

Rôle et métabolisme du saccharose lors de l'embryogenèse somatique : cas de l'épinette

Iraqi D.^{1}, Lamhamedi M.S.² et Tremblay F.M.³*

1 Unité de Biotechnologie, Centre Régional de la Recherche Agronomique de Rabat Institut National de la Recherche Agronomique. BP. 415, Avenue de la Victoire, Rabat, Maroc.

2 Direction de la Recherche Forestière, Forêt Québec, Ministère des Ressources Naturelles. 2700, rue Einstein, Ste-Foy, Qc, Canada, G1P 3W8.

3 Centre de Recherche en Biologie Forestière, Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Sainte-Foy, Qc, Canada, G1K 7P4.

** Correspondance : Tél : 00 212 61 16 46 16 Fax: 00 212 37 77 55 30,
E-mail : iraqid@yahoo.fr*

Résumé

Cette synthèse porte sur l'étude du métabolisme carboné lors du processus de l'embryogenèse somatique chez l'épinette. Durant la phase de maturation, la présence du saccharose et son hydrolyse dans le milieu sont indispensables pour une production élevée d'embryons somatiques. Le largage d'une invertase active, ayant un poids moléculaire de 53 kDa, contribue à l'hydrolyse du saccharose dans le milieu de maturation. Cette hydrolyse mène à une accumulation de glucose et de fructose et par conséquent à une augmentation de pression osmotique. Toutefois, la simulation de cette augmentation au niveau du milieu de maturation ne peut imiter les effets obtenus sur un milieu où le saccharose est hydrolysé. L'examen de la qualité des embryons montre que la teneur en sucres des embryons est indépendante de la source exogène de carbone. À l'inverse, les teneurs en protéines dans les embryons sont intimement liées aux conditions de maturation. La période de maturation se compose premièrement d'une phase de croissance durant laquelle l'activité des invertases et les concentrations en glucose et fructose endogènes sont élevées et, deuxièmement, d'une phase caractérisée par la déposition de réserves sous forme de protéines et d'amidon. La diminution de la concentration du saccharose dans le milieu de maturation ou son remplacement par du glucose et du fructose conduit à un déséquilibre du métabolisme carboné qui mène à une diminution des produits de réserves et par conséquent à une altération du développement des embryons. Durant la phase de maturation, le tissu embryogène peut aussi utiliser directement le saccharose du milieu de culture et au moins une partie du saccharose assimilé est hydrolysée par l'invertase pariétale.

Mots clés : Embryogenèse somatique, métabolisme carboné, invertase, saccharose phosphate synthase, saccharose synthase

ملخص

هذا النشر يدخل في إطار دراسة الأيض الكربوني أثناء مراحل تكون الجنين الجسدي عند الصنوبر: خلال طور النضج وجود السكر وتحلله داخل الوسط ضروري من أجل إنتاج كمية مرتفعة من الجنين الجسدي. نثر أنزيم invertase ذو الوزن الجزيئي 53 Kda يساهم في تحلل السكر داخل وسط النضج. هذا التحلل يقود إلى تراكم الكليكوز والفركتوز، وبالتالي ارتفاع الضغط الأسموزي. وفي كل الحالات تقليد هذا الارتفاع على مستوى وسط النضج لا يظهر التأثيرات الحاصلة في الوسط حينما يحلل السكر. فحص نوعية الأجنة يبرهن أن المحتوى السكري فيهم مستقل عن السكر الوارد. وعلى العكس المحتوى البروتيني للأجنة مرتبط بشدة بدرجة النضج. فترة النضج مكونة من: أولاً طور نمو وخلالها نشاط الأنفرتازات invertases وتركيز الكليكوز والفركتوز في الأجنة مرتفع. وثانياً طور يتميز بتنظيم المدخرات على شكل بروتينات ونشويات. نقص تركيز السكر في وسط النضج أو استبداله بالكليكوز والفريكتوز يؤدي إلى تغير في الأيض الكربوني مما يؤدي إلى نقص المدخرات وبالتالي تلف في تطور الأجنة. خلال طور النضج، النسيج الجنيني يمكنه أيضاً أن يستعمل السكر من الوسط، وعلى الأقل جزء من السكر الممتص يحلل عن طريق الأنفرتاز الجداري invertase. pariétale.

الكلمات المفتاح: التشكل الجنيني الجسدي، الأيض الكربوني، أنفرتاز، سكروز فوسفات سانتاز، سكروز سانتاز

Abstract

This synthesis is related to the study of carbohydrate metabolism during the somatic embryogenesis process in spruce. During the maturation stage, the presence of sucrose and its hydrolysis in the medium are essential for high somatic embryo production. The release of an active invertase with a molecular weight of 53 kDa, contributes to the sucrose hydrolysis in the maturation medium. Sucrose hydrolysis leads to glucose and fructose accumulation in the maturation medium, and consequently to an increased medium osmotic pressure. However, the simulation of the osmotic pressure increase in the medium cannot mimic the effects obtained on medium wherein sucrose was hydrolyzed. Analysis of embryos quality showed that embryo sugar level was independent of the exogenous carbon source. Conversely, embryo protein concentration was closely related to maturation conditions. The maturation stage was first composed of a growth phase during which invertase activities and endogenous glucose and fructose concentrations were high followed by a storage deposition phase where proteins and starch accumulated. Decreasing sucrose concentration in the medium or replacing it by glucose and fructose led to an imbalance in the carbohydrate metabolism, which resulted in a decreased deposition of storage products, and consequently to an impaired embryo development. During the maturation stage, sucrose was also shown to be directly taken up by embryogenic tissue from the culture medium and partly hydrolyzed by apoplastic invertase.

Key words :Somatic embryogenesis, carbohydrate metabolism, invertase, sucrose phosphate synthase, sucrose synthase

Introduction

L'embryogenèse somatique est un processus biologique qui permet l'obtention d'un nombre illimité d'embryons à partir d'une cellule ou d'un groupe de cellules somatiques (Jain et al., 1995 ; Jain et Gupta, 2005). L'embryogenèse somatique offre la possibilité de produire des clones à coût raisonnable, en peu d'espace et en peu de temps par rapport aux techniques classiques de la propagation. Le processus de l'embryogenèse somatique est composé de plusieurs phases essentielles (Figure 1).

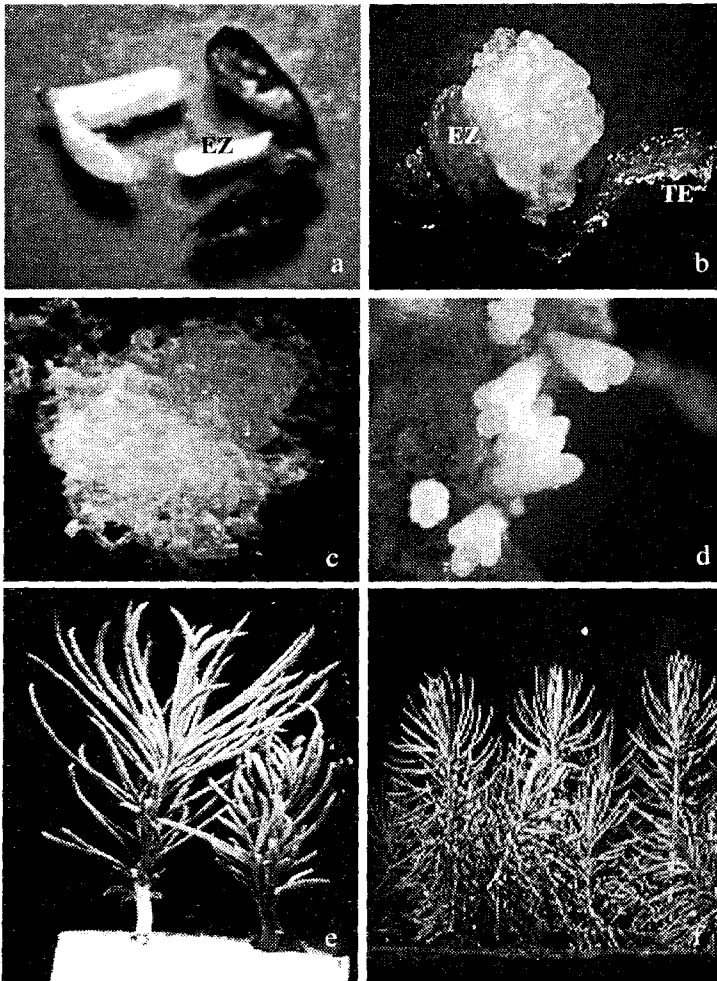


Figure 1. Les étapes de l'embryogenèse somatique chez les conifères. EZ: embryon zygotique; TE : tissu embryogène. (a) Dissection de la graine; (b) Induction du tissu embryogène; (c) Multiplication du tissu embryogène; (d) Maturation des embryons somatiques ; (e) Germination ; (f) Transfert au sol.

- 1- Induction : Le tissu embryogène diploïde ($2n$) est induit à partir des embryons zygotiques (matures ou immatures) ou à partir de cotylédons et dans certains cas à partir des aiguilles. Le tissu embryogène haploïde (n) peut être induit à partir du mégagamétophyte.
- 2- Maintenance : Une fois induit, le tissu embryogène doit être maintenu en culture sans perdre sa capacité de multiplication. La maintenance est un stade intermédiaire de multiplication, qui se situe entre l'induction du tissu embryogène et la maturation des embryons somatiques.
- 3- Maturation : Après les phases d'induction et de maintenance, il est nécessaire de faire cultiver les tissus sur un milieu de maturation pour le développement des embryons somatiques.
- 4- Germination : Les embryons somatiques produits sont transférés dans des tubes et fertilisés avec un milieu approprié.

Chez les conifères, l'embryogenèse somatique a plusieurs avantages, elle ouvre de nombreuses perspectives en amélioration génétique. Elle possède en effet un grand potentiel pour la multiplication massive des clones sélectionnés, ce qui permet d'amener les produits de l'amélioration génétique au niveau du reboisement (Timmis, 1998). De plus, le tissu embryogène constitue un matériel de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires (Stasolla et al., 2003 ; Van Zyl et al., 2003 ; Stasolla et al., 2004) et pour l'introduction de gènes d'intérêt permettant, par exemple, d'induire une résistance à certains pathogènes (Merkle et Dean, 2000). Un des avantages de l'embryogenèse somatique réside dans la conservation à long terme des génotypes dans un état juvénile durant la période nécessaire pour leur évaluation en site de reboisement (plusieurs années). Généralement, les génotypes sont conservés sous forme d'embryons immatures (tissus embryogènes) (Högberg et al., 1998) ou, plus récemment, sous forme d'embryons matures (Bomal et Tremblay, 2000). Le développement des embryons somatiques conduit à des plants présentant théoriquement les caractéristiques génétiques du plant de départ. Des travaux récents ont démontré que la régénération de clones d'épinette blanche (Lamhamedi et al., 2000) et d'épinette d'Intérieur (Grossnickle, 1998) à partir d'embryons somatiques est appropriée pour les programmes de reboisement. Bien que des cas rares de variation somaclonale aient été rapportés (Isabel et al., 1996 ; Tremblay et al., 1999), le faible taux de variation n'est pas considéré comme un obstacle pour la production de plants génétiquement conformes (Tremblay et al., 1999). Depuis la première obtention de l'embryogenèse somatique chez une espèce coniférienne en 1985 (Hakman et von Arnold), des progrès considérables ont été réalisés pour l'optimisation des ses différents stades (Jain et al., 1995 ; Jain et Gupta, 2005). Néanmoins, les mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires qui régissent le processus de l'embryogenèse somatique, et plus particulièrement la maturation des embryons somatiques, ne sont pas bien définis et doivent être mieux compris afin de faciliter le transfert de la technique à une échelle opérationnelle (Ducreux et al., 1998). Comme chez l'embryon zygotique, la formation de l'embryon somatique est contrôlée par des facteurs génétiques et environnementaux. Ces derniers sont particulièrement importants pour moduler le développement de l'embryon somatique en raison de l'absence de mégagamétophyte. Ainsi, dans le but d'obtenir un embryon morphologiquement comparable à l'embryon zygotique, l'accent a été mis sur les conditions de culture et le milieu de culture pour simuler les processus physiologiques qui se déroulent au sein du mégagamétophyte

(Ducreux et al., 1998). Dans cette synthèse l'emphase a été mise sur le saccharose comme constituant majeur de milieu de culture.

Le saccharose dans le milieu de culture: source de carbone et d'énergie

Les glucides figurent parmi les constituants essentiels des milieux de culture durant les différentes phases de l'embryogenèse somatique. En effet, comme les tissus *in vitro* sont généralement hétérotrophes en raison de l'absence d'assimilation chlorophyllienne, il est nécessaire de leur apporter une source de carbone. Parmi les glucides, le saccharose, formé des deux hexoses glucose et fructose, est le plus fréquemment utilisé dans le milieu de culture (George, 1993) et constituerait la meilleure source de carbone et d'énergie en culture *in vitro* (Desjardins et al., 1995) incluant l'embryogenèse somatique (Eapen et George, 1993 ; Tremblay et Tremblay, 1991 ; Tremblay et Tremblay, 1995 ; Lipavska et Konradova, 2004). Chez les plantes, le saccharose est livré à partir des tissus photosynthétiques à tous les organes de la plante pour la construction des éléments structuraux et pour la production d'énergie (Farrar et al., 2000). Selon les activités physiologiques et les besoins des tissus hétérotrophes, le saccharose suit différentes voies métaboliques dans divers compartiments cellulaires. Outre sa dégradation pour la synthèse de l'ATP et du NADH via la glycolyse et le cycle de Krebs, le saccharose est nécessaire à la biosynthèse des métabolites primaires importants pour la croissance et le développement des tissus (Sturm, 1999). Le saccharose participe également à la synthèse de substances de réserves telles que l'amidon et les polypeptides (Sturm, 1999 ; Fernie et al., 2002). De plus, le saccharose est un régulateur de plusieurs gènes incluant ceux qui sont impliqués dans le métabolisme carboné (Koch, 1996 ; Farrar et al., 2000 ; Winter et Huber, 2000 ; Koch, 2004).

Le saccharose: un disaccharide majeur en embryogenèse somatique

Au niveau de l'embryogenèse somatique des conifères, une faible concentration en saccharose réduit le développement des embryons somatiques et augmente la croissance du tissu embryogène (Tremblay et Tremblay, 1991). En revanche, une concentration élevée de saccharose améliore la maturation des embryons somatiques chez *Pinus strobus* (Finer et al., 1989), *Picea mariana* et *P. rubens* (Tremblay et Tremblay, 1991). Pour ces deux espèces, Tremblay et Tremblay (1991) ont montré qu'une concentration de 6% en saccharose est optimale pour la maturation des embryons somatiques.

Le saccharose, fortement soluble, contribue également à la régulation de la pression osmotique et au passage de l'eau entre les différents organes (Farrar et al., 2000). Il peut s'accumuler et atteindre des concentrations élevées sans affecter la plupart des réactions biochimiques dans la cellule. Dans le milieu de culture, le rôle osmotique du saccharose a fait l'objet de plusieurs études (George, 1993 ; Tremblay et Tremblay, 1995 ; Taber et al., 1998 ; Find et al., 1998). Au

cours de la maturation des embryons somatiques, l'hydrolyse du saccharose dans le milieu de culture en ses deux monomères, le glucose et le fructose, entraîne une augmentation de la pression osmotique (Tremblay et Tremblay, 1995 ; Taber et al., 1998 ; Find et al., 1998). Toutefois, le remplacement de 6% de saccharose dans le milieu de maturation par des concentrations équivalentes des produits de l'hydrolyse diminue la maturation des embryons somatiques (Tremblay et Tremblay, 1995). Ceci suggère que, même s'il est hydrolysé dans le milieu de maturation, le saccharose semble avoir certains effets positifs sur le développement des embryons somatiques qui ne sont pas induits par le glucose et le fructose.

Rôle du saccharose lors de l'embryogenèse somatique : phase de maturation

L'étude de la dynamique des sucres et de la pression osmotique dans le milieu a permis de déterminer le rôle du saccharose durant la maturation des embryons somatiques de l'épinette noire et de l'épinette blanche (Iraqi et Tremblay, 2001a). Le saccharose suivi de son hydrolyse lors de la maturation donne le meilleur taux de production des embryons somatiques (Tableau 1). L'altération complète de l'hydrolyse diminue significativement le rendement en embryons somatiques (Tableau 1). L'hydrolyse du saccharose mène à une accumulation de glucose et de fructose dans le milieu et par conséquent à une augmentation de la pression osmotique. L'augmentation de la pression osmotique obtenue sur un milieu de maturation contenant initia-

Tableau 1. Effet de différentes conditions de maturation sur la production d'embryons somatiques, sur la teneur en protéines et sur le taux de germination de l'épinette noire et de l'épinette blanche. (A) 6% de saccharose avec hydrolyse ; (B) Produits de l'hydrolyse : glucose + fructose; (C) 6% de saccharose sans hydrolyse.

Traitement	Épinette noire			Épinette Blanche		
	Nombre d'embryons somatiques	Protéines Totales (mg g ⁻¹ MS)	Taux de germination (%)	Nombre d'embryons somatiques	Protéines Totales (mg g ⁻¹ MS)	Taux de germination (%)
A	51 a	157 a	63 a	39 a	198 a	90 a
B	23 a	95 b	27 b	18 a	128 b	57 b
C	15 b	97 b	33 b	12 b	124 b	50 b

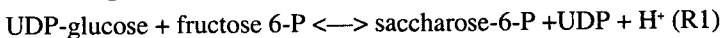
Les données avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P \leq 0.05$ selon le test de Bonferroni. (Tableau adapté de l'article Iraqi et Tremblay, 2001a).

lement 6% de saccharose a été simulée avec des concentrations croissantes de glucose et de fructose. Avec cette simulation, la production d'embryons reste faible (15 embryons pour l'épinette noire et 7 embryons pour l'épinette blanche) comparée à celle obtenue sur un milieu contenant 6% de saccharose (51 embryons pour l'épinette noire et 39 embryons pour l'épinette blanche). Ceci démontre clairement que la seule présence de saccharose ne peut supporter la production élevée d'embryons, de ce fait, la présence du saccharose et son hydrolyse sont indispensables pour une production élevée d'embryons somatiques. Pour comprendre ces résultats, la qualité des embryons produits sur différentes sources de carbone a été examinée en terme de taux de germination et de teneur en sucres et en protéines. Les résultats montrent que la teneur en sucre dans les embryons (saccharose, glucose, fructose et amidon) est indépendante de la source exogène de carbone. À l'inverse, les teneurs en protéines solubles et insolubles dans les embryons sont intimement liées aux conditions de maturation (Tableau 1). En effet, dès que l'hydrolyse est altérée ou que le saccharose dans le milieu est remplacé par le glucose et le fructose, les teneurs en protéines diminuent indépendamment de la pression osmotique du milieu. De plus, le taux de germination des embryons est lié à leurs teneurs en protéines plutôt qu'à leurs teneurs en sucres (Iraqi et Tremblay, 2001a). Ces résultats montrent que le saccharose suivi de son hydrolyse permet la régulation de la maturation des embryons somatiques en contrôlant la synthèse des protéines de réserve, spécialement les polypeptides de 42, 35 et 22 kDa (Iraqi et Tremblay, 2001a). D'autre part, Tremblay et Tremblay (1995) ont suggéré que l'hydrolyse du saccharose dans le milieu pouvait être due à la présence d'un système enzymatique extracellulaire. En se basant sur cette hypothèse et comme l'hydrolyse du saccharose dans le milieu est importante pour la maturation des embryons somatiques (Iraqi et Tremblay, 2001a), la présence d'une enzyme dans le milieu a été vérifiée. Par immunodétection, il a été montré qu'une invertase de 53 kDa est larguée dans le milieu de maturation (Iraqi et al., 2004). Le dosage de son activité a montré qu'elle est active dans le milieu et, par conséquent, qu'elle est responsable de l'hydrolyse du saccharose (Iraqi et al., 2004).

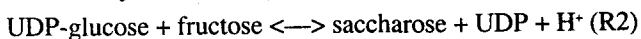
Métabolisme du saccharose

Quoique le saccharose soit largement utilisé, peu d'informations sont disponibles concernant son métabolisme lors du processus de l'embryogenèse somatique. Or le métabolisme du saccharose doit être élucidé particulièrement lors de la maturation car cette étape, durant laquelle les réserves s'accumulent, a un effet direct sur la qualité des embryons produits et ainsi sur le développement de plants. Les principales enzymes impliquées directement dans ce métabolisme sont :

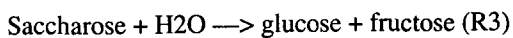
La saccharose phosphate synthase (SPS ; EC 2.4.1.14) :



La saccharose synthase (SuSy ; EC 2.4.1.13) :



L'invertase (Invertase ; EC 3.2.1.26) :



In vivo, la SPS catalyse la formation du saccharose phosphate (R1) qui est rapidement déphosphorylé par la saccharose phosphate phosphatase, donnant ainsi le saccharose. La SPS joue un rôle important dans le contrôle de la synthèse du saccharose. Une corrélation étroite entre la synthèse du saccharose et l'activité de la SPS a été montrée dans les tissus photosynthétiques comme les feuilles et dans les tissus non photosynthétiques comme les fruits (Hubbard et al., 1991 ; Huber et Huber, 1996). L'importance de la SPS dans la biosynthèse du saccharose a été confirmée par manipulation génétique. En effet, la surexpression de la SPS chez la tomate augmente la synthèse du saccharose alors que la réduction de son expression dans les feuilles de la pomme de terre inhibe la synthèse du saccharose (Frommer et Sonnewald, 1995).

La saccharose synthase (SuSy) catalyse de manière réversible la conversion du saccharose en UDP-glucose et fructose (R2). Le rôle prédominant de la SuSy in vivo est cependant axé sur le clivage du saccharose dans les tissus. L'activité de la SuSy est liée à la synthèse de la paroi cellulaire et de l'amidon (Wang et al., 1993). Récemment, Lingle (1999) a montré qu'il existe une corrélation entre l'activité de la SuSy et la quantité totale de sucres solubles. Toutefois, puisqu'elle a une capacité bidirectionnelle, la SuSy participe également à la synthèse du saccharose (Déjardin et al., 1997).

Les invertases catalysent l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose (R3). Chez les plantes, trois formes d'invertase ont été rapportées et sont classées selon le pH optimal de leur activité in vitro, leur solubilité et leur localisation cellulaire. Ainsi, il existe, une forme pariétale insoluble avec une activité optimale à pH 4.5-5, et deux formes solubles, l'une localisée dans le cytoplasme et l'autre dans la vacuole, présentant respectivement des valeurs de pH optimal de 7-8 et 4.5-5.5. Les invertases solubles permettent la régulation de la composition glucidiques des fruits (Hubbard et al., 1989 ; Yelle et al., 1991), alors que l'invertase pariétale est considérée comme essentielle dans l'établissement du gradient de saccharose entre la source et le puits (Winter et Huber, 2000). Les invertases contribuent aux changements morphologiques durant la croissance, au développement des plants (Tang et al., 1999) et des graines (Weber et al., 1995). L'activité de l'invertase change en réponse à des stress externes tels que la sécheresse, les blessures et/ou les attaques par des pathogènes (Sturm et Chripeels, 1990 ; Benhamou et al., 1991 ; Roitsch et Conzalez, 2004).

La SPS et la SuSy sont deux enzymes cytoplasmiques. Ainsi, la biosynthèse du saccharose est strictement compartimentée et limitée au cytoplasme. Bien que la SuSy et l'invertase possèdent le même substrat, il semble qu'elles jouent des rôles différents. La SuSy, par clivage du saccharose, fournit le substrat nécessaire pour la synthèse de l'amidon et de la paroi cellulaire, alors que l'invertase fournit les hexoses nécessaires pour la croissance et le développement.

Rôle des enzymes du métabolisme de saccharose lors de l'embryogenèse somatique

Pendant la maintenance, le tissu embryogène est très actif pendant les 10 premiers jours. Durant cette période, l'augmentation de l'activité des invertases permet la production des hexoses (glucose et fructose) nécessaires à la croissance du tissu embryogène, alors que la SuSy et la SPS

permettent le maintien du saccharose à un niveau constant dans le tissu embryogène. De son côté, la période de maturation est caractérisée par une première phase de croissance durant laquelle l'activité des invertases et les concentrations en glucose et fructose endogènes sont élevées, suivie d'une phase, caractérisée par la déposition de réserves telles que les protéines et l'amidon (Figure 2). Il a été montré qu'outre le rôle important des invertases solubles (Iraqi et Tremblay, 2001b), l'invertase pariétale joue aussi un rôle majeur lors de la maturation des embryons somatiques (Iraqi et al., 2004).

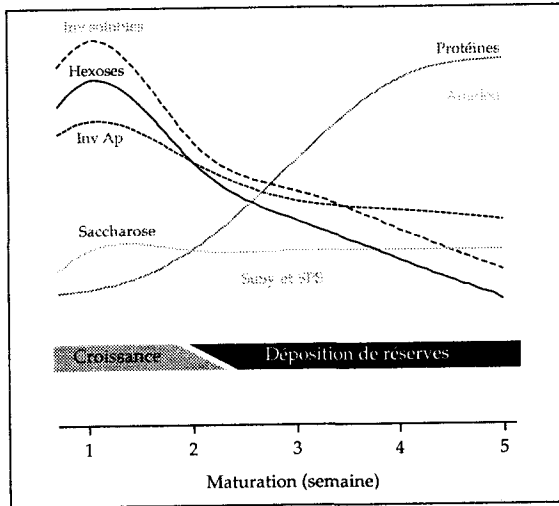


Figure 2. Évolution schématique de l'activité des invertases solubles (Inv solubles), de l'invertase pariétale (Inv Ap), de la saccharose synthase (SuSy) et de la saccharose phosphate synthase (SPS) en relation avec les teneurs endogènes en hexoses (glucose et fructose), saccharose, protéines et amidon durant la maturation des embryons somatiques chez l'épinette. (Figure adaptée de l'article Iraqi et Tremblay, 2001b).

La substitution du saccharose (6%) dans le milieu par des concentrations équivalentes en glucose et fructose affecte négativement le développement des embryons somatiques (Tableau 1). Le débalancement du métabolisme carboné au sein d'un tissu mis en présence de glucose et de fructose dans le milieu de maturation pourrait expliquer cette altération. En effet, l'activité des invertases solubles a chuté, en présence de glucose et de fructose dans le milieu, à l'inverse de celle de la SuSy (Iraqi et Tremblay, 2001b). La teneur en saccharose endogène n'a pas changé alors que celle des hexoses a augmenté (Iraqi et Tremblay, 2001b). Un tel débalancement est accompagné d'une sévère diminution de la teneur en protéines et en amidon dans le tissu embryogène durant la maturation. Malgré la faible utilisation du saccharose par le tissu embryogène durant la maturation (Iraqi et Tremblay, 2001a), la diminution de la concentration de saccharose dans le milieu de maturation affecte le métabolisme carboné. En effet, l'altération de l'activité de l'invertase pariétale et de son niveau en présence de faibles concentrations de saccharose dans le milieu est accompagnée par une diminution des hexoses endogènes, par une diminution des produits de réserves et par conséquent par une altération de la production d'embryons (Iraqi et al., 2004). Comme rapporté par Sheen et al. (1999), en présence de faibles concentrations de sac-

charose dans le milieu de maturation, la teneur en hexoses endogènes ne serait pas suffisante pour stimuler les hexokinases. Ces dernières permettent la phosphorylation des hexoses qui peuvent alors entrer dans le métabolisme et conséquemment participer à la synthèse de différents composés cellulaires dont les produits de réserve (Halford et al., 1999 ; Sheen et al., 1999 ; Farrar et al., 2000). Toutefois, une étude de l'activité des hexokinases sous différentes conditions de maturation pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Le niveau de saccharose dans le tissu embryogène augmente de trois à quatre fois durant la première semaine de maturation, comparativement à son niveau durant la maintenance, alors que les activités de la SuSy et de la SPS, deux enzymes qui participent à la synthèse du saccharose, ne suivent pas cette augmentation (Iraqi et Tremblay, 2001b). Ces résultats suggèrent une utilisation directe du saccharose du milieu de maturation par le tissu embryogène. Pour confirmer cette hypothèse et définir l'itinéraire du saccharose du milieu de maturation vers le tissu embryogène, l'assimilation de saccharose radioactif par le tissu embryogène a été suivie. Les résultats indiquent que le tissu embryogène peut utiliser directement le saccharose du milieu de maturation et qu'au moins une partie du saccharose assimilé est hydrolysée par l'invertase pariétale (Iraqi et al., 2004). Comme il a été démontré chez d'autres espèces (Felker et Goodwin, 1988 ; Thom et Maretzki, 1992), le tissu embryogène d'épinette possède donc deux stratégies d'utilisation du saccharose qui ne sont pas mutuellement exclusives. Ainsi, le largage de l'invertase qui contribue à l'hydrolyse du saccharose dans le milieu de maturation (Iraqi et Tremblay, 2001a ; Iraqi et al., 2004) et l'utilisation directe du saccharose par le tissu (Iraqi et al., 2004) opèrent en harmonie pour réguler l'utilisation des glucides nécessaires au développement des embryons somatiques (Figure 3).

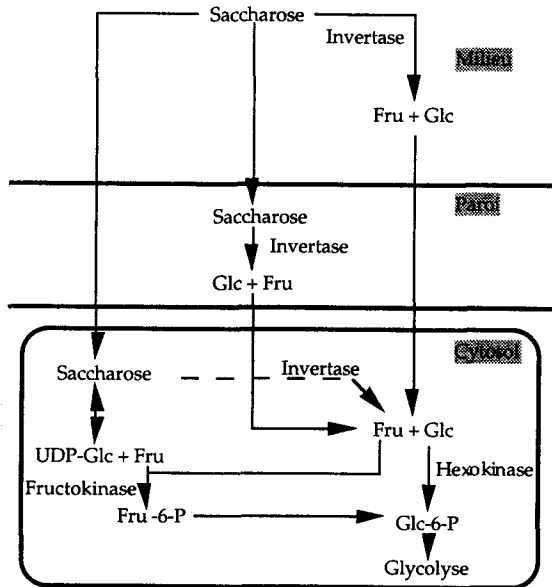


Figure 3. Utilisation du saccharose par le tissu embryogène. Le saccharose peut être hydrolysé dans le milieu de maturation par une invertase larguée dans le milieu, il peut être hydrolysé dans la paroi par l'invertase pariétale et peut aussi être directement assimilé par la cellule.

Conclusion

Cette synthèse montre qu'indépendamment de la pression osmotique, la présence du saccharose et son hydrolyse sont indispensables pour une production élevée d'embryons somatiques, leurs absences conduit à un déséquilibre du métabolisme carboné qui mène à une diminution des produits de réserves. Elle montre aussi que durant la phase de maturation, le tissu embryogène peut utiliser directement le saccharose du milieu et au moins une partie du saccharose assimilé est hydrolysée par l'invertase pariétale.

Cette synthèse contribue à la compréhension des aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires liés au métabolisme carboné lors du développement des embryons somatiques de l'épinette. Toutefois, une stratégie expérimentale basée sur des techniques de transformation génétique permettant de modifier l'expression des gènes codant pour les enzymes clés du métabolisme carboné permettra d'élucider avec une plus grande précision l'implication de chacune de ces enzymes lors du processus de l'embryogenèse somatique. Cette synthèse, dont la plante modèle est l'épinette, peut aider à la compréhension de l'utilisation du saccharose au cours de l'embryogenèse somatique de nombreuses espèces d'intérêt économique au Maroc. La compréhension de ces aspects fondamentaux peut aider à l'augmentation des rendements issus de la culture in vitro.

Références bibliographiques

- Benhamou N., Grenier G. et Chrispeels M. (1991). Accumulation of b-fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. *Plant Physiology* 97, 739-750.
- Bomal C. et Tremblay F.M. (2000). Dried cryopreserved somatic embryos of two *Picea* species provide suitable material for direct plantlet regeneration and germplasm storage. *Annals of Botany* 86, 177-183.
- Déjardin A., Rochat C., Maugenest S. et Boutin J.P. (1997). Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum* L.). *Planta* 201, 128-137.
- Desjardins Y., Hdidier C. et De Riek J. (1995). Carbon nutrition in vitro-regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M.A.L. Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 414-471.
- Ducreux G., De Buyser J., Dodeman V., Haïcour R., Lavergne D., Nato A., Ouichou A., Picard E. et Sihachakr D. (1998). Recherches récentes et biotechnologies de la multiplication végétative. *Biotechnology and vegetative propagation. Cahiers Agricultures* 7, 447-458.
- Eapen S. et George L. (1993). Somatic embryogenesis in peanut : influence of growth regulators and sugars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35, 151-156.
- Farrar J., Pollock C. et Gallagher J. (2000). Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154, 1-11.
- Felker F.C. et Goodwin J.C. (1988). Sugar uptake by maize endosperm suspension cultures. *Plant Physiology* 88, 1235-1239.
- Fernie R.A., Willmitzer L. et Trethewey R.N. (2002). Sucrose to starch : a transition in molecular plant physiology. *Trends in Plant Science* 7, 35-41.
- Find J.I., Nørgaard J.V. et Krogstrup P. (1998). Growth Parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *Journal of Plant Physiology* 152, 510-517.
- Finer J.J., Kriebel H.B. et Becwar M.R. (1989). Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Reports* 8, 203-206.
- Frommer W.B. et Sonnewald U. (1995). Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *Journal of Experimental Botany* 46, 587-607.
- George E.F. (1993). *Plant propagation by tissue culture, part 1, the technology*, Exegetics Ltd., England, pp 273-343.
- Grossnickle S.C. et Fan S. (1998). Genetic variation in summer gas exchange patterns of Interior spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss x *Picea engelmannii* Parry ex Engelm.). *Canadian Journal of Forestry Research* 28, 831-840.
- Hakman I. et Von Arnold S. (1985). Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *Journal of Plant Physiology* 121, 149-158.
- Halford N.G., Purcell P.C. et Hardie D.G. (1999). Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends in Plant Science* 4, 117-120.
- Högberg K.A., Ekberg I., Norell L. et Von Arnold S. (1998). Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme : a case study with *Picea abies*. *Canadian Journal of Forestry Research* 28, 1536-1545.

- Hubbard N., Huber S. et Pharr D. (1989). Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiology* 91, 1527-1534.
- Hubbard N., Pharr M. et Huber S. (1991). Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum* 82, 191-196.
- Huber S. et Huber J. (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 431-444.
- Iraqi D. et Tremblay F.M. (2001a). The role of sucrose during maturation of black spruce [*Picea mariana* (Mill.) BSP] and white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 111, 381-388.
- Iraqi D. et Tremblay F.M. (2001b). Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular levels of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany* 52, 2301-2311.
- Iraqi D., Le V.Q., Lamhamedi S.M. et Tremblay F.M. (2004). Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce : Involvement of apoplasmic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. *Journal of Plant Physiology* 162, 115-124.
- Isabel N., Boivin R., Levasseur C., Charest P.M., Bousquet J. et Tremblay F.M. (1996). Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *American Journal of Botany* 83, 1121-1130.
- Jain S.M., Gupta P.K. et Newton R.J. (1995). Somatic embryogenesis in woody plants. Volume 3 - Gymnosperms. Kluwer Academic Publishers.
- Jain S.M. et Gupta P.K. (2005). Protocols of somatic embryogenesis-Woody Plants, Kluwer Academic publishers.
- Koch K. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 509-540.
- Koch K. (2004). Sucrose metabolism : regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 235-246.
- Lamhamedi M.S., Chamberland H., Bernier P.Y. et Tremblay F.M. (2000). Clonal variation in morphology, growth, physiology, anatomy and ultrastructure of container-grown white spruce somatic plants. *Tree Physiology* 20, 869-880.
- Lingle S. (1999). Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. *Crop Science* 39, 480-486.
- Lipavska H. et Konradova H. (2004). Somatic embryogenesis in conifers : the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 40, 23-30.
- Merkle S.A. et Dean J.F.D. (2000). Forest tree biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 298-302.
- Roitsch T. et Gonzalez M.C. (2004). Function and regulation of plant invertases : sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9, 606-613.
- Sheen J., Zhou L. et Jang J.C. (1999). Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 410-418.

- Stasolla C., Van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Wenbin L. et Sederoff R.R. (2003). The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* 131, 49-60.
- Stasolla C., Bozhkov P.V., Chu T.M., Van Zyl L., Egertsdotter U., Suarez M.F., Craig D., Wolfinger R.D., Von Arlond S. et Sederoff R.R. (2004). Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiology* 24, 1073-1085.
- Sturm A. et Chrispeels M. (1990). cDNA cloning of carrot extracellular α -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *The Plant Cell* 2, 1107-1119.
- Sturm A. (1999). Invertases primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121, 1-7.
- Taber R.P., Zhang C. et Hu W.S. (1998). Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany* 76, 863-871.
- Tang G.Q., Lüscher M. et Sturm A. (1999). Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *The Plant Cell* 11, 177-189.
- Thom M. et Maretzki A. (1992). Evidence for direct uptake of sucrose by sugarcane stalk tissue. *Journal of Plant Physiology* 139, 555-559.
- Timmis R. (1998). Bioprocessing for tree production in the forest industry : Conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress*. 14, 156-166.
- Tremblay L. et Tremblay F.M. (1991). Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27, 95-103.
- Tremblay L. et Tremblay F.M. (1995). Maturation of black spruce somatic embryos : Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42, 39-46.
- Tremblay L., Levasseur C. et Tremblay F.M. (1999). Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany* 86, 1373-1381.
- Van Zyl L., Bozhkov P.V., Clapham D.H., Sederoff R.R. et Von Arlond S. (2003). Up, down and up again is a signature global gene expression pattern at the beginning of gymnosperm embryogenesis. *Gene Expression Patterns* 3, 83-91.
- Wang F., Sanz A., Brenner M. et Smith A. (1993). Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology* 101, 321-327.
- Weber H., Borisjuk L., Heim U., Buchner P. et Wobus U. (1995). Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions : cloning of cDNAs and cell-type specific expression. *The Plant Cell* 7, 1835-1846.
- Winter H. et Huber S.C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants : Localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19, 31-67.
- Yelle S., Chetelat R.T., Dorais M., DeVerna J.W. et Bennett A.B. (1991). Sink metabolism in tomato fruit IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiology* 95, 1026-1035.