparentes, n'est observée qu'en décembre ou en mars ; ce qui permet d'en déduire que ces inflorescences ont pris naissance probablement à la fin de la saison végétative (entre octobre et décembre).

◇ Les bourgeons auxiblastiques naissent à la même époque puisque les auxiblastes et les inflorescences femelles sont situés au même niveau sur le cycle morphogénétique. Néanmoins, nous n'avons pu les identifier :

- qu'en avril par leur position apicale. Des écailles à aisselle vide sont observées juste au-dessus de ces bourgeons axillaires.
- et plus clairement en juillet par leur taille relativement importante.

Pendant cette même période (automne), la teneur en ARN diminue dans le SAM, et elle est intermédiaire entre celle observée en juillet (maximale) et celle observée en décembre (minimale).

Le déroulement de ces activités morphogénétiques est le même chez *P. banksiana* (Curtis & Popham, 1972) et chez *P. taeda* (Greenwood, 1980), cependant les auteurs identifient la période de différenciation des bourgeons auxiblastiques au début de l'automne. En outre, chez les plants polycycliques, l'apex est encore actif pendant l'hiver et fabrique le second cycle morphogénétique à cette période (David, 1966).

L'ensemble de ces événements a pour conséquence la formation d'un bourgeon écailleux contenant l'ensemble des organes qui entreront en croissance l'année suivante. Cependant, les futurs auxiblastes et inflorescences femelles nécessitent 2 années successives pour se développer, ce qui répond à la définition de la croissance prédéterminée (Kremer, 1990).

Les variations saisonnières de la teneur relative en ARN montre une augmentation de la quantité relative d'ARN pendant la saison de végétation qui est vérifiée chez le séquoia géant (Monteuuis & Gendraud, 1987). De plus, cet accroissement peut être attribué à une production d'ébauches foliaires. Dans le cadre de notre étude, la teneur relative d'ARN semble directement liée à l'importance de cette activité. En effet, elle augmente pendant la formation des écailles à aisselle vide, et atteint son maximum en juillet au moment où sont produits des écailles et des primordia gemmaires. Elle diminue ensuite bien qu'il y ait

encore production d'ébauches foliaires, ce qui indique un ralentissement de l'activité du SAM au moment où sont différenciés les bourgeons latéraux. L'activité du SAM ne semble donc pas directement lié à la différenciation des bourgeons latéraux.

Les variations de taille du méristème résultent vraisemblablement de ces processus. Minimum en hiver et à la période de débourrement, la taille du SAM est maximale en période d'organogenèse intense. Curtis et Popham (1972) rapportent des résultats similaires sur *P. banksiana* étudiés sur des intervalles de temps plus rapprochés et précisent néanmoins, que la taille du SAM est plus faible en mars. Ainsi, ces différences observées au début de la saison de végétation, peuvent être attribuées à l'espèce ou bien à un échantillonnage différent.

Au printemps, nous avons observé le grossissement du SAM en même temps que la production d'écaillés à aisselle vide, ce qui indique que l'activité mitotique du SAM permet à la fois l'accroissement de son volume et l'organogenèse. Ensuite, en été, le SAM de volume important présente une activité mitotique qui permet :

- sans doute au moins au début de l'été, l'entretien du volume du SAM,
- et, la production des ébauches foliaires qui axillent des primordia gemmaires.

Une formation d'euphylls pendant l'augmentation du volume du SAM a aussi été décrite chez les semis de *P. banksiana* (Kremer, 1984). Nos observations montrent qu'il en est de même chez les plants adultes de pin maritime.

A la fin de l'été, le volume du dôme méristématique diminue suite à la production d'ébauches foliaires, qui auraient été, en quelque sorte, préformées.

Les variations de volume du dôme méristématique sont donc associées à l'activité organogénétique du SAM comme les fluctuations de la quantité relative d'ARN. Mais, il faut être prudent quant à l'utilisation des variations de la taille du SAM comme indicateur de l'activité organogène, ou lors d'une étude comparative. En effet, nous avons suggéré que la position de dominance du bourgeon terminal pouvait faire varier la taille du SAM. D'autres études montrent qu'elle varie aussi en fonction de la position du bourgeon sur l'arbre (Owston, 1969) et de l'exposition aux rayons lumineux (Riding, 1976 a). De plus, l'intensité et la durée des activités d'organogenèse et d'élongation varient en fonction des conditions environnementales (Pollar & Logan, 1977) et de l'origine géographique de *P. pinaster* (Kremer & Roussel, 1986). On peut donc considérer que la chronologie générale des principales phases d'activité apicales est applicable à l'ensemble de l'espèce mais

qu'elle présente dans son expression, d'importantes variations en fonction des conditions environnementales et du génotype.

#### ***IV.3.1.2.3 - Hypothèse : Les organes forment des puits ou des sources selon la période***

Selon Debazac (1966), il y a correspondance entre l'amplitude d'élongation et la présence de certains éléments morphologiques dans le cas des pousses monocycliques. L'auteur rapporte les conclusions des travaux de Sacher (1954) qui établit une relation entre l'élongation, l'activité mitotique du SAM, et le devenir des primordia gemmaires. Nos résultats obtenus à partir de l'analyse des bourgeons issus de plants adultes confirment ces travaux. En effet, la surface du méristème est maximale en juillet, période de formation des futurs brachyblastes, elle est plus faible lorsque les écailles à aisselle vides se forment en avril, ou lorsque les inflorescences femelles et les auxiblastes sont produits. Ces observations nous conduisent à considérer le fonctionnement du bourgeon comme un complexe associant sources et puits.

**Les différentes variations saisonnières que nous venons de décrire peuvent en effet, être considérées en terme d'interactions entre des zones puits consommatrices de métabolites, et des zones sources qui sont au contraire, productrices.**

Les mécanismes de différenciation et d'allongement de la tige ont déjà fait l'objet des travaux de David (1966). Associés à nos observations, ils permettent de définir la chronologie des événements intervenants lors de la croissance des bourgeons et de décrire les variations saisonnières du système source-puits (tableau 6).

L'intensité de la source varie également en fonction de la longueur du jour (maximale en juillet) et de l'efficacité de l'appareil photosynthétique qui chez *P. radiata* est optimal à 10-15 C° (Benecke, 1980 ; Greer *et al.*, 2000). Les températures automnales pourraient permettre à l'appareil photosynthétique de *P. pinaster* d'être plus efficace et d'approvisionner suffisamment les nombreux puits apparaissant à cette période. La période de repos hivernal induit une diminution de ces relations.

**Tableau 6: Interprétation en terme de source-puits des variations saisonnières des activités de croissance et d'organogenèse au niveau du bourgeon terminal**

	avril	juillet	octobre
puits	<ul style="list-style-type: none"> <li>-élongation de la tige</li> <li>-élongation des brachyblastes</li> <li>-production des écailles</li> <li>-élargissement du méristème</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-production de nouvelles ébauches foliaires</li> <li>-production des primordia gemmaires à l'aisselle des ébauches foliaires</li> <li>- développement des bourgeons auxiblastiques formés l'année précédente à la base du bourgeon terminal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-production de nouvelles ébauches dans le bourgeon terminal</li> <li>-développement des primordia gemmaires en bourgeons latéraux</li> <li>-production de nouvelles ébauches dans les bourgeons auxiblastiques</li> </ul>
source	<ul style="list-style-type: none"> <li>-pseudophylles photosynthétiquement actives allongées les années précédentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-pseudophylles nouvellement allongées</li> <li>-pseudophylles photosynthétiquement actives appartenant aux cycles morphogénétiques plus âgés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-pseudophylles nouvellement allongées</li> <li>-pseudophylles photosynthétiquement actives appartenant aux unités de croissance précédentes</li> </ul>

#### **IV.3.1.3 - Différenciation entre les différents types de matériels**

Les caractéristiques morphologiques et morphométriques des bourgeons et le test de Brachet ont révélé des différences de fonctionnement notables entre les matériels juvéniles et les matériels adultes. Ainsi, la taille du SAM, sa teneur en ARN, le nombre d'ébauches foliaires de taille réduite sont autant de paramètres qui permettent de différencier ces matériels. Elle montre une activité organogène ralentie en juillet chez les juvéniles et, ininterrompue pendant la saison de végétation chez les adultes.

##### **◆ Le fonctionnement de l'apex semble donc différent :**

◇ En effet, **chez les matériels adultes**, qu'ils soient végétatifs ou reproducteurs :

- de mars à juillet, le méristème grossit et produit des ébauches foliaires qui ne s'allongent pas à proximité de l'apex,
- puis de juillet à octobre, le méristème produit toujours des ébauches foliaires qui cette fois, s'allongent aussitôt.

Par conséquent, il semble que le grossissement du méristème n'ait pas lieu en même temps que l'allongement précoce des ébauches foliaires néoformées. Dans ce cas, on peut

présumer l'existence d'une distribution des tâches dans le temps, laquelle peut être le résultat d'une gestion des métabolites qui consiste à alimenter le grossissement du méristème puis celui-ci devenant un puits plus faible, il permettrait l'allongement des ébauches.

◇ **Chez les matériels juvéniles**, la taille du méristème et la hauteur des ébauches foliaires adjacentes varie relativement peu au cours des saisons et le pourcentage d'ébauches foliaires de taille inférieure à 105µm est plus important que chez les adultes. Dans ce cas, la formation des ébauches serait constamment privilégiée par rapport à leur élongation lorsqu'elles sont encore adjacentes au méristème. Celles-ci s'allongent lorsqu'elles s'éloignent du méristème repoussées par les nouvelles ébauches.

◆ **Le test de Brachet souligne également les différences entre les adultes et les juvéniles.**

◇ Ainsi, la quantité relative d'ARN est élevée pendant toute la saison de végétation **chez les adultes**. Ces résultats corroborent les observations de Monteuis (1989) sur le séquoia géant, qui montrent que la quantité d'ARN augmente pendant le débourrement, unique période étudiée pendant la saison de végétation par les auteurs. Nos résultats suggèrent plus précisément que cette augmentation pourrait être liée à l'intensité de l'organogenèse. Ainsi, en juillet, la quantité relative d'ARN est maximale alors que les primordia gemmaires sont en formation.

◇ **Chez les juvéniles**, cette quantité reste stable au printemps alors qu'une activité organogène est montrée par ailleurs, puis elle augmente fortement en automne, période à laquelle le bourgeon devient écailleux et acquiert des caractéristiques adultes.

**Ces différences entre les juvéniles et les adultes résultent probablement du mode croissance particulier aux premières années de l'arbre. La mesure de la quantité relative d'ARN permet également de différencier les adultes végétatifs des adultes reproducteurs mais dans une moindre mesure et uniquement en décembre.** Ces résultats corroborent ceux de Monteuis et Gendraud (1987) sur le séquoia qui montrent que le matériel âgé présente un rapport ARN/ADN plus faible chez les individus âgés pendant la période de repos.

Des études liant ce type d'observations à l'application dans le domaine de la multiplication végétative ont montré qu'une forte concentration en ARN dans les apex des boutures serait

indicateur de l'aptitude à l'enracinement chez les plants adultes de *Ficus pumila* (Davies, 1984) ou de *Pinus radiata* (Riding, 1976 b). Nos résultats pourraient donc constituer une base pour l'étude de l'aptitude au bouturage chez *P. pinaster*. Notons, néanmoins, qu'il est indispensable de considérer ce type de marqueur en fonction des variations saisonnières.

◆ **Quant à la présence de bourgeons latéraux à la base du bourgeon terminal, elle pourrait aussi constituer une caractéristique du matériel adulte végétatif.** Ainsi, 95% des bourgeons prélevés sur des plants adultes végétatifs sont entourés de bourgeons latéraux alors que ce chiffre est de seulement 60% chez les plants adultes reproducteurs. Ces résultats montrent une tendance à la diminution du nombre de bourgeons latéraux situés dans la partie supérieure du houppier au cours de l'âge. L'importance des puits localisés à la base du bourgeon terminal paraît donc diminuer avec l'âge.

Ainsi, quelque soit la période de l'année, il est aisé de différencier les matériels juvéniles des matériels adultes en utilisant les paramètres morphologiques (forme du bourgeon terminal et taille des euphylls), et morphométriques ( taille du SAM, taille des ébauches foliaires, estimation de la quantité d'ARN). En revanche, pour différencier les adultes végétatifs des adultes reproducteurs, il est nécessaire de noter la présence de bourgeons latéraux à la base du bourgeon terminal, ou bien d'estimer le contenu en ARN du SAM pendant la période de repos, mais, dans ces 2 cas, la discrimination n'est pas absolue.

## IV.3.2 - Evolution du contenu en réserves

### IV.3.2.1 - Triglycérides (figure 35)

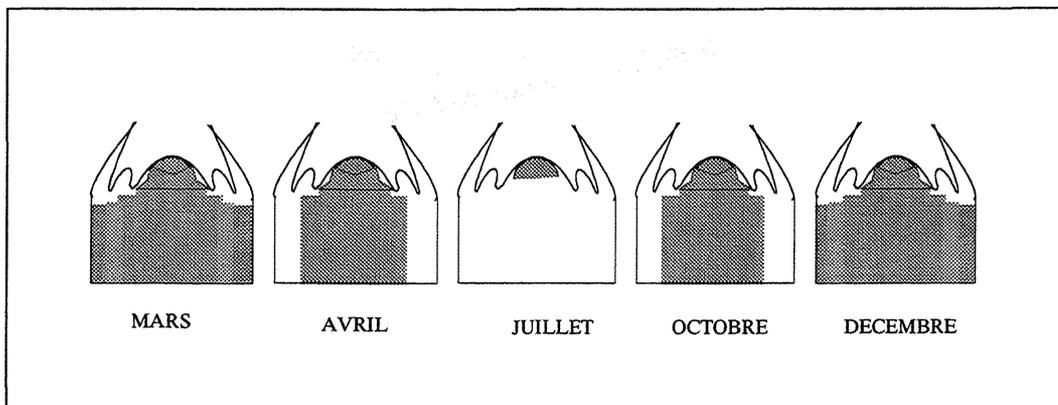


Figure 35: Schéma représentant l'évolution de la distribution des triglycérides au cours des saisons identique chez les matériels juvéniles et adultes.

◆ L'évolution saisonnière de la répartition des triglycérides ne varie pas dans les 3 types de matériel étudiés. Le bourgeon terminal accumule des réserves lipidiques dans l'ensemble de ses tissus juste avant la période hivernale. Il utilise ensuite ces réserves pendant l'élongation des tissus préformés selon une séquence spatio-temporelle définie.

Les réserves lipidiques disparaissent d'abord totalement du cortex et des tissus conducteurs au début de l'élongation de la tige (début de printemps); puis, dans un deuxième temps, ces réserves sont mobilisées dans le parenchyme médullaire (fin de printemps). Cette mobilisation des lipides progresse ensuite le long de l'axe jusqu'au méristème. Les dernières traces de triglycérides sont, en effet, détectées dans le méristème central en été alors qu'à cette période, l'élongation de la tige est terminée.

A la fin de la période d'organogenèse (automne), les triglycérides sont à nouveau accumulés dans le bourgeon d'abord dans le SAM (CMC et PM) et dans le parenchyme médullaire puis dans le parenchyme cortical et les tissus conducteurs.

Par conséquent, cette accumulation automnale s'effectue « dans le sens inverse » de celui de la mobilisation printanière.

◇ L'important stockage de triglycérides observé en hiver pourrait permettre de résister au froid (Krasowski et Owens, 1990). Les lipides hydrophobes constitueraient ainsi une forme d'énergie maximale pour une masse minimale par rapport aux autres types de réserves (Mohr et Schopfer, 1995). Ces propriétés sont importantes, à la fois pour supporter la rigueur hivernale et pour approvisionner les sites de croissance au printemps.

Une importante concentration de lipides de réserve est aussi observée en hiver chez les angiospermes (tilleul, platane) et chez les gymnospermes (pins, *Pseudotsuga menziesii*) (Catesson, 1964 ; Cecich, 1979 ; Cragg & Willison, 1980 ; Krasowski & Owens, 1990). Ces lipides seraient partiellement mobilisés pendant la période hivernale dans le cas du tilleul (Cragg & Willison, 1980). Cette hypothèse serait confirmée chez le Douglas, par une modification du degré de saturation des acides gras en hiver (Krasowski & Owens, 1990). Dans le cadre de notre étude, la coloration histocytologique des lipides de réserve ne nous permet pas d'observer une hydrolyse partielle de ces composés, ni de détecter une quelconque modification de leur composition pendant l'hiver.

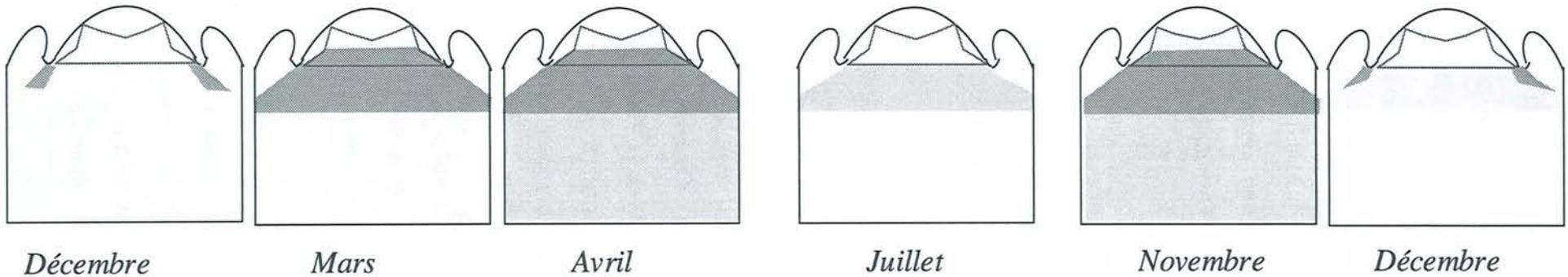
◇ En revanche, l'hydrolyse de la majorité de ces réserves a lieu au printemps et fournit ainsi les substrats nécessaires au développement du bourgeon au printemps, notamment à la formation des membranes riches en phospholipides (Cecich, 1979).

Chez le platane, la dynamique spatiale de mobilisation des triglycérides est semblable à celle décrite plus haut, au cours de la saison de végétation (Catesson, 1964). Cet auteur a montré néanmoins, une disparition totale de ces réserves dans le SAM à la fin de l'élongation. Cette différence par rapport à nos observations peut être attribuée soit à l'espèce, soit à notre plan de prélèvement qui ne suffirait pas pour observer cette disparition totale des triglycérides dans l'apex.

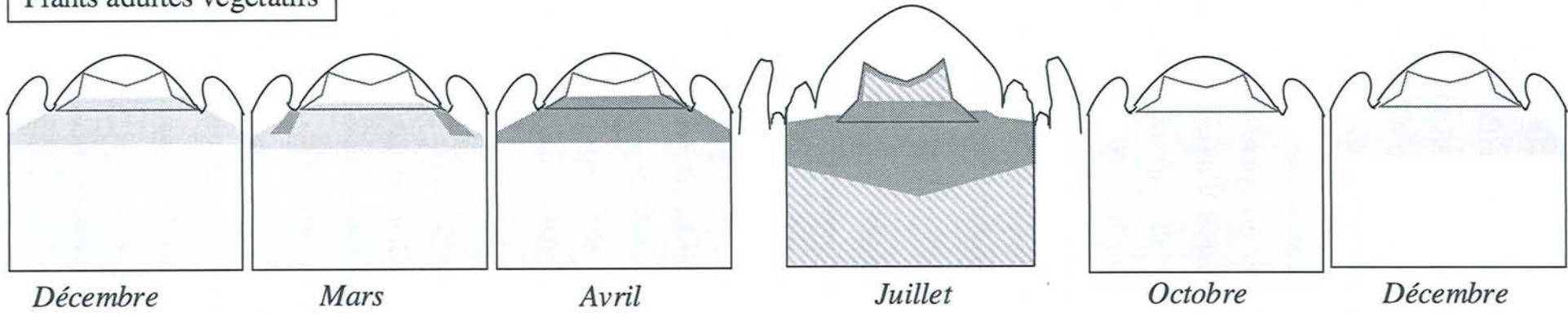
◇ Une néosynthèse de triglycérides est aussi observée par Catesson (1964). Cette accumulation débute dans le CMC indiquant, selon l'auteur, une faible activité de ces cellules. Ce processus se poursuit en automne dans l'ensemble de l'apex, et pourrait être stimulé par une diminution de la température (Krasowski & Owens, 1990).

◆ L'étude de la répartition des réserves lipidiques ne permet pas de différencier les plants juvéniles des plants adultes. D'autres auteurs ont également observé l'absence de différences entre les âges pour ce paramètre sur des bourgeons en élongation prélevés au sommet de plants d'épicéa (Olsson *et al.*, 1994). En revanche, ils ont montré une variation de la composition des lipides membranaires en fonction de l'âge du plant. La

Plants de 1 an



Plants adultes végétatifs



Plants adultes reproducteurs

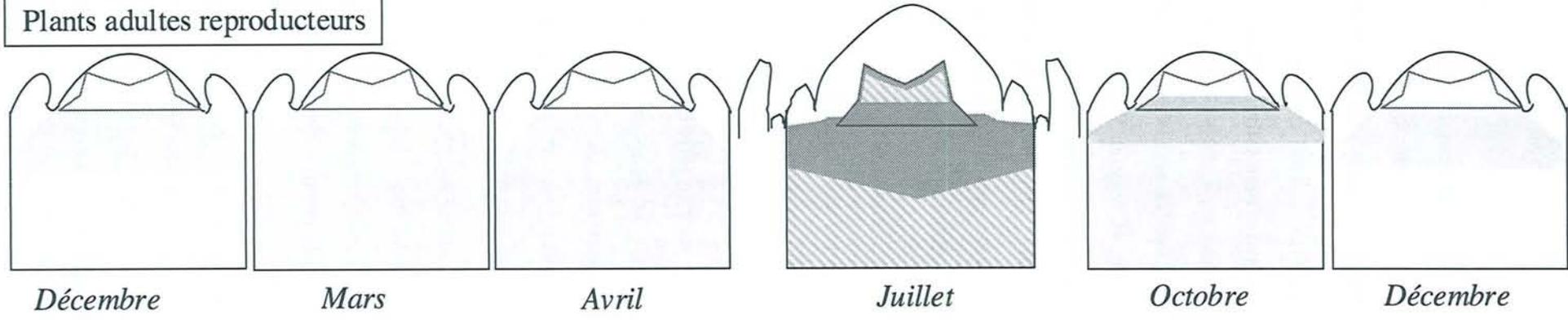


Figure 36: Evolution de la distribution des réserves amylacées

différenciation des matériels juvéniles et adultes par la présence de substances lipidiques dans les apex de pin, devrait donc être abordée par l'analyse du contenu en phospholipides. Nos résultats soulignent néanmoins, l'importance des variations saisonnières du contenu en triglycérides dans l'apex.

#### IV.3.2.2 - L'amidon (figure 36)

Contrairement aux observations réalisées à partir de l'étude des réserves lipidiques, le contenu en amidon des apex varie au cours des saisons et différemment selon le type de matériel considéré (juvénile, adulte végétatif, adulte reproducteur). L'accumulation d'amidon est cependant minimale en hiver dans les 3 cas. **Pendant la saison végétative, on observe une accumulation importante d'amidon avec un maximum en avril et octobre dans le cas des juvéniles, et uniquement en juillet dans le cas des adultes.**

◇ **Chez les juvéniles, les périodes d'accumulation d'amidon correspondent aux périodes d'organogenèse intense avec initiation de primordia gemmaires en avril et octobre. Par conséquent, il semble que les périodes d'organogenèse, et plus particulièrement l'initiation des bourgeons latéraux soient liées au stockage de l'amidon.**

◇ **Chez les adultes, la situation est identique. Une forte accumulation des réserves amylacées coïncide avec la période d'organogenèse optimale en juillet, période pendant laquelle des primordia gemmaires sont aussi initiés. Les variations saisonnières sont à peu près identiques chez les adultes végétatifs et les adultes reproducteurs. Cependant, l'accumulation d'amidon est plus importante chez les adultes végétatifs en avril, et dans une moindre mesure, chez les adultes reproducteurs, en octobre ; ce qui permet de différencier aussi ces 2 types de matériel.**

Une importante accumulation d'amidon dans les matériels juvéniles, adultes végétatifs et adultes reproducteurs a donc lieu pendant les périodes de forte activité organogène. La différenciation des 2 matériels adultes pourrait être due à un décalage dans le temps des activités du SAM. Ainsi, les différences au niveau de l'apex entre les 3 types de matériels intègrent à la fois les activités méristématiques et la gestion des réserves.

Une forte accumulation d'amidon pendant la saison végétative et tout particulièrement pendant la formation de nouvelles pièces foliaires a été observée chez d'autres espèces,

aussi bien des conifères, tels que le pin sylvestre (Hejnowicz, 1979) et le Douglas (Krasowski & Owens, 1990), que des feuillus comme le platane (Catesson, 1964). Les jeunes feuilles de chêne accumulent également de l'amidon pendant leur croissance (Alaoui-Sossé, 1996). L'accumulation d'amidon semble donc être une caractéristique générale des organes en croissance. Le stockage d'amidon dans les apex caulinaires de pin pourrait résulter de la mise en réserve des photosynthétats ou bien de la mobilisation des lipides pendant la saison végétative (chapitre III) ou encore de l'hydrolyse des polyphénols (Hejnowicz, 1979). Mais pour résoudre cette question, il serait nécessaire d'approfondir l'étude du métabolisme des lipides et des sucres au sein de l'apex.

En automne, la présence d'amidon pourrait aussi correspondre à une préparation au repos hivernal permettant une acquisition de la tolérance au froid. Ce phénomène a été décrit chez le pin maritime au niveau de la tige (Greer *et al.*, 2000) : L'hydrolyse de l'amidon est alors rapide, et produit du glucose et du fructose qui seraient directement responsables de la résistance au froid. Nos résultats montrent que, même si nous n'avons pas dosé les sucres solubles, ce phénomène pourrait s'étendre à l'apex.

Il est important de souligner que l'accumulation d'amidon en automne précède l'accumulation hivernale des triglycérides, ce qui pourrait indiquer un lien entre ces 2 composés. Il serait donc intéressant d'étudier en parallèle l'évolution des teneurs en lipides et en sucres solubles et insolubles localisés dans l'apex et leur implication dans le processus d'acquisition de la tolérance au froid.

#### **IV.3.2.3 - Les tanins**

L'apparence des tanins dans l'apex varie en fonction du type de matériel considéré et des saisons.

◇ **En effet, les tanins peuvent apparaître dans la vacuole soit sous la forme de granule (GP), soit remplir totalement le volume vacuolaire (VP).** Bilková *et al.* (1999) ont décrit les mêmes types de tanins dans les bourgeons d'épicéa, et les ont identifiés comme des tanins condensés (catéchine + leucoanthocyanidine). Les VP peuvent apparaître dans plusieurs cellules successives et former des files de cellules tanifères.

◆ **L'accumulation des tanins varie dans la zone de référence (parenchyme médullaire sub-apical) en fonction du matériel:**

En effet, les VP et GP apparaissent en mars et avril dans les apex de plants juvéniles. Puis, des files de cellules contenant des VP apparaissent à la fin de la seconde saison de croissance et chez tous les matériels adultes. Le nombre de cellules impliquées dans ces files peut augmenter avec l'âge provoquant une accumulation supérieure dans les adultes reproducteurs par rapport aux adultes végétatifs en fin de saison de croissance (octobre); ce qui suggèrerait que le nombre de ces cellules serait indicateur de l'état reproducteur.

◆ **L'accumulation de tanins dans la zone de référence varie aussi en fonction des saisons.** En effet, nous avons montré une importante accumulation de tanin dans la zone de référence pendant les périodes d'activité : en mars et octobre/novembre chez les juvéniles et pendant toute la saison de végétation avec un maximum en juillet, chez les adultes végétatifs et reproducteurs.

Ceci indique, comme pour l'amidon, un lien étroit entre la production des ébauches foliaires et la teneur en tanin dans l'apex. Néanmoins, il semble que l'accumulation des tanins sous le SAM a lieu indépendamment de l'initiation des primordia gemmaires puisque nous n'avons détecté qu'une faible quantité relative de tanins en avril de la seconde saison de végétation.

**Ainsi, les variations d'apparence et de teneur relative des tanins dans l'apex montrent qu'ils sont produits pendant les périodes d'organogenèse dans le méristème médullaire, et les cellules du parenchyme médullaire sous-apical qui en dérivent. Il en découle la formation de files de cellules tannifères comprenant un nombre variable de cellules.**

◇ Selon Bilková *et al.* (1999), les GP correspondent aux premières formes de polyphénols accumulés, leur fusion donnant naissance aux tanins vacuolaires (VP). Puis, lorsque les cellules tannifères se divisent, les cellules filles conservent la faculté d'accumuler des tanins pour former des files de cellules tannifères. En outre, Hejnowicz (1979) observe des mitoses avec "partage" des tanins entre les cellules filles dans les bourgeons de pin sylvestre. Ces résultats suggèrent que l'aptitude à produire des tanins est acquise très tôt au cours de la différenciation cellulaire.

◇ **Plusieurs fonctions des tanins ont été évoquées:**

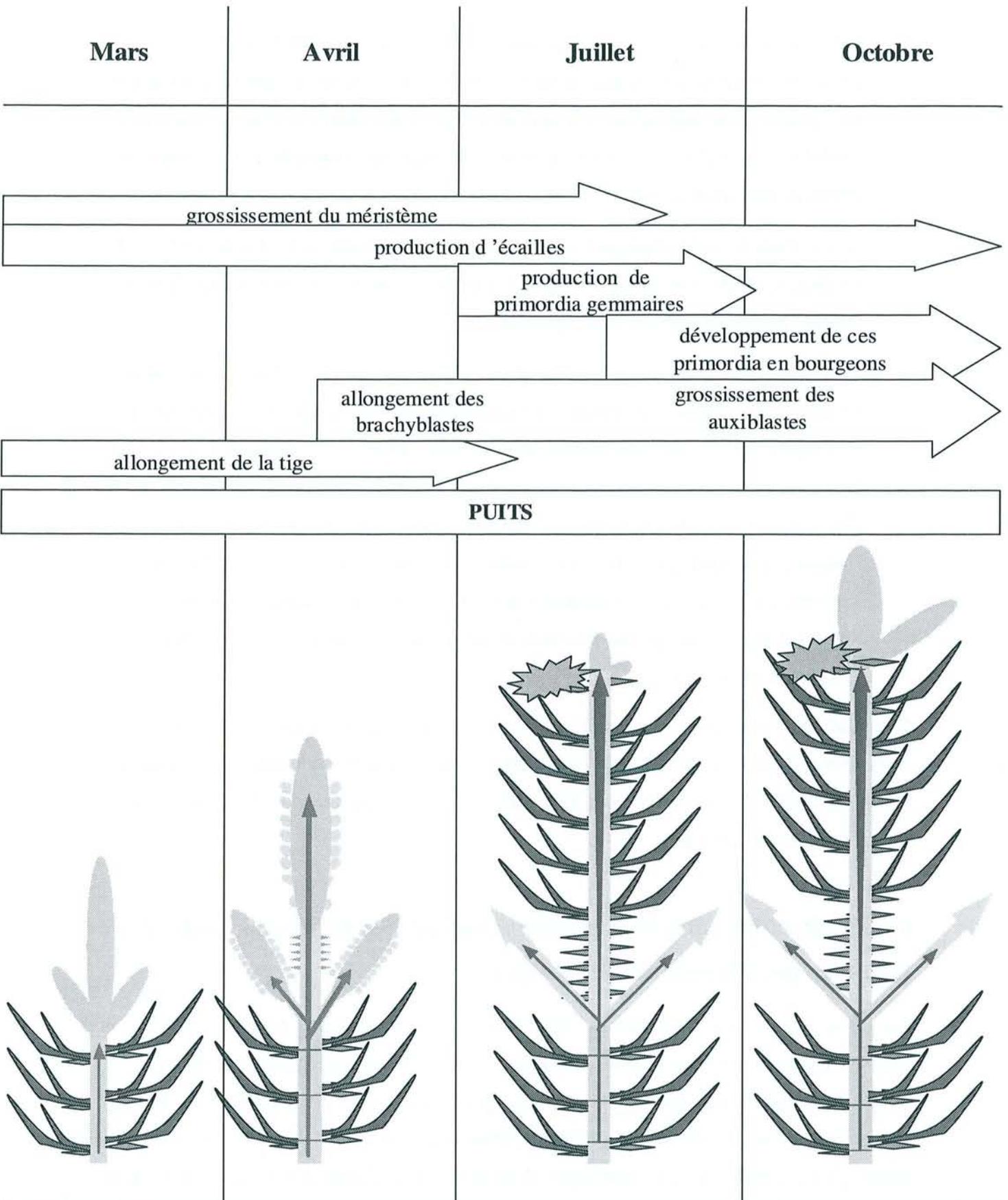
- Les tanins en étant associés à des sucres, pourraient assurer une fonction de réserve (Hejnowicz, 1979 ; Bussoti *et al.*, 1998)

- Ils confèreraient une résistance au froid hivernal (Bilková, 1999). La teneur réduite en tanins observée en octobre et en décembre dans la zone de référence ne semble pas vérifier cette hypothèse. En revanche, les tanins observés dans le parenchyme médullaire au delà de la zone de référence chez les matériels adultes pourraient effectivement jouer ce rôle.
- Les tanins seraient impliqués dans le processus de morphogenèse pendant la saison végétative (Owens & Molder, 1976). L'accroissement de son contenu pendant cette période pourrait accréditer cette hypothèse.
- Ils pourraient aussi jouer un rôle dans la détoxification des cellules (Takahama & Honiki, 1997). Ainsi, l'importante accumulation de polyphénols observée pendant les périodes d'activité méristématique dans la zone sous-apicale pourrait indiquer une implication de ces composés dans l'activité cellulaire. En outre, les processus de détoxification sont d'autant plus nécessaires que l'activité est intense. Dans cette optique, une quantité plus importante de tanins chez les matériels adultes reproducteurs que chez les adultes végétatifs récoltés en octobre, pourrait être liée soit à un léger décalage des périodes d'activité de ces matériels, soit à la formation d'inflorescences femelles.

Il résulte donc de ces hypothèses que les tanins observés dans les apex de pin pourraient avoir de multiples fonctions. Il serait donc intéressant d'identifier la nature des polyphénols accumulés dans les bourgeons de pin afin de mieux appréhender leur rôle dans le fonctionnement du bourgeon.

#### **IV.3.3 - Relation entre les variations saisonnières de l'organogenèse et de la gestion des métabolites : Hypothèse**

Les résultats obtenus au travers des études morphologiques, morphométriques et histocytologiques nous ont permis d'observer diverses modifications au sein de l'apex au cours du cycle annuel de végétation. Les particularités de chaque type de matériel (juvéniles, adultes végétatifs et adultes reproducteurs) semblent dépendre, au moins en partie, d'un contrôle d'origine trophique. A la manière de David (1966) qui a proposé un modèle de la gestion des réserves dans l'arbre adulte de pin maritime en fonction de l'activité d'élongation de la tige, nous nous proposons de réaliser le même type de



**Figure 37: Variations possibles de l'intensité des sources et des puits au niveau du bourgeon terminal entre les périodes de prélèvement de matériel adulte**

démarche au niveau du SAM en tenant compte des différentes phases du développement du cycle morphogénétique (figure 37).

#### IV.3.3.1 - Les adultes

##### → Formation des écailles stériles (au printemps):

La formation des écailles stériles et le grossissement du méristème ont lieu en même temps que l'élongation de la tige et des pseudophylles. Ces organes en formation constituent ainsi des puits importants. L'hydrolyse des réserves lipidiques contenues dans le bourgeon, associée au flux de photosynthétats provenant des pseudophylles allongées l'année précédente, pourraient alimenter ces puits. L'accumulation de l'amidon débute alors, et constituerait une forme de réserve rapidement hydrolysable directement sur les sites en croissance.

##### → Formation des écailles axillant les bourgeons latéraux (à partir du début de l'été):

Des écailles axillant des primordia gemmaires sont ensuite fabriquées. Au même moment, on observe au niveau de la tige allongée au printemps:

- une augmentation de la taille des bourgeons auxiblastiques situés à la base du bourgeon terminal,
- et une activité photosynthétique des pseudophylles qui s'ajoute à celle produite par les pseudophylles allongées l'année précédente.

Cette période d'organogenèse intense concorde avec une importante accumulation d'amidon sous le SAM. Ceci suppose l'existence d'un important flux d'éléments nutritifs apporté pendant cette période qui alimenterait l'activité apicale et la mise en réserve transitoire d'amidon comme cela est observé dans le cas des semis. Cette mise en réserve pourrait avoir un rôle tampon en stockant temporairement les excès de nutriments. Ainsi, la formation des euphylls et l'initiation de primordia gemmaires observées à cette période semblent liées à l'approvisionnement de l'apex en métabolites. Les polyphénols accumulés simultanément, pourrait, en outre, permettre de détoxiquer l'apex dont les cellules sont le siège de cette intense activité.

En même temps que sont initiés les bourgeons axillaires pendant l'été jusqu'à l'automne (= activité consommatrice d'énergie), s'ajoutent en automne l'accumulation de triglycérides qui nécessite aussi de l'énergie. Les éléments nutritifs seraient alors alloués à l'ensemble de ces activités.

### → Différenciation des bourgeons latéraux :

Le même type de raisonnement peut être appliqué au devenir des primordia gemmaires contenus au sein du bourgeon terminal. En effet, même si la formation des bourgeons destinés à former des auxiblastes n'a pu être directement observée, la présence d'ébauches d'inflorescence femelle localisées au même niveau sur le cycle morphogénétique indique qu'ils sont initiés à la fin de la saison végétative. Cependant, en octobre et décembre, nous n'avons relevé aucun signe permettant de distinguer les futurs auxiblastes des futurs brachyblastes. Or, les bourgeons auxiblastiques sont observés à l'échelle macroscopique l'année qui suit leur initiation, à partir de juillet, période que nous supposons favorable pour l'approvisionnement en assimilats (pseudophylles nouvellement allongées et photopériode importante). La différenciation des bourgeons latéraux en auxiblastes serait donc tardive et pourrait dépendre de la disponibilité en sucres au moment de leur entrée en croissance. En revanche, les bourgeons brachyblastiques seraient différenciés lorsque le flux de nutriments serait moins important que lors de la différenciation des futurs auxiblastes. Néanmoins, la description de bourgeons de pin maritime réalisée par David (1966) montre :

- que les pseudophylles caractéristiques des brachyblastes, sont initiées au sein des bourgeons axillaires contenus dans le bourgeon terminal en hiver. Les flux d'éléments nutritifs sont alors, réduits à cette période.
- il montre également un développement plus important de certains bourgeons axillaires en novembre qui pourraient être les futurs auxiblastes. Ce dernier point remet en question notre hypothèse d'une différenciation tardive de ce type de ramification. Mais l'importance des flux en nutriments est sans doute déterminante pour cette différenciation en automne, et au printemps, pour l'accroissement de ces bourgeons auxiblastiques.

Ainsi, la différenciation des bourgeons axillaires en bourgeons brachyblastiques ou en bourgeons auxiblastiques semble liée à la disponibilité en nutriments.

La formation des inflorescences femelles a aussi lieu en automne. Elle serait régulée précocément par un certain nombre de gène (Mellerowicz *et al.*, 1998 ; Mouradov *et al.*, 1998) et dépendrait aussi de la photopériode. Cecich *et al.* (1994) ont en effet, montré une formation des cônes femelles pendant la diminution de la photopériode. Or, on sait que,

chez le pin, l'expression de certains gènes est photodépendante (Skinner et Timko, 1998). Bien que ces gènes soient impliqués dans la biosynthèse de la chlorophylle, rien n'exclut une régulation similaire de l'expression des gènes de la floraison (non démontré à l'heure actuelle chez le pin). D'autre part, la nutrition peut aussi exercer une influence sur la transition vers la phase reproductive (Mouradov *et al.*, 1998). Il n'est donc pas exclu, qu'au moment de leur formation, les bourgeons inflorescentiels puisent leur énergie dans les sucres solubles et les réserves amylopectines disponibles dans l'apex, leur disponibilité pourrait alors influencer ce processus. Comme lors de la formation des bourgeons axillaires, l'accumulation de polyphénols pourrait contribuer à la détoxification des cellules impliquées dans ces activités multiples.

#### **→ Période de repos**

La période de repos est caractérisée par une faible activité méristématique, une teneur minimale en polyphénols et en amidon, et maximale en triglycérides. La présence d'une quantité importante de lipides de réserve dans l'apex conférerait la résistance au froid. En outre, l'hydrolyse des triglycérides produit des métabolites énergétiques qui alimenterait les activités de l'apex en hiver (Cragg & Willison, 1980). En effet, une mobilisation partielle de ces réserves pourrait alimenter l'initiation des pseudophylles au sein des bourgeons brachyblastiques contenus dans le bourgeon terminal (David, 1966). Le test histo-cytologique utilisé dans notre étude, n'est pas suffisamment sensible pour observer ce phénomène. Ainsi, seule la mobilisation des triglycérides pendant l'élongation au printemps, a pu être observée. En revanche, les faibles stockages d'amidon et de tanins dans l'apex pourrait aussi représenter une source en métabolites accessible en hiver.

**Finalement, les 2 grands types de réserves semblent jouer des rôles différents :**

**Au travers de ce résumé, la fonction de chaque composé est soulignée :**

- **L'amidon est une forme de stockage caractéristique des périodes d'activité, et ses variations conditionnent la production des organes latéraux : quantité importante en été pendant l'initiation des primordia gemmaires, et quantité plus faible pendant la formation des écailles à aisselle vide.**

- **Les triglycérides constituent des formes de réserve impliquées dans la résistance au froid et dans l'approvisionnement de l'apex lors de la période d'élongation de la tige.**

**L'accessibilité de ces 2 types de réserves après hydrolyse est différente et pourrait expliquer leur présence à des périodes différentes de l'année.**

L'existence de relations entre la construction d'un cycle morphogénétique et la gestion des réserves a aussi été mise en évidence chez d'autres espèces (Alaoui-Sossé, 1996). Cette relation entre le métabolisme et l'organogenèse chez le pin est évidente pour la formation du premier cycle morphogénétique qui a lieu pendant la saison végétative, mais l'est moins pour les espèces polycycliques, puisque dans ce cas, le deuxième cycle est mis en place pendant l'hiver (David, 1966).

#### **IV.3.3.2 - Les juvéniles**

Deux périodes d'organogenèse liées à des modes de croissance différents ont lieu pendant la seconde saison de végétation. Elles s'accompagnent d'une accumulation d'amidon et de polyphénols confirmant les informations obtenues chez le matériel adulte. L'hypothèse trophique peut donc être aussi appliquée à ce type de matériel.

Une faible activité apicale observée en été pourrait être attribuée à une croissance différée au sein du plant entier. En effet, la croissance de la tige et de la racine sont alternées chez les jeunes plants de *P. taeda* (Drew & Ledig, 1979). Ainsi, chez le pin maritime, les photosynthétats produits en été pourraient être dirigés vers la racine au moment où l'apex caulinaire est au repos, l'accumulation d'amidon à cette période de l'année est alors faible.

La quantité importante d'amidon et l'accumulation de triglycérides dans les apex en octobre de la seconde saison de végétation coïncide avec la présence de pièces foliaires écailleuses à la base, et chlorophylliennes à l'apex (figure 22a, oct./nov.). Celles-ci sont formées les dernières au moment où la quantité d'amidon contenue dans l'apex est importante, tandis que les écailles sont formées pendant l'été, période pendant laquelle les teneurs en amidon et en triglycérides sont faibles. En octobre-novembre, on observe aussi la reprise de croissance des brachyblastes situés à l'extrémité de la tige alors que leur pseudophylles sont déjà allongées.

**Ces observations suggèrent que le flux de métabolites permettrait au niveau de l'extrémité de la tige :**

- ◇ En automne : - à la fois la formation des ébauches foliaires et des primordia gemmaires, et la reprise de croissance des brachyblastes,
- et la néosynthèse de triglycérides en automne, qui permettront probablement au bourgeon de supporter le froid hivernal.

◇ Pendant l'été, il ne serait pas suffisant pour alimenter le processus d'élongation des euphylls chlorophylliennes.

La croissance et le devenir des pièces foliaires et des bourgeons latéraux semblent donc, chez ce matériel aussi, dépendre des réserves glucidiques disponibles, et de la gestion de ces réserves.

#### IV.3.3.3 – Comparaison Juvéniles / Adultes Végétatifs / Adultes Reproducteurs

Malgré des systèmes de croissance différents, les plants juvéniles et adultes partagent de nombreux points communs dont un parallélisme entre l'activité du SAM et la distribution des réserves amylicées et des polyphénols.

Nous avons pu néanmoins relever certaines différences entre les matériels juvéniles, adultes végétatifs et adultes reproducteurs (tableau 7) :

Tableau 7: Quelques critères de différenciation entre les différents types de matériel

	<i>amidon</i>	<i>tanins</i>	<i>quantité relative d'ARN</i>	Largeur du SAM	<i>présence de bourgeons latéraux</i>
<i>décembre</i>		J < (AV=AR)	J > AV > AR	(J = AV) > AR	AV > AR
<i>mars</i>	J > (AV=AR)	J > (AV=AR)	(J = AV) > AR	J < (AV =AR)	
<i>avril</i>	J > AV > AR	J < (AV=AR)	J < (AV=AR)	J < AV < AR	
<i>juillet</i>	J < (AV=AR)	J < (AV=AR)	J < (AV=AR)	J < (AV=AR)	
<i>octobre</i>	J > AV > AR	AV < J < AR	J > (AV=AR)	J < (AV=AR)	

J=juvénile, AV=adulte végétatif, AR: adulte reproducteur

gris foncé : différences importantes entre 2 types de matériel uniquement

gris clair : discrimination possible entre les 3 types de matériels, mais les différences sont plus faibles

Ainsi, il est possible de différencier aisément les matériels juvéniles des adultes pendant toute la saison végétative notamment par le contenu en amidon, par la taille du SAM, ou bien par la quantité relative d'ARN dans le SAM.

Par contre, il est plus difficile de différencier les adultes végétatifs des adultes reproducteurs qui présentent des phases de croissance identiques. On peut, néanmoins le faire :

- par le contenu en amidon, principalement en avril,
- par la teneur en tanins en automne,
- la largeur du SAM en avril,
- la teneur en ARN dans le SAM en décembre,
- et la présence de bourgeons latéraux à la base du bourgeon terminal.

Mais ces différences ne sont pas aussi importantes que celles observées chez les juvéniles.

## **CHAPITRE V**

### **Conclusion générale**

## V.1 – SYNTHÈSE

### V.1.1 – Organogenèse

Les caractéristiques morphologiques et cytologiques de l'apex caulinaire varient au cours de la vie du pin. Ces variations débutent avec la croissance post-germinative puis deviennent saisonnières. Elles reflètent l'activité du SAM.

◇ **Chez les semis**, la taille du SAM diminue pendant l'élongation des tissus préformés de la graine en même temps que débute la production d'ébauches foliaires. **Ceci indique que les premières pièces foliaires développées sont préformées au sein du SAM lorsqu'il est encore dans la graine. Dans un deuxième temps, lorsque l'élongation de l'épicotyle a lieu, le SAM s'élargit en même temps que se forment de nouvelles ébauches foliaires.**

L'activité organogène a lieu à des périodes différentes chez les matériels juvéniles et adultes :

◇ **Chez les juvéniles**, 2 périodes d'activité organogène sont identifiées au printemps et en automne, par la faible variation de la taille du SAM, et la diminution de la taille des ébauches, toutes 2 associées à la formation de primordia gemmaires.

◇ **Chez les matériels adultes**, l'organogenèse a lieu pendant quasiment toute la saison de végétation. Les paramètres utilisés pour identifier cette période d'organogenèse suivent des variations plus marquées que chez les juvéniles.

Ainsi, l'activité d'organogenèse augmente au printemps en même temps que la taille du SAM s'accroît. Elle se poursuit en été et s'accompagne de la formation de primordia gemmaires, la taille du SAM est à ce moment là, maximale. Puis, elle continue en provoquant une diminution de la taille du SAM entre juillet et octobre. **Il y aurait donc comme chez les semis, en quelque sorte, une préformation des ébauches foliaires dans le SAM.**

**L'activité organogène serait donc maximale dans les matériels juvéniles et adultes, au moment où l'on observe la présence de primordia gemmaires.**

Les périodes de ralentissement de la croissance ont lieu à la fin de l'élongation de l'hypocotyle, puis chaque année, en période de repos (=décembre). Elles coïncident avec une taille minimale du SAM pour tous les types de matériels. On note cependant que la

période de ralentissement d'activité observée en juillet chez les matériels juvéniles, ne suit pas cette règle car la taille du SAM est identique à celle mesurée aux autres stades.

Ces observations indiquent qu'il existe des différences dans l'évolution saisonnière de l'activité organogène des apex qui permettent de différencier les matériels juvéniles et adultes. Mais il est plus difficile de différencier les plants adultes végétatifs et adultes reproducteurs en se basant sur ces phénomènes car l'évolution de leur activité apicale est identique. D'autres paramètres, en revanche, permettent de différencier ces 2 types de matériel :

- **la présence de bourgeons latéraux dominés par le bourgeon terminal plus fréquente chez les adultes végétatifs**
- **et la coloration par le test de Brachet de ce même matériel récolté en décembre qui révèle une quantité d'ARN un peu plus importante dans le SAM du matériel adulte végétatif.**

### **V.1.2 – Les réserves**

Les réserves lipidiques et amylacées sont stockées dans l'apex puis régulièrement mobilisées tout au long de la vie de la plante.

◆ Les triglycérides constituant une importante réserve dans la graine, sont hydrolysés au cours de la post-germination pendant la croissance des tissus préformés, et disparaissent totalement de ces tissus. Puis, ils sont restockés pendant la croissance de l'épicotyle pour constituer une réserve importante en hiver de la première saison de végétation.

Ensuite, ces réserves sont hydrolysées au printemps suivant. Le contenu minimal est alors observé en été, puis une nouvelle accumulation a lieu en automne, et un important stockage de triglycérides est observé en hiver. Ce phénomène se répète chez les matériels adultes.

Ainsi, l'hydrolyse des réserves lipidiques a lieu pendant la croissance libre des plants juvéniles (élongation immédiate des nœuds et entre-nœuds formés) alors que chez les adultes, elle est concomitante avec la croissance des organes préformés dans le bourgeon (croissance prédéterminée) comme chez les semis.

**La mobilisation des réserves lipidiques s'effectue selon une séquence acropète au sein de l'apex. Elle a d'abord lieu dans le parenchyme cortical et les tissus conducteurs, puis dans le parenchyme médullaire, et enfin, remonte dans le SAM. Ces réserves ne sont jamais observées dans le méristème latéral. A l'inverse, le processus**

**d'accumulation des triglycérides suit une évolution basipète: il débute dans le SAM et se termine dans le parenchyme médullaire et les tissus conducteurs.**

**◆ Les réserves amylacées apparaissent dès l'imbibition dans tous les tissus de l'embryon. Puis, elles sont stockées privilégièrement dans le parenchyme médullaire sub-apical à plusieurs périodes de la vie du pin :**

- **d'abord pendant la différenciation des premières ébauches foliaires qui a lieu pendant l'élongation des tissus préformés lors de la croissance post-germinative,**
- **puis, pendant la production d'organes foliaires chez les plants juvéniles et adultes. L'accumulation d'amidon est particulièrement marquée lorsque les primordia gemmaires se différencient : en avril et en octobre/novembre chez les juvéniles et en juillet chez les adultes.**

Cette forte accumulation d'amidon pendant les périodes d'activité organogénétiques intenses permet donc de mettre en évidence des différences entre les apex des plants juvéniles et adultes. L'accumulation d'amidon est, en outre, sensiblement plus importante pendant l'élongation de la tige, en avril, chez les plants adultes végétatifs que chez les adultes reproducteurs. Il est donc possible de différencier ces 2 types de matériels adultes par l'estimation en avril, de la quantité d'amidon dans le parenchyme adjacent au SAM. Cette différence entre les matériels adultes végétatifs et adultes reproducteurs peut être attribuée à un décalage du rythme saisonnier d'organogenèse chez ces 2 types de matériel. Dans ce cas, l'analyse comparée de matériels récoltés au printemps à des stades de prélèvements rapprochés permettrait de valider cette hypothèse.

**◇ Les triglycérides et l'amidon forment ainsi des réserves adaptées à chaque saison : les premiers pour la période de repos, et le second pour la période d'activité. Mais les variations saisonnières de la distribution des triglycérides ne permettent pas de différencier les différents types de matériels juvéniles, adultes végétatifs et adultes reproducteurs.**

**◆ La densité des tanins dans le parenchyme médullaire sub-apical s'accroît au cours de la première saison de végétation et plus particulièrement lorsque l'épicotyle s'allonge. Puis comme pour l'amidon, leur quantité évolue en fonction de l'activité du méristème à toutes les étapes de la vie du plant, et le maximum d'accumulation dans l'apex est observé pendant les périodes d'organogenèse intense.**

**Les apex des 3 types de matériels peuvent ainsi, être différencier par l'évaluation de la quantité de tanins dans la moelle :**

- **toute l'année pour différencier les matériels juvéniles des adultes,**
- **et uniquement en automne pour différencier les matériels adultes végétatifs des adultes reproducteurs.**

Ainsi, la quantité de tanins est plus importante dans les apex de ces derniers lorsqu'ils sont récoltés à la fin de la période d'organogenèse présumée correspondre à la formation des bourgeons inflorescenciels.

Les tanins étant observés lors des périodes d'activité, **on peut donc penser qu'ils sont impliqués dans l'approvisionnement de l'apex (dans l'hypothèse où ils forment des réserves) ou bien dans la détoxification des cellules.** En effet, nous avons envisagé l'implication des tanins dans ce dernier processus lors de l'étude de la catalase sur des apex examinés pendant la croissance post-germinative. Les importantes accumulations de tanins sous le SAM pendant les périodes d'activité pourraient s'expliquer de cette façon. Afin de confirmer ces hypothèses, il faut cependant envisager le dosage de ces composés et leur identification.

♣ **L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible de coupler la morphogenèse et l'évolution de différents paramètres morphologiques et physiologiques, pour différencier les semis, les plants juvéniles et les adultes végétatifs et reproducteurs.** Nous avons entrepris le même type d'étude à partir d'autres espèces de pin (*P. radiata* et *P. pinea*) mais les stades de prélèvements sont plus restreints. Les résultats montrent également une variation saisonnière de la taille du dôme apical et de la distribution des réserves. Néanmoins, la différenciation entre les matériels adultes végétatifs et adultes reproducteurs, n'a pu être faite car le choix des périodes de prélèvement n'a pas été optimisé. Il résulte de ces observations que, même si la forme du cycle morphogénétique de ces 3 espèces de pin est similaire, les étapes de la morphogenèse de chacune de ces espèces pourraient être décalées dans le temps.

♣ La connaissance de l'état des réserves au sein de l'apex présente aussi un aspect pratique. En effet, l'accumulation et la distribution des triglycérides, de l'amidon et des tanins fluctuants au cours d'une saison de végétation pourraient conditionner le succès d'une multiplication végétative. La période de prélèvement des explants au cours de l'année pourrait alors être importante pour la réussite de la culture. La charge de glucides pourrait être un indicateur de leur aptitude à l'enracinement et à la croissance. En outre,

nous avons montré, au travers de l'étude des embryons somatiques et zygotiques excisés, l'importance des réserves pour la croissance de la plantule.

### **V.1.3 - Organogenèse et gestion des réserves amylacées: hypothèses**

Les observations indiquent un lien étroit entre le métabolisme des sucres insolubles et l'activité du méristème, nous pouvons donc discuter les relations entre ces 2 types de phénomène.

#### **V.2.2.1 - Les semis**

◆ La formation de bourgeon auxiblastiques a lieu à la fin de l'élongation de l'hypocotyle alors que le méristème apical est peu actif. Les métabolites issus de l'activité photosynthétique des cotylédons et des euphylls ne seraient pas dirigés vers le SAM, car la demande en métabolites serait faible à cette période, mais vers les ébauches foliaires en développement et les primordia gemmaires en formation. Cet approvisionnement serait suffisant pour que ceux-ci se différencient en bourgeons auxiblastiques.

◆ Pendant l'élongation de l'épicotyle, on observe un élargissement du méristème qui peut être associé à une reprise de l'activité organogène du SAM (Kremer, 1984). Les bourgeons latéraux formés, à ce moment là, donnent naissance uniquement à des brachyblastes. Cette augmentation du volume méristématique et la production d'organes qui l'accompagne exigent de l'énergie sans doute, au moins en partie, apportée après hydrolyse de l'amidon stocké dans le parenchyme médullaire sub-apical qui alimente le cycle de Krebs. Les euphylls suppléées par les pseudophylls néoformées alimentent probablement le flux glucidique qui peut être dirigé vers le stockage de l'amidon ou sur les sites de croissance. Une gestion des réserves où l'activité du SAM serait alimentée prioritairement pendant l'élongation de l'épicotyle, ne permettrait qu'un développement limité des bourgeons latéraux qui se différencieraient alors en brachyblastes.

**La formation de brachyblastes ou d'auxiblastes pendant la croissance des semis dépendrait donc des disponibilités en ressources énergétiques.**

◆ Quant à la différenciation des euphylls, les ébauches foliaires donnent normalement naissance à des aiguilles chlorophylliennes. Mais la formation d'écailles peut être également observée sur des semis soumis à des conditions particulières. En effet, lors d'un

important apport en nutriments ou encore dans des conditions favorisant la photosynthèse, les écailles caractéristiques des adultes peuvent apparaître chez des semis en première saison de végétation (Kremer & Larson, 1982; Alazard, communication personnelle). **Ces observations supposent qu'une alimentation importante induit la production d'écailles au lieu des aiguilles chlorophylliennes et modifient ainsi la morphologie foliaire.**

◆ L'initiation des primordia gemmaires à l'aisselle des euphylls peut être aussi influencée par les conditions nutritives. Ainsi, en conditions nutritives favorables, la formation systématique des bourgeons latéraux a lieu à l'aisselle des dernières ébauches foliaires formées (Kremer & Larson, 1982). A l'inverse, dans le cas des semis cultivés en conditions normales, les primordia gemmaires formés sporadiquement sont toujours distancés de l'apex par plusieurs pièces foliaires allongées.

**Ces observations suggèrent l'existence d'une " balance " entre l'activité du SAM et l'initiation des bourgeons latéraux.** Le SAM et la disponibilité en sucres exerceraient un contrôle sur la production et le devenir des bourgeons latéraux. Ainsi, le SAM capterait prioritairement le flux nutritif. Les métabolites restants serviraient, notamment à la formation des bourgeons latéraux. Un nombre important de bourgeons latéraux formés provoquerait alors la diminution de l'allongement des ébauches foliaires qui les axillent et ainsi, la formation d'écailles.

#### **V.2.2.2 - Les juvéniles et les adultes**

Nous avons abordé abondamment ce sujet sur les matériels juvéniles et adultes dans le chapitre IV. 3, c'est pourquoi nous faisons ici une description succincte :

**La présence d'amidon dans l'apex pourrait être indicatrice du flux de photosynthétats disponibles au niveau de l'apex pour diverses activités, notamment la formation des pièces foliaires et le développement des bourgeons latéraux.**

Chez les matériels adultes, par exemple, des écailles à aisselle vide sont produites et les rameaux courts se développent lorsque le flux de photosynthétats débute au printemps. En juillet, les bourgeons auxiblastiques initiés l'année précédente s'enrichissent en pièces foliaires. Cette activité serait consommatrice d'une quantité d'énergie plus importante par rapport au printemps. En outre, l'initiation des bourgeons latéraux débute à cette période.

Ainsi, le flux de photosynthétats serait plus important à cette période puisque les pseudophylles néoformées au printemps sont aussi photosynthétiquement active.

**En conclusion, il existe un lien étroit entre les productions de l'apex et la gestion des métabolites de réserve dans les plants dès la première saison de végétation, et ces relations persistent au cours des années suivantes.**

## **V.2 – Processus impliqués dans la différenciation de l'apex au cours de la vie de la plante ?**

◆ La proximité du système racinaire et la densité de l'appareil photosynthétique (euphyllles et pseudophylles) pourraient expliquer les différences entre les modalités de croissance des plants juvéniles et des adultes. La distance séparant l'apex caulinaire du système racinaire est un paramètre évoqué par d'autres auteurs pour expliquer l'aptitude au rajeunissement (Monteuuis & Bon, 1998). L'augmentation de cette distance et celle du nombre de ramification pourraient induire une modification du flux d'assimilats dans les apex caulinaires.

En outre, chez les semis, la production et la croissance des ébauches foliaires est alternée périodiquement avec la croissance de la racine (Drew & Ledig, 1979).

**Les modalités de croissance pourraient donc être liées à l'équilibre source-puits de l'apex caulinaire au cours de l'année qui dépendrait :**

- **de la distance qui le sépare des racines,**
- **des variations des phases de croissance de la racine et de la production foliaire localisée à l'extrémité de la tige.**

◆ D'autres part, **l'efficacité de l'appareil photosynthétique** varie en fonction de la température, ce qui peut expliquer les variations saisonnières de l'accumulation d'amidon et de sucres solubles (Greer *et al.*, 2000). Bien que la gestion des métabolites carbonés soit liée de façon évidente au rythme de croissance et de la morphogenèse (David, 1966), il ne faut pas écarter le rôle d'autres facteurs susceptibles d'intervenir dans ces processus.

◆ **La dominance apicale** pourrait aussi varier saisonnièrement et induire des modulations de la morphogenèse, de la taille du SAM et de la nature des organes qu'il a formés : aiguille allongée ou bien écaille à croissance réduite, bourgeon auxiblastique à croissance

indéfinie ou bien brachyblaste. La dominance apicale pourrait, en même temps que l'approvisionnement de l'apex en glucides, jouer un rôle important dans la formation et le devenir de ces différents organes.

◆ En outre, **les régulateurs de croissance** pourraient aussi être impliqués dans les phénomènes que nous avons observés. En effet, ils sont susceptibles de contrôler les activités d'organogenèse et d'élongation du bourgeon. Plusieurs de ces régulateurs sont couramment évoqués :

- l'auxine, inductrice de la dominance apicale est produite par les jeunes feuilles,
- les cytokinines d'origine racinaire induit la levée de dominance apicale,
- et l'acide abscissique induit probablement l'entrée en dormance (se reporter aux références citées par Alaoui-Sossé, 1996) et est impliqué dans l'accumulation des réserves lipidiques.

◇ **L'auxine**, notamment, exerce une influence sur le développement des bourgeons latéraux. A titre d'exemple, l'application de ce régulateur de croissance sur la section de tige privée de son bourgeon terminal, réprime temporairement la croissance des axes latéraux chez l'*Araucaria* (House *et al.*, 1998).

De plus la teneur de ces régulateurs peut varier saisonnièrement et différemment selon les conditions environnementales chez le pin maritime (Covy, 1966 ; Broquedis, Demounem & David, 1976). En effet, Covy (1966) a estimé la teneur en auxine contenue dans des bourgeons récoltés sur une période allant de octobre à mi-mars au moyen du test "coléoptyle d'avoine". Elle observe ainsi :

- une importante teneur en auxine en automne pendant l'enrichissement du bourgeon en organes latéraux,
- l'auxine disparaît ensuite pendant le repos hivernal,
- puis elle réapparaît et atteint sa teneur maximale au printemps, période à laquelle débute la formation d'écaillés à aisselle vide.

Nous pouvons donc envisager d'éventuelles interactions entre la teneur en régulateurs de croissance tel que l'auxine, et les variations saisonnières des activités de l'apex. Il serait donc particulièrement intéressant de réaliser des micro-dosages de l'auxine sur des bourgeons récoltés pendant toute la saison végétative, et d'entreprendre son immunolocalisation. Les techniques de micro-dosage sur plusieurs coupes successives de

cambium par Uggla *et al.*(1996) permettent à la fois de doser et de localiser l'auxine. Cette technique pourrait alors être adaptée au bourgeon au cours d'une saison de végétation.

◇ **Les cytokinines** synthétisées par la racine plus ou moins distante du bourgeon terminal selon l'âge du plant sont connues pour retarder la sénescence (Hartman, Joseph & Millet, 1998). De plus, leur implication dans la levée de dominance apicale montre qu'elles peuvent moduler le fonctionnement de l'apex (Cline, 2000). Ainsi, la faible distance qui sépare les brachyblastes des racines chez les plants juvéniles pourrait expliquer la reprise de croissance apicale de ces rameaux nains sous l'influence des cytokinines proches.

♣ **En conclusion, la morphogenèse et la gestion des métabolites semblent étroitement liés, mais la compréhension des mécanismes de ces relations nécessiterait encore d'importantes investigations. Parmi celles-ci, le suivi du contenu en sucres et en régulateurs de croissance sur des semis cultivés dans des conditions induisant la formation de bourgeon écailleux devrait fournir des résultats intéressants.**

## CHAPITRE VI: BIBLIOGRAPHIE

- Acevedo, A., and Scandalios, J.G.** (1991). Catalase and superoxide dismutase gene expression and distribution during stem development in maize. *Develop. Gen.* 12, 423-430
- Acevedo, A., and Scandalios, J.G.** (1996). Antioxidant gene (Cat/Sod) expression during the process of accelerated senescence in silks of the maize ear shoot. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 539-545
- Alaoui-Sossé B** (1996) : Croissance rythmique et modèle de gestion du carbone chez les jeunes plants de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.). Influence du stress salin. *Thèse de Biologie Forestière*. Nancy
- Albrechtová J.T.P., Slavik J., Wagner E.** (1997) : Confocal pH-topography in the shoot apex of *Chenopodium rubrum* in relation to different photoperiods. *Endocytobiosis & Cell Res.* 12 : p 83-94
- Allona I, Collada C., Casado R. & Aragoncillo C.** (1994) : 2S Arginine-rich proteins from *Pinus pinaster* seeds. *Tree Physiol.* 14 : p 211-218
- Anandarajah K, McKersie BD** (1990) : Enhanced vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. *Pl. Sciences.* 71 : p 261-266
- Asfari Z., Burgard M., Vicens J.** (1993) : Synthetic calixarenes and natural polyphenols : common grounds for future research. *Polyphenolic phenomena. Groupe polyphénols.* edt. Scalbert A. Ed. INRA
- Attree SM, Pomeroy MK, Fowke LC** (1992) : Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and dessication tolerance. *Planta.* 187 : p 395-404
- Balasaraswathi R., Sadasivam S.** (1997) : Changes in oil, sugars and nitrogenous components during germination of sunflower seeds, *Helianthus annuus*. *Plant foods for human nutrition.* 51 : 71-77
- Baradat P., Pastuszka P.** (1992) : Le pin maritime. *Amélioration des espèces végétales cultivées : Objectifs et critères de sélection.* INRA ed. pp : 695-709
- Benecke U.** (1980) : Photosynthesis and transpiration of *Pinus radiata* D. Don under natural conditions in a forest stand. *Oecologia.* 44 : 192-198
- Bercetche J., Pâques M.** (1995) : Somatic embryogenesis in maritime pine. In : *Somatic embryogenesis in woody plants.* Mohain Jain S., Gupta PK, Newton RJ eds. Vol 3. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers : p 221-242
- Bethke PC, Swanson SJ, Hillmer S, Jones RL** (1998) : From storage compartment to lytic organelle : The metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. *Ann. Bot.* 82 : p 399-412
- Bewley JD, Black M.** (1994) : Seeds, physiology of development and germination. New York : Plenum Press

- Bilková J., Albrechtová, Opatrná J.** (1999) : Histochemical detection and image analysis of non-specific esterase activity and the amount of polyphenols during annual bud development in Norway spruce. *J. Exp.Bot.* 336: 1129-1138
- Bon M.C.** (1988a) : J16 : an apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*. *Tree Physiol.* 4 : 381-387
- Broquedis M., Demounem R., David R.** (1976) : L'évolution saisonnière de la croissance des organes végétatifs du pin maritime et de leur teneur en auxine, dans les trois principaux sites écologiques de la forêt landaise. *C.R.Acad.Sc.Paris* . 283 : 1189-1192
- Buchholz J , Old EM** (1933) : The anatomy of the embryo of *Cedrus* in the dormant stage. *Amer. J. Bot.* 20 : p 35-44
- Busotti F., Gravano E., Grossoni P., Tani C.** (1998) : Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. *New Phytol.* 138 : 469-479
- Camefort H.** (1956) : Etude de la structure du point végétatif et des variations phyllotaxiques chez quelques gymnospermes. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 17 : p 1-185
- Carrier D.J., Cunningham J.E., Taylor D.C., Dunstan D.I.** (1997): Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. *Pl. Cell Rep.* 16: 550-554
- Carrier DJ, Kendall EJ, Bock CA, Cunningham JE, Dunstan D.** (1999) : Water content, lipid deposition, and (+)-abscisic acid content in developing white spruce seeds. *J. Exp. Bot.*, Vol 50, 337 : p 1359-1364
- Catesson A.M.** (1964) : Origine, fonctionnement, et variation cytologiques saisonnières du cambium. *Ann. Sc. Nat. 12<sup>ème</sup> série* 5 : 368-375
- Cecich R.A.** (1977) : An electron microscopic evaluation of cytohistological zonation in the shoot apical meristem of *Pinus banksiana*. *Amer. J. Bot.* 64 : p 1263-1271
- Cecich R.A.** (1979) : Development of vacuoles and lipid bodies in apical meristems of *Pinus banksiana*. *Amer. J. Bot.* 66(8) : p 895-901
- Cecich R.A.** (1980) : The apical meristem. *Proceeding of the joint workshop of IUFRO working partie on xylem and shoot growth physiology.* Edt. Little C.H.A.. pp 1-12
- Cecich RA , Horner HT** (1977) : An ultrastructural and microspectrophotometric study of the shoot apex during the initiation of the first leaf in germinating *Pinus banksiana*. *Amer. J. Bot.* 64 (2) : p 207-222
- Chandlee J.M., Scandalios J.G.** (1983): Gene expression during early kernel development in *Zea mays*. *Develop. Genet.* 4 : 99-115
- Ching TM** (1966) : Compositional changes of Douglas fir seeds during germination. *Plant Physiol.* 41 : p 1313-1319
- Ching TM** (1970) : Glyoxysome in megagametophyte of germinating ponderosa pine seeds. *Plant Physiol.* 46 : p 475-482
- Choi Y.E., Yang D.C., Kim H.S., Choi K.T.** (1997): Distribution and changes reserve material in cotyledon cells of *Panax ginseng* related to direct somatic embryogenesis and germination. *Pl. Cell Rep.* 16: 841-846
- Clark M.** (1981) : Staining procedures. ED. Williams & Wilkins, Londres, 4<sup>ème</sup> Ed. pp 299.

- Cline MG** (2000) : Execution of the auxin replacement apical dominance experiment in temperate woody species. *Am. J. Bot.* 87 : p 182-190
- Couvy J.** (1962) : Présence d'une substance de croissance et d'un inhibiteur dans les bourgeons et les pousses de première année chez *Pinus pinaster* Sol. : évolution de ces substances au cours de l'année. *C.R.Acad.Sc.Paris*: 2643-2645
- Cragg F.J., Willison J.H.M.** (1980) : The ultrastructure of quiescent buds of *Tilia europaea*. *Can. J. Bot.* 58 : 1804-1813
- Curtis JD, Popham RA** (1972) : The developmental anatomy of long branch terminal buds of *Pinus banksiana*. *Amer. J. Bot.* 59 : p 194-202
- Da Silva PMFR, Eastmond PJ, Hill LM, Smith AM, Rawsthorne S** (1997) : Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta.* 203 : p 480-487
- David R , Angeli J.** (1953) : Multiplication végétative du pin maritime et phénomènes d'histogénèses. *Compte rendu des travaux de colloque international sur la greffe.* p 139-145
- David R.** (1966) : Physiologie du pin maritime : 3 aspects de la physiologie du pin maritime : la genèse de la racine et de la tige, la formation de l'oléorésine. *Bull. Soc. Bot. de France.* p137-164
- Davies F.T.** (1984) : Shoot RNA, cambial activity and indole butyric acid effectivity in seasonal rooting of juvenile and mature *Ficus pumila* cuttings. *Physiol. Plant.* 62 : 571-575.
- Debazac E.F.** (1966) : Les modalités de la croissance en longueur chez les Pins. *Bull. Soc. Bot. France.* 114 : 3-14
- Del Rio, L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jiménez, A., Lopez-Huertas, E., and Hernandez, J.A.** (1998). The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116, 1195-1200
- Diaz-Sala C, Hutchinson KW, Goldfarb B, Greenwood MS** (1996) : Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings : the role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. *Physiol. Plant.* 97 : p 481-490
- Drew AP, Ledig FT** (1980) : Episodic growth and relative shoot : root balance in loblolly pine seedlings. *Ann. Bot.* 45 : p 143-148
- Dumas E.** (1987) : Micropropagation d'un clone âgé de pin maritime en vue de l'obtention de pieds-mères. *Ann. AFOCEL* 1986 : 95-107
- Dumas E., Franclet A., Monteuis O.** (1989) : Microgreffage de méristèmes primaires caulinaires de Pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) âgés sur de jeunes semis cultivés *in vitro*. *C.R.Acad.Sc.Paris* 309 : 723-728
- Dumas E., Monteuis O.** (1991) : Régénération *in vitro* de pins maritimes âgés par bourgeonnement adventif sur euphyllés. *Ann. AFOCEL* 1989-1990 : 43-58.
- Durzan DJ, Mia AJ, Ramaiah PK** (1971) : The metabolism and subcellular organization of the jack pine embryo (*Pinus banksiana*) during germination. *Can. J. Bot.* 49 : p 927-938
- Durzan DJ, Mia AJ, Wang BSP** (1971) : Effects of tritiated water on the metabolism and germination of jack pine seeds. *Can. J. Bot.* 49 : p 2139-2149
- Durzan DJ, Ramaiah PK** (1971) : The metabolism of L-proline by jack pine seedlings. *Can. J. Bot.* 49 : p 2163- 2173

- Escher CL, Widmer F (1997)** : Lipid mobilization and neoglucogenesis in plants : Do glyoxylate cycle enzyme activities constitute a real cycle ? A hypothesis. *Biol. Chem.* p 378 : 803-813
- Faure V.(1993)** : Contribution à l'étude des modifications protéiques et glycoprotéiques durant le développement ontogénique d'une espèce ligneuse : le *Sequoiadendron giganteum* Boichholz. Thèse de Biologie et Physiologie Végétales. Clermont Ferrand II.
- Favre J.M. (1998)** : Quelques réflexions sur la pertinence et les ambiguïtés du concept de marqueur de changement de phase. *Groupe d'étude de l'arbre*. Nancy- 23-24 Avril 1998. p50-56.
- Feirer RP, Conkey JH, Verhagen SA (1989)** : Triglycerides in embryogenic conifer calli : a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Rep.* 8 : p 207-209
- Filonova, Bozhkov & von Arnold (2000)** : Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time -lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 343: p 249-264
- Fischer W, Bergfeld R, Plachy C, Schäffer R, Schopfer P (1988)** : Accumulation of storage materials, precocious germination and development of desiccation tolerance during seed maturation in mustard (*Sinapis alba* L.). *Bot. Acta.* 101 : p 344-354
- Fosket DE, Miksche JP (1966)** : A histochemical study of the seedling shoot apical meristem of *Pinus lambertiana*. *Amer. J. Bot.* 53 (7) : p 694-702
- Gifford DJ, King JE, Migabo T., Stone SL (1998)** : Interactions between megagametophyte and embryo in germinated loblolly pine seed is a two-way-street. *The eight meeting of the conifer biotechnology working group* – 7-11 juin 1998- Douglass College Center- Rutgers University
- Goldfarb B., Hackett W.P., Furnier G.R., Mohn C.A., Plietzsch A. (1998)** : Adventitious root initiation in hypocotyl and epicotyl cuttings of eastern white pine (*Pinus strobus*) seedlings. *Physiol. Planta.* 102: 513-522
- Greenwood M.S. (1980)** : Reproductive development in loblolly pine: I. The early development of male and female strobili in relation to the long shoot growth behavior. *Am. J. Bot.* 67: 1414-1422
- Greer D.H., Robinson L.A., Hall A.J., Klages K., Donnison H. (2000)** : Frost hardening of *Pinus radiata* seedlings : effects of temperature on relative growth rate, carbohydrate concentration. *Tree Physiol.* 20 : 107-114
- Groome MC, Axler SR, Gifford DJ (1991)** : Hydrolysis of lipid and protein reserves in loblolly pine seeds in relation to protein electrophoretic patterns following imbibition. *Physiol. Plant.* 83 : p 99-106
- Gutmann M., von Aderkas P., Label P., Lelu M.A. (1996)** : Effects of abscissic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 305: 1905-1917.
- Guyon J.P. (1998)** : Forêt. Seconde édition. Coll. Référence. Ed. Synthèse Agricole.p294
- Hackett W.P. (1985)** : Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hort. Rev.* 7 : p109-155
- Häggman H, Jokela A, Krajnakova J, Kauppi A, Niemi K , Aronen T. (1999)** : Somatic embryogenesis of Scots pine : cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *J. Exp. Bot.* 50. : p 1769-1778

- Hammer MF, Murphy JB (1993)** : Properties of the lipid bodies lipase of *Pinus edulis* and electrophoretic purification of its 64 kDA subunit. *Physiol. Plant.* 87 : p 39-44
- Hammer MF, Murphy JB (1994)** : Lipase activity and in vivo triacylglycerol utilization during *Pinus edulis* seed germination. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (6) : p 861-867
- Hejnowicz A. (1979)** : Tannin vacuoles and starch in the development of Scots pine (*Pinus sylvestris*) vegetative buds. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2 : 195-203
- Hoppe A., Theimer R.R. (1997)** : Degradation of oil bodies isolated from cotyledons during germination of rapeseed seedlings. *J. Pl. Physiol.* 151 : 471-478
- House S, Dieters M, Johnson M, Haines R (1998)** : Inhibition of orthotropic replacement shoots with auxin treatment on decapitated hoop pine (*Araucaria cunninghamii*) for seed orchard management. *New forests* 16 : 221-230
- Huang AHC (1992)** : Oil bodies and oleosin in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43 : p 177-200
- Hutzler P., Fischbach R., Heller W., Jungblut T.P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G., Schnitzler J.P (1998)** : Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 323 : 953-965
- Illy G., Castaing J.P. (1966)** : Rythme saisonnier de croissance en diamètre et en hauteur du Pin maritime. *Bull. Soc. Bot. de France.* p173-179.
- Jablanczy A. (1971)** : Changes due to age in apical development in spruce and fir. *Canadian forest service bi-monthly research notes* 27 : 10
- Jensen W.A. (1962)** : Botanical histochemistry : Principles and practice. Ed. *Freeman Company.* San Francisco et Londres
- Johansen D.A. (1940)** : Plant microtechnique. Ed. *MacGraw Hill Company.* New York et Londres
- Johnson M.A., Carlson J.A., Conkey J.H., Noland T.L. (1987)** : Biochemical changes associated with zygotic pine embryo development. *J. Exp. Bot.* 38: 518-524
- Jordy M.N., Danti S., Favre J.M., M.L. Racchi (2000)** : Histological and biochemical changes in *Pinus* spp. seeds during germination and post-germinative growth: triacylglycerol distribution and catalase activity. *Aust. J. Pl. Physiol.* issue 12, vol. 27 : sous presse
- Kao C (1973)** : Biochemical changes in seeds of Taiwan red pine and Chinese fir during germination. *Forest Sci.* 19 : p 197-202
- Kao C, Rowan KS (1970)** : Biochemical changes in seeds of *Pinus radiata* D.Don during stratification. *J. Exp. Bot.* 21 :p 869-873
- Kapik R., Dinus R., Dean J. (1995)** : Abscissic acid and zygotic embryogenesis in *Pinus taeda*. *Tree Physiol.* 15 : 485-490
- King JE, Gifford DJ (1997)** : Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. Arginine and arginase activity. *Plant. Physiol.* 113 : p 1125-1135
- Kovac M, Kregar I. (1989)** : Starch metabolism in Silver fir seeds during germination. *Plant. Physiol. Biochem.* 27 : p 873-880

**Krasowski M.J., Owens J.N.** (1990) : Seasonal changes in the apical zonation and ultrastructure of coastal Douglas fir seedlings (*Pseudotsuga menziesii*). *Am. J. Bot.* 77 : 245-260

**Kremer A.** (1984) : Distribution of relative growth rates and variation of cytohistological zonation in apical meristems of seedlings of two contrasting open-pollinated jack pine (*Pinus banksiana*) families. *Can. J. For. Res.* 14 : 297-310.

**Kremer A., Larson P.R.** (1982) : The relation between first-season bud morphology and second-season shoot morphology of jack pine seedlings. *Can. J. For. Res.* 12 : 893-904

**Kremer A, Nguyen A, Lascoux M, Roussel G** (1990) : Morphogenèse de la tige principale et croissance primaire du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) Actes du 3<sup>ième</sup> colloque Sciences et Industries du bois. 14-15 mai 1990- Bordeaux. *ARBORA*. « De la forêt cultivée à l'industrie de demain ». tome 2 : p 333-349

**Kremer A., Roussel G.** (1986) : décomposition de la croissance en hauteur du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.). Variabilité géographique des composantes morphogénétiques et phénologiques. *Ann. Sc. For.* 43 : 15-34

**Kremer A., Xu L.A.** (1989) : Relationship between first-season free growth components and later field height growth in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Can. J. For. Res.* 19 : 690-699

**Lai FM, McKersie BD** (1993) : Effect of nutrition on maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Pl. Sciences.* 91 : p 87-95

**Lai FM, Senaratna T, McKersie BD** (1992) : Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. *Pl. Sciences.* 87 : p 69-77

**Lammer DL, Gifford DJ** (1989) : Lodgepole pine seed germination. II. The seed proteins and their mobilization in the megagametophyte and the embryonic axis. *Can. J. Bot.* 67 : p 2544-2551

**Locquin M., Langeron M.** (1978) : Manuel de Microscopie, Ed. Masson , Paris. pp.247

**Lison L.** (1960) : Histochimie et cytochimie animale : Principes et méthodes. Ed. Gauthier-Villars. Paris. pp. 474-487

**Lelu M.A., Bastien C., Drugeault A., Gouez M.L., Klimaszewska K.** (1999) : Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physio. Plant.* 105: 719-728

**Llewellyn** (1998) : « Stain File : Oil red O » :

<http://members.pgonline.com/bryand/dyes/26125.htm>

**Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. L., and Randall, R. J.** (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

**Margara J.** (1977) : La multiplication végétative de la betterave (*Beta vulgaris* L.) en culture *in vitro*. *C.R.Acad.Sc.Paris.* 285 : 1041-1044

**Maugé J.P.** (1971) : Croissance juvénile du pin maritime en ligniculture aspects génétiques et sylvicoles. *Annales de Recherches Sylvicoles (AFOCEL)*. pp. 220-245

**Mellerowicz EJ, Horgan K, Walden A, Coker A, Walter C** (1998) : PRFLL- a *Pinus radiata* homologue of FLORICAULA and LEAFY is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia *Planta.* 206 : p 619-629

- Mhaske VB, Chengalrayan K, Hazra S (1998)** : Influence of osmotica and abscissic acid on triglyceride accumulation in peanut somatic embryos. *Pl. Cell Rep.* 17 : 742-746
- Mia AJ, Durzan DJ (1974)** : Cytochemical and subcellular organization of the shoot apical meristem of dry and germinating jack pine embryos. *Can. J. For Res.* 4 : p 39-54
- Misra S, Attree SM, Leal I, Fowke LC (1993)** : Effect of abscissic acid, osmoticum, and dessication on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Ann. Bot.* 71 : p 11-22
- Mohr H. & Schopfer (1995)** : Respiratory metabolism. Chapter 13. In « *Plant physiology* » Ed. Springer Verlag. p 206
- Monteuuis O. (1987)** : Profils méristématiques de séquoias géants (*Sequoiadendron giganteum* Buchholz.) jeunes et âgés durant les stades de repos végétatif et de débourrement. *C.R.Acad.Sc.Paris* 305 : 715-720
- Monteuuis O.(1988)** : Aspect du clonage de séquoias géants jeunes et âgés. Thèse . Clermont Ferrand.
- Monteuuis O (1989)** : Analyses microscopiques de points végétatifs de *Sequoiadendron giganteum* jeunes et âgés durant le repos végétatif et lors du débourrement. *Bull. Soc. Bot. Fr.* p 317-326
- Monteuuis O (1991)** : Rejuvenation of 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments. *Physiol. Plant.* 81 : p 111-115
- Monteuuis O, Bon M.C. (1998)** : Changement de phase et clonage chez les espèces arborescentes : importance des méristèmes primaires caulinaires. *Groupe d'étude de l'arbre.* Nancy- 23-24 Avril 1998. p11-20.
- Monteuuis O, Dumas E (1992)** : Morphological features as indicators of maturity in acclimatized *Pinus pinaster* from different *in vitro* origins. *Can. J. For. Res.* 22 : p 1417-1421
- Monteuuis O, Gendraud M (1987)** : Nucleotide et nucleic status in shoot tips from juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum* during rest and growth phases. *Tree Physiol.* 3 : p257-263
- Morel G. (1991)** : Microscopie électronique : cryométhodes, immunocytologie, autoradiographie, hybridation *in situ*. Edt. G. Morel. INSERM Ed.
- Mohr H., Schopfer P. (1995)** : *Plant Physiology.* Springer Verlag. p.206
- Mouradov A, Glassick TV, Harmdorf BA, Murphy LC, Marla SS, Yang Y, Teasdale RD (1998)** : Family of MADS-box genes expressed early in male and female reproductive structures of Monterey pine. *Plant Physiol.* 117 : p 55-61
- Mullen RT, Gifford DJ (1993)** : Purification and characterization of catalase from loblolly pine (*Pinus taeda*) megagametophytes. *Plant Physiol.* 103 : p 477-483
- Mullen RT, Gifford DJ (1995a)** : Isocitrate lyase from germinated loblolly pine megagametophytes : enzyme purification and immunocharacterization. *Plant Physiol. Biochem.* 33 (1) : p 87-95
- Mullen RT, Gifford DJ (1995b)** : Purification and characterization of the glyoxysomal enzyme malate synthase following seed germination in *Pinus taeda*. *Plant Physiol. Biochem.* 33 : p 639-648

- Mullen RT, Gifford DJ (1997)** : Regulation of two loblolly pine (*Pinus taeda*) isocitrate lyase genes in megagametophytes of mature and stratified seeds and during postgerminative growth. *Plant Molec. Biol.* 33 : p 593-604
- Mullen RT, King JE, Gifford DJ (1996)** : Changes in mRNA populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification, germination and post-germinative growth. *Physiol. Plant.* 97 : p 545-553
- Mullen, R.T. (1995)**. Regulation of glyoxisomal enzyme gene expression in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds following imbibition. *PhD. University of Alberta, Edmonton.*
- Murphy JB, Hammer MF (1988)** : Respiration and soluble sugar metabolism in sugar pine embryos. *Physiol. Plant.* 74 : p 95-100
- Murphy JB, Hammer MF (1994)** : Starch synthesis and localization in post-germination *Pinus edulis* seedlings. *Can. J. For. Res.* 24 : p 1457-1463
- Murphy JB, Rutter MR, Hammer MF (1992)** : Activity of sucrose synthase and soluble acid invertase following germination of pinyons (*Pinus edulis*) seeds. *Can J. For. Res.* 22 : 442-446
- Murray EW, Adams RE (1980)** : Embryonic control of isocitrate lyase activity in the megagametophyte of the ponderosa pine seeds. *Physiol. Plant.* 49 : p 21-26
- Nyman B (1965)** : Studies on the fat metabolism of light- and dark-germinated seeds of Scots pine (*Pinus sylvestris* L). *Physiol. Plant.* 19 : p 63-75
- Nyman B (1969)** : Studies on sugars and starch in light- and dark-germinated seeds of Scots pine (*Pinus sylvestris* L). *Physiol. Plant.* 22 : p 441-452
- Olsson M., Nilsson R., Norberg P., von Arnold S., Liljenberg C. (1994)** : Maturation in Norway spruce : Alterations in lipid composition. *Plant Physiol. Biochem.* 32 : 225-232
- Owens J.N., Molder M. (1976)**:Vegetative bud development and cone differentiation in *Abies amabilis*. *Can. J. Bot.* 55: 992-1008
- Owston P.W. (1969)** : The shot apex in eastern white pine : its structure, seasonal development, and variation within the crown.*Can. J. Bot.* 47 : 1181-1188.
- Pargney JC, Thalouarn (1978)** : Etude cytologique de l'embryon de Pin d'Alep lors de la germination : influence d'un traitement stimulant par administration successive d'ions mercure et chlore. *Can. J. Bot.* 56 (23) : p 2931-2936
- Paton D.M. (1983)** : Vegetative propagation of adult Eucalyptus. In : Coll. Int.sur les Eucalyptus résistants au froid, CSIRO-AFOCEL, Bordeaux, septembre 1983. pp. 570-586.
- Peng CC , Tzen J T C (1998)** : Analysys of the three essential constituents of oil bodies in developing sesame seeds. *Plant Cell Physiol.* 39 (1) : p 35-42
- Peterson, G. L. (1977)**. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 53, 570-577.
- Pollard D.F.W., Logan K.T. (1977)**: The effects of light intensity, photoperiod, soil moisture potential, and temperature on bud morphogenesis in *Picea* species. *Can. J. For. Res.* 7: 415-421
- Ramaiah PK, Durzan DJ, Mia AJ (1971)** : Amino acids, solubles proteins, and isoenzyme patterns of peroxidase during the germination of jack pine. *Can. J. Bot.* 49 : p 2151-2161

**Ramarosandratana A, Harvengt L, Garin E, Pâques M, Calvayrac R (1999)** : Factors influencing the development of mature somatic embryos of maritime pine (*Pinus pinaster* AIT.). *BIOFOR Novembre 1999*. Vitoria. Spain.

**Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A., Calvayrac R, Pâques M, (2001)** : Effects of carbohydrates source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on maturation of maritime pine (*Pinus pinaster* AIT.) somatic embryos and persistence of embryonal – suspensor mass (ESM) proliferation. sous presse, vol 37, issue 1

**Randolph L.F. (1935)** : A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain technology* . 10 : 95-96

**Reidiboym-Talleux L., Grenier De March G. (1999)**: Lipid and fatty acid composition in non-embryogenic calli and embryogenic tissues in wild cherry (*Prunus Avium*). *Physio. Plant.* 105: 513-520

**Riding R.T. (1976 a)** : Within crown variation in dormant long-shoot apices of mature trees of *Pinus resinosa*. *Can. J. Bot.* 56 : 141-147.

**Riding RT (1972)** : Early ontogeny of seedlings of *Pinus radiata*. *Can. J. Bot.* 50 : p 2381-2387

**Riding R.T. (1976 b)** : The shoot apex of *Picea mariana* of differing rooting potential. *Can. J. Bot.* 54 : 2672-2678

**Riding TR, Gifford M (1973)** : Histochemical changes occurring at the seedling shoot apex of *Pinus radiata*. *Can. J. Bot.* 51 : p 501-512

**Rodionov V.S., Novitskaya YE, Polezhaeva N.V., Makarevski M.F., Ilinova M.K., Kanyuchkova G.K. ( 1988)** : Seasonal variation of lipids in Scotch pine buds, shoots and needles. *Lesovedenie*. 4 : 74-81

**Roland J.C., Vian B. (1991)** : General preparation and staining of thin sections in Electron microscopy of plant cells. ed. Hall J.L., Hawes C. Academic Press. pp. 1-66

**Salajova T., Salaj J., Kormutak A. (1999)**: Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Pl. Sciences*. 145: 33-40

**Scalbert A., Monties B., Favre J.M. (1988)** : Polyphenols of *Quercus robur* : adult tree and *in vitro* grown calli and shoots. *Phytochem.* 11 : 3483-3488

**Schaffer A.A., Petreikov M. (1997)** : Sucrose to starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. *Plant Physiol.* 113 : 739-746

**Schmid K., Andrews J. & Ohlrogge J. (1997)** : Fatty acid and lipid biosynthesis and degradation. Part VII. Chapter 27. In « *Plant metabolism* ». Edt. Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, & Layzel DB. Ed.KINGMAN

**Schneider WL, Gifford DJ (1994)** : Loblolly pine seed dormancy. I. The relationship between protein synthesis and the loss of dormancy. *Physiol. Plant.* 90 : p 246-252.

**Simola LK (1974)** : The ultrastructure of dry and germinating seeds of *Pinus sylvestris* L.. *Acta Bot. Fennica* 103 : p1-31

**Skinner JS, Timko MP (1998)** : Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) contains multiple expressed genes encoding light dependent NADPH : Protochlorophyllide oxidoreductase (POR). *Pl. Cell Physiol.* 39 : p 795-806

**Stone SL, Gifford DJ (1997)** : Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. I. Storage protein reserves. *Int. J. Plant Sci.* 158 : p 727-737

**Stone SL, Gifford DJ (1999)** : Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. II. Storage triacylglycerols and carbohydrates. *Int. J. Plant Sci.* 160 (4) : p 663-671

**Svobodová H, Albrechtová J, Kumstýřová L, Lipavská H, Vågner M, Vondrářková Z. (1999)** : Somatic embryogenesis in Norway spruce : Anatomical study of embryo development and influence of polyethylen glycol on maturation process. *Plant Physiol. Biochem.* 37 : p: 209-221.

**Takahama, U., and Oniki, T. (1997)**. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* **101**, 845-852

**Taylor D.C., Weber N., Underhill E.W., Pomeroy M.K., Keller W.A., Scowcroft W.R., Wilen R.W., Moloney M.M., Holbrook L.A. (1990)** : Storage-protein regulation and lipid accumulation in microspore embryos of *Brassica napus* L. *Planta.* 181 : 18-26

**Tepper HB (1964)** : Ontogeny of the shoot apex of seedlings of *Pinus ponderosa*. *Am. J. Bot.* 51 : p 859-865.

**Trippi V.S. (1963a)** : Studies on ontogeny and senility in plants II. Seasonal variation in proliferative capacity *in vitro* of tissues from branches from juvenile and adult zones of *Aesculus hippocastanum* and *Castanea vulgaris*. *Phyton.* 2 : p146-152

**Trippi V.S. (1963b)** : Studies on ontogeny and senility in plants I. Changes of growth vigor during the juvenile and adult phases of ontogeny in *Tilia parviflora* and growth in juvenile and adult zones of *Tilia*, *Ilex aquifolium* and *Robinia pseudoacacia*. *Phyton.* 2 : p135-145

**Trippi V.S. (1963c)** : Studies on ontogeny and senility in plants V. Leaf fall in plants of different age of *Robinia pseudoacacia* and the effect of gibberelic acid on *R. pseudoacacia* and *Morus nigra*. *Phyton.* 2 : p167-171

**Trippi V.S. (1963d)** : Studies on ontogeny and senility in plants VI. Reversion in *Acacia melanoxylon* and morphogenic changes in *Gaillardia pulchella*. *Phyton.* 2 : p172-174

**Tzen JTC, Cao YZ, Laurent P, Ratnayake C, Huang AHC (1993)** : Lipids, proteins and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.* 101: p 267-276

**Uggla C, Moritz T, Sandberg G, Sundberg B (1996)** : Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : p 9282-9286

**Willekens, H. Inzé, D. Van Montagu, M. Van Camp, W. (1995)** Catalases in plants. *Molecular Breeding* **1**: 207-228

**Wyman J, Trembray MF, Laliberté S (1996)** : Cell cycle activation during imbibition and visible germination in embryos and megagametophytes of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). *Ann. of Bot.* 78 : p 245-253

**Yeung EC (1999)** : The use of histology in the plant tissue culture systems – Some practical comments. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 35 :p 137-143

**Zou J., Abrams G, Barton D., Taylor D., Pomeroy K., Abrams S. (1995)** : Induction of lipid and oleosin biosynthesis by (+)-abscissic acid and its metabolites in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv. Reston. *Plant Physiol.* 108 : 563-571.

# SOMMAIRE

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

## CHAPITRE I: INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

## CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES 7

<b>II.1- MATÉRIEL</b>	<b>8</b>
II.1.1 – LES SEMIS , LES PLANTS JUVÉNILES ET ADULTES	8
II.1.2 - LES EMBRYONS SOMATIQUES ET ZYGOTIQUES CULTIVÉS <i>IN VITRO</i>	9
<b>II.2- MÉTHODES</b>	<b>10</b>
II.2.1 - OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES	10
II.2.2 - MICROSCOPIE À BALAYAGE	10
II.2.3 - MICROSCOPIE PHOTONIQUE	10
II.2.4 - EXPÉRIENCES ANNEXES : ETUDE DE LA CATALASE	14

## CHAPITRE III: DE L'EMBRYON MATURE AU SEMIS 16

<b>III.1 – INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
III.1.1 - GRAINE ET JEUNES SEMIS	17
III.1.2- EMBRYONS SOMATIQUES	22
III.1. 3 - OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	23
<b>III.2 – RESULTATS</b>	<b>25</b>
III.2.1- EMBRYONS ZYGOTIQUES CONTENUS DANS L'ENDOSPERME	25
III.2.2 - EMBRYONS SOMATIQUES ET ZYGOTIQUES EXCISÉS	34
<b>III.3 - DISCUSSION</b>	<b>38</b>
III.3.1- GERMINATION ET CROISSANCE POST-GERMINATIVE DES GRAINES	38
III.3.2 - CROISSANCE DES EMBRYONS SOMATIQUES ET DES EMBRYONS ZYGOTIQUES EXCISÉS	56
III.3.3 – SCHÉMA RÉCAPITULATIF DES ÉCHANGES MÉTABOLIQUES PENDANT LA GERMINATION ET LA CROISSANCE POST-GERMINATIVE	63

## CHAPITRE IV: DES PLANTS JUVÉNILES, AUX ADULTES VÉGÉTATIFS ET REPRODUCTEURS EVOLUTION SAISONNIÈRE DE L'EXTRÉMITÉ APICALE DES BOURGEONS 65

<b>IV.1- INTRODUCTION</b>	<b>66</b>
<b>IV.2- RESULTATS</b>	<b>69</b>

IV.2.1 – MORPHOLOGIE DES EXTRÉMITÉS APICALES CAULINAIRES	69
IV.2.2- MORPHOMÉTRIE DE L' APEX DU BOURGEON TERMINAL	74
IV.2.3- RÉPARTITION DES RÉSERVES	81
<b>IV.3 - DISCUSSION</b>	<b>87</b>
IV.3.1 - IDENTIFICATION DES PÉRIODES D' ACTIVITÉ	87
IV.3.2 - EVOLUTION DU CONTENU EN RÉSERVES	97
IV.3.3 - RELATION ENTRE LES VARIATIONS SAISONNIÈRES DE L' ORGANOGÈNE ET DE LA GESTION DES MÉTABOLITES : HYPOTHÈSE	102
<b><u>CHAPITRE V: CONCLUSION GÉNÉRALE</u></b>	<b>109</b>
<b>V.1 – SYNTHÈSE</b>	<b>110</b>
V.1.1 – ORGANOGÈNE	110
V.1.2 – LES RÉSERVES	111
V.1.3 - ORGANOGÈNE ET GESTION DES RÉSERVES AMYLACÉES: HYPOTHÈSES	114
<b>V.2 – PROCESSUS IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION DE L' APEX AU COURS DE LA VIE DE LA PLANTE ?</b>	<b>116</b>
<b><u>CHAPITRE VI: BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>119</b>

