

ONTOGENESE ET CONFORMITE DU POLLEN CHEZ
ECBALLIUM ELATERIUM ET *CUCUMIS MELO*

I. Introduction

Chez les Angiospermes, la qualité du pollen est un des facteurs critiques du succès reproductif. Le pollen produit doit être (i) fonctionnel, c'est-à-dire posséder toutes les propriétés biologiques lui permettant d'accomplir la reproduction *via* le convoyage et la production des gamètes mâles, et (ii) génétiquement conforme, les gamètes doivent être garants de l'identité génétique de la plante-mère et de l'espèce. L'ensemble de ces caractéristiques sont déterminées durant son ontogenèse. Celle-ci se déroule en trois grandes étapes, (i) la pré-méiose avec la différenciation de cellules sporogènes puis des cellules mères des microspores (CMM), (ii) la méiose des CMM qui aboutit à la formation de quatre microspores haploïdes et (iii) la post-méiose comprenant la division des microspores formant les grains de pollen et leur maturation (synthèse de réserves et déshydratation). Cependant, cette ontogenèse peut s'accompagner d'anomalies qui conduisent à la formation de grains de pollen non conformes (Bretagnolle and Thompson, 1995). En particulier, des dysfonctionnements peuvent perturber les mécanismes méiotiques, notamment lors de la réduction du nombre de chromosomes, de leur ségrégation et de la cytokinèse. Il en résulte la formation de grains de pollens altérés pouvant être non-réduits ($2n$), polyploïdes, aneuploïdes (Goluboskaya, 1989) ou encore anucléés (Bosco *et al.*, 1999). Mendes-Vieira *et al.* (2005) et Fuzinato *et al.* (2007) ont observé un autre type de dysfonctionnements, la dégénérescence de méiocytes et de microspores. Il est à noter que ces anomalies ont été essentiellement observées chez des hybrides issus de croisements interspécifiques ou chez des plantes ayant des niveaux de ploïdie particuliers, haploïdes ou polyploïdes. Dans le présent travail, nous avons recherché si ces anomalies pouvaient avoir lieu chez les deux espèces qui ont fait l'objet de cette étude : *C. melo* et *E. elaterium*.

Ce chapitre présente l'étude de l'ontogenèse du pollen chez les deux espèces depuis les cellules sporogènes jusqu'au pollen mature en utilisant une approche cytologique en microscopie photonique. La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour décrire la morphologie fine du pollen mature. Les anomalies susceptibles de se mettre en place lors de ce processus ontogénique ont également été abordées. Pour cela, une approche cyto-histologique en microscopie photonique a été utilisée pour (i) identifier les divers types d'anomalies ayant lieu durant l'ontogenèse et plus précisément pour (ii) quantifier les dégénérescences cellulaires aux différents stades de développement du pollen et (iii)

quantifier et caractériser les produits post-méiotiques anormaux. Les résultats ont été discutés en termes de comportement biologique et d'intégrité génétique.

II. Ontogenèse du pollen d'*E. elaterium* et de *C. melo*

L'ontogenèse du pollen des Angiospermes est étudiée depuis très longtemps et est maintenant bien connue. Pourtant, peu d'informations sont disponibles à propos de l'ontogenèse du pollen des Cucurbitacées. Quelques travaux, pour la plupart très anciens, ont eu pour objet l'étude du développement des structures reproductrices mâles des Cucurbitacées. Néanmoins, l'ontogenèse a rarement été étudiée dans son ensemble. La majorité des auteurs se sont intéressés uniquement aux aspects cytologiques et cytogénétiques de la microsporogenèse (Castetter, 1926 ; Passmore, 1930), exceptés Kirkwood (1906) et Simeonova *et al.* (1999) qui ont décrit l'ontogenèse complète du pollen chez certaines Cucurbitacées. Une description succincte de la formation du pollen chez *C. melo* a été rapportée par Chauhan et Singh (1968). Cependant, à notre connaissance, aucune description n'a été faite chez *E. elaterium*, et la description de l'ontogenèse chez *C. melo* nécessitait d'être approfondie. Il était donc nécessaire, avant de nous intéresser aux structures non conformes, de caractériser le développement normal du pollen chez *E. elaterium* et *C. melo*.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Matériel végétal

De jeunes plantes d'*E. elaterium* ont été collectées dans une population sauvage localisée à Caumont-sur-Durance (Vaucluse) en janvier 2007. Ces plantes ont été transplantées dans des pots en plastique et placées en serre à la Faculté des Sciences de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse où elles étaient irriguées deux fois par semaine. Ces plantes ont été ensuite transplantées en champ à l'INRA d'Avignon où elles ont reçu des soins horticulturaux limités : faible irrigation, aucun contrôle de ravageurs.

Des graines de melon (*C. melo* L.) var. Thorgal ® (Nunhems) ont été semées en godet individuel et gardées sous serre jusqu'au stade « deux vraies feuilles » à l'unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, INRA Avignon domaine Saint-Maurice. Les jeunes plantules ont été ensuite plantées sur sol paillé sous tunnel insect-proof à l'INRA Avignon domaine Saint-Paul et irriguées trois fois par jour.

1.2. Microscopie photonique

a. Récolte et préparations des échantillons

En octobre 2007, des boutons floraux mâles d'*E. elaterium* de différentes tailles ont été prélevés. Ils ont été classés en fonction de leur diamètre en six classes : < 2 mm, 2-3 mm, 3-4 mm, 4-5 mm, 5-6 mm et > 6 mm. La récolte des échantillons de *C. melo* a été faite en septembre 2009. Des boutons floraux mâles de différentes tailles ont été prélevés mais n'ont pas été triés.

Immédiatement après récolte, tous les échantillons ont été fixés dans une solution extemporanée de paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,5. Pour assurer une bonne pénétration du fixateur, le périanthe des boutons floraux a été retiré et les échantillons ont été soumis au vide pendant 20 minutes. Après 48 h de fixation à 4°C, les échantillons ont été rincés à l'eau distillée et stockés dans de l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à utilisation.

b. Préparations et observations microscopiques

Sections colorées

Entre 6 et 13 boutons floraux d'*E. elaterium* ont été préparés pour chaque classe de diamètre. Pour *C. melo*, 62 boutons floraux toutes tailles confondues ont été préparés. Les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (80%, 90%, 95% et 100%) puis inclus dans de la résine de méthacrylate (Kit Technovit 7100, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Des sections sériées de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à rétraction (Supercut 2065, Reichert-Young, Vienne, Autriche) et collectées sur des lames porte-objet. Les sections ont été hydratées (eau distillée) avant d'être colorées à l'acide périodique-réactif de Schiff (PAS) et au Naphtol Blue Black (NBB) pour visualiser respectivement les polysaccharides en rose et les protéines en bleu. Après séchage, les sections ont été montées de manière permanente (Isomount, Labonord, Templemars, France).

Montage in toto

Des anthères d'*E. elaterium* récoltées à l'anthèse ont été immergées dans une goutte de carmin acétique à 1% sur une lame de microscope. Ce colorant permet de visualiser les

cytoplasmes et les noyaux en rouge. Après mise en suspension du pollen, les anthères ont été retirées. L'ensemble a été recouvert d'une lamelle couvre-objet.

Observations microscopiques

Les sections et les montages *in toto* ont été observés avec un microscope (Leica DMR, Wetzlar, Allemagne) et photographiés avec une caméra digitale (Leica DFC 300 FX, Wetzlar, Allemagne).

1.3. Microscopie électronique

Des fleurs d'*E. elaterium* et de *C. melo* ont été récoltées à l'anthèse. La préparation des échantillons ainsi que leur observation ont été réalisées par le laboratoire de microscopie de l'INRA d'Avignon. Pour cela, des grains de pollen ont été déposés par tapotement des anthères sur un support métallique recouvert d'un adhésif double face. Ils ont été recouverts d'une fine couche d'or à l'aide d'un métalliseur (Balzers SCD 004, Bal Tec AG, Fürstentum, Lichtenstein). Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage à 10 KV (Philips FEI XL30, FEG, FEI Company, Hillsboro, USA).

2. Résultats

2.1. Description cyto-morphologique de l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium* et de *C. melo*

L'appareil reproducteur mâle d'*E. elaterium* et de *C. melo* est composé de deux paires d'anthères soudées et d'une anthère libre (Figure 11). Les anthères d'*E. elaterium* semblent être bisporangées. Les thèques de grande taille présentent d'importants repliements et sont reliées au filet par un connectif bien développé.



Figure 11 : Androcée d'*E. elaterium*. De droite à gauche, les deux paires d'anthères soudées et l'anthère libre.

L'observation en microscopie photonique des sections de boutons floraux nous a permis de caractériser les différents stades de l'ontogenèse du pollen chez *E. elaterium* et chez *C. melo*. L'anthère, au début de l'ontogenèse, est composée d'une partie centrale occupée par un tissu massif constitué de cellules sporogènes entourées de plusieurs couches cellulaires et d'un épiderme (Figure 12A et Figure 13A). Les cellules sporogènes présentent un contour anguleux et une paroi fine. Elles contiennent un cytoplasme exempt de vacuole et riche en protéines, et un noyau central volumineux contenant un nucléole important. Ces caractéristiques témoignent d'une forte activité métabolique.

Les cellules sporogènes se différencient par accroissement en méiocytes ou CMM (Figure 12B et Figure 13B). Parallèlement à la préparation de la méiose qui se signale par la condensation des chromosomes, les cellules accumulent des réserves sous forme d'amidon et s'entourent d'une épaisse couche de callose qui les individualise (Figure 12C). A plusieurs endroits, la couche de callose présente des interruptions par lesquels passent des trabécules cytoplasmiques qui établissent un continuum entre les CMM (Figure 12C et Figure 13B). Durant ce stade, les tissus de l'anthère se différencient en trois couches : le tapis, l'endothécium et l'assise transitoire toujours protégées par l'épiderme (Figure 12B et Figure 13B). Les CMM entrent ensuite en méiose (Figure 12D, Figure 13C et D) qui se déroule de manière simultanée. En effet, il n'y a pas de cytokinèse entre les deux divisions méiotiques comme le montre l'absence de phragmoplaste suite à la télophase I (Figure 12D et Figure 13C) et la présence des deux fuseaux lors de la seconde division méiotique (Figure 13D). Les cellules du tapis, quant à elles, augmentent de volume, synthétisent des substances comme l'amidon et deviennent binucléées, ce qui suggère un changement d'activité métabolique. Leurs parois contiguës commencent à se lyser.

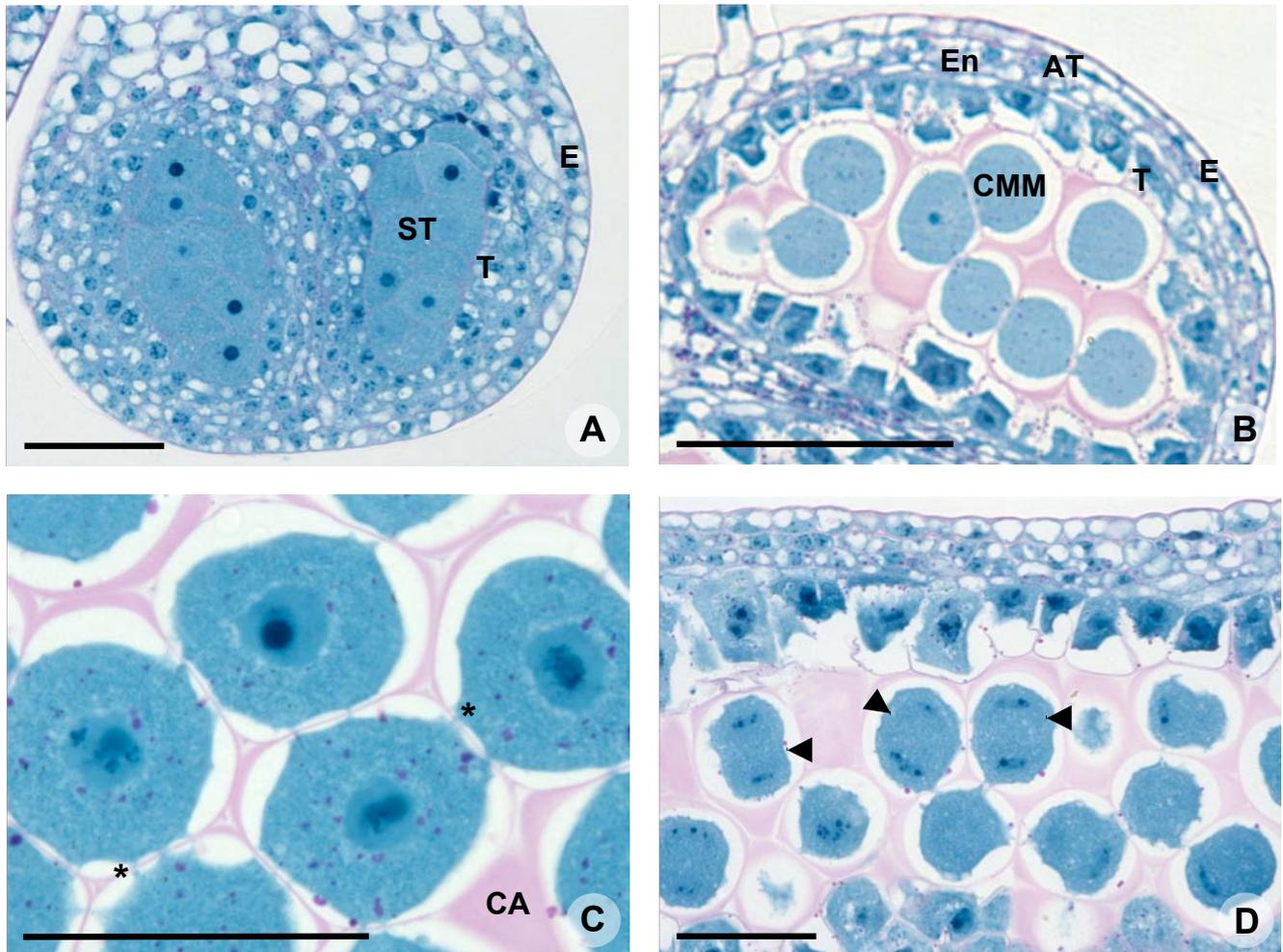


Figure 12 : Développement pré-méiotique et méiotique chez *E. elaterium*. **A** Jeune anthere composée des quatre couches cellulaires périphériques dont l'épiderme (E) et le tapis (T), et au centre le tissu sporogène (ST). **B** Cellules mères des microspores (CMM) entourées du tapis (T), de l'endothécium (En), de l'assise transitoire (AT) et de l'épiderme (E). **C** CMM contenant des réserves d'amidon (inclusions roses), entourées d'une couche épaisse de callose (CA) et communiquant par des trabécules cytoplasmiques (*). **D** CMM à la fin de la première division de la méiose (▶). Barre = 50 µm.

La cytokinèse intervient suite à la deuxième division méiotique donnant ainsi naissance à quatre microspores qui restent groupées en tétrade au sein de la paroi de la cellule-mère suivant un arrangement tétraédrique (Figure 14A et Figure 15A).

La dégradation de la callose entraîne d'une part la libération des microspores et d'autre part le passage, au niveau du locule, d'une structure tissulaire continue à la formation d'une cavité (Figure 14B et Figure 15B). Au sein de cette cavité, les microspores libres présentent un début d'édification de l'exine, un cytoplasme diffus dû à l'apparition de petites vacuoles dispersées.

Dès le stade microspores libres, apparaissent chez *E. elaterium* trois invaginations du système pariétal, conférant une forme trilobée aux microspores (Figure 14C).

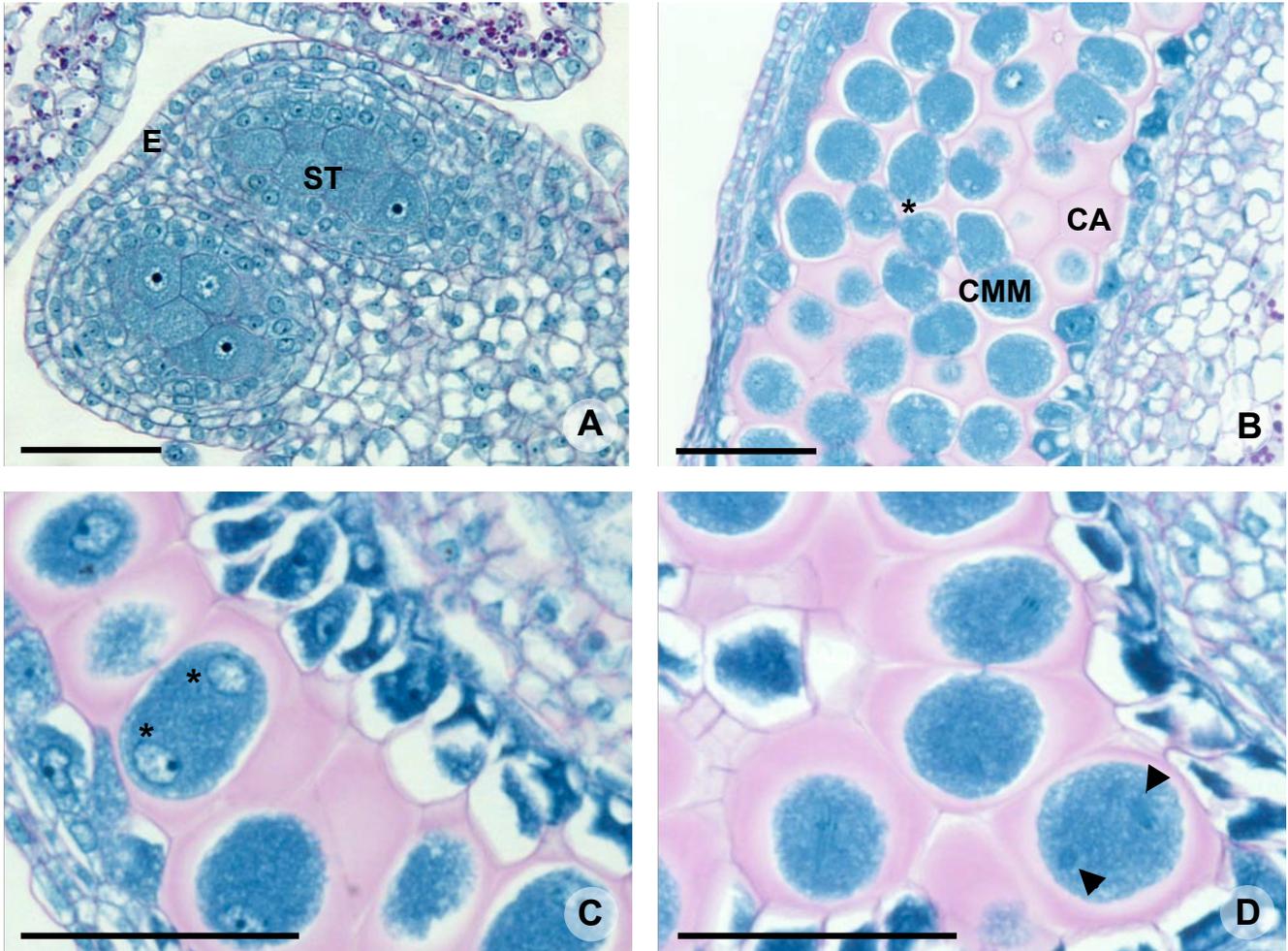


Figure 13 : Développement pré-méiotique et méiotique chez *C. melo*. **A** Jeune anthère composée des quatre couches cellulaires de la paroi dont l'épiderme (E) et au centre le tissu sporogène (ST). **B** Cellules mères des microspores (CMM) entourées d'une épaisse couche de callose (CA) et communiquant entre elles par des trabécules cytoplasmiques (*). **C** CMM à la fin de la première division de la méiose montrant deux noyaux (*). **D** CMM au cours de la deuxième division de la méiose, les deux fuseaux perpendiculaires sont bien visibles (▶). Barre = 50 µm.

Les cellules du tapis continuent leur accroissement et se vacuolisent. Leurs parois finissent par disparaître complètement formant alors des protoplastes qui se dissocient et envahissent le locule. Chez les microspores, les petites vacuoles fusionnent pour n'en former qu'une seule occupant l'essentiel du volume cellulaire, plaquant ainsi le cytoplasme et le noyau à la périphérie et induisant un accroissement de la cellule (Figure 14C et Figure 15C).

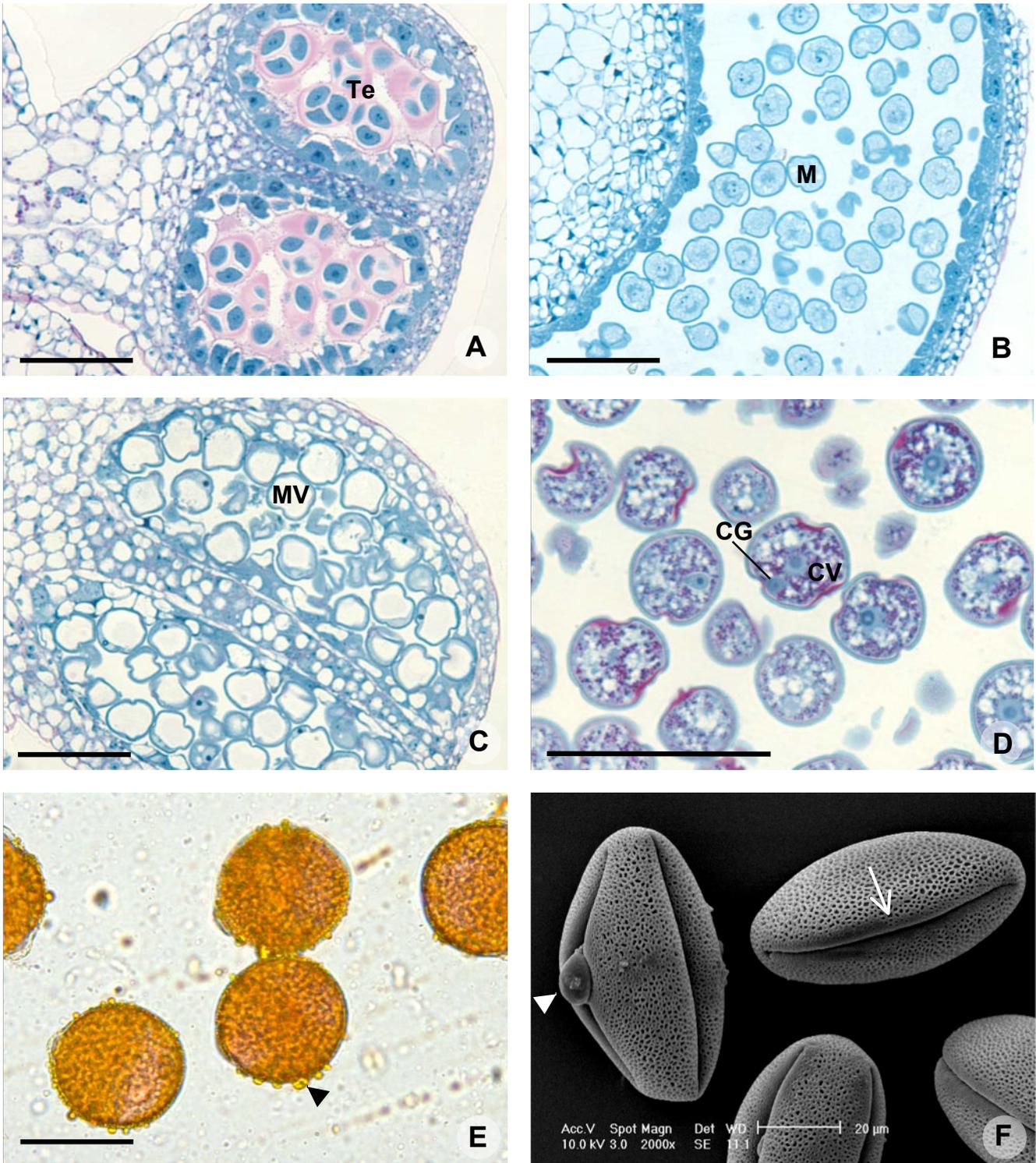


Figure 14 : Développement post-méiotique du pollen d'*E. elaterium*. A-D Sections colorées au PAS/NBB. A Tétrades (Te) composées de quatre microspores. B Microspores libres (M) après dissolution de la couche de callose. C Importante vacuolisation des microspores (MV). D Grains de pollen composés de la cellule végétative (CV) et de la cellule génératrice (CG) et présentant d'importantes inclusions d'amidon et de protéines. E Montage *in toto* de pollen mature présentant des gouttelettes de pollenkitt (►). F Photographie au microscope électronique à balayage du pollen à l'anthèse présentant des sillons (→) et des ouvertures (►) © Chifflet Bornard INRA 2008. Barres = 50 µm (A-E) ; 20 µm (F).

Les microspores subissent ensuite la division pollinique et forment des grains de pollen bicellulaires (Figure 14D et Figure 15D). Chaque grain de pollen présente une cellule végétative volumineuse incluant une petite cellule génératrice. Cette dernière se caractérise par un cytoplasme dense et très réduit et une chromatine condensée, alors que la cellule végétative possède un cytoplasme contenant une multitude de petites vacuoles et une importante population de grains d'amidon. A ce stade peut s'observer le dépôt d'intine qui débute au niveau des apertures pour les deux espèces ainsi qu'au niveau des invaginations pariétales chez *E. elaterium* (Figure 14D et Figure 15D). A ces emplacements, l'exine est déposée en couche fine. Nos observations ont montré que le pollen sectionné à la préanthèse est de type bicellulaire. Il montre un sporoderme bien différencié avec une exine ornementée, d'épaisseur constante exceptée au niveau des apertures chez les deux espèces ainsi qu'au niveau des invaginations pariétales chez *E. elaterium* où elle s'amincit. Le dépôt d'intine est continu sur toute la surface du pollen et particulièrement épaissi sous les apertures. Le cytoplasme de la cellule végétative montre d'importantes quantités de réserves sous forme de volumineux grains d'amidon et de protéines (Figure 14D et Figure 15E). La cellule génératrice reste incluse dans le cytoplasme de la cellule végétative, mais elle est bien individualisée par la présence d'une paroi. Son cytoplasme, très restreint, ne contient pas d'amidon.

Les observations de pollen d'*E. elaterium* à l'anthèse en montage *in toto* montrent la présence de pollenkitt sous forme de goulettes associées à l'exine (Figure 14E). Cette substance de couleur orange n'est pas visible sur les sections cyto-histologiques car elle est éliminée par les solvants organiques employés lors du traitement des échantillons.

Les observations au MEB nous ont permis de caractériser de manière fine l'architecture de l'exine et la structure générale des grains de pollen matures. Nos observations ont montré que le pollen d'*E. elaterium* possède une forme prolée, c'est-à-dire plus long que large, d'environ 60 µm d'axe polaire et de 30 µm d'axe équatorial (Figure 14F). Il montre une structure tricolporée formée de trois sillons longitudinaux avec, en leur milieu, un pore germinatif ou aperture. Son exine est très ornementée avec une architecture réticulée, les ornements forment un réseau.

Quant au pollen de *C. melo* (Figure 15F), nos observations nous ont montré qu'il était de forme sub-sphérique d'environ 40 µm de diamètre avec trois pores germinatifs. Son exine présente également une architecture réticulée.

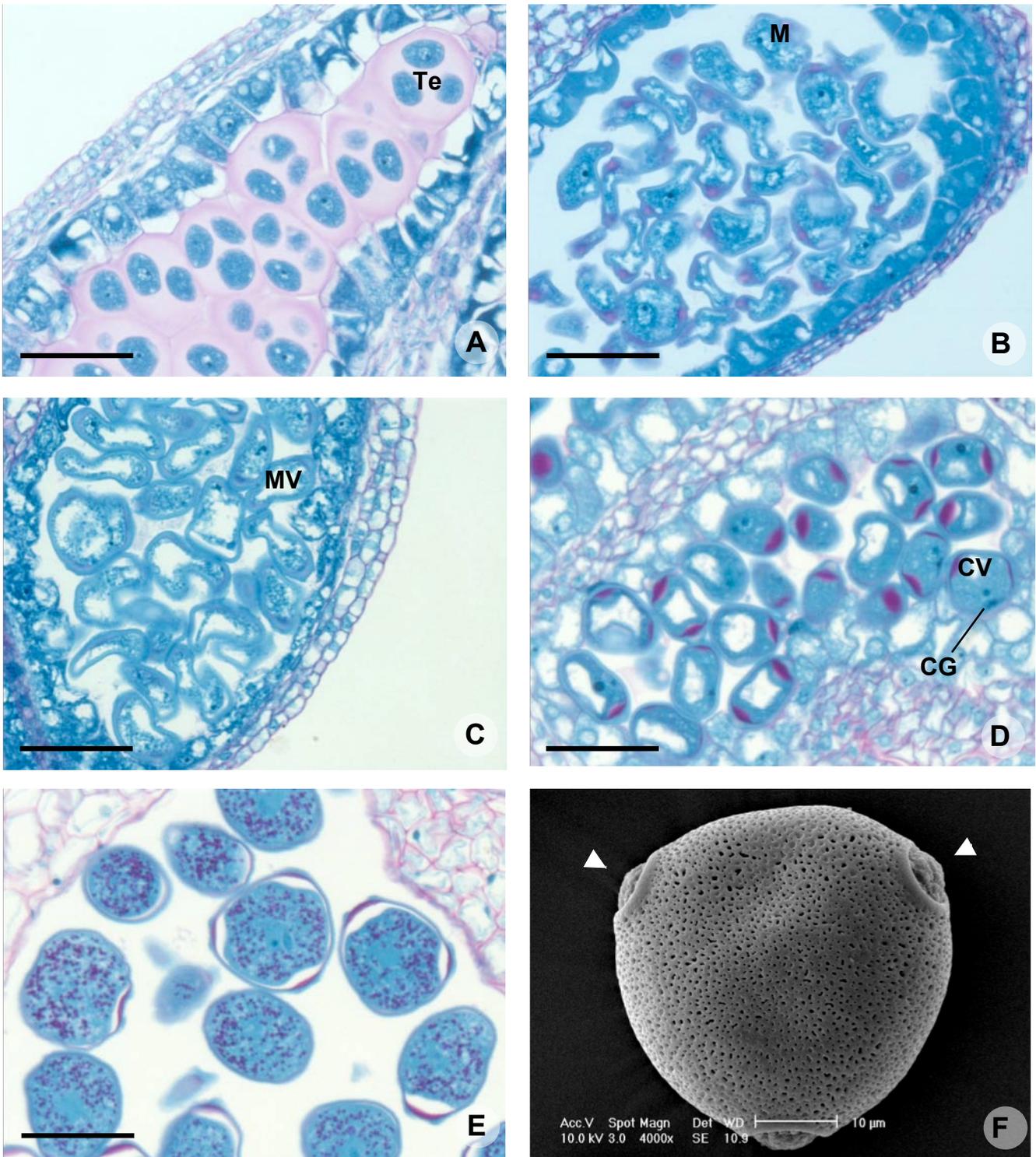


Figure 15 : Développement post-méiotique du pollen de *C. melo*. A-E Sections colorées au PAS/NBB. A Tétrades (Te) composées de quatre microspores. B Microspores libres (M) après dissolution de la couche de callose. C Microspores vacuolisées (MV). D Grains de pollen composés de la cellule végétative vacuolisée (CV) et de la cellule génératrice (CG). E Grains de pollen présentant d'importantes inclusions d'amidon (grains roses) et de protéines (en bleu). F Photographie au microscope électronique à balayage du pollen à l'anthèse montrant les trois apertures (►) © Chifflet Bornard INRA 2008. Barres = 50 µm (A-E) ; 10 µm (F).

2.2. Corrélation diamètre du bouton floral / stade ontogénique chez *E. elaterium*

Pour caractériser finement l'ontogénèse du pollen chez *E. elaterium*, nous avons cherché un marqueur morphologique. Pour cela, des boutons floraux ont été triés par classes de diamètre avant d'être sectionnés et observés au microscope photonique. La figure 16 présente la proportion de boutons floraux à un stade ontogénique donné par classe de diamètre. L'examen des résultats montre que les classes de diamètres 1-2 mm, 2-3 mm, 5-6 mm et > 6 mm sont associées à des stades ontogéniques spécifiques qui sont respectivement : cellules sporogènes, CMM, microspores vacuolisées et pollen. Cependant, les classes 3-4 mm et 4-5 mm ne sont pas discriminantes pour le stade ontogénique. En effet, les boutons de 3 à 4 mm peuvent être au stade CMM ou au stade tétrade et les boutons de 4 à 5 mm peuvent être au stade tétrade, au stade microspore libre et, en plus faible proportion, au stade microspores vacuolisées. Il est à noter que le stade microspores libres est spécifique d'une seule classe de diamètres. En effet, il n'a été observé que chez les boutons floraux de 4 à 5 mm de diamètre.

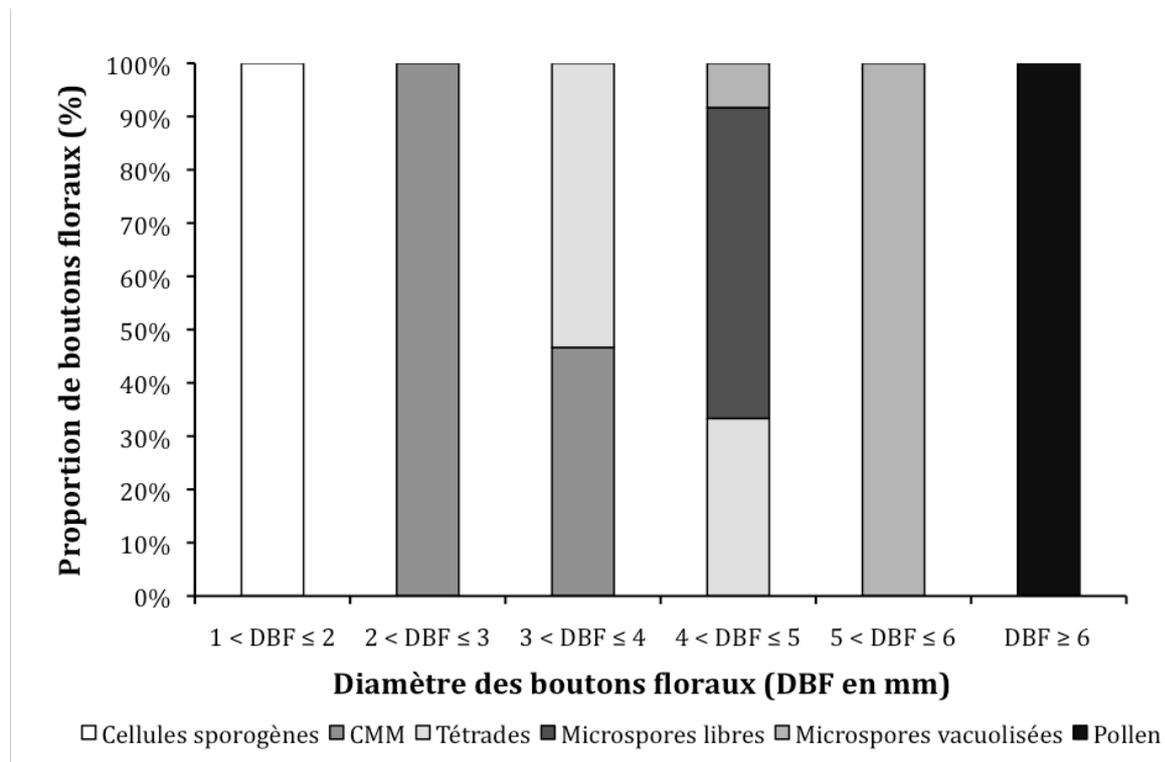


Figure 16 : Corrélation entre le diamètre du bouton floral d'*E. elaterium* et le stade ontogénique. Les boutons floraux ont été triés par classe de diamètre avant d'être observés pour identifier les stades ontogéniques des cellules mâles. L'historgramme présente la proportion de boutons floraux à un stade ontogénique donné en fonction de leur diamètre.

3. Discussion

Le présent travail constitue, à notre connaissance, la première analyse de l'ontogenèse pollinique chez *E. elaterium* et un approfondissement de celle de *C. melo*. Dans l'ensemble, l'ontogenèse pollinique chez *C. melo* observée ici est concordante avec les observations de Chauhan et Singh (1968). Nos observations révèlent que chez ces deux espèces la différenciation des cellules sporogènes en CMM semble se faire par accroissement cellulaire comme chez *C. sativus* (Heimlich, 1925), *Micrampelis lobata* et *Cyclanthera explodens*, d'autres Cucurbitacées (Kirkwood, 1906). Cette caractéristique n'est pas commune à l'ensemble de cette famille. En effet, chez d'autres Cucurbitacées, les cellules sporogènes se divisent pour former les CMM, comme chez *Fevillea cordifolia* (Kirkwood, 1906). Les CMM s'entourent d'une épaisse couche de callose qui les isole des tissus sporophytiques, mais sont reliées entre elles par des trabécules cytoplasmiques. Ces derniers créent un continuum qui permet la synchronisation de la méiose dans l'anthère (Boavida *et al.*, 2005). La microsporogénèse d'*E. elaterium* et de *C. melo* est comme chez d'autres Cucurbitacées (Kirkwood, 1906 ; Castetter, 1926 ; Heimlich, 1927 ; Simeonova *et al.*, 1999) de type simultanée : la première division méiotique est suivie directement de la seconde avant que la cytokinèse n'ait lieu et ne forme des tétrades de type tétraédrique. Ce type de microsporogénèse est le plus répandu chez les Angiospermes Eudicotylédones ou Dicotylédones vraies (Furness *et al.*, 2002).

Le développement des microspores puis des grains de pollen décrit ici suit le même déroulement que chez d'autres Cucurbitacées comme *M. lobata* (Kirkwood, 1906) et *C. sativus* (Simeonova *et al.*, 1999). Il s'agit du type normal de développement défini par Wulff (1939) caractérisé par un accroissement de la taille des microspores et par la formation de l'exine juste après la méiose. Ce développement est le plus répandu chez les Angiospermes. Le tapis, quant à lui, est de type pariétal. Les cellules du tapis ne perdent leur paroi qu'après le stade tétrade, n'envahissent pas le locule et dégèrent avant la mitose pollinique. Ce type de tapis a déjà été décrit chez d'autres Cucurbitacées (Ciampolini *et al.*, 1993) et est commun chez les plantes se développant dans des milieux secs (Pacini *et al.*, 1985).

A maturité, les grains de pollen d'*E. elaterium* et de *C. melo* sont bicellulaires comme ceux de *C. sativus* (Simeonova *et al.*, 1999) et *Cucurbita pepo* (Digonnet-Kerhoas *et al.*, 1989). Le pollen d'*E. elaterium*, avec sa forme prolée et sa structure tricolporée, c'est à dire trois sillons et trois pores, ressemble au pollen de *Bryonia dioica* (Franchi *et al.*, 2002). En revanche, il diffère fortement du pollen de melon qui présente une forme sub-sphérique et trois ouvertures.

Les caractéristiques morphologiques rapportées ici pour le pollen d'*E. elaterium* lui confèrent probablement des adaptations aux variations hygrométriques qu'il doit supporter pendant la période de présentation. Sa configuration permet de le classer parmi les pollens dits « partiellement déshydratés » caractérisés par un contenu en eau inférieur à 30% et une forme prolée présentant des sillons (Pacini and Hesse, 2004 ; Pacini *et al.*, 2006). Ces derniers permettent des changements de volume en fonction du statut hydrique (déshydratation, réhydratation) sans dommages structuraux (Pacini and Hesse, 2004). Ces pollens sont, de ce fait, moins sensibles aux stress environnementaux et ont une longévité plus importante mais germent plus lentement car leur réhydratation est plus longue (Franchi *et al.*, 2002).

En revanche, le pollen de melon dont le contenu en eau à l'anthèse est supérieur à 30% est classé parmi les pollens dit « partiellement hydratés » (Franchi *et al.*, 2002). Il est plus sensible aux changements environnementaux, perd rapidement l'eau qu'il contient et a une longévité réduite (Nepi *et al.*, 2001 ; Franchi *et al.*, 2002).

La différence concernant le statut hydrique entre ces deux types de pollens suggère que : (i) les étapes de maturation diffèrent chez les deux espèces et (ii) qu'ils mettent en place des mécanismes différents lors de l'interaction pollen-pistil, notamment lors de l'étape de réhydratation.

La recherche de corrélations entre les dimensions des boutons floraux mâles et les stades ontogéniques du pollen dont ils sont le siège chez *E. elaterium* a révélé des associations spécifiques et d'autres non spécifiques. Les stades ontogéniques précoces et tardifs montrent une corrélation nette avec le diamètre du bouton floral alors que les stades ontogéniques intermédiaires semblent se retrouver chez plusieurs diamètres de boutons. Ceci peut être expliqué soit par la variabilité génétique du matériel végétal utilisé (issu de pollinisations libres), soit par l'asynchronisme des stades ontogéniques en question. Cette étude nous a permis de disposer d'un marqueur (diamètre du bouton) des principales phases du développement des structures reproductrices mâles d'*E. elaterium*, ce qui nous a grandement facilité les expérimentations ultérieures. Des observations similaires ont été obtenues par Koltunow *et al.* (1990) chez le tabac.

Cette approche n'a pas été conduite chez *C. melo* en raison de la taille réduite des boutons floraux mâles qui ne permettait pas un tri précis en classes de diamètre.

L'ontogenèse pollinique présentée ici constitue le développement normal du pollen chez les deux espèces étudiées. Cependant, à l'occasion de ce travail, nous avons également observé la présence de structures anormales suggérant des dysfonctionnements des processus impliqués.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous attacherons à caractériser ces produits non conformes.