©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 18	Fasc. 3—4	145—164	18. 5. 1978

Données sur les processus de "nitellisation" chez *Chara vulgaris*

Par

Jean Moutschen *)

Résumé

Nous avons mis au point un procédé permettant la „nitellisation" de *Chara vulgaris* par changements de conditions de culture. Le processus de „nitellisation" se subdivise en 5 phases bien distinctes: 1. phase d'abolition progressive des mitoses, 2. des modifications des phylloïdes, 3. la perte totale de la cortication, 4. une phase de stabilisation et 5. une phase de restauration de certains processus tels que la réapparition de bourgeons latéraux et d'organes sexuels mâles.

Les modifications nucléaires pendant les cycles amitotiques ont été étudiées en détail au cours de ces phases et tout spécialement pendant la période de stabilisation, à la fois par mensuration volumétrique et par colorimétrie photographique. Ces données soulignent une fois de plus l'intérêt du matériel „nitellisé" dans les études de Biologie aux niveaux cellulaire et moléculaire.

Summary

A method allowing to induce „nitellisation" processes in the alga *Chara vulgaris* by changes of the medium has been described. The „nitellisation" processes can be subdivided in 5 phases: 1. decrease of the mitotic index, 2. modifications of branchlets, 3. loss of cortication, 4. period of stabilisation and 5. phase of recovery of some processes such as lateral budding and antheridia.

Nuclear modifications during the amitotic cycles have been investigated in detail, especially during the stabilisation period by volume measurements and photographic colorimetry. The data emphasize once more the interest of the „nitellised" material in cellular and molecular investigations.

---

*) Prof. Dr. J. Moutschen, Université de Liège, Laboratoire de Génétique, 15, rue Forgeur, B-4000 Liège.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

1. Introduction

Il est bien connu que la morphogenèse des Charophytes est fortement influencée par les conditions écologiques. Ainsi, l'absence de courant d'eau, la réduction de l'intensité lumineuse et l'appauvrissement du milieu, peuvent produire diverses anomalies morphologiques, notamment des modifications des processus de cortication ainsi que des plantes à prédominance monosexuelle. L'ensemble de ces modifications désignées par GOEBEL (1918) sous le nom de „Nitellisierung" (que nous traduisons par „nitellisation") est réputé fréquent chez certaines espèces de *Chara* (GIESENHAGEN 1908). Elles consistent globalement en réductions de diverses structures qui font qu'au bout d'un certain temps, les spécimens prennent davantage l'apparence de *Nitella*. Ces modifications sont mentionnées dans GOEBEL (1918). Les plantes „nitellisées" se montrent favorables à l'étude des courants cytoplasmiques ainsi qu'au développement des anthéridies. Au cours d'une recherche précédente, nous avons montré que ces plantes se prêtent bien à diverses études de Biologie cellulaire au moléculaire (MOUTSCHEN 1976, 1977) et pourront continuer à être utilisées à cet effet dans l'avenir. Il était cependant nécessaire au préalable de s'assurer de la reproductibilité expérimentale des processus de „nitellisation" et de décrire en détail les changements, tout particulièrement de la morphologie nucléaire qui surviennent au cours de ce processus.

2. Matériel et Méthodes

Les spécimens de *Chara vulgaris* ont été récoltés dans les serres du Jardin Botanique de l'Université de Liège où ils sont acclimatés depuis des années. Ils sont tout d'abord abondamment lavés à l'eau courante puis transférés en aquarium pendant quelques semaines dans les conditions suivantes: intensité lumineuse 5000 lux/16 hrs, température 20—22° C, renouvellement de l'eau (stérile) deux fois par semaine. Pendant une période s'étalant sur 10 semaines, une partie progressivement croissante du milieu est remplacée par du milieu de Dangeard stérile, dilué au tiers. En voici la composition: $Ca(NO_3)_2$ 1 g,. KH_2PO_4 0,25 g, $MgSO_4$. $7H_2O$ 0,25 g, $CaCl_2$ 0,12 g, $FeCl_3$ traces (environ 100 ppm) pour 3 litres d'eau distillée. Chaque semaine, on remplace 1/10 de la quantité du milieu par le même volume de ce milieu dilué, de sorte qu'au bout de 10 semaines les plantes se trouvent dans le milieu de Dangeard dilué au 1/3..

Cette stérilisation du milieu ainsi que les modifications des concentrations en sels minéraux aboutissent généralement à un état relativement axénique où *Chara* seul survit. Les *Chara* sont alors maintenus de manière permanente, dans les conditions suivantes: 20—22° C, 5000 lux.+ lumière du jour d'appoint pendant 16 hrs et dans le milieu mentionné ci-dessus. Chaque semaine, plusieurs spécimens sont examinés après fixation (Carnoy) et coloration des noyaux par la méthode de Feulgen suivie de „squash" modéré entre lame et lamelle dans l'acide acétique à 45°.

En vue de mesurer les volumes nucléaires, nous avons utilisé un appareil

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

de type Micro-Videomat (Siemens) couplé à un photomicroscope (Zeiss). Etant donné la grande variabilité de forme des noyaux, il s'est avéré que par ce moyen, l'évaluation exacte de la surface nucléaire fournirait une estimation plus précise qu'un calcul de leur volume à partir des valeurs des axes. La mesure de la taille nucléaire sera donc donnée dans ce travail en m A, la conversion en μm^2 étant toujours possible (1 m A = 62,5 μm^2). Pour évaluer la quantité de DNA par noyau après la réaction de Feulgen, nous avons adopté une méthode basée sur la colorimétrie photographique, mise au point par DEN TONKELAAR (1963) et DEN TONKELAAR et VAN DUIJN (1964) à laquelle nous avons apporté diverses modifications (destinées à être publiées en détail dans un autre contexte). Dans les grandes lignes, cette méthode consiste à révéler un positif (papier Kodak Bromesko 18 × 24 cm) au moyen d'un révélateur spécial contenant: 80 g de carbonate de sodium, 2 g de 2: 4 dichloro-1-naphtol, 100 mg d'acide ascorbique, 2 gr de bromure de potassium, 2 g de sulfate de sodium et 5 g de sulfate de N: N diéthylparaphénilènediamine. En raison de l'oxydation très rapide de ce révélateur, le développement doit être réalisé sous azote, exempt d'oxygène. Les images de la chromatine nucléaire prennent une couleur bleue. Elles sont stables à l'air et peuvent aisément être éluées dans une quantité connue de méthanol à 37° C. Après élution, la concentration de colorant correspondant exactement à la découpe d'un noyau est mesurée au spectrophotomètre Zeiss (à 630 nm) et comparée à la valeur d'un étalon. La quantité de colorant peut alors être rapportée soit à une unité de surface nucléaire préalablement mesurée au Micro-Videomat, soit à une quantité de papier, soit aux deux.

Il est indispensable d'effectuer une correction de non-homogénéité en procédant de la manière suivante: on découpe une surface connue de papier à un endroit du positif qui ne contient pas d'image nucléaire. On élue au méthanol et l'on mesure la quantité de colorant qui correspond ainsi au fond-permanent. Cette valeur rapportée à l'unité de surface ou de poids est retranchée de chaque valeur nucléaire. Il s'avére nécessaire de procéder à partir d'un négatif aussi homogène que possible. Dans la présente recherche, cette difficulté a été évitée du fait que les noyaux à comparer se trouvent dans la même cellule c'est-à-dire sur le même négatif.

3. Résultats

D'une manière générale, nous avons pu distinguer 5 périodes dans la „nitellisation" des *Chara*.

A. Périodes successives

Ière période

Au cours de celle-ci, il y a diminution progressive de la fréquence mitotique dans les régions méristématiques. Le taux de mitoses y passe d'environ 1—2‰ à 1—2/10.000 et même moins. Le bourgeonnement nodal devient presque inexistant. Aucun organe sexuel ne se forme plus et, ceux qui sont encore présents dégénèrent. Cette période s'étend sur les deux ou trois premières semaines consécutives aux changements des condi-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

tions expérimentales. On y remarque aussi une nette régression des bractées et des bractéoles des phylloïdes et une complète disparition des stipulodes aux noeuds des axes.

IIème période

Celle-ci couvre 4—6 semaines et même davantage. Elle est caractérisée par des modifications profondes de la morphologie des phylloïdes. On observe tout d'abord un accroissement du nombre des cellules terminales (Fig. 1 et 3, planche I). A ce stade, les phylloïdes possèdent encore des noeuds et des entre-noeuds (Figs. 1—3, planche I). Deux groupes de noyaux sont visibles à la base de la Fig. 2, planche I ainsi que des cellules corticales (indiquées par une flèche). Souvent les cellules terminales subissent une phase d'élongation très nette. Au cours de ce processus que l'on pourrait désigner sous le nom de „terminalisation", certaines caractéristiques nucléaires des cellules terminales sont conservées. Ainsi, le cycle de croissance nucléaire donnant naissance à de volimineux noyaux et suivi d'un cycle amitotique se déroule de manière basifuge comme c'est le cas dans les cellules terminales des phylloïdes normaux (MOUTSCHEN 1977). Il s'ensuit qu'au début du développement, la taille des noyaux des cellules de la base est supérieure à celle des noyaux des cellules apicales. Ultérieurement le nombre des noyaux des cellules de la base où l'amitose s'est déjà déroulée, devient supérieur au nombre de noyaux des cellules du sommet. A ce stade, le nombre de cellules terminales est toujours plus élevé que chez les *Chara* normaux (2 à 3). On peut en dénombrer jusqu'à 10. Des nombres voisins de 5 cellules sont visibles sur les Figs. 1—3, planche I. A ce stade, les axes restent capables de produire des cellules corticales normales comme le montre la Fig. 4, planche I où l'on remarque en alternance les petits noyaux des futures acicules (ac) et de plus gros noyaux (G) des autres cellules corticales axiales. Au cours de cette période, le méristème apical peut apparaître assez désorganisé (Fig. 1, planche I). Cependant, il reste capable de donner alternativement naissance à un noeud et à un entre-noeud. Dans la Fig. 1, planche I, les jeunes phylloïdes provenant du verticille situé sous le méristème montrent déjà un accroissement du nombre de cellules terminales et de leur taille. Alors que normalement les 3 cellules terminales sont incapables de cortication, cette inaptitude s'étend aux cellules sous-jacentes.

L'étape suivante dans le processus de „nitellisation" est caractérisée par la perte progressive pour les phylloïdes, de l'aptitude à produire des cellules corticales déjà amorcée au stade de „terminalisation". On observe alors un nombre moins élevé de noyaux aux noeuds. Nous avions antérieurement observé (MOUTSCHEN 1977) que les jeunes noeuds des phylloïdes contiennent deux types nucléaires de tailles progressivement différentes en allant du sommet à la base. Les plus grands noyaux correspondent aux

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

futurs noyaux corticaux, susceptibles de devenir des noyaux géants en ruban. Les plus petits noyaux, de type méristématique (sphériques et avec un ou deux nucléoles et des chromocentres) donnent normalement naissance aux noyaux corticaux, vraisemblablement uniquement par amitose. Deux types nucléaires sont encore visibles dans les deux noeuds de la base d'un phylloïde à la Fig. 2, planche I (flèche). La cortication de la cellule internodale basale est encore visible. Cependant, au cours du processus de „nitellisation", les noyaux géants qui dérivent des petits noyaux nodaux disparaissent progressivement. D'après nos observations, cette disparition ne s'effectue pas brusquement mais s'étale sur plusieurs semaines. Elle procède habituellement dans un sens basipède. Ce sont donc les noeuds proches des cellules terminales puis de plus en plus éloignées, qui perdent la faculté de produire des cellules corticales. La perte de l'aptitude à la cortication s'étend ensuite vers les bases des phylloïdes. A la fin, on observe aux noeuds phylloïdiens, encore appendues aux cellules nodales, des cellules de plus grande taille contenant des noyaux beaucoup plus volumineux que les noyaux nodaux (Fig. 1, planche II). La structure de ces noyaux est différente de celle des noyaux nodaux. Ils sont généralement beaucoup plus colorés que ceux-ci. Ils peuvent contenir l'un ou l'autre nucléole et plusieurs chromocentres. Ces noyaux ne prennent jamais une forme normale en ruban et l'on n'observe aucune élongation de ces cellules. Par contre, il n'est pas rare que l'on voit des images de début de cycle amitotique mais celui-ci paraît abortif et les cellules dégénèrent. Aux axes, il est parfois difficile de distinguer ces cellules qui sont les reliques des cellules corticales ou de bractéoles, des futures cellules des phylloïdes (voir période suivante) dans lesquelles le cycle amitotique se poursuit normalement (voir plus loin).

IIIe période

Cette période est surtout caractérisée par les modifications de la morphologie des axes, contemporaines de divers changements des phylloïdes. Elles s'étendent sur une période de un à deux mois et parfois davantage. De manière générale, la perte de l'aptitude à la cortication est très comparable dans les axes et dans les phylloïdes. La cortication reste cependant assez normale beaucoup plus longtemps et l'on remarque encore en alternance des petits noyaux des acicules et de plus gros noyaux corticaux (Fig. 4, planche I) mais la différenciation des cellules corticales devient de plus en plus incomplète. Ultérieurement, on remarque que les cellules résiduelles à gros noyaux dégénératifs, décrites aux noeuds des phylloïdes à la période II, apparaissent plus fréquemment et pendant une plus longue période aux noeuds des axes. Certaines cellules peuvent correspondre à des stipulodes abortives. En même temps que la disparition de la cortication des axes, on constate une diminution du nombre de phylloïdes aux noeuds.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

On en compte 3 à 5 mais il n'est pas rare qu'il n'y en ait plus qu'un seul. Leur morphologie est complètement boueversée et converge vers celle des cellules internodales axiales. Les phylloïdes sont alors réduits à quelques articles (1 ou 2 noeuds et 2 ou 3 entre-noeuds). Dans la Fig. 5, planche I, un phylloïde montre deux noeuds (N), 1 cellule internodale non cortiquée (I) et une cellule terminale (T) de forme ogivale typique. La Fig. 6, planche I représente le cas extrême où le phylloïde est réduit à une seule cellule terminale ogivale (T) et à un noeud basal (N). A la différence des cellules terminales de la période précédente, cette cellule devient plasmodiale et géante. Elle peut contenir de très nombreux noyaux dont l'évolution sera envisagée ultérieurement (Fig. 2, planche II). Dans ces cas, les phylloïdes ne comportent plus qu'une seule cellule géante qui atteint la taille des cellules internodales axiales et peut mesurer plusieurs centimètres. Par rapport à la période précédente, la morphogenèse des noeuds est profondément modifiée. Le nombre de cellules corticales dégénératives diminue progressivement et les cellules à noyaux géants représentent exclusivement les futurs phylloïdes. A ce stade, les cellules internodales axiales sont pratiquement „nues" comme les phylloïdes. On peut voir un noeud (N) et deux parties d'entre-noeud (EN) à ce stade à la Fig. 3, planche II.

Les cellules internodales axiales contiennent des noyaux de plus en plus nombreux (cf. Tableau I) susceptibles de se diviser par amitose (Fig. 4, planche II) ou dans d'autres cas, de subir une phase de croissance au cours de laquelle la population nucléaire devient hétérogène (Fig. 5, planche II).

IVe période

Elle correspond tout d'abord à une phase de stabilisation des échantillons complètement „nitellisés". Les télomes se présentent très généralement comme suit:

1. Absence complète de cellules corticales des phylloïdes et des axes à l'exception de quelques rares cellules involutives et n'ayant jamais l'apparence de cellules corticales.

2. Phylloïdes en nombre réduit (1—3) à chaque noeud, le plus souvent réduits à une seule cellule géante de type terminal (ogival) et dont le rapport de taille avec les cellules internodales axiales est inchangé par rapport à la période précédente.

Le comportement des noyaux au cours de cette phase sera étudié ultérieurement.

Ve période

Après un laps de temps de plusieurs mois, on remarque divers processus de restauration que l'on peut résumer comme suit:

a) Le taux de mitoses s'accroît (jusqu'à un ordre de grandeur de 1‰ environ pour les cellules méristématiques). Curieusement, nous avons

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tableau I

Evolution des nombres de noyaux et des tailles nucléaires dans les cellules internodales des verticilles successifs (Pour les nombres de noyaux, moyenne de 10 cellules — Pour les tailles nucléaires, moyenne de 10 noyaux par cellule).

	Axes				Phylloïdes			
Verticille	Nombre de noyaux	t 0,05 σ	Surface moyenne (μm^2)	t 0,05 σ	Nombre de noyaux	t 0,05 σ	Surface moyenne (μm^2)	t 0,05 σ
1	90	10	984,4	—	24	10	965,6	—
2	120	15	456,9	86	40	12	323,0	32
3	265	20	365,0	48	250	30	200,0	14
4	914	100	215,0	23	363	35	227,5	13
5	950	111	170,0	15	495	52	155,0	9
6	1280	122	200,0	15	627	70	136,3	12
7	635	60	251,3	21	410	50	215,6	16
8	620	52	370,6	34	390	40	225,0	20
9	630	64	452,5	52	450	12	250,7	22

La distribution des tailles n'étant pas gaussienne, l'interval de confiance ne peut être calculé par les méthodes statistiques habituelles.

observé uniquement des mitoses à n = 14 chromosomes (Fig. 2, planche III) alors qu'avant le début de la „nitellisation", nos observations avaient toujours montré n = 28 chromosomes dans les méristèmes apicaux aussi bien que dans les anthéridies (voir discussion).

b) Le nombre de phylloïdes par noeud s'accroît quoiqu'étant loin de reprendre sa valeur normale.

c) L'activité méristématique latérale aux noeuds s'accroît considérablement. On compte en moyenne 1 bourgeon latéral pour 3 ou 4 noeuds.

d) Exceptionellement, nous avons observé de jeunes anthéridies jusqu'à présent abortives. Pendant une période s'étendant sur plus d'une année, aucun oogone n'est apparu.

e) La croissance des échantillons est plus rapide.

B. Modifications nucléaires au cours du développement des Chara „nitellisés"

Ces modifications ont été étudiées en détail, exclusivement pendant la phase IV (de stabilisation) en raison du fait qu'aux stades précédents, les types nucléaires sont plus instables.

Le tableau I montre que:

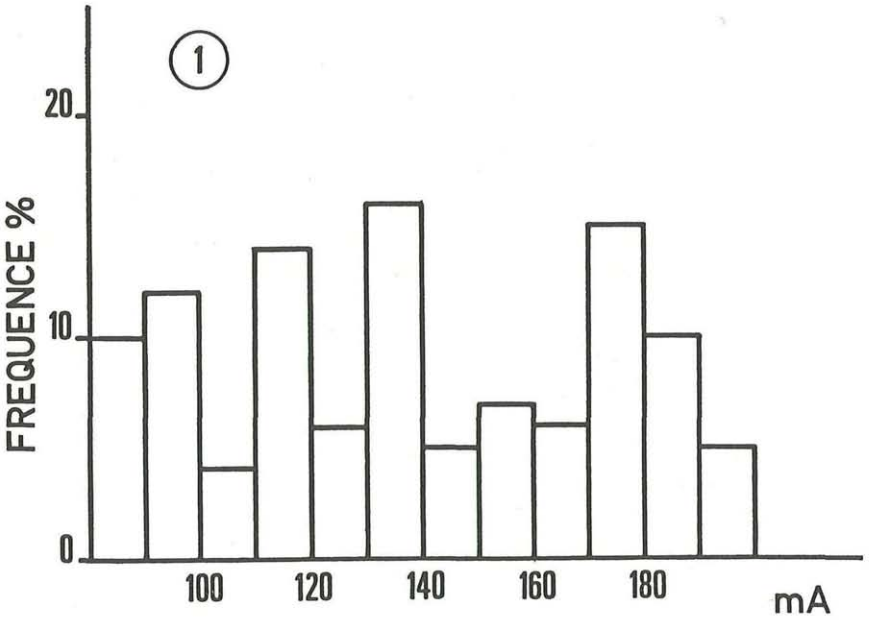
1. L'évolution des nombres de noyaux par cellule ainsi que de leur taille est presque parallèle dans les axes et dans les phylloïdes.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tableau II

Corrélations évaluées pendant la phase de stabilisation des *Chara* „nitellisés", à partir des données du tableau I

	Axe/phylloïdes		Taille/nombre	
	Taille	Nombre	Axes	Phylloïdes
Coéfficient de corrélation ρ	0,969	0,927	−0,774	−0,706
Limite inférieure	0,756	0,526	−0,987	−0,982
Limite supérieure	0,999	0,994	0,426	0,520



Graphique 1. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales axiales (aux 1er—2e verticilles).

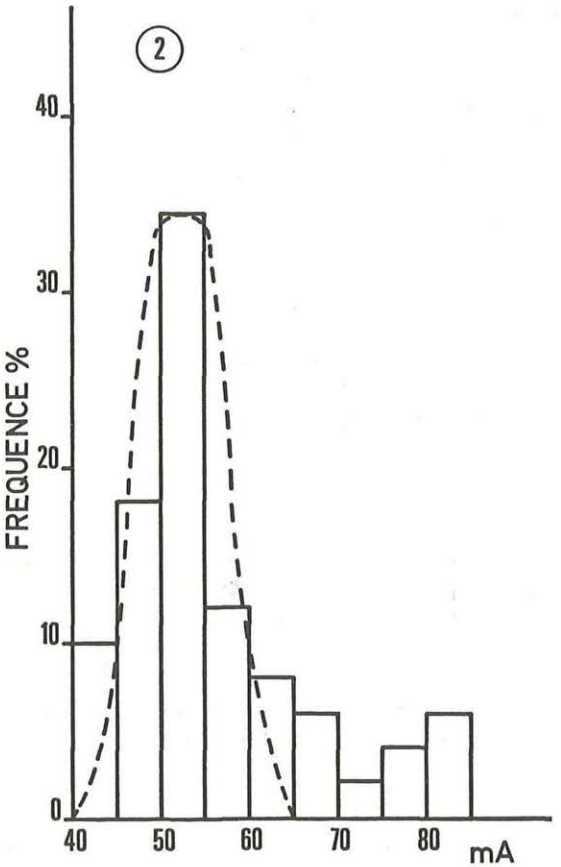
2. On observe tout d'abord un accroissement du nombre de noyaux jusqu'au niveau du 6e verticille inclusivement. Cet accroissement est plus marqué dans les cellules internodales axiales. Le nombre de noyaux dans une cellule de phylloïde est toujours moins élevé que dans une cellule axiale du même verticille mais la variabilité des nombres de noyaux par cellule est supérieure dans les phylloïdes.

3. Parallèlement, dans les axes et les phylloïdes, la taille des noyaux varie en sens inverse de leurs nombres. Le nombre de noyaux est maximal au moment où le volume est minimal. La corrélation entre phylloïdes et

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

axes est donc fortement positive, à la fois pour la taille nucléaire et pour le nombre de noyaux. La corrélation taille/nombre est, par contre, très significativement négative aussi bien dans les axes que dans les phylloïdes (tableau II).

4. Après ce verticille, on note un nombre moins élevé de noyaux. Le volume nucléaire dans les axes s'accroît du 7e au 9e verticille.



Graphique 2. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales axiales (aux 3e—5e verticilles).

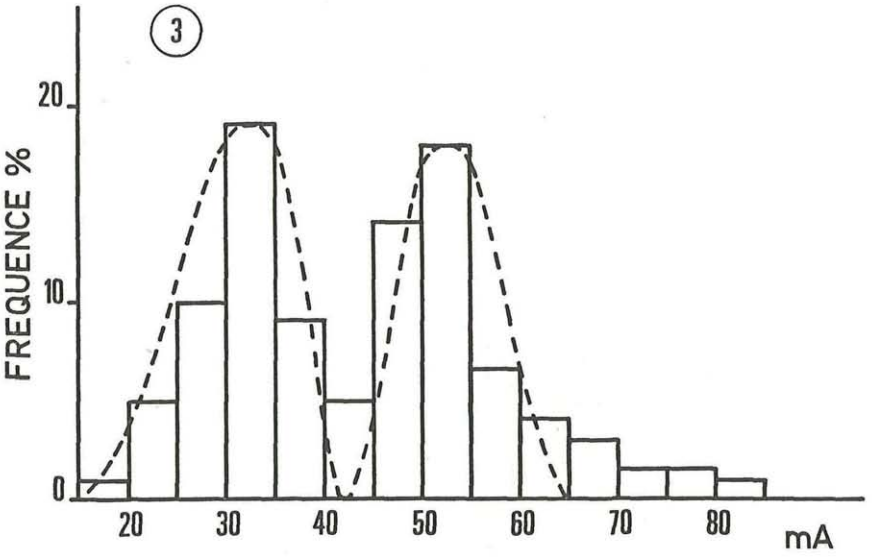
Cet accroissement volumétrique est beaucoup moins marqué dans les phylloïdes où il n'est d'ailleurs pas statistiquement significatif pour les verticilles étudiés. Il est donc probablement plus lent dans les phylloïdes que dans les axes.

Les populations nucléaires ont été analysées au cours de la phase de

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

stabilisation des *Chara* „nitellisés" (c'est-à-dire avant l'apparition des phénomènes de restauration mentionnés plus haut).

Dans les axes: On remarque tout d'abord (graphique 1) une distribution tout à fait irrégulière des fréquences des tailles nucléaires, à un niveau qui correspond au premier verticille sous le méristème apical (tableau I). Les noyaux assez fortement colorés au Feulgen, ont des formes irrégulières souvent en haltère mais parfois réniformes, sinués ou en croissant. Des chromocentres assez gros (C) et en nombres assez peu élevés y sont souvent bien visibles mais par contre, la matière nucléolaire y est diffuse (Fig. 5,



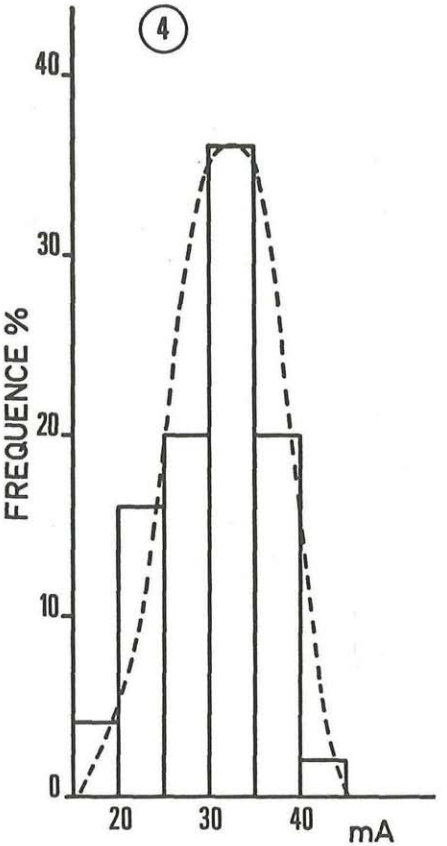
Graphique 3. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales axiales (aux 5e—7e verticilles). Courbe nettement bimodale correspondant aux amitoses (stade en haltère).

planche III). Cette phase correspond manifestement à une période pré-amitotique qui marque la fin du processus d'endoreduplication. Elle est suivie d'une phase de stabilisation qui est traduite dans le graphique 2 et est interprétée comme une distribution de fréquences de tailles en voie de normalisation. Ce graphique représente un stade voisin du 2e verticille (tableau I). On rencontre souvent à ce stade, des chapelets de noyaux parfois encore attachés l'un à l'autre (pouvant aller jusqu'à 10 et même davantage) qui marquent la fin du premier cycle amitotique (Fig. 7, planche III). Chacun de ces noyaux a une taille assez comparable à celle des noyaux nodaux (Fig. 3, planche III et graphique 7) mais la structure de ce dernier noyau avec son nucléole (il y en a parfois 2) et ses chromocentres est toute

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

différente. Cette phase est suivie d'un second cycle amitotique au cours duquel chacun des noyaux unitaires semble être capable de se diviser en donnant des figures en haltère (Figs 3 et 4, planche II).

Le graphique 3 nous donne une distribution manifestement bimodale. Dans ces cellules qui se situent à un niveau un peu antérieur au 6e verticille



Graphique 4. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales axiales (aux 8e—9e verticilles). Courbe normalisée.

(tableau II), le nombre maximum de noyaux n'est pas encore atteint. Dans ce graphique, le premier sommet correspond à des petits noyaux sphériques. Le second comprend uniquement des noyaux de forme ellipsoïdale ou en haltère (Fig. 4, planche II). Comme le nombre de noyaux sphériques s'accroît au verticille suivant, on peut en déduire que les noyaux en haltère correspondent à un stade de division amitotique. Lorsque ce processus est terminé, tous les noyaux sont sphériques. La distribution des tailles s'est

Tableau III

Concentrations de DNA (exprimées en µg de colorant/mg de papier ou en µg/noyau) de noyaux de cellules internodales (moyenne de 10 mesures)

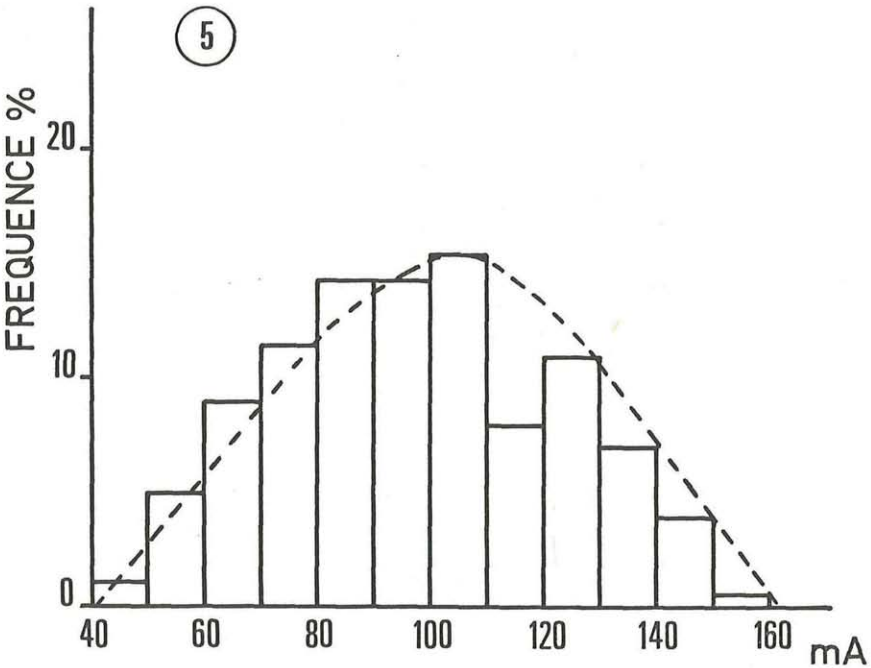
		Poids moyen (mg)	± t 0,05 σ	Rapport	µg/noyau	± t 0,05 σ	Rapport	µg/mg	± t 0,05 σ	Rapport
Phase.	Phylloïdes									
d'expansion	Ier type	33,2	± 4,5	2,5	61,2	± 3,2	3,9	1,87	± 0,14	4,9
nucléaire	IIe type	81,8	± 5,8		15,7	± 3,9		0,38	± 0,18	
	Axes									
	Ier type	24,3	± 3,5	3,4	31,4	± 11,4	2,4	1,36	± 0,27	7,4
	IIe type	82,6	± 9,5		13,6	± 6,3		0,17	± 0,11	
Post-	Axes									
synthèse	Ier type	17,8	± 1,5	1,7	22,91	± 5,6	1,5	2,08	± 0,41	1,1
de DNA	IIe type (haltère)	30,1	± 2,7		34,28	± 6,2		1,82	± 0,72	

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

alors normalisée (graphique 4) et le nombre des noyaux est maximum (au 6e verticille du tableau I).

Les graphiques 5 et 6 correspondent à des verticilles postérieurs à ceux qui figurent dans le tableau I. Au graphique 5, on remarque un accroissement de taille correspondant à une distribution beaucoup plus irrégulière qu'au graphique 4. Au tableau I, cette distribution était annoncée par l'accroissement volumétrique observé aux verticilles 7—9 et interprété



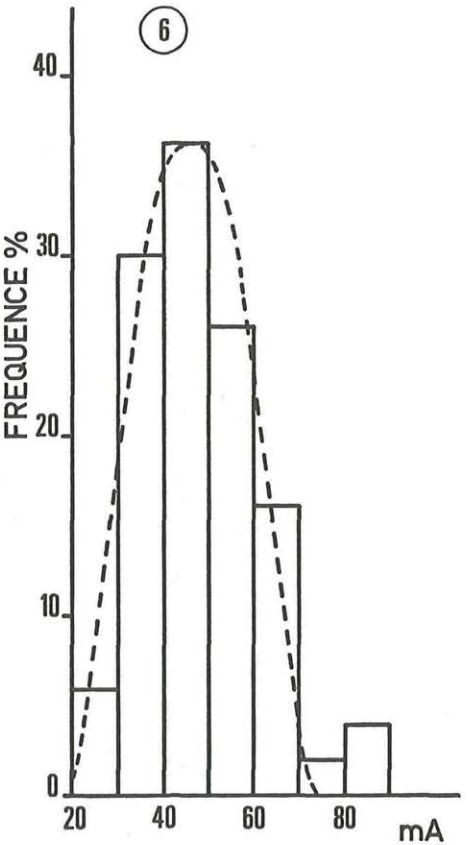
Graphique 5. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales axiales (après le 9e verticille) phase d'expansion nucléaire.

comme une phase de croissance nucléaire. Les populations nucléaires sont alors hétérogènes. On voit tout d'abord des noyaux en élongation, assez peu colorés, à nombreux et petits grains de chromatine sans nucléole ni chromocentre visible (Fig. 12, planche II et Fig. 4, planche III). On remarque ultérieurement des noyaux assez volumineux, parfois très allongés et dont la périphérie, beaucoup moins colorée, est interprétée comme des nucléoles multiples (Fig. 6, planche III).

Dans les phylloïdes: l'évolution des distributions des tailles nucléaires est, de manière générale, parallèle à celle des axes. Avant le premier morcellement amitotique, les noyaux sont volumineux, à contours irréguliers, bien

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

colorés, à chromocentres bien visibles et à nucléoles diffus (Fig. 5, planche III). Le premier morcellement amitotique donne une distribution très irrégulière (graphique 8) (1er verticille du tableau I). A ce stade, la distribution des tailles des noyaux nodaux lorsqu'ils existent, est tout à fait normale (graphique 7). Dans les cellules internodales, le morcellement

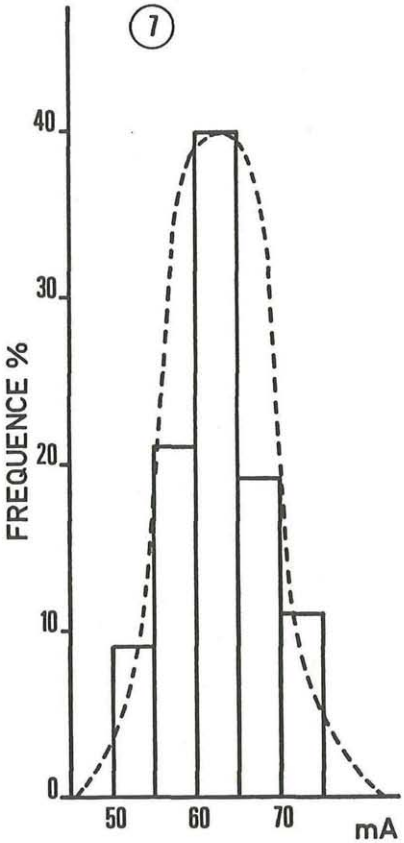


Graphique 6. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales axiales (après le 9e verticille) Normalisation de la courbe.

amitotique est suivi d'une brève phase de stabilisation (graphique 9) qui correspond au niveau des verticilles 3—4 du tableau I, puis d'une phase de croissance qui aboutit à une population nucléaire hétérogène comportant à la fois des noyaux plus petits, sphériques et plus colorés et des noyaux ellipsoïdaux beaucoup moins colorés (Fig. 2, planche II et Fig. 1, planche III). C'est dans ces cellules que seront étudiés les contenus en DNA des noyaux.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Comme dans les cellules internodales axiales, on peut parfois observer une division amitotique de maints noyaux aboutissant au nombre maximum. Chaque noyau possède alors une taille minimale (graphique 10). Comme pour les axes, les tailles s'accroissent dans les cellules suivantes (graphique 11). Au cours d'une étape ultérieure de la présente recherche, nous avons



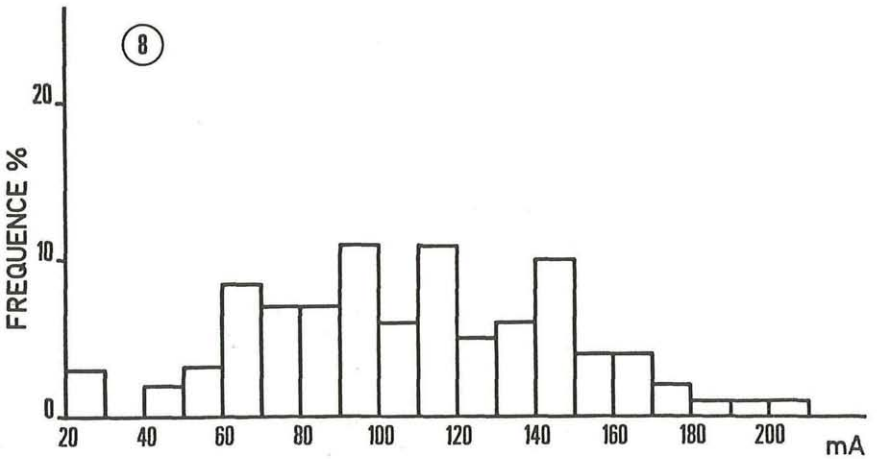
Graphique 7. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules nodales des phylloïdes.

voulu préciser quelques points concernant le cycle des acides nucléiques au cours des divisions amitotiques des *Chara* „nitellisés". Le tableau III résume divers résultats obtenus par colorimétrie photographique.

La dernière synthèse amitotique dans les cellules internodales axiales est démontrée du fait, qu'à un doublement de volume nucléaire (exprimé ici en poids de papier) correspond un doublement de la concentration en DNA (exprimée an μg/par noyau) et du fait que la quantité de DNA par unité

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

de volume nucléaire (exprimée en µg/mg de papier) reste pratiquement constante. Le deuxième type de noyau, celui en haltère représente donc la fin du processus amitotique lui-même et par conséquent, est postérieur à la synthèse du DNA. Ces processus amitotiques ont été particulièrement précisés dans les cellules internodales axiales où ils semblent bien s'effectuer de manière assez synchrone (Fig. 4, planche II). Un tel synchronisme n'a pas pu être observé dans les grandes cellules internodales des phylloïdes où les modalités amitotiques sont probablement quelque peu différentes. En ce qui concerne les cellules dont les noyaux sont en phase d'expansion et dont nous avons distingué deux types par cellule (Figs 2 et 5, planche II



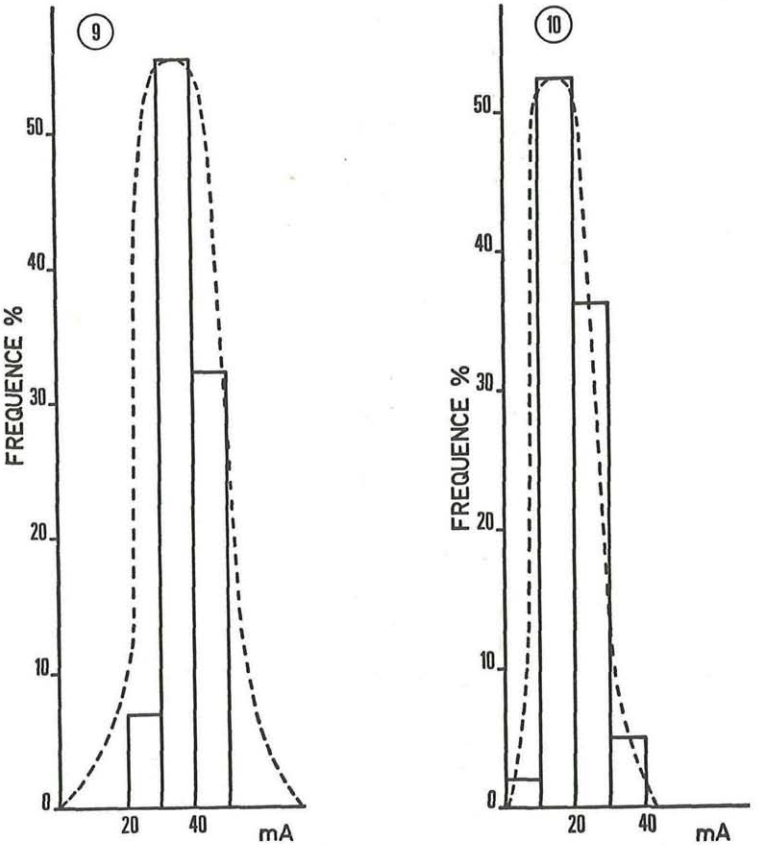
Graphique 8. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales des phylloïdes (aux 1er—2e verticilles).

et Fig. 1, planche III), on peut constater (tableau III) que le comportement de leurs noyaux est tout différent de celui des noyaux amitotiques. A des accroissements de volumes d'un facteur 2 et 4, respectivement pour les axes et les phylloïdes, correspondent des diminutions des quantités de DNA par noyau, respectivement d'un facteur 4 pour les phylloïdes et 2 pour les axes et de DNA par unité de poids de noyau respectivement par des facteurs 4 pour les phylloïdes et 8 pour les axes. Le fait qu'il existe des déviations à ces rapports peut facilement s'expliquer non seulement en raison des erreurs de mesure mais encore des erreurs d'échantillonnage (c'est-à-dire de confusions des types nucléaires). On ne peut donc échapper à la conclusion que l'accroissement volumétrique du second type nucléaire ne peut être dû à des synthèses de DNA mais bien à des synthèses d'autres constituants nucléaires qui se déroulent dans des noyaux dans lesquels les concentrations de DNA sont inférieures à celles de l'autre type nucléaire.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

4. Discussion et Conclusions

Les méthodes permettant de „nitelliser" les *Chara* sont certainement très diversifiées. Celle qui a été utilisée au cours du présent travail présente outre l'avantage d'être simple et d'être bien reproductible, celui de per-



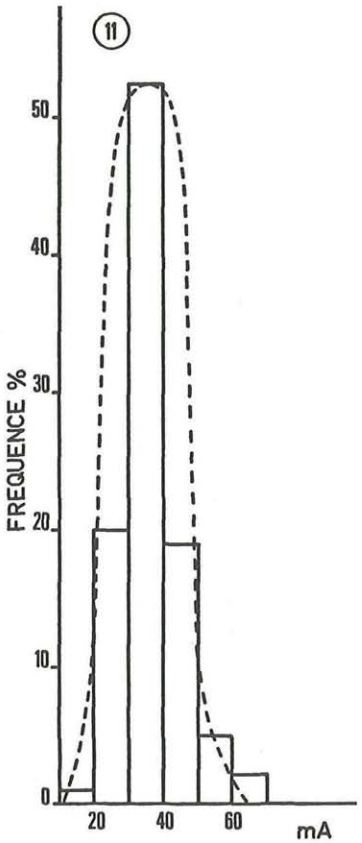
Graphique 9. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales des phylloïdes (aux 3e—5e verticille) Normalisation.

Graphique 10. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales des phylloïdes (aux 5e—7e verticilles) distribution normalisée.

mettre de suivre les différentes phases du processus. La phase fondamentale de la „nitellisation" est certes la perte progressive de l'aptitude à former des cellules corticales. Or, cette aptitude dépend des noyaux géants en ruban dont nous avons souligné au cours d'un précédent travail (MOUTSCHEN 1976, 1977), diverses analogies avec les macronoyaux des infusoires ciliés. Ces noyaux géants en ruban sont issus des noyaux nodaux de type méristé-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

matique. C'est donc en définitive au niveau de ces derniers que se situe la modification fondamentale qui conduit à l'état „nitellisé". On pourrait penser qu'il s'agit de la perte du pouvoir amitotique chez les noyaux nodaux qui donnent normalement naissance anx cellules corticales mais non chez ceux qui donnent naissance aux phylloïdes, quoique le nombre de



Graphique 11. Distribution des tailles nucléaires dans les cellules internodales des phylloïdes (aux 8e—10e verticilles) Début d'une phase d'expansion.

ceux-ci soit fortement réduit à chaque noeud. Au stade ultime, de stabilisation de l'état „nitellisé", le système phylloïdien est devenu complètement amitotique. La seule caractéristique fondamentale. commune aux Charophytes, qui soit alors maintenue dans son intégrité, est l'alternance des noeuds et des entre-noeuds. L'étude des cycles nucléaires pendant l'état „nitellisé" a permis de résoudre divers problèmes bien que maints points restent encore obscurs. La formation de noyaux géants dans les axes ou dans

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

les phylloïdes où le phénomène est plus visible, correspond certainement à une phase d'intenses synthèses de DNA (nous l'avons mis en évidence chez *Chara* normal au moyen de thymidine-H^3 — MOUTSCHEN 1977) mais il n'est pas encore possible de discerner si ce processus d'endoreduplication consiste en une polyploïdisation, en une polyténisation ou en un processus particulier aux Charophytes. On peut seulement prévoir qu'il sera plus aisé d'aborder cette question avec des spécimens „nitellisés" du fait que les noyaux corticaux dégénèrent ou ne se forment pas. Quoiqu'il en soit, cette phase est suivie d'un „morcellement" amitotique que nous avons désigné sous le nom de premier cycle. A partir de ce moment, il devient malaisé de définir combien de fois un noyau peut se diviser par voie amitotique. L'existence de distributions de tailles irrégulières au cours de la phase qui suit l'endoreduplication suggère plutôt qu'à ce stade, une partie de la population nucléaire puisse se diviser plusieurs fois consécutivement alors qu'une autre fraction n'en est pas capable. Quoiqu'il en soit, au moment où les cellules internodales axiales ou les grands phylloïdes unicellulaires vont atteindre leur taille maximale, divers processus de régulation ont dû jouer. C'est là que l'on rencontre les nombreux noyaux en haltère, ce qui suggère que les processus amitotiques sont beaucoup plus synchronisés et affectent la grande majorité, sinon la totalité des noyaux.

Il est surprenant de constater que dans les verticilles postérieurs à celui où se déroule cette dernière amitose, le nombre de noyaux est moins élevé et que les populations nucléaires sont hétérogènes. Une interprétation de ce fait est que les cycles de croissance nucléaire ainsi que les cycles amitotiques se déroulent en vagues successives au cours du développement. Dans ce cas, les cycles seraient plus lents dans certains verticilles postérieurs. Comme nous n'avons jamais observé cette irrégularité chez les *Chara* normaux, elle pourrait être particulière à l'état „nitellisé". La colorimétrie photographique a permis de préciser quelques points au sujet de la phase de croissance nucléaire. A un accroissement de taille nucléaire correspond paradoxalement une diminution de la teneur en DNA. Comme les plus gros noyaux sont moins colorés et semblent bien contenir une matière nucléolaire diffuse ou périphérique, on pourrait penser que l'accroissement volumétrique est dû à une intense synthèse de RNA ou de RNA-protéines. Des expériences récentes (inédites) ont montré qu'après absorption d'uridine-H^3, suivie de fixation et d'autoradiographie, ces noyaux sont effectivement marqués. Cependant, comment concevoir que dans les noyaux les plus volumineux, le taux de DNA ne soit pas égal mais moindre ? Une explication de ce paradoxe, compatible avec l'hypothèse émise antérieurement au sujet des distributions de tailles irrégulières, serait que la population nucléaire qui se divise le plus par amitose et qui, par conséquent, produit les noyaux les plus petits, devient incapable de synthétiser ses DNA mais par contre, s'engage dans les synthèses de RNA ou de RNA-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

protéines. Il y aurait dès lors en mélange dans certaines cellules des noyaux capables de redupliquer leurs DNA et d'accomplir leur cycle amitotique et d'autres, seulement capables de transcription et d'assurer le transfert de l'information génétique. Une expérience récente (MOUTSCHEN 1977) étaye cette interprétation. Lorsque l'on immerge des *Chara* „nitellisés" au moment du stade stabilisé, soit dans une solution d'uridine-H^3, soit dans une solution de thymidine-H^3, chaque verticille est capable d'utiliser l'un ou l'autre précurseur à n'importe quel moment du développement montrant qu'il y a donc synthèse simultanée de DNA et de RNA. Cependant, le turn-over de ces molécules n'étant pas connu dans ce matériel, il n'est pas encore possible de déterminer d'après ces données quelle est la fraction de la population nucléaire qui synthétise l'un ou l'autre composant. Nous ignorons encore si les noyaux engagés dans la transcription sont ultérieurement capables de recommencer un nouveau cycle amitotique. D'un autre côté, nous ne pouvons prévoir jusqu'à quel point peuvent aller les phénomènes de restauration. La morphologie des *Chara* „nitellisés" ne s'est pas sensiblement modifiée depuis la période de stabilisation c'est-à-dire depuis plus d'une année. Au cours de celle-ci, diverses modifications des conditions de culture n'ont pas encore permis d'obtenir des oogones et les anthéridies elles-mêmes sont fort rares et jusqu'à présent abortives. Au cours de la restauration mitotique partielle, le phénomène le plus curieux est le passage du nombre de chromosomes de 28 à 14 pour lequel nous ne pouvons encore fournir d'explication plausible. On ne peut éliminer la possibilité que les deux populations de *Chara* aient existé en mélange et que seuls les spécimens à 14 chromosomes aient été aptes à se „nitelliser". En raison de la raréfaction progressive des mitoses au cours de la première phase et de leur difficulté d'étalement, ce fait peut être passé inaperçu.

Malgré les nombreuses questions encore posées sur la dynamique des cycles amitotiques, la présente étude souligne une fois de plus l'intérêt des *Chara* „nitellisés" comme voie d'approche de ces problèmes.

Références

GIESENHAGEN K. 1908. Dans „Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen" par K. GOEBEL: 207.

GOEBEL K. 1918. Zur Organographie der Characeen-Flora 110 (3—4): 344—387.

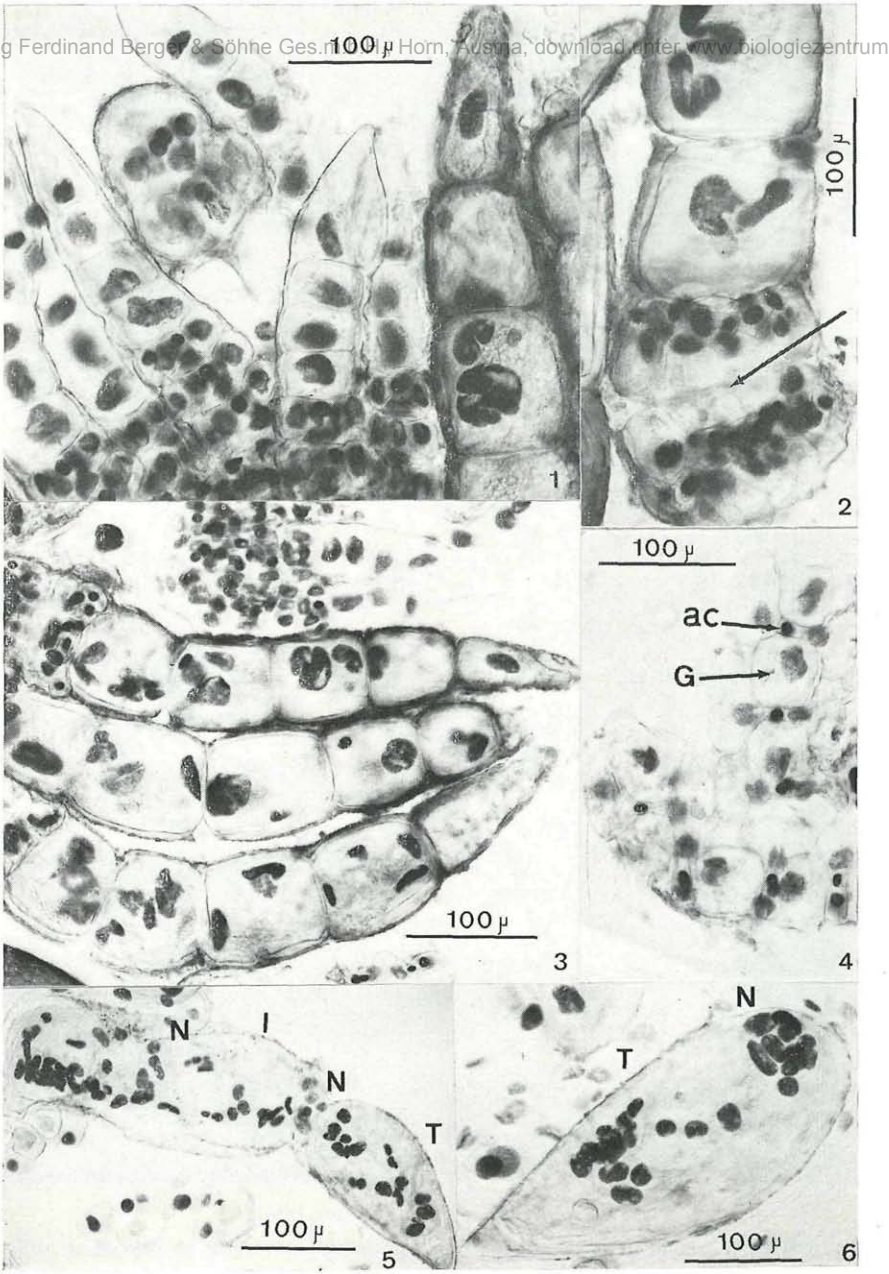
MOUTSCHEN J. 1976. Is the nuclear system of the alga *Chara* homologous to that of the Ciliates? — Naturwissenschaften 63 (8): 390.

— 1977. Données sur les systèmes nucléaires de *Chara vulgaris* au cours de la morphogenèse et dans leurs relations avec les phénomènes d'amplification de l'action génique. — Rev. Cytol. Biol. vég. 40: 125—149.

TONKELAAR E. M. DEN. 1973. Fotographische Colorimetrie. — Thesis, Leiden.

— & VAN DUIJN P. 1964. Photographic colorimetry as a quantitative cytochemical method. I. Principles and practice of the method. — Histochimie 4: 1—9.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



Explication de la Planche I.

Fig. 1. Début de la „termininalisation" des cellules internodales des phylloïdes. Le méristème apical est visible.

Fig. 2. „Terminalisation" et perte de la cortication des segments terminaux d'une phylloïde. La cortication existe encore à l'entrenoeud de la base de la phylloïde (flèche).

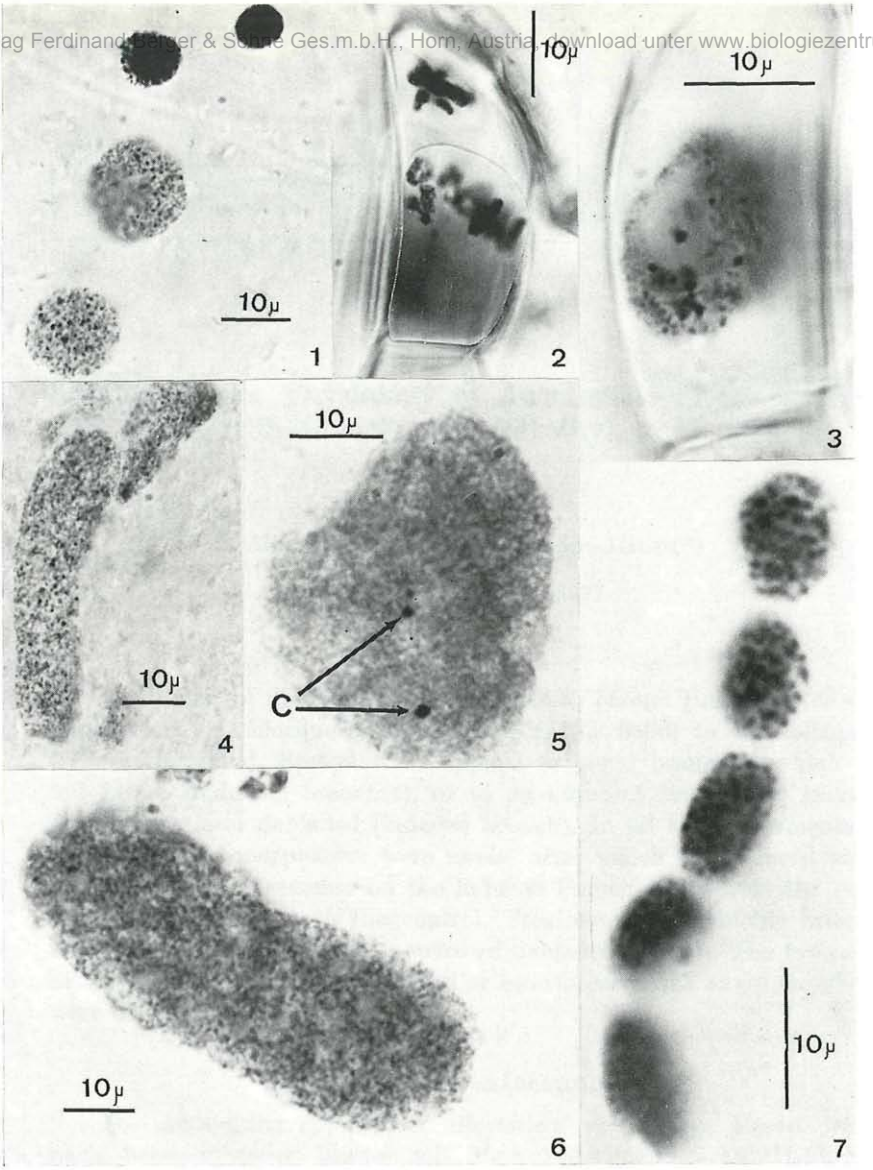
Fig. 3. Fin de „terminalisation" dans trois phylloïdes.

Fig. 4. Restes de la cortication des entre-noeuds des axes montrant de petits noyaux aciculaires (ac) alternant avec de plus gros noyaux (G) corticaux.

Fig. 5 et Fig. 6. Deux stades dans la formation de phylloïdes géantes. Dans la Fig. 5, on remarque deux noeuds (N), une cellule internodale (I) et une cellule terminale (T). Dans la Fig. 6, seul le noeud basal (N) et une cellule terminale (T) subsistent.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



Explication de la Planche III.

Fig. 1. Deux types de noyaux différents coexistant dans une cellule de phylloïde en croissance.

Fig. 2. Anaphase à 14 chromosomes (période de restauration).

Fig. 3. Noyau nodal (de phylloïde) de type méristématique avec nucléole et chromocentres (période de restauration).

Fig. 4. Noyaux en phase d'allongement dans une cellule internodale axiale. De petits grains de chromatine nombreux apparaissent. Aucun nucléole ni chromocentre visible.

Fig. 5. Gros noyau pré-amitotique dans une future cellule de phylloïde. Deux chromocentres (C) nettement visibles. Matière nucléolaire diffuse.

Fig. 6. Gros noyau post-amitotique d'une cellule internodale axiale en phase de croissance. La périphérie nucléaire plus claire est interprétée comme des nucléoles.

Fig. 7. Chapelet de noyaux post-amitotiques dans une cellule internodale axiale. Gros grains de chromatine bien visibles.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1978

Band/Volume: 18_3_4

Autor(en)/Author(s): Moutschen Jean

Artikel/Article: Données sur les processus de "nitellisation" chez Chara vulgaris. 145-164