



UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP - DAKAR
FACULTE DES SCIENCES



THESE

de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles

présentée par

Marie Madeleine SPENCER-LOPES

Maître-Assistante à la Faculté des Sciences

pour obtenir le Grade de Docteur ès Sciences Naturelles

**LES EBAUCHES DE RACINES ADVENTIVES
DE LA TIGE DE *SESBANIA ROSTRATA*
BREM (LEGUMINOSAE) :
ETUDE CYTOPHYSIOLOGIQUE AVANT ET
APRES LEUR DEVELOPPEMENT.**

Soutenue le 6 octobre 1992 devant la Commission d'Examen :

Président : Professeur Amadou T. BA, Univ. C.A.D.
Membres: Professeur Emile DUHOUX (Directeur de thèse), Univ. Paris VII
Docteur André CHAMEL, Directeur de Recherches C.E.N.G. (Rapporteur)
Docteur Bernard DREYFUS, Directeur de Recherches ORSTOM
Professeur Antoine NONGONIERMA, Univ. C.A.D.
Docteur Mouhamadou L. THIAM, Maître de Conf. Univ. C.A.D.

A la mémoire de mon Père

Les travaux ayant permis l'obtention des résultats présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'Université Cheikh Anta DIOP, en collaboration étroite avec le Laboratoire de Biotechnologies des Systèmes Symbiotiques Forestiers de Nogent sur Marne (France) et le Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble (France), sous la direction scientifique du Professeur Emile DUHOUX.

Mes remerciements vont, tout d'abord, aux autorités universitaires sénégalaises qui m'ont permis d'effectuer ce travail dans le cadre de mes activités professionnelles.

Monsieur Emile DUHOUX a bien voulu, il y a quelques années, m'accueillir dans son laboratoire de Cytophysiologie. Il m'a ainsi donné la chance de travailler à ses côtés dans la recherche scientifique pour la préparation d'un Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Végétale. Sous sa direction, j'ai pu ensuite obtenir une thèse de Doctorat de 3ème Cycle. Ses grandes capacités scientifiques et son sens profond des relations humaines, m'ont beaucoup aidée durant toutes ces années et ont conduit à la présentation de ce mémoire pour l'obtention du grade de Docteur ès-Sciences Naturelles. Son intérêt pour mon travail ne s'est jamais démenti, même après son départ de Dakar. Je prie Monsieur E. DUHOUX, de bien vouloir trouver ici l'assurance de ma profonde reconnaissance, de mon attachement indéfectible à l'esprit de son enseignement et surtout d'un souvenir impérissable.

J'ai été très sensible au soutien que Madame le Professeur Yvette PARES m'a toujours apporté dans le cadre de mon travail comme dans la vie de tous les jours. Son sens aigu des valeurs humaines et sa foi inébranlable dans les vertus de la sagesse africaine m'ont profondément marquée. Qu'elle trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Amadou Tidiane BA, Chef du Département de Biologie Végétale. Son bureau toujours ouvert a été pour moi un lieu de discussions et d'échanges fructueux, mais aussi un havre de paix où toutes les angoisses et inquiétudes se dissipent. Il me fait, en particulier, le grand honneur de bien vouloir présider cette commission d'examen. Qu'il trouve ici, l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse à Monsieur le Professeur Antoine NONGONIERMA toute ma gratitude pour l'aide et les conseils judicieux qu'il m'a toujours prodigués. Sa connaissance profonde de la nature est pour nous, ses jeunes frères et soeurs, une source intarissable d'enseignement.

Mes remerciements vont également à Monsieur Mouhamadou Lamine THIAM, Maître de Conférences au Département de Biologie Végétale, pour les critiques et les conseils dont il m'a fait bénéficier au cours de nos nombreuses discussions. Je le prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je dois beaucoup à Madame Jeanine GAGNAIRE, Directeur de recherches au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, pour le soutien et la direction sans faille qu'elle m'a apportés au cours du travail effectué sur l'utilisation des radio-isotopes en biologie végétale. Qu'elle trouve ici, l'assurance de ma profonde gratitude.

Le Docteur André CHAMEL, Directeur de Recherches au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, a suivi avec intérêt mes travaux sur l'application des radio-isotopes à l'étude de l'absorption racinaire chez *Sesbania rostrata*, il m'a judicieusement conseillée pendant mon stage. Je le remercie également pour avoir accepté de discuter les résultats et, malgré ses nombreuses occupations, de participer au jury.

Au Docteur Bernard DREYFUS, Directeur de Recherches au Laboratoire de Microbiologie des sols du Centre ISRA / ORSTOM de Dakar, j'adresse également mes remerciements très sincères pour la collaboration fructueuse qu'il a initiée avec notre département dans le cadre de ce travail sur *Sesbania rostrata* et aussi pour avoir accepté de participer à ce jury d'examen.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Alain COTTIGNIES, Maître de Conférences à l'Université de Paris VI. Les discussions fructueuses qu'il a bien voulu m'accorder et dont j'ai tiré le plus grand bénéfice, mais surtout le fait d'avoir accepté de prendre de son temps pour relire et critiquer les résultats, m'ont profondément touchée. Je l'en remercie très sincèrement.

Il n'est pas possible de citer ici toutes les personnes qui m'ont aidée et encouragée au cours des longues années passées à explorer les ébauches de racines adventives de *S. rostrata*, et sans lesquelles je n'aurais pu effectuer ce travail.

J'adresse à Monsieur le Professeur Antoine NONGONIERMA toute ma gratitude pour l'aide et les conseils judicieux qu'il m'a toujours prodigués. Sa connaissance profonde de la nature est pour nous, ses jeunes frères et soeurs, une source intarissable d'enseignement.

Mes remerciements vont également à Monsieur Mouhamadou Lamine THIAM, Maître de Conférences au Département de Biologie Végétale, pour les critiques et les conseils dont il m'a fait bénéficier au cours de nos nombreuses discussions. Je le prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je dois beaucoup à Madame Jeanine GAGNAIRE, Directeur de recherches au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, pour le soutien et la direction sans faille qu'elle m'a apportés au cours du travail effectué sur l'utilisation des radio-isotopes en biologie végétale. Qu'elle trouve ici, l'assurance de ma profonde gratitude.

Le Docteur André CHAMEL, Directeur de Recherches au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, a suivi avec intérêt mes travaux sur l'application des radio-isotopes à l'étude de l'absorption racinaire chez *Sesbania rostrata*, il m'a judicieusement conseillée pendant mon stage. Je le remercie également pour avoir accepté de discuter les résultats et, malgré ses nombreuses occupations, de participer au jury.

Au Docteur Bernard DREYFUS, Directeur de Recherches au Laboratoire de Microbiologie des sols du Centre ISRA / ORSTOM de Dakar, j'adresse également mes remerciements très sincères pour la collaboration fructueuse qu'il a initiée avec notre département dans le cadre de ce travail sur *Sesbania rostrata* et aussi pour avoir accepté de participer à ce jury d'examen.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Alain COTTIGNIES, Maître de Conférences à l'Université de Paris VI. Les discussions fructueuses qu'il a bien voulu m'accorder et dont j'ai tiré le plus grand bénéfice, mais surtout le fait d'avoir accepté de prendre de son temps pour relire et critiquer les résultats, m'ont profondément touchée. Je l'en remercie très sincèrement.

Il n'est pas possible de citer ici toutes les personnes qui m'ont aidée et encouragée au cours des longues années passées à explorer les ébauches de racines adventives de *S. rostrata*, et sans lesquelles je n'aurais pu effectuer ce travail.

Je voudrais ainsi exprimer mes remerciements très sincères à toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce travail.

A tout le personnel du Département de Biologie Végétale du CENG, pour l'aide spontanée que vous m'avez apportée et pour cette atmosphère de chaleureuse amitié dans laquelle s'est effectué mon séjour.

Au personnel du CTFT et du BSFT de Nogent sur Marne pour leur collaboration amicale et sans faille. Je prierai particulièrement, Mademoiselle Hélène LAFORGE de trouver ici le gage d'une amitié sincère.

A Monsieur Pierre LOUIS du laboratoire d'Embryologie Expérimentale du CNRS de Nogent sur Marne pour toutes les "ficelles" du métier de photographe qu'il a bien voulu me faire partager.

A mes collègues et amis des Départements de Biologie animale, de Géologie et de Chimie pour leur assistance et leur amitié constantes. Je citerai plus particulièrement Messieurs Em. COLY, Ed. COLY, B. MARCHAND, X. MATTEI, M. NDAO, D. NGOM, Y. SIAU, B.S. TOGUEBAYE, que j'ai si souvent sollicités.

A tous les chercheurs, techniciens et personnels administratifs du Centre de Recherche ISRA / ORSTOM de Bel-Air, plus particulièrement du Laboratoire de Biologie des sols, pour l'aide précieuse qu'ils m'ont toujours apportée avec beaucoup de gentillesse.

A mes chers amis du Département de Biologie Végétale, collègues, techniciens et personnel administratif, à aucun moment votre sollicitude à mon égard ne s'est démentie. Vous avez toujours répondu à mon appel, que ce soit pour des aménagements horaires, pour des discussions de fond ou même pour des manipulations. Je vous adresse à tous et à chacun en particulier, mes sincères remerciements. Je dirai, à la même occasion, à mon amie et collègue Madame Gnagna LEYE de bien vouloir trouver ici l'assurance d'une amitié sincère et durable.

Je remercie aussi très sincèrement les autorités des centres de recherches français dans lesquels j'ai eu la chance de travailler pour toutes les facilités qu'elles m'ont accordées dans la réalisation de mes programmes de stages.

A l'Agence Internationale pour l'énergie Atomique (AIEA), à la Mission Française de Coopération à Dakar, à la Fondation pour l'impulsion de la Recherche Scientifique au Sénégal (FIRST) et à la Fondation Internationale pour la Science (FIS), plus particulièrement à son Secrétaire Scientifique Monsieur Jacques BALDENSPERGER j'adresse mes sincères remerciements pour leur assistance financière.

INTRODUCTION GENERALE

Une plante supérieure, comme tout organisme vivant pluricellulaire, constitue un système intégré au sein duquel les diverses unités ou organes s'influencent mutuellement dans un réseau de corrélations multiples. Ces interactions, à l'état naturel, vont permettre à la plante de prendre sa forme spécifique (Champagnat, 1974).

Les corrélations qui contrôlent la morphogenèse de l'appareil racinaire sont beaucoup moins connues que celles qui concernent l'appareil caulinaire.

De même, peu de résultats ayant trait au contrôle corrélatif de la rhizogenèse adventive ont été recueillis, et pour des raisons économiques évidentes, on connaît mieux la rhizogenèse induite dans le cadre du bouturage que l'induction et la croissance des racines adventives préformées.

L'induction des racines adventives peut survenir à la suite d'une rupture des corrélations internes, sous l'effet d'une blessure de la plante ou d'un bouturage. Des racines adventives peuvent également se former de manière spontanée et naturelle chez certaines espèces végétales. De nombreuses plantes possèdent, en effet, deux systèmes racinaires : le système racinaire primaire ou séminal qui provient du développement de la radicule pendant la germination et le système racinaire adventif qui, lui est induit *a posteriori* à partir d'organes divers de la plante ; tiges, feuilles, ou organes reproducteurs.

A cause de leur origine caulinaire, et peut-être aussi de leur position aérienne, les racines adventives de nombreuses espèces ont la particularité de développer des fonctions parfois très différentes de celles que l'on rencontre chez les racines souterraines. Ainsi en est-il de certaines plantes tropicales qui possèdent des racines adventives capables de développer des structures, des formes et des fonctions nouvelles (par exemple, les pneumatophores des plantes de mangrove).

Une illustration en est fournie, également, par des légumineuses tropicales de milieux humides, comme certaines espèces du genre *Aeschynomene* et du genre *Sesbania* dont les racines adventives présentes sur la tige, à l'état d'ébauches préformées, peuvent en présence du *Rhizobium* spécifique se transformer en nodules aériens fixateurs d'azote atmosphérique.

La nodulation caulinaire présente un grand intérêt pour l'agronomie, car elle augmente considérablement les potentialités

fixatrices de la plante qui est souvent nodulée, par ailleurs au niveau de l'appareil souterrain, et rend le système symbiotique moins dépendant des facteurs de l'environnement (Dreyfus et Dommergues, 1980 et 1981 ; Dommergues *et al.*, 1985).

Les sites de nodulation caulinaire de *S. rostrata* ont retenu notre attention car les racines adventives qui les constituent présentent des propriétés très originales (Dreyfus, 1982 ; Duhoux & Dreyfus, 1982). Tout d'abord, contrairement aux racines adventives préformées décrites à ce jour, dans la littérature, notamment par Favre (1977 a et b), elles ne restent pas "latentes au sein des tissus qui leur ont donné naissance" mais se présentent à l'air libre, après avoir traversé l'épiderme de la tige.

Ensuite, les phénomènes de rhizogenèse sont bien séparés des phénomènes de croissance racinaire *sensu stricto*, cela permet donc d'envisager d'étudier séparément l'un ou l'autre de ces phénomènes encore imparfaitement compris.

Enfin, la position prédéterminée et le grand nombre d'ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata* font de cette plante un modèle expérimental très accessible pour étudier à la fois l'état physiologique de ces racines latentes, leur développement en racines adventives typiques, leur rôle dans la nutrition de la plante, leur évolution en nodules caulinaires en présence de *Azorhizobium caulinodans* et enfin la déviation morphogénétique du développement de certaines d'entre-elles, en bourgeons lorsque des fragments de tige sont cultivées *in vitro*.

Nous avons utilisé ce système biologique naturel pour réaliser d'une part, une étude expérimentale des corrélations morphogénétiques et physiologiques multiples qui s'exercent entre les différentes unités ou organes végétaux et, d'autre part pour analyser les processus de différenciation des ébauches racinaires adventives de la tige de la légumineuse tropicale annuelle *Sesbania rostrata*.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à une étude détaillée de la morphologie, de l'anatomie, et de la caractérisation physiologique de ces ébauches de racines adventives en attente sur la tige. Des résultats concernant la répartition de certains éléments minéraux identifiés dans ce matériel, au niveau de la tige et au niveau des ébauches racinaires, sont également présentés.

Les corrélations morphogénétiques qui contrôlent l'évolution de ces ébauches en racines adventives typiques sont étudiées, dans un deuxième chapitre.

L'utilisation de traceurs radioactifs (^{86}RB et ^{134}Cs), a permis d'étudier l'absorption et la répartition des éléments minéraux dans la plante de manière à mieux cerner le rôle de ces racines adventives dans la nutrition minérale de la plante.

Dans un troisième chapitre, il est abordé, l'étude des potentialités morphogénétiques de ces ébauches : ces dernières en culture *in vitro* peuvent donner naissance à des bourgeons adventifs, évoluant eux-mêmes très rapidement en rameaux feuillés. Cette formation de bourgeons adventifs a également été observée au niveau des sites de nodulation de *Aeschynomene afraspera*. Une étude comparative de la plasticité morphogénétique des tissus des sites d'infection chez ces deux espèces a donc été effectuée.

Au préalable nous nous proposons de rappeler, dans une synthèse bibliographique, les connaissances actuelles concernant les racines adventives, les conditions de leur formation, la croissance racinaire, les principales fonctions des racines adventives et, enfin la plasticité morphogénétique au niveau des apex de racines chez certaines espèces végétales.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

1 - Diversité des racines adventives dans le règne végétal.

La grande majorité des plantes présente un appareil végétatif typique constitué de feuilles, d'une tige et de racines souterraines. Quelques plantes cependant ne possèdent pas de racines ; c'est le cas des hydrophytes flottantes : *Wolffia arhiza*, (*Lemnaceae*), *Salvinia* spp (*Salviniaceae*) et *Ceratophyllum* (*Ceratophyllaceae*).

On trouve également des plantes arhizes chez les *Bromeliaceae* épiphytes, chez les *Orchidaceae* saprophytes et chez certaines plantes parasites, comme les *Rafflesiaceae* (Favre, 1977a).

Les études paléontologiques ont montré que les premières plantes terrestres n'avaient pas de racines mais seulement des tiges. Par exemple, les Psilotales qui datent du Dévonien, possédaient des rhizomes horizontaux associés à une tige érigée. Les rhizomes de *Rhynia*, portaient quant à eux des rhizoïdes unicellulaires qui pourraient être considérés comme les précurseurs des structures racinaires (Barlow, 1976).

L'anatomie comparée et la paléobotanique montrent que le système racinaire adventif est un caractère primitif. Il semblerait que les premières plantes apparues sur terre portaient des racines adventives produites par des zones rhizogènes spécifiques situées à la base des tiges. Le système racinaire primaire ou séminal tel que nous le connaissons actuellement n'existait pas. Ce système peut donc être considéré comme un caractère spécifique des Angiospermes et des Gymnospermes qui sont apparus plus tard (Barlow, 1976).

La distribution des racines adventives a progressivement évolué de la base des tiges vers des zones plus apicales (Fig. 1). Cette progression vers les parties hautes de l'appareil végétatif peut être considérée comme un caractère récent permettant aux plantes d'explorer plus rapidement et de manière plus efficace des niches écologiques nouvelles. Très souvent, d'ailleurs, les racines adventives recolonisent des zones perdues par les racines séminales, c'est ce que Kahn (1977 et 1978) appelle "la reconquête de l'espace proximal".

Les racines adventives sont très répandues parmi les Angiospermes actuelles, on les rencontre depuis les xérophytes jusqu'au hydrophytes, chez les monocotylédones comme chez les dicotylédones. Chez les plantes épiphytes, les racines séminales dégénèrent souvent très tôt et sont remplacées par des racines adventives

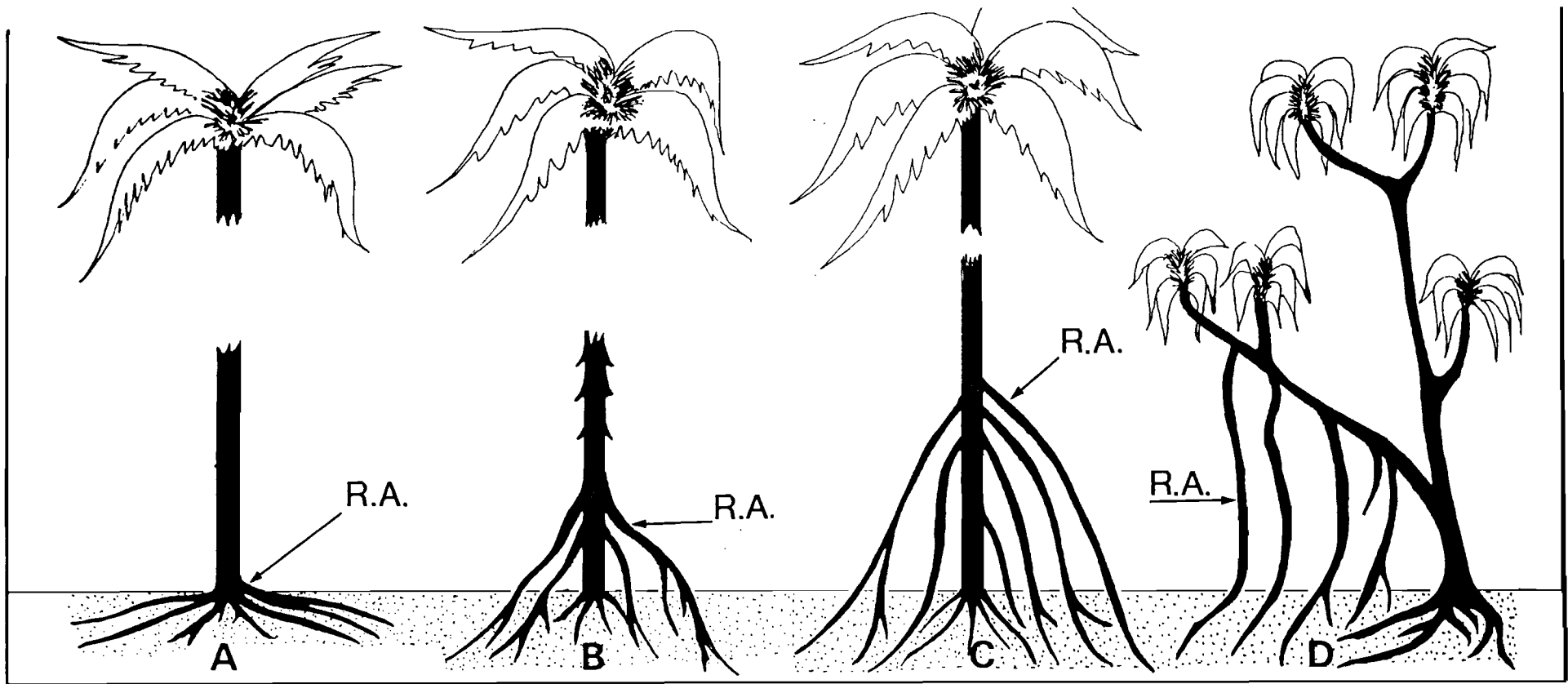


Fig. 1 - Migration des zones démergence des racines adventives (R.A.) vers les parties hautes des tiges :

- A - *Elais guineensis*
- B - *Cryosophila nana*
- C - *Iriartea exorrhiza*
- D - *Pandanus candelabrum*.

d'après Jenik (1978).

Ces racines adventives des plantes épiphytes ou hémiepiphytes présentent généralement un dimorphisme caractéristique et sont traditionnellement classées en deux groupes :

- les " racines adventives de fixation "
- et les " racines adventives d'assimilation " (Goebel, 1905 ;

Davis, 1970).

Ainsi chez la liane *Philodendron melanochrystum* (Araceae) on observe des racines adventives fixatrices qui croissent latéralement et enserrant le support et, des racines adventives nourricières qui sont basipètes.

Très souvent d'ailleurs, les caractéristiques anatomiques de ces racines adventives changent dès qu'elles pénètrent dans le sol, comme le montre le tableau I ci-dessous.

Tableau I - Caractéristiques des racines adventives avant et après leur pénétration dans le sol (D'après Kapil & Rustagi, 1966) et Hinchee (1981).

Espèces	Caractéristiques	Racines aériennes	Racines terrestres
<i>Ficus benghalensis</i>	poils absorbants	absents	présents
	lenticelles	nombreuses	peu nombreuses
	endoderme	peu développé	bien développé
	moelle	bien distincte	absente
	tissus secondaires	quelques vaisseaux (petite taille)	nombreux vaisseaux (grande taille)
<i>Monstera deliciosa</i>	poils absorbants	absents	présents
	raphides	quelques uns	nombreux

Chez *Ficus benghalensis* les racines adventives peuvent se développer en très grand nombre sur les branches latérales. On connaît des spécimens dont la frondaison peut atteindre 500 à 600 mètres de circonférence et qui présentent plusieurs centaines de "racines troncs" pouvant elles-mêmes atteindre 3,70 m de circonférence (Galil, 1984).

Les racines échasses sont d'épaisses racines adventives qui prennent naissance sur le tronc ou les tiges, souvent à 1 m du sol ou de l'eau et qui se recourbent ensuite vers le bas pour aller se ficher dans la vase. Les exemples les plus typiques de ces racines-échasses se rencontrent dans les mangroves : *Rhizophora* spp et *Pandanus* spp. De telles racines échasses, encore appelées racines nodales existent également chez *Zea mays* (Clowes, 1978). Les racines échasses peuvent être considérées soit comme une réponse à une atmosphère très humide, soit comme un mécanisme d'évitement de l'asphyxie suite à l'inondation, elles auraient donc à la fois un rôle de fixation et un rôle de nutrition.

Clemens *et al.* (1978) et Blake & Reid, (1981) ont montré que chez certaines plantes placées en condition d'inondation, la formation de racines adventives associée à la mise en place de l'aérenchyme constituent une réponse adaptative qui permettrait à la plante de continuer à assurer ses échanges gazeux et nutritifs.

Certaines racines adventives deviennent des épines par arrêt de la croissance et lignification des cellules corticales, exemple ; épines ou pneumorhizes du palmier *Euterpe oleracea* (De Granville, 1974).

Les racines contreforts sont anatomiquement des racines adventives reliées au tronc par une structure particulière formée en partie par les tissus du tronc, en partie par les tissus des racines elles-mêmes, c'est le cas du fromager (*Ceiba pentandra*, *Bombacaceae*).

Chez certaines espèces les racines adventives prennent naissance au niveau de l'apex de la tige mais croissent vers le bas dans les tissus du cortex et n'émergent que peu avant d'atteindre le sol, cas du *Lycopodium* spp (*Lycopodiaceae*) (Stockey, 1907).

Chez les plantes aquatiques les racines adventives sont également de deux types avec des caractéristiques anatomiques différentes. Ainsi *Ludwigia adscendens* et *L. peploides* (*Onagraceae*) présentent des racines adventives polymorphes : les racines dites "normales" à diamètre faible et à géotropisme positif et les racines hypertrophiées à diamètre important et à géotropisme négatif (Ellmore, 1981 ; Samb, 1983 et 1987).

Les plantes de la famille des *Podostemaceae* qui sont très répandues dans la zone tropicale, ont d'abord été considérées comme des algues ou des lichens à cause de leur structure thalloïde. En fait ce "thalle" est une racine adventive pouvant porter des bourgeons caulinaires (Barlow, 1976).

Parmi les orchidées, les genres *Microedia*, *Toeniophyllum* et *Dampopylocentrum* sont caractérisés par leur structure apparemment caule, avec seulement des racines adventives qui peuvent atteindre 30 cm de longueur. Des tiges existent cependant chez ces plantes mais elles présentent une croissance très lente et les feuilles sont réduites à de petites écailles (Jonsson, 1981).

La disposition aérienne des racines adventives leur confère généralement des propriétés complémentaires à celles des racines séminales, par exemple la possibilité d'extraction de nutriments de milieux autres que le sol, comme le milieu aérien ambiant ou des niches écologiques particulières.

C'est ainsi que le *Codonanthe uleana* (*Gesneriaceae*) ne peut vivre en épiphyte qu'après formation d'un "jardin de fourmis", c'est-à-dire après formation d'une association étroite entre ses racines adventives et les fourmis commensales, sinon elle vit en plante terrestre. Les racines adventives viennent extraire l'eau et les substances nutritives de l'humus et des débris accumulés par les insectes au niveau de certaines feuilles modifiées (Barlow, 1976).

Ces structures racinaires adventives interviennent bien souvent dans la multiplication végétative, c'est-à-dire la propagation de la plante, par rupture des stolons ou des rhizomes. Chez *Musanga smithii* (*Moraceae*) une nouvelle pousse naît souvent à partir du point de pénétration de la racine dans le sol. Ceci constitue une forme de multiplication végétative très efficace pour cette espèce qui fleurit très abondamment (Barlow, 1976).

1 - Conditions de formation des racines adventives

Les conditions de formation des racines adventives varient considérablement avec les familles, les genres, les espèces, les cultivars et même avec l'âge et la nature de l'organe qui leur donne naissance : tige, feuilles ou bourgeons.

Chez les cryptogames vasculaires, de même que chez certaines orchidées du genre *Aerangis*, la rhizogenèse adventive spontanée paraît être la règle (Emberger, 1960). Les racines adventives sont encore prépondérantes chez les monocotylédones. Par contre, chez les dicotylédones la formation des racines adventives intervient soit en complément de l'enracinement latéral, soit le plus souvent après

bouturage, c'est-à-dire après isolement de fragments de tiges ou d'autres organes de la plante.

Dans tous les cas, la formation des racines adventives implique une transformation profonde de l'activité histologique des tissus qui leur donnent naissance.

Du point de vue histologique, il est généralement admis que les racines adventives ont une origine interne, c'est-à-dire qu'elles prennent naissance au niveau des tissus conducteurs ou au niveau des tissus parenchymateux voisins. Des racines adventives d'origine superficielle existent, cependant chez *Crassula multica*, chez *Armorica rustica* et chez *Nasturtium officinale* (Champagnat & Blatteron, 1966 ; Gautheret, 1969 et Ballade, 1970).

Le processus de la rhizogenèse a été étudié de manière détaillée par Buvat (1944, 1945) chez *Lycopersicum esculentum* et *Brimeura amethystina*. Il est actuellement admis que la succession des différentes phases de dédifférenciation et de différenciation décrites par Buvat n'est pas spécifique à ces plantes ni même à la rhizogenèse. Dans ses grandes lignes, ce processus est commun à toutes les néoformations d'organes.

En ce qui concerne la rhizogenèse *sensu stricto* si les auteurs s'accordent sur le fait qu'il y a généralement plusieurs phases, il n'y a pas l'unanimité quant au nombre des différentes étapes. Nous adopterons la chronologie de Favre (1977a) modifiée par White & Lowell (1984) qui nous paraît simple et suffisamment explicite avec trois étapes principales :

- la première consiste en une activation générale des tissus qui vont donner naissance à la racine adventive,
- la seconde est marquée par le développement d'une activité mitotique importante: c'est l'édification du champ morphogénétique de la future racine,
- et dans une troisième étape, le champ morphogénétique organisé entre en croissance.

Il faut signaler toutefois, que ces étapes ne se succèdent pas forcément ; c'est ainsi que des cellules activées peuvent ne jamais donner naissance à une racine ou encore la racine peut prendre naissance à une certaine distance des cellules activées.

Des racines adventives peuvent également être mises en place à la suite d'une infection par certains agents pathogènes. La tomate, par

exemple, peut former des racines adventives en réponse à l'infection par *Pseudomonas solanacearum* ou *Corynebacterium michiganense* (Grieve, 1941). Un autre exemple célèbre de formation des racines adventives à la suite d'une infection est le cas de l'infection par *Agrobacterium rhizogenes* qui donne naissance au point d'infection à une touffe de racines adventives caractéristiques : les " Hairy Roots" (Riker *et al*, 1980) et cela sur de nombreuses plantes : pommier, rosier, betterave à sucre et Forsythia.

Plusieurs auteurs ont, par ailleurs, signalé l'existence de racines adventives courtes abondamment produites en conditions sèches.

Cannon (1949) avait constaté que certaines annuelles désertiques pouvaient former des racines latérales de "deuxième poussée" initiées seulement en milieu sec et persistant à l'état de rudiments tant que dure la sécheresse.

Chez *Sinapis alba* de nombreuses petites racines adventives à peine visibles à l'oeil nu apparaissent sur le pivot ou les racines latérales en conditions de stress hydrique (Vartanian, 1971, 1972 a et b, 1981 et 1984). De telles racines ont également été décrites chez des *Zygophyllaceae* comme le *Zygophyllum dumosum* et le *Tribulus cistoïdes* (Allen & Allen, 1949). Ces racines représentent probablement une réponse adaptative qui permet la mise en place rapide d'une importante surface absorbante dès que les conditions d'humidité redeviennent optimales.

Il ne semble pas y avoir d'orientation spécifique de la distribution des racines adventives, ni la dominance apicale, ni la vascularisation des noeuds ou entre-noeuds ne permettent d'expliquer la répartition des racines adventives chez une plante donnée. Weber (1936) a proposé une classification des R.A en quatre catégories principales :

- les racines adventives hypocotylaires (ex : *Balsamina*),
- les racines adventives nodales (ex : *Ranunculaceae*),
- les racines adventives bourgeonnaires (ex : *Crassulaceae*),
- et les racines adventives internodales (ex : *Hedera*).

Toutes les racines adventives décrites précédemment sont parfaitement développées, mais il existe également des racines adventives sous forme d'ébauches racinaires qui restent latentes et ne poursuivent leur croissance que dans certaines conditions.

En effet, un certain nombre de plantes présentent des "racines préformées" à l'aisselle des feuilles, au niveau des noeuds ou plus

rarement, au niveau des entre-noeuds. Ces racines sont généralement "latentes au sein des tissus qui leur ont donné naissance" (Favre, 1977 a), c'est le cas de *Populus nigra* var. *italica* (Shapiro, 1958), de *Salix fragilis* L. (Haissig, 1970), de l'olivier, de certaines espèces des genres *Citrus*, *Cotoneaster*, *Hydrangea*, *Jasminum*, *Ribes*, (Favre, 1977 a et b), et de *Tradescantia fulmensis*, (Nadjahi, 1977 et Nadjahi et Favre, 1980).

Swingle (1925) avait également montré l'existence de racines adventives latentes groupées en amas en un même point appelé " Burr-knot" chez certains arbres fruitiers tels les pommiers et les cognassiers. Récemment des ébauches de racines adventives latentes ont été décrites chez des *Aeschynomene* (Alazard, 1985 ; Alazard, 1990).

La mise en place de ces ébauches de racines préformées est probablement contrôlée génétiquement comme le suggère Haissig (1970) pour les espèces qui présentent de primordiums racinaires préformés. Zobel (1975) a montré, sur la base d'études de mutagenèse chez la tomate, que la mise en place des racines séminales et des racines adventives est contrôlée par différentes parties du génome de la plante. Mais on ne connaît pas encore le nombre de gènes impliqués dans cette régulation.

Concernant la régulation physiologique de la mise en place de ces racines adventives, nous disposons de relativement peu de résultats définitifs. Il est, cependant, généralement admis que l'auxine joue un rôle primordial dans l'initiation et le développement des racines adventives (Haissig, 1970, 1972 et 1974 ; Leroux, 1973). Ainsi Weigel *et al.* (1984) ont montré que plus la concentration en auxine présente à la base de la bouture au moment du prélèvement est importante, plus le nombre de racines adventives formé est important. De même Brunner (1978) en utilisant la chromatographie en phase gazeuse a montré dans le dernier centimètre de la base des boutures de *Phaseolus vulgaris* L. une augmentation de la concentration en AIA et AIB dans les premières 24 heures après le prélèvement. Cette période correspond aussi au plus fort pourcentage de formation de racines adventives. Au delà de 24 heures, le taux de ces auxines diminue ; ce qui entraîne une réduction de la rhizogénèse et plutôt la poursuite de l'élongation racinaire (Vierskov, 1978).

Les auxines proviennent généralement des bourgeons et des feuilles. Ces dernières interviennent non seulement dans la synthèse et le transport de l'auxine vers les zones cibles, mais aussi dans la synthèse d'autres substances pouvant intervenir en synergie avec ces auxines : l'indole et les composés phénoliques (Jarvis & Booth, 1981 ; Jarvis *et al.*,

1983). L'auxine favorise également le transport des carbohydrates, c'est-à-dire des réserves énergétiques vers la base de la bouture.

3 - Croissance des racines adventives.

Après formation du "champ morphogénétique", la nouvelle ébauche racinaire est généralement prête pour l'élongation. Cependant, elle peut entrer immédiatement en croissance, par exemple lors d'un bouturage, ou rester latente, pendant un temps plus ou moins long, c'est le cas pour les racines préformées.

Dans tous les cas, lorsque la croissance est induite, on constate qu'après une phase de multiplication cellulaire assez "désordonnée", il se manifeste, au sein du méristème radical, une certaine organisation, c'est-à-dire une orientation des divisions et des directions d'élongation cellulaire. C'est ainsi que vont s'édifier progressivement le cylindre central en position interne, le cortex, l'épiderme et la coiffe de la future racine (Favre, 1977 a).

Il faut noter que chez les racines préformées, la croissance peut être assurée soit par l'addition de nouvelles cellules produites par le cambium, de la même façon que se mettent en place les cellules du phloème secondaire, c'est le cas de *Salix fragilis* (anciennement *S. cordata* ; Carlson, 1938 et 1950). Par contre, chez le genre *Cotoneaster* Clark (1933) a montré que la croissance se produit par des divisions et des élongations cellulaires au sein même du méristème racinaire.

L'individualisation du centre quiescent, considéré comme caractéristique des apex radicaux se produit, en général, lorsque le jeune méristème a effectué un début de croissance et émerge des tissus qui lui ont donné naissance (Favre, 1977 a).

Dans certains cas, la croissance des ébauches racinaires peut être très lente, ainsi chez *Salix fragilis*, Carlson (1938) a montré que dans les tiges d'individus âgés de 9 ans, on pouvait trouver des ébauches racinaires encore imparfaitement organisées.

La poursuite de l'élongation va conduire l'ébauche de racine adventive à traverser les tissus dans lesquels elle se trouve incluse avant d'émerger à l'air libre. Cette traversée peut s'effectuer soit par "écrasement" des cellules situées en avant de l'ébauche racinaire (Carlson, 1938 et Haissig, 1974), soit par hydrolyse enzymatique des cellules avoisinantes (Mac Cully, 1975). Ces deux hypothèses s'appuient

pour la première, sur le fait qu'il subsiste souvent, à l'avant de l'ébauche de racine adventive des débris cellulaires plus ou moins aplatis et pour la deuxième sur la présence de "poches" ou "cavités" vides autour de l'ébauche de racine adventive (Peterson, 1975).

Il est probable que les deux phénomènes coexistent lors de la croissance des ébauches de racines adventives. En effet, dans certains cas les parois cellulaires voisines peuvent être facilement lysées par des cellulases, mais certains tissus très riches en composés pectiques, difficilement hydrolysables, comme les fibres et les scléristes sont plutôt écrasés et repoussés sur les côtés (Haissig, 1972).

Les ébauches de racines adventives émergent généralement en formant un angle droit avec l'axe principal de la tige, elles se recourbent ensuite vers le bas (Carlson, 1938). Dans certains cas cependant, des ébauches de racines adventives peuvent émerger au niveau de la surface de section de la tige, cela pourrait s'expliquer par la présence de barrières physiques infranchissables comme les assises de sclérenchyme dans certaines tiges (Carlson, 1938).

4 - Morphogenèse *in vitro* : conversion d'un méristème racinaire en méristème caulinaire.

La formation de bourgeons sur des racines ou drageonnement est un phénomène bien connu. De nombreuses espèces végétales se multiplient, en effet, naturellement à partir de bourgeons formés le long de racines, ce sont des drageons. Citons par exemple le cas de l'arbre à pain (*Artocarpus incisa* L. *Moraceae* ; de l'*Acacia albida*. *Papilionaceae* ; des régions tropicales et l'exemple du framboisier (*Rubus idaeus* L.), en zones tempérées.

Ces bourgeons se forment le plus souvent après traumatisme ou excision des racines. Chez les *Podostemaceae*, l'une des fonctions principales du système racinaire est la production de drageons (Goebel, 1905).

La formation de bourgeon en position apicale par rapport à la racine est un phénomène plus rare. Ce phénomène a été observée chez des fougères comme *Ophioglossum vulgatum*. (Rostowzew, 1891 ; *O. lustanicum* L. (Gerwirtz et Fahn, 1969) ou *O. petiolatum* L. (Peterson, 1968), chez les Sélaginelles (Wochock & Sussex, 1975 a et b) et chez des Angiospermes tels que le liseron (Torrey, 1958), le pissenlit ou l'endive (Hartmann et Kester, 1975).

Chez les orchidées également le phénomène est connu, par exemple chez *Neottia nidus-avis* R. (Champagnat, 1971), chez *Fogonia ophioglossoides* (Holm, 1925) ou chez *Catasetum* spp (Kerbaux, 1984).

Les observations histologiques concernant ces néoformations caulinaires ont généralement montré que malgré les apparences, le bourgeonnement observé est latéral par rapport au méristème racinaire proprement dit qui demeure intact C'est le cas chez les orchidées précédemment citées (Peterson, 1968 et 1970), de même que chez le liseron, le pissenlit et l'endive.

La perspective qu'une telle caulogénèse à partir de l'apex racinaire soit éventuellement exploitable pour une multiplication végétative, a conduit plusieurs auteurs à examiner si le phénomène est reproductible *in vitro*. Au titre de ces vérifications expérimentales, on peut citer les travaux de Peterson (1970 et 1975) sur *Ophioglossum petiolatum*, de Brand & Venverloo (1973) sur *Populus nigra* spp *italica* et de Rao et Mohan Ram (1981) sur *Limnophila indica*.

Ces auteurs sont unanimes pour affirmer que la néoformation gemmaire terminale sur les racines étudiées ne met pas directement en jeu le méristème racinaire lui-même. Ce qui fait dire à Bigot (1980) "qu'en aucun cas le méristème racinaire ne se transforme en méristème caulinaire".

Les premiers auteurs à parler d'une transformation de méristème racinaire en méristème caulinaire sont Champagnat *et al.*, 1967 et 1968) et puis Ballade (1968 et 1970). Ils ont montré qu'en présence de kinétine, il pouvait y avoir une transformation en bourgeon de certains apex d'ébauches racinaires. L'origine tissulaire de cette conversion est superficielle. Cette reconversion n'apparaît toutefois possible qu'à la condition d'opérer très précocement. En effet, dès qu'est mise en place l'organisation racinaire complète avec cylindre central, écorce, assise pilifère et surtout coiffe, les ébauches racinaires ne sont plus transformables. Ainsi, ont-ils conclu que les bourgeons formés proviennent d'une dédifférenciation de l'assise superficielle terminale de la jeune ébauche encore inachevée, c'est-à-dire du rhizoderme recouvrant alors "la plaque radiculaire". Ils entendent par là que le territoire induit à former le méristème caulinaire est localisé strictement hors du méristème racinaire proprement dit. Ce dernier, s'il n'intervient pas directement, semble toutefois jouer un rôle aussi bien dans la localisation que dans l'induction du phénomène.

C'est d'ailleurs ce que montre Bigot (1980) chez une autre espèce, le lys hybride "Enchantement". Chez cette plante, en effet, des ébauches de racines adventives sont initiées très tôt, à la base des tiges et sur un milieu riche en cytokinines. La mise en culture *in vitro* des tissus contenant ces ébauches racinaires entraîne un bourgeonnement exactement à la place de celles-ci. Or, l'auteur constate que l'activation mitotique aboutissant à ce développement caulinaire est précédée par une vacuolisation et une transformation en "organes de réserves" des ébauches racinaires présentes, et qu'elle a lieu au contact de celles-ci.

Il devient donc évident, dans ces conditions, que les méristèmes racinaires n'engendrent pas les bourgeons formés par une sorte de conversion, mais qu'ils ont une responsabilité directe dans les caulogénèses adjacentes observées.

La question demeure donc de savoir si un territoire méristématique déjà engagé dans une organisation racinaire peut être réorienté vers un programme morphogénétique caulinaire. Les résultats dont nous disposons actuellement ne permettent toujours pas de répondre de manière absolue. De nombreux auteurs s'accordent à penser, avec Bigot (1977) qu'à partir du moment où un méristème racinaire constitué émerge à l'air libre son "organisation" est désormais "protégée" et qu'il ne peut modifier son fonctionnement et ses caractéristiques pour se transformer en méristème caulinaire.

Les travaux de Refeno et Roux (1984) sur le vanillier (*Vanilla fragrans*, *Orchidaceae*) apportent cependant des arguments de poids qui montrent que des extrémités racinaires peuvent être le siège d'un méristémogénèse adventive et latérale, mais peuvent aussi donner naissance à une reconversion caulinaire de l'apex racinaire proprement dit. Ces auteurs ont, en effet, montré que le méristème racinaire du moins dans sa partie nodale qu'est la région du centre quiescent avec son halo mitotiquement actif, peut engendrer directement un méristème caulinaire.

5 - Conclusion.

De cette revue de la littérature, on retiendra surtout la très large distribution des racines adventives dans le règne végétal, mais également la grande diversité de formes et de types de ces racines adventives

La possibilité de former des racines adventives semble en relation directe avec la complexité de l'organisation et le niveau élevé de

l'adaptation des espèces à leur environnement. Les plantes de la flore tropicale humide présentent de nombreux exemples illustrant cette diversité de formes et de fonctions des racines adventives

L'étude des racines adventives présente un intérêt certain, non seulement au plan fondamental, par exemple au regard de l'évolution, des fonctions des racines adventives et des aspects génétiques, cellulaires et moléculaires de leur métabolisme, mais aussi pour l'agronomie.

Parmi les espèces de plantes tropicales, *Sesbania rostrata* apparaît comme un matériel de choix pour tenter d'apporter des précisions concernant la mise en place et la croissance des racines adventives, mais aussi montrer comment sur une même plante les racines adventives peuvent avoir des fonctions très différentes selon les conditions de leur environnement.

Des comparaisons ont été établies entre le comportement *in vitro* des ébauches de racines adventives de *S. rostrata* et celles d'une autre légumineuse à nodules caulinaires *Aeschynomene afraspera*.

**CHAPITRE II - MATERIELS, METHODES
ET CONDITIONS EXPERIMENTALES.**

I . LE MATERIEL VEGETAL.

1 - *Sesbania rostrata*.

Position Systématique

Sesbania rostrata Brem est une légumineuse tropicale annuelle, appartenant à la sous-famille des *Papilionoideae* (Berhaut, 1976). Cette sous-famille encore appelée *Faboideae* comprend quelques 440 genres et 12.000 espèces largement répandues depuis les forêts tropicales humides jusqu'aux abords des déserts froids ou chauds (Polhill 1981 et Polhill & Raven, 1981). Bentham (1865) dans son traité "*Genera Plantarum*" a établi une classification des *Papilionoideae* dans laquelle la tribu des *Galegeae* occupe une position centrale, les autres tribus *Podalyrieae*, *Genisteae*, *Trifolieae*, *Loteae*, *Hedysareae*, *Vicieae*, *Phaseoleae*, *Dalbergieae* et *Sophoreae* s'y rattachant par divers caractères morphologiques : nombre de folioles, formes des étamines, etc.

L'hétérogénéité constatée par la suite dans certaines de ces tribus, notamment dans les *Galegeae* et le *Hedysareae*, a conduit Hutchinson (1964) à effectuer des remaniements. Les recommandations de la "Conférence Internationale sur les Légumineuses" tenue à Kew en Angleterre (juillet 1978) proposent de placer *Sesbania rostrata* dans la tribu des *Papilionoideae-Robinieae*. (Golblatt, 1981 ; Sousa & De Sousa, 1981 ; Polhill & Sousa, 1981, Le Coq *et al.*, 1985).

Cette tribu comprend 21 genres répartis essentiellement au Mexique en Amérique Centrale, en Inde (régions occidentales) et dans le Nord de l'Amérique du Sud et en Afrique. Le genre *Sesbania* est plus particulièrement répandu dans les régions humides et sub-humides des Tropiques.

Au Sénégal, le *Sesbania rostrata* se rencontre généralement dans les zones humides, aux abords des fleuves (Sénégal, Sine et Saloum et Casamance), dans les Niayes (dépressions interdunaires littorales où la nappe phréatique affleure) et dans les rizières.

Germination des graines.

Les plantes utilisées proviennent de graines de *Sesbania rostrata* récoltées dans la région de Linguère (Nord-Est du Sénégal).

Les graines triées à la main sont lavées à grande eau pour éliminer toute trace de produits de conservation ou de composés phénoliques (inhibiteurs de la germination) de la surface des téguments. Ces graines sont ensuite plongées dans un bécher contenant de l'eau afin d'éliminer les graines parasitées qui flottent à la surface.

Les graines saines sont alors essorées et plongées dans de l'acide sulfurique concentré (96 %), que l'on fait agir pendant 20 à 30 minutes. Cette opération provoque la levée de l'inhibition tégumentaire en permettant la pénétration de l'eau et de l'oxygène, indispensables à la reprise d'activité de l'embryon. Les graines sont rincées plusieurs fois à l'eau courante pour éliminer toute trace d'acide.

Ces graines sont ensemencées soit en pleine terre dans le Jardin botanique du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de Dakar, soit dans des pots de 15 cm x 11 cm contenant un mélange de terre de jardin et de sable des dunes (V / V), à raison de 15 graines par pot. Les pots sont placés dans une cuvette remplie d'eau de manière à assurer une hydratation suffisante des plants.

A la fin de la deuxième semaine les tiges, comme les racines sont inoculées par badigeonnage et injection dans le sol d'une solution aqueuse contenant 10^9 cellules / ml d'*Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus *et al.*, 1988), ceci permet d'obtenir une nodulation des racines et de la base des tiges conduisant ainsi à une crois-sance régulière et satisfaisante des plantes.

Lorsque les plantes ont atteint 30 à 40 cm de hauteur (4 à 6 semaines), elles sont prêtes pour les expérimentations.

L'étude du développement des racines adventives et les tests de marquage radioactif sont réalisés en culture hydroponique soit sur des plantes entières, soit sur des boutures mononodales de 6 à 8 cm de longueur. Ces boutures sont cultivées à raison d'une bouture par tube à essais (Fig. 2) ou par lots de 42 boutures sur des plaques de polystyrène (Fig. 3) flottant à la surface de l'eau contenue dans des cuvettes.

Les dispositifs expérimentaux sont placés dans une pièce de culture où les conditions de température, d'éclairement et d'humidité contrôlées à l'aide d'un thermo-hygro-baromètre et maintenues comme suit :

- lumière : 50 à 60 mE. m^{-2} . sec^{-1} pendant 14 heures par jour,
- température comprise entre $17 \pm 2^\circ C$ la nuit et $25 \pm 2^\circ C$ le jour,
- hygrométrie : 70 à 80 % d'humidité relative.

2 - *Aeschynomene afraspera*

A. afraspera est une légumineuse tropicale présentant, comme *S. rostrata* des nodules fixateurs d'azote sur la tige (Alazard, 1985 et 1990 ; Alazard & Duhoux, 1988).

Cette légumineuse appartient à la sous famille des *Papilionoïdeae* et à la tribu des *Hedysareae*. Le nom *Aeschynomene* vient du grec "*aischynomenos*" signifiant "qui a honte" par référence à la sensibilité des feuilles au toucher et à la température. Ces plantes sont aussi appelées "sensitives américaines".

Nous avons utilisé des graines d'*A. afraspera* gracieusement offertes par le laboratoire de Microbiologie des sols du Centre de Recherche ISRA / ORSTOM de Bel-Air (Sénégal).

Les graines après scarification à l'acide sulfurique concentré (96 %) pendant 30 minutes sont soigneusement rincées à l'eau courante et ensemencées par lots de 15 graines dans des pots identiques à ceux utilisés pour le *S. rostrata*. La croissance est stimulée par injection dans le sol d'une suspension de la souche de *Rhizobium* ORS 322 contenant 10^8 cellules / ml (Alazard, 1985).

II. LES METHODES EXPERIMENTALES.

1 - Potentiel hydrique des différentes structures présentes sur la tige.

Les potentiels hydriques des extrémités d'ébauches de racines adventives, des pointes de racines adventives en cours d'élongation et des tissus adjacents de la tige sont déterminés selon la méthode densimétrique de Chardakov (1953).

Environ 200 petits fragments d'une longueur de 0,5 mm sont découpés à partir d'ébauches de racines adventives ou de pointes de racines déjà développées à l'aide d'une lame de rasoir et rapidement placés dans des tubes à hémolyse. Chaque lot de matériel végétal est alors recouvert de 5 ml d'une solution de saccharose de concentration connue. Les pointes des racines qui se sont allongées dans l'eau sont, au préalable, essuyées sur du papier absorbant pour éviter tout transfert de liquide.

Dans les deux cas des mesures comparatives sont réalisés au niveau des tissus de la tige situés entre deux mamelons caulinaires. Une portion de tige de 1,2 cm de diamètre et de 0,5 mm d'épaisseur est découpée à l'aide d'une lame de rasoir en petits fragments de 0,5 x 0,5 mm (Fig. 4). Environ 200 petits fragments sont alors déposés dans les tubes à hémolyse, puis recouverts de la solution de saccharose de concentration choisie.

Un gradient de concentration a été établi à partir d'une solution molale :

(342 g par litre d'eau distillée): $C_1 = 1,5 \text{ M}$; $C_2 = 1 \text{ M}$; $C_3 = 0,5 \text{ M}$ et $C_4 = 0,25 \text{ M}$

Pour chaque concentration, nous considérons deux tubes : le tube contenant le matériel végétal dont le potentiel hydrique est à tester et un tube témoin ne contenant que la solution de saccharose.

Les tubes sont placés à 4°C pendant 16 heures de manière à laisser se stabiliser la pression osmotique (Cottignies, 1985). Les tubes sont ensuite ramenés rapidement à la température ambiante (20 à 25 °C) et les solutions contenant le matériel végétal légèrement teintées par addition de quelques cristaux de bleu de méthylène.

A partir de chacune des solutions contenant le matériel végétal une microgouttelette de solution bleuie est alors prélevée à l'aide d'une micropipette Gilson (5 μl) et délicatement introduite à mi-hauteur dans la solution témoin de référence qui était de même concentration en début d'expérience.

Selon la densité de la goutte, elle va monter ou descendre dans la solution témoin :

- la goutte descend ; la densité du liquide prélevé dans la solution contenant le matériel végétal est supérieure à celle de la solution témoin, cela veut dire que le matériel végétal a prélevé de l'eau du milieu où il est plongé, ce qui a eu pour effet de concentrer la solution bleuie,

- la goutte monte ; la densité du liquide a diminué, c'est-à-dire que le matériel végétal a cédé de l'eau au milieu,

- lorsque le mouvement de la microgouttelette bleuie est nulle cela indique que le potentiel hydrique du matériel végétal a la même valeur absolue que la pression osmotique de la solution de saccharose de référence.

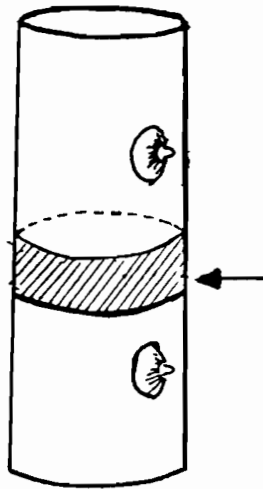


Fig. 4 - Prélèvement d'un fragment de tige entre deux sites de nodulation (ébauches racinaires).

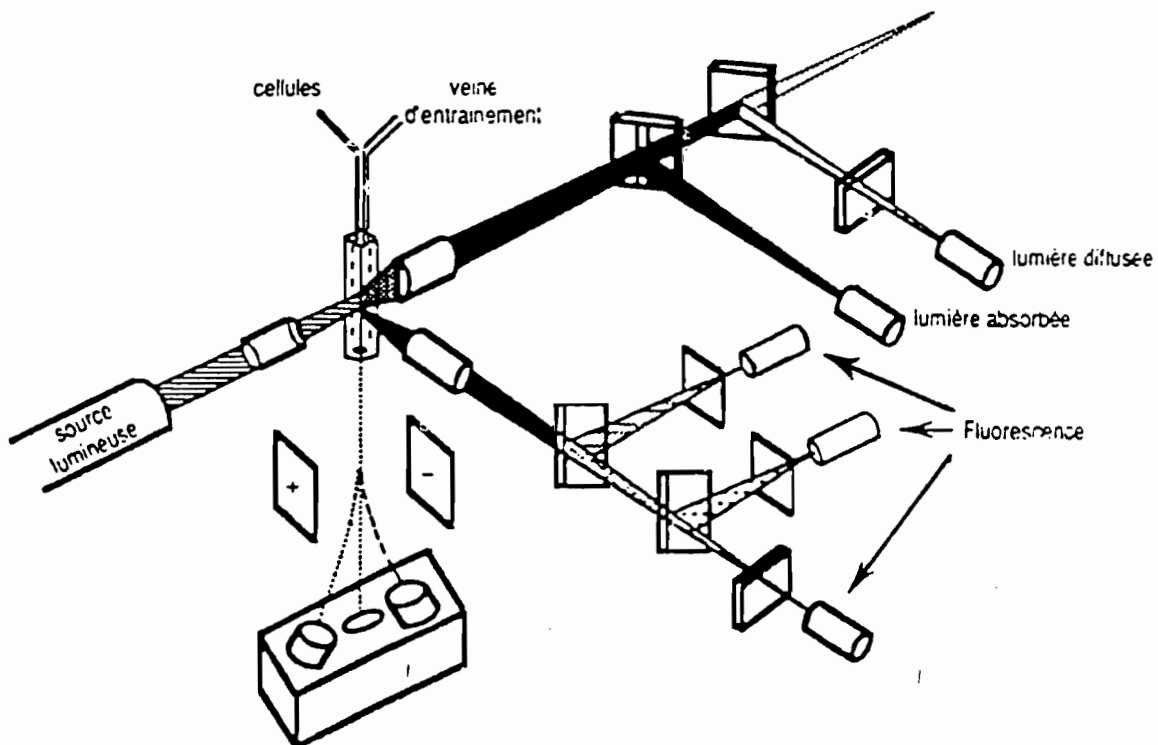


Fig. 5 - Principe du Cytofluoromètre.

Rappelons que le potentiel hydrique, Ψ_w , ainsi évalué est la résultante de plusieurs potentiels existant dans le végétal :

- le potentiel osmotique, Ψ_p dû aux différentes substances dissoutes dans les cytoplasmes et les vacuoles ;
- le potentiel matriciel, Ψ_t dû à l'adsorption de l'eau par les colloïdes et les membranes cellulaires et aux forces capillaires;
- et enfin, le potentiel de turgescence, Ψ_π dû à l'effet de l'élasticité des parois et membranes végétales (Cottignies, 1985).

$$\text{Soit : } \Psi_w = \Psi_p + \Psi_t + \Psi_\pi$$

2 - Techniques de cytofluorométrie

La cytofluorométrie permet de situer les cellules dans le cycle cellulaire : G₁ - S - G₂ et M par une étude individuelle des noyaux après adjonction d'un marqueur fluorescent spécifique. Elle présente l'intérêt, du fait de l'association avec un microordinateur, de permettre l'observation et l'analyse d'un grand nombre de cellules en un temps relativement court, ce qui accroît la fiabilité statistique.

Environ 250 méristèmes de racines sont rapidement et soigneusement prélevés à l'aide d'un rasoir à partir des mamelons caulinaires présents sur la tige puis fixés pendant 30 minutes dans une solution de formaldéhyde commercial à 10 % dans laquelle nous avons ajouté du tampon Tris et dont le pH a été ajusté à 7,4 par de la soude à 0,1N avant autoclavage à 110°C pendant 20 minutes (Hamada & Fujita, 1983).

Le mélange avait, au préalable, été filtré sur filtre millipore pour s'assurer de la stérilité et de l'absence de noyaux parasites (bactéries, spores, etc.).

Les échantillons ainsi fixés sont ensuite rincés dans la solution tampon puis rassemblés dans une boîte de Petri et écrasés avec ménagement à l'aide d'une baguette de verre. Cette opération a pour but de hâcher les tissus et de libérer le maximum de noyaux dans le milieu. La préparation est alors reprise dans 1 ml de tampon additionné de Triton-X-100 à 1% qui facilite la dispersion du cytoplasme. Ce hachis est alors filtré sur un tamis nylon (maillage : 30 μm) et centrifugé à 1500 tours / min. pendant 10 minutes. Le culot est repris dans du tampon Tris à pH = 7,4 et coloré par adjonction du fluorochrome Hoechst 33 344 à 2 mg / ml (Brown *et al.*, 1991 a et b), avant le passage au cytofluoromètre EPICS V (Coulter, Florida).

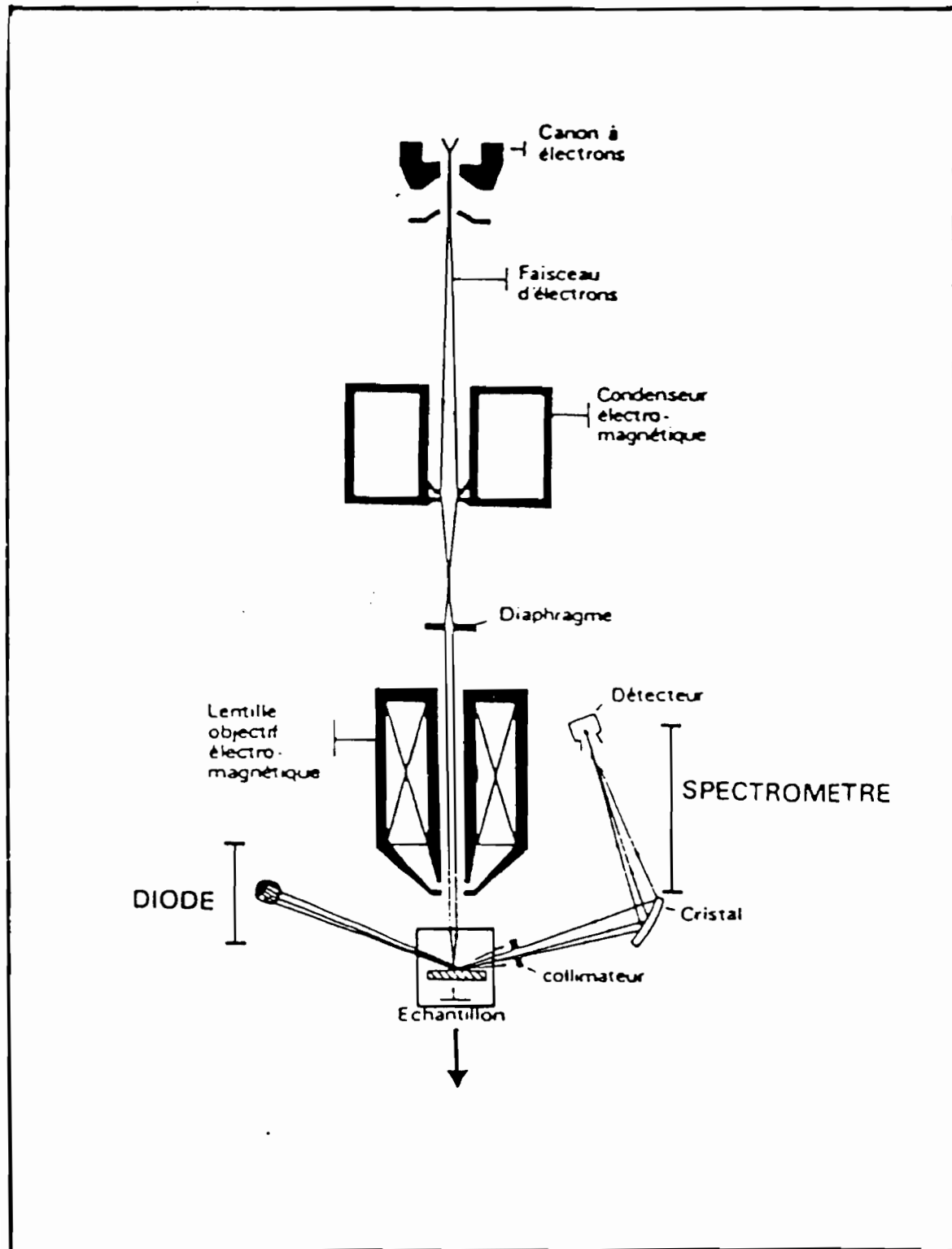


Fig. 6 - Principe de fonctionnement de la microsonde électronique.

Cet appareil est équipé d'un rayon laser Argon (Spectra - Physics 2026 - 05) qui en éclairant chaque noyau lors de son passage dans le capillaire provoque la fluorescence de ce dernier (Fig. 5). Les signaux lumineux émis sont transformés en signaux électriques analogiques qui seront traités par informatique (Métézeau & Frelat, 1991). Les histogrammes sont analysés automatiquement en termes de composantes de la distribution des différents teneurs en ADN 2 C, > 2C à < 4C, 4C, rencontrés au cours du cycle cellulaire .

3 - Techniques de microanalyse

L'analyse à la microsonde électrique permet d'étudier de façon précise la répartition des éléments minéraux *in situ* au niveau tissulaire, cellulaire voire même sub-cellulaire sur une coupe histologique.

3.1 - Principe physique de la méthode

Le CAMEBAX fonctionne selon le principe de la sonde de CASTAING (Fig. 6). Un faisceau d'électrons secondaires est accéléré et focalisé sur une zone donnée de l'échantillon localisé optiquement en microscopie à balayage (Paris *et al.*, 1978 et Chamel & Bossy, 1981).

Ce petit volume de matière irradié émet alors, entre autres, un spectre de rayons X caractéristiques des éléments présents dans la préparation. L'émission d'électrons secondaires peut être utilisée en mode balayage pour obtenir une image en relief ou en mode analyse. Lorsque l'appareil fonctionne en mode analyse, l'intensité de courant peut être très élevée (10 nA) et l'image obtenue n'est pas de très bonne qualité mais l'analyse peut être très fine et donner des spectres des éléments minéraux présents dans la préparation.

Toutefois étant donné le bruit de fond important, seuls seront localisés et dosés les éléments dont la masse atomique est supérieure à 20 et qui sont présents en concentrations suffisamment importantes pour être détectées par l'appareil.

3.2 - Prélèvement et préparation des échantillons

Des fragments de tige de *S. rostrata* de 5 mm x 3 mm x 8 mm sont prélevés sur des plantes entières de manière à isoler soit un mamelon caulinaire avec son ébauche de racine adventive à l'état latent, soit un mamelon caulinaire infecté par le *Rhizobium* spécifique, c'est à dire un nodule caulinaire .

Les échantillons inclus dans du "Tissue-Tek", et collés sur un support métallique sont plongés très rapidement dans de l'azote liquide (-196 °C). Les fragments ainsi inclus sont introduits dans un cryomicrotome où, par des sections fines effectuées à l'aide d'un couteau de verre, on essaiera d'obtenir une surface parfaitement plane. Les échantillons peuvent, à ce stade, être stockés dans un congélateur à -80°C.

Les échantillons sortant du congélateur sont placés dans le lyophilisateur à -35 °C. Une baisse de pression ($P=3$ Pa), permet la sublimation de la glace contenue dans les tissus. La déshydratation a donc lieu sans passage par l'état liquide, ce qui est destiné à maintenir la distribution des éléments diffusibles *in situ*. Un piège froid, maintenu à -60 °C, permet de fixer la vapeur d'eau éventuellement émise par l'échantillon.

Les échantillons sont fixés sur un support métallique avec de la laque (colle argent) et recouverts d'une fine couche de carbone ou d'or (quelques centaines d'angstroms) par évaporation sous vide dans l'appareil à métalliser (Jeol, Fine coat ion sputter JFC-1100), ce qui les rend conducteurs.

La dernière étape consiste à ramener chaque échantillon de manière progressive à la température ambiante et à la pression atmosphérique avant de le soumettre au CAMEBAX.

4 - Techniques histologiques

4.1 - Microscopie photonique : techniques de fixation

En fonction de la coloration à effectuer ou plus exactement des constituants cellulaires à mettre en évidence, les explants de tige sont fixés par l'A.F.A. (mélange alcool, formol et acide acétique glacial dans les proportions suivantes 16 vol. / 2 vol. / 1 vol.), par le mélange de Navashine, par une solution de glutaraldéhyde à 4 %, ou encore le mélange éthanol à 95 %, acide acétique (3 volumes / 1 volume) selon les procédés décrits par Langeron (1949), et Martoja & Martoja-Pierson (1967).

Les fixations débutent généralement par un dégazage sous vide de 10 à 30 min destiné à faciliter la pénétration du fixateur. Les échantillons séjournent ensuite dans le fixateur à 4° C pendant au moins 24 heures.

4.1.1 - Préparations microscopiques

Après fixation, les échantillons sont lavés à l'eau courante puis déshydratés par passage dans des bains d'alcool éthylique de concentrations croissantes.

Des coupes d'épaisseurs différentes ont été réalisées : coupes minces (8 à 10 μm d'épaisseur), coupes semi-fines (1 à 2 μm d'épaisseur) et coupes ultra-fines (< 1 μm). L'inclusion dans le premier cas se fait dans du paraplast (Monoject Scientific Inc.) qui est un polymère plastique présentant des propriétés analogues à celles de la paraffine, dans le deuxième cas nous avons utilisé de l'araldite (Paul Valley Industrial Park Warrington).

Après refroidissement et solidification, les blocs contenant les échantillons sont sectionnés, soit au microtome à main (Jung-Heidelberg) pour les blocs de paraplast, soit à l'ultra microtome (Ultracut E / Reichert-Jung) pour les blocs d'araldite.

Les coupes ainsi obtenues sont ensuite collées à l'aide d'une solution d'albumine d'oeuf à 1 % sur des lames d'histologie préalablement dégraissées. Les préparations sont alors déparaffinées ou plus exactement débarassées du paraplast et de l'araldite par passage dans des mélanges de toluène et d'alcool absolu ou de soude et d'alcool absolu (Cf. Annexe).

4.1.2 - Coloration des préparations microscopiques

- Coloration à l'hématoxyline

Les préparations microscopiques sont placées pendant 20 à 30 minutes dans une solution d'alun de fer et d'ammonium à 5% (mordançage). Elles sont ensuite rapidement rincées à l'eau distillée et colorées lame par lame par l'hématoxyline de Regaud. Les préparations peuvent être différenciées à l'acide picrique avant d'être rincées et déshydratées selon les techniques classiques (Martoja & Martoja-Pierson, 1967) avant le montage dans le baume du Canada.

- Coloration par le fast green

Après une déshydratation poussée, les préparations microscopiques sont passées dans une solution alcoolique de vert solide (Fast green) à 0,5 % additionnée de quelques gouttes d'essence de clou de girofle. Elles sont ensuite plongées dans deux bains d'alcool absolu et de toluène.

Ces deux premières colorations permettent de mettre en évidence les cellules méristématiques, à gros noyaux et cytoplasme réduit.

- Squash au Feulgen : détermination de l'index mitotique

Les observations des noyaux ont été effectuées sur des pointes de racines adventives développées dans l'eau. Le matériel est préfixé pendant 2 heures dans une solution de 8-hydroxyquinoléine à 0,003 M. Ce prétraitement a pour but d'amener les noyaux division au stade métaphase, stade où les chromosomes sont le mieux individualisés. Les pointes de racines sont ensuite fixées pendant toute une nuit, à 4 °C dans un mélange éthanol-acide acétique (3 volumes / 1 volume). Les échantillons sont ensuite plongés dans de l'acide chlorhydrique à 1 N au bain-marie à 60 °C pendant 5 à 9 minutes, puis rincés à l'eau distillée.

Les pointes de racine sont alors plongées pendant 2 heures dans le réactif de Schiff. Après un rinçage à l'eau du robinet, chaque méristème est délicatement écrasé et étalé entre lame et lamelle, en une couche autant que possible monocellulaire dans une goutte d'une solution d'acide acétique à 45 %.

4.2 - Microscopie électronique

4.2.1 - Microscopie électronique à balayage

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope à balayage type : Scanning Microscope J.S.M. 35 CF Jeol.

- Observation sur du matériel frais (non fixé)

Des fragments de tige de *S. rostrata* de 3 mm x 5 mm portant un mamelon caulinaire sont rapidement prélevés à l'aide d'un rasoir, rincés à l'eau courante puis essuyés délicatement sur du papier absorbant, pour éviter la formation de givre sur la surface des échantillons lors du passage au froid. Chaque fragment est alors placé sur le support approprié et plongé dans l'azote liquide pendant 30 sec. à 1 min. avant

d'être transféré dans le sas du microscope lui-même refroidi par de l'azote liquide.

Les parois de cellules de racines renferment suffisamment d'électrolytes pour assurer la conduction des électrons sans nécessiter une métallisation préalable, à condition que la tension utilisée reste relativement faible et comprise entre 10 à 15 kV (Vartanian *et al.*, 1983).

- Observation sur du matériel fixé

Les échantillons végétaux sont prélevés comme précédemment décrit. Chaque fragment de tige est plongé dans un tube à hémolyse contenant une goutte d'eau distillée.

Dans certains cas, afin de suivre l'évolution des ébauches de racine adventive au cours du temps, les pointes de racines sont prélevées après un séjour de 1, 2, 3, et 4, puis 24 heures dans l'eau. Dans ce cas, les tissus végétaux sont tués instantanément par immersion du tube à hémolyse pendant 30 sec. à 1 min dans un bain-marie d'eau bouillante.

Les tubes à hémolyse sont ensuite placés dans un dessiccateur rempli d'acétone pure et relié à une pompe à vide. La dépression ainsi créée va amener l'acétone à ébullition. Le dessiccateur est alors fermé et maintenu ainsi pendant 48 à 72 heures. A la fin de cette période les échantillons sont complètement déshydratés et l'acétone a remplacé l'eau dans les tubes .

Les échantillons sont récupérés et soumis à la métallisation avant l'observation au microscope électronique (Baujard & Pariselle, 1987).

4.2.2 - *Microscopie électronique à transmission*

Les observations sont réalisées sur des coupes ultra-fines réalisées après fixation au glutaraldéhyde à 4 % suivie d'une post-fixation au tétroxyde d'osmium en solution à 1 % . le matériel est inclus dans l'araldite et sectionné à l'ultra microtome, comme précédemment décrit. Les coupes sont ensuite observées au microscope Siemens Elmiskop 101.

5 - Techniques de l'imagerie par résonance magnétique (I.R.M.)

L'imagerie en résonance magnétique est une technique d'analyse spectroscopique permettant, par exemple, de visualiser *in situ* la distribution de l'eau libre à l'intérieur des tissus (R.M.N. du proton).

5.1 - Principe physique de la méthode

Lorsqu'un échantillon d'organe vivant (végétal, par exemple) est soumis à un champ magnétique, les noyaux d'hydrogène, appartenant notamment aux molécules d'eau contenues dans l'organe, se comportent comme de petits aimants qui s'orientent dans la direction du champ.

Ces noyaux excités par une onde radio s'éloignent de leur position d'équilibre pour y revenir par la suite avec des temps différents selon la composition chimique des tissus analysés. C'est ce temps de relaxation qui est traduit par l'appareil en signal lumineux donnant ainsi une image très précise de la distribution de l'eau libre dans l'échantillon.

5.2 - Préparation des échantillons végétaux

Des fragments de tige de *S. rostrata* de 2 cm de longueur présentant soit des mamelons caulinaires à l'état latent, soit des nodules caulinaires, c'est-à-dire des mamelons infectés par le *Rhizobium* spécifique sont introduits dans l'appareil et analysés un par un. L'expérimentateur peut, à volonté, changer l'orientation du fragment végétal de manière à visualiser et analyser l'échantillon en coupe transversale ou longitudinale.

6 - Techniques d'utilisation des traceurs radioactifs

L'utilisation des traceurs radioactifs nous a permis d'étudier les rôles respectifs des deux systèmes racinaires de *S. rostrata* dans le transport des éléments minéraux dans la plante. Nous avons utilisé une solution minérale de Hoagland (1950) diluée au quart dans laquelle a été ajoutée, selon les expérimentations, une fraction d'une solution aqueuse de chlorure de ^{86}Rb et /ou du ^{134}Cs .

Ces deux isotopes sont utilisés comme modèles pour le potassium, car ce sont tous deux des alcalins et ils peuvent avoir un comportement et un rôle similaires à celui du potassium dans la plante en association avec les sels de potassium (KNO_3 et KH_2PO_4) du milieu minéral utilisé (Morard & Bur, 1971).

L'isotope radioactif est appliqué soit au niveau de la tige qui présente des ébauches racinaires ou des racines adventives, soit au niveau des racines séminales.

La pénétration et la migration des éléments radioactifs sont estimées par le taux de radioactivité retrouvé dans les parties non traitées de la plante entière ou des boutures.

6.1 - Absorption et migration du ^{86}Rb à travers des fragments de tige de *S. rostrata*

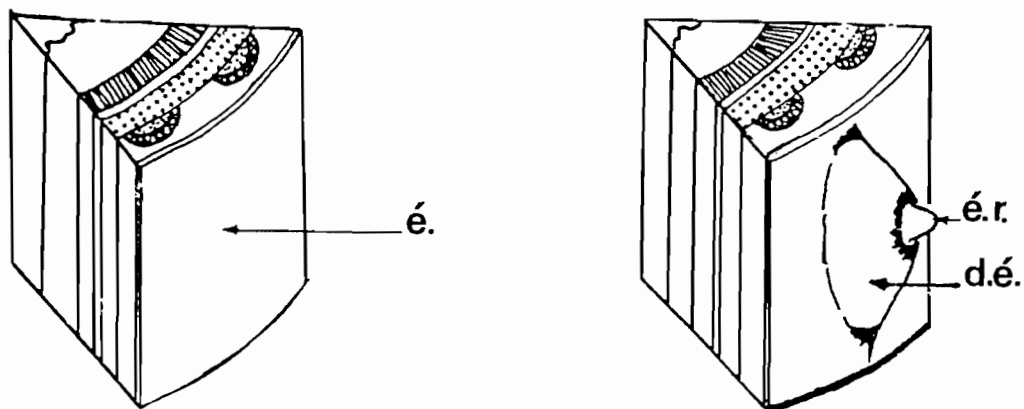
L'étude de la pénétration des éléments radioactifs a été conduite selon les techniques décrites par Chamel (1973) et Baker (1987) pour l'étude de l'absorption foliaire.

Des microgouttelettes (10 μl) de la solution minérale de Hoagland diluée au quart contenant une fraction d'une solution aqueuse de chlorure de ^{86}Rb (activité initiale : 3,7 MBq / ml ou 20,7 μg ^{86}Rb / ml) ont été déposées sur des fragments de tige de 3 x 5 x 5 mm présentant ou non un mamelon caulinaire (Fig. 7).

La surface qui doit recevoir la solution radioactive a été préalablement essuyée et traitée par un agent tensioactif, par exemple du Tween 20 à 0,1 %, pour assurer l'adhérence de la microgouttelette. La quantité de ^{86}Rb qui a été fixée et qui a migré à travers les tissus est estimée par la mesure de la radioactivité dans le fragment végétal et dans la gélose (Fig. 8).

6.2 - Absorption et migration du ^{86}Rb et/ou du ^{134}Cs dans les plantes entières

Pour étudier le rôle des deux systèmes radicaux de *Sesbania rostrata* : les racines séminales souterraines et les racines adventives de la tige dans l'absorption d'éléments minéraux tels que le ^{86}Rb et le ^{134}Cs , nous avons utilisé le dispositif à double compartimentation de la Figure 9. Le système radical séminal des plantes entières de *S. rostrata* plonge dans un compartiment constitué par une solution nutritive de Hoagland (1950) diluée au quart et enrichie en fer EDTA (Murashige & Skoog, 1962). La tige partiellement effeuillée est délicatement introduite dans un tube flexible de 3 cm de diamètre. Les plantes sont maintenues verticales à l'aide d'un support vertical et les parois des récipients contenant la solution nutritive sont peintes en noir afin d'assurer l'obscurité nécessaire à une bonne croissance des racines.



é. : épiderme lisse

é.r. : ébauche racinaire

d.é. : dôme épidermique

Fig. 7 - Fragments de tige de *Sesbania rostrata* utilisés pour l'étude de la pénétration des ions ^{86}Rb .

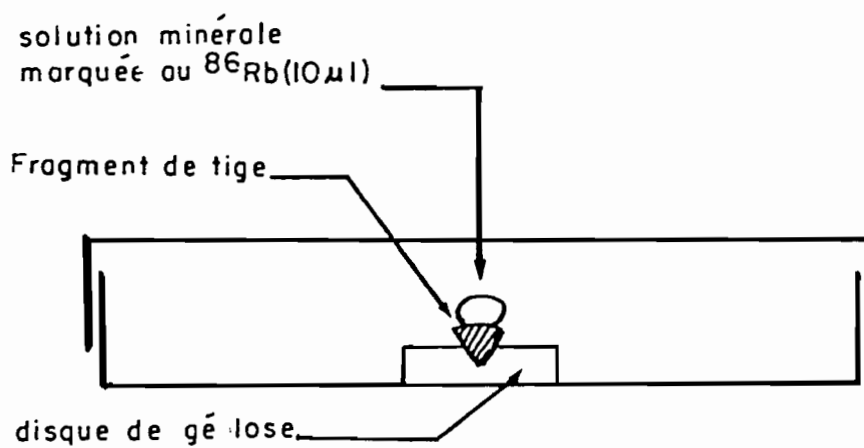


Fig. 8 - Dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la pénétration caulinaire des ions ^{86}Rb

Ce type de dispositif déjà bien connu (Franck & Hodgson, 1964, Bristow & Whitcombe, 1971; Cumbus & Robinson, 1977; Waisel *et al.*, 1981) permet d'étudier séparément l'absorption par les ébauches racinaires de la tige et / ou par les racines séminales et de déterminer le sens de migration de ces éléments dans la plante entière.

Quatre séries d'expériences ont été réalisées, dans chaque cas nous utilisons deux lots de 6 plantes âgées de 6 à 8 semaines et hautes d'environ 40 cm . Chaque expérience est répétée deux fois. Les expériences ont été conduites dans une serre du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble (CENG - France) où les conditions de milieu sont contrôlées et maintenues comme suit :

- lumière : $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$,
- température : $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$,
- hygrométrie : 80 % d'humidité relative.

1ère série : *Etude de l'absorption par les ébauches de racines adventives en attente sur la tige* (Fig. 10a)

Les racines séminales baignent dans un milieu constitué d'éléments stables (soution de Hoagland, 1950). La radioactivité est apportée uniquement au niveau des tiges, par addition à 20 ml du milieu minéral de base d'une fraction d'une solution aqueuse de chlorure de ^{86}Rb de manière à obtenir une activité initiale de : 0,074 MBq. La solution est introduite dans le tube flexible, à l'aide d'une seringue de 20 ml munie d'un tube cathéter souple (Frank and Hodgson, 1964). Le tube a été préalablement obturé par un bouchon de liège et de l'eicosane liquide (polymère plastique qui après solidification devient imperméable à l'eau et aux solutés), L'extrémité supérieure est fermée avec du coton pour éviter l'évaporation.

2ème série : *Etude de l'absorption réalisée par les racines séminales seules* (Fig. 10b)

Dans cette série d'expériences les éléments radioactifs : ^{86}Rb ou ^{134}Cs sont ajoutés au milieu nutritif contenu dans les erlenmeyers (activité intiale dans chaque cas 0, 074 MBq. Les tubes renfermant les tiges, contiennent la même solution minérale, mais non radioactive.

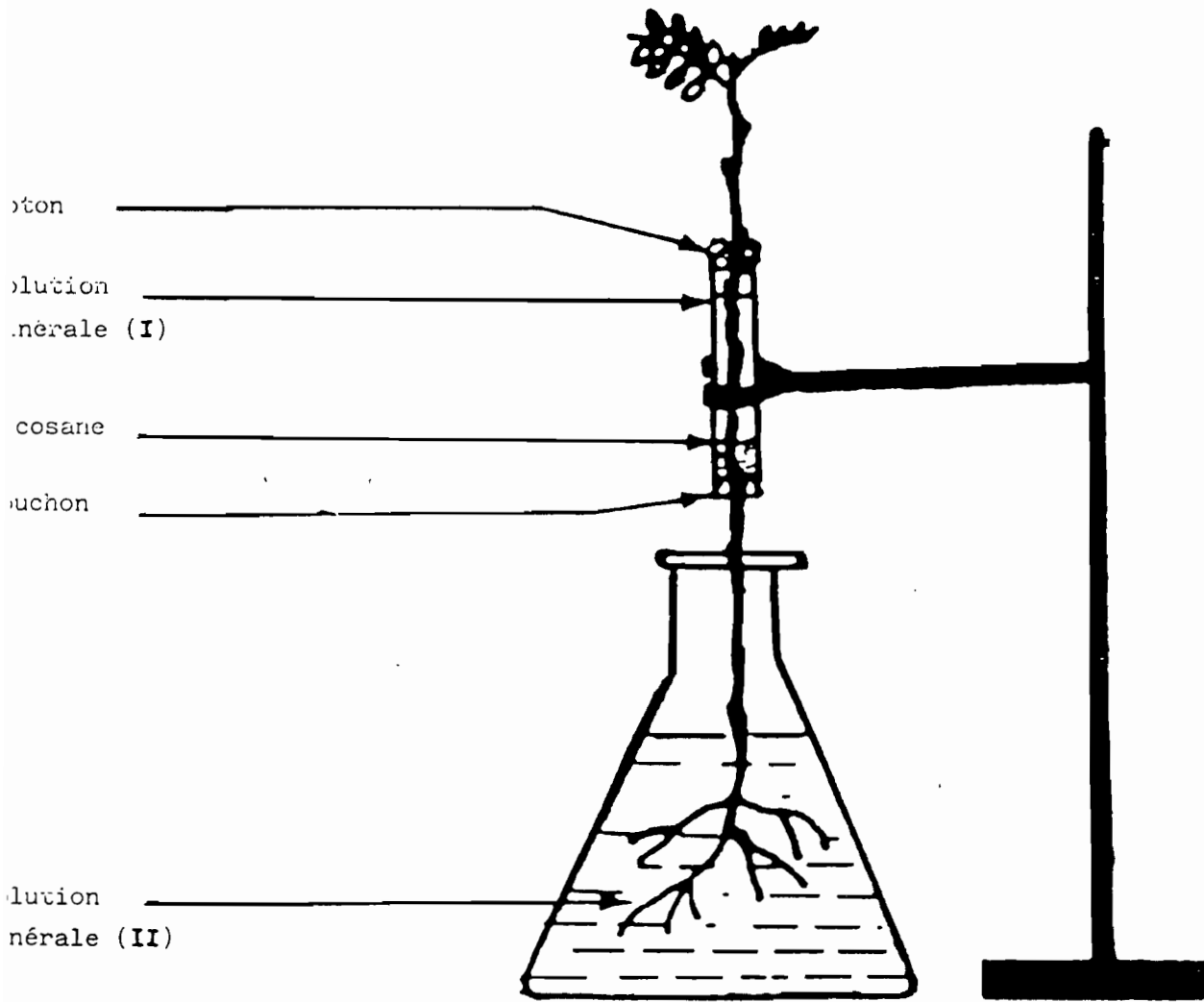


Fig. 9 - Dispositif expérimental à double compartimentation (I et II)
 utilisé pour les expériences de marquage radioactif avec du ^{86}Rb et / ou du
 ^{134}Cs .

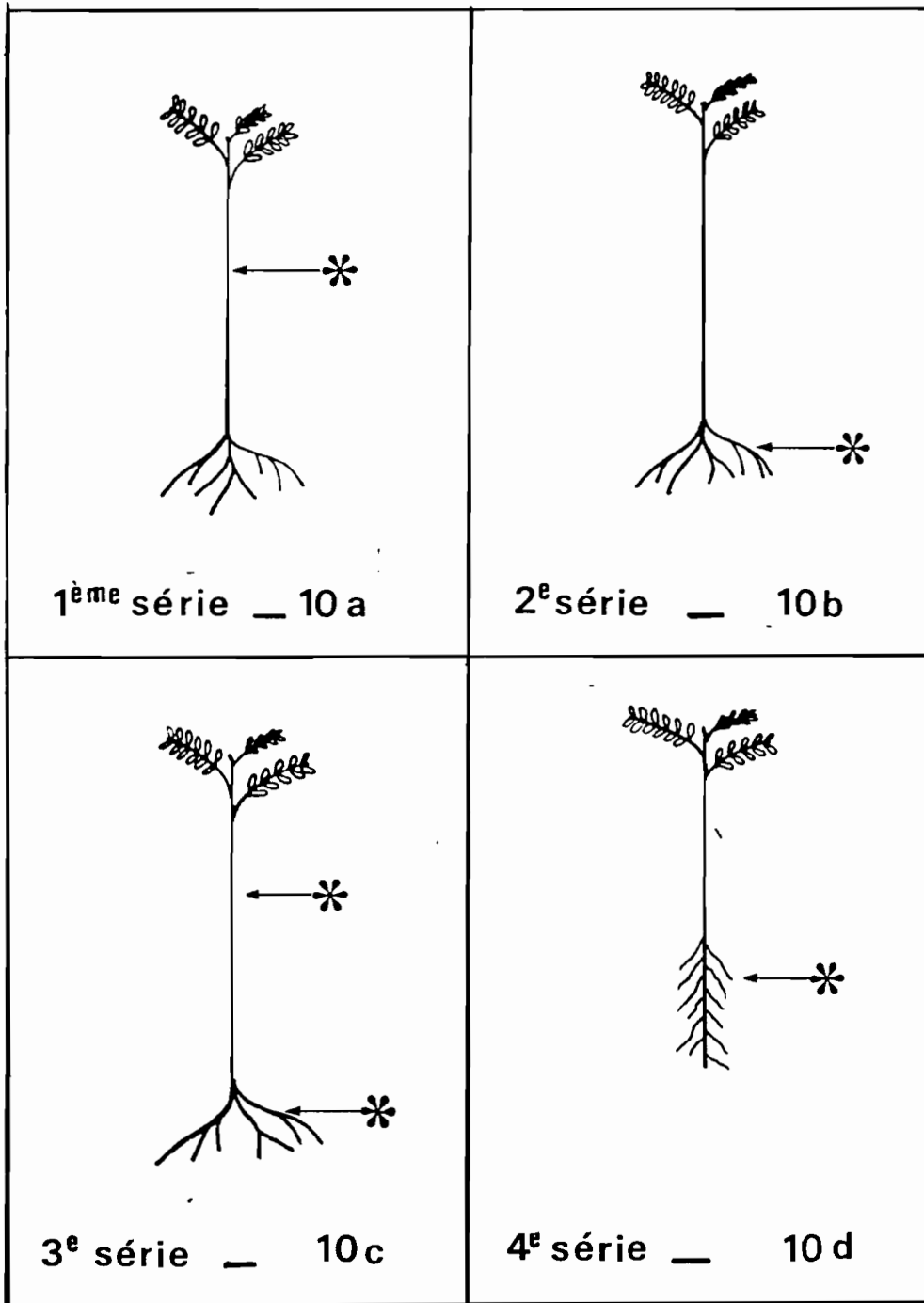


Fig. 10 - Localisation des zones traitées par les solutions radioactives de ^{86}Rb et / ou de ^{134}Cs .

3ème série : *Etude de l'absorption par les racines adventives et séminales simultanément : double marquage isotopique* (Fig. 10c)

Dans cette troisième série d'expériences, nous avons effectué un "double marquage isotopique" en apportant simultanément à la plante du chlorure de ^{86}Rb à 0,074 MBq au niveau de la tige et du chlorure de ^{134}Cs à 0,074 MBq au niveau des racines séminales, toujours en association avec les éléments minéraux de la solution de Hoagland. Ces deux radioéléments présentent à peu près la même vitesse de migration et sont facilement séparables par spectrométrie γ (Gagnaire, 1967; Gagnaire-Michard et Jourdan, 1978 ; Jourdan, 1980). Cette technique permet de distinguer le rôle qui revient à chacune des parties traitées (tiges ou racines séminales).

4ème série : *Etude de l'absorption par les racines adventives de la tige seules* (Fig. 10d)

Dans ce dernier cas, les plantes sectionnées au niveau du collet séjournent pendant 4 jours avant l'expérimentation proprement dite dans une solution nutritive non radioactive. Les racines adventives s'allongent et lorsqu'elles atteignent 5 à 7 cm de longueur, elles sont transférées pendant 24 heures dans le milieu minéral dans lequel ont été ajoutées des fractions de chlorure de ^{86}Rb ou de ^{134}Cs avec une radioactivité initiale de 0,074 MBq.

6.3 - Absorption et migration du ^{86}Rb dans des boutures mononodales

Pour étudier la migration des éléments minéraux entre la feuille axillante, l'entre-noeud situé immédiatement en dessous et ses racines adventives, nous avons traité le milieu dans lequel baigne les boutures (Fig.1). Lors de ces expérimentations seul le radio-isotope ^{86}Rb a été utilisé. Les boutures ont été cultivées individuellement dans des tubes à essais contenant une solution minérale de base additionnée de chlorure de ^{86}Rb (activité radioactive initiale : 0,037 MBq / ml).

6.4 - Méthodes de comptages radioactifs

Les émissions de rayons γ des deux traceurs utilisés sont détectées et comptées dans deux appareils de comptage pour émetteurs γ : (type CG 4000 / Intertechnique et type SEP 1620 / Novelec).

Dans tous les cas, les expériences de traitement radioactif sont arrêtées au bout de 24 heures. Les liquides résiduels, à la fin de

l'expérimentation dans les tubes flexibles et/ ou dans les erlenmeyers, de même que les liquides de rinçage des plantes (eau pure) sont conservés pour être soumis au comptage. Les petits fragments de tiges sont directement placés dans les tubes de comptage en plexiglass. Les boutures mononodales sont découpées de manière à isoler les zones traitées de celles qui ne l'ont pas été. Les plantes entières sont découpées en 5 parties :

- les feuilles,
- la zone apicale de la tige (4 à 5 entre-nœuds),
- la zone médiane (5 à 6 entre-nœuds),
- la zone basale (derniers entre-nœuds jusqu'à l'hypocotyle)
- et les racines séminales.

Les parties qui ont été en contact avec la solution radioactive sont rincées par 2 ou 3 bains dans une eau pure non radioactive, puis essorées sur du papier absorbant, de manière à éliminer les ions qui pourraient être adsorbés sur les surfaces. Chaque partie est alors introduite dans un tube de comptage.

Les mesures de la radioactivité sont données en nombre de coups par minute (c.p.m.). Nous avons exprimé les résultats en pourcentage de la radioactivité totale après cumul des c.p.m. Dans le cas du ^{86}Rb , des calculs de compensation de la décroissance sont nécessaires compte tenu de sa courte période de désintégration ($\lambda = 18,7$ jours). La répartition (R) est exprimée en c.p.m. par mg de poids sec.

Les données numériques ont été soumises au test de Levenne (1960). Chaque moyenne est affectée de son intervalle de confiance pour $p = 0,05$

7 - Techniques de culture *in vitro*

7.1 - Explants de tige de *S. rostrata*

Les bourgeons adventifs de *S. rostrata* apparaissent exclusivement sur les tiges et les rameaux axillaires. Bien que des potentialités morphogénétiques puissent exister sur n'importe quel organe de la plante, le problème qui nous intéresse ici ; à savoir le devenir des mamelons caulinaires en culture *in vitro*, nous a amené à mettre en culture exclusivement des explants de tige.

Des tiges effeuillées sont lavées à grande eau, puis découpées en fragments de 6 à 8 cm de longueur dont les extrémités sont obturées avec de la paraffine fondante, pour limiter la pénétration du désinfectant .

La dissection comprend, après désinfection, l'élimination des extrémités de tige enduites de paraffine, le découpage en fragments de tailles différentes selon les expérimentations :

- explants de 2 cm de longueur avec ou sans bourgeon axillaire,
- explants de portions de tiges (0,5 x 0,3 x 0,8 cm) avec un seul mamelon caulinaire.

7.2 - Explants de tige de *A. afraspera*

Dans le cas d' *A. afraspera*, des explants de 2 cm de longueur, sans bourgeon axillaire ont été mis en culture et seulement sur milieu minéral de base M.S. décrit ci-dessous.

7.3 - Composition des milieux de culture

Nous avons choisi comme milieu de base, le milieu de Murashige & Skoog (1962) additionné de 20 g / l de saccharose. Ce milieu est enrichi en fer, en vitamines de Nitsch & Nitsch (1965) et en régulateurs de croissance selon les besoins (cf.annexe).

Le pH est ajusté à 5,4 - 5,6 par addition de quelques gouttes de NaOH à 0,1 N avant l'adjonction de 8 g de gélose par litre de milieu (Bacto-Agar). Les milieux ainsi préparés sont répartis dans des tubes de culture à raison de 20 ml environ par tube ou dans des boîtes de Petri (55 mm) à raison de 12 ml par boîte. Les régulateurs de croissance quand il y en a, sont ajoutés avant autoclavage, à 120° C pendant 20 minutes.

7.4 - Prélèvement et mise en culture des explants de tige

Afin d'éliminer les éléments parasites susceptibles de proliférer *in vitro*, les explants sont d'abord soigneusement désinfectés (cf. annexe). Les fragments de tige sont ensuite rincés avec de l'eau stérile par trois fois après un séjour dans l'hypochlorite de calcium à 7 %, par six fois après un séjour dans le bichlorure mercurique à 0,1 %.

Ces explants sont placés un à un dans des tubes de culture et par trois ou cinq dans des boîtes de Petri pour les petits explants. Nous avons pris soin, dans tous les cas d'enfoncer légèrement l'explant (0,2 à 1cm) dans le milieu de culture pour permettre un bon échange entre les tissus végétaux et le milieu nutritif.

Les paniers contenant les tubes, de même que les boîtes de Petri sont entreposés dans la chambre de culture sous une lumière incidente de 3.000 lux assurée par des tubes fluorescents au néon (Philips-TL. 40/55 W). La photopériode est de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité et la température ambiante est maintenue à $27 \pm 2^\circ \text{C}$.

**CHAPITRE III - ETUDE
MORPHOLOGIQUE, ANATOMIQUE ET
PHYSIOLOGIQUE DES EBAUCHES
RACINAIRES DE LA TIGE DE
*SESBANIA ROSTRATA***

I - INTRODUCTION

Sesbania rostrata se caractérise par une tige haute de 3 à 4 mètres portant de nombreux sites de nodulation qui ont l'aspect de petites pointes (Fig. 11) disposées sur des génératrices verticales depuis le collet jusqu'au sommet de la plante (Duhoux & Dreyfus, 1982). Lorsqu'ils sont infectés par le *Rhizobium* spécifique : *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus *et al.*, 1988), ces sites donnent naissance à des nodules caulinaires (Fig. 12) fixateurs d'azote atmosphérique (Dreyfus et Dommergues, 1981).

Les sites de nodulation du *S. rostrata* sont préformés sur la tige, leur formation est indépendante de l'infection par l'*Azorhizobium*. Un site de nodulation se présente d'abord sous la forme d'un petit renflement de l'épiderme de la tige (Fig. 13) puis 1 ou 2 jours plus tard, le renflement s'accroît et laisse percer en son centre une ébauche de racine adventive (Duhoux & Dreyfus, 1982 Dreyfus, 1982).

Les sites de nodulation situés à la base de la tige, évoluent naturellement, lorsque la plante est inondée, en racines adventives typiques (Spencer- Barreto et Duhoux, 1987).

En somme, les sites de nodulation de *S. rostrata* sont des racines adventives remarquables pour plusieurs raisons :

- leur position sur la tige est prédéterminée,
- elles sont continuellement formées lors de la croissance de la plante,
- elles sont sensibles à l'infection par l'*Azorhizobium* ou à l'immersion dans l'eau,
- elles peuvent également se maintenir en état de latence en absence d'eau et de l'*Azorhizobium* .

Afin de mieux comprendre les évolutions ultérieures de la structure des ébauches de racines adventives présentes dans les mamelons caulinaires, nous avons cherché à préciser leur ontogénèse, leur structure histologique et à caractériser leur état physiologique de manière à expliquer cet état de latence inhabituel chez des racines adventives.

II - RESULTATS

Les mamelons caulinaires de *S. rostrata* se répartissent tout le long de la tige depuis l'hypocotyle jusqu'à la zone sub-apicale. Au sommet de la tige, les deux derniers entre-noeuds ne portent pas de mamelons visibles à l'oeil nu.

Sur la partie haute de la tige adulte, les génératrices verticales de mamelons caulinaires sont localisées dans des vallécules bordées par les crêtes de collenchyme de la tige. La jeune tige, non encore côtelée présente une section circulaire, comme d'ailleurs la tige âgée devenue ligneuse.

Le mamelon caulinaire mature des zones basale et médiane de la tige adulte est constitué d'un dôme épidermique percé en son centre par un petit massif extrusif (Fig. 14).

1 - Ontogenèse des ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata*

Les premiers stades de la formation des racines adventives de *S. rostrata* sont observés exclusivement au niveau du 3^{ème} entre-noeud à partir de l'apex (Fig. 15), jamais dans les entre-noeuds plus jeunes, et cela quels que soient l'âge et la taille de la plante (6 à 12 entre-noeuds). C'est au niveau de ce 3^{ème} entre-noeud que l'on peut observer les cellules initiales subissant les premières divisions mitotiques (Fig. 16). Ces cellules se situent toujours entre 2 faisceaux cribro-vasculaires, dans une zone où le cambium commence à fonctionner. En effet, dans les parties jeunes de la plante où les formations secondaires ne sont pas encore en place, nous n'avons jamais observé d'ébauches de racines adventives.

Ces cellules initiales semblent provenir de l'activité du cambium interfasciculaire intégrant les cellules voisines du parenchyme cortical. Après une courte phase de multiplication apparemment "désordonnée", il apparaît une certaine polarité dans l'allongement et dans la division conduisant à l'édification d'un massif méristématique en forme de demi-lune (Fig. 17) ; correspondant au "champ morphogénétique radical" selon Favre (1977 a).

Chez *S. rostrata* le cortex est très peu développé, de ce fait très vite la jeune ébauche racinaire fait saillie au niveau de l'épiderme, tout en restant incluse dans les tissus de la tige. Au niveau de la région interne et centrale du massif méristématique, les cellules s'allongent dans le sens radial et les premières trachéides apparaissent. Il se met ainsi en place le

futur cylindre central qui va relier l'ébauche de racine adventive à la vascularisation de la tige .

Dans la région apicale de l'ébauche racinaire, les divisions s'orientent perpendiculairement à la surface donnant ainsi naissance au cortex et au rhizoderme de la future racine adventive (Fig.18).

C'est très généralement lorsque les différents territoires racinaires sont mis en place (cylindre central, cortex, coiffe, ...) que la jeune racine adventive émerge de la tige après rupture de l'épiderme, donnant ainsi le mamelon caulinaire typique avec son dôme épidermique et sa pointe de racine en attente (Fig. 27).

2 - Caractérisation de l'état physiologique des cellules des méristèmes racinaires

Pour bien situer les ébauches de racines adventives par rapport aux autres organes de la tige, du point de vue physiologique, il a été entrepris, d'une part une étude de la localisation de l'eau dans les tissus et des mesures du potentiel hydrique, et d'autre part la caractérisation des cellules des méristèmes racinaires présents dans ces ébauches de racines adventives par rapport au cycle cellulaire.

2.1 - Visualisation de l'eau libre dans les ébauches de racines adventives

Cette technique permet de visualiser l'eau libre contenue dans les tissus par une plage blanche dont la brillance varie en fonction de la teneur en eau. Elle permet ainsi de distinguer les tissus riches en eau des tissus qui en contiennent moins et constitue une approche pour s'assurer de l'état d'activité ou d'arrêt d'activité d'un organe, qui est généralement fonction de l'absence ou de la présence de l'eau (Cottignies, 1985).

Deux lots de fragments de tige de *S. rostrata* de 2 cm de longueur sont prélevés pour être soumis au champ magnétique de la R.M.N. Le premier lot est constitué de tiges ne présentant que des mamelons caulinaires à l'état de latence, le deuxième lot est constitué de tiges portant des nodules caulinaires, c'est-à-dire des structures déjà infectées par le *Rhizobium* spécifique.

La figure 19 représente la coupe anatomique d'une tige se *S. rostrata* portant des mamelons caulinaires bien développés et la figure 20, une vue transversale de cette même tige en I.R.M.

Les parties de la tige qui apparaissent sur l'image obtenue en IRM sont : les tissus conducteurs et les cinq côtes de collenchyme nettement visibles. Il n'apparaît pas d'autres images sur la périphérie de la tige ; les mamelons caulinaires ne sont pas visibles.

Par contre, à titre de comparaison, l'image obtenue à partir des informations analytiques sur un plan transversal de la tige présentant des nodules montre, outre les zones conductrices, des structures périphériques nettement visibles : les nodules caulinaires (Figs 21 et 22).

En effectuant une sélection verticale du fragment de tige dans un plan passant par la génératrice des nodules, on obtient les figures 23 et 24. Sur la figure 23 six nodules sont identifiables. Les différences d'intensité lumineuse observées sur la figure 24 correspondent aux nodules caulinaires. On observe également un spectre caractérisé par les 6 pics des teneurs relatives en eau de ces nodules.

Ces résultats suggèrent donc, soit que les ébauches racinaires de la tige de *S. rostrata* présentent une teneur en eau libre très faible, soit alors que l'eau qui se trouve là, est sous une forme liée non détectable par R.M.N. Par contre après infection par le *Rhizobium* spécifique, les nodules caulinaires formés sont beaucoup plus riches en eau. Ceci est tout à fait en accord avec l'existence d'une importante activité métabolique dans ces organes nodulaires, activité liée à la fixation symbiotique de l'azote.

2.2 - Mesures du potentiel hydrique dans les ébauches de racines adventives

Par la technique densimétrique de Chardakov (1953), nous avons pu estimer le potentiel hydrique des méristèmes racinaires. Cette étude, comme l'étude précédente, a pour but de déterminer les teneurs relatives en eau dans les extrémités des ébauches de racines adventives, de manière à préciser l'état physiologique de ces organes par rapport aux autres parties de la tige.

Dans une première manipulation des extrémités d'ébauches racinaires fraîchement prélevées sur les tiges ont été placées dans un tube à hémolyse et recouvertes d'une solution molale de saccharose (342 g de saccharose par litre d'eau distillée).

Au bout de 16 heures à 4 °C, les gouttes prélevées du milieu dans lequel baigne le matériel végétal et colorées par le bleu de méthylène remontent lorsqu'elles sont introduites dans une solution de saccharose de référence, c'est-à-dire une solution qui avait la même concentration au début de l'expérience.

Nous en avons donc conclu, selon Chardakov (1953) que le potentiel hydrique des cellules des méristèmes racinaires est inférieur, en valeur absolue, à la pression osmotique de ce milieu de référence.

Dans une deuxième série d'expériences des extrémités des ébauches de racines adventives ont été introduites dans quatre solutions de saccharose de concentrations croissantes : C₁ = 1,5 M ; C₂ = 1M ; C₃ = 0,5 M et C₄ = 0,25 M

Nous avons alors noté que les gouttes prélevées dans les solutions C₁ et C₂, remontent lorsqu'elles sont introduites dans les solutions de référence ayant même concentration en début d'expérience, ce qui veut dire qu'elles sont moins denses que ces solutions de référence, donc que les extrémités de racines adventives ont cédé de l'eau dans ces solutions.

Par contre, les gouttes prélevées dans le milieu C₄ descendent lorsqu'elles sont, à leur tour introduites dans la solution de référence : C₄. Cela signifie que les extrémités des ébauches de racines adventives ont capté de l'eau du milieu dans lequel elles baignaient, rendant ce dernier plus dense que le milieu de référence de même concentration en début d'expérience.

Dans la solution C₃, il n'y a pas eu de mouvement net de la goutte qui semble donc s'immobiliser dans cette solution.

En conclusion, le potentiel hydrique des zones méristématiques des ébauches de racines adventives est compris entre $-22,4 \times 1$ et $-22,4 \times 0,25$. Plus exactement, il serait égal à :

$$S = - 22,4 \times 0,5 M = - 11,2 \text{ atm.}$$

Des mesures identiques ont été réalisées avec des fragments de tige prélevés entre deux sites de nodulation (Fig. 4).

Des gouttellettes provenant de solutions de saccharose de concentrations croissantes depuis le concentration molale (342 g/l d'eau)

et dans lesquelles ont séjourné pendant 16 heures des fragments de tiges ont été à leur tour testées de la même manière que précédemment.

Il est apparu que les tissus de la tige présentent un potentiel hydrique supérieur ou égal à $0,25 \times 22,5 = - 5,6$ atm.

Ainsi le potentiel hydrique est plus faible dans les ébauches de racines adventives que dans les tissus de la tige.

Ce résultat, associé au résultat précédent de l'imagerie en RMN, faisant état de la faible teneur en eau libre dans ces ébauches racinaires, constitue un argument permettant de conclure à un état d'arrêt de la croissance des cellules de ces méristèmes racinaires.

2.3 - Distribution des teneurs en ADN des noyaux des cellules des méristèmes racinaires adventifs en cytofluorométrie

L'application des techniques de cytofluorométrie nous est apparue comme une méthode intéressante pour tenter de caractériser l'état physiologique des ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata* en situant les noyaux des cellules des méristèmes des ébauches racinaires dans le cycle cellulaire : G₁ - S - G₂ et M. Une telle étude peut permettre, en effet de conclure quant à l'état cyclant ou non cyclant des cellules de l'organe (Cottignies, 1986).

5 784 noyaux ont été analysés par le cytofluoromètre à partir de noyaux prélevés sur des extrémités d'ébauches de racines adventives.

Les données statistiques font état de 79% de noyaux en G₀₋₁ et 2% de noyaux en G₂. La figure 25 présente l'histogramme de l'intensité de fluorescence (en unités arbitraires) des noyaux ainsi traités. Pour traduire ces mesures en quantité d'ADN, nous avons utilisé comme élément de référence les noyaux des érythrocytes de poulet pour lesquels 2C d'ADN correspondent à environ 3 pg.

Un traitement de cet histogramme par pesée des bandes correspondant aux différentes populations à 2C ou à plus de 2C, permet les observations suivantes :

- La région regroupant le maximum de population 2C (comprise entre 85,4 et 106,6) pèse 0,0766 g. Cela correspond comparativement aux autres zones à 95 % de la population 2C. Si nous considérons la courbe

Nombre total de noyaux : 5784

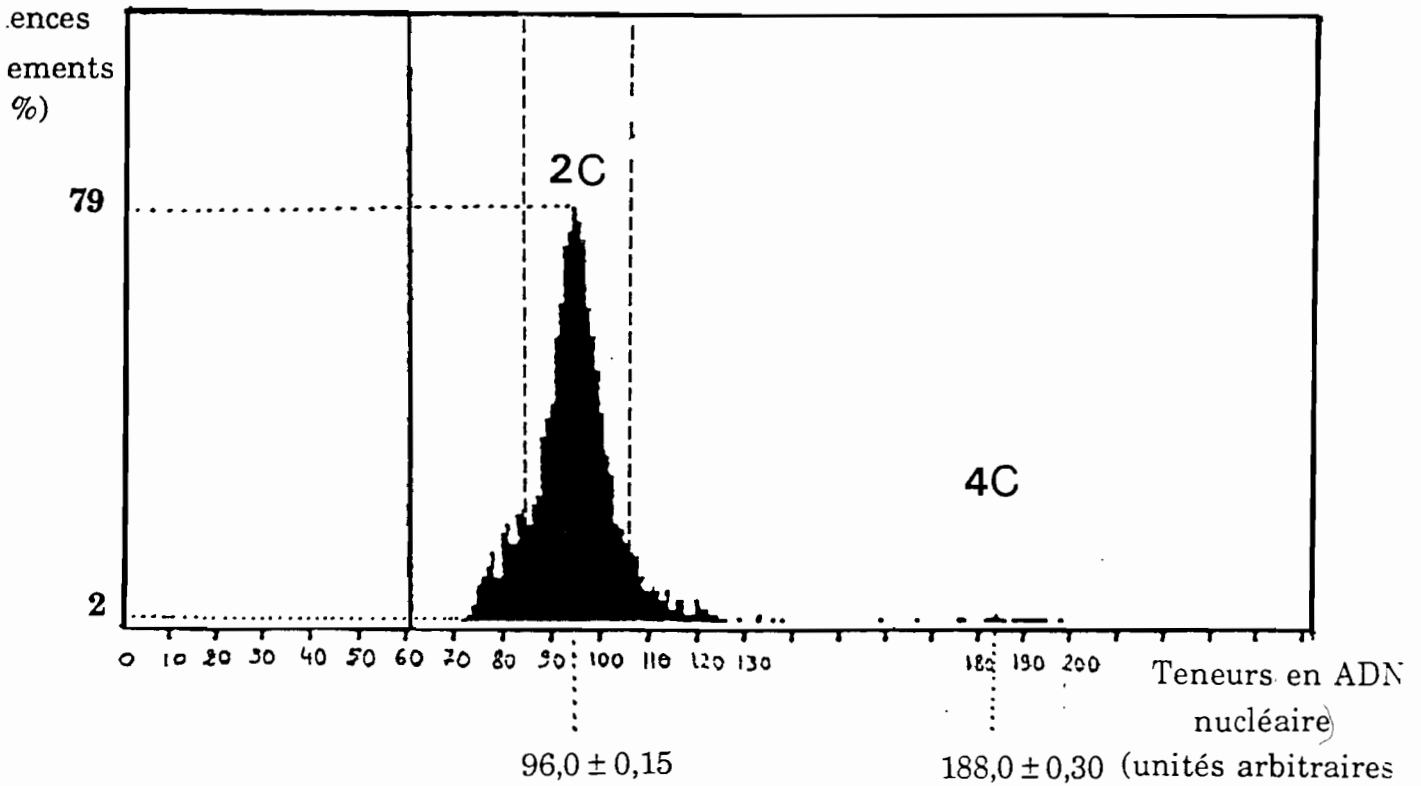


Fig. 25 - Distribution des teneurs en ADN des noyaux des cellules des ébauches racinaires de *S. rostrata* en cytofluorométrie.

Nombre total de noyaux : 2590

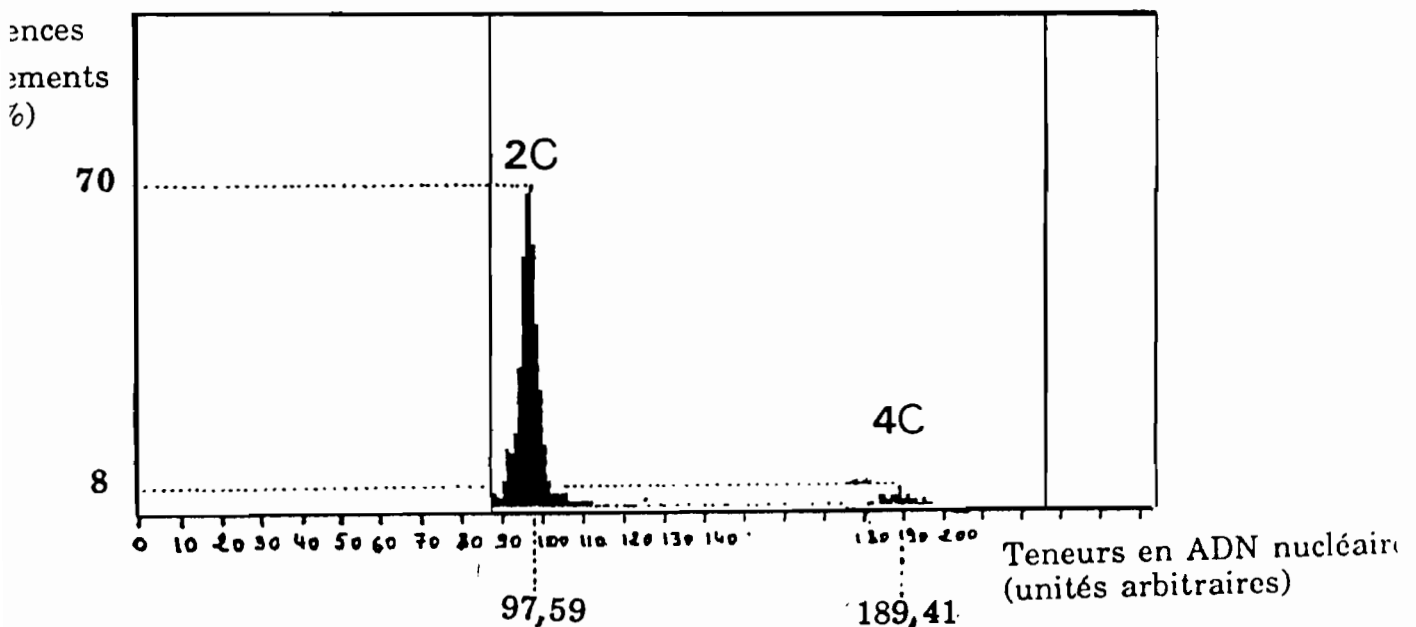


Fig. 26 - Distribution des teneurs en ADN des noyaux des cellules épidermiques d'une tige de *S. rostrata* en cytofluorométrie.

gaussienne théorique correspondant à cet histogramme, il apparaît qu'il devrait y avoir 2,5 % de la population avec un peu moins de 2C et 2,5 % de la population avec plus de 2C. Or la pesée de la zone du graphe au-delà de 106,6 donne : 0,0087g, ce qui correspond à 4 fois plus de la population théorique qui devrait peser : 0,002016 g.

Il apparaît donc sur l'histogramme que la population des noyaux à 2C des ébauches de racines adventives n'est pas tout à fait pure, et qu'elle renferme 7 à 8 % noyaux 2C en trop. Cette différence n'est cependant pas énorme, compte tenu des limites de la technique.

Cet excès de noyaux 2C peut, en effet, être dû à deux facteurs.

- D'abord les noyaux isolés selon le protocole décrit dans le chapitre " Matériel et méthodes " ne sont pas tous à l'état pur, du cytoplasme a pu rester collé à certains noyaux. Une goutte du milieu montée et observée au microscope à fluorescence permet d'observer des noyaux très fluorescents dont certains sont, en effet, entourés d'un peu de cytoplasme. Cela entraîne des erreurs de mesures du fait de la diffusion de la fluorescence par ces traces de cytoplasme.

- Ensuite, il a pu y avoir contamination de l'échantillon par les noyaux des cellules du dôme épidermique du mamelon caulinaire lors du prélèvement à la lame de rasoir.

Il reste néanmoins que les mesures montrent une très grande majorité de noyaux 2C et, au contraire un très faible pourcentage de noyaux 4C, correspondant probablement à des cellules non cyclantes de l'épiderme de la tige noté d'ailleurs sur un autre histogramme (Fig. 26) lors d'une étude comparative.

2.4 - Analyse de l'activité mitotique dans les méristèmes racinaires présents dans les mamelons caulinaires

L'étude histologique des ébauches de racines adventives des mamelons caulinaires et la détermination de l'index mitotique dans les méristèmes racinaires présents dans ces structures ont été entreprises afin de rechercher des arguments cytologiques en faveur ou en défaveur de l'arrêt d'activité.

Les massifs extrusifs qui percent l'épiderme de la tige au niveau des mamelons caulinaires sont des apex de racines préformés comme le révèle l'étude histologique. Chaque apex de racine d'une longueur totale d'environ 100 μm présente les principaux territoires histologiques de nature racinaire : coiffe, méristème sub-apical, cortex et un cordon

vasculaire directement relié à la stèle de la tige (Fig. 27). Notons, qu'il n'existe pas de poils absorbants, ni de zone d'élongation.

Au niveau apical ; la coiffe apparaît formée de cellules parenchymateuses de grande taille (30 μm), dont les plus périphériques se desquament progressivement. Sur ses flancs, la coiffe s'amincit jusqu'à ne plus présenter qu'une seule assise cellulaire. Immédiatement sous la coiffe s'édifie la zone d'entretien de la coiffe ou zone calyptrogène caractérisée par une ou deux assises de cellules méristématiques tétraédriques . Le méristème racinaire proprement dit comporte un centre quiescent dont les limites ne sont pas très évidentes à définir et un massif de cellules isodiamétriques de très petite taille (16 μm) disposées de manière assez régulière.

A la base de l'ébauche racinaire, les cellules parenchymateuses du cortex sont relativement plus grandes (40 μm) et bien différenciées (vacuolisation importante). Le cylindre central se distingue nettement avec ses cellules allongées et orientées selon le grand axe de l'ébauche racinaire.

2.5 - Index mitotique dans les méristèmes racinaires adventifs

L'observation à un fort grossissement de la zone méristématique d'une ébauche racinaire montre qu'aucune figure de mitose n'apparaît dans ces méristèmes. Tous les noyaux sont quiescents avec une membrane nucléaire bien visible de même que le nucléole (Fig 28). L'index mitotique est donc nul.

Sur des microphotographies de cellules du méristème racinaire, on peut observer que le noyau renferme une hétérochromatine en amas denses, le nucléole est assez volumineux et d'aspect fibrillaire. Les vacuoles sont réduites. Les mitochondries et les chloroplastes sont relativement peu structurés et les parois pectocellulosiques très minces (Figs 29 et 30).

Ces observations, adjointes aux résultats en cytofluorométrie correspondent aux critères de l'état bloqué G₀-1 des cellules non cyclantes, caractéristiques de la plupart des états d'arrêt temporaire de la prolifération cellulaire et de la croissance (Cottignies, 1986).

3 - Microanalyse comparative des éléments minéraux présents dans les différents tissus du mamelon caulinaire au CAMEBAX

3.1 - Répartition graphique des éléments minéraux

Cette étude a été réalisée pour chercher les différences dans la répartition des éléments minéraux entre les ébauches de racines adventives et les autres parties de la tige, dans le but de trouver une corrélation possible entre leur état de latence et une variation dans le métabolisme minéral.

Par la méthode dite de "sélection d'énergie" avec comme détecteur une diode Silicium-Lithium, nous avons obtenu un spectre caractéristique de certains éléments présents dans les tissus de la tige : Na, Mg, S, P, Cl, et K (Fig. 31).

Ces éléments ont été par la suite analysés et dosés en unités arbitraires sur une surface identique à différents niveaux de la tige et dans l'apex de racine. Pour avoir des éléments de comparaison les mêmes dosages ont été effectués dans le nodule caulinaire (c'est-à-dire après infection par *Azorhizobium*). Une étude comparative des variations de concentrations entre les différents organes et la tige a été effectuée.

Le tableau II ci-dessous donne les moyennes de variations de concentrations (ΔX) de ces éléments dans les différents cas d'évolution en comparaison avec la tige correspondante.

Ces valeurs ont été analysées par un programme statistique (Test de Levenne, 1960) qui permet de dire si la différence est hautement significative (H.S.) pour $p < 0,01$; significative (S.) $0,01 < p < 0,05$ ou non significative (N.S.) pour $p \geq 0,05$.

Tableau II - Comparaison des variations de concentrations des éléments observés sur le spectre à la microsonde électronique (ΔX = Concentration dans la tige - Concentration dans la zone ciblée). * unités arbitraires.

Comparaison	ΔK	ΔCl	ΔS	ΔP	ΔMg
Tige / E.R.A.	1468 *	427	1991	266	231
	p=0,8 (N.S.)	p=0,7 (N.S.)	p=0,4 (N.S.)	p=0,5 (N.S.)	p=0,07(N.S.)
Tige / N.C.	- 6566	- 1754	277	- 892	52
	p=0,01(S)	p=0,03 (S)	p=0,6 (N.S.)	p=0,03 (S)	p=0,05/N.S.)

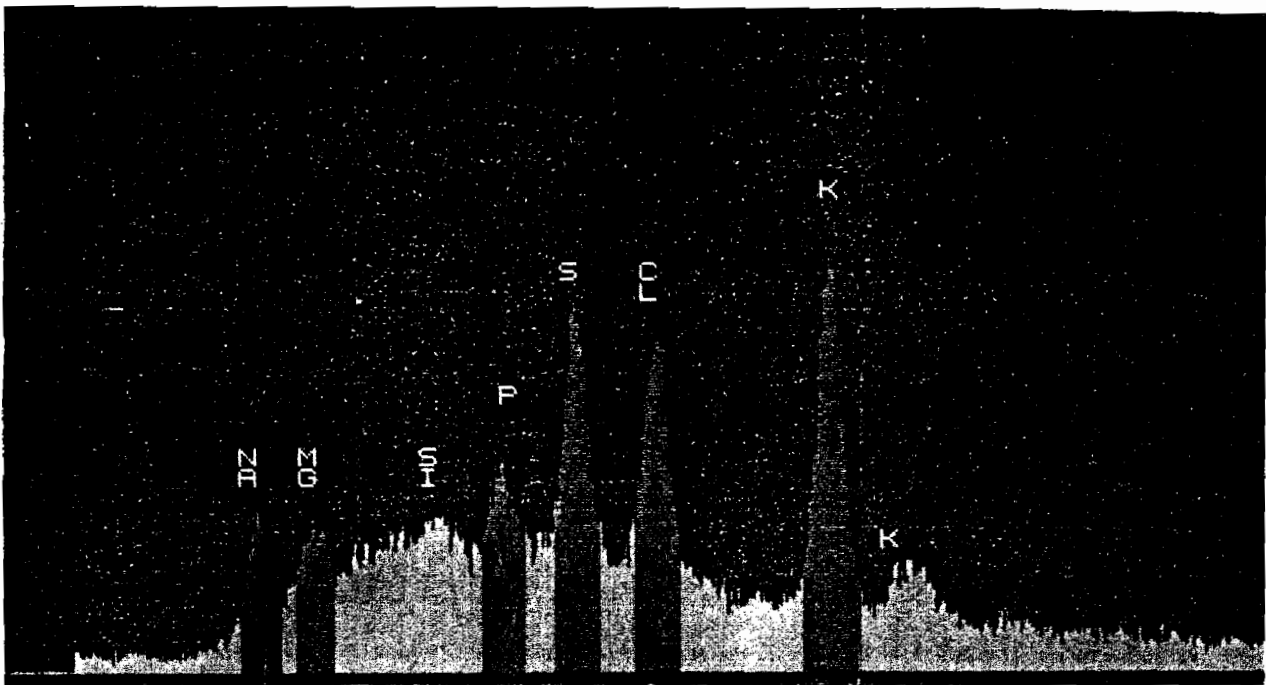


Fig. 31 -- Spectre des éléments détectés à la microsonde électronique sur une coupe transversale de tige de *S. rostrata*

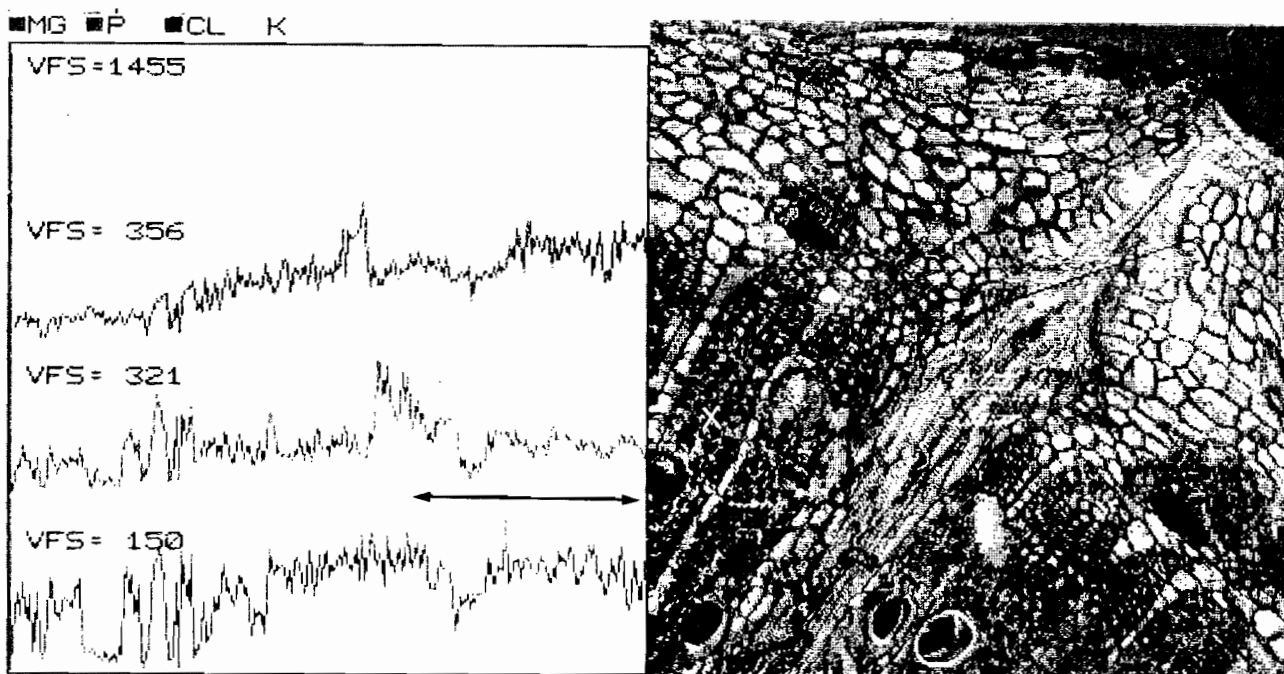


Fig. 32 - Traversée réalisée selon l'axe (x,y) depuis les tissus de la tige jusqu'au cortex de l'ébauche de racine adventive. Le phosphore (en vert) ne présente pas des pics notables dans la zone de l'ébauche racinaire (flèche).

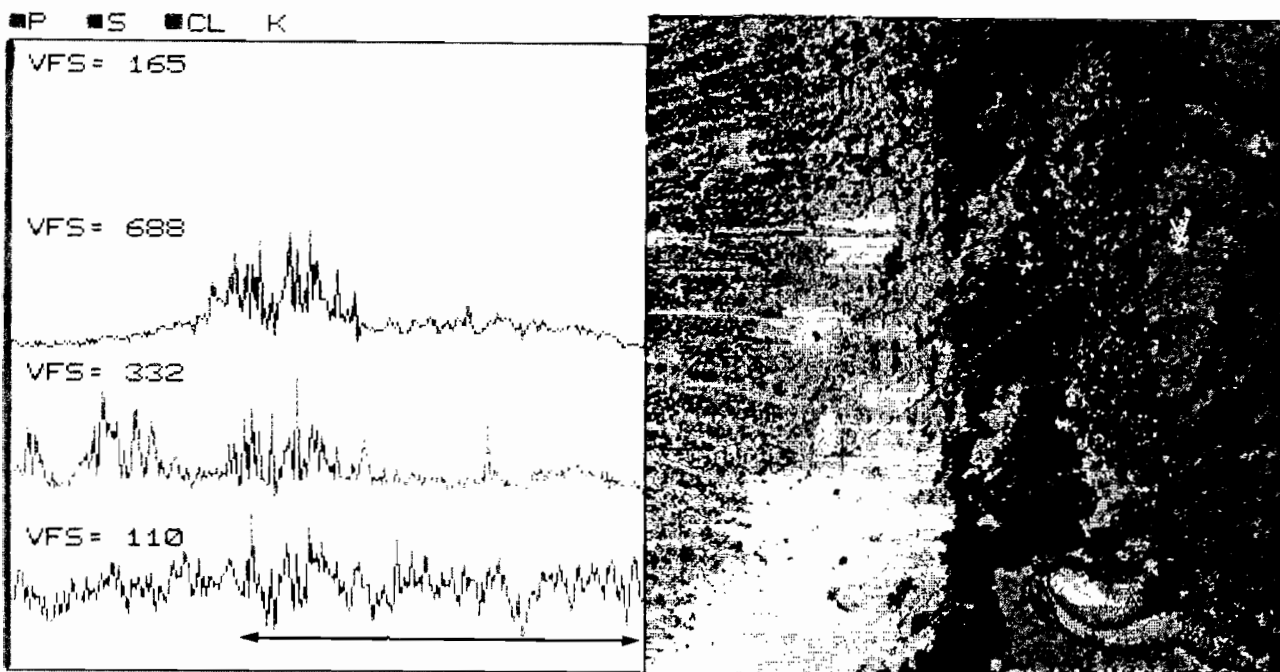


Fig. 33 - Traversée réalisée selon l'axe (x,y) depuis les tissus de la tige jusqu'au méristème nodulaire. Le phosphore (en rouge) présente des pics relativement plus importants au niveau des tissus nodulaires (flèche).

Il n'apparaît pas de différences significatives de concentrations pour les éléments analysés entre la tige et l'apex de racine en attente. La présence du primordium racinaire ne modifie pas la répartition de ces éléments ; il n'y a pas d'accumulation préférentielle notable d'aucun de ces éléments au niveau de l'ébauche racinaire.

Par contre, lorsque l'infection a eu lieu, certains éléments (Potassium, Chlore et Phosphore) sont plus abondants dans le nodule caulinaire par rapport à la tige.

3.2 - Analyse quantitative de la répartition des éléments minéraux

Nous avons également tenté une analyse quantitative de ces éléments. Pour cela, nous avons réalisé des témoins avec des rondelles de papier 1 cm de diamètre imbibées de solutions des différents éléments identifiés sur le spectre à des concentrations connues (en mole / l). Les teneurs en éléments minéraux des apex de racines et des nodules caulinaires sont donc estimées à partir de ces témoins (Tableau III).

Tableau III - Etude comparative de la concentration en ; K, Cl, S, P et Mg dans l'ébauche de racine adventive et dans le mamelon caulinaire

Eléments identifiés	Concentration dans les E.R.A. (en mole / l)	Concentration dans les N.C. (en mole / l)	Valeur de p.	Conclusion
K	0,05	0,15	0,4	N.S.
Cl	0,06	0,12	0,4	N.S.
S	0,06	0,09	0,9	N.S.
P	0,025	0,1	0,05	S
Mg	0,06	0,05	0,9	N.S.

Là encore, il n'apparaît pas de différences significatives entre les teneurs en K, Cl, S et Mg dans la tige et dans l'ébauche de racine adventive. Cependant, comparativement, le phosphore est présent à plus forte concentration dans le nodule caulinaire. Cette augmentation assez significative du taux de phosphore peut être reliée aux nombreuses divisions cellulaires et à l'importante activité métabolique qui accompagnent la formation du méristème nodulaire. Par contre, dans l'ébauche de racine adventive, comme dans de nombreux autres organes en état de repos, l'absence de divisions cellulaires et l'arrêt ou la diminution de l'activité de synthèse s'accompagnent d'une nette

réduction du métabolisme du phosphore et de la réduction de l'activité des mitochondries (Cottignies, 1986).

3.3 - Répartition spatiale des éléments minéraux à la microsonde électronique

A l'aide d'un microscope à balayage équipé d'une microsonde électronique nous avons étudié la répartition de certains éléments minéraux présents dans les tissus de *S. rostrata*, notamment dans les ébauches de racines adventives et dans les mamelons caulinaires dans la zone à analyser. Cette technique permet de faire une analyse en continu point par point sur une droite choisie par l'expérimentateur : c'est la traversée.

Au niveau d'un mamelon bien développé de la zone médiane de la tige, la traversée depuis les tissus conducteurs propres à la tige jusqu'au cortex de l'apex de racine ne montre pas de différences notables dans les concentrations des divers éléments identifiés (Fig. 32).

Par contre lorsque l'analyse est effectuée après infection par le *Rhizobium* spécifique, c'est à dire au stade nodule, il apparaît une augmentation relative du Phosphore dans le nodule (Fig. 33).

4 - Conclusion

L'ensemble de ces résultats confirme que l'apex de racine est une zone en attente alors que le nodule est une zone d'intense activité métabolique et mitotique (présence de méristèmes nodulaires en cours de formation).

La presque totalité des noyaux dans les méristèmes racinaires est bloqué en phase G₀-1 et la teneur en eau liée importante, entraînant corrélativement la réduction de l'activité respiratoire et le ralentissement du métabolisme du phosphore (Cottignies, 1986).

III - DISCUSSION

Chez *S. rostrata* la mise en place des ébauches de racines adventives sur la tige est naturelle et spontanée, elle n'est soumise ni à un bouturage, ni à un traumatisme préalable. Cette mise en place est probablement régie par des facteurs génétiques, comme c'est le cas pour la plupart des plantes à racines adventives préformées décrites à ce jour (Haissig, 1970).

Dreyfus et ses collaborateurs (communication personnelle) ont, par ailleurs, obtenu au laboratoire de Microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar, par mutagenèse chimique (trempage des graines dans le méthane sulfonate d'éthyle (M.S.E.) un mutant de *S. rostrata* "sans sites", c'est-à-dire sans ébauches de racines adventives visibles sur la tige .

La chronologie des étapes de mises en place de ces ébauches de racines adventives préformées parait, toutefois, assez comparable à ce que l'on observe chez les racines adventives néoformées et que nous avons adopté précédemment, c'est-à-dire les trois étapes caractérisées par Favre (1977a et b).

Dans le cas de *S. rostrata* la première étape, c'est-à-dire l'activation générale, liée à la croissance de la plante et donc plus diffuse dans le temps se situe dans la zone corticale profonde interfasciculaire .

La deuxième étape : formation du champ morphogénétique de la racine est relativement fugace et difficile à saisir. En effet, comme dans cas de *Salix fragilis* (Carlson, 1929, 1938 et 1950), seules des coupes supérieures ou égales à 10 μm d'épaisseur permettent de localiser les premières cellules impliquées dans le phénomène. Le nombre de cellules impliquées semble très faible car elles ne s'observent que sur moins d'une dizaine de coupes de 10 μm d'épaisseur soit $10 \times 10 = 100 \mu\text{m}$. Par ailleurs, la faible épaisseur de l'écorce fait que très vite l'ébauche de racine adventive fait saillie à la périphérie de la tige. On n'observe, donc pratiquement jamais de champs morphogénétiques, selon Favre (1977 a) à l'intérieur des tissus, c'est-à-dire en position strictement interne, comme c'est le cas aussi chez *S. fragilix* (Carlson, 1950), chez *Populus nigra*, (Shapiro, 1958) et chez le Pois (Nougarède & Rondet, 1982).

La troisième étape, la croissance racinaire est, par contre suspendue et ne sera induite qu'après un séjour des tiges pendant plusieurs heures dans l'eau, comme nous le verrons plus loin.

Chez *S. rostrata*, comme chez de nombreuses autres plantes à ébauches de racines adventives préformées, les premières manifestations cellulaires de la mise en place d'une racine, ne sont perceptibles qu'à partir du troisième entre-noeud. On sait, par ailleurs, que c'est généralement à partir de cette zone que les cellules cambiales sont initiées et commencent à fonctionner pour donner naissance aux formations secondaires (Wolfe, 1934).

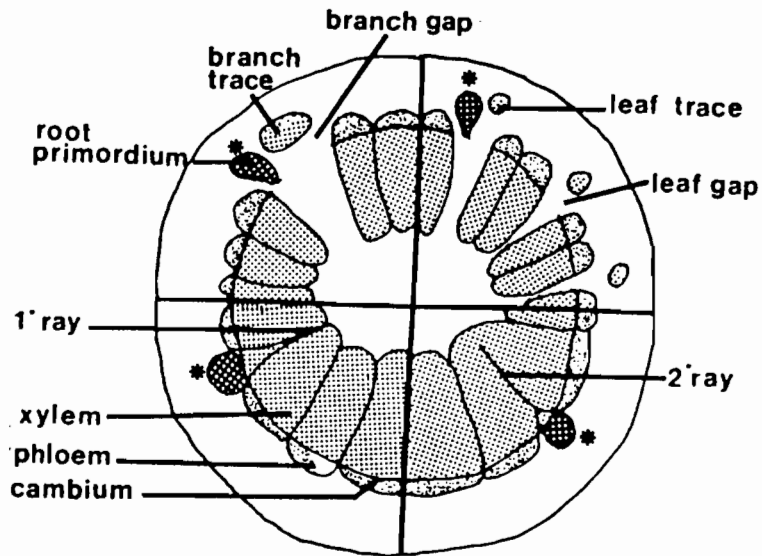


Fig. 34 - Localisation des primordium racinaires adventifs (*) Haissig (1965 et 1974)

Haissig (1965 et 1974) a montré que les cellules initiales des futures racines adventives sont situées au voisinage du cambium, des nouvelles formations secondaires ou des cellules corticales proches (Fig. 34).

Rappelons, aussi, que Swingle avait déjà observé en 1927 que les primordium racinaires préformés étaient généralement localisés au niveau des traces foliaires, des traces des rameaux latéraux ou des bourgeons. Ajoutons à cela, que depuis Loiseau (1960) il est admis que le système conducteur constitue en lui même une réalité phyllotaxique, c'est-à-dire que la disposition relative des faisceaux cribro-vasculaires dans une plante est en relation directe avec la disposition de ses feuilles.

La disposition linéaire des ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata*, disposition apparemment liée à la phyllotaxie de la plante (Duhoux, 1984), et que l'on rencontre aussi chez *Populus nigra var. italica* (Shapiro, 1958), semble en relation directe avec la mise en place des formations secondaires comme c'est le cas chez *S. fragilis* (Haissig, 1970).

En ce qui concerne les mécanismes physiologiques qui interviennent dans la régulation de la mise en place des ces ébauches de racines adventives préformées, peu d'informations sont disponibles à l'heure actuelle. Certains résultats montrent l'influence de la lumière, de l'obscurité, des phénomènes de dormance et des auxines, mais leur rôles respectifs n'ont pas été clairement définis (Shapiro, 1958 ; Jarvis *et al.*, 1983). Il est généralement admis que le développement des racines, qu'elles soient adventives ou non, dépend du taux d'auxines, notamment de l'AIA présent dans le tissu. Dans les cas de bouturage ou de traumatisme c'est l'accumulation de l'auxine basipète au niveau de la section ou au niveau de la zone de cicatrisation qui induit la rhizogenèse.

Dans le cas des racines adventives, plus particulièrement les ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata* ; l'interprétation est plus délicate. La localisation privilégiée des ébauches de racines adventives sur des génératrices verticales semble liée à la disposition des structures conductrices notamment du xylème secondaire immature lors de la phyllogenèse. Si on admet avec Scheldrake (1971) que ce xylème secondaire immature transporte et peut même synthétiser de l'auxine, on comprend alors que cette zone présente une plus grande aptitude à la rhizogenèse qui se traduit par la disposition des ébauches de racines adventives le long des génératrices reliant les feuilles.

En ce qui concerne l'état physiologique des cellules des ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata*, nous avons pu déduire des observations effectuées que les noyaux des cellules des méristèmes de racines adventives de la tige sont bloqués en phase G₀-1 et qu'ils ne retrouvent l'état cyclant que lorsque les tiges sont placées dans l'eau (voir plus loin). Les observations en I.R.M. ont également montré que dans les ébauches de racines adventives l'eau intracellulaire est soit en trop faible quantité, soit à l'état lié ce qui ne permet pas de la visualiser. Et enfin, nous avons pu observer que le potentiel hydrique des méristèmes racinaires des ébauches de racines adventives est faible par rapport au potentiel hydrique des tissus de la tige.

Les résultats de microanalyse n'ont pas révélé de différences significatives quant à la répartition des éléments minéraux. Les ébauches de racines adventives présentent le même équilibre minéral que la tige. Par contre, lorsqu'il y a infection bactérienne, il se produit une certaine augmentation de la teneur en élément phosphore nécessaire aux réactions énergétiques des différentes phases de la nodulation et de la fixation symbiotique de l'azote.

Ces ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata* présentent ainsi une configuration particulière des noyaux avec une hétérochromatine en amas et des nucléoles d'aspect fibrillaire (Cottignies, 1979 et 1983 ; Cottignies & Jennane, 1988). L'absence de mitoses et la faible teneur en eau qui est corrélée à la réduction de la capacité respiratoire elle-même impliquée dans la réduction du métabolisme, notamment du métabolisme du phosphore, constituent aussi des critères de caractérisation de l'état bloqué G₀-1 existant pendant la dormance, la croissance rythmique ou cyclique (Cottignies, 1986), l'inhibition corrélative et la quiescence (Chouard, 1951).

Lorsqu'on se réfère aux définitions de la dormance, actuellement admises et rapportées par Cottignies (1986), on constate que les ébauches de racines adventives ne satisfont pas complètement aux définitions proposées : la véritable dormance est considérée comme un état endogène d'incapacité à la croissance liée au rythme des saisons. Cette incapacité due probablement à un facteur interne à l'organe lui-même ne peut être abolie par une simple modification de l'environnement (Wareing, 1963 ; Friedman *et al.*, 1979). Les ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata*, par contre, reprennent leur croissance dès qu'elles sont mises en contact avec l'eau et cela quels que soient l'âge, l'état végétatif de la plante ou la saison.

Dans le cas de l'inhibition corrélative la suppression de l'organe inhibiteur induit la reprise de la croissance (Chouard, 1951 et Feldman, 1984), ce qui n'apparaît pas chez *S. rostrata*. L'arrêt de croissance des ébauches de racines adventives ne semble pas, directement contrôlé par des corrélations morphogénétiques. La croissance des ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata* ne semble sous l'influence ni du bourgeon apical, ni des racines séminales (Voir chapitre suivant). Il n'y pas de phénomène de dominance apicale, ni action activatrice ou inhibitrice de ces organes sur la croissance des ébauches de racines adventives comme l'ont décrit divers auteurs dont Favre (1970, 1973 a et b) chez la Vigne. Cette observation est également contraire à celle réalisée chez *S. alba* (Vartanian, 1984) où l'ablation du bourgeon terminal entraîne une inhibition de la croissance des racines adventives courtes et également différente des observations de Samb (1983) chez *Jussiaea repens* où l'ablation de l'apex conduit à une augmentation de la croissance des racines adventives. Chez *S. rostrata* le bourgeon terminal intervient peut-être à un stade plus précoce de la différenciation des racines adventives.

Les ébauches de racines adventives de *S. rostrata* ne semblent donc se trouver ni en état de dormance, ni en état d'inhibition corrélative, ni en état de croissance cyclique. Ces structures paraissent plutôt se trouver dans un état de quiescence, puisqu'il suffit de les placer en présence d'eau pour que la croissance et l'élongation se manifestent, comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Le fait que, chez *S. rostrata* la croissance reprenne dès que les conditions d'humidité optimales sont rétablies, semble indiquer que nous avons à faire à une quiescence selon Meyer & Anderson, (1952), Samish (1954) et Cottignies (1985). En effet, selon ces auteurs la quiescence désigne plutôt l'arrêt de croissance provoqué par une carence ou les variations défavorables d'un ou plusieurs facteurs de milieu.

**CHAPITRE IV - EVOLUTION DES
EBAUCHES RACINAIRES DE
S. ROSTRATA DANS L'EAU : ROLE
DANS LA NUTRITION MINERALE DE
LA PLANTE.**

I - INTRODUCTION

Lorsqu'une tige de *S. rostrata* séjourne dans l'eau, les ébauches de racines s'allongent et se ramifient donnant des racines adventives typiques. L'élongation débute en moins de 24 heures. Cette élongation est liée à des modifications métaboliques et physiologiques dans les ébauches de racines.

Nous avons ainsi entrepris une étude systématique d'un certain nombre de caractères anatomiques et physiologiques permettant de mieux appréhender les corrélations morphogénétiques intervenant dans la croissance de ces ébauches de racines. Des traceurs radioactifs ont été utilisés pour tenter de préciser le rôle de ces structures dans la nutrition minérale et hydrique de la plante.

L'utilisation des radioisotopes a déjà permis de réaliser des progrès remarquables dans la connaissance des mécanismes de la pénétration et du transport des solutés dans la plante (Bidulph, 1959 ; Gagnaire-Michard & Jourdan, 1978 ; Jourdan, 1980 ; Chamel, 1973 ; Penot, 1976 a et b et 1979 ; Souidi, 1976 ; Floch' ; 1979 et Baillon, 1985).

Pour étudier la migration des nutriments dans la plante plusieurs macroéléments radioactifs ont pu être utilisés comme traceurs radioactifs des substances minérales dissoutes utilisées par la plante : ^{32}P , ^{42}K , ^{14}C , etc.

Un certain nombre de résultats obtenus dans ce domaine ont concerné la migration des ions potassium qui, avec l'azote et le phosphore constituent les trois éléments fondamentaux de la nutrition minérale de la plante (Chamel, 1973).

Le potassium intervient à divers niveaux dans le métabolisme général. S'il joue surtout un rôle d'activateur de nombreuses enzymes, il intervient également dans la régulation de l'équilibre ionique intracellulaire, et dans le maintien des potentiels électriques des membranes cellulaires contrôlant les courants d'eau, d'ions et de métabolites dans la cellule (Chamel, 1973). L'isotope radioactif ^{42}K est cependant difficile à manipuler car il présente une période de désintégration très courte ($\lambda = 12,4$ heures).

Des travaux antérieurs s'intéressant à ce sujet ont montré que l'absorption et la migration des ions rubidium et potassium dans la plante sont suffisamment proches pour que l'isotope radioactif du rubidium ^{86}Rb

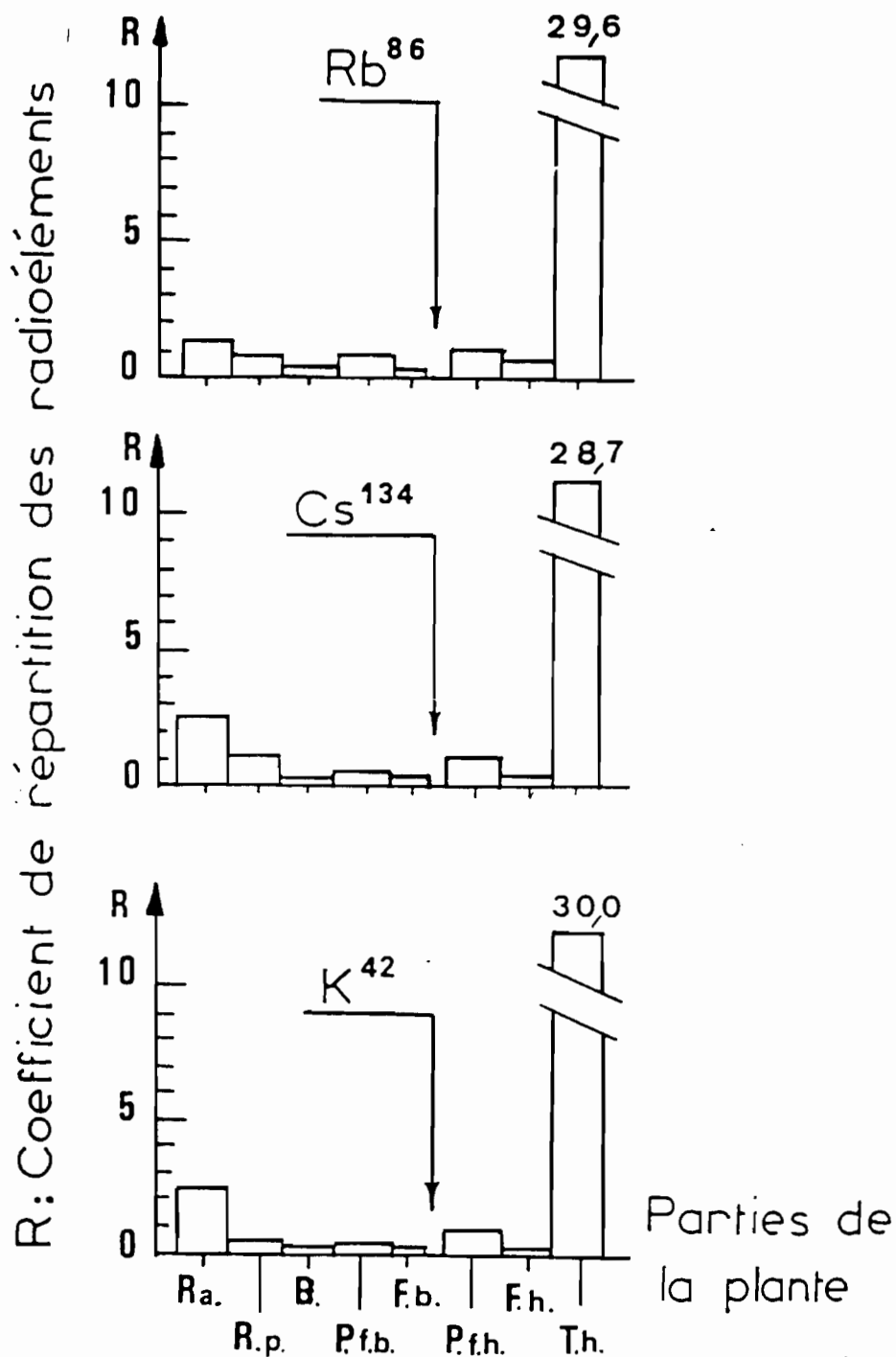


Fig. 35. Répartition du ^{86}Rb , ^{134}Cs et ^{42}K dans des jeunes peupliers, 24 heures après une application foliaire (d'après NIVOU, 1976).
 R : coefficient de répartition ; c'est le rapport entre la radioactivité (exprimée en pourcentage de la radioactivité totale des parties non traitées) et le poids de la matière sèche (exprimée en pourcentage du poids total de la plante).
 Ra. = ramifications racinaires, R.p. = racines principales ; B. = bouture ; P.f.b. = pétioles des feuilles du bas ; F.b. = limbe des feuilles du bas ; P.f.h. = pétioles des feuilles du haut ; F.h. = limbe des feuilles du haut ; T.h. = tige du haut.

soit utilisé sans trop de distortion comme traceur du potassium contenu dans la solution minérale (West & Pitman, 1967 ; Floch' & Penot, 1972 ; Bidulph, 1976 ; Souidi, 1976 ; Cumbus & Robinson, 1977).

Des essais préliminaires réalisés au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble par Nivou (1976) et cités par Jourdan (1980) sur *Populus X Euramericana* cv-214 ont montré que la répartition des isotopes radioactifs ^{86}Rb et ^{134}Cs dont les périodes de désintégration sont respectivement $\lambda = 18,7$ jours et $\lambda = 2,06$ ans (Tableau IV) est tout à fait comparable à celle du ^{42}K dans la plante est (Fig. 35).

Tableau IV : Caractéristiques physiques des radioéléments utilisés.

Radioélément	Période de désintégration (λ)	énergie de rayonnement servant à la mesure (KeV)
^{86}Rb	18,7 jours	1076,6
^{134}Cs	2,06 ans	795,8

Nous avons donc choisi d'utiliser le ^{86}Rb et le ^{134}Cs pour toutes nos expérimentations chez *S. rostrata*.

II - RESULTATS

1 - Modifications cytophysiologiques liées au passage de l'état d'ébauches racinaires à l'état de racines adventives

Après un séjour de 24 heures au moins dans l'eau, l'induction de la croissance est effective et les ébauches racinaires s'allongent pour donner des racines adventives typiques. Cette reprise de la croissance est probablement corrélée à des modifications cytophysiologiques précises par rapport à la situation de quiescence décrite précédemment. Trois aspects ont été retenus pour caractériser cette nouvelle situation d'une part, l'évolution du potentiel hydrique dans les méristèmes racinaires et d'autre part, la distribution de l'ADN des noyaux et l'index mitotique dans ces cellules méristématiques.

1.1 - Caractérisation de l'état physiologique des racines adventives développées sur la tige de *S. rostrata*

1.1.1 - Evolution du potentiel hydrique dans les racines adventives en cours d'élongation

Les mesures de potentiel hydrique réalisées selon la méthode de Chardakov, décrite précédemment, ont montré que les extrémités (0,5 cm de longueur) des racines adventives développées après un séjour de 24 heures dans l'eau, présentent un potentiel hydrique supérieur ou égal à -5,6 atm.

Sur des fragments de tige prélevés entre deux sites de nodulation, nous avons obtenu les mêmes résultats, c'est-à-dire un potentiel hydrique égal à -5,6 atm.

Ces résultats montrent d'une part, qu'après un séjour dans l'eau, le potentiel hydrique s'élève dans les méristèmes racinaires, par rapport aux valeurs notées chez les ébauches de racines adventives, d'autre part ce potentiel hydrique devient alors égal au potentiel hydrique des tiges.

Cette augmentation du potentiel suggère donc une sortie de l'état de repos observé précédemment. En effet, dans la plupart des exemples de reprise d'activité après une dormance ou une inhibition temporaire, le potentiel hydrique augmente assez rapidement dans les zones préalablement en repos, par rapport aux autres tissus de la plante (Cottignies, 1986).

Mais, contrairement à ce qui a été décrit chez le frêne (Cottignies, 1983) le potentiel atteint au niveau des racines adventives ne présente pas de différence nette avec celui des tissus de la tige. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que chez *S. rostrata*, les tiges et les racines séjournent en même temps dans l'eau. Les racines adventives absorbent l'eau directement du milieu, il n'y a pas d'appel d'eau spécifique de la tige vers ces racines adventives.

1.1.2 - Distribution des teneurs en ADN des noyaux des cellules méristématique dans les racines adventives en cytofluorométrie

3 281 noyaux prélevés sur des extrémités de racines adventives en cours d'élongation dans l'eau, ont été analysés par le cytofluoromètre.

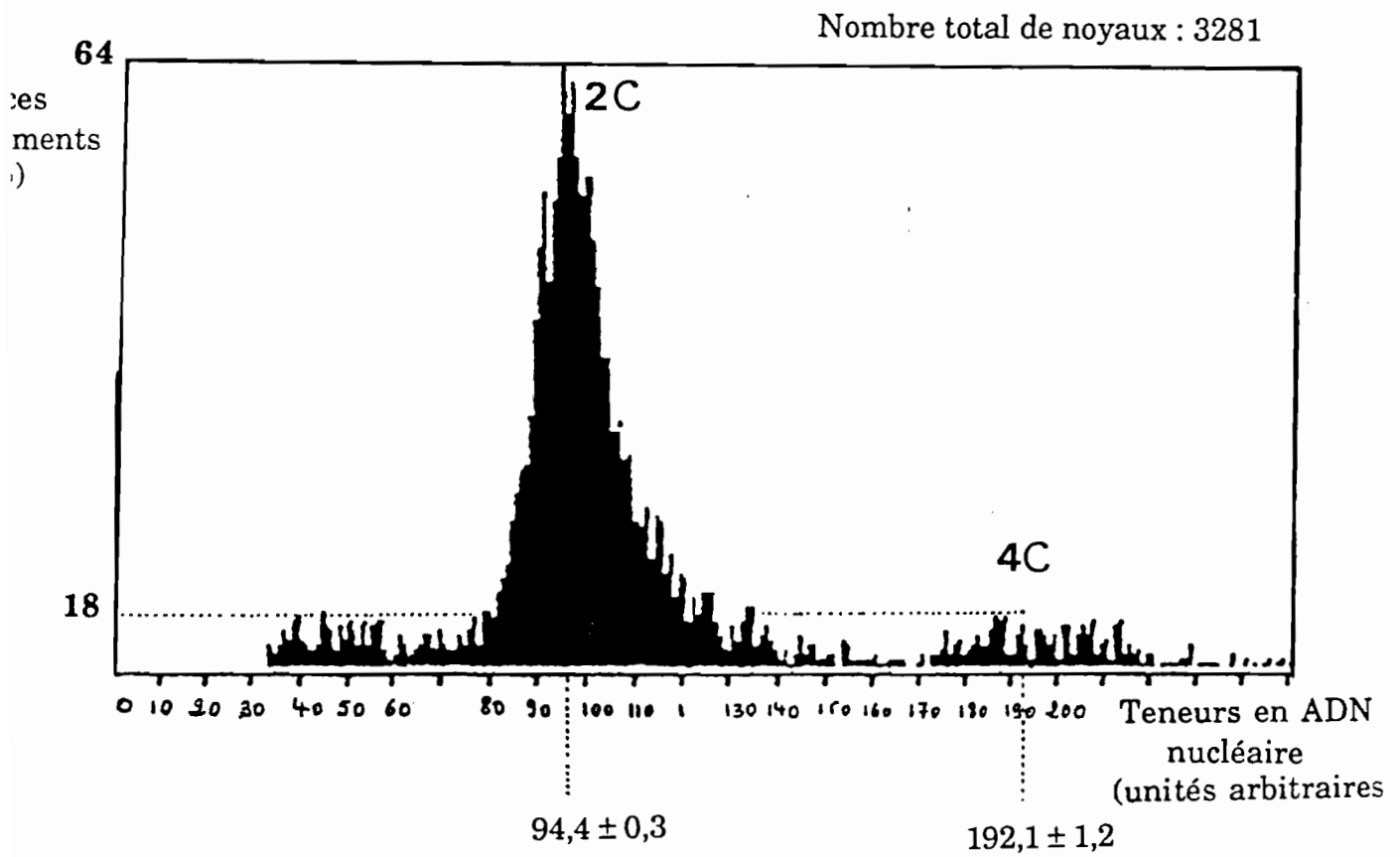


Fig. 36 - Distribution des teneurs en ADN des noyaux des cellules méristématiques des racines adventives en cours d'élongation sur la tige de *S. rostrata* en cytofluorométrie.

La figure 36 montre, à côté des 64% de noyaux à 2C, une population de noyaux à 4C relativement importante (18%).

Ces résultats indiquent que ces cellules ne sont pas rassemblées en une seule phase, comme c'était le cas pour les cellules des méristèmes des ébauches de racines adventives. Il n'y a visiblement pas de blocage des noyaux qui sont cyclants. Cette reprise de l'activité mitotique est confirmée d'ailleurs par l'index mitotique déterminé ci-dessous.

1.1.3 - Index mitotique dans les méristèmes racinaires en cours d'élongation.

Différents comptages des noyaux en division ont été réalisés sur des squash de pointes de racines adventives, après un séjour de 12, 24, 48 ou 72 heures dans l'eau. Dans chaque cas sur 100 noyaux dénombrés dans le champ du microscope, nous comptons le nombre de noyaux en mitoses (métaphase).

Les moyennes obtenues sont :

- pas de mitoses nettes après 12 heures,
- 17 % après 24 heures
- 13 % après 48 heures
- et 10 % après 72 heures.

Lors de comptages effectués sur des racines ayant séjourné plusieurs semaines dans l'eau, les moyennes obtenues sont toujours voisines de 10 %.

Il apparaît donc qu'après un maximum de 16 à 21 % dans les premières 24 heures d'immersion dans l'eau les mitoses sont moins fréquentes. Cela pourrait signifier que lors de ces 24 premières heures il y a un déblocage des noyaux qui étaient tous dans la même phase et qui retrouvent brutalement leur état cyclant, preuve qu'ils étaient bien en état d'arrêt temporaire.

2. Etude expérimentale de la croissance des racines adventives

Le but de cette étude était de chercher à savoir si des facteurs exogènes (eau, lumière) et/ou endogènes (présence ou absence de bourgeon terminal ou axillaire) avaient une incidence sur l'allongement de ces racines adventives. L'étude a été réalisée sur des plantes entières et sur des boutures mononodales.

2.1 - Croissance des racines adventives sur des plantes entières (Marcottage)

2.1.1 - Influence de quelques facteurs exogènes

- L'eau

L'immersion dans l'eau de jeunes plantes intactes, c'est-à-dire avec feuilles, racines et bourgeon terminal ou même après ablation plus ou moins importante de ces organes, pendant 24 heures suffit pour induire l'entrée en croissance des racines adventives. Les racines adventives se développent alors rapidement sur toute la longueur de la partie immergée de la tige (Fig. 37).

Le principal facteur inducteur de la croissance des racines adventives de la tige de *S. rostrata* est l'eau ou une atmosphère saturée en eau. La réhydratation des cellules de l'ébauche racinaire et des cellules de la tige constituant le dôme épidermique amorce les réactions métaboliques avec une faible période de latence.

Le contact avec l'eau doit, cependant, être assez important dans le temps car ni un arrosage, ni une pluie n'ont jamais provoqué le développement des racines adventives. Dans les populations naturelles de *S. rostrata*, lorsqu'en période d'hivernage, la base des tiges demeure inondée pendant quelques semaines, les ébauches de racines adventives se développent, donnant alors un important chevelu racinaire observable au début de la saison sèche après le retrait de l'eau (Fig. 38).

- La lumière

La lumière joue un rôle important dans l'induction de l'entrée en croissance des racines adventives, car son absence se traduit par des réponses très particulières, à savoir :

- maintien de la latence des apex de racines adventives présentes dans les zones apicale et basale;
- entrée en croissance des seules ébauches de la zone médiane (Spencer-Barreto & Duhoux, 1987).

Les racines adventives présentes dans la zone médiane sont les seules capables d'entrer en croissance même en absence de lumière. La présence d'une importante réserve amylocée dans les tissus caulinaires de cette zone semble pouvoir expliquer l'induction de la croissance des racines à ce niveau, même en absence de lumière. Elles disposent

probablement d'une réserve énergétique et nutritionnelle suffisante pour induire la croissance.

2.1.2 - Influence de quelques facteurs endogènes : corrélations morphogénétiques régulant la croissance des racines adventives

- Le bourgeon terminal

Le bourgeon apical ne semble pas intervenir directement dans l'induction de la croissance des racines adventives. Les résultats présentés dans le tableau V, ci-dessous montrent que la décapitation des plantes entières n'empêche pas le développement des racines adventives.

Tableau V- Influence de la décapitation sur la croissance de racines adventives.

Traitement	Nombre de plantes	nombre moyen de racines allongées / plante	Longueur moyenne des racines/ plante (mm)
Plantes décapitées	24	94 ± 31	19 ± 5
Plantes témoins	24	84 ± 20	13 ± 5

- Les feuilles

De jeunes plants de *S. rostrata* sont presque entièrement immergés dans l'eau. Les résultats présentés dans le tableau VI, ci-dessous, montrent que les racines adventives se développent plus rapidement (en moins de 24 heures) et subissent un allongement plus net lorsqu'il subsiste à l'air libre au moins deux feuilles .

Tableau VI- Influence de l'ablation des feuilles sur l'entrée en croissance des racines adventives sur des plantes entières.

	Nombre de plantes	Nombre moyen de racines allongées/ plante	Longueur moyenne des racines / plante (mm)
Plantes témoins	24	57 ± 6	21 ± 3
Plantes effeuillées (sauf deux feuilles)	24	61 ± 4	23 ± 2
Plantes entièrement effeuillées	24	21 ± 8	4 ± 1

Notons que lorsque toutes les feuilles sont immergées, elles ne survivent pas longtemps. Seules les feuilles restées à l'air libre subsistent et participent à la stimulation de la croissance.

2.2 - Croissance des racines adventives sur des boutures monodales (Bouturage)

Des boutures monodales (Cf. Chap. III), c'est-à-dire des fragments de tige de *S. rostrata* sont soustraits aux corrélations internes de la plante, et soumis à l'influence de divers facteurs exogènes et endogènes .

2.2.1 - Influence d'un facteur exogène : la lumière

Nous avons essayé de préciser la zone réceptrice de la lumière sur les boutures et de déterminer les conditions optimales de la croissance des racines adventives. Des boutures monodales ont été placées de manière à ce que soit, toute la bouture reçoive la lumière, soit une partie seulement de la bouture reçoive cette lumière (feuille axillante ou entre-noeud). Les résultats consignés dans le tableau VII, ci-dessous, montrent que la lumière agit essentiellement par l'intermédiaire des feuilles, probablement, par la synthèse des photosynthétats nécessaires à la croissance racinaire. On remarque de plus, que l'obscurité au niveau des racines adventives est favorable à leur croissance.

Tableau VII - Variation du comportement des racines adventives de la tige de *S. rostrata* sur des boutures monodales en fonction du site récepteur de la lumière.

	Nombre de boutures	Nombre moyen de racines allongées sur l'ensemble des boutures	Longueur moyenne des racines
Totalité de la bouture à la lumière	42	29 ± 11	22 ± 6
Feuille axillante soustraite à la lumière	42	0	0
Mamelons caulinares soustraits à la lumière	42	30 ± 7	32 ± 11

2.2.2 - Influence de quelques facteurs endogènes .

- Les bourgeons axillaires et les feuilles

Lors de cette expérimentation les boutures mononodales disposées dans les cuvettes sont soit ébourgeonnées et effeuillées, soit simplement ébourgeonnées. Les résultats sont consignés dans le tableau VIII, ci-après.

Tableau VIII-Influence des bourgeons axillaires et des feuilles sur l'induction de l'entrée en croissance des apex de racines sur des boutures mononodales.

	Nombre de boutures	Nombre de boutures enracinées	% de boutures enracinées
Boutures ébourgeonnées et effeuillées	42	6	13
Boutures ébourgeonnées	42	16	38
Boutures effeuillées	42	9	20
Boutures complètes (témoins)	42	36	85

Les boutures ébourgeonnées et effeuillées présentent une nette inhibition de l'élongation des racines adventives. Sur les boutures simplement effeuillées les racines adventives peuvent se développer, mais seulement après l'apparition d'une jeune feuille axillante, c'est-à-dire après une reprise de l'activité photosynthétique (Tableau VIII).

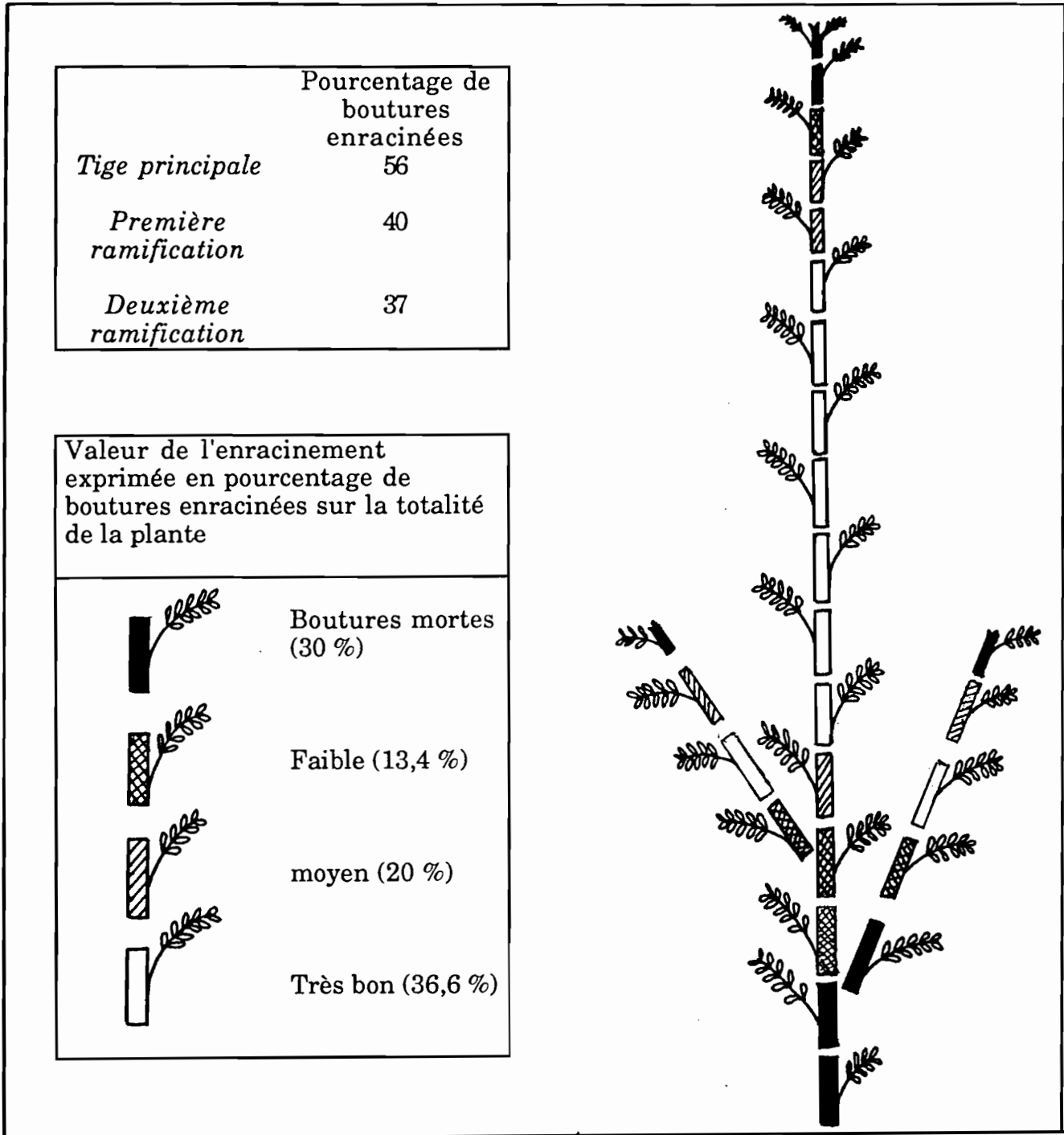
- Position des boutures par rapport à l'apex de la tige de la plante- mère .

Des boutures mononodales ont été prélevées tout au long de la tige principale et des ramifications de plantes de *S. rostrata*. Les boutures ont été soigneusement localisées sur la tige et on a suivi l'enracinement de chaque fragment. Les résultats de cette expérimentation sont présentés sur la figure 39.

L'observation attentive de cette figure nous amène aux conclusions suivantes .

- les boutures prélevées sur la tige principale s'enracinent nettement mieux que celles des ramifications latérales. Cette action activatrice du développement des racines adventives de la tige principale se manifeste d'une part, sur la vitesse

Fig. 39 - Différence d'aptitude au bouturage des diverses parties de la tige de *Sesbania rostrata*.



d'entrée en croissance (les premières racines s'y développent en moins de 24 heures), d'autre part, sur le pourcentage de boutures enracinées. Ce pourcentage est de 56% des boutures pour l'ensemble de la tige, et il atteint 100% si on se restreint à la zone médiane de la tige principale.

- Sur la tige principale comme sur les rameaux, les boutures apicales et basales s'enracinent mal, soit parce que les apex racinaires dans les mamelons sont encore trop jeunes et pas assez différenciées, soit parce que dans la zone basale ces apex de racines sont souvent trop agés, sclérifiés et déformés (bifurcation des pointes).

- la partie de la plante qui présente une croissance optimale des racines adventives est la zone médiane de la tige principale.

3 - Rôle des racines adventives dans la nutrition minérale de la plante

3.1 - Mise en évidence

Des boutures mononodales avec des racines adventives bien développées et un rameau axillaire de 3 cm de longueur ont été mises en terre en même temps que des germinations. Les cultures ont été réalisées dans le jardin botanique du Département de Biologie Végétale pendant tout l'hivernage (2 mois). L'expérience a été effectuée en deux répétitions de deux lots de 20 plantes .

Tableau IX - Etude comparative de la croissance des plantes issues de boutures et des plantes issues de germinations.

	Nb.de feuilles	Long. des tiges (cm)	Poids sec (g)			Total poids sec (g)
			Feuilles	Tiges	Racines	
Germin.	171 ± 22	123,1 ± 17	11,02 ± 2	16,3 ± 5	2,6 ± 0,7	29,92
Boutures	126,4 ± 14	165,2 ± 13	16,4 ± 2	26,6 ± 5	9,3 ± 2,4	52,3

Il apparait nettement, sur le tableau IX, que si les plantes issues de graines présentent plus de feuilles celles-ci sont petites avec des folioles également de petite taille . Les plantes issues de boutures sont nettement mieux développées (hauteur moyenne : 165,2 cm) et la biomasse moyenne

produite pendant le même temps est plus importante (52,3 g contre 29,9 g). Par ailleurs le système racinaire de ces boutures, issu du développement des racines adventives, est nettement plus important .

Ces différences dans la croissance des plantes présentant des racines adventives développées et des plantes n'en présentant pas semble suggérer que les racines adventives jouent un rôle dans l'absorption racinaire et dans la nutrition minérale de la plante. C'est ainsi que nous avons entrepris d'étudier le rôle des racines adventives dans la nutrition de la plante à l'aide de traceurs radioactifs.

3.2 - Etude de l'absorption et de la migration du ^{86}Rb dans la plante.

3.2.1 - Absorption des éléments radioactifs par les ébauches racinaires sur de petits fragments de tige.

Dans cette expérience nous étudions la pénétration du ^{86}Rb contenu dans une microgouttelette (10 μl) d'une solution de chlorure de rubidium (activité initiale de 3,7 MBq / ml ou 20 mg de ^{86}Rb / ml) au niveau de fragments de tiges de *S. rostrata* de 3 mm x 5 mm x 5 mm présentant ou non un mamelon caulinaire mature. Les résultats de cette expérimentation sont résumés dans les tableaux X et XI ci-dessous.

Tableau X - Pénétration du traceur ^{86}Rb dans un fragment de tige présentant un mamelon caulinaire, au bout de 24 heures de traitement.

Fractions étudiées.	Répartition de la radioactivité en % du total
Liquide résiduel à la surface	6 \pm 3
Eau de rinçage	3 \pm 2
Fragment de tige	38 \pm 1
Disque de gélose	53 \pm 6

La pénétration du radio-élément contenu dans la goutte déposée sur le fragment de tige est nettement plus importante (91 % de la radioactivité totale) en présence d' un mamelon caulinaire que sans mamelon caulinaire (53 % de la radioactivité totale).

Tableau XI - Pénétration du ^{86}Rb dans un fragment de tige sans mamelon caulinaire au bout de 24 heures de traitement.

Fractions étudiées.	Répartition de la radioactivité en % du total.
Liquide résiduel à la surface	42,2 ± 15
Eau de rinçage	4,8 ± 7
Fragment de tige	25,6 ± 7
Disque de gélose	27,4 ± 10

De même, la migration de ce radio-élément dans les tissus (c'est à dire vers la gélose) se fait mieux (53 %) dans les fragments possédant un mamelon caulinaire que dans les fragments sans mamelon (27,4 %).

En s'appuyant sur la structure anatomique du mamelon caulinaire on explique aisément cette migration préférentielle. La parfaite différenciation de l'apex de racine et la présence d'un cordon vasculaire bien structuré semblent permettre une circulation aisée de la solution minérale du mamelon vers la tige .

Les racines adventives courtes de la tige de *S. rostrata* semblent donc, avant même leur développement pouvoir participer de manière active à la nutrition minérale de la plante. Cette absorption, nous le verrons plus loin est secondaire par son importance par rapport à l'absorption réalisée par les racines séminales.

3.2.2 - Absorption et migration des éléments radioactifs dans les plantes entières

3.2.2.1 - Absorption par les ébauches de racines adventives en attente sur la tige.

Dans une première série d'expériences, grâce au dispositif expérimental décrit précédemment (cf. Chap. III), une solution de chlorure de rubidium marquée par du ^{86}Rb (activité initiale : 0,037 MBq) est appliquée au niveau des mamelons caulinaires de la tige des plantes entières pendant 24 heures. La fin de l'expérimentation est conduite selon les méthodes décrites par ailleurs (Jourdan, 1980 ; Gagnaire-Michard & Jourdan, 1978).

Les plantes sont découpées en 5 parties correspondant aux principales zones décrites plus haut. La portion de tige traitée avec la solution radioactive est éliminée pour une meilleure expression des résultats. Les mesures de la radioactivité dans les différents fragments de la plante sont rassemblées dans le tableau XII .

Tableau XII - Répartition du ^{86}Rb absorbé au niveau de la tige de *S. rostrata*.
(* Zones en contact avec la solution radioactive)

Différentes parties de la plante.	radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en % du total)	Poids sec (en mg)	Répartition (en c.p.m./mg de poids sec)
feuilles (1)	9022	27 ± 9	130 ± 60	69,40
Zones apicales (2)	6803	19,5 ± 7	100 ± 20	68,03
Zones médianes * (3)	14308	42,1 ± 11	140 ± 30	102,20
Zones basales (4)	2622	8 ± 1	160 ± 50	16,38
Zones racinaires (5)	1192	3,7 ± 2	230 ± 40	5,18

La radioactivité mesurée dans les différentes parties de la plante permet d'estimer la répartition du ^{86}Rb le long de la plante. La répartition est caractérisée par le rapport :

$$R = \frac{\text{Radioactivité en c.p.m.}}{\text{Poids sec (en mg)}}$$

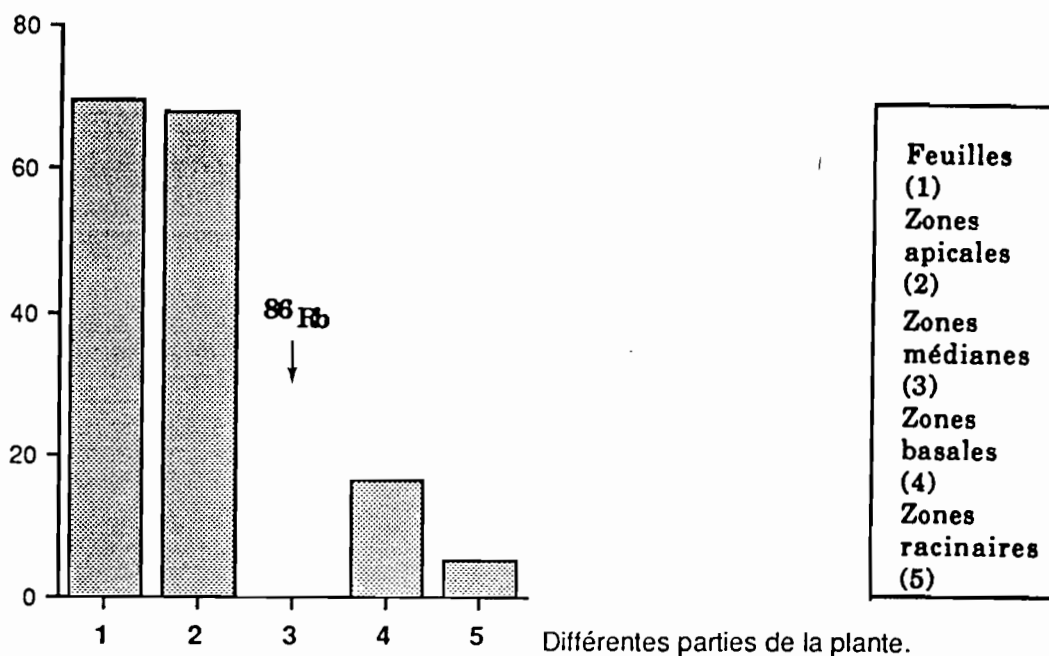


Fig. 40 - Migration du ^{86}Rb absorbé au niveau des E.R.A. de la tige.

Il apparaît très nettement que les ions ^{86}Rb sont absorbés au niveau de la tige (coefficient de répartition $R = 102,2$ c.p.m./mg de poids sec). Puisque les entre-noeuds de cette partie de la tige présentent de nombreux mamelons caulinaires parfaitement développés, on peut aisément conclure à l'intervention des racines adventives dans l'absorption du radio-élément.

Il apparaît également sur l'histogramme de la figure 40 que la migration du radio-isotope est presque exclusivement acropète. Ces résultats montrent que chez *S. rostrata* comme chez de nombreuses autres plantes, le ^{86}Rb s'accumule généralement dans les zones de grande activité métabolique (méristèmes apicaux de la tige et jeunes feuilles).

3.2.2.2 - Absorption par les racines séminales seules.

Des plantes entières âgées de 5 à 6 semaines, hautes d'environ 40 cm, sont placées dans le milieu nutritif et maintenues par un support vertical de manière à ce que seule la base des tiges et les racines séminales plongent dans la solution nutritive dans laquelle nous avons ajouté 20 ml d'une solution minérale marquée par du chlorure de ^{86}RB ou de ^{134}Cs (activité initiale dans les deux cas : 0,074 MBq).

Il apparaît une nette migration des isotopes et surtout du ^{134}Cs à partir des zones traitées vers les parties apicales de la plante (Figs 41 et 42).

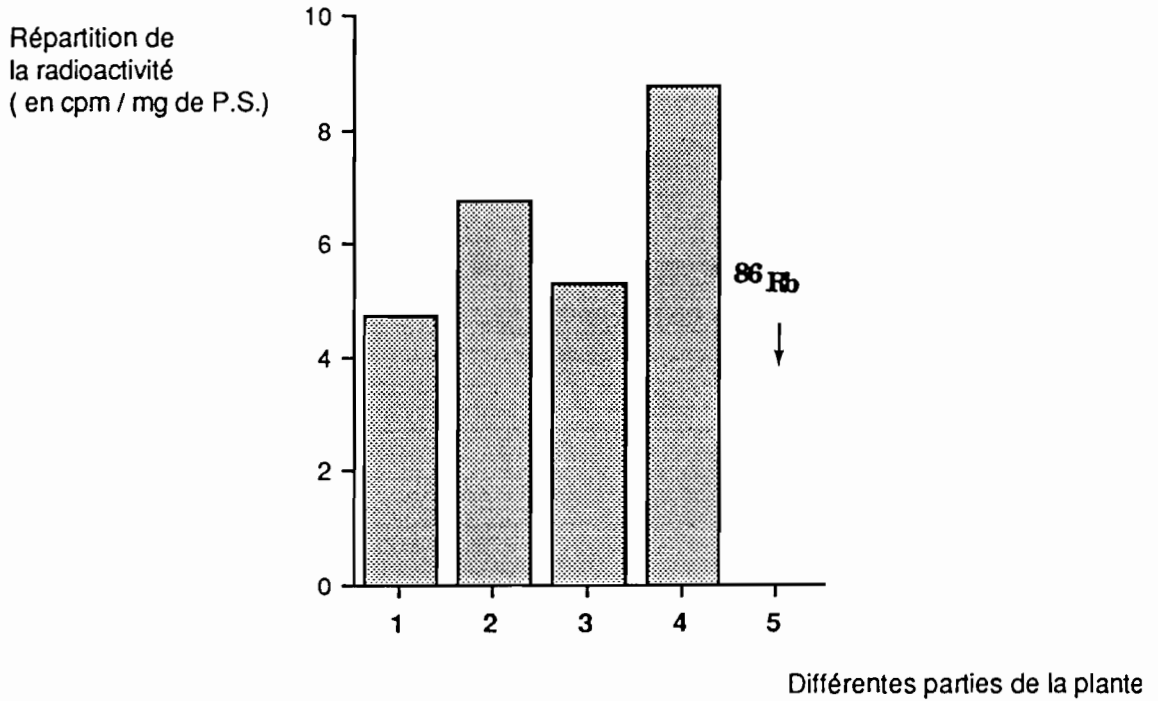


Fig. 41 - Répartition du ^{86}Rb absorbé au niveau des R.S.

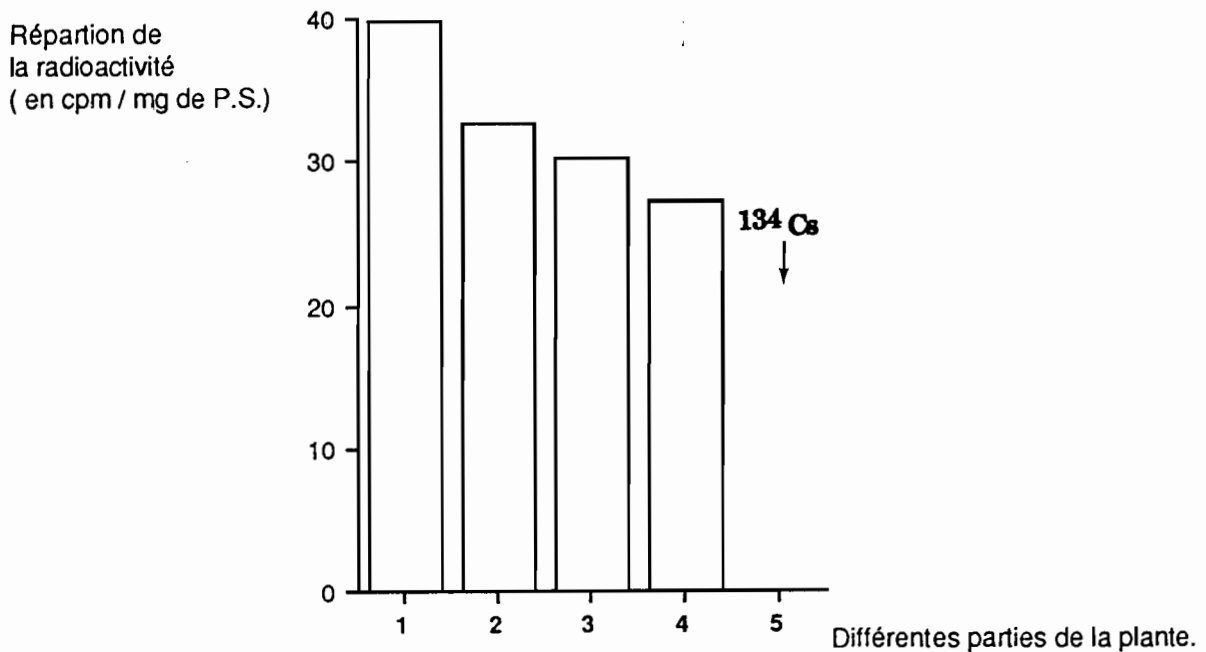


Fig. 42 - Migration du ^{134}Cs absorbé au niveau des R.S.

Tableau XIII - Répartition du ^{86}Rb absorbé par les racines séminales au bout de 24 heures de traitement. (* Zone en contact avec la solution radioactive).

Différentes parties de la plante.	radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en du total %)	Poids sec (en mg)	Répartition (en c.p.m. / mg de poids sec)
feuilles (1)	906	$22,7 \pm 5$	190 ± 30	4,76
Zones apicales (2)	335	9 ± 3	50 ± 10	6,76
Zones médianes (3)	373	$9,2 \pm 1$	70 ± 20	5,32
Zones basales (4)	789	19 ± 4	90 ± 30	8,76
Zones racinaires* (5)	1618	$39,8 \pm 5$	90 ± 30	17,97

Tableau XIV - Répartition du ^{134}Cs absorbé par les racines séminales au bout de 24 heures de traitement. (* Zone en contact avec la solution radioactive).

Différentes parties de la plante.	radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en du total %)	Poids sec (en mg)	Répartition (en c.p.m. / mg de poids sec)
feuilles (1)	4772	$11,2 \pm 2$	120 ± 30	39,76
Zones apicales (2)	1960	$4,6 \pm 2$	60 ± 10	32,66
Zones médianes (3)	3623	$8,5 \pm 4$	120 ± 30	30,19
Zones basales (4)	6816	16 ± 5	250 ± 50	27,26
Zones racinaires* (5)	25353	$59,5 \pm 5$	170 ± 30	149,14

Les racines ayant été soigneusement rincées par des bains successifs dans une eau pure non radioactive, la radioactivité notée correspond donc à la quantité de radioéléments effectivement absorbés et fixés et non à la présence de ^{86}Rb ou de ^{134}Cs adsorbés sur les surfaces des organes végétaux traités.

3.2.2.3 - Absorption simultanée par les deux systèmes racinaires du *S. rostrata* : Expérience de double marquage isotopique.

- Ebauches de racines adventives de la tige en attente.

Dans cette série, c'est-à-dire, lors des expériences de "double marquage isotopique" les traceurs radioactifs sont apportés en même temps ; le ^{86}Rb au niveau de la tige et le ^{134}Cs au niveau des racines séminales (radioactivité initiale dans les deux cas : 0,074 MBq). Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau XV.

Tableau XV- Répartition simultanée du ^{86}Rb (à partir de la zone médiane de la tige) et du ^{134}Cs (à partir des racines séminales) dans des plantes entières de *S. rostrata* en 24 heures (Zones en contact avec la solution radioactive).

	Différentes parties de la plante	Radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en % du total)	Poids sec (en mg)	Répartition de la radioactivité (en c.p.m./ mg de poids sec)
^{86}Rb	Feuilles (1)	2772	16,7 ± 11	170 ± 60	16,30
	Zones apicales (2)	1562	9,8 ± 7	70 ± 10	22,31
	Zones médianes * (3)	3517	19 ± 12	100 ± 10	35,17
	Zones basales (4)	2050	12,5 ± 6	160 ± 30	12,81
	Zones racinaires (5)	6973	42 ± 15	200 ± 30	34,86
^{134}Cs	Feuilles (1)	6835	14,5 ± 8	170 ± 60	40,20
	Zones apicales (2)	4304	9 ± 6	70 ± 10	61,48
	Zones médianes (3)	6828	14,5 ± 12	100 ± 10	68,28
	Zones basales (4)	5866	21,8 ± 5	160 ± 30	36,66
	Zones racinaires* (5)	22290	49,1 ± 13	200 ± 30	111,45

La répartition de la radioactivité à partir de la tige montre que les racines advent-ives présentes sur la tige sont capables d'absorber même en présence des racines séminales .

La migration du ^{134}Cs reste très nettement acropète, par contre, la migration du ^{86}Rb absorbé au niveau de la tige se répartit d'avantage dans les racines (42%) que dans l'extrémité apicale (16,7 %), cela s'expliquerait peut-être par la présence de racines en croissance (Figs 43 et 44).

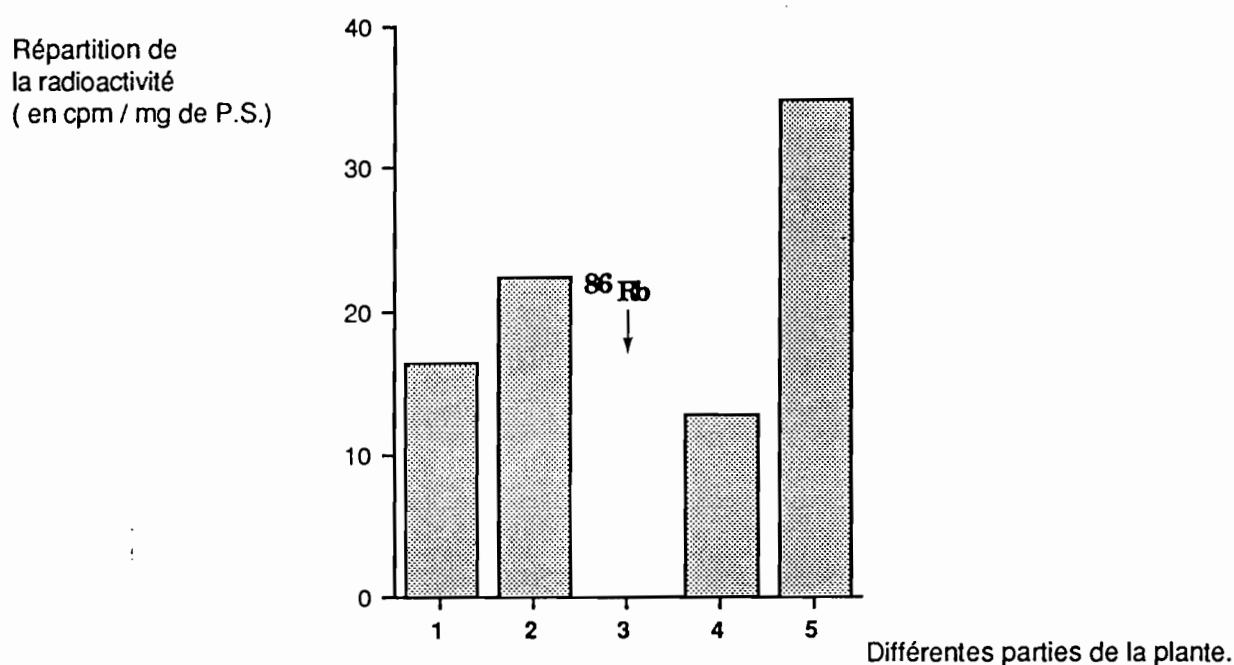


Fig. 43 - Migration du ^{86}Rb absorbé au niveau des E.R.A. dans le cas de double marquage .

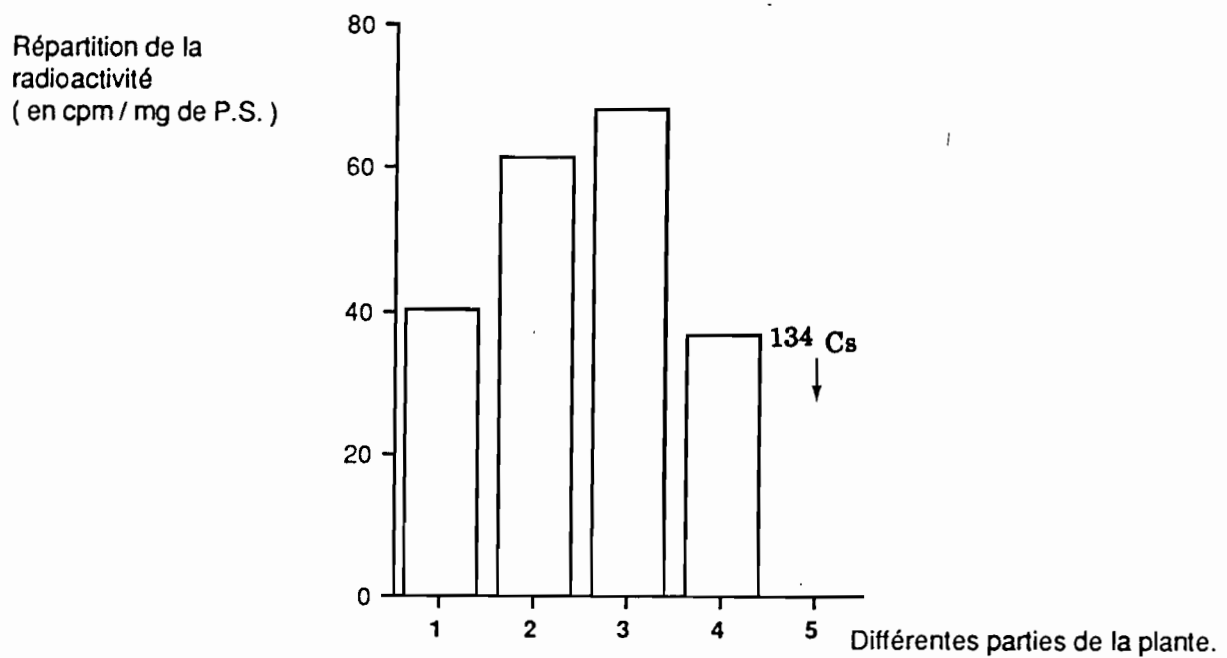


Fig 44 - Migration du ¹³⁴Cs abs. au niveau des R.S. dans le cas de double marquage.

Ces résultats indiquent un fonctionnement concomitant des ébauches de racines adventives et des racines séminales de *S. rostrata*, avant même l'élongation de ces ébauches de racines de la tige.

Tableau XVI - Répartition du ⁸⁶Rb absorbé par les racines séminales et les racines adventives de la base des tiges. (* Zone en contact avec la solution radioactive)

Différentes parties de la plante.	radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en du total %)	Poids sec (en mg)	Répartition (en c.p.m. / mg de poids sec)
feuilles (1)	2242	28,8 ± 2	260 ± 50	8,62
Zones apicales (2)	679	8,9 ± 3	70 ± 10	9,70
Zones médianes (3)	595	7,7 ± 2	120 ± 30	4,95
Zones basales (4)	1770	22,5 ± 6	220 ± 50	8,04
Zones racinaires* (5)	2469	31,4 ± 5	200 ± 40	12,34

- Racines adventives à la base bien développées.

Les plantes ont d'abord séjourné pendant quatre jours dans une solution nutritive non radioactive. Pendant le séjour dans la solution nutritive, l'état de latence des ébauches racinaires a été levé et elles se sont développées en racines adventives typiques de 6 à 8 cm de longueur. Ces plantes sont ensuite transférées dans un milieu nutritif contenant les mêmes éléments que précédemment, mais contenant aussi du chlorure de ^{86}RB ou de ^{134}Cs pendant 24 heures.

Tableau XVII - Répartition du ^{134}Cs absorbé par les racines séminales et les racines adventives de la base des tiges. (* zone en contact avec la solution radioactive)

Différentes parties de la plante.	radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en du total %)	Poids sec (en mg)	Répartition (en c.p.m. / mg de poids sec)
feuilles (1)	7968	18,5 ± 6	14 0 ± 30	56,91
Zones apicales (2)	2310	4,2 ± 1	60 ± 10	38,50
Zones médianes (3)	3960	7,2 ± 3	210 ± 40	18,85
Zones basales (4)	9462	17,2 ± 5	360 ± 60	26,28
Zones racinaires* (5)	19423	53 ± 9	24 0 ± 50	80,92

Les résultats présentés dans les tableaux XVI et XVII montrent que la migration vers les zones apicales est plus importante ici que lors du traitement sur des ébauches de racines non réactivées (Fig. 45 et 46). Ainsi la radioactivité apportée au niveau de ces racines a bien pénétré et s'est répartie dans les différentes parties aériennes de la plante non traitées. Ces racines adventives développées sur la tige interviennent donc effectivement dans l'absorption minérale de la plante en même temps que les racines séminales.

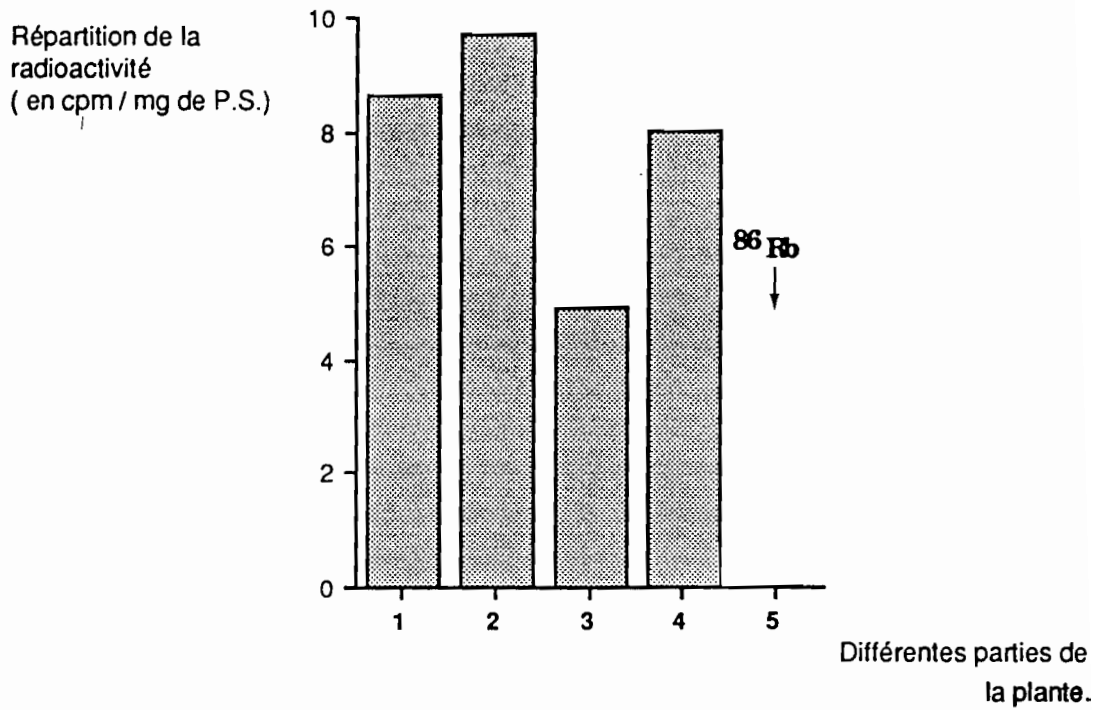


Fig. 45 - Migration du ^{86}Rb absorbé au niveau des R. A. et R.S. de la base de la tige.

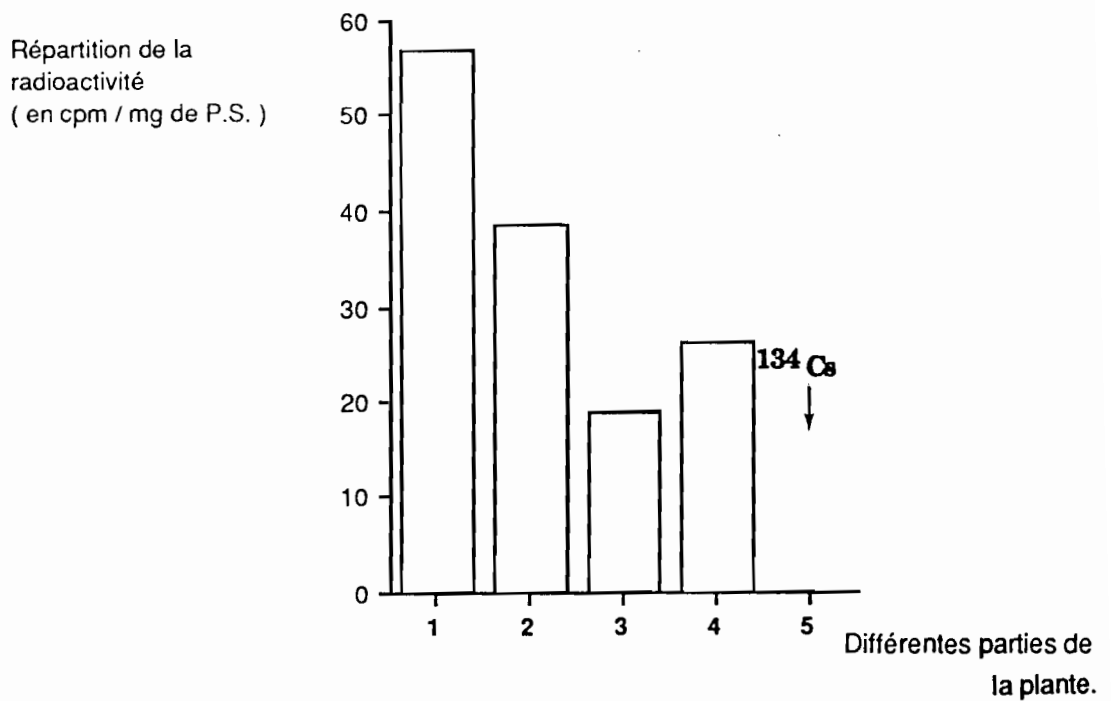


Fig. 46 - Migration du ^{134}Cs abs. au niv. des R.A. et des R.S. de la base de la tige.

3.2.2.4 - Absorption par les racines adventives développées à la base des tiges privées de racines séminales

Dans cette dernière série d'expériences, les plantes sont sectionnées au niveau du collet. Elles sont placées dans une solution nutritive simple de Hoagland pendant 4 jours, puis transférées dans un milieu radioactif (Traceurs utilisés : ^{86}Rb et ^{134}Cs) pendant 24 heures. Comme précédemment, les racines adventives de la base des tiges sont très nettement allongées ; il n'y a pas de racines séminales.

Tableau XVIII - Répartition du ^{86}Rb absorbé par les racines adventives de la base des tiges privées de racines séminales. (* zone en contact avec la solution radioactive)

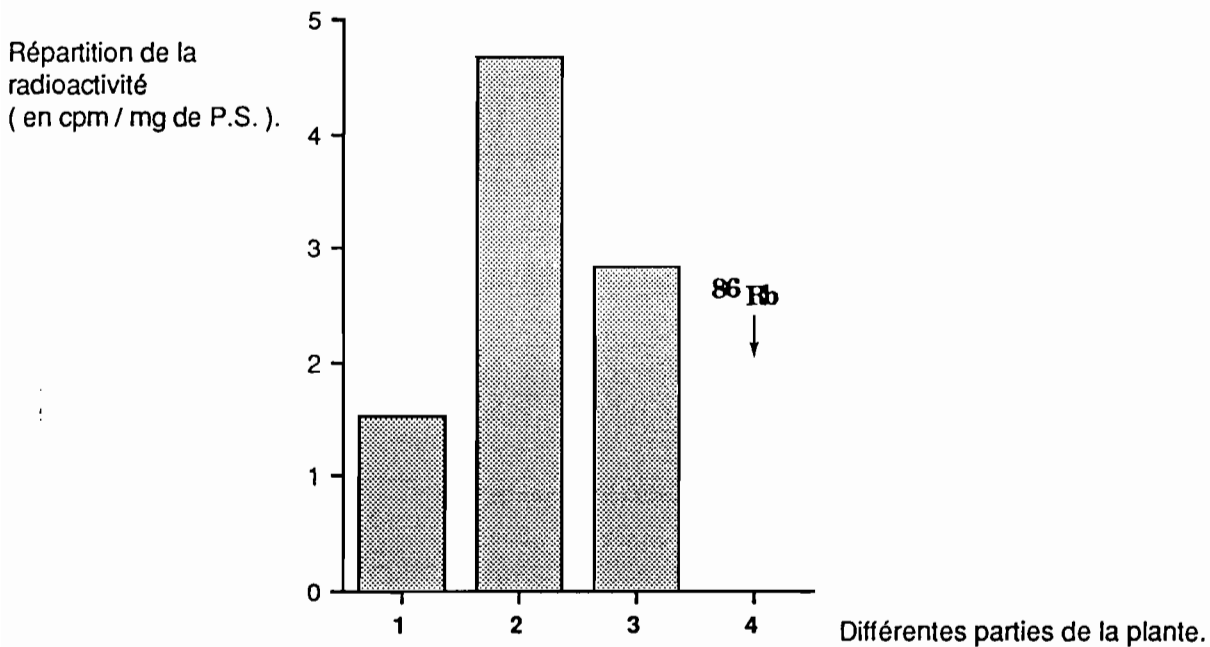
Différentes parties de la plante.	radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en du total %)	Poids sec (en mg)	Répartition (en c.p.m. / mg de poids sec)
feuilles (1)	430	18,9±3	280±60	1,53
Zones apicales (2)	280	12,1±5	60±10	4,66
Zones médianes (3)	256	11,1±4	90±30	2,84
Zones basales* (4)	1351	58,8±8	200±40	6,75

Tableau XIX - Répartition du ^{134}Cs absorbé par les racines adventives de la base des tiges privées de racines séminales. (* Zone en contact avec la solution radioactive)

Différentes parties de la plante.	radioactivité totale (en c.p.m.)	Répartition de la radioactivité (en du total %)	Poids sec (en mg)	Répartition (en c.p.m. / mg de poids sec)
feuilles (1)	2236	17,4±9	150±30	14,90
Zones apicales (2)	1041	8,1±2	40±10	26,02
Zones médianes (3)	2031	15,8±2	110±30	18,46
Zones basales* (4)	7533	58,6±10	170±30	44,31

L'observation des résultats des tableaux XVIII et XIX montre que les radioéléments absorbés par les racines adventives de la base de la tige migrent vers les jeunes feuilles et les zones apicales. Cette forte radioactivité détectée dans les zones non traitées, confirme les résultats selon lesquels, les racines adventives de la tige de *S. rostrata* sont capables d'absorber l'eau et les substances dissoutes.

Elles peuvent donc participer activement à la nutrition de la plante. Lorsqu'elles sont en attente leur rôle semble se limiter à un apport additionnel en eau et substances dissoutes lorsque les conditions externes le permettent (forte hygrométrie atmosphérique par exemple). Par contre, lorsqu'elles sont bien développées, elles interviennent de manière plus importante et peuvent même, lorsque les racines séminales sont sectionnées, suppléer à l'ablation des racines séminales (Fig. 47 et 48).



⁸⁶Rb
Fig. 47 - Migration du ⁸⁶Rb absorbé au niveau des R.A. de la base de la tige.

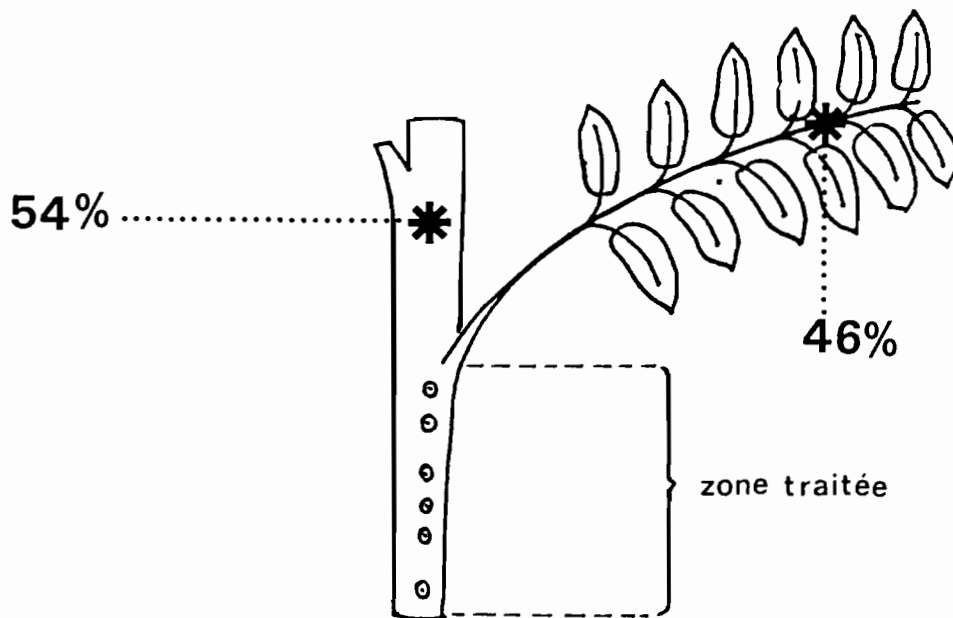


Fig. 49 - Répartition des ions ^{86}Rb au niveau de la bouture. Les ébauches racinaires sont en "attente".

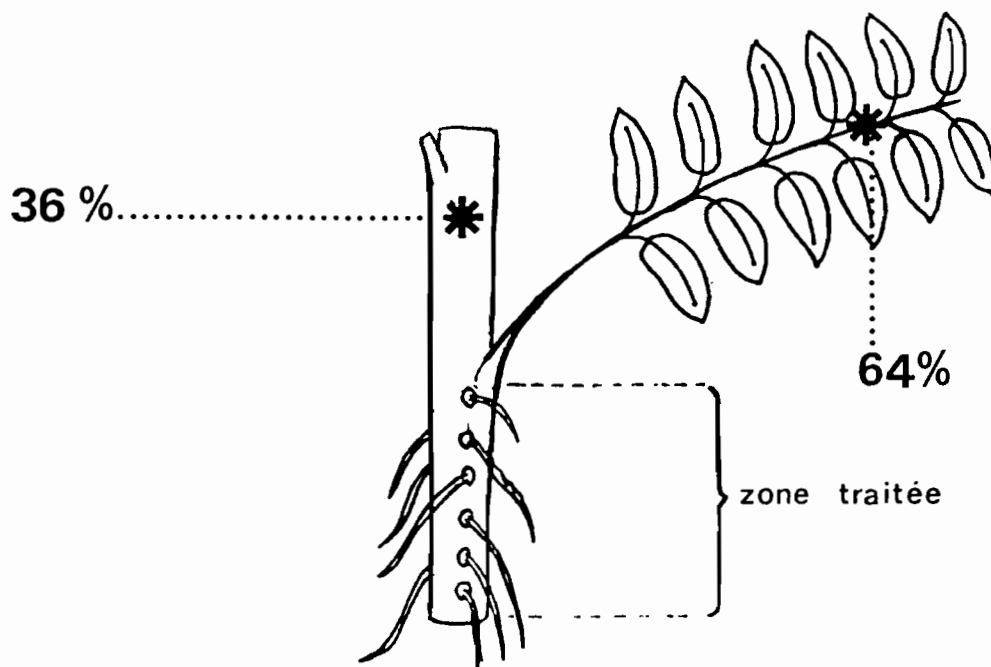


Fig. 50 - Répartition des ions ^{86}Rb au niveau de la bouture. Les racines adventives sont bien développées.

Tableau XX- Répartition de la radioactivité dans la bouture après apport de ^{86}Rb à la base des boutures binodales.

	Répartition de la radioactivité (en % du total dans la bouture)	Répartition de la radioactivité (en % de la radioactivité dans les parties non traitées)
Feuille	21,7 ± 7	46
Entre-noeud supérieur	24,5 ± 3	54
Entre-noeud inférieur	52,9 ± 7	////////

Ces valeurs rapportées sur la bouture (Fig. 49) montrent une répartition à peu près équivalente dans la feuille et dans la tige.

3.2.3.2 - Racines adventives de l'entre-noeud inférieur développées.

Des boutures binodales sont plongées dans un milieu nutritif contenant des sels minéraux stables (milieu de Hoagland), les racines adventives se développent alors rapidement. Lorsque les racines ont atteint 5 à 6 cm de longueur (4^{ème} jour de culture), les boutures sont transférées dans un milieu nutritif analogue dans lequel on a ajouté 10 ml d'une solution de rubidium contenant du ^{86}Rb (activité initiale 0,037 Mb). Les valeurs consignées dans le tableau XXIII suivant montrent une nette migration du ^{86}Rb à partir de la zone traitée.

Tableau XXI- Répartition de la radioactivité (^{86}Rb) apportée par le milieu de culture.

Traceur ^{86}Rb % Radioactivité	Répartition
Feuille	15 ± 9
Entre-noeud supérieur	64 %
Entre-noeud inférieur	10,7 ± 8
	36 %
	74,3 ± 8
	////////

Lorsque nous considérons les trois parties de la bouture ; feuille, entre-noeud supérieur et entre noeud inférieur, il apparaît une nette accumulation de la radioactivité dans l'entre-noeud inférieur. Cela s'explique par le développement intensif des racines adventives qui sont, comme cela a été démontré précédemment plus actives lorsqu'elles se

sont bien allongées. Par contre, après élimination de la partie contaminée, on peut constater une accumulation de la radioactivité au niveau de la feuille axillante (Fig. 50).

4 - Conclusion

Les différentes observations réalisées au cours de ce travail d'analyse de l'induction et de la croissance effective des ébauches racinaires montrent que le séjour dans l'eau modifie de manière significative l'état physiologique des cellules méristématiques concernées.

Le potentiel hydrique qui était plus faible dans les ébauches racinaires en état de latence, s'élève pour devenir égal au potentiel hydrique de la tige.

De même, la distribution de l'intensité de fluorescence des noyaux en cytofluorométrie montre qu'après un séjour de plus de 24 heures dans l'eau, les pointes de racines adventives présentent un pourcentage assez important de noyaux 4C. C'est-à-dire de noyaux qui se retrouvent à l'état cyclant. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par les comptages de l'index mitotique qui n'est plus nul, mais voisin de 17 %.

Ces observations attestent d'une reprise d'activité assez brutale, c'est-à-dire d'une sortie d'un état de blocage G₀-1, comme l'ont montré Cottignies & Jennane (1988), chez le frêne. Il serait intéressant pour la suite des investigations sur cet aspect de la physiologie des ébauches de racines adventives, de suivre de manière précise les modifications cytologiques et nucléaires qui accompagnent cette sortie de l'état de latence

Les expériences avec le ⁸⁶Rb et le ¹³⁴Cs ont permis de montrer que les racines adventives de la tige de *S. rostrata* jouent effectivement un rôle dans la nutrition minérale et hydrique de la plante (Spencer-Barreto *et al.*, 1989).

En effet, lorsque les tiges se trouvent immergées pendant un temps inférieur ou égal à 24 heures, les ébauches racinaires assurent une part non négligeable de l'absorption minérale. Par ailleurs, après un séjour de plus de 24 heures dans l'eau, les ébauches racinaires commencent à s'allonger pour donner des racines adventives typiques parfaitement fonctionnelles. Il serait intéressant à ce stade de l'analyse de comparer le

pourcentage de pénétration au travers de l'épiderme de la tige par rapport à la pénétration au niveau des mamelons caulinaires.

III - DISCUSSION.

L'examen des aspects histocytologiques au cours de la croissance des racines adventives de la tige de *S. rostrata* montre que chez cette plante la phase de rhizogenèse est totalement indépendante des conditions de milieu.

L'analyse des aspects corrélatifs essentiels pouvant intervenir dans la croissance de ces racines adventives conduit à des observations assez originales. Parmi les facteurs exogènes dont l'effet a été reconnu, l'eau et la lumière semblent jouer un rôle essentiel. L'eau intervient probablement en permettant la réhydratation des cellules jusque là en état de latence des ébauches racinaires, et la réactivation des réactions métaboliques. La lumière, qui intervient essentiellement par l'intermédiaire des feuilles, agit probablement en favorisant la photosynthèse.

L'évolution des ébauches en racines adventives typiques reste sous le contrôle de l'appareil photosynthétique des feuilles. En absence totale de feuilles sur la plante entière ou sur la bouture, les racines adventives ne se développent pas. De nombreux travaux ont, par ailleurs, montré que le rôle des feuilles est décisif dans la régulation de la croissance des racines adventives (Favre, 1977 a et b). Ces organes produiraient au cours de la photosynthèse les éléments responsables de la stimulation rhizogène (polysaccharides et hormones végétales), ceux-ci étant, par la suite mis en réserve dans les bourgeons, les cotylédons ou les feuilles.

S. rostrata se comporte de façon analogue à de nombreuses autres plantes ligneuses, l'âge et la position des boutures, c'est à dire l'état physiologique de la bouture au moment du prélèvement, jouent un rôle important dans l'induction et la croissance des racines adventives (Martin & Quillet, 1974 ; Francllet, 1979). Dans le cas précis de *S. rostrata*, il s'agit seulement de l'expression de la croissance de racines qui sont préformées sur la tige et non de leur induction comme chez les arbres.

Les boutures de la zone médiane de la tige de *S. rostrata* s'enracinent le mieux. Cette réponse semble étroitement liée à la répartition des réserves glucidiques dans la tige (Spencer-Barreto & Duhoux, 1987). Les réserves amyliacées sont, en effet, très inégalement

réparties tout au long de la tige. Dans la zone apicale de la tige, seul existe un étroit anneau périvasculaire, dans la partie basale les grains d'amidon sont significativement réduits, par contre, dans la zone médiane de la tige les rayons ligneux sont très riches en grains d'amidon.

Par ailleurs des études anatomiques des racines adventives de la zone médiane ont montré que les apex de racines y sont à leur optimum de développement (territoires racinaires bien différenciés avec cordon vasculaire fonctionnel reliant la jeune racine à la stèle de la tige).

La zone médiane de la tige est donc la mieux adaptée pour fournir des boutures vigoureuses et homogènes.

Les différents résultats relatifs à l'utilisation des traceurs radioactifs ^{86}Rb et ^{134}Cs , ont montré que non seulement les racines adventives une fois développées, sont parfaitement fonctionnelles, mais également que les ébauches de racines présentes dans les mamelons caulinaires de la tige de *Sesbania rostrata* peuvent intervenir, au moins partiellement dans l'absorption minérale.

Ainsi, la différenciation cellulaire très avancée, associée à la possibilité d'absorption minérale et à la rapidité relative de la reprise de l'activité métabolique et de la croissance montrent que les racines adventives ne sont pas "dormantes" comme les "Burr-knots" des cognassiers (Swingle, 1925) ou les "dormants rootlets" de *Pinus ponderosa* (Stone, 1957), ou les racines courtes dormantes des *Zygophyllaceae* (Ginzburg, 1967) ou encore d'*Abies procera* et *Pinus resinosa* (Wilcox, 1955 et 1968).

Ces ébauches de racines adventives sont plus exactement " en attente" sur la tige. L'activité métabolique et la division cellulaire sont effectivement arrêtées, comme l'ont montré les études en cytofluorométrie de flux et les observations en I.R.M., mais elles reprennent, assez rapidement après un séjour dans l'eau.

Cette "attente" constitue un phénomène biologique original décrit par Vartanian (1971 et 1972 a et b, 1981) chez la moutarde blanche : *Sinapis alba*. L'auteur a montré que chez cette plante, des racines adventives courtes sont mises en place à la base du pivot ou sur les racines secondaires, sous l'effet d'une contrainte hydrique . Ces racines courtes de *S. alba* sont parfaitement différenciées, seule l'élongation est momentanément suspendue. Elles constituent, toujours selon Vartanian (1971, 1981 et 1984) des points de survie qui confèrent à la plante des

possibilités d'absorption et de réhydratation rapide en présence d'eau ou d'une atmosphère très hygroscopique. Ces structures ont également été décrites chez une *Zygophyllaceae* : le *Tribulus cistoïdes* par Allen & Allen (1949). Selon ces auteurs, ces racines constituent une adaptation qui permet le développement rapide en condition d'humidité satisfaisante par l'établissement d'une surface absorbante plus importante.

Dans les cas de *Sesbania rostrata*, les ébauches de racines adventives de la tige ne sont pas directement induites par les facteurs de milieu, elles sont mises en place de manière spontanée et naturelle. Leur mise en place est probablement régie par des facteurs génétiques, comme nous l'avons dit plus haut. Ces racines présentent toutefois de nombreuses analogies avec les racines courtes de *S. alba* : taille réduite, absence de poils absorbants, possibilité d'élongation rapide en présence d'eau. Il faut noter cependant l'absence de certains caractères observés chez *S. alba*, comme la croissance radiale des cellules corticales et l'accumulation d'amidon (Vartanian, 1972 a).

L'étude du comportement de ces racines adventives dans des conditions d'hydratation variables reste encore à préciser. Nous pouvons cependant supposer que leur présence sur la tige expliquerait, au moins en partie, l'adaptation de *S. rostrata* à des biotopes sahéliens. En atmosphère sèche, elles restent en "attente" sur la tige et peuvent survivre longtemps sur la plante. En atmosphère très humide ou en présence d'eau, par exemple, lorsque la base des tiges se trouve immergée à la suite d'une remontée du niveau de l'eau, les racines adventives se développent rapidement et assurent ainsi à la plante une assimilation plus importante, favorisant ainsi sa croissance ou sa vitesse de croissance.

Ces observations sur les aspects corrélatifs de la croissance des ébauches de racines adventives présentes sur la tige de *S. rostrata* conduisent à des perspectives intéressantes en agronomie et en recherche fondamentale.

En effet, l'utilisation de cette plante comme engrais vert ne connaît pas la vulgarisation que l'on en attendait (Rinaudo *et al.*, 1983 ; Mulongoy, 1986). Cela est dû, semble-t-il, à un certain nombre de problèmes liés aux facteurs suivants :

- difficulté d'approvisionnement en graines,
- germination déficiente sans prétraitement de levée de dormance,
- période de culture trop longue par rapport à celle des cultures vivrières.

Ces problèmes avaient déjà été signalés par Becker *et al.* (1988) qui ont montré que le bouturage et le taillis de *S. rostrata* constituent une solution pour une utilisation efficace de la plante comme engrais vert. La multiplication végétative à partir des boutures mononodales est simple et efficace à 90 %. Elle pourrait être facilement développée en milieu paysan.

D'autre part, l'utilisation de ces boutures va permettre à l'expérimentateur soit d'exploiter la variabilité naturelle de la plante, en utilisant la plante entière, soit au contraire de standardiser au maximum ses plantes en n'utilisant que des boutures provenant de la zone médiane. La multiplication d'individus performants obtenus par sélection, par mutagenèse, ou encore par transformation génétique va permettre de contrôler les déviations génétiques et d'assurer la propagation d'individus d'élites.

**CHAPITRE V : EVOLUTION DES
EBAUCHES DE RACINES ADVENTIVES
DE LA TIGE DE
ROSTRATA EN BOURGEONS ; ETUDE
COMPARATIVE AVEC *A. AFRASPERA***

I -INTRODUCTION

Les fragments de tige de *Sesbania rostrata* cultivés *in vitro* sur le milieu de base Murashige & Skoog (1962) (Cf. Annexe), présentent une néoformation plus ou moins importante de bourgeons adventifs.

En effet, après trois semaines environ de culture, des bourgeons adventifs apparaissent sur la surface de l'explant et parfois sur la même génératrice que les mamelons caulinaires de la tige (Fig. 51).

Cette caulogenèse adventive à partir de fragments d'entre-noeuds cultivés sur un milieu sans régulateurs de croissance est encore peu connue. Des néoformations identiques ont été décrites chez le tabac (Skoog & Tsui, 1948), chez *Ailanthus altissima* et *Verbascum thapsus* (Caruso, 1971 et 1974), chez *Torenia fournieri* (Chlyah, 1973, et 1974 a et b ; Chlyah & Tran Tranh Van, 1971 et Chlyah *et al*, 1980) et chez plusieurs espèces de *Populus* (Douglas, 1984).

Des fragments d'entre-nœuds d'*Aeschynomene afraspera* cultivés dans les mêmes conditions donnent également naissance à des bourgeons adventifs (Fig. 52).

L'ensemble des observations effectuées sur des explants de ces deux espèces montre que si le plus souvent ces productions caulinaires sont incontestablement adventives car situées à plus ou moins grande distance des mamelons caulinaires, la néoformation de bourgeon est parfois située sur l'emplacement même de ces structures. Cette dernière observation pose alors le problème du rôle des méristèmes racinaires présents dans les mamelons caulinaires dans ces processus de néoformation de bourgeons.

Une étude des séquences morphologiques et histologiques de ces néoformations a donc été entreprise de manière à préciser les conditions expérimentales et les modalités de cette caulogenèse adventive.

II - RESULTATS

1 - Caulogénèse adventive chez *Sesbania rostrata*.

1.1 - Conditions expérimentales de la néoformation de bourgeons adventifs.

Des fragments d'entre-noeuds de longueurs variables sont prélevés sur de jeunes plants de *S. rostrata* âgés de 6 à 8 semaines et cultivés sur le milieu de base M.S. additionné de 20 g / l de saccharose et de 4 régulateurs de croissance (ANA, Kinétine, BAP et GA₃ à différentes concentrations). Différents facteurs endogènes et exogènes ont été étudiés en vue de préciser les conditions de néoformation de ces bourgeons.

1.1.1 - Influence de la taille et de la structure des explants.

1.1.1.1 - Fragments de tige de 2 cm de longueur.

Deux types d'explants ont été considérés dans ce cas, pour étudier l'influence de la présence ou de l'absence du bourgeon axillaire.

- Fragments d'entre-noeuds sans bourgeon axillaire.

Les explants d'entre-noeuds de 2 cm de longueur cultivés sur les milieux contenant des régulateurs de croissance : ANA, BAP, Kinétine ou BAP à des concentrations variant de 0 à 2 mg / l, ont toujours donné naissance à une importante prolifération anarchique de cellules. Le cal se forme le plus souvent à la section de l'explant en contact avec le milieu de culture, parfois aussi aux deux extrémités de l'explant. Ces explants finissent d'ailleurs, à plus ou moins brève échéance, par se nécroser et se dessécher.

Par contre, sur les explants cultivés sur le milieu de base sans régulateur de croissance, il se forme assez rapidement des bourgeons adventifs.

Ces résultats semblent indiquer que la morphogénèse adventive observée sur ces explants de tige de *S. rostrata* est régulée par un équilibre hormonal endogène et que l'addition de régulateurs de croissance fait basculer la balance hormonale dans le sens d'une callogénèse.

- Fragments d'entre-nœuds avec bourgeon axillaire.

Lorsque les fragments de tige de 2 cm de longueur présentent au moment de la mise en culture un bourgeon axillaire, celui-ci se développe assez rapidement alors en rameau feuillé et aucune néoformation de bourgeon n'est observée ultérieurement sur ces explants. Les ébauches de racines adventives se développent en racines typiques.

La présence du bourgeon axillaire semble exercer une influence inhibitrice de la néoformation de bourgeons adventifs.

1.1.1.2 - Petits fragments de tige de 0,5 x 0,8 x 0,5cm.

Tanimoto et Harada (1984) ont montré chez *Torenia fournieri* des corrélations très étroites entre la taille des explants mis en culture et leurs capacités morphogénétiques. Cette corrélation serait liée, selon ces auteurs, au fait que les explants de grande taille sont d'autant plus capables de synthétiser ou de stocker les cytokinines.

Les explants de petite taille qui contiennent peu ou pas de régulateurs endogènes à une teneur adéquate, seront donc plus sensibles à l'influence de facteurs exogènes. Nous avons alors choisi de mettre en culture des explants de petite taille (0,5 x 0,8 x 0,5 cm) cultivés sur des milieux enrichis en phytohormones.

Le tableau XXII, ci-dessous résume l'ensemble des résultats obtenus lors de la culture de petits explants en présence de différents régulateurs de croissance : ANA, kinétine, BAP et GA₃ à la même concentration de 1 mg/l (60 explants par expérimentation).

Tableau XXII - Influence de diverses phytohormones sur la morphogenèse de fragments de tige de *S. rostrata* de 0,5 x 0,8 x 0,5 cm.

Milieu	Pourcentage d'explants avec des B. A.	Intensité de la formation de racines en %	Intensité de la Formation de cals
M.S.	26 ± 0,02	13 ± 0,04	+
M.S. + ANA	-	91 ± 0,02	+++
M.S. + Kin.	56 ± 0,04	16 ± 0,01	++
M.S. + BAP	80 ± 0,01	13 ± 0,05	++
M.S. + GA ₃	8 ± 0,03	11 ± 0,07	+++

La figure 53 montre que la morphogenèse observée dans ce cas est fonction de la nature du régulateur utilisé. La kinétine et la BAP favorisent la néoformation de B.A. (Fig. 53 b), par contre la GA₃ favorise plutôt l'élongation des bourgeons formés (Fig. 53 c). L'ANA, est nettement plus favorable à la formation de cals, cals qui peuvent, par la suite donner naissance à des structures racinaires chlorophylliennes (Fig. 53 a).

1.1.2 - Influence de la position de l'explant sur la tige-mère sur la néoformation de bourgeons.

Des explants de 2 cm de longueur prélevés sur de jeunes plants de *S. rostrata* âgés de 6 semaines et portant 7 entre-noeuds en plus de l'hypocotyle, sont ensemencés en tenant compte de leur position sur la tige. Nous considérons comme entre-noeud N°1, celui dont la feuille en position apicale, vient juste de se détacher

Tableau XXII - Influence de la position de l'explant par rapport à l'apex sur les possibilités caulogènes (48 explants par expérimentation).

	Nb. de bourg. formés.	Pourcentage de bourgeonnement
1 ^{er} entre-noeud	0	0 ± 0,00 %
2 ^{ème} "	1	2 ± 0,04 %
3 ^{ème} "	9	19 ± 0,02 %
4 ^{ème} "	18	38 ± 0,04 %
5 ^{ème} "	33	68 ± 0,06 %
6 ^{ème} "	4	8 ± 0,04 %

Les deux entre-noeuds sous jacents à l'apex dont les tissus sont encore peu différenciés et qui ne présentent probablement pas d'ébauches racinaires (Cf. Chap. III) ne donnent pas de bourgeons adventifs (Tableau XXIII).

De même, les entre-noeuds les plus proches de la base de la tige qui sont très lignifiés et dont les apex de racines sont très fortement différenciés avec même un début d'élongation pour certains, ne donnent pas de bourgeons adventifs.

Il semble exister chez les tiges âgées une différenciation très poussée et irréversible des tissus ne permettant ni une néoformation de bourgeon, ni une reconversion des mamelons caulinaires. Par ailleurs, la culture *in vitro* de fragments de tiges prélevés sur des plantes âgées de

plus de 3 mois, n'aboutit pas dans les délais habituels (6 à 8 semaines) à la formation de bourgeons adventifs.

Par contre, les explants prélevés sur les 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} entrenœud donnent naissance à de nombreux bourgeons adventifs. Dans ces zones subapicale et médiane, il existerait une plus grande aptitude à la morphogenèse caulinaire adventive.

1.2 - Néoformation de bourgeons adventifs.

Les bourgeons adventifs néoformés apparaissent généralement vers le 15^{ème} jour de culture. Dès la deuxième semaine de culture, il apparaît de petites boursouflures au niveau de l'épiderme lisse des tiges. Des coupes histologiques effectuées dans les premiers jours de la caulogenèse adventive montrent un massif méristématique en position interne par rapport aux tissus corticaux de la tige (Fig. 54).

Les bourgeons adventifs néoformés de *S. rostrata* sont donc d'origine interne, tout comme chez *Nicotiana tabaccum* (Gupta *et al.*, 1966). Cette observation est à rapprocher de celle effectuée sur les cultures de fragments de cotylédons de *S. rostrata* réalisées par Mbodj (1992).

Les premières divisions cellulaires sont s'observées soit au niveau des cellules corticales proches du cambium entre deux faisceaux cribrovasculaires, soit au niveau du phloème et des tissus voisins.

La caulogenèse observée peut avoir lieu directement à partir des tissus de la tige ou être précédée de la formation d'un cal (Fig. 53 b).

1.3 - Reconversion du méristème racinaire en méristème caulinaire.

Les premières manifestations de la transformation des ébauches racinaires s'observent vers le 10^{ème} jour après la mise en culture. L'ébauche racinaire qui est normalement érigée, s'affaisse pendant que la base du mamelon caulinaire s'épaissit et présente une forme subcylindrique (Fig. 55).

Peu après une protubérance plus ou moins importante apparaît dans le mamelon en formant un angle avec l'axe de la racine (Fig. 56).

Une coupe histologique de mamelons caulinaires à ce stade de la culture montre une dislocation de la coiffe qui se desquame et se détache

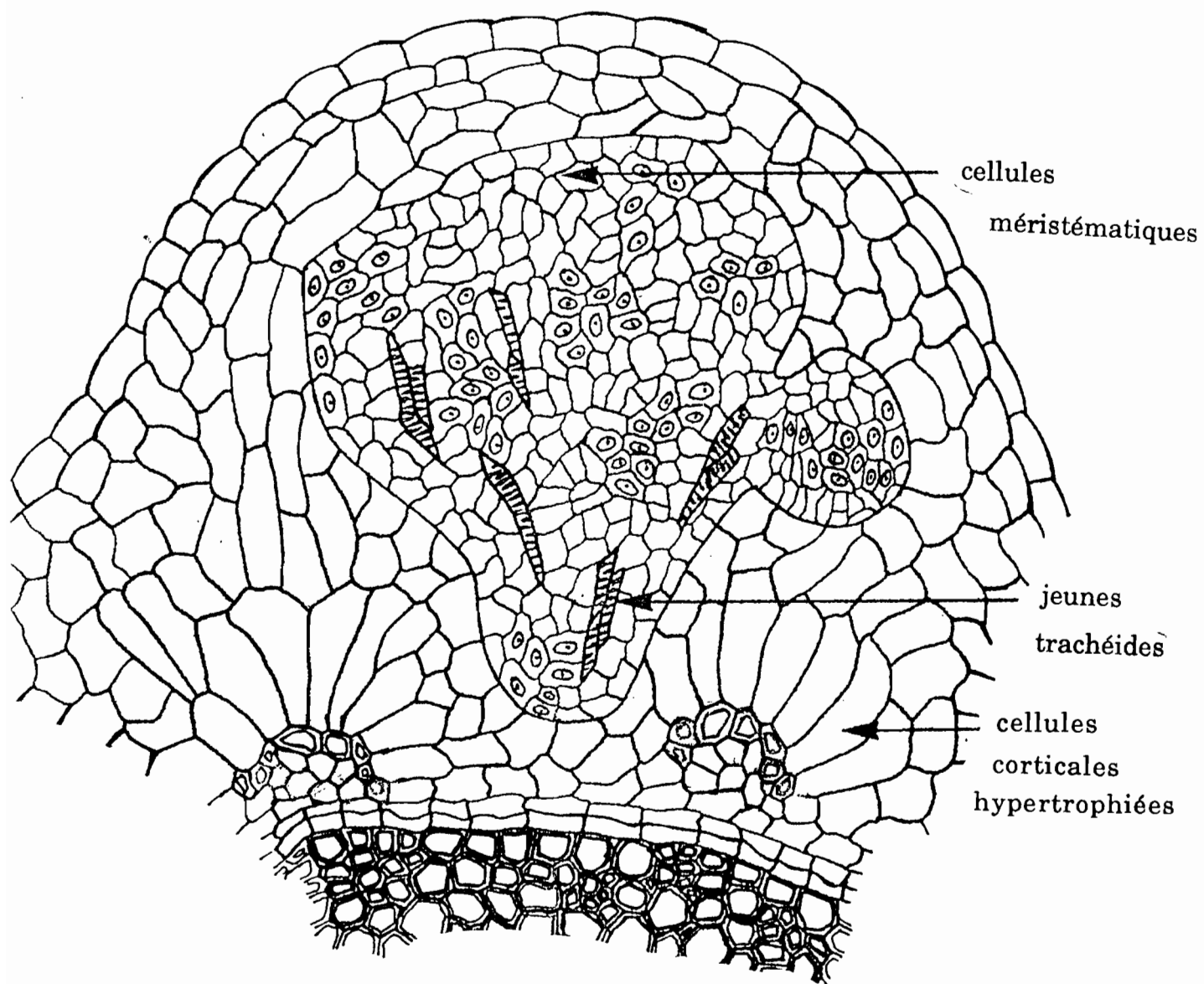


Fig. 54 - Massif méristématique en cours de formation dans les tissus corticaux de la tige de *S. rostrata*.

pratiquement de l'apex de racine (Fig. 57). Il apparaît donc que les tissus calyptraux (= assise génératrice de la coiffe) ne participent pas à l'édification de nouveau méristème végétatif. Sous ces cellules desquamées apparaît généralement une zone dense qui correspond probablement à l'accumulation de débris de parois cellulaires désagrégées ou lysées.

Le méristème racinaire a disparu de l'extrémité de l'ébauche, les cellules des tissus conducteurs semblent également se lyser (Fig. 53). Les cellules corticales quant-à-elles sont fortement hypertrophiées et allongées dans le sens du grand axe du mamelon caulinaire .

A ce stade de l'évolution, les coupes histologiques montrent le mise en place d'un nouveau méristème situé latéralement par rapport à l'axe des tissus conducteurs et en dessous de l'emplacement du méristème racinaire primitif (Fig. 59).

Sur une coupe axiale de ce méristème. Les premiers recloisonnements d'abord anarchiques semblent s'orienter perpendiculairement à la surface de manière à édifier un méristème caulinaire (Fig. 60). La disposition caractéristique des territoires racinaires ne s'observent plus, notamment la zone calyptrogène constituée de cellules méristématiques tétraédriques n'existe plus.

Le processus de différenciation se poursuit, les premières ébauches foliaires se mettent en place, de jeunes trachéides se forment au sein de ce nouveau méristème.

Le jeune bourgeon émerge généralement à la fin de la 2^{ème} semaine de culture (Fig. 61) et évolue en pousse feuillée (Fig. 62).

Dans les mamelons caulinaires des zones sub-apicale et médiane, il existerait au niveau des cellules de l'ébauche racinaire une certaine plasticité qui permettrait une reconversion de la morphogenèse dans la voie caulinaire. Ce comportement est à rapprocher des observations effectuées chez la fougère : *Nephrolepis bisserata* par Espagnac (1973) qui qualifie alors de "champs morphogénétiques pluripotentiels" les méristèmes interconvertibles décrits chez cette plante.

2 - Caulogénèse adventive chez *Aeschynomene afraspera*

Les bourgeons de *A. afraspera* apparaissent au niveau des mamelons caulinaires, mais contrairement à ce qui se passe chez *S. rostrata*, il n'apparaît pas un, mais plusieurs bourgeons qui évoluent rapidement en pousses feuillées (Fig. 63).

Une étude de l'évolution de ces bourgeons adventifs a été entreprise. Des observations macroscopiques et histologiques systématiques des explants de tige en culture *in vitro*, ont été régulièrement effectuées pour chercher à préciser l'ontogénèse de ces bourgeons adventifs.

- Aspects morphologiques et histologiques.

Les premières manifestations du bourgeonnement adventif s'observent dans la 2^{ème} semaine de culture d'explants de tige de 2 cm de longueur sur milieu minéral de base M.S. sans adjonction de régulateurs de croissance.

Tout d'abord la zone d'émergence de l'apex de racine dans le mamelon caulinaire semble s'affaisser, tandis que le renflement épidermique latéral qui l'accompagne et qui est habituellement discret augmente de volume (Fig. 64). Entre le 15^{ème} et le 18^{ème} jour de culture de cette zone renflée émergent les premières ébauches foliaires (Fig. 65). La morphogénèse se poursuit alors et les bourgeons neoformés se développent rapidement (Fig. 66 et 67), pour donner naissance à des pousses feuillées.

Une coupe histologique du mamelon caulinaire (Fig. 68) au moment du prélèvement montre que l'ébauche racinaire au moment de la mise en culture est bien structurée : les différents territoires racinaires sont parfaitement distincts. Le méristème racinaire est caractéristique, mais l'ensemble est encore recouvert par une couche de cellules épidermiques. Noter la présence de part et d'autre de l'ébauche de racine d'un dôme latéral, constitué de cellules sous-épidermiques et corticales d'assez grande taille.

Les figures 68 et 69 montrent que chez *A. afraspera* les tissus de l'apex de racine ne sont pas directement impliqués dans la néoformation des bourgeons adventifs. C'est au niveau du dôme épidermique latéral du mamelon caulinaire qu'ont lieu les divisions cellulaires conduisant à la formation des méristèmes caulinaires neoformés.

Au 15^{ème} jour de culture, une coupe histologique de l'explantat montre l'assise épidermique (a.e.), pratiquement non recloisonnée et l'assise sous épidermique (a.s.e.) qui a subi par endroits des recloisonnements obliques (Fig. 70). Ces divisions se poursuivent rapidement, il en résulte la formation de petites cellules isodiamétriques peu différenciées et de dimensions réduites (10 à 15 µm de diamètre). Ces recloisonnements aboutissent très vite à l'édification d'importants amas méristématiques (a.m. ; fig. 71).

Cette méristématisation s'accroît par la suite, les petites cellules isodiamétriques à cytoplasme dense et noyau volumineux s'organisent en méristèmes caulinaires. A la fin de la 2^{ème} ou au début de la 3^{ème} semaine de culture des bourgeons observables à l'oeil nu apparaissent au niveau du mamelon caulinaire (Fig. 72). La formation de plusieurs bourgeons adventifs en même temps s'expliquent par la mise en place simultanée de plusieurs zones méristémogènes (Fig. 73).

III - DISCUSSION

La formation de bourgeons adventifs est un phénomène assez connu actuellement. De nombreuses plantes des régions tropicales et tempérées peuvent former spontanément des bourgeons adventifs (Fink, 1982 ; Rao, 1966 et Rao & Mohan Ran, 1981). Ces bourgeons sont généralement induits à la suite de traumatismes (blessure, isolement de fragments d'organes végétatifs ou floraux).

Les techniques de culture *in vitro* et l'utilisation des régulateurs de croissance (Skoog & Miller, 1957) ont permis d'obtenir d'excellents résultats en caulogénèse adventive et cela sur de nombreuses espèces végétales (Kamada & Harada, 1979 ; Warmke & Warmke, 1950 ; Haissig, 1965 et Chlyah & Tran tranh Van, 1971).

Les bourgeons adventifs néoformés de *S. rostrata* et de *A. afraspera* sont très différents quant à leur origine histologique et à leur disposition par rapport à l'ébauche de racine adventive, cela laisse donc supposer que les mécanismes cytophysiologiques inhérents à cette néoformation sont différents dans les deux cas.

Chez *S. rostrata*, il est apparu un certain gradient des potentialités caulogènes depuis l'apex jusqu'à la zone médiane de la tige, les capacités

morphogénétiques des explants diminuant ensuite au delà du 7^{ème} entre-noeud. Des observations analogues ont été effectuées chez d'autres plantes, ce qui a conduit Thorpe (1980), après une étude exhaustive de la caulogenèse adventive, à conclure que le comportement organogène d'un explant est fonction de la conjugaison des facteurs endogènes existant au moment de la mise en culture. Un des facteurs liés à l'âge, mais aussi aux conditions nutritionnelles des entre-noeuds, étant la position de l'explant par rapport à l'apex .

D'autre part, la répartition des potentialités morphogénétiques semble liée au degré de différenciation des tissus de l'explant . Le nombre de bourgeons adventifs formés peut être directement corrélé avec le stade de développement des tisus de la tige au moment du prélèvement. Nous avons vu précédemment que le 3^{ème} entre-noeud constitue une zone charnière à partir de laquelle, les formations secondaires commencent à se mettre en place. De même, il a été démontré que la répartition des grains d'amidon, c'est-à-dire de la source énergétique tout au long de la tige semble privilégier ces deux zones (Spencer- Barreto & Duhoux, 1987).

La caulogenèse adventive sur milieu minéral de base sans régulateurs de croissance semble entièrement régulée par un équilibre endogène en phytohormones et en métabolites essentiels dont le rôle a été démontré chez *Nicotiana tabacum* L. par différents auteurs (Malcom *et al.*, 1973 et Patel & Thorpe, 1984). Caruso (1971) a, pour sa part, interprété la caulogenèse adventive observée chez *V. thapsus*, comme résultant des interactions de régulateurs de croissance provenant des tissus vasculaires de l'explant. La situation de certains des méristèmes caulinaires néoformés chez *S. rostrata* à proximité des tissus conducteurs semble en accord avec cette hypothèse. Le fait que les tissus de la base des tiges soient moins réactifs, pourrait ainsi s'expliquer d'une part, par la forte différenciation des cellules dans ces zones qui rend impossible toute dédifférenciation, d'autre part par le fait que ces zones basales sont généralement plus riches en auxines comme c'est le cas chez *Nicotiana tabacum* L. (Croes *et al.*, 1985) et donc moins favorables à une caulogenèse adventive.

Par ailleurs, l'absence de néoformation caulinaire en présence du bourgeon axillaire pourrait s'expliquer par le fait que ce bourgeon détourne les cytokinines et les métabolites en sa faveur (Douglas, 1984). Les bourgeons adventifs situés à une certaine distance du mamelon caulinaire prennent naissance soit d'une dédifférenciation des cellules corticales ou périvasculaires, soit d'une néoformation à partir de cals.

Il reste cependant que les bourgeons adventifs qui apparaissent au niveau même du méristème racinaire du mamelon caulinaire semblent bien provenir d'une reconversion du dit méristème racinaire.

Les nouveaux méristèmes caulinaires de *S. rostrata* ne se forment pas exactement en position apicale par rapport aux ébauches racinaires comme c'est le cas chez le Cresson (Ballade, 1968 et 1970), mais forment plutôt un angle avec le méristème préexistant comme chez *Ophioglossum petiolatum* (Peterson, 1970). Chez *S. rostrata*, cependant, le méristème racinaire ne poursuit pas son évolution normale, ces cellules apicales ; coiffe, cortex et même tissus conducteurs dégénèrent.

Le problème de la convertibilité d'un méristème racinaire en méristème caulinaire ou inversement a depuis longtemps suscité un grand intérêt en recherche fondamentale.

De véritables transformations sont relativement rares. Nous pouvons rappeler les cas de *Neottia nidus-avis* (Champagnat, 1971), de *Nasturtium officinale* (Ballade, 1970), de l'*Anthurium longifolium* (Goebel, 1978), et plus récemment de *Vanillia fragrans* (Refeno & Roux, 1984).

Les études histologiques de ces transformations sont souvent incomplètes et parcellaires. Rostowzew (1891) après une étude systématique de la formation de bourgeons adventifs au niveau des apex racinaires de *Asplenium esculentum* et diverses espèces de *Platyserium*, a montré que se sont des cellules tétaédriques appartenant à la zone calyptrogène qui cessent leur évolution dans la direction de la formation de la coiffe et voient ainsi leur destinée déviée dans le sens d'une caulogenèse adventive. Chez *Ophioglossum vulgatum*, le même auteur a montré que ce sont des cellules dérivées du méristèmes caulinaires qui évoluent en méristèmes caulinaires.

Dans les deux cas, toujours selon Rostowzew (1891), il existerait une transition nette entre la vascularisation type racine et la vascularisation type tige, comme celle qui existe au niveau de l'hypocotyle des plantes supérieures.

Peterson (1970) a réalisé des travaux analogues sur les formations caulinaires en position apicale, par rapport à l'apex racinaire de *Ophioglossum petiolatum*. Là aussi, il est apparu que ce sont des cellules dérivées du méristème racinaire qui, au lieu de continuer à se diviser normalement prennent une conformation différente (gros noyau et

nucléole important) pour donner naissance au méristème caulinaire. Le méristème racinaire qui ne semble pas affecté par cette néoformation, poursuit son évolution parallèlement à la formation du méristème caulinaire.

L'originalité du phénomène de reconversion chez *S. rostrata*, réside dans le fait que les supports histologiques du méristème racinaire semblent disparaître et sont remplacées par les cellules du méristème caulinaire. Cette structure constitue donc un modèle expérimental original pour l'étude des caractéristiques cellulaires et subcellulaires des méristèmes racinaires et caulinaires, mais aussi et surtout un outil de choix pour l'étude précise du phénomène de convertibilité ainsi mis en évidence.

Aeschynomene afraspera par contre, forme des bourgeons adventifs à partir des tissus périphériques. Mais dans ce cas, contrairement à ce qui se passe, par exemple, chez *Torenia fournieri* (Chlyah, 1974a) se sont des cellules sous épidermiques qui sont activées et impliquées dans les divisions donnant naissance aux méristèmes caulinaires, et non pas directement les cellules épidermiques.

Les potentialités morphogénétiques de *A. afraspera* se distinguent à la fois des résultats observés chez *S. rostrata*, où les bourgeons sont d'origine plus profonde et des observations de néoformations à partir de couches minces de cellules épidermiques (Chlyah, 1973, 1974a ; Chlyah & Tran Thanh Van, 1975 et Ha Ngoc & Tran Thanh Van, 1979), où les cellules activées sont des cellules épidermiques superficielles.

Pour les deux exemples présentés au cours de ce travail, il serait intéressant à ce stade des observations d'effectuer des analyses et des dosages des hormones et autres substances inductrices de la caulogénèse adventive et de préciser les interactions impliquées dans ces phénomènes.

**DISCUSSION ET CONCLUSION
GENERALES**

L'essentiel des résultats obtenus au cours de ce travail, porte sur la caractérisation de l'état cytophysiologique des méristèmes des ébauches racinaires, sur la croissance des racines adventives et sur la plasticité morphogénétique des tissus méristématiques racinaires de la tige de *S. rostrata*.

LA QUIESCENCE DES EBAUCHES DE RACINES ADVENTIVES DE LA TIGE DE *S. ROSTRATA*.

Les ébauches racinaires de la tige de *S. rostrata* sont originales pour plusieurs raisons.

- D'abord elles sont préformées et disposées régulièrement sur des génératrices verticales de la tige.

- Ensuite, arrivées à maturité elles sont proéminentes et percent l'épiderme de la tige, contrairement à ce qui existe chez les autres plantes à racines préformées, elles ne sont pas "latentes au sein des tissus qui leur ont donné naissance" (Favre, 1977 a et b).

- De plus, chez *S. rostrata*, les ébauches racinaires sont à un stade de différenciation très avancé et comprennent un méristème racinaire, un cortex, un cordon vasculaire et une coiffe, alors que les racines préformées décrites à ce jour sont réduites à des massifs méristématiques plus ou moins développés (Carlson, 1958 ; Haissig, 1970 et Favre, 1977).

- Et enfin, les cellules des méristèmes racinaires présentent toutes les caractéristiques de l'état d'arrêt de croissance : blocage des noyaux en phase G₀₋₁, hétérochromatine organisée en réseaux à maillages larges et regroupée en amas denses, petits nucléoles d'aspect compact et réduction de la teneur en eau libre dans les tissus. L'arrêt de l'évolution des noyaux des cellules méristématiques en phase G₁ du cycle cellulaire est actuellement considéré comme une caractéristique physiologique de l'état non cyclant des cellules (Cottignies, 1986). L'auteur a, en effet, mis en évidence à partir d'une étude sur les bourgeons dormants du frêne, l'existence d'une phase G₁ privilégiée correspondant à la période de vie ralentie liée au cycle saisonnier (Cottignies, 1981). Ce regroupement des noyaux en phase G₁ du cycle cellulaire a été décrit au niveau de divers organes :

- dans des cas de dormance embryonnaire, au niveau des graines sèches de Laitue, de Pin et de Gui (Brunori & d'Amato, 1967 ; Thomas, 1975 et Salle, 1976),

- dans des cas de résistance à la sécheresse au niveau du bulbe de *Isoetes setacea* (Michaux, 1972),

- et aussi dans des cas de vie ralentie hivernale au niveau des bourgeons tubérisés souterrains de *Phytolacca decandra* (Nougarède *et al.*, 1973 a et b).

Les ébauches racinaires de la tige de *S. rostrata* semblent constituer le premier exemple d'un regroupement en phase G₀-1, caractéristique d'un arrêt de croissance au niveau des noyaux de cellules méristématiques racinaires.

Nous avons pu également observer que chez *S. rostrata*, comme chez la plupart des plantes à ébauches racinaires préformées, la mise en place des ébauches de racines adventives est liée à la croissance de la plante et ne nécessite pas de traumatisme préalable. Cette mise en place des primordium racinaires reste toutefois fonction de la présence d'auxine dans les tissus (Haissig, 1970, 1972 & 1974). La localisation des primordium racinaires au voisinage des formations secondaires, notamment du xylème, s'expliquerait, en effet, par la présence d'auxine transportée ou même synthétisée par ces tissus immatures (Scheldrake, 1971). Cela suppose donc, chez *S. rostrata* que les cellules initiales sont "activées" lors de la mise en place de ces formations secondaires par un apport d'auxine optimal dans la zone "prédisposée" des traces foliaires, mais que par la suite, l'élongation ultérieure est bloquée du fait d'un taux d'auxine inférieur au seuil optimal de la croissance racinaire.

CROISSANCE DES RACINES ADVENTIVES DE LA TIGE DE *SESBANIA ROSTRATA*.

Cet état de quiescence inhabituel chez les racines adventives conduit à des propriétés biologiques intéressantes en rapport, notamment, avec la croissance et la nodulation caulinaires.

* D'abord, la présence, le long de la tige, de ces structures "en attente" mais fonctionnelles favorise le développement rapide de la plante, dès que le niveau de l'eau dans les mares ou marigots pendant les pluies permet l'inondation des tiges. Le développement rapide des racines adventives permet une croissance accélérée de la partie aérienne (hauteur et biomasse), après une période 'd'attente' dans des conditions d'hygrométrie faible, comme dans le cas du trèfle rouge : *Trifolium pratense* L., après le repos hivernal (Montpetit & Coulman, 1991).

Le contrôle de l'entrée en croissance des ébauches racinaires de *S. rostrata* semble être exclusivement le fait des feuilles et de l'activité photosynthétique qui en résulte. Cette régulation se fait probablement par

l'intermédiaire des substances glucidiques, dont la répartition dans la tige est assez caractéristique (Spencer-Barreto & Duhoux, 1987), d'autres substances en provenance des feuilles doivent également intervenir ; régulateurs de croissance, substances oligodynamiques comme l'ont suggéré Bastin, 1966 et Batten & Goodwin, 1978, chez d'autres plantes.

Nous avons, également pu constater, grâce à l'utilisation des isotopes radioactifs ^{86}Rb et ^{134}Cs , que ces racines interviennent activement dans la nutrition minérale de la plante, permettant ainsi la survie des populations de *Sesbania* plusieurs semaines encore après la fin de la saison des pluies. La présence de ces ébauches racinaires en "attente" sur la tige trouve, en outre, une application pratique très intéressante dans la multiplication végétative de la plante par bouturage (Cissé *et al.*, 1992).

* Ensuite le fait que ces ébauches racinaires soient sensibles à l'infection par *Azorhizobium caulinodans* et puissent former des nodules aériens fixateurs d'azote est également de première importance. Non seulement cette nodulation caulinaire va décupler les potentialités fixatrices de la plante, mais elle lui confère en même temps la faculté de continuer à fixer l'azote même en cas d'inondation des racines séminales ou en présence de composés azotés dans le sol (Dreyfus & Dommergues, 1980). La disposition aérienne et la conformation particulière de ces sites de nodulation avec un dôme épidermique percé en son centre par une ébauche racinaire, facilite le "piégeage" des bactéries transportées par les insectes et favorise une nodulation naturelle efficace. Dans le même ordre d'idées, cette situation aérienne met à la disposition de l'expérimentateur un modèle très accessible pour une nodulation contrôlée et efficace, dans la perspective d'une valorisation de la fixation d'azote chez cette plante.

Du point de vue agronomique, en effet, l'amélioration de la fixation symbiotique de l'azote apparaît actuellement comme une priorité pour la mise en valeur de l'agriculture tropicale agressée par les conditions défavorables du milieu et la systématisation de mauvaises pratiques culturales. Ce résultat ne sera cependant atteint que lorsque l'on connaîtra parfaitement la physiologie et les principales caractéristiques génétiques des deux symbiotes.

En ce qui concerne la bactérie de nombreux résultats ont été obtenus qui ont conduit à la caractérisation de *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus *et al.*, 1988). De nombreux aspects de la physiologie des nodules, plus précisément du métabolisme des deux symbiotes ont pu être étudiés. *S. rostrata* se singularise parmi les légumineuses en conservant ses

capacités de fixation de l'azote même lorsqu'il croît sur un milieu contenant de l'azote combiné (Dreyfus et Dommergues, 1981 et Dreyfus *et al* 1984). De même, selon Davis, (1984) et Saint Macary *et al* (1985) la fixation d'azote des nodules caulinaires de *S. rostrata* n'est pas affectée par l'inondation.

FIG. 7 - Plasticité morphogénétique d'une ébauche racinaire de la tige de *Sesbania rostrata*.

D.E. : dôme épidermique

M.R. : méristème racinaire

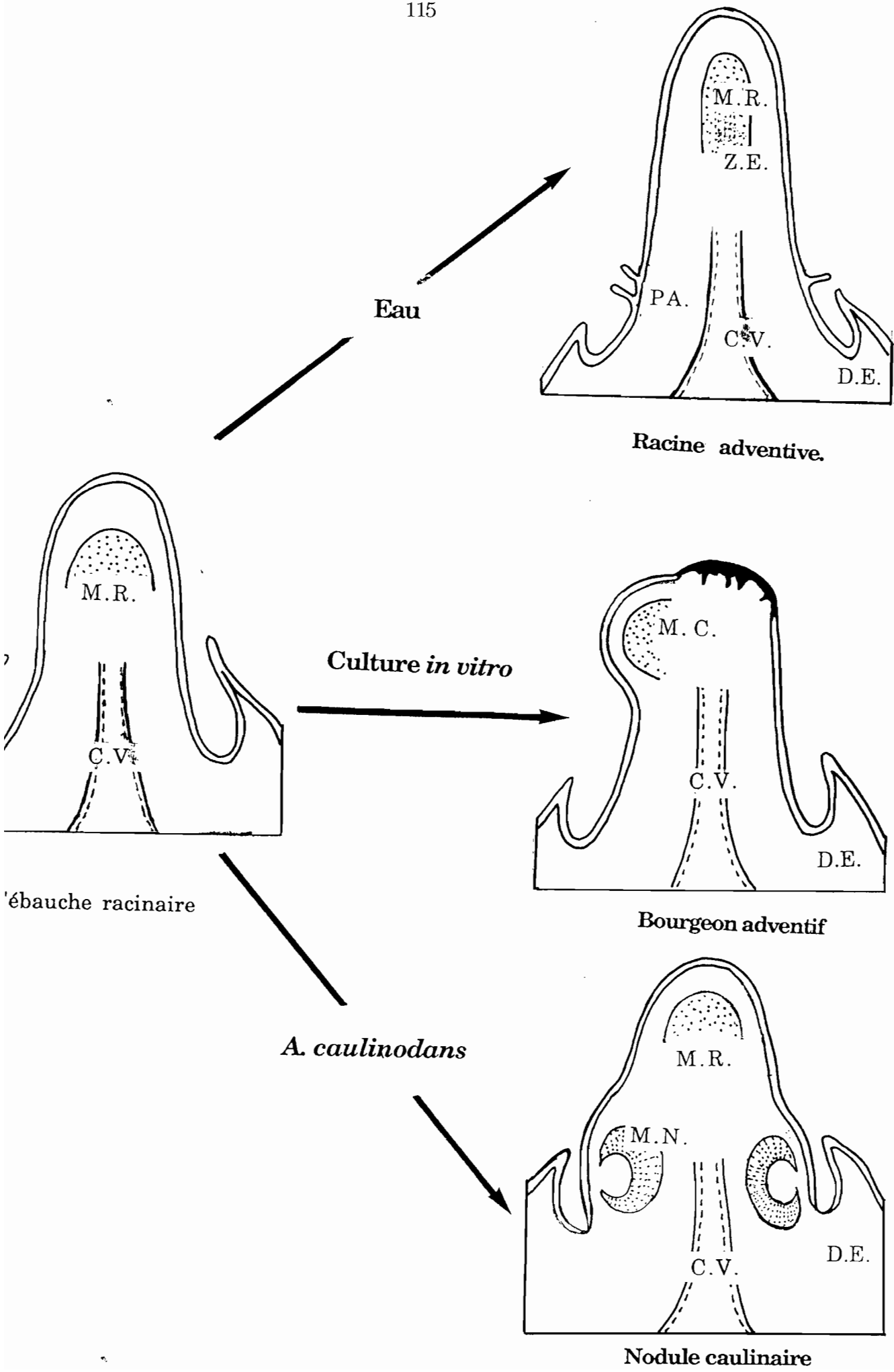
Z.E. : zone d'élongation

P.A. : poils absorbants

C.V. : cordon vasculaire

M.N. : méristème nodulaire.

M.C. : méristème caulinaire



PLASTICITE MORPHOGENETIQUE DES EBAUCHES RACINAIRES DE LA TIGE DE *S. ROSTRATA*.

Au cours de ce travail nous, également pu montrer que les ébauches racinaires des la tige de *S. rostrata* peuvent connaître trois destinées différentes selon les conditions de milieu (Fig. 74).

1° - En présence d'eau, elles se développent en racines adventives typiques ; la zone d'élongation et les poils absorbants se développent.

2° - En présence de l'*Azorhizobium caulinodans* les ébauches racinaires donnent naissance à des nodules . Lorsque cette infection a lieu à l'air libre le méristème racinaire reste latent et coexiste avec le méristème nodulaire qui se développe. Par contre, lorsque l'infection a lieu dans l'eau les deux méristèmes fonctionnent en même temps.

3° - En culture *in vitro*, sur un milieu minéral de base sans adjonction de régulateurs de croissance, certaines ébauches racinaires peuvent donner naissance à des bourgeons adventifs (Spencer-Barreto M.M., 1987).

Les tissus des ébauches racinaires semblent ainsi pouvoir donner naissance à deux types de méristèmes surnuméraires différents :

- un méristème nodulaire dans la zone basale en présence de l'*A. caulinodans*,
- un méristème caulinaire dans la zone apicale au voisinage direct du méristème racinaire en culture *in vitro*.

En ce qui concerne la première évolution, Duhoux (1984) a montré que le méristème nodulaire est initié à la base de l'ébauche de racine adventive, alors que les bactéries sont répandues dans la totalité de l'ébauche. La présence des bactéries dans les poches bactériennes semble induire l'activation des cellules corticales internes qui se divisent pour donner de petits îlots méristématiques. Cette zone basale correspond théoriquement à la zone d'élongation racinaire et d'initiation des poils absorbants (Duhoux & Alazard, 1983). Rovira (1973) a montré que cette zone d'élongation est le site majeur de sécrétion d'exudats racinaires. Denarié & Truchet (1979) ont, de leur côté, constaté que la morphogénèse du nodule résulte de la stimulation réalisé à distance par les bactéries.

Il n'y a actuellement aucune preuve d'un éventuel transfert d'ADN entre l'*A. caulinodans* et la plante hôte au cours de l'établissement de la nodulation (Holsters *et al.*, 1985 et De Bruijn, 1988). Il semble plutôt y avoir

des échanges de signaux qui induiraient, à la fois la différenciation des cellules végétales et l'expression des gènes symbiotiques des deux partenaires. L'étude moléculaire des phénomènes inhérent à cette symbiose aérienne permettra, par exemple, de mieux comprendre les mécanismes de la régulation des gènes de la plante-hôte vis-à-vis de la bactérie.

La deuxième évolution aboutissant à la mise en place d'un méristème caulinaire pose le problème de la reconversion d'un méristème racinaire en méristème caulinaire ; phénomène déjà décrit chez *Ophioglossum petiolatum* (Peterson, 1970) et chez *Vanillia fragrans* (Refeno & Roux, 1984).

Une telle transformation, théoriquement possible selon les données de la morphologie comparée et de la paléontologie (Refeno & Roux, 1984) garde encore pour la recherche fondamentale bien des zones d'ombre.

Certes, l'existence chez certains végétaux du protocorme, cette structure compacte et ambiguë alliant des traits racinaires, comme la production de poils absorbants, à des caractéristiques imparfaitement caulinaires, suggère bien la possibilité d'une sorte de transition entre les structures caulinaires et racinaires. Mais les preuves histologiques d'une telle conversion sont plus rares.

Chez *S. rostrata* nous avons pu montrer histologiquement la mise en place de méristèmes caulinaires sur certaines ébauches racinaires. C'est le premier exemple de formation de bourgeon adventif sur un apex de racine conduisant à l'arrêt de fonctionnement du méristème racinaire. Chez *Nasturtium officinale* (Balade, 1970) et chez *Ophioglossum* (Rostowzew, 1891 et Peterson 1970), le méristème racinaire peut poursuivre son évolution normale pendant que s'initie le méristème caulinaire.

Cette structure constitue ainsi un modèle exclusif pour l'étude des facteurs physiologiques, biochimiques et génétiques intervenant dans l'expression des potentialités morphogénétiques d'un "méristémoïde" en méristème caulinaire ou racinaire.

CONCLUSION

Les observations faites au cours de ce travail montrent que les ébauches racinaires adventives de la tige de *S. rostrata* constituent un modèle privilégié pour l'étude des caractéristiques cytologiques et

physiologiques des méristèmes racinaires et caulinaires mais aussi et surtout un modèle exclusif pour l'étude de la reconversion d'un méristème racinaire en méristème caulinaire.

L'induction de la plasticité morphogénétique est peut-être liée à une variation de l'équilibre hormonal au sein même des cellules de l'ébauche de racine adventive.

L'analyse de ces trois formes de méristémogénèse adventive peut être envisagée à deux niveaux :

- au niveau cellulaire : localisation du ou des signaux cytologiques de chacun des méristèmes que l'on peut rencontrer dans les ébauches de racines adventives de la tige de *S. rostrata* ;

- au niveau moléculaire identification et étude des gènes assurant la mise en place de ces différents méristèmes.

De nombreuses questions restent, en effet, sans réponse.

- Quels sont les *stimuli* de la genèse de ces différents méristèmes ?
- Quelles sont les différentes phases des régulations hormonales de ces trois évolutions ?

Les réponses à toutes ces questions seront probablement apportées par la biologie moléculaire qui cherche à identifier et à isoler les gènes responsables d'abord de la mise en place des méristèmes racinaires adventifs, puis de rechercher les modalités de repression et d'activation des gènes responsables des deux autres formes de méristémogénèse.

Notre contribution dans la mise en évidence de certains aspects cytophysiologiques de ces ébauches racinaires et des corrélations régulant la mise en place et la croissance des racines adventives, avec la démonstration du rôle déterminant de ces racines dans la nutrition de la plante d'autre part, constituent un progrès intéressant dans la connaissance de ces ébauches racinaires "en attente" sur la tige.

Le regroupement des noyaux en phase G_0-1 au niveau de méristèmes racinaires pose ainsi le problème d'une probable réponse des racines aux situations de latence ou de dormance. Des travaux complémentaires sur l'étude de la synthèse de l'ADN nucléaire dans ces cellules, de même que la recherche d'éventuels marqueurs biochimiques des différentes évolutions cellulaires devraient apporter des arguments convaincants dans ce sens.

L'étude de la distribution de ^{86}Rb et de ^{134}Cs a, en effet, montré que ces radioisotopes sont absorbés de manière active par les racines

adventives de la tige de *S. rostrata*. Il est ainsi apparu que l'absorption est réalisée principalement par les racines séminales et secondairement par les ébauches de racines adventives " en attente" sur la tige. Lorsque ces ébauches se développent en racines typiques, l'absorption devient maximale à leur niveau, à tel point qu'en absence des racines séminales, elles peuvent assurer à la plante une croissance satisfaisante. On pourrait supposer, d'ailleurs, que comme chez *Rorippa nasturtium aquaticum* L. Hayek (Cumbus & Robinson, 1977), la participation relative des racines adventives et / ou des racines séminales dépend, en grande partie, de la richesse en nutriments de l'eau ou du sol dans lesquels se trouvent ces deux systèmes radicaux.

Nous n'avons cependant, pas pu préciser les voies de circulation de ces radioéléments dans la plante. Les techniques d'autohistoradiographie permettrait probablement de spécifier les tissus conducteurs assurant le transport du ^{86}RB et du ^{134}Cs dans la plante entière et dans la bouture.

Au stade actuel des recherches sur la fixation d'azote par le système *S. rostrata* / *A. caulinodans*, il s'agit essentiellement d'améliorer l'effectivité de la symbiose en intervenant, soit au niveau de la bactérie, par manipulations génétiques, en essayant, par exemple, de transférer à la souche sauvage des gènes de résistance à la sécheresse ou à la salinité, soit au niveau de la plante. Ce dernier aspect des investigations nous semble très important car il devrait permettre de préciser le rôle du végétal dans la stricte spécificité d'hôte caractéristique de ce système symbiotique. de même, il permettrait de mieux appréhender les relations privilégiées qui existent chez *S. rostrata* entre la fixation d'azote et la photosynthèse. C'est, en effet, le premier exemple de coexistence entre une activité nitrogénasique, normalement inhibée par l'oxygène, et l'activité photosynthétique.

Les manipulations ultérieures pourraient, par exemple, viser à accroître la production de biomasse, par exemple par hybridation ou transfert génétique avec des plantes qui ne possèdent pas de nodules caulinaires, mais qui présentant un intérêt économique certain, comme c'est le cas pour *S. grandiflora*, *S. sesban* (Allen & Allen, 1981) et *S. bispinosa* (Kapoor & Gupta, 1986). Elles pourraient également conforter sa résistance à certaines contraintes environnementales (Pariselle, 1988 ; Vernier & Godefroy, 1987 ; Thakur, 1991 et Ramani *et al.*, 1989).

ANNEXE

La cytofluorométrie.Tampon Tris

Eau distillée	250 ml
Tampon Tris (10 mM)	0,303 g
EDTA dissodique (10mM)	0,9 g
NaCl (100mM).....	1,5 g

Le pH est ajusté à 7,4 par NaOH à 1N. Le mélange est ensuite autoclavé à 120° pendant 20 min.

Fixateur :

Tampon Tris.....	50 ml
Formol à 37 %	5 ml

Techniques d'histologie.Composition du colorant à l'Hématoxyline de Regaud.

a) Mordant.

Eau.....	500 ml
Acide acétique.....	5 ml
H ₂ SO ₄ conc.....	0,6 ml
Sulfate d'ammonium ferrique.....	15 g

b) Colorant (Hématoxyline de Heidenhein à 2 % dans de l'alcool à 95 %)

Eau.....	10 gouttes
Haematoxyline stock.....	10 gouttes
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 gouttes
Na ₂ HPO ₄	8 gouttes

Déshydratation.

Les lames sont plongées successivement dans :

- de l'éthanol à 50 % (quelques secondes)
- de l'éthanol à 70 % (quelques secondes)
- de l'éthanol à 85 % (quelques secondes)
- de l'éthanol à 95 % (quelques secondes)
- de l'éthanol à 100 % (2 bains de quelques secondes)

Techniques de culture *in vitro*.

* Désinfection des explants

- Eau distillée.....5 min
- Eau distillée + agent mouillant
(Teepol à 1% ou SDS à 1 %) 30 min à 1H
- Eau distillée.....5 min
- Alcool à 70° quelques sec.
- Eau distillée5 min
- Solution d'hypochlorite de
calcium à 7 %..... 20 min
- ou Solution de bichlorure
mercurique à 0,1 % 1 à 3 min.

* Composition des milieux de culture.

a) Composition de la solution mère de macro-éléments minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962)

KNO ₃	1900 mg / l
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	370 mg / l
KH ₂ PO ₄	170 mg / l
Ca Cl ₂ , 2 H ₂ O	440 mg / l
NH ₄ NO ₃	1.650 mg / l

b) Composition de la solution-mère de micro-éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962).

MnSO ₄ , 4 H ₂ O	22,3 mg / l
H ₃ BO ₃	6,2 mg / l
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	8,6 mg / l
KI.	0,83 mg / l
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,25 mg / l
CuSO ₄ , 5 H ₂ O.....	0,025 mg / l
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,025 mg / l

c) Composition de la solution de vitamines de NITSH & NITSH + acides aminés (1965)

Inositol	100 mg / l
Glycine	2 mg / l
Acide nicotinoque	5 mg / l
Pyridoxine HCl	0,5 mg / l
Thiamine HCl	0,5 mg / l
Acide folique	0,5 mg / l
Biotine	0,5 mg / l

d) Composition de la solution de fer : Fe EDTA.

Solution de fer chélaté par le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique :

H ₂ O	1 litre
Na ₂ , EDTA	7,45 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	5,57 g

e) Composition finale du milieu utilisé pour la culture *in vitro* de fragments de tige de *Sesbania rostrata* et de *Aeschynomene afraspera*.

Macro-éléments	200 ml / l
Micro-éléments	10 ml / l
Vitamines de NITSH & NITSH	5 ml / l
Fer EDTA	5 ml / l
Saccharose	20 g / l
Eau distillée	Q.S.P. 1000 ml

BIBLIOGRAPHIE

- ALAZARD, 1985. Stem and Root Nodulation in *Aeschynomene* spp. appl. Environ. Microbiol. **50** : 732-734.
- ALAZARD. D. 1990. Nitrogen Fixation in Pure Culture by Rhizobia Isolated from Stem Nodules in Tropical *Aeschynomene* species. F.E.M.S. Microbiology Letters. **68** : 177-182.
- ALAZARD D. & DUHOUX E. 1988. Diversity of Stem Nodulation Sites in *Aeschynomene* spp. J.Plant Physiol. **132** : 123-125.
- ALLEN V.N. & ALLEN E. 1949. The Anatomy of Nodular Growths on the Roots of *Tribulus cistoïdes* L. Proceed. Soil Sci. Soc. Amer. **14** : 179-183.
- ALLEN O. N. & ALLEN F. K. 1981 The *Leguminosae* . A Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation. pp : 604-607. The University of Wisconsin Press. Madison.
- BAILLON F. 1985. Etude physiologique du gui feuillu (*Viscum album album* L.) pour la recherche d'une méthode de lutte chimique contre ce parasite : pénétration et transport de deux herbicides phloème-mobiles : 2-4-DB et glyphosate. Thèse de Doctorat d'Etat. univ. Scient. et Méd. de Grenoble. pp : 103.
- BAKER E. A. 1987. Penetration Studies with Sprays Applied to Isolated Cuticles and Leaf Segments. Aspects of Applied Biology. **14** : 141-151.
- BALLADE P. 1968. Caulogénèse apicale sur les jeunes racines axillaires du Cresson (*Nasturtium officinale* R. Br.). Soc. Bot. Fr. Mém. **115** : 256-258.
- BALLADE P. 1970. Précisions nouvelles sur la caulogénèse apicale des racines axillaires du Cresson (*Nasturtium officinale* R. Br.). Planta. **92** : 138-145.
- BARLOW P.W. 1976. Towards an Understanding of the Behaviour of Root meristems. Jour. of Theoretical. Biol. **57** : 433-451.
- BASTIN M.,1966. Root initiation, Auxin Level and Biosynthesis of Phenolic Compounds. Photochemistry and Photobiology. **5** : 423-429.

- BATTEN D. J. & GOODWIN P.B. 1978. Phytohormones and the Induction of Adventitious Roots . *In* : Phytohormones and Related Compounds : A Comprehensive Treatise. Ed. Letham D.S., Goodwin P.B. & Higgins T.J.V. Amsterdam. 2 : 137-173.
- BAUJARD P. & PARISELLE A. 1987. Fabrication de microtamis et préparation des nématodes pour l'observation au microscope électronique à balayage. *Revue Nématol.* 10 : 477-481.
- BECKER M., LADHA J. K., WATANABE I. & OTTOW J. C. G. 1988 Seeding vs. Vegetative Propagation of the Stem Nodulating Green Manure *Sesbania rostrata*. *Biol. Fertil. Soils.* 6 ; 279-281.
- BENTHAM G., 1865 *Genera Plantarum*. *In* : Bentham G. and Hooker J.D., 1, Reeve, London. 5 ; 213-223.
- BERHAUT J. 1976. Flore illustrée du Sénégal. Clairafrique éd. Dakar, 5. pp.647.
- BIDULPH O. 1959. Translocation of Inorganic Solutes. *In* : Plant Physiology. Ed. F.C. Steward. Academic Press. New-York. 2 : 553-604.
- BIGOT C. 1977. Aspects des capacités à l'organogenèse de bourgeons *in vitro* en relation avec l'origine des tissus mis en culture. Tentative pour réorienter un territoire organogène. *Bull. Soc. Bot. Fr. Coll. Multipl. Végét.* 124 : 135-147.
- BIGOT C. 1980. Quelques aspects de la néoformation spontanée de bourgeons. *In* : La multiplication végétative des plantes supérieures. Ed. Gauthier Villars. 77-97.
- BLAKE T.J. & REID D.M. 1981. Ethylène, Water and Tolerance to Waterlogging of Three Eucalyptus species. *Aust. J. Plant Physiol.* 8 : 497-505.
- BRAND R. & VENVERLOO C. 1973. The Formation of Adventitious Organs. II- The Origin of Buds Formed on Young Adventitious Roots of *Populus nigra* L. "italica". *Acta Bot. Neerl.* 22 : 399-406.
- BRISTOW J.M. & WHITECOMBE M. 1971. The Role of Roots in the Nutrition of Aquatic Vascular Plants. *Amer. J. Bot.* 58 : 8-13.

- BROWN S.C., BERGOUNIOUX C., TALLET S. & MARIE D. 1991 a. Flow Cytometry of Nuclei for Ploidy and Cell Cycle Analysis. *In* : Practical Guide to Plant Cellular and Molecular Techniques. Ed. Potrykus I. & Negritiu I. Zurich.pp:1-13.
- BROWN S.C., DEVAUX P., MARIE D., BERGOUNIOUX C. & PETIT P.X. 1991 b. Cytométrie en flux : application à l'analyse de la ploïdie chez les végétaux. *Biofutur*. 47 : 1-14.
- BRUNNER H. 1978. Influence of Various Growth Substances and Metabolic Inhibitors on Root Regenerating Tissue of *Phaseolus vulgaris* L.Changes in Contents of Growth Substances and in Peroxydase and IAA oxydase activities. *Z. Pflanzenphysiol*. 88 : 13-23.
- B RUNORI A. & D'AMATO F. 1967 The DNA Content of Nuclei embryo of dry Seeds of *Pinus pinea* and *Lactuca sativa*. *Caryologia*. 20 : 153-161.
- BUVAT R. 1944. Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. I - Plantes entières et boutures. *Ann. Sci. Nat*. 5 : 1-130.
- BUVAT R. 1945. Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. II - Cultures de tissus et tumeurs. *Ann. Sci. Nat*. 6 : 1-119.
- CANNON W.A. 1949. A Tentative Classification of the Root Systems. *Ecology*. 30 : 542-548.
- CARLSON M.C. 1929. Origins of Adventitious Roots in Coleus Cuttings. *Bot. Gaz*. 87 : 119-126.
- CARLSON M.C. 1938. The Formation of Adventitious Root in *Salix cordata* .*Amer. J. Bot*. 25 : 721-725.
- CARLSON M.C. 1950. Nodal Adventitious Roots in Willow Stems of Differents Ages. *Amer. J. Bot*. 37 : 555-556.
- CARUSO J. L. 1971. Bud Formation in Exised Stem Segments of *Verbascum thapsus* . *Amer. J. Bot*. 58 : 429-431.
- CARUSO J. L. 1974. *In vitro* Bud Formation in Stem Segments of *Aillanthus altissima* . *New Phytol*. 73 : 441-443.

- CHAMEL A. 1973. Etude à l'aide du ^{42}K de la pénétration et de la migration du potassium fourni par voie foliaire. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Scient. et Méd. de Grenoble. pp : 151.
- CHAMEL A. & BOSSY J.P. 1981. Electron Microprobe Analysis of Apple Fruit Tissues Affected with Bitter Pit. *Scientia Horticulturae*. **15** : 1551-1563.
- CHAMPAGNAT M. 1971. Recherches sur la multiplication végétative de *Neottia nidus-avis*. *Rich. Ann. Sci. Nat. Bot.* **12** : 209-248.
- CHAMPAGNAT P. 1974. Introduction à l'étude des complexes de corrélations. *Rev. Cytol. et Biol. Vég.* **37** : 175-208.
- CHAMPAGNAT M. & BLATTERON S. 1966. Ontogénie des organes axillaires de Cresson (*Nasturtium officinale* R.Br.). *Revue Générale de Botanique*. **73** : 85-102.
- CHAMPAGNAT M., BALLADE P. & PORTE J. 1967. Introduction à l'étude expérimentale de l'organogenèse axillaire du Cresson (*Nasturtium officinale*). *Bull. Soc. Bot. Fr.* **110** : 122-138.
- CHAMPAGNAT M., MOREL G., & GAMBADE G. 1968. particularités morphologiques et pouvoir de régénération de *Cymbidium virescens* cultivés *in vitro*. *Soc. Bot. Fr. mém.* **115** : 236-249.
- CHARDAKOV S. 1953. Régime hydrique du cotonier et détermination des heures optimales d'irigation. *Acad. Sci. Uzbek. (S.S.S.R.)*. Tashkent.
- CHLYAH H. 1973. Néof ormation dirigée à partir de fragments d'organes de *Torenia fournieri* Lind. cultivés *in vitro*. *Bio. Plant. (Praha)*. **15** : 80-87.
- CHLYAH H. 1974 a. Etude histologique de la néof ormation de méristèmes caulinaires et radiculaires à partir de segments d'entre-noeuds de *Torenia fournieri* cultivés *in vitro*. *Can. J. Bot.* **52** : 473-476.
- CHLYAH H. 1974 b. Inter-tissue Correlations in Organ Fragments. Organogenetic capacity of tissue exised from Stem Segments of *Torenia fournieri* Lind cultured separatly *in vitro*. *Plant Physiol.* **54** : 341-348.

- CHLYAH H. & TRAN TRANH VAN M. 1971. Analyse des capacités néoformatrices radiculaires et caulinaires (végétatifs et floraux) chez le *Torenia fournieri* Lind. Compt. Rend. Acad. Sci. **273** : 356-369.
- CHLYAH H., SQALI-KHALIL A. & CHLYAH A. 1980. Dimorphism in Bud Regeneration in Flax (*Linum usitatissimum*). Can. J. Bot. **58** : 633-641.
- CHOUARD P. 1951. Dormances et inhibitions des graines et des bourgeons : préparation au forçage ; thermoperiodisme. Les cours du CNAM. CDU.Paris.
- CISSE I., SPENCER-BARRETO M.M.& DUHOUX E.,1992. Croissance des racines adventives de *Sesbania rostrata* Brem (*Leguminosae*) : application à la multiplication végétative de la plante. Proceed. 4th Conf. AABNF. Ed. Willey & Sons. (sous presse).
- CLARK W.A. 1933. Vegetative Propagation in Cotoneaster. Trans. Bot. Soc. Edinb. **31** : 256-261.
- CLEMENS J. KIRK A.M. & MILLS P.D. 1978. The Resistance to Waterlogging of three *Eucalyptus* Species. Oecologia (Berl.) **34** : 125-131.
- CLOWES F.A.L. 1978. Chimeras and the Origin of lateral Root Primordia in *Zea mays*. Annals of Botany. **42** : 801-807.
- COTTIGNIES A. 1979. The Blockage in the G₀₋₁ Phase of Cell Cycle in the Dormant Shoot Apex of Ash. Planta. **147** : 15-19.
- COTTIGNIES A. 1981. Arrêt saisonnier de la pré-synthèse de l'ADN en un point de restriction (G₀, R). Bull. Soc. Bot. Fr. **2** : 53-60.
- COTTIGNIES A. 1983. Teneur en eau et dormance dans le bourgeon de frêne. Z. Pflanzenphysiol. **11** : 133-139.
- COTTIGNIES A. 1985. Dormance et croissance active chez le frêne. Thèse de Doctorat d'Etat. Paris VII,pp : 215.
- COTTIGNIES A. 1986. Dormance. Ann. Sci. Nat.,Bot. **8** : 93-142 .

- COTTIGNIES A. & JENNANE A. 1988. Water Content, Water Potential, and Transition from the Non-cycling to the Cycling State in Pea Cotyledonary Bud.
- CROES A.F., CREEMER-MOLENAAR T., VAN DEN EEDE G., KEMP A., & BARENDE G.W.M., 1985. Tissue Age as Endogenous Factor Controlling *in vitro* Bud Formation on Explants from the Inflorescence of *Nicotiana tabaccum* L. J. Exp. Bot. **36** : 1771-1779.
- CUMBUS I.P. & ROBINSON L.W. 1977. The Function of Root Systems in Mineral Nutrition of Watercress (*Rorippa nasturtium-aquaticum* L.) Hayek. Plant and Soil. **47** : 395-406.
- DAVIS T.A. 1970. Epiphytes that Strangulate Palms. Principes. **14** : 10-25.
- DAVIS L.C. 1984. Diffusion of Gases Throught Plant Tissues. Entry of Acetylene into Legume Nodules. Plant Physiol. **76** : 854-857.
- DE BRUIJN F. J. 1988. The Unusual Symbiosis Between the Diazotrophic Stem-nodulating Bacterium *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 and its Host, the Tropical Legume *Sesbania rostrata* : Plant and Bacteriel aspects. Plant Microbiol. **3** : 1-77.
- DE GRANVILLE J.J., 1974. Aperçu sur la structure des pneumatophores de deux espèces des sols hydromorphes en Guyane. *Mauritia flexuosa* L. et *Euterpe oleracea*. Mart (*Palmae*). généralisation au système respiratoire racinaire d'autres palmiers. Cahier de l'ORSTOM. **23** : 3-24.
- DENARIE J. & TRUCHET G. 1979. La symbiose *Rhizobium*-Légumineuses : rôle respectif des partenaires. Physiol. Vég. **17** : 643-667.
- DOMMERGUES Y.R., DREYFUS B., DIEM H.G. & DUHOUX E., 1985. Fixation de l'azote et agriculture tropicale. La Recherche. **16** ; 22-31.
- DOUGLAS G.C. 1984. Formation of Adventitious Buds in Stem Internodes of *Populus* spp. Cultured *in vitro* on Basal Medium : Influence of Endogenous Properties of Explants. J. Plant Physiol. **116** : 313-321.
- DREYFUS B.L. 1982. Symbiose fixatrice d'azote chez *Sesbania rostrata*, Légumineuse à nodules caulinaires. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Paris VII. pp : 120.

- DREYFUS B.L. & DOMMERGUES Y.R. 1980. Non-inhibition de la fixation d'azote atmosphérique par l'azote combiné chez une légumineuse à nodule caulinaires, *Sesbania rostrata*. C.R. Acad. Sc. Paris., **291** : 767-770.
- DREYFUS B.L. & DOMMERGUES Y.R. 1981. Nitrogen-fixing Nodules Induced by *Rhizobium* on the Stem of the Tropical Legume *Sesbania rostrata*. F.E.M.S. Microbiology letts. **10** : 313-317.
- DREYFUS B.L., GARCIA J.L. & GILLIS M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. Int. Syst. Bacteriol. **38** : 89-98.
- DUHOUX E. 1984. Ontogénèse des nodules caulinaires du *Sesbania rostrata*. (Légumineuse). Can. J. Bot. **62** : 982-994.
- DUHOUX E. & DREYFUS B.L. 1982 - Nature des sites d'infection par le *Rhizobium* de la tige de la légumineuse, *Sesbania rostrata* Brem. C.R. Acad. Sc., Paris. **294** : 407-411.
- DUHOUX E. & ALAZARD D. 1983. Culture *in vitro* de nodules de *Sesbania rostrata* : mode d'infection des tissus néoformés et comparaison avec l'infection chez la plante. C.R. Acad. Sc., Paris., **296** : 93-100.
- ELLMORE G.S. 1981. Root Dimorphism in *Ludwigia peploides* (*Onagraceae*) : Development of two root types from similar primordia. Bot. Gaz. **142** : 525-533.
- EMBERGER L. 1960. Les végétaux vasculaires. Masson et C^{ie}. éd. Paris.
- ESPAGNAC H. 1973. Les axes polymorphes de *Nephrolepis bisserata*. Analyse expérimentale du déterminisme de leurs structures. Ann. Sci. Nat. **14** : 223-286.
- FAVRE J.M. 1970. Influence de facteurs internes sur la cinétique d'enracinement de la vigne *in vitro*. Rev. gén. Bot. **77** : 519-562.
- FAVRE J.M. 1973 a. Effets corrélatifs de facteurs internes sur la rhizogénèse d'un clone de vigne (*Vitis riparia* x *V. rupestris*) cultivé *in vitro*. Rev. Gén. Bot. **80** : 279-361.

- FAVRE J.M. 1973 b. Divers aspects du rôle du bourgeon et des noeuds sur la rhizogénèse de la vigne cultivée *in vitro*. Rev. Cytol. Biol. Végét. **37** : 393-406.
- FAVRE J.M., 1977a. La Rhizogénèse. Aspects divers d'un processus d'organogénèse végétale. Ann. Univ. Abidjan, pp:100.
- FAVRE J.M., 1977b. Formation et entrée en croissance des racines adventives. *In* : Multiplication végétative et rhizogénèse. C.R. du groupe d'étude des Racines, Ed. Gagnaire- Michard J., Lemaire F. et Riedacker A.
- FELDMAN L.J. 1984. Regulation of Root Development. Ann. Rev. Plant Physiol. **35** : 223-242.
- FINK S. 1982. Adventitious Root Primordia ; the Cause of Abnormally Broad Xylem Rays in Hard and Soft Wood. Intern. Assoc. Wood Anat. **3** : 31-38.
- FLOCH' J.Y. 1979. Etude du transport à longue distance des éléments minéraux dans le thalle des algues brunes. Thèse de Doctorat ès Sciences. Univ. de Bretagne Occident. pp : 83.
- FLOCH' J.Y. & PENOT M. 1972. Transport du ^{32}P et ^{86}Rb chez quelques algues brunes : orientation des migrations et voies de conduction. Physiol. Vég. **10** : 677-686.
- FRANCLET A 1979. Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. *In* : Micropropagation d'arbres forestiers. Afocel. **3** : 3-18.
- FRANK P.A. & HODGSON R.H. 1964. A technique for Studying Absorption and Translocation in Submersed Plants. Weeds. **12** : 80-82.
- FRIEDMAN R., ALTMAN A. & ZAMSKI E. 1979. Adventitious Root Formation in Bean Hypocotyl Cuttings in Relation to IAA Translocation and Hypocotyl Anatomy. J. Exper..Bot. **30** : 769-777.
- GAGNAIRE J. 1967. I - Recherches sur la détection des pollutions radioactives par les végétaux. II - Quelques aspects de la dormance des bourgeons. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Scient. et Méd. de Grenoble. pp: 120.

- GAGNAIRE-MICHARD J. & JOURDAN J. 1978. Variations saisonnières du transport et de la localisation du ^{86}Rb et du ^{134}Cs dans de jeunes arbres (Peupliers et Pins) Ann. Afocel. 224-250.
- GALIL J. 1984 *Ficus religiosa* L. The tree splitter . Bot. J. of Linnean Society . 88 ; 185-203.
- GAUTHERET R.J. 1969. Investigations on the Root Formation in the Tissue of *Helianthus tuberosus* cultured *in vitro* . Amer. J. Bot. 56 : 702-717.
- GERWITZ M. & FAHN A. 1969. The Anatomy of sporophyte and gametophyte of *Ophioglossum lusitanicum* . Phytomorphology. 10 : 342-351.
- GINZBURG C. 1967. Organization of the Adventitious Root Apex in *Tamatix aphylla* . Amer. J. Bot. 54 : 4-8.
- GOEBEL K. 1905. Organography of Plants, Especially the Archegoniate and Spermatophyta. Part 2. Special organography. Clarendon Press, Oxford.
- GOEBEL K. 1978. Ueber Wurzelsprosse von *Anthurium longifolium*. Bot. Ztg. 36 : 645-648.
- GOLDBLATT P., 1981. Cytology and the Phylogeny of Leguminosae. In : Advances in Legume Systematic. Ed. Polhill R.M. and Raven P.H. Royal Bot. Garden Kew., 2 : 427-463.
- GRIEVE B. 1941 Studies in the Physiology of Host-parasite Relations. II- Adventitious Root Formation. Proceedings of the Royal Society of Victoria . 53 ; 323-341.
- GUPTA G.R.P., GUHA S. & MAHESHAWARI A. 1966. Differentiation of Buds from *Nicotiana* Leaves in Sterile Culture. Phytomorphology. (Delhi). 16 : 175-182.
- HA NGOC K. A. & TRAN TRANH VAN M. 1979. Capacité caulogène de cellules de cal issues des couches cellulaires minces de type épidermique de ramifications florales de *Nicotiana tabacum* cv. Wisc. 38. Physiol. Plant. 46 : 203-207.

- HAISSIG B.E. 1965. Organ Formation *in vitro* as Applicable to Forest Tree Propagation. Bot. Rev. **31** : 607-626.
- HAISSIG B.E. 1970. Preformed Adventitious Root Initiation in Brittle Willow Grown in Controlled Environment. Can. J. Bot. **48** : 2309-2312.
- HAISSIG B.E. 1972. Meristematic Activity During Adventitious Root Primordium Development. Plant Physiol. **49** : 886-892.
- HAISSIG B.E. 1974. Origins of Adventitious Roots. New Zealand J. of Forestry Science. **4** : 299-310.
- HAMADA S. & FUJITA S. 1983. DAPI Staining Improved for Quantitative Cytofluorometry. Histochemistry. **79** : 219 : 226.
- HARTMAN H. T. & KESTER D.E. 1975. Plant Propagation Principles and Practices. Englewood-Cliffs. Prentice-Hall.pp : 660.
- HINCHEE M.A.W. 1981 Morphogenesis of Aerial and Subterranean Roots of *Monstera deliciosa* . Bot. Gaz. **142** ; 347-359.
- HOAGLAND D.R., ARNON D.I. 1950. The Water-culture Method for Growing Plants Without Soil. Cal. Agric. Exp. Stn. Circ. **347** : 1-39.
- HOLM T. 1925. On the Development of Buds upon Roots and Leaves. Ann. Bot..**39** : 867-881.
- HOLSTERS M. , VAN DEN EEDE G.,GOETALS K. & DREYFUS B. 1985. Identification of Nodulation and Nitrogen Fixation functions of *Rhizobium sesbaniae* strain ORS 571. In : Nitrogen Fixation Reseach Progress. Evans H.J., Bottomley P.J. & Newton W.E. Eds. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp : 136.
- HUTCHINSON J., 1964 - The Genera of Flowering Plants. Oxford University Press, **1** : 221-489.
- JARVIS B.C. & BOOTH A.B. 1981. Influence of Indole Butiric Acid, Boron, Myo-inositol, Vitamin D₂, and Seedling age on Adventitious Root Development in Cuttings of *Phaseolus aureus*. Physiol.Planta. **53** : 213-218.

- JARVIS B.C., ALI A.H.N. & SHAHEED A.I. 1983. Auxin and Boron in Relation to the Rooting Response and ageing Mung Bean Cuttings. *The New Phytol.* **95** : 509-518.
- JENIK J. 1978. Roots and Root Systems in Tropical Trees : morphologic and ecologic aspects. *In* : Tropical Trees as Living Systems. Cambridge Univ. Press. Ed. Tomlinson P.B. & Zimmermann M.H. 323-349.
- JONSSON L. 1981 A monograph of the genus *Microedia* (*Orchidaceae*). *Symbolae Botanicae Upsalienses.* **23** ; 1-155.
- JOURDAN J 1980. Variations saisonnières de la morphogenèse et de la croissance des systèmes aériens et souterrains chez le peuplier : leurs relations avec les glucides et les transferts minéraux. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Scient. et Méd. de Grenoble. pp : 160.
- KAHN F. 1977. Analyse structurale des systèmes racinaires des plantes ligneuses de la forêt tropicale dense humide. *Candollea.* **32** : 321-358.
- KAHN F. 1978. Architecture et dynamique spatiale racinaires. In *Physiologie des racines et symbioses. Proceed. Symposium sep.1988. France* Ed. Riedacker A. & Gagnaire-Michard J. 242-267.
- KAMADA H. & HARADA H. 1979. Influence of Several Growth Regulators and Amino Acids on *in vitro* Organogenesis of *Torenia fournieri* Lind. *J.Exp. Bot.* **30** : 27-36.
- KAPIL R.N. & RUSTAGI P.N. 1966. Anatomy of Aerial and Terrestrial Roots of *Ficus benghalensis* L. *Phytomorphology.* **16** ; 382-386.
- KAPOOR S & GUPTA S C 1986 Rapid *in vitro* Differentiation of *Sesbania bispinosa* plants : a Leguminous Shrub. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **7** : 263 - 268.
- KERBAUY G.B. 1984. Regeneration of Protocorm-like Bodies Through *in vitro* Culture of Root Tips of *Catasetum* (Orchidacées). *Z. Pflanzenphysiol.* **113** : 287-291.
- LANGERON M. 1949. Précis de microscopie. Ed. Masson et Cie. Paris. pp : 1430.

- LE COQ C., GUERIN C. & DUHOUX E., 1985. Caryologie de *Sesbania rostrata*. Brem. I : Etude chromosomique. Rev. Cytol. Biol. Vég. **8** : 245-254.
- LEROUX R. 1973. Contribution à l'étude de la rhizogenèse de fragments de tiges de pois (*Pisum sativum*) cultivés *in vitro*. Rev. Cytol. et Biol. **36** : 1-132.
- LEVENNE H. 1960. Robust Tests for equality of Variance. *In* : Contributions to Probability and Statistics. Eds Olkin I. & Alto P. Stanford Univ. Press.
- LOISEAU J.E. 1969. La Phyllotaxie. Coll. Monog. Bot. et Biol. Vég. Paris Ed. Masson et Cie. pp : 223.
- MAC CULLY M.E. 1975. The Development of Lateral Roots. *In* : The Development and Functions of Roots. Ed. Torrey J.G. & Clarkson D.T. Acad. Press. London. pp : 105-124.
- MALCOM K.R., THORPE T.A. & COSTERTON J.W. 1973. Ultrastructural Aspects of Shoot Initiation in Tobacco Callus Cultures. Amer. J. Bot. **60** : 788-795.
- MARTIN B & QUILLET G 1974. Bouturage des arbres forestiers au Congo. Bois et Forêts des tropiques. **154**, 41-57; **156**, 39-61 ; **157**, 21-39.
- MARTOJA R. & MARTOJA-PIERSON M. 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Ed. Masson & Cie. pp : 305.
- MBODJI . A. 1992. Contribution à l'étude des potentialités organogènes de *Sesbania rostrata* Brem, Légumineuse tropicale à nodules caulinaires. Mém. de DEA. Univ. C.A.D. Dakar. pp : 55.
- METEZEAU P. & FRELAT G. 1991. Principes, potentialités et limites de la cytométrie en flux. Applications en microbiologie. Ann. Biol. **1** : 39-57.
- MEYER B.S. & ANDERSON D.B. 1952. Plant Physiology. 2 ème édition. Chapman & Hall. New-York.
- MICHAUX N. 1972. Etude cytophotométrique du méristème caulinaire de *Isoetes setacea* Lam., au cours de son cycle annuel. C. R. Acad. Sci. D. **274** : 3453-3456.

- MONTPETIT J.M. & COULMAN B.E. 1991. Relationship Between Spring Vigor and the Presence of Adventitious Roots in Established Stands of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *Can. J. Plant. Sci.* **71** : 749-754.
- MORARD P. & BUR R. 1971. Comparaison de l'utilisation du ^{86}Rb et du ^{42}K comme traceurs radioactifs pour l'étude de l'absorption du potassium par le sorgho. Coll. sur l'emploi des isotopes et des rayonnements dans la recherche en phytopédologie y compris leurs applications an sylviculture. 13-17 déc. IAEA -SM / 151 / 15.
- MULONGOY K., 1986. Potential of *Sesbania rostrata* as Nitrogen Source in Alley Cropping Systems. *Biol. Agris. Hortic.* **3** : 341-346.
- MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962. A revised Medium for Rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497.
- NADJAH I R. 1977. Analyse expérimentale du comportement rhizogène de boutures de *Tradescantia fluminensis* Vell en fonction de leur structure. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. de Paris Sud. pp :135.
- NADJAH I R. & FAVRE J.M., 1980. Etude histologique de la mise en place de l'appareil conducteur chez *Tradescantia fluminensis* Vell. Commelinacées. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **127** : 443-457.
- NITSCH J.P. & NITSCH C. 1965. Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L. *Ann. Physiol. Vég.* **7** : 251-256.
- NOUGAREDE A. & RONDET P. 1982. Rhizogenèse adventive dans l'épicotyle de Pois : initiation et structuration de la racine. *Can. J. Bot.* **60** : 261
- NOUGAREDE , TEPFER S. et TEPFER M. 1973 a. Les bourgeons au cours de l'état pérennant chez le *Phytolacca decandra* L.C.R. acad. Sci. **276** : 957-960.
- NOUGAREDE , TEPFER S. et TEPFER M. 1973 b. Seasonal Changes in the Shoot Apex of *Phytolacca decandra* L. *Am. J. Bot.* **60** : 4-11.

- PARISELLE A., 1988. Rôle nématocide de *Sesbania rostrata*. Communication Congrès "*Sesbania rostrata*". Dakar. (Sénégal) : 5 - 8 janvier 1988.
- PARIS N., CHAMEL A., CHEVALIER S., FOURCY A., GARREC J.P. & LHOSTE. A.M. 1978. Application de quelques techniques à l'étude de la microlocalisation des ions dans les tissus végétaux. *Physiol. Vég.* **16** : 17-35.
- PATEL K. L. & THORPE T.A. 1984. Histochemical Examination of Shoot Initiation in Cultured Cotyledon Explants of Radiata Pine. *Bot. gaz.* **145** : 312-322.
- PENOT, 1976 a. Evolution de l'absorption et du taux d'exportation du ^{86}Rb au cours de la sénescence foliaire. *C.R. Acad. Sci.* **282** : 855-858.
- PENOT M. 1976 b. Mise en évidence de déplacements à grande vitesse dans le phloème de *Tradescantia viridis*. *Planta.* **132** : 183-187.
- PENOT M. 1979. Transport à longue distance des éléments minéraux dans le phloème . Relation entre organes. Importance du contrôle hormonal. *In* : Les corrélations entre les racines et les parties aériennes. C.R. du Groupe d'Etudes des Racines. Ed. Gagnaire-Michard J. et Riedacker A. **9** : 94-133.
- PETERSON R.L. 1968. Developmental and Morphogenetic Studies of *Ophioglossum petiolatum*. Hook. Ph. D. Thesis University of California. pp 211.
- PETERSON R.L. 1970. Bud Development at the root apex of *Ophioglossum petiolatum*. *Phytomorphology.* **20** : 183-190.
- PETERSON R.L. 1975. The Initiation and Development of Roots Buds. *In* : The Development and Functions of Roots. Ed. Torrey J.G. & Clarkson D.T. Acad. Press. Inc. London. Ltd. 125-161.
- POLHILL R.M., 1981. *Papilionoideae*. *In* : Advances in Legume Systematics. Ed. Polhill R.M. and Raven P.H., Royal Bot. Garden Kew., **1** : 191-208.
- POLHILL R.M. & RAVEN P.H. 1981. Biogeography of the *Leguminosae*. *In* : Advances in Legume Systematics. Ed. Polhill R.M. and Raven P.H. Royal Bot. Garden. Kew. **1** : 27-34.

- POLHILL R.M. & SOUSA M., 1981. *Robinieae*. In : Advances in Legume Systematics. Ed. Polhill R.M. and Raven P.H., Royal Bot. Garden. Kew., 1 : 283-288.
- RAMANI S., JOSHUA D.C. & SHAIKH M.S. 1989. Response of three *Sesbania* Species to Salinity when grown Hydroponically. J. Plant Nutri. 12 :1447-1455.
- RAO A.N. 1966. Developmental Anatomy of Natural Root Grafts in *Ficus globosa* . Aust. J. Bot. 14 : 269-276.
- RAO S. & MOHAN RAN H. Y. 1981. Regeneration of Whole Plants From Cultured Root Tips of *Limnophilla indica* . Can. J. Bot. 59 : 969-973.
- REFENO G. & ROUX J. 1984. Transformation du méristème racinaire en méristème caulinaire chez *Vanilla fragrans* . Arch. Anat. Microsc. 73 : 309-321.
- RIKER A. J., BAMBFIELD W.M., WRIGHT W.H., KEITT G.W. & SAGAN H.E. 1980. Studies on Infectious Hairy Root of Nursery Apple Trees. Journal of Agricultural Research (Washington) 41 : 507-540.
- RINAUDO G, DREYFUS B L & DOMMERGUES Y R 1983 *Sesbania rostrata* green manure and nitrogen content of crop and soil. Soil Biol. Biochem. 15 :111-113.
- ROSTOWZEW S. 1891. Recherches sur l'*Ophioglossum vulgatum* L. Avers. K.Danske. Vidensk. Selsk. Forh. 2 : 54-83.
- ROVIRA A. D. 1973. Zones of Exudation along Plant Roots and Spatial Distribution of Microorganisms in the Rhizosphère. Pestic. Sci. 4 : 361-366.
- SAINT MACARY H., MAQUESES E.P., TORRES R.O. & MORRIS . 1985. Effect of Flooding in Growth and Nitrogen Fixation of two *Sesbania* Species. Philipp. J. Crop Sci. 10 : 17-20.
- SALLE G. 1976. Etude autoradiographique de la synthèse du DNA au cours de la germination du *Viscum album* (Loranthacées). Phytomorphology. 26 : 183-189.

- SAMB P.I. & KAHLEM G. 1983 Déterminisme de l'organogénèse racinaire de *Jussia repens* L. Z. Pflanzenphysiologie. **109** : 279-284.
- SAMB P.I. & BA A.T. 1987. Etude morphologique et histologique du polymorphisme racinaire du *Ludwigia adscendens* L. Hara (*Onagraceae*). Bull. IFAN. **46** : 303-313.
- SAMISH R.M. 1954. Dormancy in Woody Plants. Ann. Rev. plant Physiol. **5** : 183-189.
- SCHELDRAKE A.R. 1971. Auxin in the Cambium and its Differentiating Derivatives. J. Exp.Bot. **22** : 735-740..
- SHAPIRO S. 1958. The Role of Light in the Growth of Root primordia in the Stems of Lombardy Poplar. In : Physiology of Forest Trees. Ed. Thimann K.V. Press Co. New-York. 445-465.
- SKOOG F. & MILLER C.O. 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultures *in vitro* . Symp. Soc. Exp. Biol. **11** : 118-130.
- SKOOG F. & TSUI C., 1948. Chemical Control of Growth and Bud Formation in Tobacco Stem Segments and Callus Cultured *in vitro* . Amer. J. Bot. **35** : 782-787.
- SOUIDI C. 1976. Recherches physiologiques sur la croissance et la morphogénèse des racines chez *Populus euramericana* et *Picea excelsa*. Thèse de Doctorat de 3 ème Cycle. Univ. Scient. et Méd. de Grenoble. pp: 107.
- SOUSA S.M. & DE SOUSA M.P. 1981. New World *Lonchocarpineae*. In : Advances in Legume Systematics. Ed. Polhill R.M. and Raven P.H. Royal Bot. Garden. Kew., **1** : 261-281.
- SPENCER-BARRETO M.M., 1987. Plasticité morphogénétique des ébauches racinaires adventives préformées sur la tige de *Sesbania rostrata* Brem. Thèse de Doctorat de 3 ème cycle. Univ. de Dakar. PP : 134.
- SPENCER-BARRETO M. M. & DUHOUX E. 1987. Corrélations morphogénétiques régulant la croissance des racines adventives de la tige de *Sesbania rostrata* Brem (*Leguminosae*) In : Les arbres

fixateurs d'azote et Amélioration biologique de la fertilité du sol. Colloques et Séminaires; Ed. de l'ORSTOM : 367-375.

- SPENCER- BARRETO M M, GAGNAIRE J, PLEBIN R., BEAUDOING G. & DUHOUX E. 1989. Les mamelons caulinares de la tige de *Sesbania rostrata* : rôle dans l'absorption minérale de la plante. *Oecol. Plant.* **4** : 411-422.
- STOKEY A. G. 1907 The roots of *Lycopodium pithyoides*. *Bot. Gaz.* **44** : 57-63.
- STONE E. C. 1957. Dew as an Ecological Factor. the Effect of Artificial Dew on the Survival of *Pinus ponderosa* and the Associated Species. *Ecol.* **38** : 414-422.
- SWINGLE C.F. 1925. Burr-knots of Apple Trees. Its Relation to Crowngall and to Vegetative Propagation. *J. Hered.* **16** : 313-320.
- SWINGLE C.F. 1927. Burr-knot Formation in Relation to the Vascular System of Apple Stem. *J. Agric. Res.* **34** : 533-544.
- TANIMOTO S. & HARADA H. 1984. Roles of Auxin and Cytokinin in Organogenesis in *Torenia* Stem Segments Cultured *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.* **115** : 11-18.
- THAKUR R.B., 1991. Performance of *Sesbania rostrata* in Calcareous Soils. *IRRN.* **16** : 21-22.
- THOMAS M.J. 1975. Etude cytophotométrique du DNA nucléaire des différents territoires de l'embryon du *Pinus sylvestris* L. au cours de son développement. *C.R. Acad. Sci.* **280** : 1087-1090.
- THORPE T.A. 1980. Organogenesis *in vitro* : Structural, Physiological and Biochemical Aspects. *Int. Rev. Cytol.* **11** : 71-111.
- TORREY J.G. 1958. Endogenous Bud and Root Formation by Isolated Roots of *Convolvulus* Grown *in vitro*. *Plant Physiol.* **33** : 258-263.
- VARTANIAN N. 1971. Action morphogénétique du facteur hydrique sur le système racinaire de *Sinapis alba* L. I - Rhizogenèse et potentiel hydrique racinaire. *Rev. gén. Bot.* **78** : 19-29.

- VARTANIAN N. 1972 a. Action morphogénétique du facteur hydrique sur le système racinaire de *Sinapis alba* L. II - Etude histologique des ébauches racinaires produites par la sécheresse. Rev.Gén. Bot. **79** : 139-165.
- VARTANIAN N. 1972b. Induction par la sécheresse des racines courtes tubérisées chez les plantes annuelles : crucifères et quelques autres familles. C.R. acad. Sci. Paris. 274 / 1497-1500.
- VARTANIAN N. 1981. Some Aspects of Structural and Functional Modification Induced by Drought in Root Systems. Plant and Soil. **63** : 83-92.
- VARTANIAN N. 1984. Un modèle de processus adaptatif à la sécheresse : aspects phylétiques, génétiques et physiologiques. Bull. Soc. Bot. Fr. **131** : 59-67.
- VARTANIAN N., WERTHEIMER D.S. & COUDERC H. 1983. Scanning Electron Microscopic Aspects of Short Tuberized Roots, with Special Reference to Cell Rhizodermis Evolution under Drought and Rehydratation. Plant Cell and Environ. **6** : 39-46.
- VERNIER P. & GODEFROY J. 1987. Comportement de *Sesbania rostrata* Brem et Oberm dans le Nord Cameroun. Fruits. **42** : 511-514.
- VIERSKOV B. 1978. A Relationship Between Length of Basis and Adventitious Root Formation in Pea Cuttings. Physiologia Plantarum. **32** : 170-173.
- WAISEL Y., AGAMI M. & SHAPIRA Z. 1981. Uptake and Transport of ^{86}Rb , ^{32}P , ^{36}Cl and ^{22}Na by four submersed hydrophytes. Aquatic Botany. **13** : 179-186.
- WAREING P.F. 1963. The Germination of Seeds. In : Vistas in Botany. Recent Research in Plant Physiology. Turill. Mc Millan. New-York. 195-227.
- WARMKE H.E. & WARMKE G.L. 1950. The Role of Auxin in the Differentiation of Root and Shoot Primordia from Root Cuttings of *Taraxacum cichorium* . Amer. J. Bot. **37** : 272-283.

- WEBER H. 1936. Vergleichend-morphologist studien über die sprobburtige bewwurzelung. Nova Acta Leopoldina. Neue Folge. 4 : 229-298.
- WEIGEL U., HORN W. & HOCK B. 1984. Endogenous auxin level in Terminal Stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* during Adventitious Rooting. *Physiol. Planta.* 61 : 422-428.
- WEST K.R. & PITMAN M.G. 1967. Rubidium as a tracer for potasium in the marine algae : *Ulva lactuca* L and *Chaetomorpha darwinii* (Hooker). *Knetzing Nature.* 214 : 1262-1263.
- WHITE J. & LOWELL P.H. 1984. The Anatomy of Root Initiation in Cuttings of *Griselina littoralis* and *Griselina lucida* . *Ann. Bot.* 54 : 7-20.
- WILCOX H. 1955. Regeneration of Injured Root Systems in Noble Fir. *Bot. Gaz.* 116 : 221-234.
- WILCOX H.E. 1968. Morphological Studies of the Roots of Red Pine : *Pinus resinosa*. I- Growth Characteristics and Paterns of Branching. *Amer. J. Bot.* 55 : 247-254.
- WOCHOK Z. & SUSSEX I. 1975 a. Morphogenesis in Sellaginella. Auxin Transport in the Stem. *Plant Physiol.* 51 : 646-650.
- WOCHOK Z. & SUSSEX I. 1975 b. Morphogenesis in Sellaginella. III-Meristem Determination and Cell Differentiation. *Dev. Biol.* 47 : 376-383.
- WOLFE F.H. 1934. The Origin of Adventitious Roots in *Cotoneaster dammeri*. *Bot. Gaz.* 95 : 686-694.
- ZOBEL R.W. 1975 The Genetics of Root Development. *In* : The development and Function of Roots. Ed. Torrey J.G. & Clarkson D.T.) Academic Press. London . 261-275.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE - I - : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
Diversité des racines adventives dans le règne végétal	6
Conditions de formation des racines adventives	10
Croissance des racines adventives.....	14
Morphogenèse <i>in vitro</i> : conversion d'un méristème racinaire en méristème végétatif	15
Conclusion	17
CHAPITRE - II - : MATERIELS, TECHNIQUES ET CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	19
.....	
.....	
.....	
I . LE MATERIEL VEGETAL	20
<i>Sesbania rostrata</i>	20
<i>Aeschynomene afraspera</i>	22
II - LES METHODES EXPERIMENTALES	22
Potentiel hydrique des différentes structures présentes sur la tige	22
Techniques de cytofluorométrie.....	25
Techniques de microanalyse.....	27
Principe physique de la méthode	27
Prélèvement et préparation des échantillons	27
Techniques histologiques	28
Microscopie photonique : <i>Techniques de fixation</i>	28
<i>Préparations microscopiques</i>	29
<i>Coloration des préparations microscopiques</i>	29
- Coloration à l'hématoxyline.....	29
- Coloration par le mélange Fast-Green	30

- Squash au Feulgen : détermination de l'index mitotique	30
Microscopie électronique.....	30
<i>Microscopie électronique à balayage</i>	30
- Observation du matériel frais.....	30
- Observation du matériel fixé	31
<i>Microscopie électronique à transmission</i>	31
Techniques de l'imagerie par résonance magnétique (I.R.M.).....	32
Principe physique de la méthode	32
Préparation des échantillons végétaux.....	32
Techniques d'utilisation des traceurs radioactifs	32
Absorption et migration du ^{86}Rb à travers des fragments de tige de <i>S. rostrata</i>	33
Absorption et migration du ^{86}Rb et du ^{134}Cs dans les plantes entières..	33
1ère série : Etude de l'absorption racinaire par les ébauches de racines adventives (E.R.A.) en attente sur la tige.....	35
2ème série : Etude de l'absorption racinaire réalisée par les racines séminalles seules	35
3ème série : Etude de l'absorption racinaire par les racines adventives et séminalles simultanément : double marquage isotopique.....	38
4ème série : Etude de l'absorption racinaire par les racines adventives de la base de la tige	38
Absorption et migration du ^{86}Rb dans les boutures mononodales.....	38
Méthodes de comptages radioactifs.....	38
Techniques de culture <i>in vitro</i>	39
Explants de tige de <i>S. rostrata</i>	39
Explants de tige d' <i>A. afraspera</i>	40
Composition des milieux de culture.....	40
Prélèvement et la mise en culture des explants de tige.....	40

CHAPITRE - III - : ETUDE MORPHOLOGIQUE, ANATOMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES EBAUCHES RACINAIRES DE LA TIGE DE SESBANIA ROSTRATA	42
INTRODUCTION.....	43
RESULTATS.....	44
Ontogénèse des ébauches de racines adventives de la tige de <i>S. rostrata</i> .	44
Caractérisation de l'état physiologique des cellules des méristèmes racinaires.....	45
Visualisation de l'eau libre dans les ébauches de racines adventives.....	45
Mesures de potentiel hydrique dans les ébauches de racines adventives..	46
Distribution des teneurs en ADN des noyaux des cellules des méristèmes racinaires adventifs en cytofluorométrie	48
Analyse de l'activité mitotique dans les méristèmes racinaires présents dans les mamelons caulinares.....	50
Index mitotique dans les méristèmes racinaires.....	51
Microanalyse comparative des éléments minéraux présents dans les différents tissus du mamelons caulinares au CAMEBAX.....	52
Répartition graphique des éléments minéraux.....	52
Analyse quantitative de la répartition des éléments minéraux.....	56
Répartition spatiale des éléments minéraux à la microsonde électronique.....	57
Conclusion.....	57
III - DISCUSSION	57
CHAPITRE - IV - EVOLUTION DES EBAUCHES RACINAIRES DE S. ROSTRATA DANS L'EAU : ROLE DANS LA NUTRITION MINERALE DE LA PLANTE	64
I - INTRODUCTION.....	65
II - RESULTATS	66
Modifications cytophysiologiques liées au passage de l'état d'ébauches racinaires à l'état de racines adventives.....	66
Caractérisation de l'état physiologique des racines adventives de la tige de <i>S. rostrata</i>	67

Evolution du potentiel hydrique dans les racines adventives en cours d'élongation.....	67
Distribution des teneurs en ADN des noyaux des cellules méristématiques des racines adventives en cytofluorométrie.....	67
Index mitotique dans les méristèmes des R.A. en cours d'élongation.....	69
Etude expérimentale de la croissance des racines adventives	69
- Croissance des racines adventives sur des plantes entières (Marcottage).....	70
<i>Influence de quelques facteurs exogènes</i>	70
L'eau.....	70
La lumière	70
<i>L'influence de quelques facteurs endogènes : corrélations morphogénétiques régulant la croissance des racines adventives</i>	71
Le bourgeon terminal	71
Les feuilles	71
Croissance des racines adventives sur des boutures monodales (Bouturage).....	72
<i>Influence d'un facteur exogène : la lumière</i>	72
<i>Influence de quelques facteurs endogènes</i>	73
Les bourgeons axillaires et les feuilles	73
La position des boutures par rapport à l'apex de la tige de la plante mère	73
Le rôle des racines adventives dans la nutrition minérale de la plante	75
Mise en évidence	75
Etude de l'absorption et de la migration du ⁸⁶ Rb dans la plante	76
<i>Absorption des éléments radioactifs par les mamelons caulinaires sur de petits fragments de tige</i>	76
<i>Absorption et migration des éléments radioactifs dans les plantes entières</i>	77
Absorption par les ébauches de racines adventives en attente sur la tige.	77
Absorption par les racines séminales seules	79

Absorption simultanée par les deux systèmes racinaires du <i>S. rostrata</i> : Expérience de double marquage isotopique	82
Les les ébauches de racines adventives de la tige en attente	82
Les racines adventives à la base bien développées.....	85
Absorption par les racines adventives développées à la base des tiges privées de racines séminales	87
Absorption et migration du ^{86}Rb au niveau des boutures	89
Ebauches de racines adventives en attente.....	89
Racines adventives de l'entre-noeud inférieur développées	91
Conclusion	92
II - DISCUSSION.....	93
CHAPITRE - V - : EVOLUTION DES EBAUCHES RACINAIRES DE LA TIGE DE S. ROSTRATA EN B.A. : ETUDE COMPARATIVE AVEC LES EBAUCHES RACINAIRES DE LA TIGE D'A. AFRASPERA	97
I - INTRODUCTION.....	98
II - RESULTATS	98
Caulogénèse adventive chez <i>Sesbania rostrata</i>	98
Conditions expérimentales de la néoformation de bourgeons adventifs ...	98
<i>Influence de la taille des explants</i>	<i>98</i>
Fragments de tige de 2 cm de longueur.....	98
Fragments d'entre-noeuds sans bourgeon axillaire.....	99
Fragments de tiges avec bourgeon axillaire.....	99
Petits fragments de tige de 0,5 x 0,8 x 0,5cm.....	100
<i>Influence de la position de l'explant sur la tige-mère.....</i>	<i>101</i>
Néoformation de bourgeons adventifs	102
Reconversion du méristème racinaire en méristème caulinaire	102
Caulogénèse adventive chez <i>Aeschynomene afraspera</i>	105
Aspects morphologiques et histologiques.....	105

II - DISCUSSION	106
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES	110
ANNEXE	120
BIBLIOGRAPHIE	124

PLANCHE - I -

Fig. . - Bouture mononodale de *S. rostrata* cultivée en tube à essais. Noter l'important enracinement obtenu en 10 jours (n.f. : nouvelles feuilles).

Fig. . - Boutures mononadales de *S. rostrata* cultivées en lots sur une plaque de polystyrène flottant à la surface de l'eau. Les racines adventives sont bien développées et les bourgeons axillaires commencent à s'allonger (B.A. : bourgeon a. . .).

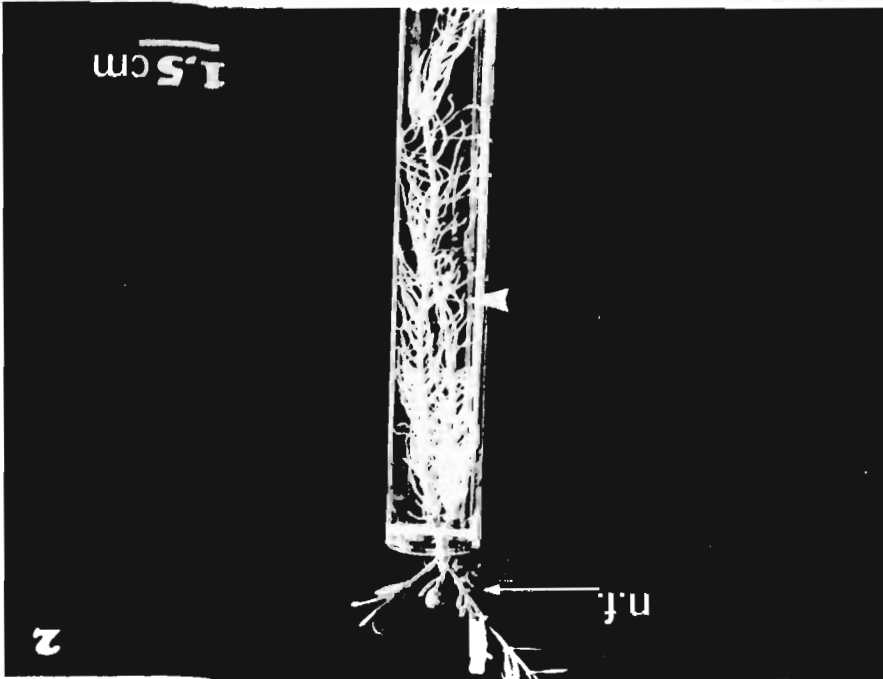
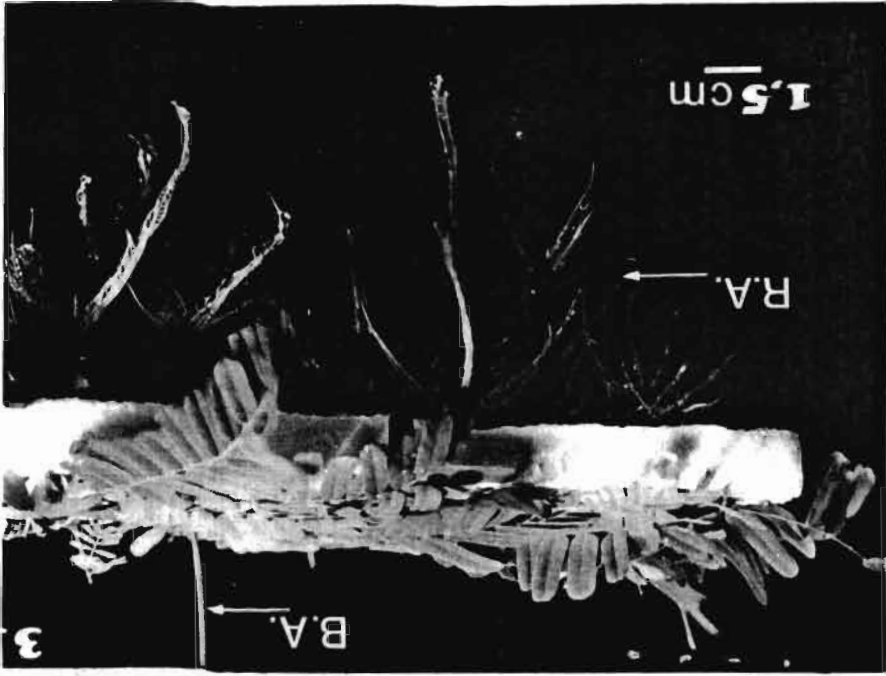


PLANCHE - II -

Fig. 11 - Tige de *S. rostrata* présentant deux génératrices de mamelons caulinaires (—▶).

Fig. 12 - Tige de *S. rostrata* présentant des nodules caulinaires (▶).

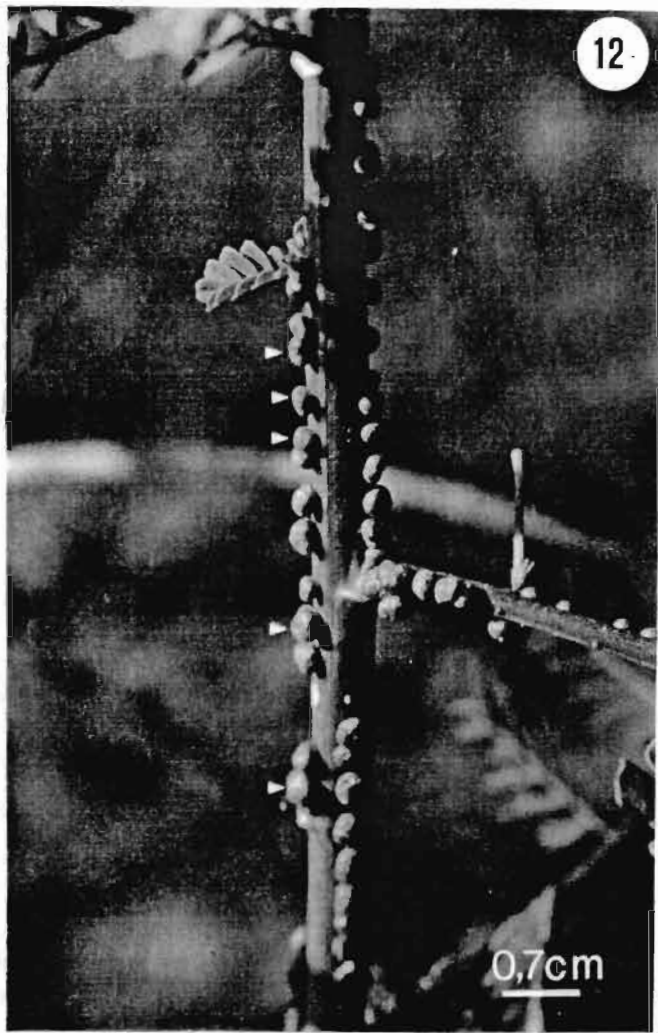


PLANCHE - III-

Fig. 13 - Le jeune mamelon caulinaire des zones apicales d'une tige de *S. rostrata* se présente sous la forme d'un petit renflement de l'épiderme de la tige (→).

Fig. 14 - Le mamelon caulinaire à maturité , avec son dôme épidermique (d.e.) percé en son centre par l'apex d'une ébauche de racine adventive (E.R.A.).

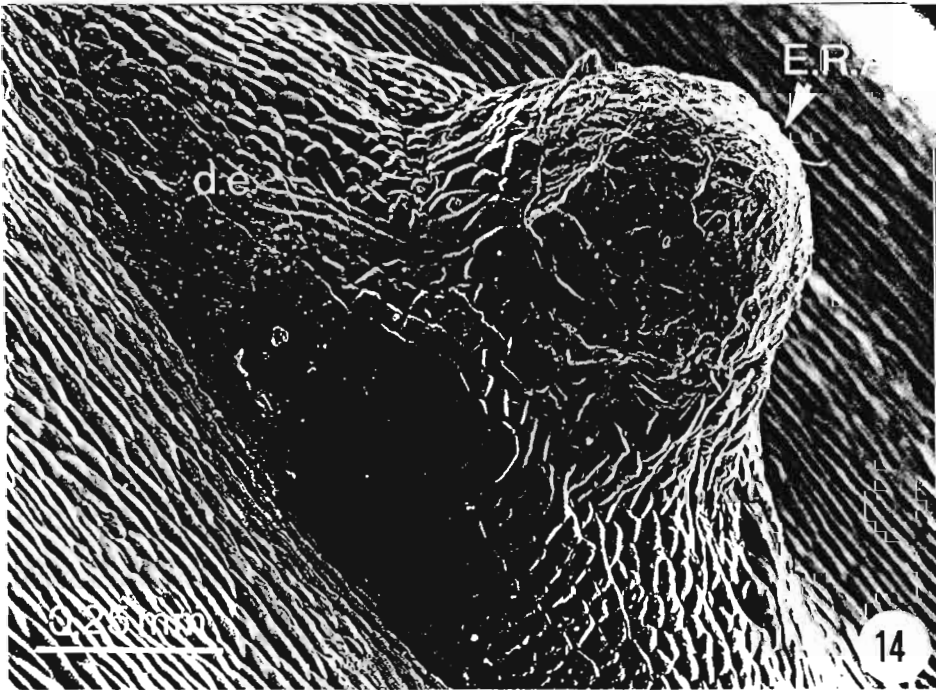


PLANCHE - IV -

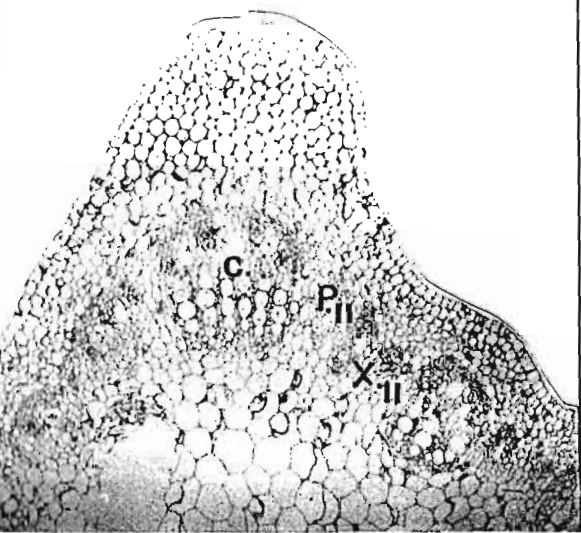
Fig. 15 - Coupe transversale d'une tige de *S. rostrata* au niveau du 3^{ème} entre-noeud. Noter la présence du cambium (c.) et de quelques assises de formations secondaires (X II et P II).

Fig. 16 - Les cellules initiales de l'ébauches de racine adventive. Les divisions apparemment anarchiques (►) vont s'orienter pour donner naissance à un méristémoïde qui s'organisera peu à peu (P. : phloème ; c. cambium).

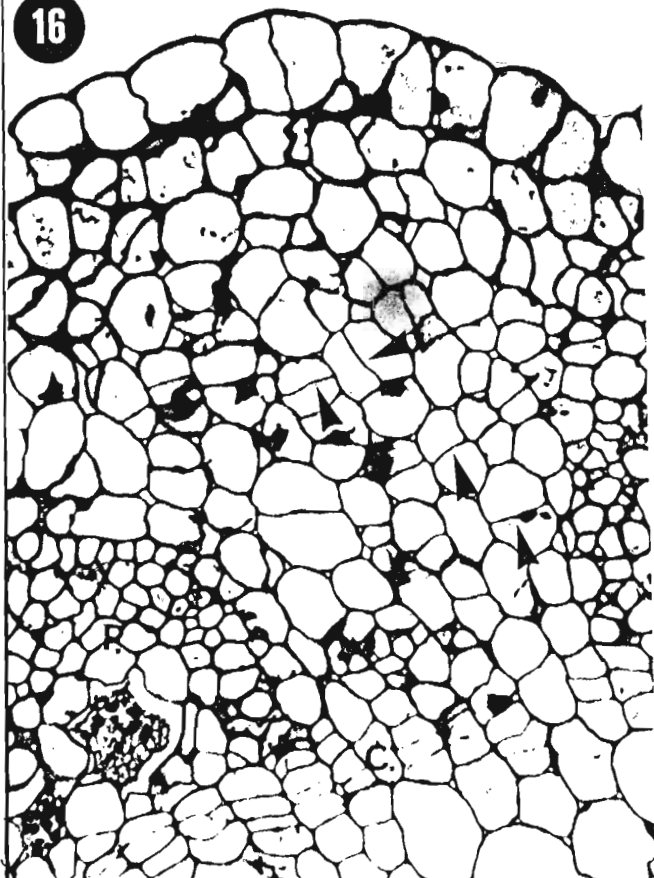
Fig. 17 - Les divisions cellulaires orientées aboutissent à la formation d'un massif méristématique en demi-lune : le champ morphogénétique de la future racine. Dans la zone interne noter l'élongation des cellules qui deviendront les trachéides (t.).

Fig. 18 - Les cellules de la coiffe (c.) sont en cours de différenciation à partir de la zone calyptrogène (►). Le cordon vaculaire (c.v.) bien différenciée est en relation directe avec la stèle de la tige (s).

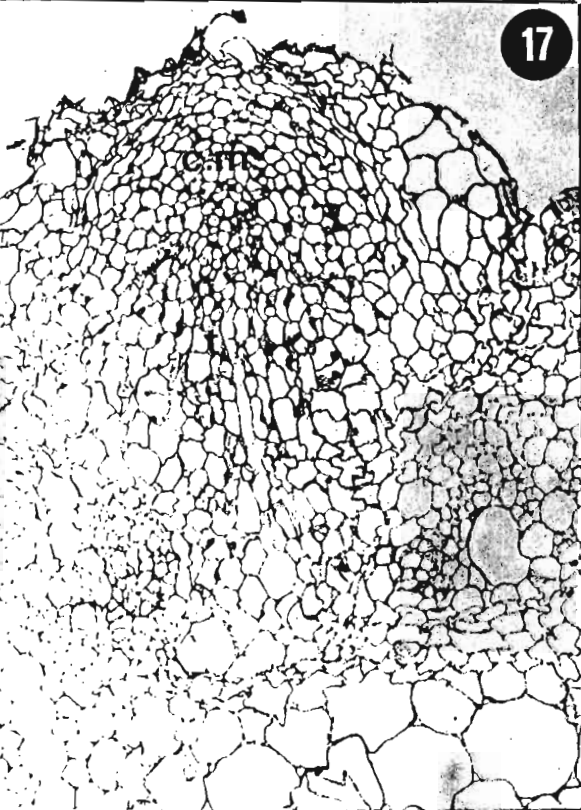
15



16



17



18

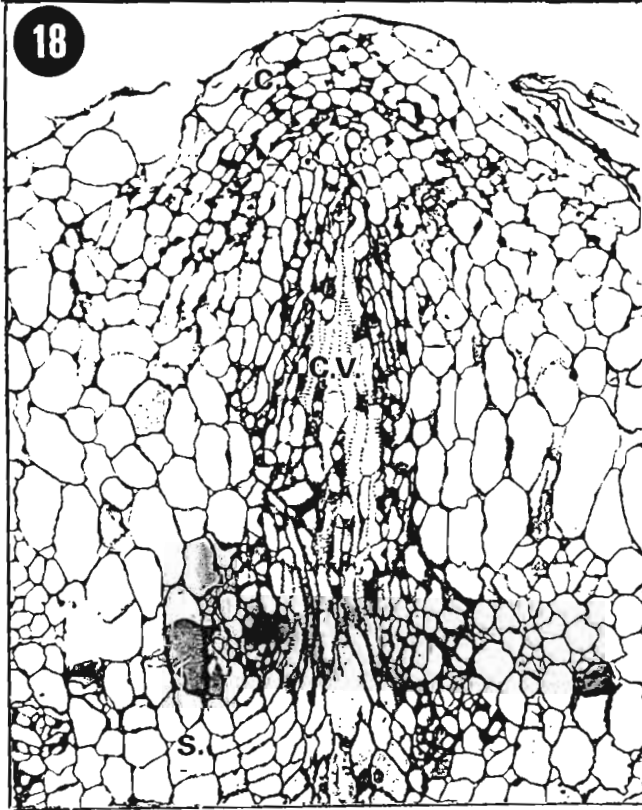


PLANCHE -V-

Fig. 19 - Coupe anatomique transversale d'une tige de *S. rostrata* au niveau des mamelons caulinaires :



- crêtes de collenchyme



- anneau de sclérenchyme



- tissus conducteurs



- parenchyme médullaire

Fig. 20 - Image en RMN de la répartition en eau libre de cette même tige en vue ransversale.

Fig. 21 - Coupe anatomique transversale d'une tige de *S. rostrata* nodulée (N.C.) (légende: cf. plus haut).

Fig. 22 et 23 - Image de la même tige en RMN en vue transversale et longitudinale : les nodules se distinguent nettement par une forte brillance (N.C. et ►).

Fig. 24 - Spectre de la répartition del'eau le long d'un fragment de tige de *S. rostrata* nodulée.

19



0,75 cm

20

TOMIKON
CESBANIA

IRMBM GRENOBLE
22-12-87 11:45
S 1, E 1
F/L

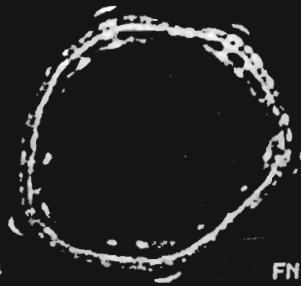
UT 506

0,75cm

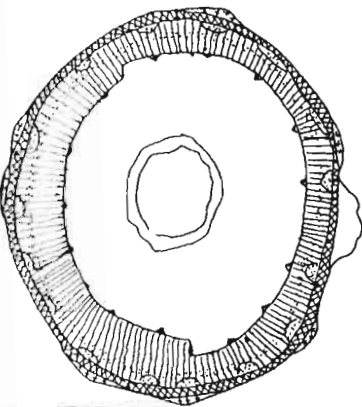
MSME
S: 1
D: 0
T: 2034/ 34

LT 13

FN: CESB0304
1001



21



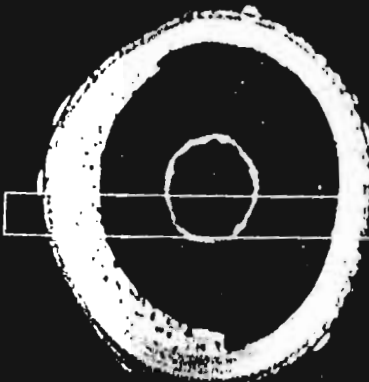
N.C.

0,5cm

22

SLTH: 1.46 mm
SSDI: 4.38 mm
ICDI: -2.50 mm

FOV: 2.00 cm
SO: CS/ 0



N.C.

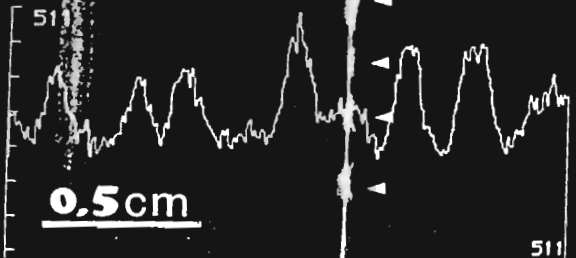
0,5cm

23

0,5cm

24

X=298



0,5cm

511

PLANCHE VI

Fig. 27 - Coupe longitudinale d'un mamelon caulinaire.

c.m. : cellules méristématiques
co. : cortex
c. v. : cordon vasculaire
d.e. : dôme épidermique

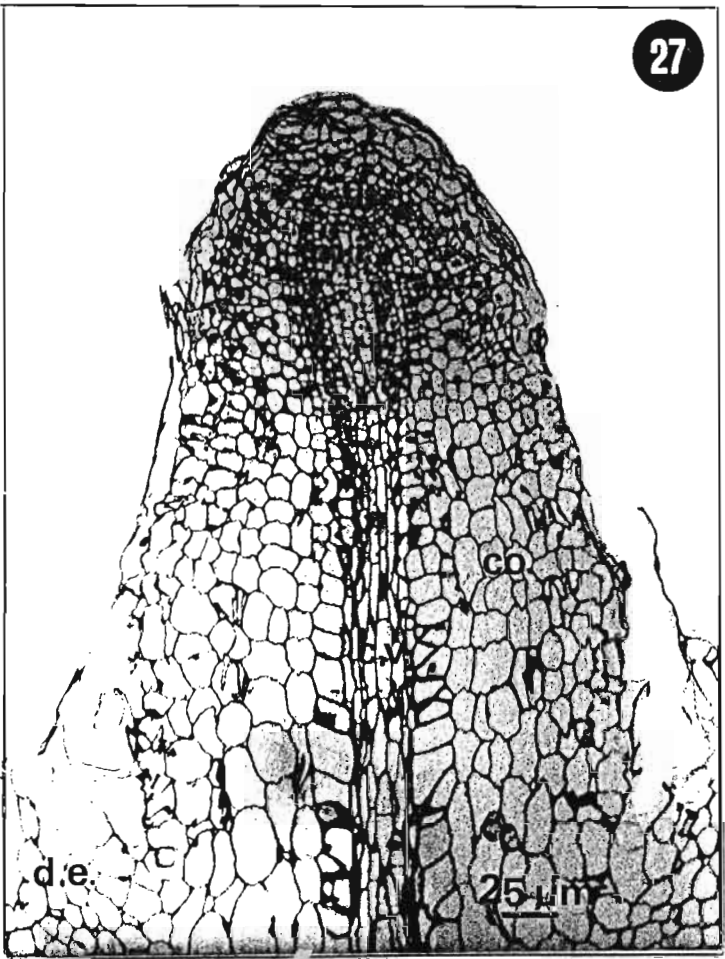


PLANCHE VII

Fig. 28 - Zone méristématique de l'ébauche de racine adventive. Les cellules isodiamétriques de petite taille (16 μ m) ne présentent pas de figures de mitoses. Les noyaux sont quiescents, le cytoplasme dense et réduit.

Fig. 29 et 30 - Microphotographie de cellules du méristème racinaire. Le nucléole est bien compact (nu.), la chromatine fibrillaire, et les organites peu structurés (c. : chloroplaste ; mi. : mitochondrie ; v. : vacuole ; p.p.c. : paroi pectocellulosique).

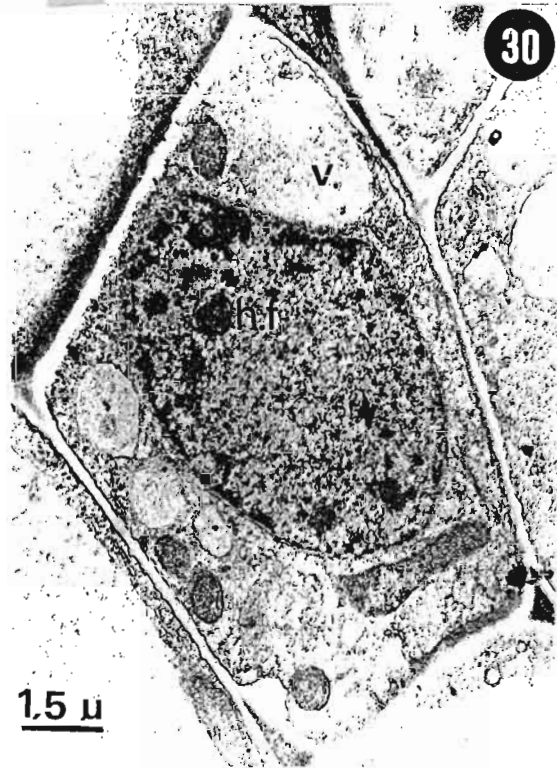
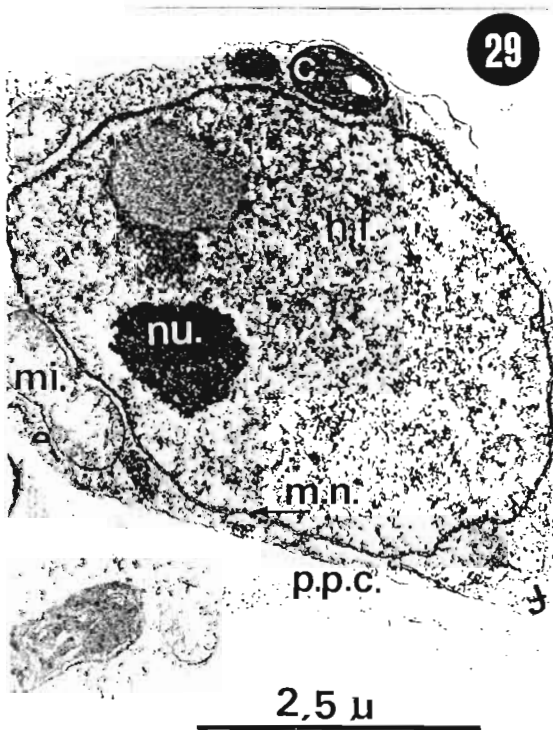
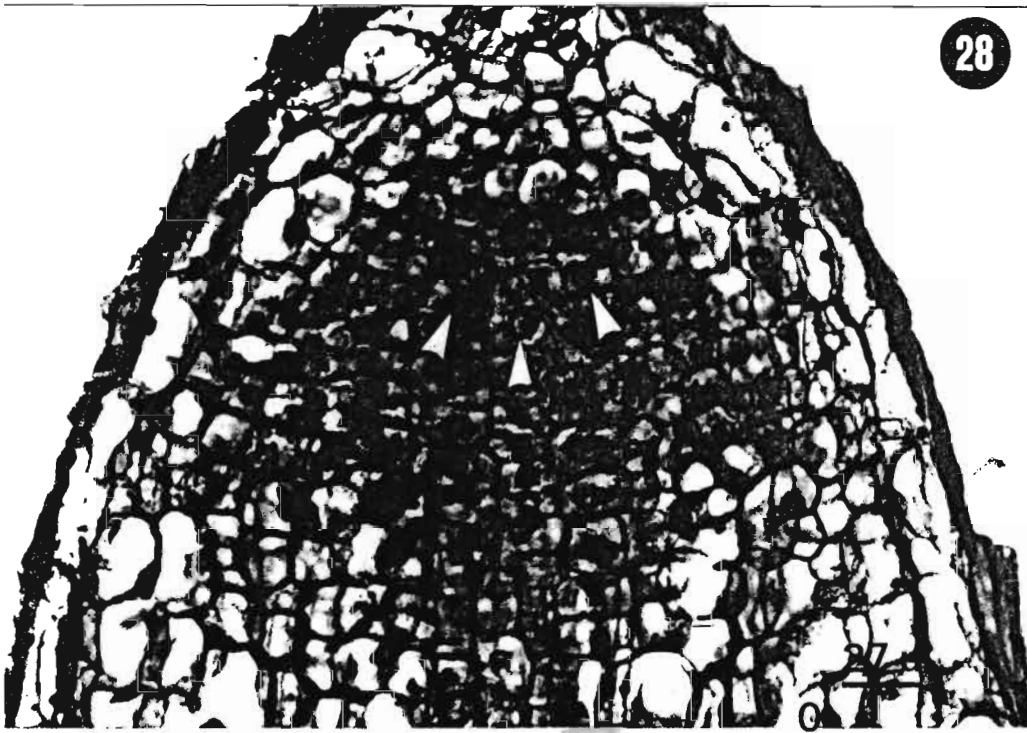


PLANCHE - VIII -

Fig. 37 - Sur une tige de *S. rostrata* ayant séjourné quelques jours dans l'eau des racines adventives plus ou moins ramifiées se sont développées (R.A.), quelques ébauches sont encore à l'état latent dans les mamelons caulinares (M.C.).

Fig. 38 - Vue d'une population naturelle de *S. rostrata* à la fin de la saison des pluies, après le retrait de l'eau du marigot. Noter la présence d'un important cheveu racinaire (R.A.).

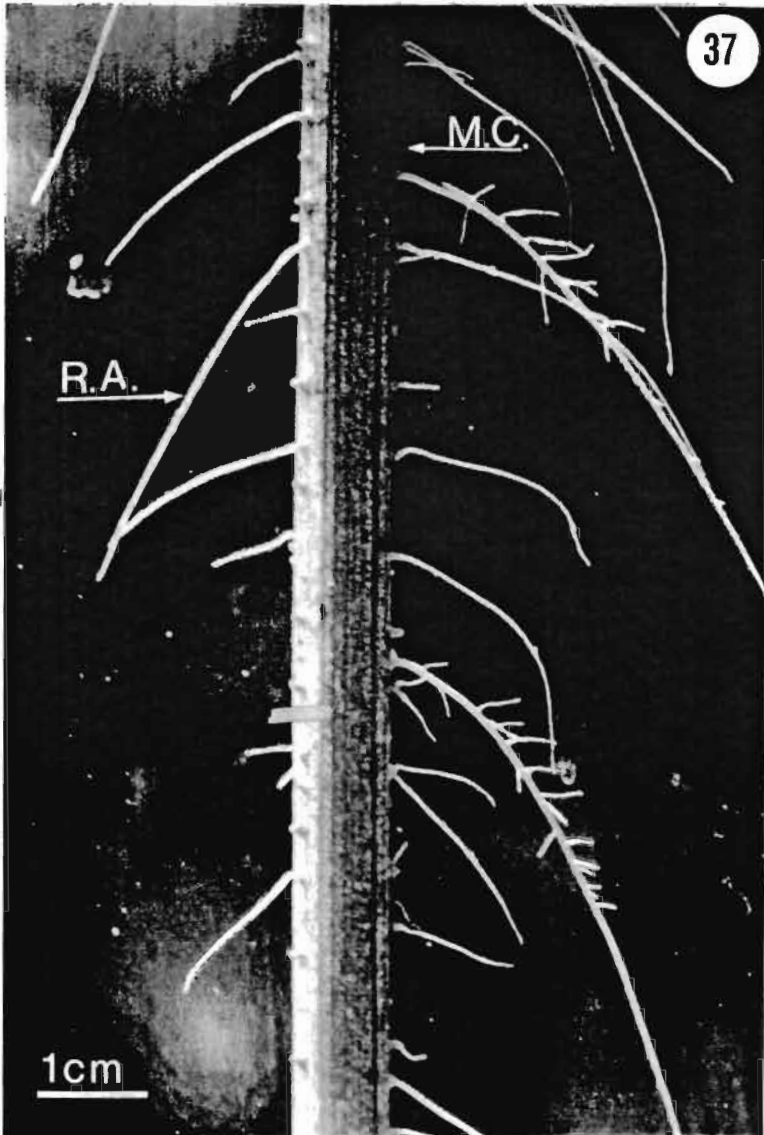


PLANCHE -IX-

Fig. 51 - Bourgeons adventifs (B.A.) néoformés sur un fragment d'entre-noeud de *S. rostrata* cultivé *in vitro* sur milieu M.S. sans adjonction de régulateurs de croissance. Noter la disposition de ces bourgeons sur le même alignement que les mamelons caulinaires (M.C.).

Fig. 52 - Bourgeons adventifs néoformés sur un fragment d'entre-noeud de *A. afrspera* cultivé *in vitro* sur milieu M.S. sans régulateurs de croissance (B.A.).

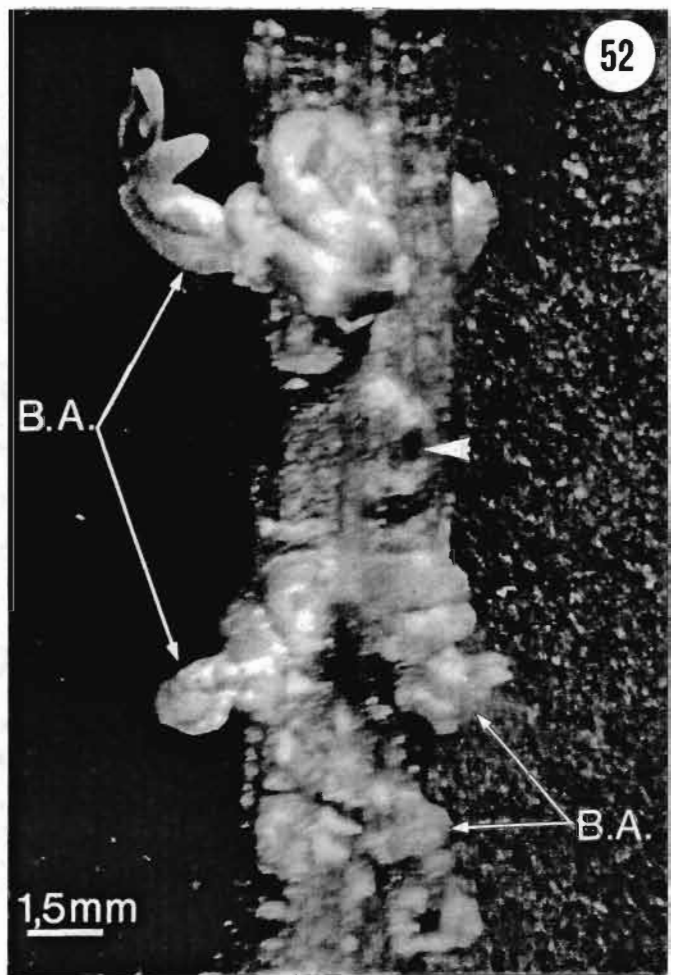
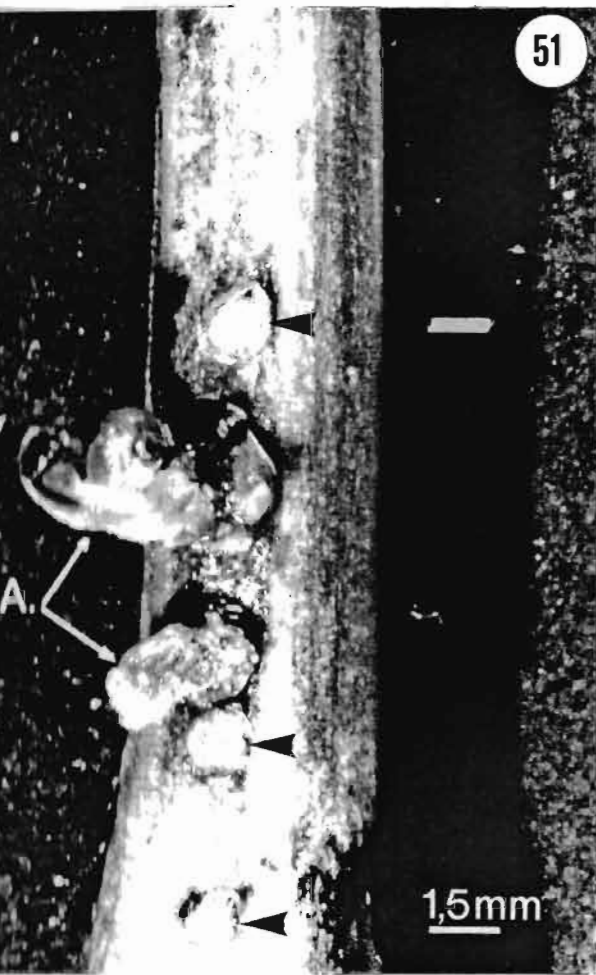


PLANCHE - X -

Fig. 53 - Potentialités morphogénétiques des petite fragments (0,5 x 0,3 x 0,8 cm) cultivés *in vitro*. Selon la nature du régulateur de croissance exogène additionné au milieu M.S, la réponse pmorphogénétique est différente.

- **53 a** - En présence d'ANA, formation soit d'un cal, soit d'un cal rhizogène.

- **53 b** - Enprésence de kinétine ou de BAP, formation de bourgeons adventifs néoformés (avec ou sans cal intermédiaire).

- **53 c** - En présence de GA₃ , formation de bourgeons adventifs dont les tiges sont très longues et grêles.

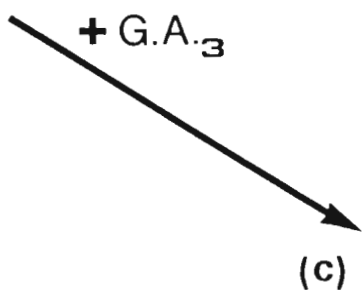
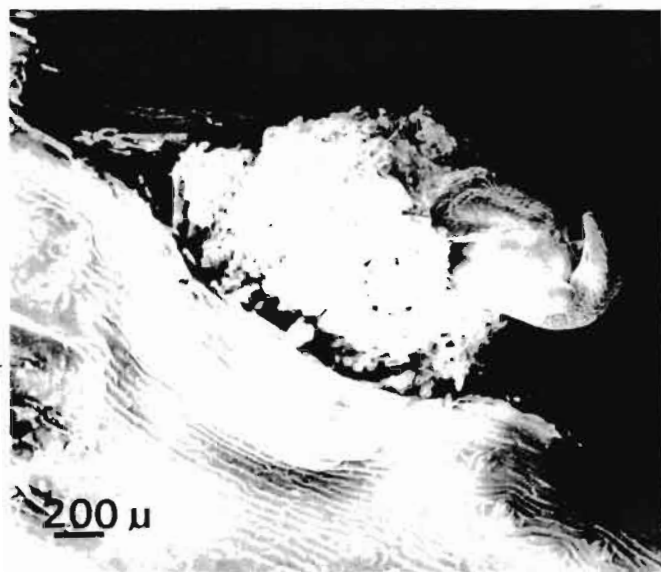
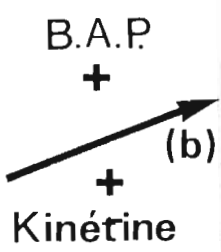
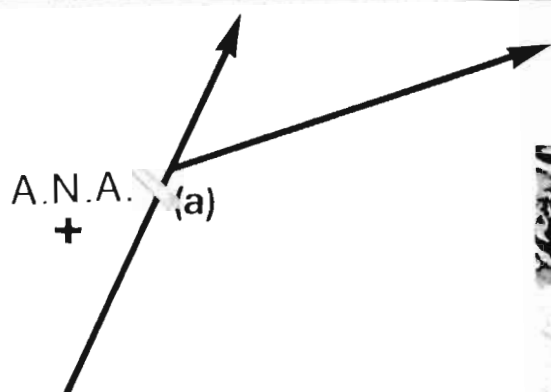
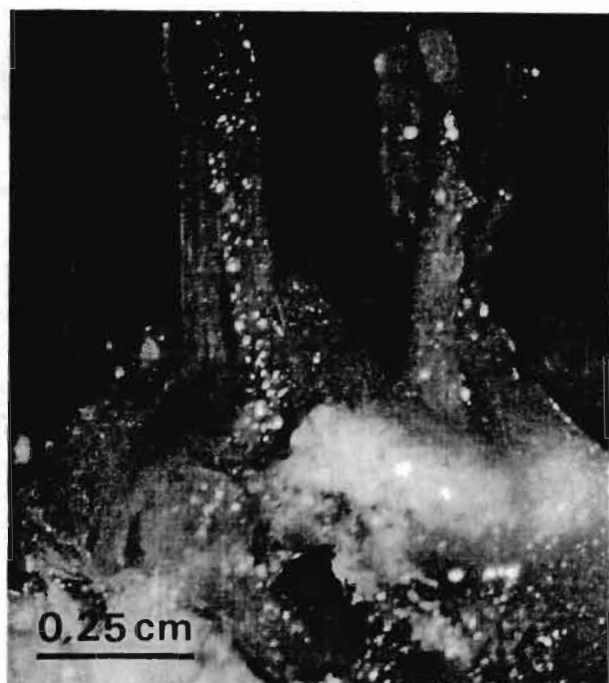
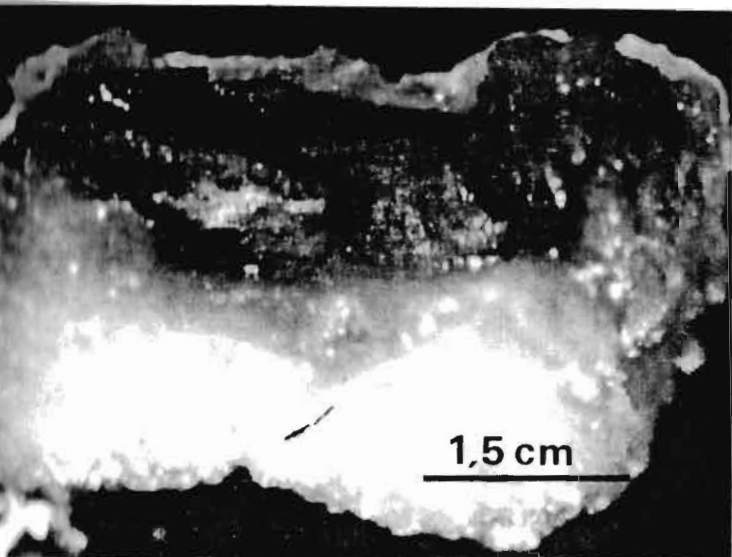


PLANCHE - XI-

Fig. 55 - Microscopie électronique à balayage. aspect d'un mamelon caulinaire dans la deuxième semaine de culture *in vitro*. Le dôme épidermique (d.e.) prend une forme sub-cylindrique pendant que l'ébauche racinaire(E.R.A. s'affaisse.

Fig. 56 - Aspect d'un mamelon caulinaire au microscope optique au 12^{ème} jour de culture *in vitro*. L'ébauche racinaire est complètement affaissé, noter la présence des débris calyptraux(d.c). Sur le côté apparaît un renflement très net (*).

Fig. 57 - Coupe longitudinale d'un mamelon caulinaire au 12^{ème} jour de culture *in vitro*. Les différents territoires racinaires sont encore visibles, mais certaines structures sont absentes comme la coiffe. Sur un côté on note la présence d'un important massif méristématique (*).

Fig. 58 - Détail de la zone méristématique caulinaire.

d.c. : débris calyptraux
c.v. : cordon vasculaire
m.c. : méristème caulinaire
co. cortex de l'ébauche racinaire.

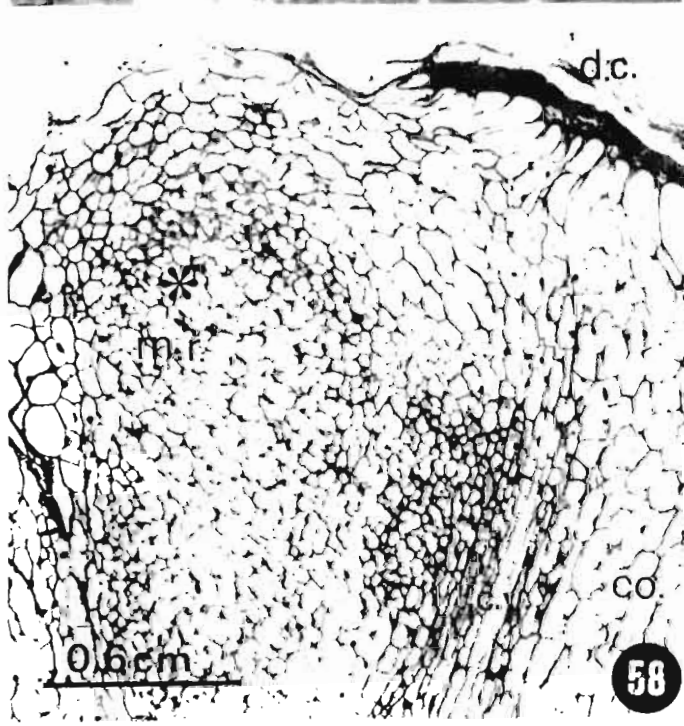
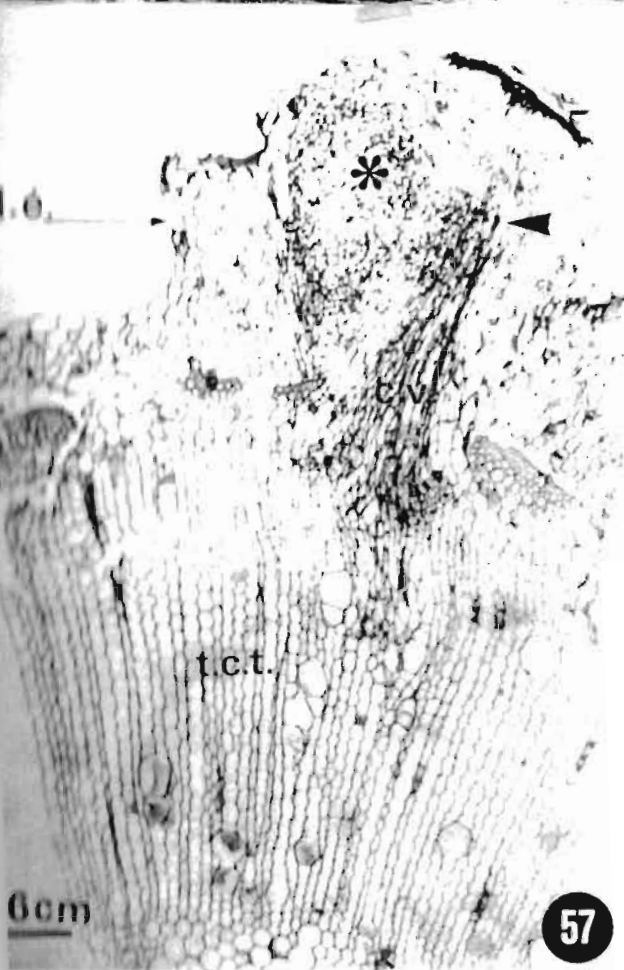
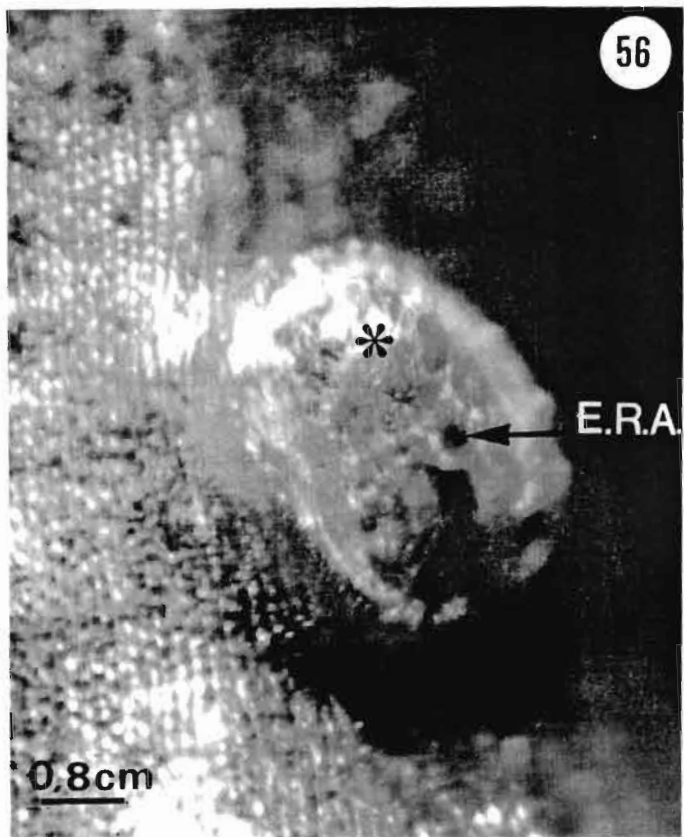


PLANCHE - XII -

Fig. 59 - Coupe longitudinale d'un mamelon caulinaire en cours de reconversion. Le massif méristématique (m.m.) latéral est bien distinct, avec de petites cellules isodiamétriques en position sous apicale. (d.e. : dôme épidermique).

Fig. 60 - Détail de la zone apicale.

La coupe axiale du massif méristématique en cours de formation montre que les divisions s'orientent perpendiculairement à la surface () de manière à donner naissance à un méristème caulinaire. La zone dense correspond aux débris cellulaires de la coiffe qui est alors totalement désorganisée.

Fig. 61 - Le bourgeon végétatif émerge au début de la 3^{ème} semaine. Noter (►) le niveau de raccordement entre l'épiderme du bourgeon néoformé et le dôme épidermique du mamelon caulinaire.

Fig. 62 - Pousse feuillée (p.f.) formée in vitro sur un fragment d'entre-noeud de *S. rostrata* cultivé sur milieu M.S. sans régulateurs de croissance. Noter également le développement d'une racine adventive (r.a.).

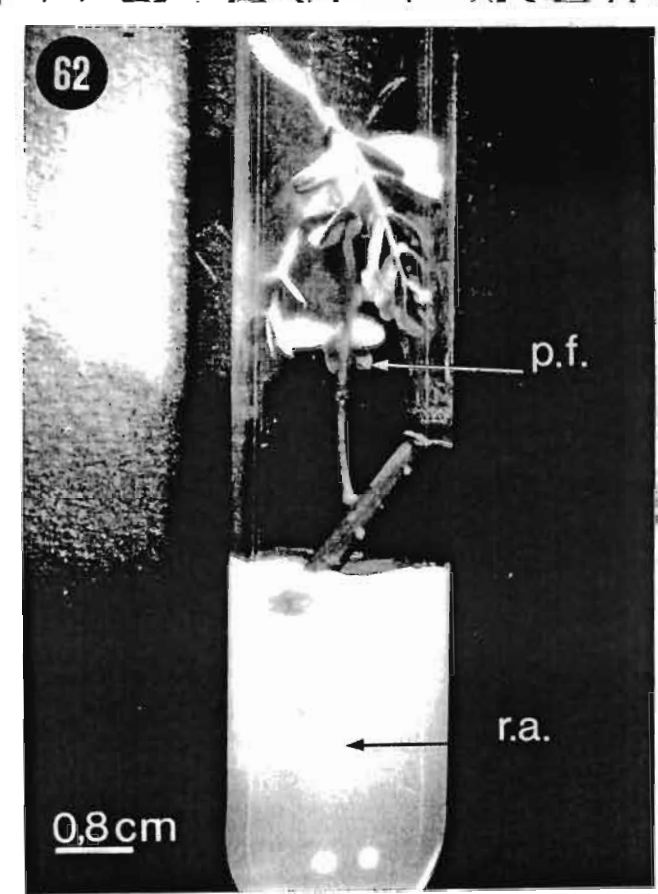
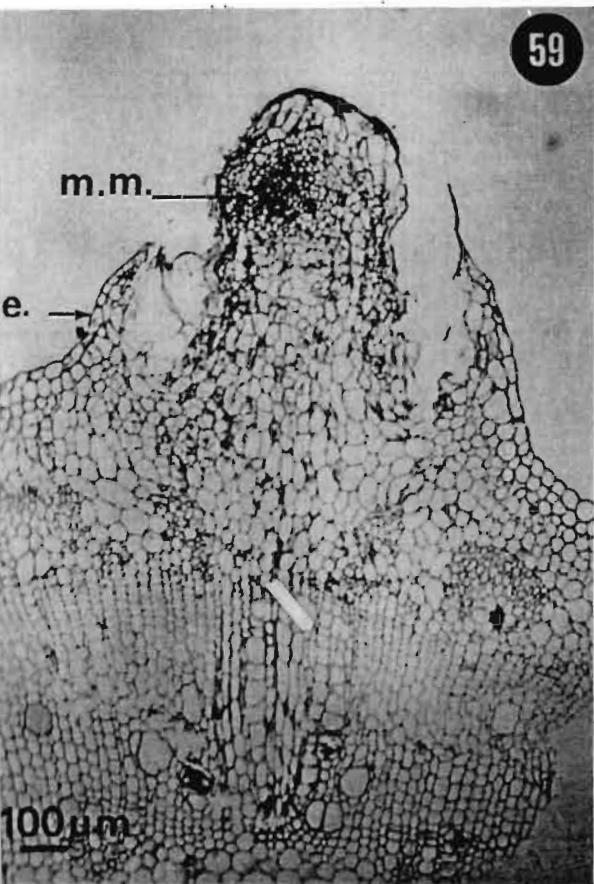


PLANCHE - XIII -

Fig. 63 - Développement de deux pousses feuillées (p.f.) d'*Aschynomene afraspera in vitro* sur milieu minéral de base M.S. sans adjonction de régulateur de croissance. Noter la présence de racines adventives (r.a.).

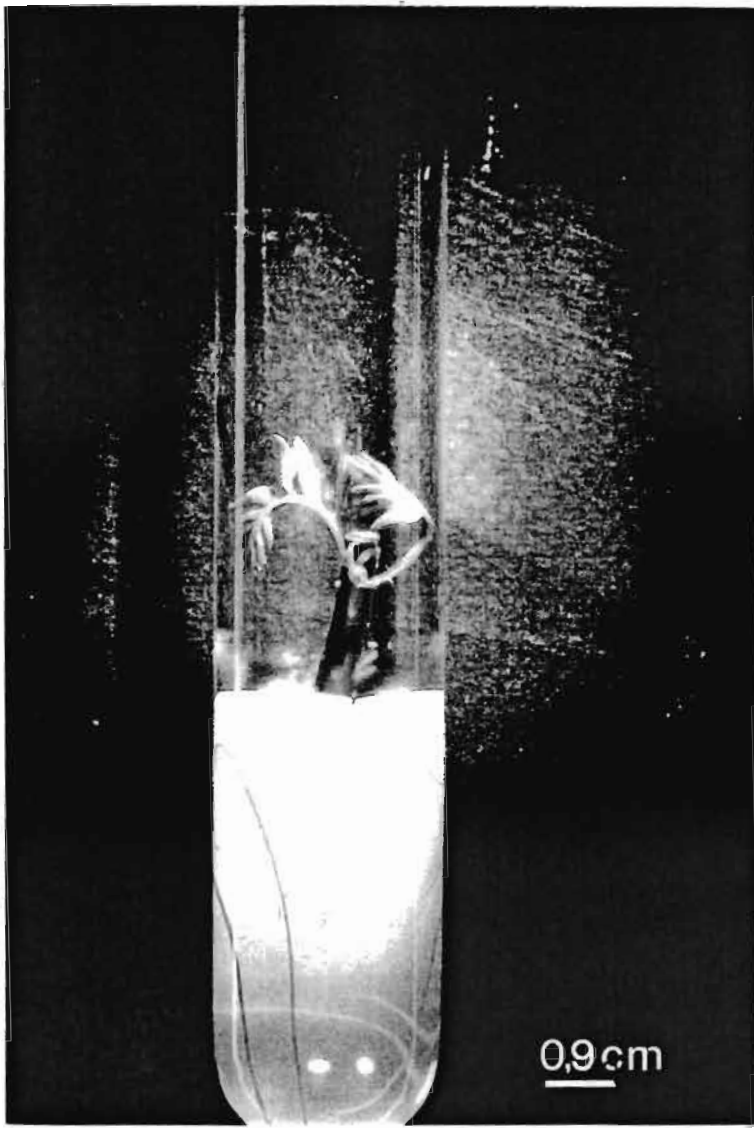


PLANCHE -XIV -

Fig.64 - Le mamelon caulinaire de *A. afraspera* au début de la 2^{ème} semaine de culture *in vitro*. L'ébauche racinaire () est très affaissée , le renflement épidermique latéral par contre est très proéminent (r.e.l.)

Fig.65 - Les premières ébauches foliaires(e.f.) émergent des tissus du mamelon caulinaire (r.e. : renflement épidermique) entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour de culture *in vitro*.

Fig. 66 - Au début de la 3^{ème} semaine de culture , de nombreux bourgeons adventifs (B.A.) sont observables sur le mamelon caulinaire.L'ébauche de racine adventive(E.R.A.) est encore perceptible latéralement.

Fig. 67 - Trois bourgeons adventifs (B.A.) en cours de développement sur un mamelon caulinaire d'*A. afraspera*.

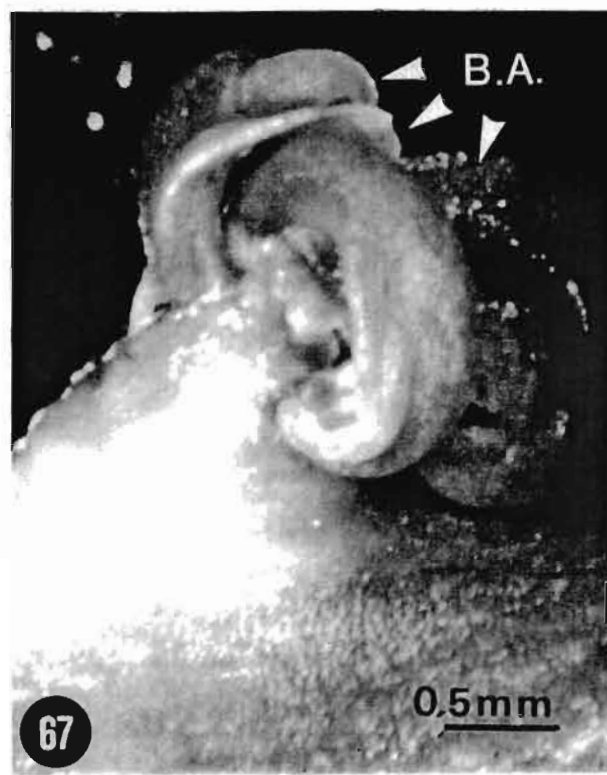
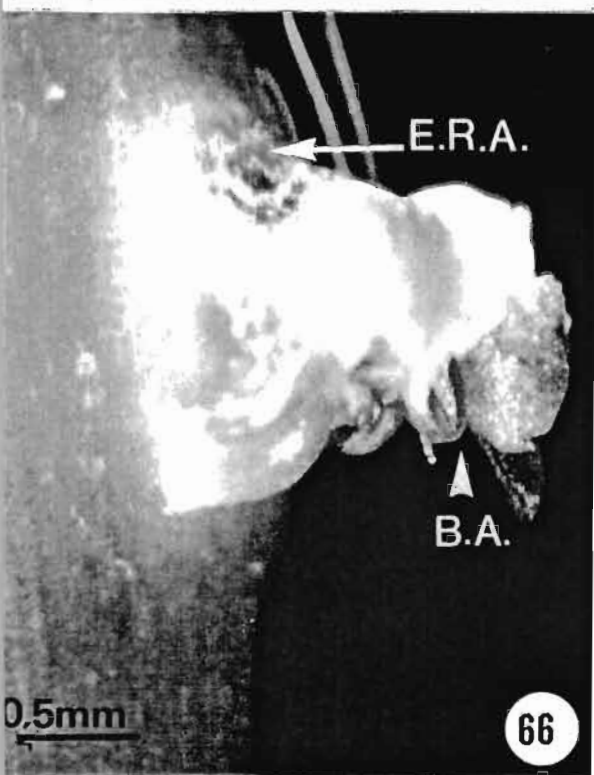
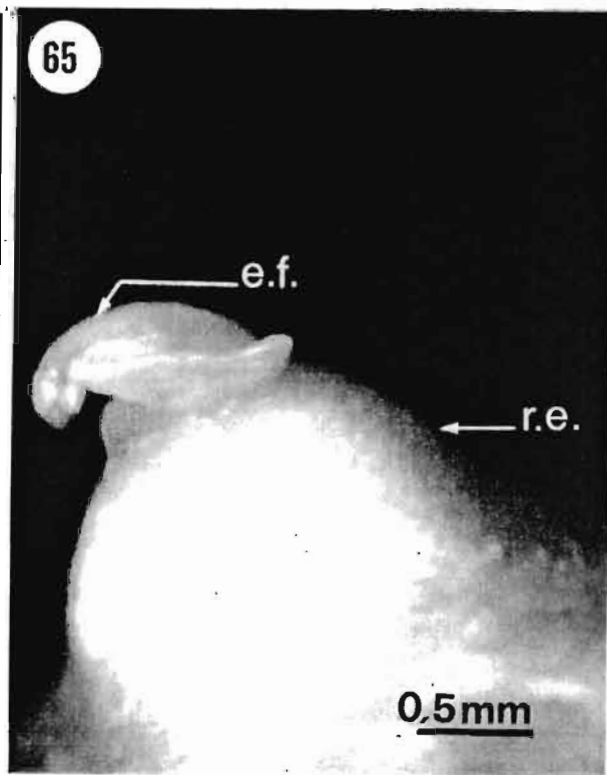
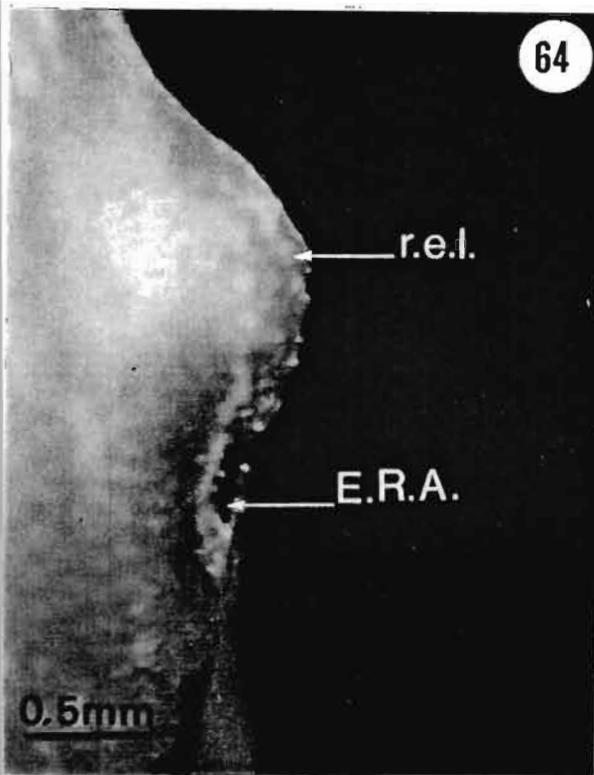


PLANCHE - XV -

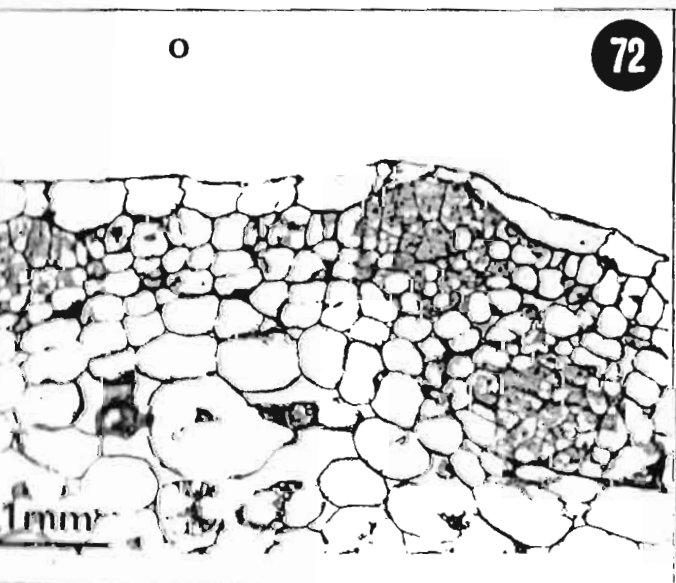
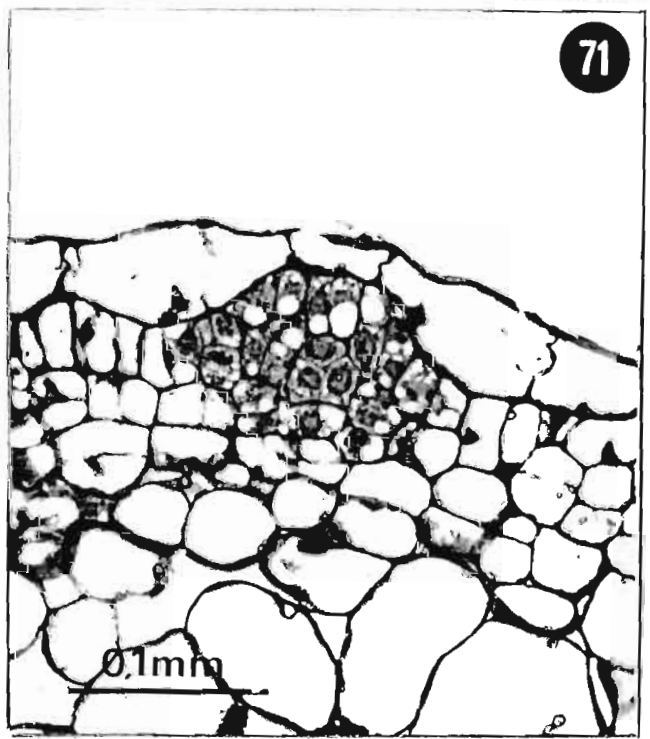
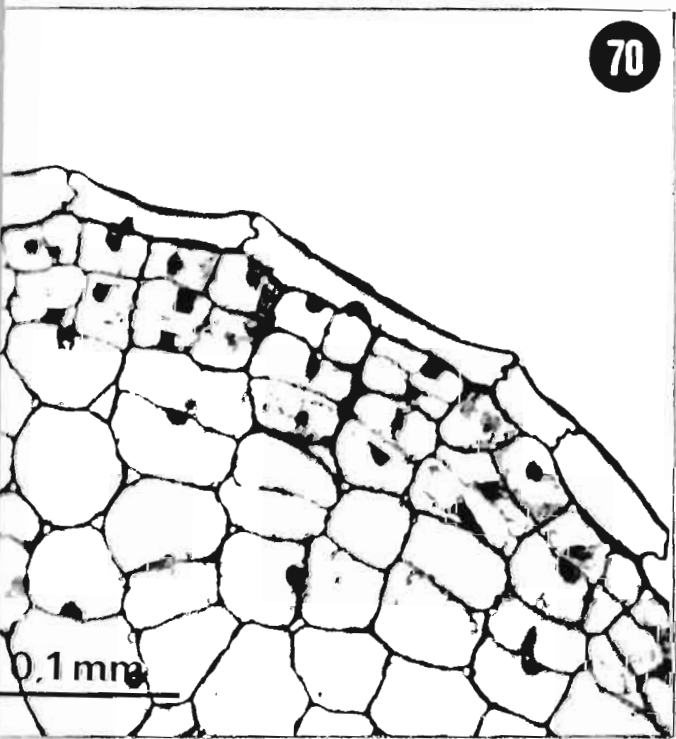
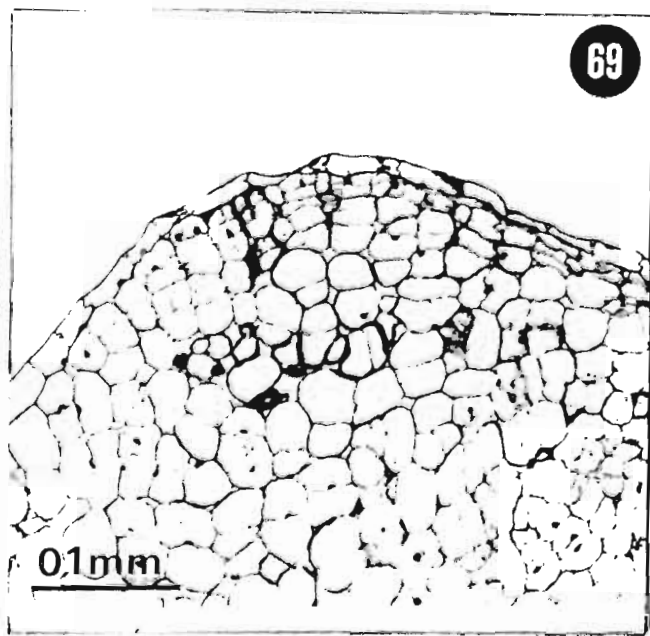
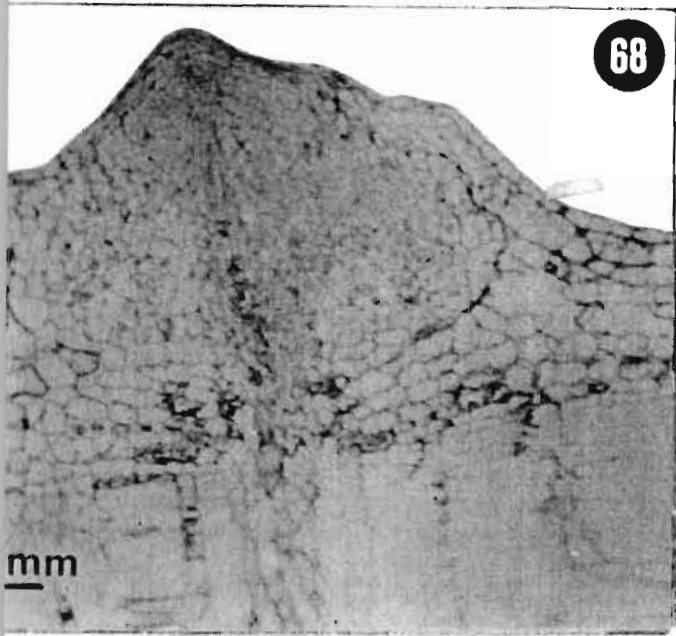
Fig. 68 - Coupe longitudinale d'un mamelon caulinaire d'*A. afraspera* au moment de la mise en culture. L'ébauche de racine adventive (E.R.A.) est en position centrale par rapport aux deux renflements épidermiques latéraux (r.é.l.).

Fig. 69 - Coupe axiale du mamelon caulinaire d'*A. afraspera* au niveau du renflement latéral observé en début de culture *in vitro*. Des divisions mitotiques (►) sont observables en position sous épidermique.

Fig. 70 - Détail de la zone périphérique d'un renflement épidermique latéral en cours d'évolution. Noter les nombreuses divisions

Figs 71 et 72 - Massifs méristématiques formés au niveau d'un mamelon caulinaire d'*A. afraspera*. Les cellules sont isodiamétriques avec de gros noyaux, un cytoplasme granuleux et de petites vacuoles.

Fig. 73 - Jeune bourgeon néoformé au niveau d'un mamelon caulinaire d'*A. afraspera* en culture *in vitro* sur un milieu minéral de base M.S sans régulateurs de croissance (é.f.).



Titre : Les ébauches de racines adventives de la tige de *Sesbania rostrata* Brem (Leguminosae) : étude cytophysiologique avant et après leur développement.

Nom du candidat : Marie Madeleine SPENCER-LOPES

Nature du Mémoire : Thèse de Doctorat ès Sciences

Jury : Président Professeur Amadou Tidiane BA
Membres Professeur Emile DUHOUX (Directeur de thèse)
Docteur André CHAMEL
Docteur Bernard DREYFUS
Professeur Anatole NONGONIERMA
Docteur Mouhamadou Lamine THIAM

Résumé : *Sesbania rostrata* Brem est une légumineuse tropicale annuelle qui porte de nombreux nodules fixateurs d'azote sur la tige. Ces nodules se forment après infection par *Azorhizobium caulinodans* de sites préformés. Les études histologiques entreprises dans le présent travail, ont permis de montrer que ces sites de nodulation sont en fait des ébauches de racines adventives à un stade de différenciation avancé. Les paramètres cytophysiologiques ci-après, ont été étudiés pour caractériser l'état de latence assez inhabituel de ces ébauches de racines adventives : le potentiel hydrique, la répartition de l'eau libre (RMN du proton), la distribution des taux d'ADN et l'index mitotique dans les noyaux des cellules méristématiques racinaires. Lorsque la tige séjourne quelques temps dans l'eau, les ébauches racinaires se développent en racines adventives typiques. L'utilisation des isotopes radioactifs ^{86}Rb et ^{134}Cs a permis de mettre en évidence le rôle de ces structures dans la nutrition minérale de la plante. Et enfin, la culture *in vitro* de fragments d'entre-nœuds sur un milieu nutritif de base sans régulateurs de croissance a révélé que ces ébauches de racines adventives possèdent des potentialités morphogénétiques originales comme la possibilité de reconversion de méristèmes racinaires en méristèmes caulinaires.

Mots Clés : *Sesbania rostrata*, racine adventive, quiescence, absorption minérale, reconversion méristématique.

Abstract : *Sesbania rostrata* Brem is an annual tropical legume which forms nitrogen-fixing nodules on the stem, after infection by the *Azorhizobium caulinodans*. Histological studies undertaken on the preformed sites showed that they were in fact adventitious root tips. In order to characterize the physiological stage of these root tips, various factors involved in dormancy are studied: water potential, lack of free water (RMN), cytodensimetric measurements of nuclear DNA contents and mitotic index. Application of radioisotopes ^{86}Rb and ^{134}Cs pointed out that these lateral root tips are able to absorb mineral nutrients from surrounding media, and therefore, are involved in the mineral nutrition of the whole plant. Excised internodal segments of *S. rostrata* cultured on a nutrient medium without growth regulator formed numerous buds. The results presented in this work showed that these adventitious root tips were characterized by original morphogenetical capabilities as the transformation of the root meristem onto a bud meristem.

Key Words : *Sesbania rostrata*, adventitious root, mineral absorption, meristematic reconversion.