Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 20 (1967)
Heft: 1

Artikel: Recherches sur le développement des tissus végétaux cultivés in vitro dans ses rapports avec l'utilisation du glucose et l'action de la lumière

Autor: Naef, Jaques

Kapitel: III: Introduction aux expériences

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739382

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

fioles de Warburg, soit lavées à l'eau pour limiter l'oxydation superficielle inhérente au découpage. Par la suite nous introduisions dans les fioles des colonies intactes, âgées si possible de trois semaines pour les raisons énoncées plus loin (p. 53). Dans ce cas également, nous mettions au préalable 10 ml. de milieu de mesure dans les fioles. Nous complétions ensuite le volume à 15 ml. en admettant que le poids spécifique des tissus est de 1. Après quoi les couvercles de fioles étaient soigneusement adaptés et celles-ci fixées aux manomètres correspondants. Le thermobaromètre était préparé de manière identique. Après un temps d'équilibre de 20-30 minutes dans le bain thermostatique à 25°C, les robinets étaient fermés et les mesures des variations de volume gazeux étaient notées toutes les 10 minutes ou dans certains cas toutes les 15 minutes.

Calcul de l'oxygène libéré

Nous avons suivi la méthode générale dont nous donnons le sommaire. Les expériences comprennent en général 3 phases d'égale durée. C'est ce procédé que nous avons adopté. Il s'agit d'une phase éclairée précédée et suivie d'une phase obscure. En admettant que l'intensité respiratoire est constante, on mesure au cours de la période éclairée la valeur négative de la consommation d'oxygène à laquelle s'ajoute la valeur positive du dégagement d'oxygène produit par la photosynthèse. Afin de diminuer l'erreur de mesure de l'intensité respiratoire, on calcule cette dernière en faisant la moyenne entre deux lectures faites l'une avant et l'autre après la période éclairée. Pour obtenir la valeur réelle de la photosynthèse, on ajoute à la moyenne de l'intensité respiratoire la valeur de la photosynthèse mesurée. Pour simplifier le calcul on peut utiliser la formule proposée par Stauffer [64] qui permet de tenir compte du sens négatif ou positif des valeurs des échanges gazeux à la lumière.

CHAPITRE III. — INTRODUCTION AUX EXPÉRIENCES

1. RÔLE DE QUELQUES FACTEURS EXTERNES SUR LA CROISSANCE.

Questions posées:

Effet du glucose offert

Cette question concerne un domaine qui a été étudié dans les débuts des recherches sur la nutrition des tissus cultivés in vitro et en particulier dans les travaux de Gautheret [15, 19]. Ces derniers ont été effectués en cultivant les tissus sur des milieux dont la source glucidique était le saccharose, alors que nous avons utilisé le glucose dont la valeur nutritive est un peu plus faible mais qui a l'avantage d'être un ose simple.

On pouvait donc se demander quel était l'effet de ce glucide sur des colonies tissulaires. Nous avons choisi comme matériel d'étude une souche de tissu cambial de Carotte et une souche de Crown-gall de Scorsonère. Leurs colonies ont des caractères très différents mais présentent l'avantage de se cultiver facilement et assez rapidement. Lorsqu'on procède à l'entretien de ces souches tissulaires, on ne leur fournit pas la même dose de sucre. Le milieu de culture sur lequel les tissus de Carotte sont entretenus contient 2 % de glucose; celui que l'on utilise pour une souche de Crown-gall de Scorsonère en contient 5 %.

La première question que nous nous sommes posée était de rechercher quelle pouvait être l'influence de doses de plus en plus élevées de glucose sur la croissance des tissus choisis. Il était donc possible de comparer le comportement de ces derniers entre eux. On sait d'après les premiers travaux [15] que le saccharose offert en doses de plus en plus fortes à des tissus de Carotte détermine un maximum de croissance à 3 %. On sait aussi que ces tissus ne prolifèrent pas en l'absence d'une source glucidique. Il était intéressant de savoir quelle était la plus petite dose capable de déterminer une croissance appréciable.

Effet de la lumière

Il était intéressant de savoir quelle était l'influence de la lumière sur les tissus que nous avions choisis. Pour cela il était nécessaire de faire un choix et de déterminer des conditions expérimentales constantes. Nous avons pu réaliser ces conditions dans des cabines climatisées dont l'éclairage était défini et identique dans tous les cas étudiés. Il est évident que lorsqu'on se pose cette question il faut tenir compte de la nature plastidaire des tissus. Nous indiquerons cela plus loin. Mais d'emblée on pouvait s'attendre à observer les effets de la photosynthèse dans les cas les plus favorables.

On sait que le tissu cambial de Carotte prolifère bien en lumière diffuse. Il en est de même pour les tissus de Crown-gall de Scorsonère. Il fallait encore savoir si des tissus cultivés entièrement à l'obscurité ou à la lumière contrôlée présenteraient une croissance très différente ou au contraire identique, voire analogue. A priori on peut attribuer un rôle à la photosynthèse mais il faut encore savoir si elle se manifeste réellement et si cette fonction est significative. Un choix a donc dû être fait quant à la durée d'éclairement. Nous n'avons pas étudié la croissance en fonction de la qualité de la lumière ni en fonction de la durée d'éclairement car cela nous aurait considérablement compliqué nos expériences. Nous avons décidé de donner une lumière discontinue aux tissus c'est à dire une période quotidienne de 14 heures d'éclairement et une de 10 heures d'obscurité.

Nous avons signalé divers travaux réalisé dans ce sens, en particulier ceux dont les résultats démontrent l'effet de la lumière sur le contenu glucidique des tissus. Nous avons tenu à vérifier certains de ces résultats. Nous avons utilisé pour cela les souches tissulaires que nous entretenions.

On pouvait penser que les tissus ne seraient pas indifférents aux effets de la lumière. Nous voulions d'abord nous assurer que tel était bien le cas pour ensuite mettre en évidence les relations qui pouvaient exister entre l'apport d'un glucide exogène et l'action de la lumière.

Effet de la combinaison des facteurs glucose et lumière

La troisième question qui a orienté la partie expérimentale est de savoir quelle est l'action de doses de plus en plus fortes de glucose combinées à la présence ou à l'absence de lumière. Il y a là en effet une réunion de deux groupes de facteurs qui peuvent influencer la croissance d'une manière importante. Deux raisons nous ont conduit à poser cette question. C'est du reste en faisant intervenir simultanément ces deux types de variables que nous avons fait nos expériences.

Premièrement les tissus sont considérés comme étant carbohétérotrophes puisqu'on leur fournit du glucose. Deuxièmement les tissus qui sont capables de verdir sous l'effet de la lumière peuvent présenter, face à l'offre de glucose, des réactions différentes ou au contraire semblables à celles que manifestent des tissus cultivés à l'obscurité. En d'autres termes ils seraient sensibles ou indifférents à l'action de la lumière.

Comme nous l'avons déjà dit, l'offre de glucose détermine un optimum de croissance à une dose déterminée. Pour les tissus cultivés en lumière diffuse, nous voulions savoir si cet optimum se manifestait aussi bien pour les tissus maintenus à l'obscurité que pour ceux qui étaient cultivés à la lumière. Et dans cette éventualité, s'il correspondait à la même dose de glucose dans les deux cas.

Par le fait que nous soumettions les tissus aux deux groupes de facteurs: glucide-lumière partielle et glucideo-bscurité complète, l'interprétation des résultats s'en trouve plus compliquée, mais c'est bien sous cette forme combinée que les réactions sont les plus frappantes.

Il était également important de suivre l'évolution de la nutrition glucidique dans des conditions expérimentales bien déterminées et toujours semblables, ainsi que nous le préciserons plus loin. C'est pour ces raisons que nous avons utilisé un éclairage artificiel et constamment identique ainsi qu'une température invariable.

La comparaison des résultats devait par conséquent nous permettre d'apprécier l'intervention de la photosynthèse *in vitro*.

2. Rôle de la nature des tissus en fonction des questions posées.

Questions corollaires:

Tissu chlorophyllien

Le choix d'un tissu chlorophyllien nous permettait d'effectuer des mesures de croissance en relation avec la dose de sucre d'une part et la lumière ou l'obscurité

d'autre part. Il s'agissait donc de savoir si un tissu chlorophyllien réagirait de manière analogue ou parallèle lorsqu'on le cultive à la lumière et à l'obscurité sur des milieux dont la concentration en glucose variait de 1 à 6%.

Si le tissu était placé dans des conditions d'éclairement artificiel, on pourrait le forcer à développer son plastidome, donc attendre des résultats plus caractéristiques et peut-être différents de ceux que l'on connaissait déjà au sujet de l'utilisation du glucose. Cela nous a conduit à poser d'autres questions: dosage des chlorophylles, photosynthèse, par exemple.

a) Dosage des chlorophylles

Puisque l'on obtient en chambre climatisée un verdissement assez appréciable du tissu cambial de Carotte et supérieur à celui que l'on observe si on maintient ce tissu à la lumière solaire diffuse ou indirecte, il était nécessaire de déterminer sa teneur en chlorophylle. Cela permettait déjà de préciser si ces colonies peuvent être en mesure de réaliser un acte photosynthétique, uniquement sur la base des pigments qu'elles contiennent. Etablir une comparaison avec la teneur en chlorophylle des tissus foliaires ne paraît pas valable à cause de la dissemblance importante qui existe entre les associations cellulaires considérées, ainsi que leur degré de différenciation.

Toutefois une indication sur l'état chlorophyllien du tissu cambial de Carotte dans nos conditions d'expérience était indispensable et nous avons entrepris des dosages.

b) Photosynthèse et respiration

Le fait d'utiliser des tissus qui verdissent à la lumière et qui possèdent donc une quantité de pigments chlorophylliens mesurable ne permet pas de savoir si l'activité photosynthétique dépasse le point de compensation. Il fallait donc entreprendre des mesures de photosynthèse. Si ces mesures sont très faciles à réaliser avec l'appareil de Warburg sur des Algues unicellulaires, elles le sont beaucoup moins sur des tissus cultivés *in vitro*. De nombreuses objections théoriques et pratiques s'y opposent. Elles ont été récemment encore soulignées par Lioret [48]. Cependant des mesures sont possibles et même si elles ne rendent que partiellement compte des phénomènes physiologiques elles sont très utiles. Nous n'avons toutefois pas utilisé de colonies dissociées. Ces mesures portent d'une manière classique sur les variations d'Oxygène au cours d'une phase éclairée située entre deux phases obscures. Une nouvelle question se pose au sujet de la variation manométrique pendant les phases obscures. Cette variation qui se traduit par une diminution d'Oxygène dans l'enceinte de mesure, donc par une absorption tissulaire, correspond-elle à la valeur de la respiration mesurée dans les conditions habituelles? En effet, l'emploi de l'appareil de Warburg nécessite l'immersion des tissus dans des solutions tampon qui ne sont pas les mêmes si l'on désire étudier la respiration ou la photosynthèse. Or la respiration est estimée par différence entre les variations manométriques issues d'une fiole dans laquelle le

gaz carbonique est absorbé et celles qui proviennent d'une fiole dans laquelle les échanges gazeux sont libres. La photosynthèse est estimée par une autre méthode dans laquelle l'anhydride carbonique est maintenu constant au moyen d'un mélange tampon carbonate-bicarbonate. Cette solution qui sert de milieu pour les mesures est différente du milieu de culture, son pH est très élevé. C'est pourquoi nous avons voulu comparer les valeurs de la respiration, manifestée dans les conditions de mesure de la photosynthèse à celles que l'on obtient normalement.

c) Rôle d'un milieu fortement alcalin

Ainsi que nous venons de le dire, les mesures de photosynthèse s'effectuent dans un milieu fortement alcalin. Comme les opérations durent environ deux heures, on pouvait se demander si ce milieu n'allait pas influencer les fonctions physiologiques et fausser encore les résultats. La culture du tissu cambial de Carotte se fait sur un milieu acide (pH 5,5), il était donc important de savoir si un milieu alcalin avait une action défavorable sur celui-ci. Nous devions en particulier nous assurer qu'un milieu de culture tamponné à un pH élevé n'était pas toxique. Pour répondre à cette question nous avons dû cultiver des explantats issus d'une souche de Carotte sur un milieu tamponné à pH 9.

Tissu de Crown-gall non chlorophyllien

Les questions générales que nous nous sommes posées s'appliquaient en premier lieu à un tissu chlorophyllien. Il était intéressant d'avoir des indications sur le comportement d'un tissu non chlorophyllien, c'est à dire un matériel biologique de référence et d'établir ainsi des comparaisons. Quelle serait la croissance d'un tel tissu en fonction d'une dose de glucose de plus en plus forte, quelle serait l'influence de la lumière ou de l'obscurité? Nous avons tout d'abord choisi un tissu facile à cultiver et permettant de réaliser des expériences comparables à celles que nous avions commencées avec les tissus de Carotte, c'est à dire une souche de Crown-gall de Scorsonère. Ces tissus ne verdissent pas à la lumière, ils se cultivent aisément et même plus rapidement que ceux de Carotte. Le fait qu'il s'agit de tissus tumoraux dispense de leur founir un facteur de croissance mais par contre cela ne permet pas d'établir des comparaisons très rigoureuses. Nous avons déjà signalé que le milieu de culture confectionné pour l'entretien de cette souche contient davantage de glucose (5 % au lieu de 2 %). Cette différence tient compte de la croissance optimum des tissus qui ne se manifeste donc pas avec une dose identique de sucre. Cela indique une dissemblance supplémentaire entre les deux régimes proposés.

Tissus caroténogènes

Nous espérions utiliser un tissu dont les caractères cytologiques et physiologiques se rapprochent encore plus de ceux du tissu cambial vert de Carotte. Nous avons alors

choisi une souche très caroténogène de ce même tissu qui a été isolé par Eichenberger [13] considérée comme étant le résultat d'une mutation. Ce tissu est de même nature, de même origine et se cultive également en présence d'un facteur de croissance. Toutefois on ajoute au milieu de culture 5 % de glucose au lieu de 2 %. En vue d'utiliser cette souche pour une expérience, nous avons dû procéder à des repiquages fréquents en raison de sa nature noduleuse. En effet, la souche de tissu cambial vert de Carotte que nous utilisions nous donnait des colonies *compactes* susceptibles d'être découpées en explantats faciles à calibrer. La souche caroténogène proliférait très bien mais elle ne donnait pas de colonies charnues. Ces dernières paraissaient plutôt *composées*, c'est à dire constituées par un agrégat de nodules dont la cohésion était fragile. Elles étaient donc impropres, dans cet état, à être utilisées pour fournir un grand nombre d'explantats calibrés. Nous avons donc repiqué cette souche fréquemment pendant deux ans pour obtenir finalement des colonies compactes. C'est ce qui nous a permis de réaliser quelques essais complémentaires.

En choisissant cette souche, nous nous sommes posé la question suivante: Quelle est l'action de la lumière et de l'obscurité sur la croissance des explantats?

Les résultats que nous attendions pouvaient être rapprochés assez aisément de ceux que nous avions obtenus précédemment avec une souche chlorophyllienne.

Mais auparavant il était nécessaire de connaître la nature des pigments plastidaires des colonies oranges. Nous avons fait quelques extractions qui nous ont fourni des premières indications. Par la suite, nous avons entrepris, en collaboration avec G. Turian, [53] des analyses plus complètes dont nous donnons les résultats résumés en annexe. Les conclusions auxquelles nous avons abouti nous ont fourni un élément intéressant pour comparer les effets de la lumière et de l'obscurité entre une souche verte et une souche orange de tissu cambial de Carotte.

Consommation de glucose et composition glucidique des tissus. (Effet du glucose utilisé)

Une dernière question qui s'est présentée à propos des tissus chlorophylliens de Carotte était la suivante: Quelle est la consommation de glucose de ces tissus? Est-elle la même à la lumière et à l'obscurité? Est-elle invariable en fonction de la dose offerte? Cette question est importante car elle permet de mieux saisir le rôle du glucose dans la croissance ainsi que celui de la lumière. On pouvait émettre les hypothèses suivantes: Premièrement, la consommation du glucose est la même à la lumière et à l'obscurité. Deuxièmement, la consommation n'est pas la même dans les deux cas. Elle pourrait alors être plus faible à la lumière qu'à l'obscurité en raison de l'apport causé par la photosynthèse.

Parallèlement, nous devions alors préciser la nature et le taux des glucides solubles retrouvés dans les tissus. Cela nous permettait également de faire une comparaison avec les résultats obtenus par Goris [26] qui a étudié les transformations glucidiques. Pour répondre à cette série de questions il était nécessaire d'adapter les conditions expérimentales, ainsi que nous l'indiquerons plus loin.