

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(en): **Naef, Jaques**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences [1948-1980]**

Band (Jahr): **20 (1967)**

Heft 1

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-739382>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

RECHERCHES
SUR LE DÉVELOPPEMENT DES TISSUS VÉGÉTAUX
CULTIVÉS IN VITRO DANS SES RAPPORTS
AVEC L'UTILISATION DU GLUCOSE
ET L'ACTION DE LA LUMIÈRE

PAR

Jaques NAEF

	Pages
AVANT-PROPOS	5
 CHAPITRE PREMIER: INTRODUCTION	
Absorption des glucides et leur transformation intratissulaire	7
Echanges gazeux respiratoires	9
Notion de croissance et de rendement	10
Action d'ensemble de la lumière et de la température sur les tissus . . .	11
<i>a)</i> action de la lumière	11
<i>b)</i> action de la température	13
<i>c)</i> interaction de la lumière et de la température	14
 CHAPITRE II: MATÉRIEL ET TECHNIQUES	
A) <i>Culture des tissus in vitro</i>	15
Tissus utilisés	15
Volume et poids des explantats	15
Milieux de culture	16
<i>a)</i> milieux solides	16
<i>b)</i> milieu liquide	16
Conditionnement des expériences	17
B) <i>Mesures de croissance pondérale</i>	17
Poids frais	17
Poids sec	17

	Pages
C) <i>Dosage d'azote</i>	17
Prises pour le dosage de l'azote total	18
Prises pour le dosage de l'azote protéique	18
Élimination de l'azote soluble	18
Minéralisation de l'azote total	18
Minéralisation de l'azote protéique.	18
Tubes témoins et courbe étalon	18
Lectures et détermination des quantités d'azote	19
D) <i>Dosage des sucres</i>	19
Extraction	19
Préparation d'une solution convenable pour le dosage	19
Dosage et calculs	20
E) <i>Dosage des chlorophylles</i>	21
Préparation de l'extrait	21
Dosage et calculs	22
F) <i>Mesure des échanges gazeux</i>	23
Mesure de la respiration	23
Choix d'une solution où s'effectuent les mesures	23
Opérations	23
Mesure de la photosynthèse	24
Choix d'une solution où s'effectuent les mesures	24
Opérations	24
Calcul de l'oxygène libéré	25

CHAPITRE III: INTRODUCTION AUX EXPÉRIENCES

1. Rôle de quelques facteurs externes sur la croissance:	25
Questions posées: Effet du glucose offert	25
Effet de la lumière	26
Effet de la combinaison de ces facteurs	27
2. Rôle de la nature des tissus en fonction des questions posées	
Questions corollaires: Tissu chlorophyllien	27
a) dosage des chlorophylles	28
b) Photosynthèse et respiration	28
c) Rôle d'un milieu alcalin pour les me- sures	29
Tissu de Crown-gall non chlorophyllien	29
Tissu caroténogène	29
Consommation du glucose et composition glu- cifique des tissus	30

CHAPITRE IV: DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

Pages

1. Action du glucose sur des tissus verts de Carotte cultivés à la lumière et à l'obscurité	31
2. Action du glucose sur des tissus de Crown-gall de Scorsonère cultivés à la lumière et à l'obscurité	32
3. Croissance comparée d'une souche caroténogène et d'une souche chlorophyllienne de tissus de Carotte	32
4. Photosynthèse d'une souche tissulaire de Carotte	34
5. Respiration de deux souches tissulaires de Carotte	37
6. Consommation de glucose d'une souche tissulaire chlorophyllienne de Carotte	38
7. Annexe	39

CHAPITRE V: RÉSULTATS

A) <i>Souche chlorophyllienne de tissus cambial de Carotte</i>	39
Rôle de la concentration du sucre	39
Effet sur le poids frais	41
Effet sur le poids sec	41
Effet sur l'hydratation	42
Rôle de la lumière	44
Effet sur le poids frais	44
Effet sur le poids sec	45
Effet sur l'hydratation	45
Rôles complémentaires	45
Part probable de la fonction chlorophyllienne	49
Mesure de la photosynthèse	51
Mesure annexe de la respiration	53
Rôle du milieu alcalin sur les tissus	54
Absorption du glucose et composition glucidique des tissus	55
B) <i>Souche de tissus de Crown-gall de Scorsonère</i>	61
Rôle de la concentration des sucres	63
Effet sur le poids frais	63
Effet sur le poids sec	64
Effet sur l'hydratation	64
Rôle de la lumière	64
Rôles complémentaires	64

4 DÉVELOPPEMENT DES TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS IN VITRO DANS SES RAPPORTS

	Pages
C) <i>Souche caroténogène de tissus cambial de Carotte</i>	67
Rôle de la lumière	67
Rôles complémentaires	68
D) <i>Annexes</i>	69
CHAPITRE VI: DISCUSSION ET CONCLUSIONS	72
<i>Sommaire.</i>	75
<i>Bibliographie</i>	76



AVANT-PROPOS

Parmi les premiers travaux réalisés dans le domaine de la culture des tissus végétaux *in vitro*, certains devaient permettre d'obtenir la prolifération indéfinie de fragments de nombreuses plantes. Les recherches physiologiques qui se sont développées plus tard sur ces premières bases s'orientèrent vers des études de la nutrition, en particulier minérale et carbonée. Elles ont permis d'obtenir de grandes précisions sur ce sujet. Parallèlement, comme il s'agissait de besoins nutritifs, des travaux ont été dirigés par divers auteurs sur l'action des régulateurs de croissance car pour beaucoup de tissus de Dicotylédones, ces derniers ont joué un rôle décisif dans la réalisation de cultures *in vitro*. Par ailleurs, des études sur le métabolisme ont été entreprises. Elles comprennent, entre autres, celles de la pénétration des substances nutritives ainsi que leurs modifications intratissulaires. Dans ce cas aussi, les régulateurs de croissance interviennent et ils ont été largement utilisés.

Les problèmes posés par la nutrition et le métabolisme des tissus se situent parmi d'autres tels que ceux de la morphogenèse et de l'histogenèse liées à la multiplication cellulaire ou ceux de la pathologie végétale.

La croissance dont plusieurs auteurs proposent des définitions générales ou particulières présente plusieurs manifestations dont les unes sont obtenues par mesures pondérales globales, les autres par des estimations de la matière vivante formée telles que des mesures de la prolifération. A ce sujet, divers critères d'appréciation ont été proposés que nous présenterons plus loin.

Parmi les facteurs physiques qui jouent un rôle dans le développement des tissus végétaux cultivés *in vitro*, la lumière est celui dont l'action est la plus complexe. Les réponses des divers tissus aux facteurs physiques et en particulier à la lumière sont très variables. Si l'on tient compte encore du fait que les souches tissulaires ayant subi de nombreux repiquages ne se développent que dans un milieu rigoureusement conditionné comprenant en particulier des substances de croissance, on aura une idée plus complète des effets qui peuvent se manifester en concurrence ou en synergie à leur niveau.

Il y a donc lieu de prendre en considération les interactions qui se produisent entre lumière et température, lumière et nutrition et aussi entre lumière et substance de croissance.

Les tissus végétaux cultivés *in vitro* ne se multiplient pas sans l'apport d'un glucide dans le milieu de culture, sauf les explantats primitifs qui contiennent assez de réserves.

Dans le cadre des travaux effectués dans le domaine de la nutrition carbonée, Gautheret [15] étudiant l'action du saccharose sur les tissus de Carotte a déterminé un optimum de l'accroissement en fonction des concentrations de ce sucre. Or ces tissus qui élaborent de la chlorophylle permettent peut-être d'apprécier les possibilités de photosynthèse *in vitro*.

Il paraissait donc intéressant de suivre le développement de tissus mis au contact de diverses doses de sucre, en présence ou en l'absence de lumière. Nous pouvons ainsi définir le but de ce travail qui est d'étudier les réactions des tissus à la lumière et à l'obscurité en fonction de la dose exogène de glucose.

Dans tout un groupe d'expériences qui seront décrites, les tissus étaient soumis à l'effet de plusieurs variables: la concentration du sucre offert, la lumière et l'obscurité. Si l'on considère le premier effet, il se manifeste comme une variable totalement quantitative. Pour les deux derniers par contre, la définition de la variable est un peu différente. Il s'agit ici d'un phénomène de tout ou rien, c'est-à-dire que la quantité régulière de lumière fournie est donnée brusquement et complètement, l'intensité ainsi que la qualité étant chaque fois les mêmes, aux erreurs d'appareillage près.

Une autre variable, biologique, celle-là, concerne les tissus utilisés. Nous avons en effet utilisé des tissus de type différent afin de tenter d'établir des comparaisons.

Pour estimer les effets des variables sur la croissance, nous avons choisi différents critères. Diverses remarques ont été faites au sujet de l'appréciation de la croissance par Lance et par Lioret en particulier (voir chap. 1). Nous avons utilisé comme critères directs le poids frais, le poids sec et l'hydratation et comme critères indirects l'accumulation de substances azotées et dans certains cas, celle des glucides solubles.

Avant de préciser le type d'expérience qui a été réalisé, nous faisons une remarque liminaire. Lorsqu'on étudie les critères utilisés pour définir la croissance, on constate qu'ils ont un caractère relatif. En effet, certains sont intégrants mais vagues comme le poids frais, d'autres comme les quantités d'azote sont au contraire précis mais partiels. Une interprétation biologique des variables n'est en définitive possible que par la combinaison de leurs effets tout en ayant soin de prendre plusieurs références.

Au cours de nos recherches, des questions annexes se sont posées qui seront indiquées plus loin. Elles concernent en particulier des caractéristiques physiologiques et pigmentaires des tissus étudiés en fonction des conditions d'expérience. Nous avons, par ailleurs, étudié la consommation glucidique de certains tissus. En dehors des phénomènes de croissance, nous avons fait des mesures de photosynthèse pour savoir si celle-ci se manifeste de façon appréciable chez une souche chlorophyllienne. Cela nous a amené à vérifier si les intensités respiratoires étaient les mêmes dans des conditions de mesure différentes. Enfin nous avons été en mesure de comparer des souches différentes entre elles.

CHAPITRE PREMIER — INTRODUCTION

ABSORPTION DES GLUCIDES ET LEUR TRANSFORMATION INTRATISSULAIRE

Rôle de glucides

Les tissus prélevés sur un organe entier comme des fragments de racine ou de tubercule contiennent suffisamment de sucre en réserve pour proliférer sur un milieu de culture entièrement minéral. Les colonies tissulaires par contre ne croissent pas sans l'apport d'une source organique de carbone. Les glucides représentent la meilleure source de carbone, tout au moins certains d'entre eux. Les alcools et les acides organiques sont beaucoup moins utilisables quand ils ne sont même pas toxiques (Gautheret [15, 16, 19]; White [65]; Hildebrandt et Riker [35]; Nickell et Burkholder [54]; Straus et La Rue [63], etc.).

Gautheret mentionne [19] une vingtaine de glucides qui ont été essayés. Depuis lors Goris [30] a réalisé des expériences plus récentes sur l'utilisation de certains sucres comme le mélibiose. Tous ces travaux affirment que parmi les plus efficaces se trouvent le saccharose, le glucose, par ordre d'importance, puis le maltose et le raffinose. Certains glucides ne sont même pas utilisés par les tissus, comme le palatinose, homologue « synthétique » du saccharose que l'on a tenté de leur fournir (Goris [28]).

La concentration optimum d'un sucre qui provoque l'accroissement pondéral le plus élevé varie naturellement avec le tissu considéré, (tige de faible diamètre, organe charnu, cambium d'arbre, etc. et avec l'espèce). Gautheret [15] a montré par exemple, que l'accroissement maximum de tissus de Carotte cultivés sur un milieu contenant du saccharose s'obtenait avec une dose de l'ordre de 3%.

Les recherches de Goris [22,23] indiquent que les tissus de Carotte et plus particulièrement les fragments de racine épuisent leurs réserves glucidiques intratissulaires. L'acide β -indolyl-acétique accélère encore la chute des glucides intratissulaires. Cependant, sur un milieu fortement glucosé, la perte de sucre est compensée finalement au cours d'une expérience qui s'étend sur plusieurs semaines. Lioret [46,47] travaillant sur des tissus de tubercule et de Crown-gall de Scorsonère, a constaté au cours de la première semaine de culture que la teneur en glucides totaux est très élevée. Par contre, au début de la deuxième semaine les glucides totaux diminuent assez fortement puis cette diminution devient plus faible. Ces phénomènes sont dus à une évolution physiologique. Les tissus passent d'une phase de jeunesse à une phase d'équilibre.

Ce qui a été très bien mis en évidence par Goris [26] ce sont les transformations très rapides des sucres par les tissus. En effet, si l'on incorpore au milieu de culture du glucose ou du fructose, on retrouve une grande quantité de saccharose dans les tissus.

Dans le cas de la souche tissulaire de Carotte, le fructose est plus efficace que le glucose: en fin d'expérience, par exemple, on retrouve deux fois plus de saccharose dans les colonies placées sur fructose que dans celles qui ont absorbé du glucose. Mais par ailleurs le sucre du milieu s'accumule et s'interconvertit dans les tissus. C'est ainsi qu'après 128 jours de culture, pour une masse tissulaire correspondant à 100 g. de tissu sec initial, il y a 89 g. de fructose dosé dans les fragments cultivés sur glucose alors qu'il y a 303 g. de glucose dosé dans les fragments cultivés sur fructose. D'autres recherches effectuées par Goris et Duhamet [29] et portant sur des tissus de Topinambour montrent que ceux-ci enrichissent légèrement leur teneur en glucides réducteurs lorsque le milieu contient 5% de glucose. Ball [2] a constaté, en cultivant des tissus de *Sequoia sempervirens*, que le milieu contenait les mêmes sucres en fin de culture que les tissus. Barnoud [5] indique également que des sucres transformés par les tissus peuvent diffuser dans le milieu.

Il faut encore signaler l'intervention des glucides dans la synthèse des protéides: dans des travaux effectués sur des feuilles entières, M^{lle} Champigny a précisé que les glucides interviennent sur le plan matériel et sur le plan énergétique. L'azote minéral, en effet, est incorporé dans les molécules organiques surtout par l'acide α -cétoglutarique dérivant lui-même de l'oxydation des chaînes carbonées glucidiques ou protéiques. L'acide glutamique qui résulte des synthèses ultérieures se présente donc comme un lien entre le métabolisme des glucides et celui des protéides. L'énergie de l'acide adénosine-triphosphorique qui intervient dans les mécanismes de la respiration et de la photosynthèse est mise à disposition de la synthèse protéique. La formation de la glutamine est également liée au métabolisme des glucides par les mécanismes d'oxydo-réduction et de phosphorylation.

Rôle des substances de croissance

Les substances stimulantes de la croissance et en particulier les auxines modifient la composition glucidique des colonies tissulaires de Carotte cultivées sur un milieu dépourvu de sucre en exaltant l'épuisement des réserves (Goris 22,23). L'auxine agit dans ce cas comme elle le ferait sur des fragments de racine prélevés en automne. Mais la présence d'auxine dans un milieu contenant du sucre se traduit assez paradoxalement par une augmentation de la quantité de sucre dans les tissus. Cette constatation a été confirmée par de nombreux auteurs qui utilisaient le même matériel ou des tissus de Tabac (Skoog et Robinson 61). L'équilibre glucidique intratissulaire est modifié par l'auxine mais les résultats varient selon le tissu considéré. Par ailleurs, Lioret (43,44) a constaté au contraire que l'acide naphthalène-acétique, spécialement à forte dose, tend plutôt à épuiser les glucides des tissus de tubercules de Scorsonère. L'action du lait de coco a été étudiée en détail par Goris et Duhamet [29]. Il apparaît que cette substance provoque une diminution très sensible de la teneur en sucre des tissus de Carotte et de Topinambour.

Echanges gazeux respiratoires

Lorsqu'on met un fragment de tissu en culture *in vitro*, il se produit un choc qui provoque une exaltation respiratoire. Cette exaltation est temporaire puisque l'on observe par la suite un régime stable qui peut être influencé par certaines substances incorporées au milieu de culture. Plantefol [56] en 1938 déjà, a constaté que des fragments de tissu cambial de Saule présentent un dégagement de CO₂ qui augmente entre le 4^{me} et le 8^{me} jour, puis diminue ensuite. Cette augmentation est très sensible sur un milieu glucosé mais on l'obtient aussi sur un milieu purement minéral. Lachaux [38,39] ayant cultivé de petits fragments de racine de Carotte et de tubercules de Topinambour a constaté que l'intensité respiratoire s'élève pendant quelques jours, en étant supérieure à celle de gros fragments, puis elle diminue plus tard. Cette intensité respiratoire est supérieure même si le milieu ne contient pas de sucre. Ces groupes de résultats ne semblent donc pas concorder entièrement. Lioret a utilisé, lors de ses recherches, les tissus du parenchyme vasculaire de racine de Scorsonère. Les fragments qu'il utilisait ne présentaient pas d'accroissement des échanges gazeux s'ils étaient simplement maintenus sur un milieu humide, mais seulement s'ils étaient cultivés sur un milieu sucré. Selon Lioret, l'augmentation de la respiration au cours des premières 24 heures après l'épluchage des explantats serait due à une dégradation plus rapide des chaînes carbonées et plus probablement glucidiques beaucoup plus qu'au traumatisme lui-même. De plus une absorption d'oxygène se manifeste par l'action des polyphénoloxydases. Par contre, la désinfection des fragments de tubercules par l'hypochlorite en dénaturant les enzymes superficielles détermine une baisse de l'intensité respiratoire.

Le repiquage des colonies tissulaires de Topinambour [Lachaux 37, 39] ou ceux de crown-gall de Scorsonère [Lioret 45, 46] provoque également une exaltation transitoire de la respiration. Elle passe par un maximum entre le 8^{me} et 15^{me} jour.

Les modificateurs de croissance jouent un rôle important sur la respiration. Lachaux a étudié l'action de l'acide indolyl-acétique sur les tissus de Carotte et de Topinambour. L'intensité respiratoire du xylème de Topinambour est fortement augmentée alors que celle des fragments de racine de Carotte n'est pas modifiée. Dans ce domaine, les travaux de Nickell sont parmi les plus significatifs. Cet auteur a étudié les relations entre l'auxine et la respiration sur des tissus de tumeurs virologiques d'Oseille. La plus forte prolifération et la plus grande intensité respiratoire sont déterminées par une forte dose d'acide indolyl-acétique. Par contre, en utilisant le 2,4 D¹) et l'acide naphtoxy-acétique, il observait une exaltation de l'intensité respiratoire pour une dose largement supérieure (100 fois plus forte) à celle qui stimule la prolifération. Cependant, le même auteur a obtenu des résultats analogues avec des substances inhibitrices comme la colchicine par exemple. L'exaltation de la respiration par les auxines s'est manifestée dans ces expériences pour de faibles doses.

¹ 2,4 D: Acide 2,4 Dichlorophénoxyacétique.

Au-dessus de 10^{-5} il observait par contre une inhibition. Mitchell, Burris, Riker [50] en étudiant les échanges gazeux de tissus de Tournesol ont constaté que de fortes doses d'auxines diminuent l'intensité respiratoire.

Les récents travaux de Lioret montrent que les interprétations de ces phénomènes sont assez complexes. Les réactions des tissus normaux de Scorsonère et des colonies de Crown-gall de cette même espèce sont différentes. L'acide naphthalène-acétique provoque une exaltation respiratoire du xylème de Scorsonère mais dans ce cas, l'exaltation la plus forte est obtenue avec la dose très élevée de 10^{-4} . Cette forte intensité respiratoire exprimée en mg de CO_2 par mg d'azote protéique est mise en relation par cet auteur avec le catabolisme et non avec la synthèse protéique comme l'indique la comparaison des résultats avec les témoins. Par contre, les tissus de Crown-gall ne semblent pas être influencés par l'auxine tout au moins à la dose de 10^{-6} .

Le lait de coco paraît avoir une action différente. Lioret [46] a constaté pendant la deuxième semaine qui suit le repiquage des colonies de Crown-gall de Scorsonère une élévation de l'intensité respiratoire. Pour lui, ceci exprime surtout une augmentation de matière vivante.

D'autres auteurs mentionnent l'augmentation de la respiration sous l'effet du lait de coco [Constabel 11], Steward et coll. [62] en particulier ont considéré les échanges respiratoires, le métabolisme respiratoire et la croissance des tissus de Carotte. Pour ces auteurs, le lait de coco intensifie davantage la respiration que la synthèse protéique. Il agirait alors comme une auxine en exaltant le catabolisme. L'interprétation des résultats paraît donc bien ne pas être la même d'un tissu à l'autre.

Notion de croissance et de rendement

Très judicieusement, Lioret [46] signale que la notion de croissance est éminemment variable et qu'elle ne peut être définie par un seul type d'accroissement pondéral. Si les constituants cellulaires varient au cours de l'étude d'un tissu considéré, ils ne varient pas nécessairement dans le même sens ni dans la même proportion. Lioret définit ainsi quelques possibilités de changements des critères considérés en fonction de divers facteurs de croissance, par exemple :

- Un accroissement portant à la fois sur le poids frais et le poids sec de manière parallèle.
- Une augmentation du poids frais et des protéines sans augmentation des matières inertes.
- Un accroissement de poids frais et une diminution de poids sec par disparition des réserves.
- Une augmentation du poids frais sans modification du poids sec.

C'est ainsi, par exemple, qu'il compare selon le poids frais, le poids sec et les protéines 6 lots différents de tissus de Scorsonère cultivés sur des milieux contenant diverses substances de croissance. Il constate que le lot cultivé en présence de 10^{-5}

d'acide naphthalène-acétique a le poids frais le plus élevé mais il a par contre un poids sec 5 fois plus faible qu'un lot cultivé en présence de 10% de lait de coco et une teneur en protéines qui est de 20% inférieure à ce dernier.

De son côté, Lance [40] a étudié des tissus de Scorsonère et a comparé la croissance relative du poids frais, du poids sec et de l'azote protéique. Il a remarqué que le poids sec et le poids frais ont des valeurs relativement parallèles. Par contre, l'azote protéique augmente dès le début de la culture assez fortement pour passer par un palier au bout d'un temps variable selon le tissu considéré, mais au moins après le 78^{me} jour. L'azote protéique indique donc une variation protoplasmique reflétant la vie cellulaire proprement dite et ce critère exprime le mieux les activités métaboliques. C'est sur la base de telles comparaisons que les deux auteurs définissent des périodes correspondant à des phases de latence, de croissance active et de sénescence. Lioret précise encore une phase de choc correspondant à la mise en culture, une phase de protéogénèse ou de jeunesse, une phase d'équilibre ou adulte dans laquelle les substances paraplasmiques augmentent, puis une phase de sénescence avec ralentissement des synthèses. Pour les tissus de racines de Scorsonère, les quatre phases se déroulent en trois semaines. Par contre, pour les colonies de crown-gall, ces phases s'étendent sur une durée beaucoup plus longue. La phase adulte commence dans ce dernier cas après 15 jours, soit au début de la sénescence des tissus de racine et se poursuit jusqu'à 6 semaines. Ceci illustre clairement que les explantats primitifs et les colonies tissulaires ayant subi de nombreux repiquages n'ont pas le même comportement. Il s'agit d'ailleurs, dans ce cas, d'un tissu tumoral qui a entre autres la particularité d'être insensible à l'auxine.

Indépendamment des critères de croissance, il faut considérer également le rendement de croissance. Parmi plusieurs quotients énergétiques, Kandler [36] a utilisé celui qu'il nomme coefficient d'efficacité synthétique, c'est-à-dire le rapport :

$$\frac{\text{Carbone assimilé}}{\text{Carbone oxydé en CO}_2}$$

Grâce à ce rapport, Kandler a pu montrer par exemple, que pour une mole de glucose absorbée, 0,27 mole était transformée en substance vivante. Ses expériences ont porté notamment sur les tissus de crown-gall de Vigne.

Action d'ensemble de la lumière et de la température sur les tissus

a) Action de la lumière

Lors des premiers travaux dans le domaine de la culture des tissus, certains auteurs obtenaient un développement favorable si les explantats étaient placés à la lumière, d'autres obtenaient des résultats équivalents en maintenant ceux-ci à l'obscurité. Il s'est avéré par la suite que le comportement des tissus est très variable. Celui d'un fragment de racine n'est pas exactement le même que celui de souches ayant subi de nombreux repiquages. Nous avons déjà rappelé que, quelles que soient les condi-

tions de culture, il faut fournir un sucre aux explantats pour qu'ils prolifèrent [Gautheret 16, 19].

Par ailleurs, la teneur en pigments photosynthétiques, quoique toujours faible, n'est pas la même d'un tissu à un autre; elle peut même varier selon les conditions de culture. De toutes façons cette teneur est insuffisante pour assurer aux tissus la carboautotrophie. Les dosages de chlorophylle que nous avons faits sur la souche de tissu cambial de Carotte [52] donnent par exemple, une quantité de chlorophylle *a* de 1,95 mg et de chlorophylle *b* de 0,96 mg pour 100 g de tissus frais âgés de 47 jours.

Indépendamment du rôle que peut jouer la lumière sur la photosynthèse, de Capite [8] a constaté que la lumière agit sur la croissance des tissus à des températures élevées, c'est-à-dire au-dessus de 26°. Cet auteur a démontré également que la croissance des tissus à la lumière varie en fonction de l'intensité de cette dernière. C'est ainsi qu'ayant utilisé un éclairage de 1620, 3760 et 8060 lux, la croissance la plus forte était obtenue avec un éclairage de 3760 lux.

L'alternance de la lumière et de l'obscurité a été étudiée par Enderle. La période obscure et la période éclairée ayant la même durée, il a comparé la croissance de cultures placées en chambre humide en mesurant les variations de surface. Il a ainsi pu constater que l'accroissement de la surface présente en général deux maximums: un au début de la période éclairée et un à la fin, ainsi qu'un minimum se situant à la fin de la nuit. Ces variations rythmiques sont le résultat de changements osmotiques et non pas de modifications directes de la croissance. Par ailleurs, le photopériodisme des tissus a fait l'objet d'une étude par Bünning et Welte [7]. Ces auteurs ont montré que l'intensité de la croissance augmente avec la longueur de la photopériode. Cependant il existe un minimum pour un éclairage de 16 heures. D'autre part, on obtient une croissance en jour court aussi rapide qu'en jour long à condition d'interrompre la période obscure pendant quelque temps.

Michejda [49] essayant de retrouver des changements saisonniers dans la croissance des tissus de Carotte, aboutit aux conclusions suivantes. Il n'y a pas de fluctuations saisonnières pour ce qui concerne le poids sec relatif, la respiration, la teneur en sucre et en azote ainsi que pour les valeurs osmotiques. Par contre, il y a des fluctuations annuelles du poids frais et du poids sec avec un maximum au printemps.

Goris a démontré l'influence de la lumière sur le contenu glucidique des tissus. Au cours de ses recherches il a constaté par exemple que chez les tissus de crown-gall de Vigne qui sont incolores, la lumière ne modifie pas beaucoup le contenu glucidique. D'autre part, les tissus de Carotte placés sur un milieu contenant 5% de glucose ont environ 2 fois plus de sucres totaux que ceux qui sont maintenus à l'obscurité après 128 jours de culture. Mais si le milieu contenait 2% de glucose, les tissus cultivés à la lumière renfermaient après 66 jours de culture, 1,5 fois plus de sucres totaux que s'ils étaient mis à l'obscurité.

Goris a étudié l'effet de la lumière sur les tissus de Carotte étiolés. Au cours d'une expérience qui a duré 30 jours, ces tissus devenus artificiellement blanchâtres

ont été cultivés sur glucose et sur fructose. La moitié des explantats se trouvait à la lumière, l'autre à l'obscurité. A la fin de l'expérience, les tissus cultivés à la lumière sur fructose n'avaient pas la moindre couleur verte tandis que ceux qui étaient cultivés sur glucose avaient repris quelques taches verdâtres. Or le contenu glucidique des tissus cultivés sur fructose est sensiblement le même, tant à la lumière qu'à l'obscurité, alors que celui des tissus cultivés sur glucose est un peu plus abondant en saccharose à la lumière qu'à l'obscurité. Malgré cette différence qui peut être attribuée en fin d'expérience à la faible synthèse de pigments, Goris conclut que la lumière, en l'absence de chlorophylle, n'exerce pas d'influence sur les transformations glucidiques intratissulaires.

C'est à une conclusion assez semblable que sont parvenus Roux et Tendille [57]. Ayant fait absorber pendant un temps très court du $^{14}\text{CO}_2$ à des tissus d'une souche chlorophyllienne de Carotte et à ceux de la souche caroténogène d'Eichenberger [13], ils firent l'analyse des corps qui contenaient du carbone radioactif. Ils retrouvèrent dans les premiers tissus du ^{14}C dans les glucides, les acides aminés et les acides carboxyliques, alors que dans les seconds, seuls les acides aminés et les acides carboxyliques étaient marqués. Ceci montre donc bien que les tissus chlorophylliens synthétisent des glucides à partir du CO_2 .

L'action de la lumière sur la synthèse des protides a été étudiée par M^{lle} Champigny [9] sur des feuilles entières de Bryophyllum. Or ses conclusions peuvent être envisagées ici. Indépendamment de la photosynthèse, l'action de la lumière se manifeste par trois effets portant sur la réduction de l'ion NO_3 , l'incorporation dans les protides d'intermédiaires de la photosynthèse et sur la modification de la vitesse de synthèse des acides α -cétoniques. La lumière accélère considérablement la genèse des acides aminés. Elle est environ 20 fois plus rapide sous un éclairage de 5000 lux qu'à l'obscurité.

b) *Action de la température*

Des travaux portant sur le tissu cambial d'arbre sont dus à Gioelli [21]. D'autres ayant trait aux tissus tumoraux de Soleil et de Tabac ont été faits par Hildebrandt, Riker et Duggar [34]. Nikell et Burkholder ont utilisé des tissus tumoraux d'Oseille. Ces auteurs constatèrent l'existence d'un optimum de température agissant sur la prolifération. Il se situe selon le tissu considéré entre 24 et 32° C. Les travaux entrepris par de Capite [8] en phytotron sur 3 souches tissulaires sont très nets. Ayant utilisé des souches de tissus de Parthenocissus tricuspidata, de Carotte et de Crown-gall de Soleil, il constata que la plus forte prolifération se manifestait à 26° C pour la première souche et 23° C pour les deux autres, si elles étaient cultivées en lumière continue. Si les tissus étaient mis en serre en lumière naturelle pendant 8 heures avec une température nocturne de 6° C inférieure à la température diurne, le maximum de prolifération était obtenu pour une température plus élevée c'est-à-dire 30° C le jour et 23° C la nuit. Par contre, des tissus placés à l'obscurité à 26° C se développaient

moins que s'ils étaient en lumière artificielle continue. En comparant la température des tissus cultivés à l'obscurité et à la lumière, de Capite a constaté qu'en lumière continue et pour une température inférieure à celle qui correspond à l'optimum à l'obscurité, la croissance était peu influencée, mais pour des températures supérieures à cet optimum, la prolifération était fortement stimulée par la lumière.

Nous mentionnerons encore par extension qu'il existe des résultats se rapportant à des tissus traités par le froid. Pour Straus et La Rue [63], le fait de placer des tissus d'albumen de Maïs à 4° C pendant 20 jours puis à 25° C arrête le développement. Pour de Capite, un court séjour de fragments de racine de Carotte à 4° C provoque la production d'anthocyanes mais les tissus se développent très bien quoique le cal soit beaucoup plus lisse et compact que dans les conditions normales. Goris s'est servi plus récemment de souches tissulaires de Carotte. Ses résultats montrent que l'action du froid [4° C] est très complexe. Par exemple des explantats découpés 4 jours avant d'être repiqués et maintenus à 4° C dans un tube stérile et sans milieu se développent mieux que des explantats préparés au moment du repiquage et non soumis à l'action du froid.

c) *Interaction de la lumière et de la température*

La constatation la plus curieuse faite par de Capite réside dans le fait que la température des tissus augmente avec l'intensité lumineuse. Les mesures ayant été faites avec un thermocouple, la température des tissus cultivés à l'obscurité était la même que celle de la cabine à culture, alors que pour les tissus cultivés à la lumière artificielle continue, la température était toujours plus élevée. De Capite en a conclu dans ce dernier cas que l'augmentation de la température tissulaire semble être le résultat de la transformation en chaleur de l'énergie radiante interceptée, soit :

$$T_{td} = T_a \text{ à l'obscurité}$$

$$T_{tl} = T_a + T_{re} \text{ à la lumière}$$

où T_{td} = température tissulaire à l'obscurité

$$T_{tl} = \text{température tissulaire à la lumière}$$

$$T_a = \text{température de l'air}$$

$$T_{re} = \text{différence de température causée par l'énergie radiante.}$$

Lorsque la température ambiante est de 26° C, celle des tissus de Carotte est de 31,1° C, si ces derniers sont cultivés à la lumière, par exemple.

Enfin de Capite indique pour des températures inférieures à 26° C que la croissance semble être fonction de la température, mais pour des températures plus élevées, qu'elle est fonction de la lumière et de la température.

Les actions de la lumière et de la température jouent un grand rôle dans le développement des tissus cultivés *in vitro*. De plus elles peuvent donc se manifester en synergie dans certains cas.

CHAPITRE II — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A) CULTURE DE TISSUS IN VITRO

Tissus utilisés

D'une manière générale nous avons réalisé toutes les expériences avec le même matériel, c'est-à-dire la souche de tissu cambial de Carotte isolée par Gautheret en 1939. Ce qui a dicté le choix de ce tissu, c'est la facilité de son entretien par rapport à d'autres, une certaine régularité dans la prolifération et une bonne homogénéité dans le développement. C'est aussi le fait que ce tissu possède de la chlorophylle en quantité appréciable s'il est placé dans de bonnes conditions d'éclairement. Il en sera question à propos des mesures de photosynthèse.

Les mêmes tissus de Carotte maintenus à l'obscurité peuvent être repiqués. Ils sont alors, après un ou deux passages, exempts de chlorophylle et peuvent rester blancs pendant plusieurs jours si on les replace à la lumière. Cependant ils se repiquent plus difficilement et sont aussi plus délicats car ils se nécrosent rapidement. Nous avons utilisé cette souche étiolée comme témoin dans des mesures de respiration.

Une autre souche de tissu cambial de Carotte nous a fourni des données de comparaison par rapport à la souche chlorophyllienne. Il s'agit d'une souche obtenue par Eichenberger par hasard, vraisemblablement à la suite d'une mutation somatique, touchant le mécanisme enzymatique des pigments photosynthétiques. Elle est très caroténogène et nous avons montré avec Turian [53] qu'elle ne possède pas de chlorophylle. Elle se cultive malheureusement beaucoup plus difficilement que la souche verte dont elle provient, ce qui ne permet pas de l'utiliser pour obtenir un échantillon important, régulier et stable.

Nous voulions établir des comparaisons avec la souche verte de Carotte en utilisant des colonies de Crown-gall de Scorsonère, car elles ne verdissent pratiquement pas dans les conditions de nos expériences. Dans ce cas également les premiers résultats se sont montrés trop irréguliers pour que nous puissions continuer à employer cette souche.

Volume et poids des explantats

Afin que les fragments de tissus mis en culture soient aussi semblables que possible, des cubes de même forme sont prélevés dans les colonies servant au repiquage. On applique la méthode du quadrillage, c'est-à-dire que la colonie initiale est mise dans une boîte de Petri stérile sous laquelle est glissée une feuille de papier millimétré portant en son centre un carré de 6 mm de côté ombré au crayon. Les tissus sont découpés en suivant le carré de façon à obtenir des cubes de 6 mm d'arête. Le poids moyen des explantats prélevés ainsi dans les tissus de Carotte était de l'ordre

de 134 à 152 mg. Les explantats de Crown-gall de Scorsonère étaient d'abord de même grandeur mais nous avons ensuite utilisé des cubes de 7 mm d'arête et de 150 mg car leur prolifération était plus régulière dans ces conditions.

Milieux de culture

Les souches tissulaires étaient entretenues sur des milieux solides en suivant les techniques de Gautheret [19].

a) *milieux solides* :

Nous indiquons ici la formule générale des milieux servant à l'entretien des souches. Les quelques variantes se rapportant à chaque type d'expérience sont décrites plus loin.

Les souches de tissu cambial de Carotte chlorophylliennes, ou étiolée et celle de Crown-gall de Scorsonère ont été cultivées sur le milieu de Gautheret. La souche de tissu de Carotte d'Eichenberger (caroténogène) a été cultivée sur le milieu de Heller.

Le milieu de Gautheret comprend :

la solution de Knop diluée de moitié

la solution de micro-éléments de Berthelot modifiée par Gautheret à raison de 0,5 ml par litre

de la gélose (1 %)

de la Vitamine B₁ (10^{-6} g/ml).

Selon le tissu considéré, le milieu comprend encore en dose variable :

du glucose

de l'acide β -indolyl-acétique (ABIA)

Les tissus verts de Carotte sont cultivés en présence de 2 % de glucose et d'ABIA (10^{-8}); les tissus étiolés de Carotte sont cultivés en présence de 3 % de glucose et d'ABIA (10^{-8}); ceux de Crown-gall de Scorsonère en présence de 5 % de glucose et sans auxine.

Le milieu de Heller comprend :

la solution de macro-éléments

la solution de micro-éléments (1 ml par litre)

de la gélose (1 %)

du glucose (5 %)

de la vitamine B₁ (10^{-6} g/ml)

de l'acide β -indolyl-acétique (10^{-8} g/ml).

b) *milieu liquide*

Nous avons réalisé des expériences en milieu liquide pour étudier la consommation de glucose par les tissus. Dans ce cas, nous avons choisi le milieu de Heller qui était mieux adapté à des expériences de courte durée. Nous avons utilisé le système mis au point par Heller [32] pour maintenir les explantats au niveau du liquide, soit un support en papier-filtre sans cendres, embouti et introduit dans les tubes de culture.

Afin d'éviter que des bulles d'air restent emprisonnées sous le papier-filtre, nous percions ce dernier d'un trou de 2 mm en son centre, au moyen d'une aiguille.

Conditionnement des expériences

Tous les tubes de cultures des expériences que nous avons faites ont été disposés dans une pièce à culture ayant environ 9 m³ et climatisée au moyen d'une installation réalisée spécialement. Nous disposions d'une étagère à rayons de verre sur lesquels étaient placés des tubes lumineux Philips de 120 cm, type « Lumière du jour » TL 40 W, standard 55, 6500° K. L'éclairage reçu à 20 cm était d'environ 2200-2400 lux. La température était réglée à 23° ± 1° C.

Les cultures qui devaient être réalisées à l'obscurité étaient placées dans des boîtes en bois ou en carton qui se trouvaient dans la même pièce.

La durée d'éclairage était de 14 heures tandis que celle de la période obscure était de 10 heures, le tout étant commandé par une horloge.

Nous avons également utilisé cette chambre climatisée pour entretenir la plupart des souches dont nous avons besoin. Cela permettait d'avoir des colonies semblables et régulières toute l'année. Ces souches étaient ainsi soustraites aux inconvénients que l'on rencontre souvent tels qu'une trop forte chaleur en été ou un manque d'illumination en hiver.

B) MESURES DE CROISSANCE PONDÉRALE

1) *Poids frais*

A la fin de chaque expérience, le poids frais de toutes les colonies qui s'étaient développées était lu à la balance de précision. Les fragments étaient soigneusement essuyés séparément, avec du papier filtre, puis pesés le plus rapidement possible.

2) *Poids sec*

Après la détermination du poids frais, toutes les colonies constituant une condition expérimentale étaient réunies en un seul flacon à culture à large col. Tous les flacons étaient ensuite bouchés par un tampon de coton puis mis au four Pasteur pendant au moins quatre jours à 97° C. Les pesées étaient ensuite faites à la balance Mettler en plaçant ensemble tous les fragments d'un même flacon.

C) DOSAGE D'AZOTE

Nous avons dosé l'azote total et l'azote protéique selon une méthode mise au point au laboratoire du Professeur Gautheret. Les valeurs obtenues au moyen de ces dosages constituaient un autre critère de croissance.

Après les avoir remis pour quelques heures au four à 95° C, les tissus secs sont broyés dans un mortier recouvert d'une plaque de bois percée d'un trou qui ne laissait passer que le pistil. De cette façon, les fragments de tissus n'étaient pas dispersés et ils pouvaient être broyés convenablement.

Le principe du dosage est fondé sur une réaction obtenue au moyen du réactif de Nessler mesurée au colorimètre.

Prises pour le dosage de l'azote total

Les prises de 30 à 40 mg sont pesées à la balance Mettler, puis transportées directement dans les tubes à minéraliser spéciaux portant des graduations pour 35 ml et 50 ml. On place au fond de chaque tube une pincée de catalyseur de Dumazert et Marcelet au sélénite de Mercure.

Prises pour le dosage de l'azote protéique

Chaque prise de 60 à 100 mg est déposée sur la plaque poreuse d'un tube d'Allihn No. 4. Chacun d'eux est ensuite disposé au-dessus d'une éprouvette.

Elimination de l'azote soluble

Les tubes d'Allihn sont alors remplis d'une solution normale d'acide trichloracétique [16,5%]. Lorsque la filtration est terminée, on entraîne les particules restées sur les parois des tubes, on les remplit à nouveau et on laisse filtrer. On répète l'opération une troisième fois et si besoin est une quatrième fois, c'est-à-dire jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Ces opérations se déroulent à la chambre froide.

Minéralisation de l'azote total

Cette méthode permet de traiter 24 échantillons simultanément.

La minéralisation s'opère en plaçant les tubes dans un portoir en laiton. On a eu soin d'introduire dans chaque tube 3 ml d'acide sulfurique pur. La plaque de base du portoir est creusée de petites hémisphères dans lesquelles s'adaptent le fond des tubes. Le portoir est placé sur un réchaud et on commence la minéralisation à la veilleuse pendant une heure, puis on augmente la flamme pendant 2 à 3 heures jusqu'à ce que le contenu des tubes soit limpide. On laisse refroidir puis on introduit délicatement dans chaque tube 0,25 à 1 ml d'eau oxygénée. On remet à chauffer pendant une heure.

Minéralisation de l'azote protéique

On entraîne le résidu resté sur le filtre d'un jet de pissette et on le recueille dans un tube à minéralisation où l'on dépose également une pointe de spatule de catalyseur. On ajoute 3 ml d'acide sulfurique pur puis on évapore l'eau à l'étuve à 160° C. Après quoi on pratique la minéralisation comme pour l'azote total.

Tubes témoins et courbe étalon

Au cours des opérations précédentes on a également préparé deux tubes témoins qui contiennent :

- du sélénite de Mercure (Catalyseur de Dumazert et Marcelet)
- du sulfate d'Ammonium.

On a préparé au préalable une solution de sulfate d'Ammonium à 1000 gamma d'azote par ml. soit 4,716 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ desséché à l'étuve dans un litre d'eau distillée.

On effectue ensuite des prises de manière à avoir des dilutions donnant: 20, 40, 60, 80, 90, 100, 120 et 150 gamma d'azote. On complète le volume au premier trait de chaque tube soit 35 ml puis on ajoute à chacun 15 ml de réactif de Nessler. Les mesures permettent de représenter le graphique étalon.

Lecture et détermination des quantités d'azote

Les tubes à minéralisation sont repris après refroidissement et leur contenu est dilué avec de l'eau distillée jusqu'au trait de 50 ml avec les mêmes précautions que pour les témoins. Il reste à prélever à la pipette de précision les prises d'essai que l'on porte dans un tube à minéralisation. On complète avec de l'eau jusqu'au premier trait (35 ml) puis avec 15 ml de réactif de Nessler (2^{me} trait). Les prises d'essai doivent être telles que la coloration mesurée au colorimètre soit comprise entre les deux valeurs extrêmes des tubes témoins. Les lectures sont faites avec le même tube du colorimètre pour chaque prise d'essai et les quantités d'azote sont obtenues par comparaison avec le graphique étalon. On calcule ensuite le nombre de gamma d'azote contenu dans 50 ml puis par mg de poids sec.

D) DOSAGE DES SUCRES

Le dosage du glucose dans le milieu de culture était fait selon la méthode de Bertrand [6]. Le dosage des sucres intratissulaires qui est beaucoup plus long et délicat a été réalisé selon la méthode dite des trois sucres (glucose, fructose, saccharose) telle qu'elle a été appliquée par Goris avec une formule qui permet de trouver rapidement les quantités recherchées.

Extraction

Les tissus, après avoir été pesés et coupés en fragments d'environ 100 mg sont tout d'abord stabilisés par de l'alcool à 95 bouillant dans un volume correspondant à 5 fois le poids de matière fraîche. L'ébullition modérée est maintenue pendant 20 à 30 minutes. Ils sont broyés au moment du dosage sur une plaque de verre puis soumis à un épuisement par l'éthanol 90. utilisé à raison de 5 fois le poids du tissu. Cette opération se fait à chaud pendant 1 à 2 heures dans un ballon plongé dans l'eau d'un bain-marie. Le contenu est versé bouillant sur un filtre de Büchner disposé sur une fiole à vide. On essore le résidu et on recommence deux fois l'opération. On termine par une extraction à l'alcool 60. et une à l'eau. Toutes les solutions sont distillées au bain-marie à une température voisine de 50°C, en s'aidant du vide. Nous avons utilisé un appareil rotatif type Büchi. On évapore jusqu'à ce que l'on obtienne une liqueur sirupeuse épaisse.

Préparation d'une solution convenable pour le dosage

Le résidu est repris par de petites quantités d'eau de façon à obtenir finalement 20 à 50 ml. Cette solution est déféquée par de l'acétate de Plomb basique qui est intro-

duit goutte à goutte en agitant fortement le récipient. Nous avons utilisé le plus souvent un tube à centrifuger de manière à éviter un transvasage superflu. On centrifuge pendant 15 minutes à 2500 t/min. Après quoi on vérifie si la précipitation a été complète par adjonction de quelques gouttes d'acétate de Plomb. Si ce n'est pas le cas, on répète l'opération. Nous utilisons en général environ 1,2 ml de solution déféquante pour une masse tissulaire d'environ 10 g. Le précipité est remis en suspension dans un peu d'eau afin de le laver puis on le soumet à une nouvelle centrifugation de quelques minutes. Si l'on ne poursuit pas les opérations immédiatement, pour une bonne conservation, il faut prendre soin d'acidifier faiblement la solution sucrée jusqu'à un pH de 5 par quelques gouttes d'acide acétique en suivant avec un papier indicateur. Avant de faire les dosages proprement dit, il faut encore éliminer les sels de Plomb. On y parvient en ajoutant à la solution du sulfate de Sodium anhydre jusqu'à fin de précipitation, à raison d'environ 0,25 g pour 1 ml d'acétate de Plomb, un excès de ce sel ne gênant pas les opérations ultérieures.

On agite bien la solution puis on centrifuge jusqu'à ce que le liquide soit tout à fait limpide. Dans ce cas aussi, il est nécessaire de vérifier si la précipitation a été totale avant de poursuivre les opérations et il faut laver le précipité, le remettre en solution, centrifuger et ajouter le surnageant à la solution. Cette dernière est alors réduite à un volume déterminé par concentration sous vide à l'appareil à distiller rotatif, en dessous de 60°C. Les quantités de sucre étant faibles, nous amenions le volume à 21 ml.

Dosage

Le principe du dosage consiste à faire trois déterminations. Une lecture polarimétrique et deux mesures du pouvoir réducteur, l'une avant, l'autre après dédoublement du saccharose.

La solution sucrée obtenue comme nous l'avons indiqué est versée dans le tube de 20 cm d'un polarimètre dont on mesure la déviation soit α . Nous avons utilisé un appareil Kern. Ensuite sur une partie aliquote (10 ml) on détermine la quantité de sucres réducteurs par la méthode de Bertrand, soit p ce résultat exprimé en sucre interverti. Le reste de la solution est soumis à l'hydrolyse enzymatique au moyen d'une solution d'Invertase Analytical Difco. Nous ajoutons en pratique 1 à 2 ml d'une solution de 10 ml. ($k = 0,1$) puis nous laissons la fiole soigneusement bouchée pendant une nuit à l'étuve à 37°C. Puis un nouveau dosage donne la somme des sucres réducteurs initiaux et du saccharose inverti soit p' .

Connaissant le poids π de tissu frais et le volume v de la solution sucrée, on peut calculer la déviation polarimétrique d'une solution contenant dans 100 ml les glucides solubles de 100 g de tissu frais analysé soit A .

$$A = \frac{\alpha \cdot v}{\pi}$$

D'autre part on peut déterminer P, la quantité de sucres réducteurs contenus dans 100 g de tissu frais:

$$P = \frac{p \cdot 100}{\pi}$$

et P', la somme des sucres réducteurs initiaux et du saccharose inverti correspondant à 100 g de tissu frais:

$$P' = \frac{p' \cdot 100}{\pi}$$

Pour obtenir facilement le pourcentage de chacun des trois sucres, Goris a établi une formule simple en fonction des trois valeurs précédentes et des pouvoirs rotatoires spécifiques qui lui permettait d'obtenir la concentration en glucose des tissus. Quant au fructose, il est déduit par différence entre la quantité des sucres réducteurs P et celle du glucose. Le saccharose résulte de la différence des valeurs P' — P multipliée par le coefficient 0,95 qui est le rapport du poids moléculaire du saccharose et du sucre interverti.

On obtient le poids de sucre dans 100 g de tissu frais:

$$\text{Glucose. } x = \frac{1}{144,05} (50 A + 154,51 P - 63,21 P')$$

$$\text{Fructose. } y = P - x$$

$$\text{Saccharose. } z = (P' - P) 0,95$$

Les lectures polarimétriques sont difficiles à obtenir avec une grande exactitude. Le pouvoir réducteur, par contre, est déterminé avec précision.

E) DOSAGE DES CHLOROPHYLLES

La méthode de Comar et Zscheile [10] permet par un simple calcul d'obtenir les quantités de chlorophylle a et b en partant d'une seule solution. Cette méthode appliquée au dosage des chlorophylles d'algues unicellulaires peut s'adapter au dosage de ces pigments extraits des tissus cultivés in vitro.

Préparation de l'extrait

Nous utilisons 5 à 8 g de tissus frais qui étaient déposés dans un mortier immédiatement après la pesée. Après avoir ajouté une pointe de spatule de carbonate de Calcium pour neutraliser l'excès éventuel d'acides organiques pouvant hydrolyser la chlorophylle, on recouvre les tissus de sable de quartz que l'on humecte ensuite au moyen d'un peu d'acétone. On commence à broyer les tissus et l'on veille à ce que le sable soit toujours humide en ajoutant de temps en temps de l'acétone. Il ne doit cependant pas y avoir un excès de solvant surnageant au-dessus du sable. Après le

broyage, il faut rincer le pistil à l'acétone et transporter tout le contenu du mortier dans un tube à essai à travers un entonnoir à large col. On rince ensuite complètement le mortier et l'entonnoir avec de petites quantités d'acétone et on abandonne le mélange pendant au moins deux heures à la chambre froide.

Dans un cylindre à vide on dispose un tube à essai surmonté d'un petit entonnoir. On pose le couvercle sur le cylindre et on y adapte un entonnoir de Büchner muni d'un papier-filtre. On humecte le filtre au moyen de quelques gouttes d'acétone puis on transvase tout le contenu du tube maintenu au froid: sable et solution acétonique. Il faut prendre garde de bien étaler le sable sur toute la surface du filtre au moyen d'une baguette de verre et de le laver plusieurs fois à l'acétone jusqu'à ce qu'il retrouve sa couleur rose.

Le filtrat n'est pas toujours limpide: il peut contenir du sable et des protéines qui ont floclé. On le filtre à nouveau (Papier Schleicher et Schüll no. 575). Cette opération se fait alors au-dessus d'une ampoule à décanter de 200 ml. Avant de continuer, il est nécessaire de laver le papier-filtre trois fois à l'acétone pour entraîner la chlorophylle qui a été adsorbée.

On peut alors ajouter dans l'ampoule à décanter 10 à 20 ml d'éther de pétrole pur ou d'hexane. Cette quantité doit être au moins la moitié du volume d'acétone. Puis on lave six fois à l'eau distillée en évitant d'émulsionner la solution, afin d'éliminer l'acétone.

On recueille ensuite la solution de chlorophylle qui a passé dans l'éther de pétrole ou l'hexane dans un tube à essai dans lequel on a déposé une pointe de spatule de sulfate de Sodium. Puis on rince l'ampoule à décanter deux fois avec 1 à 2 ml de solvant pur. La solution doit reposer 1 à 2 heures à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit parfaitement limpide. La solution est alors complétée à un volume déterminé de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,2 et 0,8 à la longueur d'onde de 660 millim.

1 Dosage

La détermination quantitative est réalisée au moyen des formules de Comar après lecture au spectrophotomètre. Nous avons utilisé l'appareil Beckmann modèle DU. On remplit les cuves de 1 cm du spectrophotomètre avec les solutions à doser en ayant rempli l'une d'elles avec du solvant pur qui sert de témoin à blanc. Puis on procède aux lectures qui sont faites aux longueurs d'onde suivantes:

6400, 6425, 6450, 6475, 6625 Angström

Les manipulations sont faites rapidement en raison de l'évaporation du solvant.

Soient D_{6600} et D_{6425} les densités optiques aux longueurs d'onde respectives de 6600 et 6425 Angström.

Les concentrations de chlorophylle a et b se calculent à partir des données au moyen des formules suivantes:

Chlorophylle a: $9,93 \cdot D_{6600} - 0,777 \cdot D_{6425}$ mg/litre d'éther de pétrole.

Chlorophylle b: 17,7. D 6425 — 2,81. D 6600 mg/litre d'éther de pétrole.
Il ne reste plus qu'à rapporter ces valeurs au poids de tissu frais.

F) MESURE DES ÉCHANGES GAZEUX

La mesure des échanges gazeux a été réalisée à l'aide de la méthode manométrique de Warburg. En utilisant cette méthode et l'appareillage qui lui est propre, nous avons essayé de déterminer la photosynthèse des tissus chlorophylliens comme on le fait pour des cultures d'algues par exemple. Par la suite, nous avons encore utilisé cette méthode afin de mesurer les échanges gazeux respiratoires à titre de comparaison. Cela nous permettait de mesurer des actes physiologiques différents dans des conditions assez semblables. A la méthode manométrique s'oppose la méthode eudiométrique qui paraît beaucoup plus fine ainsi que Lioret [48] l'a précisé encore récemment. Les erreurs attachées à la première méthode proviennent surtout d'une diffusion gazeuse incomplète. Nous avons eu cependant la possibilité d'effectuer de nombreuses mesures avec l'appareil de Warburg qui nous ont donné des résultats satisfaisants. Les premiers essais ont été réalisés avec l'appareil de Braun modèle SL rectangulaire. Par la suite, nous avons utilisé l'appareil Braun modèle W circulaire équipé d'un dispositif spécial pour la photosynthèse comportant une cuve en plexiglas et un cadre portant huit tubes fluorescents Philips TL 20 à réflecteur incorporé. Nous obtenions de cette façon un éclairage de 4760 lux à 20 cm.*) L'appareil étant placé dans une chambre noire, il était possible de passer immédiatement d'une période éclairée à une période obscure ou vice versa. Les fioles ont été faites spécialement pour cet usage.

Mesure de la respiration

Choix d'une solution où s'effectuent les mesures

Les poids de tissus utilisés étant particulièrement grands et afin que le volume gazeux soit suffisant, il était nécessaire d'employer des fioles spéciales. Le volume de ces fioles est d'environ 35 cm³.

La solution de mesure comprenait 1 partie de mélange tampon et 9 parties de solution de Heller.

Mélange tampon adapté de Sørensen: $\left. \begin{array}{l} \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ M } 8 \text{ parties} \\ \text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ M } 2 \text{ parties} \end{array} \right\} \text{pH } 6,2 - 6,3$

Opérations

Les tissus étaient choisis après 3 semaines de culture environ ou un temps convenable éventuellement plus long. Après avoir été pesées, les colonies étaient immédiatement introduites dans les fioles.

* Amplitude d'agitation 5 cm; fréquence: 80 oscillations/min.

Trois fioles étaient préparées contenant l'une 15 ml. et les autres 10 ml. de solution de mesure. La première sert de thermobaromètre. On introduit 0,3 ml. de KOH 20 % dans le tube excentrique de la deuxième fiole. On y place également un morceau de papier filtre de 2×2 cm. plissé en éventail pour étaler la potasse sur une plus grande surface. On dépose sur le fond de la fiole les tissus et on complète le volume à 15 ml. avec du milieu de mesure en admettant que le poids spécifique des tissus est de 1.

Dans la troisième fiole on ne met pas de potasse mais on introduit seulement les tissus et on complète le volume à 15 ml. avec du milieu de mesure.

Nous disposions généralement deux séries de trois fioles sur les supports de l'appareil. Les couvercles doivent être enduits de graisse à joints ou de silicone et adaptés aux fioles respectives. Puis ces dernières doivent enfin être fixées aux manomètres correspondants. La température du bain thermostatique était de 25°C.

Les manomètres étaient ensuite mis en mouvement et les robinets étaient maintenus ouverts. Ceci constitue la période de stabilisation qui durait 20 minutes. Après quoi les robinets étaient fermés et les lectures étaient faites toutes les 10 minutes pendant une heure.

Mesure de la photosynthèse

Choix d'une solution où s'effectuent les mesures

Les cellules sont mises en contact avec une solution de carbonate et de bicarbonate. Ce mélange tampon permet d'obtenir une pression partielle de CO₂ constante dans l'espace occupé par les gaz à l'intérieur de la fiole de Warburg. Dans cette fiole la pression partielle de CO₂ est constante de même que le volume de ce gaz. Les variations manométriques enregistrées sont donc celles de la consommation d'oxygène auxquelles peuvent s'ajouter à la lumière les valeurs positives du dégagement d'oxygène produit par la photosynthèse.

Le mélange tampon a un pH beaucoup plus élevé que celui du milieu de culture. C'est pourquoi nous avons réalisé une expérience en vue de vérifier si un milieu alcalin n'exerçait pas d'action inhibitrice sur les tissus [voir p. 34].

Ceci nous a amené à faire l'essai de plusieurs mélanges tampons et plus particulièrement à comparer leur pH [voir p. 34 et tableau 1]. Finalement, après plusieurs essais, nous avons adopté le mélange d'Emerson-Chalmers dans les proportions suivantes:

K ₂ CO ₃	0,1 M	15 parties
NaHCO ₃	0,1 M	85 parties

le pH est de 8,75.

Opérations

Au cours des premiers essais, les tissus étaient découpés en tranches de 1/2 mm. d'épaisseur. Après la pesée, les tranches étaient soit introduites directement dans les

fioles de Warburg, soit lavées à l'eau pour limiter l'oxydation superficielle inhérente au découpage. Par la suite nous introduisons 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 complétons 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 avons 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 réalisés 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 glucide-obscurité 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'éclairage 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 avons 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 fournir 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 espérons 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 avons 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 devons 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.

CHAPITRE IV — DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

1. *Action du glucose sur des tissus verts de Carotte cultivés à la lumière et à l'obscurité.**Principe*

Nous voulions étudier l'effet du glucose fourni en doses croissantes à des explantats exposés à la lumière ou maintenus à l'obscurité.

Des fragments préparés à partir d'une souche de tissu cambial de Carotte ont été mis en culture sur le milieu gélosé de Gautheret. La source d'hydrate de carbone a donc toujours été le glucose mélangé aux solutions nutritives dans les proportions suivantes: 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6 g%. Pour quelques expériences, nous avons aussi utilisé des doses plus faibles: 0,25; 0,5; 0,75 g%. Une moitié des fragments était cultivée à la lumière, l'autre était mise à l'obscurité.

Mode opératoire

Pour chaque dose de sucre, nous utilisons 24 tubes de culture qui étaient répartis en deux lots de 12 tubes chacun. L'un d'eux était placé à la lumière (14 heures par jour), l'autre était disposé dans des boîtes en bois ou en carton pendant toute la durée de l'expérience dans une cabine climatisée à 23°C. ¹⁾ Pour chaque expérience nous utilisons 18 à 24 lots d'explantats préparés comme nous l'avons indiqué, c'est à dire 216 à 298 fragments de tissu au total.

La durée de culture a été de 60 à 63 jours pour les deux premières expériences. Ensuite, nous avons réduit cette durée à 47 et 50 jours.

Nous avons réalisé une expérience de ce genre qui nous donnait comme première indication des résultats concernant le poids frais et le poids sec (A 110). Nous avons voulu répéter cette expérience pour en confirmer la validité. Or il s'est avéré que cette répétition livrait des résultats assez analogues mais non superposables (A 111). Ceci nous a incité à répéter encore ce type d'expérience un certain nombre de fois (A 116 — A 119) si bien que nous disposions finalement de 6 résultats par condition expérimentale, c'est à dire des valeurs fournies par environ 72 explantats, tout au moins pour toutes les doses de glucose comprises entre 1 et 4 g% ainsi que pour 5 et 6 g%.

Expression des résultats

Pour chaque expérience de ce type nous avons déterminé le poids frais de tout explantat qui avait proliféré ainsi que le poids sec de l'ensemble de ces fragments. Dans certains cas nous avons également pratiqué des dosages d'azote total et d'azote

¹ Voir technique de culture, p. 16.

protéique à partir du matériel séché. Nous avons groupé les résultats de plusieurs expériences puisqu'elles étaient comparables pour en faire des moyennes. Certains tableaux ou graphiques correspondent donc à une expérience donnée ou à plusieurs. ¹⁾

2. *Action du glucose sur des tissus de Crown-gall de Scorsonère cultivés à la lumière et à l'obscurité.*

Principe

Nous voulions réaliser une deuxième série d'expériences semblables aux précédentes mais plus particulièrement en vue d'établir des comparaisons avec les résultats obtenus au moyen de tissus chlorophylliens de Carotte. Nous avons donc utilisé des tissus provenant d'une souche de Crown-gall de Scorsonère. Il s'agissait de cultiver des explantats sur des milieux glucosés de 1 à 6 g %, à la lumière et à l'obscurité.

Mode opératoire

Chaque expérience se déroulait de la même façon que celles que nous avons entreprises avec des tissus de Carotte. Pour chaque concentration de glucose nous préparions 24 tubes de culture selon les techniques habituelles, en disposant des explantats calibrés de tissus sur le milieu de culture solide. Ces tubes étaient aussi répartis en deux lots dont l'un était placé entre deux tubes lumineux pendant 14 heures par jour et l'autre dans des boîtes obscures, sur des rayons de la chambre climatisée à 23°C.

Après avoir obtenu les premiers résultats et pour des raisons que nous précisons plus loin, nous avons été obligé de modifier légèrement la taille et le poids des explantats. Nous avons donc découpé dans les colonies initiales des fragments de 7 mm de côté au lieu de 6 mm.

Tous les explantats qui avaient proliféré étaient pesés séparément puis tous ceux d'un lot²⁾ étaient réunis et desséchés au four à 97°C pour pouvoir ensuite déterminer leur poids sec.

Nous avons répété 4 fois cette expérience afin d'en vérifier les résultats. La culture a duré pour la première 54 jours et pour les suivantes 45, 31 et 35 jours. (exp. A 210-214).

3. *Croissance comparée d'une souche caroténogène et d'une souche chlorophyllienne de tissus de Carotte.*

¹ Une analyse graphique des résultats individuels d'une expérience a été soumise à M^{lle} V. Uehlinger, Dr ès sc., statisticienne, que nous remercions ici vivement. La dispersion des résultats était suffisamment faible pour qu'il ne soit pas nécessaire d'appliquer un test particulier pour toutes les expériences, dont les résultats exprimés par des moyennes sont significatifs.

² C'est-à-dire ceux qui correspondaient à une même dose de glucose cultivés soit à la lumière soit à l'obscurité.

Première expérience. Principe

Estimant que les colonies d'une souche caroténogène de tissu cambial de Carotte (souche d'Eichenberger) étaient assez semblables aux colonies d'une souche verte que nous utilisions, nous avons décidé d'en comparer la croissance.

Nous avons fait un essai préliminaire qui consistait à comparer le poids frais et le poids sec de ces deux types de colonies. Comme il est assez difficile d'obtenir des explantats calibrés de tissus provenant de la souche caroténogène, soit parce qu'elles sont souvent nécrosées soit parce que les colonies sont un peu granuleuses, nous ne pensions pas utiliser ces tissus pour des expériences quantitatives. Ils avaient par ailleurs une prolifération relativement lente, ce qui n'est pas non plus sans rendre leur emploi mal commode. Cependant, en vue de déterminer la teneur en pigments de ces tissus [52], nous avons dû repiquer la souche assez fréquemment pendant à peu près deux ans. Cela nous a permis d'obtenir des colonies plus compactes et moins granuleuses. Nous n'avons fait que comparer, pour commencer, deux séries d'explantats. Pour les raisons que nous venons d'indiquer, nous ne disposions par au moment voulu des deux souches prêtes à être repiquées simultanément. C'est pourquoi nous avons pesé un certain nombre de fragments qui n'avaient pas le même âge mais qui avaient atteint le volume maximum, c'est à dire les parois du tube de culture.

Conditions expérimentales

Milieu de culture: milieu de Heller solidifié par de la gélose (1 %).

Concentration de glucose: 5 %

Age des colonies: souche chlorophyllienne: 57 jours

souche caroténogène: 77 jours

Les colonies étaient placées dans la chambre climatisée à 23° C. Une moitié des explantats de chaque souche était cultivée à la lumière, l'autre était maintenue à l'obscurité.

Deuxième expérience. Principe.

Nous avons ensuite réalisé l'expérience suivante: A partir de chacune des deux souches, trois groupes de 24 explantats ont été préparés pour être cultivés en présence de trois concentrations de glucose (3; 5; 6 g %) en vue de comparer le poids frais et le poids sec de colonies de même âge.

Conditions expérimentales

Milieu de culture: milieu de Heller solidifié par de la gélose (1 %).

Concentration de glucose: 3; 5; 6 g %.

Age de colonies: 58 jours.

Les tissus ont été cultivés en chambre climatisée à 23° C selon les techniques décrites. Un lot de 12 explantats pour chaque condition était placé à la lumière et un

autre était maintenu simultanément à l'obscurité. Il y avait donc deux séries de 36 tubes, pour cette expérience.

4. *Photosynthèse d'une souche tissulaire de Carotte.*

Principe

Afin de déterminer le rôle de la lumière sur les tissus chlorophylliens, nous avons tenté de mesurer l'intensité de leur photosynthèse. Ces expériences ont été accompagnées d'une étude sur le comportement des tissus dans le milieu fortement alcalin où s'effectue la mesure. Nous avons en outre fait des dosages de chlorophylle de ces mêmes tissus.

a) *Dosage des chlorophylles*

Nous avons dosé les chlorophylles a et b des colonies de tissu cambial de Carotte exposées à la lumière et cultivées dans les conditions décrites antérieurement [voir p. 15]. Les dosages n'ont pas été effectués sur les tissus qui ont servi à réaliser d'autres expériences car le prélèvement d'une partie aliquote n'est pas possible mais sur ceux dont nous entretenons régulièrement la souche. Nous avons fait des dosages à partir de colonies d'âge variable issues soit d'un même repiquage soit de repiquages différents. Nous n'avons pas recherché à établir systématiquement une correspondance entre la production de chlorophylle et l'âge des colonies mais plutôt la composition pigmentaire des tissus à la fin de nos expériences.

b) *Effet d'un milieu de culture alcalin*

Principe

Nous avons expliqué les raisons qui nous ont incité à étudier l'effet d'un milieu fortement alcalin sur la croissance des tissus. Nous avons comparé la croissance de colonies tissulaires de Carotte chlorophylliennes sur un milieu normal d'une part et tamponné d'autre part à un pH élevé. Nous avons donc décidé d'incorporer au milieu de culture habituel le mélange tampon que nous avons utilisé pour effectuer nos premières mesures de photosynthèse à l'appareil de Warburg.

Mode opératoire

Au milieu de culture de Gautheret (milieu d'entretien, glucose 2%), nous avons ajouté la quantité convenable de mélange tampon. Ce dernier était stérilisé à part et ajouté aseptiquement à la solution gélosée pendant son refroidissement après la stérilisation à l'autoclave.

Nous avons constaté que si le mélange tampon était incorporé au milieu avant le passage à l'autoclave, l'effet combiné d'un pH et d'une température élevée déterminait l'hydrolyse du glucose. Il fallait donc procéder à une stérilisation séparée de la solution nutritive et du mélange tampon, puis ajouter ce dernier aseptiquement

pendant que le milieu de culture était encore liquide. L'adjonction du mélange modifiait quelque peu l'équilibre ionique du milieu mais nous ne l'avons pas adapté en conséquence.

Le mélange tampon que nous avons utilisé était le suivant :

K_2CO_3 2,5 mMole/l.

$NaHCO_3$ 9,75 mMole/l.

Une solution concentrée était préparée et stérilisée à 120°C pendant 20 min. puis ajoutée à raison de 10 ml par litre de milieu. Le milieu-témoin était simplement prélevé sur la solution nutritive aussitôt qu'elle était sortie de l'autoclave après une stérilisation de 20 minutes à 115°C.

Le pH du mélange tampon était de 9,1 ; celui du milieu tamponné était de 8,67 à 34°C.

Les explantats ont été préparés selon la technique habituelle et ont été laissés 39 jours à la lumière diffuse. Nous avons ensuite déterminé le poids frais de chaque explantat qui avait proliféré et le poids sec de l'ensemble de ceux-ci pour chaque condition.

c) *Mesures de la photosynthèse.*

Principe.

Nous voulions estimer la valeur des échanges gazeux des tissus de Carotte placés dans les conditions de mesure de la photosynthèse. Nous avons appliqué la méthode directe de Warburg avec l'appareillage adéquat déjà décrit [voir p. 24], et avons mesuré la consommation d'oxygène au cours de deux périodes obscures encadrant une période éclairée.

Mode opératoire.

Nous avons réalisé 15 essais différents dont seuls quelques-uns nous ont fourni des résultats favorables et que nous donnerons plus loin.

Les expériences n'étaient pas chaque fois identiques, c'est pourquoi nous en indiquons sommairement le plan.

Le premier essai (B 110) a été fait de la manière suivante :

Une colonie était coupée au microtome à main en tranches de $\frac{1}{2}$ mm d'épaisseur environ. Ces tranches étaient lavées à l'eau distillée plusieurs fois puis laissées immergées une nuit et rincée finalement une à deux fois. Nous pesions après essorage délicat 300 mg de tissus que nous plongeons dans 2,7 ml de solution tampon d'Emerson-Chalmers [14]: $K_2CO_3/NaHCO_3$ 0,1 M.

Pour les deux expériences suivantes (B 111 et 112) nous avons doublé le volume du milieu dans lequel s'effectue la mesure. Nous avons déposé dans deux fioles 500 mg et dans deux autres 1000 mg de tissus découpés en tranches. Nous avons aussi introduit dans une fiole une colonie entière.

Au cours d'une autre expérience (B 113) nous avons également découpé des colonies en tranches que nous avons ensuite lavées dans une solution de tampon phosphate avant de les mettre dans le tampon carbonate-bicarbonate.

Estimant que le volume du milieu dans lequel s'effectuent les mesures n'était pas suffisant, nous l'avons porté d'abord de 3 à 6 ml puis pour les trois expériences suivantes à 12 ml. (B113, 114, 115). Nous avons aussi réduit le temps de lavage des tissus à deux heures.

Par conséquent, à partir de la sixième expérience (B116), nous avons utilisé uniquement des colonies entières de plus de 1 g, âgées environ d'au moins 44 jours. Le volume total de liquide par fiole était de 15 ml. Considérant que les manipulations de découpage et de lavage ne permettaient pas de rendre compte de l'acte physiologique global accompli par des tissus intacts, nous y avons renoncé.

Par la suite, nous avons changé la composition du mélange-tampon car en nous basant sur les travaux de Heller [33], nous avons constaté que la solution que nous utilisions avait une concentration en ions K^+ et Na^+ trop élevée. Nous avons réalisé diverses solutions que nous avons mélangées dans des proportions différentes. Nous avons ensuite effectué des mesures de pH (Voir tableau 1).

Pour la septième expérience (B 117), nous avons utilisé deux colonies entières de 0,342 et 0,506 g immergées dans le mélange de Stauffer ($Na_2CO_3 - NaHCO_3$ 0,1 M, dans les proportions 5:95).

Au cours d'une autre expérience, (B 119) nous avons essayé les trois solutions tampon suivantes:

a) Solution de Pratt modifiée	$KHCO_3 - NaHCO_3$ (no. 5)
b) Solution d'Emerson-Chalmers modifiée	$K_2CO_3 - NaHCO_3$ (no. 6)
c) Solution de Stauffer modifiée	$Na_2CO_3 - NaHCO_3$ (no. 4).

Nous avons également tenté d'obtenir des solutions dont le pH soit moins élevé. Nous y sommes parvenu en ajoutant à celles-ci un agent chélateur sous la forme du sel de Sodium d'éthylène diamine tétracétique (EDTA).

Pour l'expérience B 120, nous avons préparé les milieux de mesure suivants:

a) Solution tampon	K_2CO_3	0,138 g/l	pH 6,14
	$NaHCO_3$	0,823 g/l	
	Solution nutritive glucosée à 2%		
	Solution d'EDTA 100 cc d'une solution 0,1 M		
b) Solution tampon	idem		pH 6,72 (no. 7)
	Solution d'EDTA idem		
c) Solution tampon	idem		pH 8,50

Nous avons immergé 4 colonies dans des fioles contenant du milieu a) et 3 colonies dans d'autres, contenant du milieu b) et c), pour faire des mesures à l'appareil de Warburg.

Nous avons encore répété cette expérience en y apportant quelques modifications (B121). Nous avons utilisé les solutions n° 7 avec des proportions un peu différentes qui avaient un pH de 7,50 et 6,04 respectivement, ainsi que la même solution sans EDTA.

Enfin, pour les trois dernières expériences, nous avons utilisé le mélange tampon d'Emerson-Chalmers $K_2CO_3 - NaHCO_3$ 0,1 M, sol. n° 3 avec ou sans glucose. Le pH était de 8,65 à 8,75. Dans certains cas nous avons ajouté en outre quelques ml de solution minérale de Heller.

En faisant cette série d'expériences nous avons donc placé les tissus dans des conditions très différentes en vue de trouver lesquelles seraient les plus favorables pour réaliser des mesures de photosynthèse.

TABLEAU 1
Mélanges tampons utilisés pour les mesures de photosynthèse

Mélange et emploi	Constituants, proportions et molarité					pH
1. Mélange de Pratt (58)	$KHCO_3$	0,035 M				
	$NaHCO_3$	0,065 M				
2. Mélange de Stauffer (64)	Na_2CO_3	0,1 M	10			
	$NaHCO_3$	0,1 M	90			
3. Mélange de Emerson et Chalmers (14) Exp. B 110 à B 116 et B 123 à B 125	K_2CO_3	0,1 M	15	30	m/Mole K/1	8,75
	$NaHCO_3$	0,1 M	85	85	m/Mole Na/1	
4. Mélange de Stauffer modifié Exp. B 117 et B 119	Na_2CO_3	0,01 M	5	1	m/Mole Na/1	8,35
	$NaHCO_3$	0,01 M	95	9,5	m/Mole Na/1	
5. Mélange de Pratt modifié Exp. B 119	$KHCO_3$	0,0035 M	9	3,15	m/Mole K/1	8,00
	$NaHCO_3$	0,0065 M	1	0,065	m/Mole Na/1	
6. Mélange d'Emerson-Chalmers modifié Exp. B. 119	K_2CO_3	0,05 M	2,5	2,5	m/Mole K/1	8,85
	$NaHCO_3$	0,01 M	97,5	9,75	m/Mole Na/1	
7. Mélange d'Emerson-Chalmers Modifié + EDTA Exp. B 120	K_2CO_3	0,05		2	m/Mole K/1	6,72
	$NaHCO_3$	0,01 M		9,8	m/Mole Na/1	
	EDTA	0,01 M				
8. Mélange d'Emerson-Chalmers modifié + EDTA Exp. D 121	K_2CO_3	0,25 M		10	m/Mole K/1	9,47 } 7,50
	$NaHCO_3$	0,01 M		9,8	m/Mole Na/1	
	EDTA	0,05				
9. Mélange d'Emerson-Chalmers modifié + EDTA Exp. B 121	K_2CO_3	0,05 M		2	m/Mole K/1	10,07 } 6,04
	$NaHCO_3$	0,005 M		4,9	m/Mole Na/1	
	EDTA	0,3 M				

5. *Respiration de deux souches tissulaires de Carotte.*

Principe

Des colonies vertes et étiolées de la souche de tissu cambial de Carotte que nous cultivons ont été placées dans les conditions de mesure adéquate afin d'en déterminer la respiration au moyen de l'appareil de Warburg et selon la méthode directe.

Mode opératoire.

Les colonies étaient choisies spécialement avant d'être pesées. Nous ne prenions que celles qui s'étaient développées régulièrement sur toutes les faces de l'explantat.

Les tissus étiolés provenaient d'une souche chlorophyllienne à l'origine mais dont les explantats ont été constamment à l'obscurité en chambre climatisée. Ces tissus cultivés sont blancs ou jaunâtres.

Les mesures ont été faites dans tous les cas d'après la technique que nous avons adoptée (voir p. 23), Elles ont été répétées à 8 reprises.

Dans chaque cas nous prenions soin de vérifier le pH du milieu dans les fioles au début et à la fin des expériences afin de vérifier si les résultats étaient exacts. En effet, le mouvement d'agitation auquel les fioles sont soumises dans le bain thermostatique peut faire passer un peu de potasse de la tubulure ad hoc dans le liquide de la fiole, ce qui fausse complètement les phénomènes respiratoires mesurés.

Les lectures qui étaient faites sur les manomètres nous permettaient d'apprécier la consommation d'oxygène des colonies des deux souches considérées et de la comparer à celle des tissus placés dans d'autres conditions pour l'étude de la photosynthèse.

6. *Consommation de glucose d'une souche tissulaire chlorophyllienne de Carotte.**Principe*

Nous voulions suivre la consommation de glucose des colonies que nous utilisons pour nos premières expériences sur la croissance. Pour cela il était nécessaire de cultiver ces tissus sur un milieu liquide et de procéder au dosage du sucre résiduel. Pour compléter ces résultats que nous attendions, nous avons également entrepris le dosage des glucides solubles des colonies. Cela devait nous permettre de préciser d'une part la consommation de glucose et d'autre part la composition glucidique intratissulaire en fonction du sucre fourni, de la lumière et de l'obscurité.

Mode opératoire

Nous avons préparé un milieu de culture de Heller liquide avec les concentrations de glucose suivantes: 1, 2, 3, 4, 5, 6%. Nous avons réalisé un essai préliminaire en ajoutant 2 et 3 g % de glucose au milieu minéral.

Des explantats calibrés étaient préparés à partir de la souche chlorophyllienne de tissu cambial habituelle.

Il fallait introduire dans les tubes de culture, avant de les stériliser, un support en papier-filtre pour maintenir les fragments au bon niveau.

Pour chaque dose de glucose nous préparions 24 tubes répartis en deux lots égaux dont l'un était exposé à la lumière et l'autre à l'obscurité dans la chambre climatisée à 23° C.

La culture a duré 43 jours après quoi nous avons déterminé le poids frais de chaque explantat qui avait proliféré. Ces derniers étaient ensuite stabilisés.

Le milieu de culture resté dans les tubes était repris, son volume mesuré et complété à la valeur initiale. Les dosages étaient alors immédiatement entrepris et nous obtenions la valeur du glucose résiduel par unité de volume correspondant à une colonie. Par différence avec le poids de sucre fourni initialement, nous connaissons la valeur du glucose disparu donc consommé par les tissus. Nous avons ainsi procédé à 12 dosages.

Par la suite, nous avons fait des extractions et des dosages des glucides solubles des explantats selon la méthode indiquée plus haut. Cette méthode permet donc d'obtenir le poids de glucose, de saccharose et de fructose. La totalité des tissus récoltés correspondant à une dose de glucose était utilisée pour chaque dosage. Il s'est trouvé que pour les faibles doses de glucose fournies aux tissus, la limite de sensibilité de la méthode était atteinte lorsque nous disposions de moins de 10 g de matière fraîche. Nous avons dû recourir dans certains cas à un microdosage selon la méthode de Bertrand.

ANNEXE

Effet d'une température différente sur les colonies de tissus de Carotte cultivées à la lumière et à l'obscurité.

Principe

Pour toutes nos expériences nous avons maintenu la température constante afin de ne pas introduire une variable supplémentaire. Toutefois nous voulions savoir si l'effet d'une température élevée pouvait être néfaste pour des colonies cultivées à la lumière.

Mode opératoire

Nous avons préparé des explantats selon la méthode classique que nous avons placés sur le milieu de culture habituel. Le glucose était fourni en doses croissantes allant de 0,25 g % à 6 g %. Pour chaque concentration de glucose nous avons préparé deux lots de 12 tubes. L'un était disposé à la lumière dans une cabine climatisée à 31° C, l'autre était mis à l'obscurité dans une autre cabine dont la température était réglée à 26° C. Nous avons déterminé le poids frais et le poids sec après 79 jours de culture dans ces conditions.

CHAPITRE V — RÉSULTATS

A. SOUCHE CHLOROPHYLLIENNE DE TISSU CAMBIAL DE CAROTTE.

Rôle de la concentration du sucre offert aux tissus

Considération préliminaire.

Pour les tissus cultivés à la lumière on constate, si l'on choisit comme critère

de croissance le poids frais, que celui-ci augmente en fonction de la dose de glucose, passe par un maximum pour une dose de 3 ou 3,5 g % et diminue ensuite (voir fig. 1, 4, 6). Pour la dose la plus forte (6 %) la valeur de poids frais est supérieure à celle qui

TABLEAU 2

Poids sec % mg de poids frais

Concentration de glucose fourni en g %	Moyenne des expériences A 110, 111, 117		Moyenne des expériences A 116, 118, 119	
	Tissus cultivés		Tissus cultivés	
	à la lumière	à l'obscurité	à la lumière	à l'obscurité
0,25	5,15	4,18	4,85	3,84
0,5	5,07	4,71	4,97	4,49
0,75	5,78	4,88	4,83	4,60
1	6,52	5,18	5,25	5,00
1,5	6,70	5,72	5,72	5,55
2	6,93	6,17	6,22	5,73
2,5	7,18	6,83	6,46	6,45
3	7,87	6,83	6,92	6,84
3,5	8,50	7,59	7,34	7,07
4	9,25	7,70	7,79	7,44
4,5	10,75	8,82	—	—
5	10,46	8,81	8,86	8,80
5,5	12,08	9,87	—	—
6	12,25	10,40	9,59	9,02

est obtenue pour la dose la plus faible (0,25 %). Cela confirme les travaux de Gautheret [15, 19] à ce sujet. Les tissus cultivés à l'obscurité ne présentent pas un optimum net pour une concentration de sucre. Le poids frais augmente légèrement puis semble se stabiliser pour des doses comprises entre 2 et 4 g %; ensuite il diminue un peu aux concentrations plus élevées.

Rôle de la concentration du sucre offert sur la teneur en eau et le poids sec.

A la lumière, une concentration croissante de glucose diminue la teneur en eau relative, (voir tableau 3, 4). L'hydratation, c'est-à-dire la quantité d'eau par unité de poids sec, diminue également (voir tableau 5).

A l'obscurité on observe également une diminution de la teneur en eau relative. De même pour l'hydratation (voir tableau 5). Réciproquement, la matière sèche augmente à la lumière en fonction de la dose glucose.

A l'obscurité on constate le même phénomène. Les valeurs obtenues sont cependant un peu plus faibles qu'à la lumière.

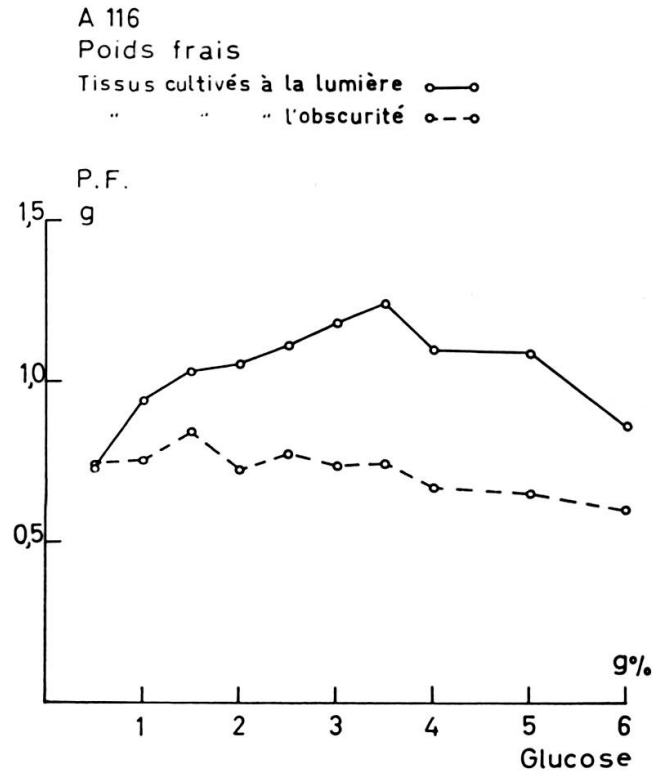


Fig. 1.

Variations de l'accroissement (poids frais) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* dans des milieux contenant diverses doses de glucose.

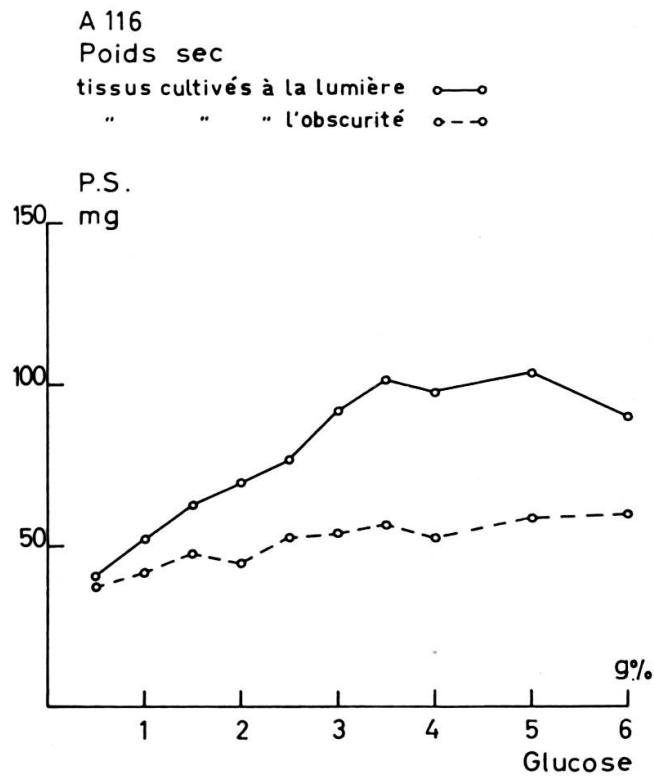


Fig. 2.

Variations de l'accroissement (poids sec) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* dans des milieux contenant diverses doses de glucose.

TABLEAU 3

Teneur en eau des tissus

Moyenne des résultats de trois expériences: A 116, 118, 119

Concentration de glucose fourni en g %	Tissus cultivés à la lumière		Tissus cultivés à l'obscurité	
	Teneur en eau absolue en mg/colonie	%	Teneur en eau absolue en mg/colonie	%
0,25	689,9	95,96	543,3	96,15
0,5	763,9	95,14	658,4	95,66
0,75	974,9	95,30	672,8	95,43
1	939,8	94,88	718,2	95,02
1,5	1077,5	94,41	745,1	94,91
2	1136,1	94,08	743,6	94,32
2,5	1249,8	93,62	761,8	93,48
3	1280,4	93,35	775,5	92,93
3,5	1302,9	92,87	743,6	93,53
4	1251,7	92,37	677,1	92,57
5	1080,8	91,30	548,9	90,75
6	859,5	90,65	629,7	91,35

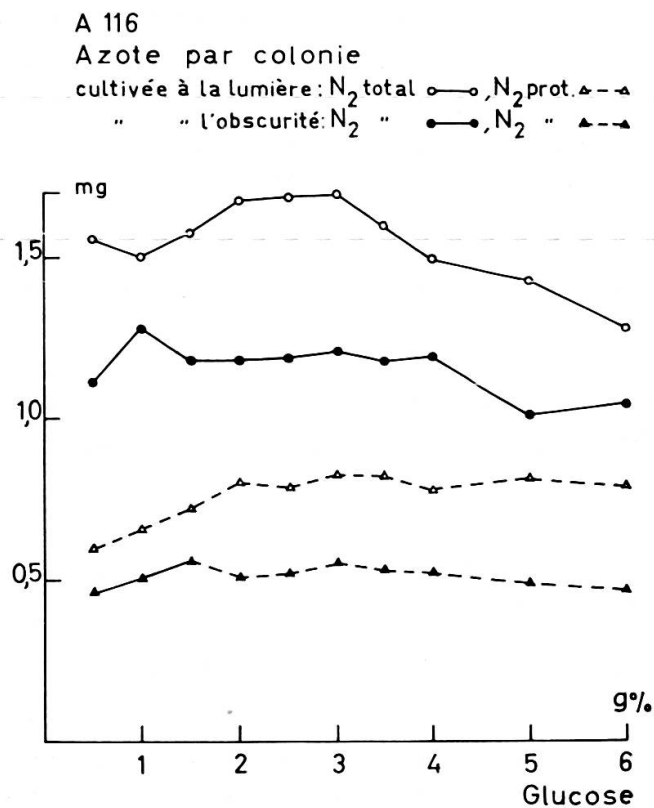


Fig. 3.

Variations de la teneur en azote par colonie tissulaire de Carotte cultivée *in vitro* sur un milieu contenant diverses doses de glucose.

TABLEAU 4

Teneur en eau des tissus

Moyenne des résultats de trois expériences: A 110, 111, 117

Concentration de glucose fourni en g %	Tissus cultivés à la lumière		Tissus cultivés à l'obscurité	
	Teneur en eau absolue en mg/colonie	%	Teneur en eau absolue en mg/colonie	%
0,25	496,2	94,83	577,9	95,51
0,5	548,7	94,90	689,5	95,29
0,75	598,5	94,22	681,5	95,11
1	634,6	93,55	804,2	95,76
1,5	786,0	93,29	750,7	94,24
2	944,8	93,05	737,8	93,85
2,5	1034,2	92,71	677,2	93,25
3	1117,4	92,17	775,2	92,78
3,5	1128,3	91,50	689,5	92,39
4	989,9	90,64	734,4	92,30
4,5	940,9	89,23	485,1	91,18
5	890,4	89,73	632,5	91,25
6	858,7	87,92	458,1	89,70

TABLEAU 5

Hydratation des tissus

Poids d'eau par mg de matière sèche

Glucose fourni g %	Moyenne des expériences A 110, 111, 117		Moyenne des expériences A 116, 118, 119	
	Tissus cultivés		Tissus cultivés	
	à la lumière	à l'obscurité	à la lumière	à l'obscurité
0,25	18,36	21,31	23,82	25,12
0,5	18,79	20,25	19,63	22,10
0,75	16,29	19,46	20,27	20,95
1	14,53	22,60	18,54	19,11
1,5	13,91	16,35	16,89	18,70
2	13,40	15,27	15,90	16,65
2,5	12,72	13,82	14,69	16,04
3	11,77	12,85	14,06	13,15
3,5	10,77	12,14	13,03	14,48
4	9,69	11,99	12,10	12,48
4,5	8,30	10,34	—	—
5	8,74	10,43	10,49	9,82
6	7,79	8,71	9,70	10,57

Rôle de la lumière sur la croissance (sensu lato) des tissus par comparaison avec ceux qui sont cultivés à l'obscurité.

Nous considérons ce rôle d'après les critères suivants: le poids frais, le poids sec, l'azote et les sucres incorporés.

La masse tissulaire prise dans son ensemble est d'abord estimée par son poids frais. Il intègre donc l'hydratation, le poids sec, l'azote et les sucres.

L'effet de la lumière sur le poids frais est le suivant: quelle que soit la concentration du sucre offert, le poids frais est plus élevé à la lumière. L'hydratation, le poids sec, l'azote et les sucres ont également des valeurs plus grandes. On remarque que la différence est surtout sensible pour des doses de sucre supérieures à 1,5%.

Nous avons choisi un autre moyen de comparaison qui consiste à exprimer le poids frais des tissus cultivés à l'obscurité pour 100 mg de matière fraîche cultivée à la lumière, ou l'inverse, soit le poids frais des tissus cultivés à la lumière pour 100 mg de tissus frais cultivés à l'obscurité. Nous avons fait de même avec le poids sec.

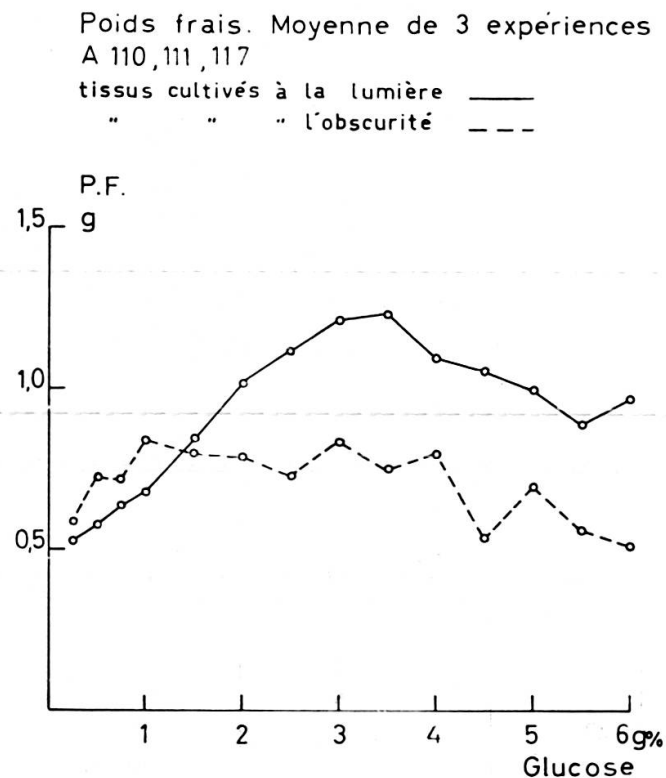


Fig. 4.

Variations de l'accroissement (poids frais) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* pendant 60 ± 3 jours dans des milieux contenant diverses doses de glucose.

Moyenne des résultats de trois expériences.

L'examen du tableau 6 montre que les tissus cultivés à l'obscurité représentent 125 et 85% du poids frais des tissus cultivés à la lumière lorsque le milieu contient 0,5% de sucre. Si la dose de glucose augmente, ce pourcentage diminue pour se stabi-

liser à partir de 2% de glucose à une valeur variant entre 50 et 60%. Il semble donc que pour de faibles doses, l'action du sucre ne soit pas très remarquable.

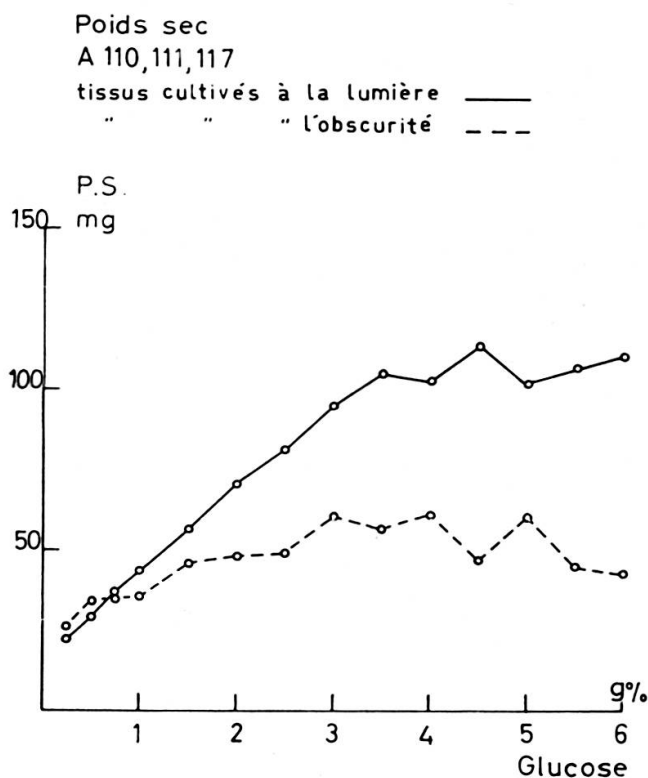


Fig. 5.

Variations de l'accroissement (poids sec) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* pendant 60 ± 3 jours dans des milieux contenant diverses doses de glucose. Moyenne des résultats de trois expériences.

Par contre pour des concentrations plus élevées, il paraît bien que la lumière influence la croissance puisque les tissus cultivés à l'obscurité ne représentent en moyenne que le 60% du poids des tissus cultivés à la lumière.

Rôles complémentaires

Lorsqu'on compare les résultats d'une expérience à l'autre, on est obligé de prendre en considération simultanément les effets du glucose et de la lumière ou ceux du glucose et de l'obscurité. Dans certains cas nous avons donc réparti les résultats en deux groupes. L'un réunit les valeurs tirées des expériences A 110, 111, 117; il correspond à des cultures de 60 ± 3 jours. L'autre comprend les résultats acquis au moyen des expériences A 116, 118, 119; la durée était de 47 ± 2 jours (voir fig. 4 à 7).

Ce qui paraît constant, c'est que les phénomènes généraux se retrouvent dans chaque expérience à quelques différences quantitatives près. Les cultures réalisées à la lumière ont un poids frais qui semble dépendre assez régulièrement de la dose de glucose fournie. Ce poids augmente jusqu'à la dose de 3,5% puis diminue.

TABLEAU 6

Concentration de glucose fourni en g %	Poids frais des tissus cultivés à l'obscurité % g de tissus frais cultivés à la lumière		Poids sec des tissus cultivés à l'obscurité % g de tissus secs cultivés à la lumière	
	Moyenne des expériences A 110, 111, 117	Moyenne des expériences A 116, 118, 119	Moyenne des expériences A 110, 111, 117	Moyenne des expériences A 116, 118, 119
0,25	111,63	78,59	96,89	74,69
0,5	125,19	85,71	116,61	75,56
0,75	112,79	68,94	95,31	66,81
1	123,80	76,30	81,45	74,15
1,5	94,55	68,78	81,21	62,46
2	74,42	64,74	68,51	62,51
2,5	65,10	61,04	60,28	62,34
3	68,91	60,84	63,55	64,77
3,5	60,52	56,76	54,20	51,35
4	72,85	53,97	59,93	52,43
4,5	50,46	—	41,40	—
5	69,84	51,08	59,50	54,24
5,5	63,17	—	51,60	—
6	52,70	72,70	47,73	67,23

Poids frais. Moyenne de 3 expériences
A 116, 118, 119
tissus cultivés à la lumière —
" " " l'obscurité - - -

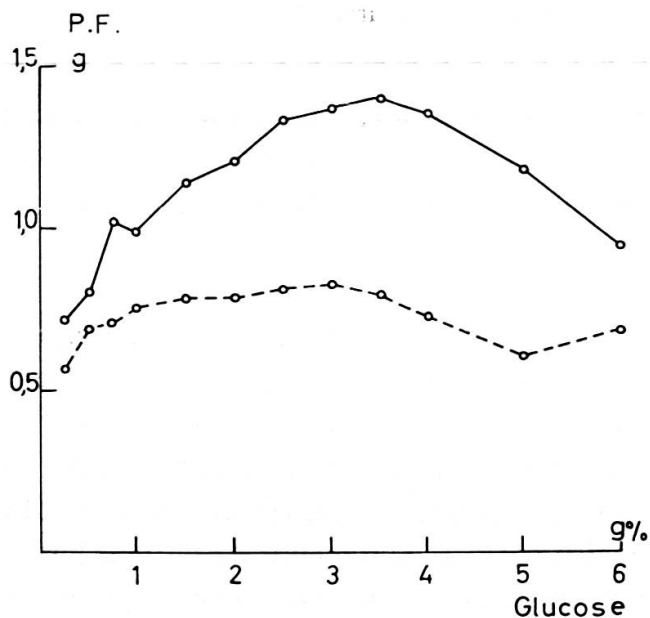


Fig. 6.

Variations de l'accroissement (poids frais) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* pendant 47 ± 2 jours dans des milieux contenant diverses doses de glucose. Moyenne des résultats de trois expériences.

Les colonies maintenues à l'obscurité ne manifestent pas une variation très grande en fonction du sucre offert. Leur poids frais augmente légèrement aux concentrations de glucose comprises entre 0,25 et 1 %, puis se stabilise et diminue un peu aux doses de 5 à 6 %.

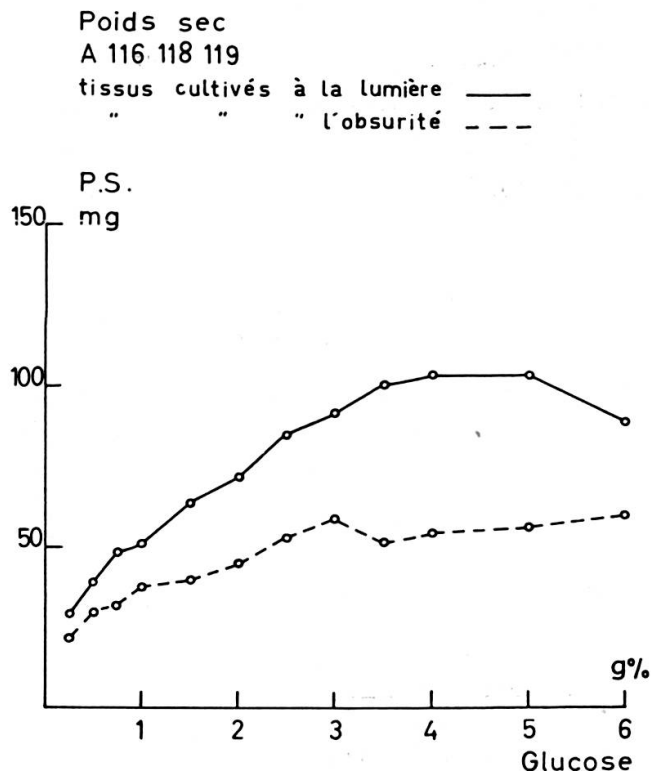


Fig. 7.

Variations de l'accroissement (poids sec) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* pendant 47 ± 2 jours dans des milieux contenant diverses doses de glucose. Moyenne des résultats de trois expériences.

Les résultats ne sont pas exactement superposables mais il ne fait aucun doute que le lumière favorise l'augmentation du poids frais. Il semble que les colonies plus âgées ont un peu régressé puisque le maximum s'élève à 1,5 g pour les colonies de 47 jours et 1,23 pour celles de 60 jours.

Le poids sec varie dans des limites beaucoup plus étroites (voir tableau 2). A la lumière, en fonction de la dose de glucose, il augmente de façon presque exponentielle puis il se stabilise à partir d'une dose de 3,5 % ou augmente même un peu. Il diminue légèrement dans un groupe de trois expériences (A 110, 111, 117; voir fig. 5), mais sans atteindre une valeur inférieure à celle que l'on obtient avec 3 % de glucose. A l'obscurité, ces valeurs montrent aussi une augmentation en fonction de la dose de glucose mais beaucoup plus atténuée. Le poids sec augmente jusqu'à une concentration de 3 % de sucre puis il ne varie plus beaucoup. Ces valeurs restent faibles. Il semble que l'accumulation de matière sèche ne varie pas beaucoup entre des cultures âgées de 47 ou de 60 jours.

Pour ce critère également, on remarque que la production de matière est fortement stimulée par la lumière, surtout aux concentrations élevées de glucose, sans toutefois dépasser un certain niveau. Il semble que l'apport de sucre exogène se manifeste surtout à partir d'une certaine concentration et qu'il agisse en complétant l'autotrophie relative des tissus.

Les quantités d'azote dosées dans les tissus ne semblent pas être très nettement influencées par les doses de sucre fournies. Chez les colonies éclairées on distingue toutefois (voir fig. 3) un maximum pour la valeur de l'azote total à une concentration de 3% de glucose, suivi d'une baisse sensible. Chez ces mêmes tissus on voit que

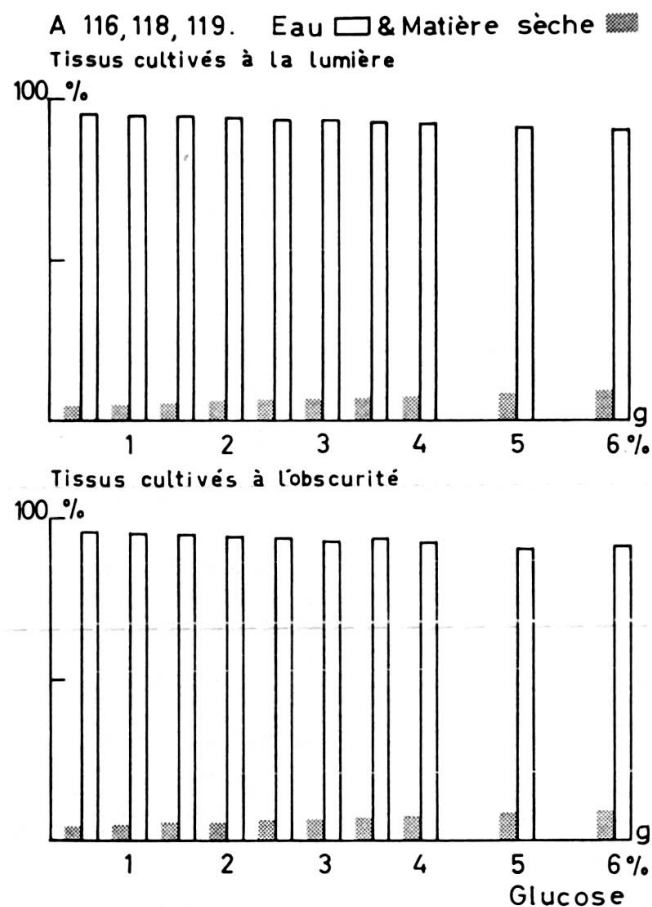


Fig. 8.

Teneur en eau et en matière sèche de tissus de Carotte cultivés *in vitro* pendant 47 ± 2 jours dans des milieux contenant diverses doses de glucose. Moyenne des résultats de trois expériences.

l'azote protéique s'élève un peu puis se stabilise. Les tissus placés à l'obscurité ont une quantité d'azote protéique presque constante, quel que soit l'apport de sucre.

Les quantités d'azote sont nettement plus élevées chez les tissus éclairés que chez ceux qui prolifèrent à l'obscurité.

Part probable de la fonction chlorophyllienne.

Dosage des chlorophylles

Nous avons dosé les chlorophylles a et b des colonies de tissu de Carotte exposées à la lumière, cultivées dans les conditions décrites antérieurement. Nous avons déjà signalé [52] d'une part que le tissu cambial de Carotte élabore de la chlorophylle en quantité appréciable et d'autre part que la quantité de chlorophylle b est importante par rapport à la chlorophylle a. Ces quantités respectives de pigments photosynthétiques sont naturellement faibles par rapport à la masse tissulaire mais elles sont conformes à la nature parenchymateuse des cellules. Il ne semble pas qu'il soit possible d'obtenir des souches encore plus riches en chlorophylle que celles que nous avons utilisées. Par contre, il paraît assez certain que le taux de chlorophylle varie en fonction de l'âge des cultures. En partant de colonies âgées successivement de 47, 96 et 101 jours qui provenaient d'un même repiquage, nous avons

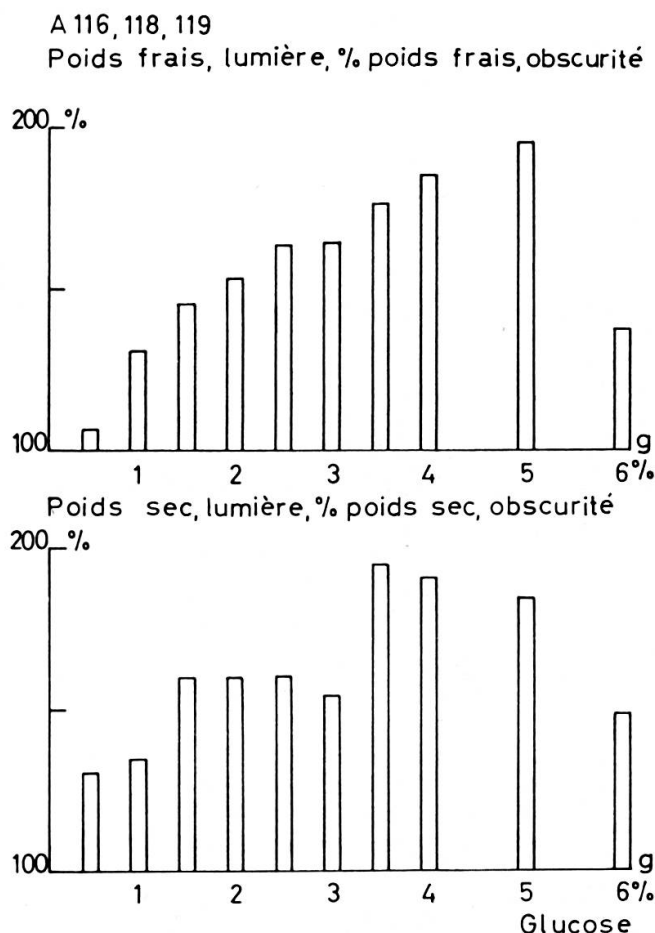


Fig. 9.

Variations de l'accroissement (poids frais et poids sec) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* à la lumière pour 100 g de mêmes tissus cultivés à l'obscurité dans des milieux contenant diverses doses de glucose. Moyenne des résultats de trois expériences.

constaté que les tissus les plus jeunes renfermaient le plus de chlorophylle alors que les tissus plus âgés en contenaient le moins. Cependant ces résultats n'étaient pas exactement comparables à ceux d'autres dosages. Cela indique que les variations entre les prises d'essai sont assez grandes selon les extraits. Ces variations sont dues soit à des pertes qui surviennent lors de l'extraction soit surtout à cause de la variabilité des échantillons eux-mêmes.

TABLEAU 7

Teneur en chlorophylles exprimée en mg/100 g de différents lots de tissus de Carotte

Age en jours .	Extraits provenant d'une même série d'explantats			Extraits provenant d'explantats différents		
	47	91	97	49	96	101
Chy a	1,957	1,597	1,439	2,028	2,615	0,928
Chy b	0,966	0,627	0,703	0,554	1,063	0,454

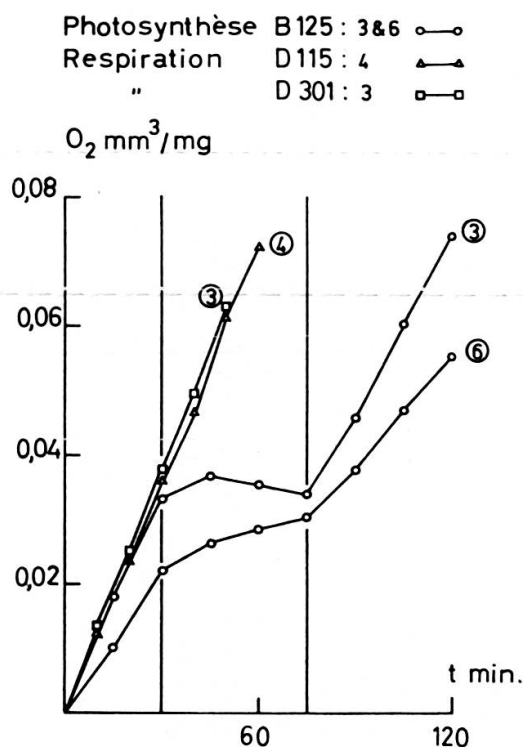


Fig. 10.

Mesure de la photosynthèse : Variations de la consommation d'oxygène par unité de tissus frais de Carotte placés à l'obscurité pendant 30 minutes, à la lumière pendant 45 minutes, puis à l'obscurité pendant 45 minutes.

Mesure de la respiration : Variations de la consommation d'oxygène par unité de tissus frais de Carotte chlorophylliens (triangles) ou étiolés (carrés) maintenus respectivement pendant 60 et 50 minutes à l'obscurité.

Il ressort de la lecture du tableau 7 que les quantités de pigment sont assez variables, mêmes si les extraits correspondent à des tissus qui ont sensiblement le même âge.

Ces dosages nous permettent de considérer la photosynthèse des tissus de Carotte sur la base d'une expression quantitative et non pas simplement en estimant l'intensité de leur couleur.

Mesures de la photosynthèse.

Résultats

De tous les essais que nous avons entrepris, seul quelques résultats suffisamment démonstratifs seront commentés.

Certains mélanges que nous avons faits pour les mesures de photosynthèse semblent avoir été favorables aux tissus, d'autres au contraire, peu ou pas du tout. Les résultats que nous avons comparés entre eux (voir fig. 10), se rapportent tous à des colonies entières plongées dans le milieu de mesure.

Pour les expériences B 110 à 116, nous avons toujours utilisé le mélange tampon d'Emerson et Chalmers ($K_2CO_3 - NaHCO_3$). Nous avons utilisé le tampon de Stauffer sans succès pour deux expériences (B 117 et 118). Dès le début des mesures, nous observions un dégagement gazeux.

Pour l'expérience B 119 nous avons préparé trois solutions différentes. Seul le mélange d'Emerson-Chalmers permettait d'observer une consommation d'oxygène importante. Dans le mélange de Pratt modifié, les colonies manifestaient des échanges très faibles et dans celui de Stauffer on n'observait que de très petites variations manométriques non constantes.

TABLEAU 8

Oxygène dégagé au cours de la photosynthèse

Expérience	O ₂ dégagé ml O ₂ /mg/min.	Respiration O ₂ absorbé ml O ₂ /mg/min.
B 125 n° 3	0,001113	0,00104
B 125 n° 6	0,000595	0,000840
B 125 n° 2	0,000469	0,000526
B 119 n° 9	0,000667	0,000667
B 119 n° 11	0,000795	0,000767
B 116 n° 9	0,000726	0,000616

Les deux expériences suivantes, B 120 et 121 nous ont montré que l'emploi d'un chélateur tel que l'EDTA n'est pas favorable. Le pH du milieu est bien abaissé vers une valeur se rapprochant de celle du milieu de culture, mais les

échanges gazeux sont perturbés. Nous avons observé par exemple dans certains cas une élévation manométrique pendant la période obscure au lieu d'une dépression indiquant une consommation d'oxygène.

Pour les trois dernières expériences, nous avons utilisé uniquement le mélange tampon d'Emerson-Chalmers, dans des proportions qui étaient quelque peu modifiées dans certains cas. Cela nous a permis de faire des mesures tout à fait régulières.

Les variations manométriques des trois premières expériences étaient faibles. Nous avons donc augmenté le volume du liquide dans les fioles et utilisé des colonies entières. Ceci nous a donné de meilleurs résultats. Il nous semblait que la lumière n'était pas assez forte car nous n'observions pas de dégagement gazeux au cours de la phase éclairée. Nous avons fait faire des aménagements à l'appareil dont nous disposions pour obtenir finalement un éclairage d'environ 4760 lux à 20 cm. La dernière expérience B 125 a pu être réalisée dans ces conditions et nous a donné de bons résultats (voir fig. 10).

Au cours de nos dernières expériences nous avons renoncé à modifier les mélanges tampons et nous avons utilisé celui qui nous paraissait le meilleur, bien que son pH

TABLEAU 9

Croissance du tissu cambial de Carotte sur un milieu tamponné à pH élevé. K_2CO_3 — $NaHCO_3$. Expérience A 115

Poids frais		Poids sec		Nombre de colonies
Milieu tamponné	Témoin	Milieu tamponné	Témoin	
0,9346 g	0,8076 g	58,02 mg	59,27 mg	21

soit élevé (8,75). Nous venons de constater, d'après le résultat fourni par l'expérience A 115, qu'un milieu alcalin n'avait pas d'effet néfaste sur la croissance des tissus (voir tableau 9).

La figure 10 indique les variations d'oxygène rapportées à chaque colonie. On constate que la consommation d'oxygène est très inégale d'une colonie à l'autre. Au cours de la période éclairée, les tissus ne parviennent que faiblement à dégager de l'oxygène. On observe par contre, au cours de cette période, une atténuation très sensible de la respiration. Cependant dans un cas on voit que cette dernière est maintenue au point de compensation. Ces indications, quoique d'une faible importance sur le plan énergétique, sont cependant utiles sur le plan fonctionnel. On constate que la consommation d'oxygène est fortement abaissée pendant la période d'illumination, ce qui permet aux tissus, sinon d'effectuer une synthèse réelle, du moins de diminuer leur hétérotrophie. Les mécanismes biochimiques de la photo-

synthèse sont possibles; ils se manifestent faiblement au cours de la période d'illumination et on peut affirmer que ce processus favorise le développement des colonies lorsqu'elles sont cultivées à la lumière.

Respiration des tissus

En vue de contrôler si la respiration s'effectuait normalement, nous avons mesuré la consommation d'oxygène dans les conditions habituelles de mesure, c'est-à-dire dans un milieu contenant un tampon phosphate. Nous n'avons pas suivi l'évolution de la respiration en fonction du développement des tissus, mais nous l'avons comparée à celle que l'on obtient lors de la mesure de la photosynthèse au cours des périodes obscures.

Nous avons utilisé des colonies d'une souche de tissu cambial de Carotte chlorophyllienne et ceux d'une souche étiolée. L'examen de la figure 10 montre que la respiration de ces deux tissus est identique et que de plus, la consommation d'oxygène effectuée par les tissus chlorophylliens placés dans le mélange carbonate-bicarbonate est très comparable. D'autre part, les valeurs que nous avons obtenues correspondent au même ordre de grandeur que celles qui sont données pour d'autres tissus.

Conclusion

L'action de la lumière sur les tissus verts de Carotte se manifeste par une diminution de l'absorption d'oxygène, c'est-à-dire que dans le bilan nutritif, les synthèses ne sont pas suffisantes pour égaler les besoins. Cependant la photosynthèse est mesurable et s'exprime donc normalement. La consommation d'oxygène obtenue dans un mélange tampon carbonate-bicarbonate paraît tout à fait normale lorsqu'on la compare à celle que l'on obtient dans les conditions de mesure différentes et adaptées spécialement à la respiration des cellules (tampon phosphate). La critique que l'on ne peut manquer de faire à l'égard des mesures que nous avons décrites réside dans le fait que la diffusion des gaz dans les tissus complique l'interprétation des résultats tant de l'intensité respiratoire que de la photosynthèse.

Nous considérons la colonie dans son ensemble formant pas conséquent une unité physiologique qui se comporte comme telle et dont nous étudions les réactions globalement.

Si l'expression de l'intensité respiratoire paraît ne pas être le reflet exact des phénomènes pris sous l'angle physico-chimique, elle n'en reste pas moins celle d'une réalité physiologique concernant l'ensemble de la masse tissulaire considérée. Si la mesure des échanges gazeux ne semble être que globale, on peut supposer que ces derniers s'expriment de la même façon dans les conditions de culture. Les échanges gazeux doivent être probablement plus rapides et plus complets à la périphérie qu'au centre de la colonie. Après avoir remarqué une faible différence d'intensité respiratoire entre les tissus coupés en tranches et les colonies entières, nous avons préféré utiliser ces dernières comme étant des unités intactes. Nous pensons que si

dans quelques cas les tranches de tissus manifestent une intensité respiratoire plus élevée que des colonies entières, il peut s'agir d'un phénomène extra-physiologique dû au traumatisme.

Rôle du milieu alcalin utilisé pour la mesure de la photosynthèse sur les tissus de Carotte.

Il n'était pas possible de savoir si le mélange tampon utilisé pour les mesures de photosynthèse avait un effet néfaste sur les tissus, sans cultiver ces derniers sur un milieu de culture à pH élevé. Ce que l'on peut dire a priori, dans le cas des mesures manométriques, c'est que les tissus passent brusquement d'un tube de culture dont le milieu a un pH d'environ 6 dans une fiole de Warburg dont le pH est plus grand que 8 et que ces manipulations peuvent causer un certain choc physiologique.

Nous avons donc réalisé l'expérience décrite précédemment (A 115), et nous faisons parallèlement des mesures à l'appareil de Warburg en choisissant les différentes solutions décrites.

L'expérience A 115 nous a donné les résultats suivants: Les colonies de tissu cambial de Carotte ont été cultivées sur un milieu tamponné (2,5 mMole de K/1 et 9,75 mMole de Na/1). Les valeurs de pH ont été mesurées avant et après l'expérience (voir tableau 10). Les explantats ont été laissés pendant 39 jour à la lumière solaire diffuse, sur ce milieu et ils y avaient très bien proliféré. Tout au plus pouvait-on remarquer que les cellules qui avaient été au contact du milieu s'étaient nécrosées un peu plus tôt et en plus grand nombre que celles des tissus témoins. Les valeurs du poids frais et du poids sec sont très voisines de ce qu'elles sont lorsque les tissus sont cultivés sur un milieu habituel. Le poids frais est un peu plus élevé que celui des témoins. Les valeurs du pH qui sont présentées dans le tableau 10 permettent de voir que l'effet tampon de la solution que nous avons utilisée n'est pas très marqué. Gautheret [18] avait remarqué que les tissus sont capables d'abaisser ou d'augmenter le pH du milieu sur lequel ils se trouvent et de tendre ainsi à le ramener près de la

TABLEAU 10

Expérience A 115. Croissance du tissu cambial de Carotte sur un milieu alcalin

Valeur de pH

	Avant stérilisation	Après stérilisation	Expérience	Témoin
Mélange tampon $K_2CO_3 - NaHCO_3$	8,74	9,10		
Milieu de culture	5,18	5,10 à 25° C		6,61 à 48° C 6,32 à 24° C
Milieu + mélange tampon	—	8,67 à 34° C	7,80 à 40° C 7,45 à 24° C	

valeur normale. En effet, le pH du milieu passe de 8,67 à 7,80 en fin de culture. Cette valeur est cependant plus élevée que celle du milieu témoin qui passe de 5,10 à 6,61. Les tissus ont donc été cultivés entièrement en milieu alcalin et cela permet de dire que si ce milieu n'était pas adapté aux colonies tissulaires de Carotte, il n'empêchait

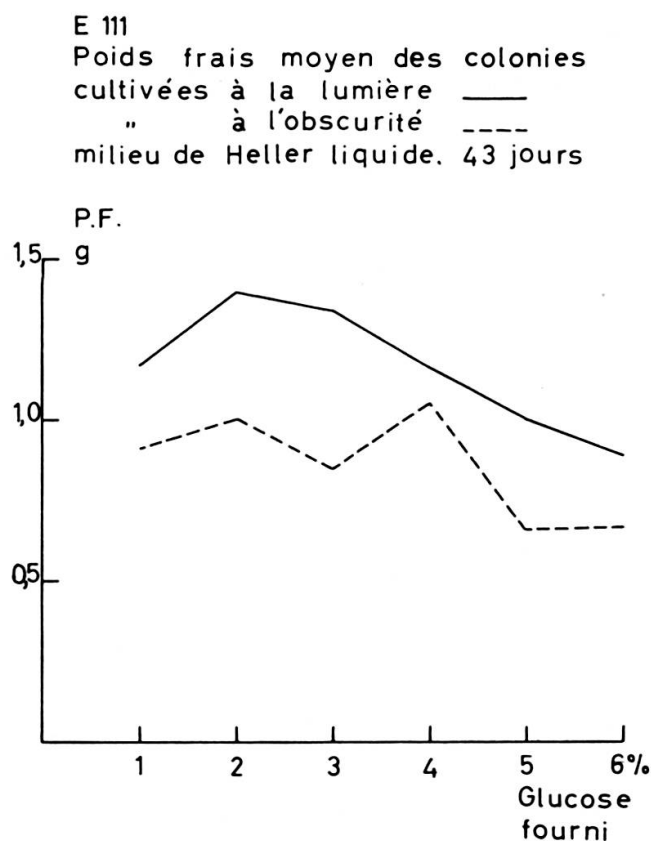


Fig. 11.

Variations de l'accroissement (poids frais) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* sur un milieu liquide en présence de diverses doses de glucose. Tissus et milieux ont servi à effectuer des dosages glucidiques.

absolument pas la prolifération. Bien que la composition du mélange-tampon utilisé dans cette expérience ne fût pas exactement la même que celle des mélanges proposés pour la mesure de la photosynthèse, nous pensons que les effets que nous avons obtenus peuvent être généralisés.

Absorption du glucose par les tissus et composition en glucides solubles de ces derniers.

Le calcul du glucose consommé par les tissus a été effectué par différence entre le glucose offert à chaque colonie et le glucose dosé dans le milieu de culture à la fin de l'expérience (E 111).

La courbe de croissance donnée par le poids frais ne présente pas un maximum à 3% de glucose mais à 2% (fig. 11). Pour 6% de glucose, le poids frais est plus faible



que pour 1 %, tant chez les tissus cultivés à la lumière que pour ceux qui sont maintenus à l'obscurité. Ces résultats sont donc un peu différents de la moyenne.

TABLEAU 11

Glucose consommé par colonie tissulaire de Carotte en fonction du glucose offert

Concentration de sucre dans le milieu %	Sucre consommé pour 100 g de sucre offert	
	Tissus cultivés à la lumière %	Tissus cultivés à l'obscurité %
1	23,60	17,00
2	27,50	18,00
3	21,87	12,40
4	18,80	12,40
5	17,44	8,00
6	15,20	8,00

E 111

Glucose absorbé par colonie tissulaire après 43 jours de culture
à la lumière 
à l'obscurité 

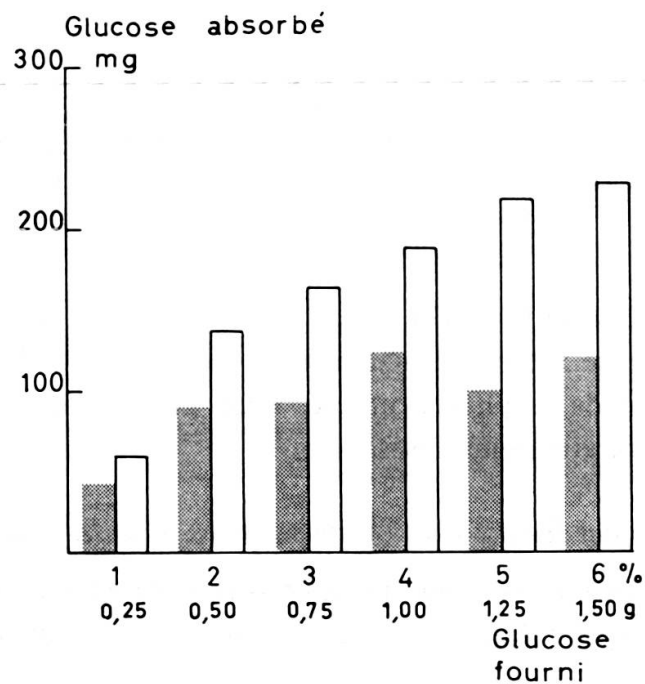


Fig. 12.

Glucose absorbé par colonie tissulaire de Carotte cultivée en présence de diverses doses de glucose après 43 jours de culture, à la lumière et à l'obscurité.

Nous avons constaté que les colonies placées à l'obscurité consommaient moins de glucose que celles qui étaient exposées à la lumière (voir fig. 12). Cela n'avait rien d'étonnant puisque les premières ont un poids plus faible que les secondes. Plus la concentration de sucre offert s'élève, plus la consommation augmente. Ce qui nous paraît plus important encore réside dans la comparaison entre le glucose consommé

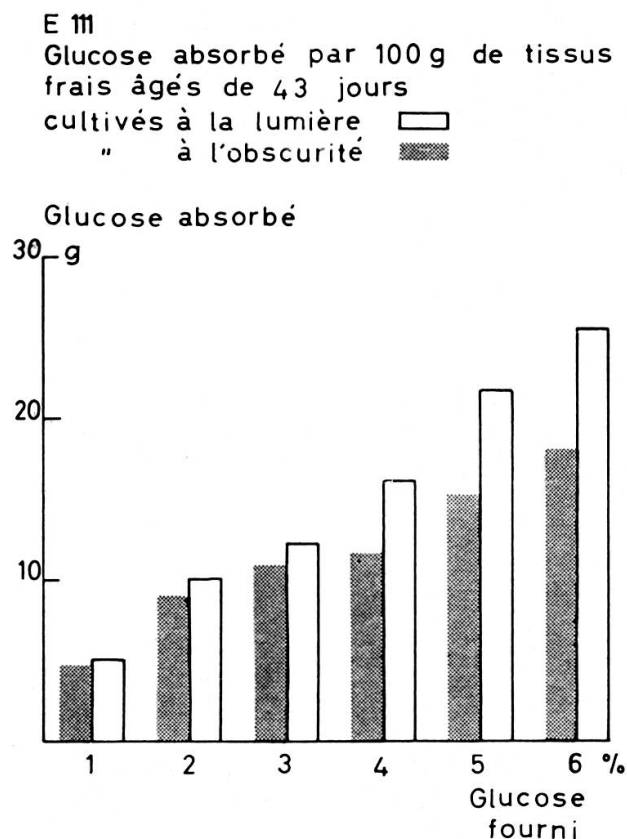


Fig. 13.

Glucose absorbé par unité de poids de tissus frais de Carotte cultivés en présence de diverses doses de glucose.

à la lumière pour 100 g de matière fraîche et le glucose consommé à l'obscurité pour la même unité de poids frais. On voit en effet (fig. 13), que la consommation relative n'est pas la même dans ces deux conditions. Il semble par conséquent que la lumière favorise l'absorption du glucose, ce qui se traduit par une augmentation du poids frais des tissus.

D'autre part on voit que les tissus ont consommé au maximum moins de 25% du glucose fourni à la concentration de 1 g % et 15% si les tissus étaient cultivés en présence de 6 g % de sucre (voir tableau 11).

Le quotient de consommation de glucose (voir tableau 12) diminue en fonction du sucre offert. Cela fait apparaître que l'écart entre le sucre consommé à la lumière et celui qui est consommé à l'obscurité augmente progressivement (voir fig. 12, 13).

Bien que les tissus fussent placés dans des conditions d'éclairage différentes,

TABLEAU 12

Quotient de consommation de glucose

Glucose consommé à l'obscurité / 100 g de tissus frais	
Glucose consommé à la lumière / 100 g de tissus frais	
Concentration de glucose dans le milieu g%	Quotient
1	0,93
2	0,88
3	0,89
4	0,73
5	0,70
6	0,70
Glucose consommé à l'obscurité par colonie	
Glucose consommé à la lumière par colonie	
Concentration de glucose dans le milieu g%	Quotient
1	0,72
2	0,65
3	0,57
4	0,66
5	0,46
6	0,52

nous supposons que leur consommation de glucose serait assez silmiaire. Nous pensions, en effet, que la photosynthèse pouvait être à elle seule responsable de l'augmentation du poids des tissus cultivés à la lumière. Or il semble donc que la lumière favorise l'absorption du glucose, ce qui se traduit par un accroissement pondéral des colonies.

Les dosages des glucides intratissulaires nous ont permis de confirmer en partie ce que l'on savait déjà à ce propos. Nous avons trouvé davantage de sucre totaux chez les tissus éclairés que chez ceux qui étaient placés à l'obscurité. Chez les tissus cultivés à la lumière, aux faibles concentrations de glucose fourni il y a plus de saccharose que de glucose et inversement aux fortes doses. Par contre, chez les tissus maintenus à l'obscurité il y a toujours davantage de glucose que de saccharose (voir fig. 14, 16, 17).

Contrairement à ce que Goris avait obtenu [26], nous avons trouvé une quantité de glucose assez semblable chez les tissus placés dans les deux conditions.

Le fructose est toujours très faible et n'a même pas pu être dosé à partir des tissus qui ont reçu peu de glucose. Il y en a un peu plus chez les colonies éclairées que chez celles qui sont placées à l'obscurité. Cela confirme les constatations de Goris [25].

Les quantités de sucre intratissulaires augmentent en fonction de la dose de glucose présente dans le milieu. A l'obscurité, il semble que cette quantité se stabilise à partir d'une concentration de glucose offerte de 4%. A la lumière, il semble plutôt que les sucres continuent à s'accumuler, ceci est particulièrement net pour le saccharose.

On remarque qu'il existe une relation entre le glucose consommé et les glucides solubles accumulés. Il semble que la lumière associée à une forte concentration de glucose favorise l'absorption de ce sucre par les colonies ainsi que l'accumulation intratissulaire des sucres totaux.

Lorsqu'on compare le quotient de sucre absorbé au quotient des sucres accumulés on constate qu'il n'est pas le même. Cela montre que la proportion de glucose absorbé est plus grande que celle des sucres accumulés. En d'autres termes, il semble que la

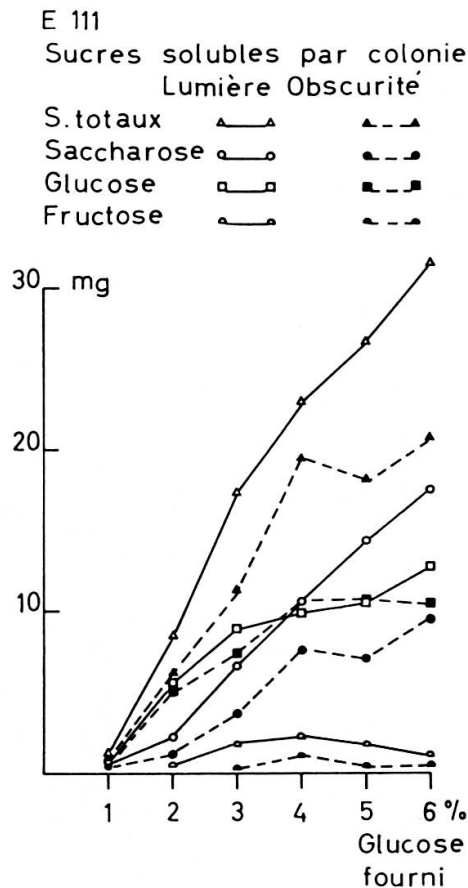


Fig. 14.

Variations des sucres solubles extraits de tissus de Carotte cultivés *in vitro* en présence de diverses doses de glucose à la lumière et à l'obscurité.



TABLEAU 13

Quotient des sucres accumulés

Glucose fourni g %	$\frac{\text{Sucres stockés à l'obscurité/100 g de tissus frais}}{\text{Sucres stockés à la lumière/100 g de tissus frais}}$
1	0,465
2	0,829
3	0,695
4	0,572
5	0,636
6	0,464

Glucose fourni g %	$\frac{\text{Sucres stockés à l'obscurité/colonie}}{\text{Sucres stockés à la lumière/colonie}}$
1	0,656
2	0,737
3	0,657
4	0,852
5	0,683
6	0,657

E 111

Sucres totaux par colonie
 âgée de 43 jours
 cultivée à la lumière 
 " à l'obscurité 

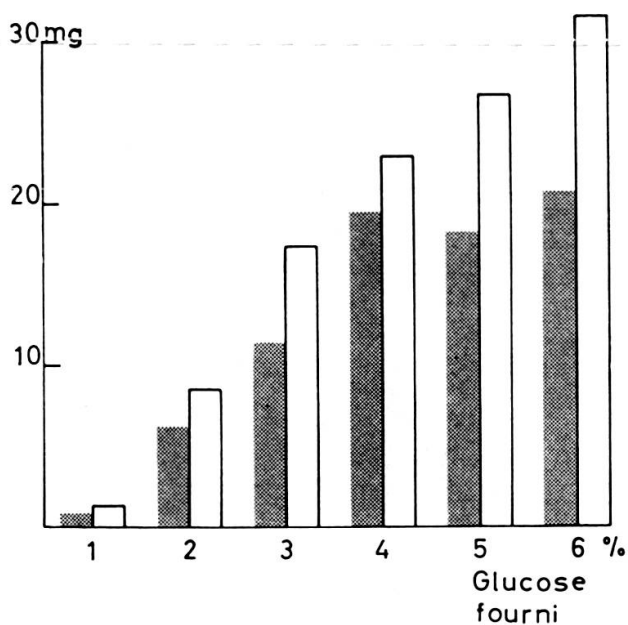


Fig. 15.

Teneur en sucres totaux par colonie tissulaire de Carotte cultivée en présence de diverses doses de glucose.

lumière favorise davantage l'absorption du glucose que son stockage, donc qu'une plus grande quantité de glucose est utilisée pour des synthèses. Cela permet de dire que la lumière stimule la croissance et non pas seulement la pénétration de la solution nutritive.

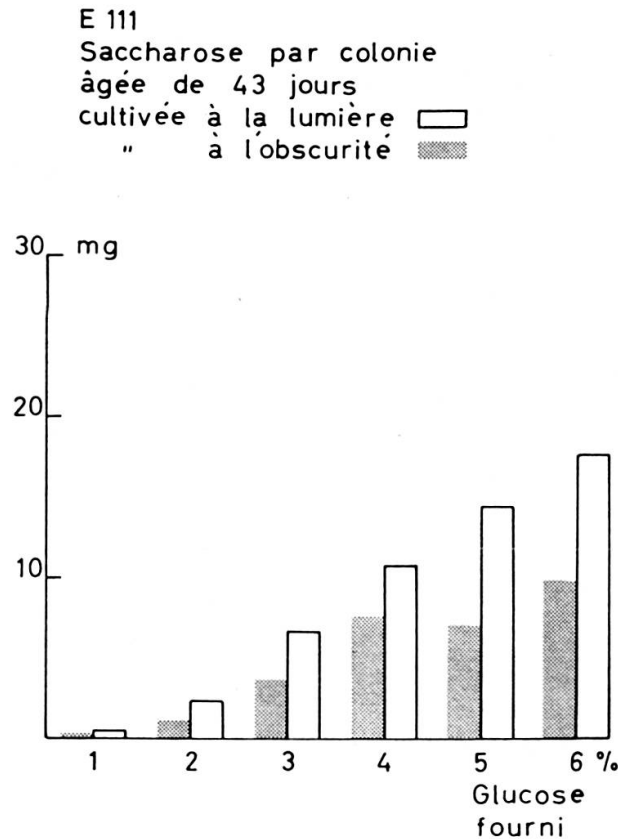


Fig. 16.

Teneur en saccharose par colonie tissulaire de Carotte cultivée *in vitro* en présence de diverses doses de glucose.

B) SOUCHE DE TISSUS DE CROWN-GALL DE SCORSONÈRE

Variabilité des résultats



Les tissus de Crown-gall de Scorsonère ne verdissent pas de façon nette à la lumière. Par contre ils sont un peu subérifiés alors que ceux du tissu cambial de Carotte ne le sont pas.

Les résultats que nous avons obtenus ont été très irréguliers. Nous attribuons cela à deux causes. Tout d'abord le poids moyen des explantats initiaux était assez faible: 129,5 mg. Or la reprise des fragments est d'autant plus précaire que les fragments sont petits [Duhamet 12]. D'autre part, la souche de tissu de Crown-gall de Scorsonère, si elle peut proliférer abondamment et sans auxine, est quelquefois difficile à obtenir sous forme de colonies toutes semblables. Ces tissus présentent une

TABLEAU 14

Croissance des colonies de Crown-gall de Scorsonère
Poids sec exprimé en pour-cent du poids frais

Glucose fourni g %	Exp. A 210		Exp. A 211		Exp. A 212		Exp. A 214	
	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité
1	5,12	4,70	7,36	11,50	6,47	8,00	5,12	5,28
1,5	5,48	6,55	8,17	8,93	8,17	9,74	—	—
2	6,14	6,42	7,97	8,52	9,88	7,64	5,29	5,36
2,5	6,91	6,60	7,08	9,25	9,88	11,08	5,74	5,75
3	6,91	6,69	9,67	9,01	9,07	10,55	6,59	6,39
3,5	8,65	8,76	10,24	10,71	12,78	15,08	6,99	7,44
4	10,16	8,91	9,93	10,36	13,95	11,64	7,83	8,59
4,5	9,42	9,57	10,74	13,56	16,57	16,39	8,66	9,67
5	9,72	9,03	14,12	13,68	13,01	13,05	9,66	10,06
5,5	11,46	9,92	13,80	17,24	18,54	16,17	10,62	10,97
6	11,84	11,94	14,83	16,98	15,06	13,55	11,50	11,84
6,5	—	—	16,16	19,54	20,64	18,11	—	—

E 111
Glucose par colonie
âgée de 43 jours
cultivée à la lumière 
" à l'obscurité 

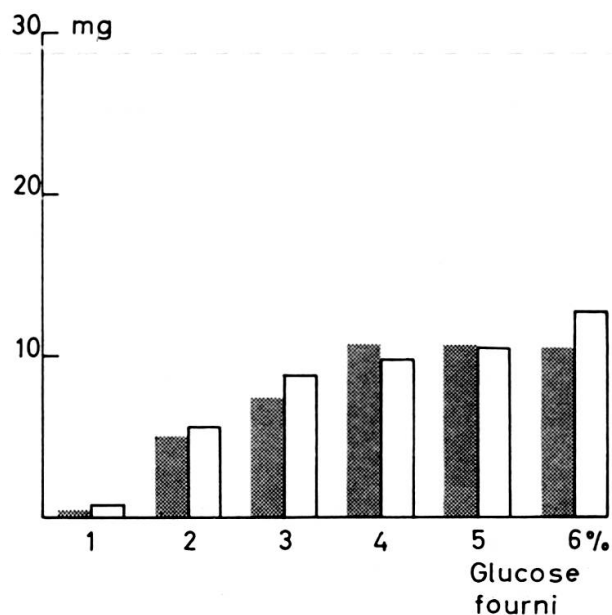


Fig. 17.

Teneur en glucose par colonie tissulaire de Carotte cultivée *in vitro* en présence de diverses doses de glucose.

texture assez serrée mais comme par ailleurs ils s'accroissent assez vite et dans toutes les directions, on trouve au centre des colonies, des régions un peu moins hydratées ou des sortes de cavernes faites d'un parenchyme plus ou moins spongieux qui paraît avoir une bonne vitalité au premier abord mais qui, en fait, ne prolifère pas ou mal. Les parties périphériques sont beaucoup plus fermes mais il n'est pas facile d'en

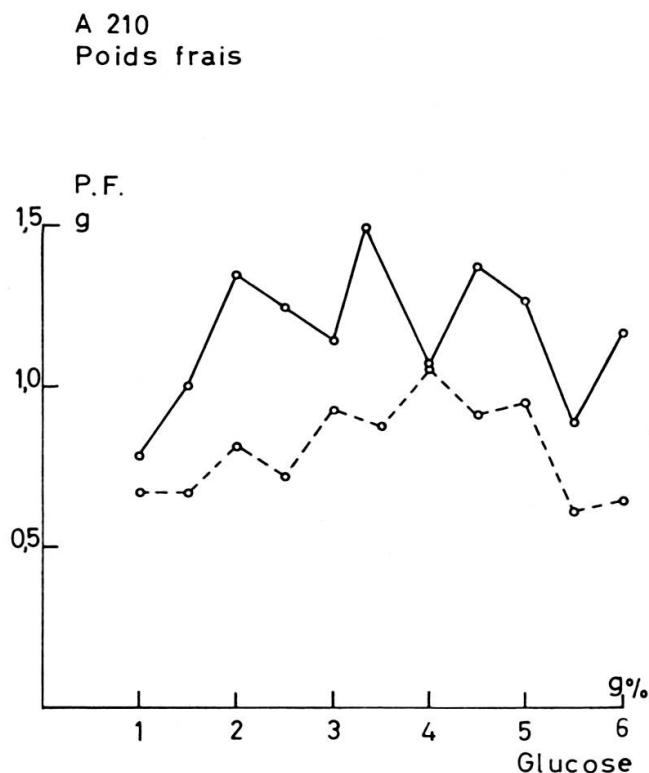


Fig. 18.

Variations de l'accroissement (poids frais) de tissus de Crown-gall de Scorsonère cultivés *in vitro* dans des milieux contenant diverses doses de glucose.
 Courbe en trait plein: culture réalisée à la lumière.
 Courbe en tirets: culture réalisée à l'obscurité.

faire des explantats de forme régulière. Ces réserves étant faites, on comprend mieux pourquoi des résultats quantitatifs sont difficiles à obtenir avec régularité si l'on utilise une souche de Crown-gall de Scorsonère.

Rôle de la concentration du sucre offert sur la teneur en eau et le poids sec

D'une manière générale, on observe une augmentation du poids frais et du poids sec en fonction de la dose de glucose.

La teneur en eau relative diminue (aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité). (voir tableau 15).

La matière sèche augmente en fonction de la dose de glucose mais pas de façon très régulière. (voir tableau 14).

Rôle de la lumière et rôles complémentaires sur la croissance des tissus

Dans un premier essai (A 210), nous avons remarqué que le poids frais moyen du groupe d'explantats correspondant à une dose de glucose était très variable d'une dose à l'autre. Ce qui nous a paru le plus remarquable, c'est que les valeurs du poids frais, du poids sec et de l'azote des tissus cultivés à la lumière étaient généralement plus élevées que celles des tissus maintenus à l'obscurité (voir fig. 18, 19, 20) Nous avons alors répété cette expérience dans le but de confirmer ces premiers résultats et surtout pour essayer d'obtenir des valeurs plus régulières.

Dans une deuxième expérience (A 211), nous avons ajouté au milieu de culture de l'auxine (ABIA 10^{-8}). Le poids frais et le poids sec étaient légèrement plus élevés que dans l'expérience précédente. Comme dans l'expérience précédente, les tissus qui ont proliféré à la lumière ont une croissance plus élevée que ceux qui ont été maintenus à l'obscurité. L'écart paraît même plus important dans ce cas.

A 210
Poids sec

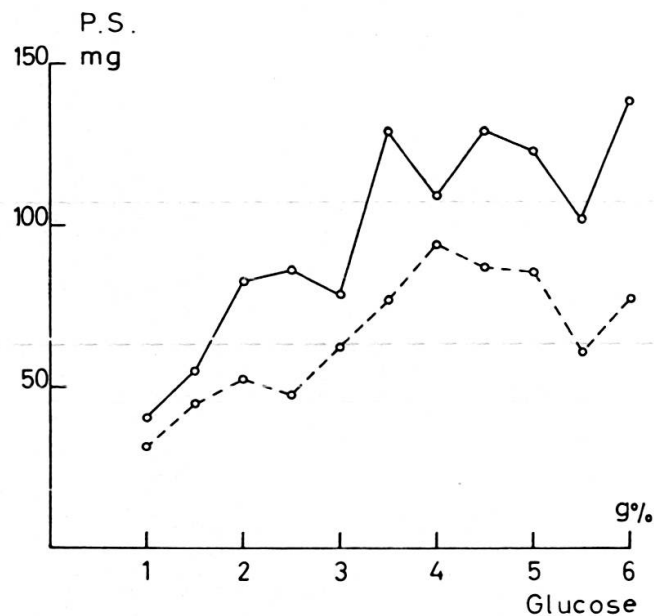


Fig. 19.

Variations de l'accroissement (poids sec) de tissus de Crown-gall de Scorsonère cultivés *in vitro* dans des milieux contenant diverses doses de glucose.

Courbe en trait plein: culture réalisée à la lumière.

Courbe en tirets: culture réalisée à l'obscurité.

Le poids frais montre un maximum pour 4% de glucose. Le poids sec augmente assez régulièrement à la lumière jusqu'à la plus forte concentration de glucose. A l'obscurité, cette valeur tend à diminuer un peu.

La troisième et la quatrième expérience (A 212 et 214) ont été réalisées en cultivant les explantats sur un milieu sans auxine. Ainsi que nous l'avons déjà remarqué, le

TABLEAU 15

Croissance des colonies de Crown-gall de Scorsonère
Teneur en eau des tissus
Exp. A 210

Glucose fourni g %	Tissus cultivés à la lumière		Tissus cultivés à l'obscurité	
	g/colonie	%	g/colonie	%
1	0,744	9,48	0,640	9,52
1,5	0,947	9,45	0,627	9,33
2	1,261	9,38	0,762	9,35
2,5	1,159	9,31	0,674	9,33
3	1,061	9,31	0,868	9,33
3,5	1,365	9,13	0,799	9,12
4	0,962	8,98	0,962	9,11
4,5	1,243	9,06	0,823	9,04
5	1,142	9,03	0,861	9,10
5,5	0,786	8,85	0,549	9,00
6	1,030	8,81	0,569	8,81

A 210

Azote par colonie

cultivée à la lumière : N₂ total ○—○, N₂ prot. ▲—▲

" " l'obscurité : N₂ " ●—●, N₂ " ▲—▲

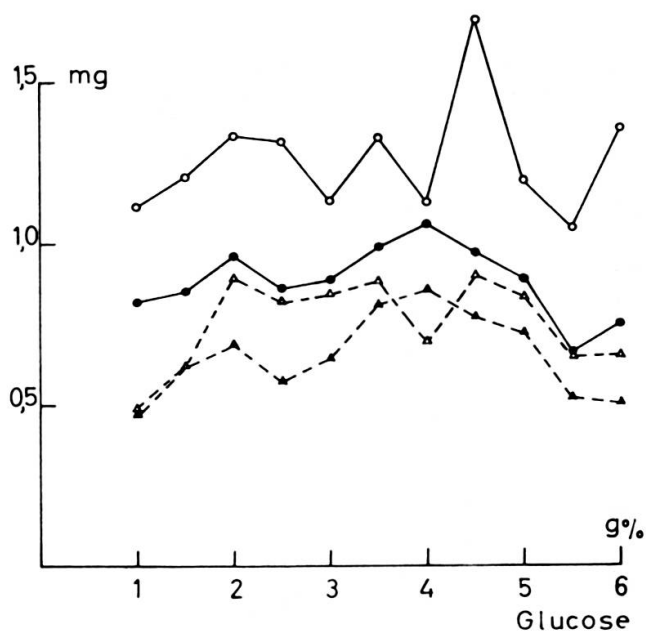


Fig. 20.

Variations de la teneur en azote de tissus de Crown-gall de Scorsonère cultivés *in vitro* dans un milieu contenant diverses doses de glucose.

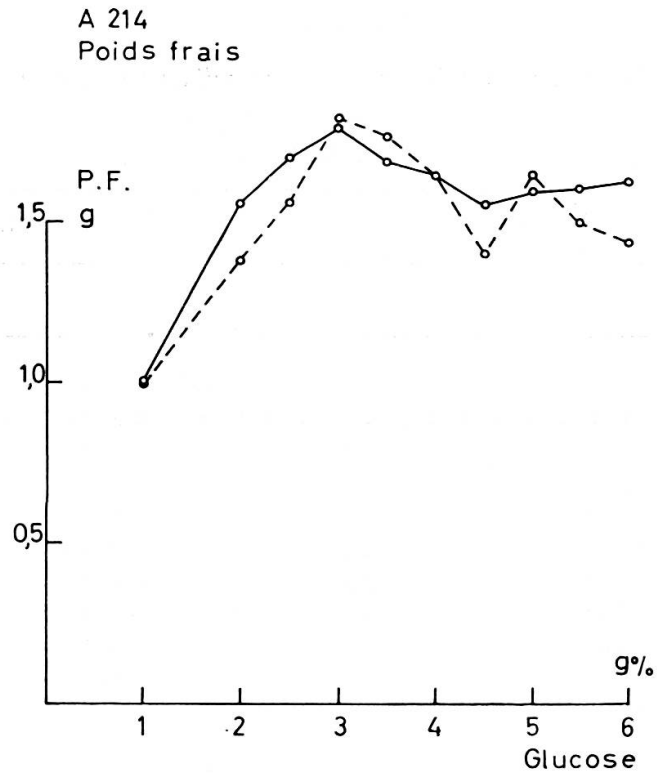


Fig. 21.

Variations de l'accroissement (poids frais) de tissus de Crown-gall de Scorsonère cultivés *in vitro* dans un milieu contenant diverses doses de glucose.

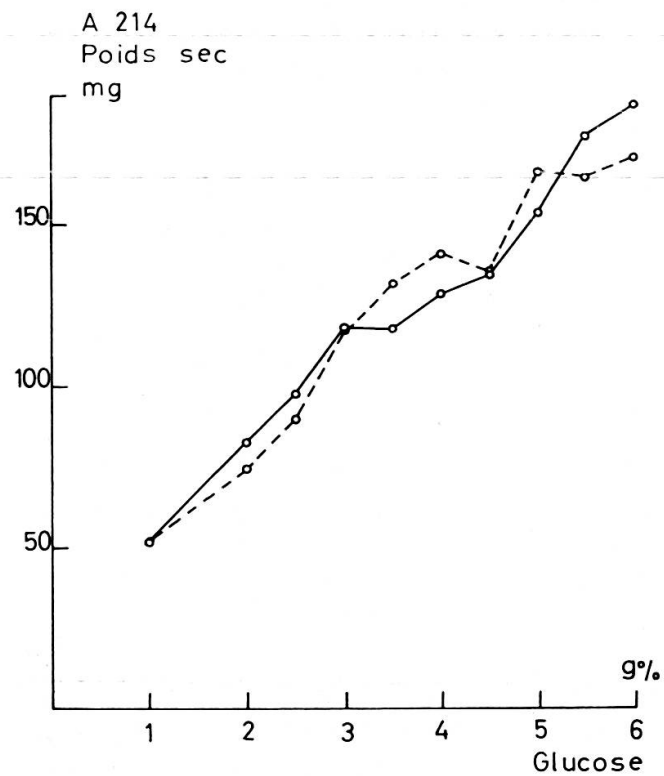


Fig. 22.

Variations de l'accroissement (poids sec) de tissus de Crown-gall de Scorsonère cultivés *in vitro* dans un milieu contenant diverses doses de glucose.

poids frais et le poids sec des tissus cultivés à la lumière est plus élevé que celui des tissus maintenus à l'obscurité. La forme de chaque courbe de croissance n'est pas régulière. Pour les tissus cultivés à la lumière, on voit que le poids frais passe par un maximum pour 3 % de glucose, et le poids sec pour 4 %. Les tissus cultivés à l'obscurité n'ont pas un maximum net pour les deux critères envisagés.

La dernière expérience (A 214) présente une particularité intéressante, qui diffère des trois premières (voir fig. 21 et 22). Le poids frais a un maximum pour 3 % de glucose. Les valeurs diminuent un peu aux fortes doses sans descendre au-dessous de celles que l'on obtient pour 2 %. Le poids sec ne cesse d'augmenter régulièrement. On ne distingue pratiquement pas de différence entre ces valeurs, que les tissus soient cultivés à l'obscurité ou non. Ceci est donc en contradiction avec les premiers résultats. Tout se passe comme si la lumière n'avait pas influencé la croissance. Ces résultats sont conformes à ceux que l'on pouvait attendre d'un tissu non chlorophyllien. Dans ce cas, comme dans celui des tissus de Carotte étudiés par Goris, il semble que la lumière, en l'absence de chlorophylle, n'ait pas d'action sur la croissance.

C) SOUCHE CAROTÉNOGÈNE DE TISSU CAMBIAL DE CAROTTE

Rôle de la lumière

La croissance de ces tissus a été comparée à celle des tissus chlorophylliens. Les premières données ont trait à des colonies d'âges différents mais elles nous ont permis de remarquer que la prolifération était très différente d'une souche à l'autre. Les colonies oranges âgées de 77 jours avaient un poids frais assez voisin de celui des colonies vertes cultivées à la lumière, âgées seulement de 57 jours. Nous pouvions déjà dire que la souche chlorophyllienne avait une « avance » de 20 jours sur la souche orange, lorsque ces tissus étaient cultivés à la lumière.

Cette première constatation nous a montré que l'effet de la lumière ne se manifeste pas de façon semblable sur ces deux types de colonies. Les colonies oranges avaient une croissance évaluée en poids frais qui était beaucoup plus faible que celle des colonies vertes.

Nous avons alors réalisé une seconde expérience limitée à trois conditions expérimentales pour chaque tissu. Cette restriction était due au fait que nous avons signalé, à savoir qu'il était difficile d'obtenir des colonies oranges en bon état, et en nombre suffisant pour les découper en explantats réguliers.

La lumière semble agir sur les deux tissus différents dans le même sens, mais dans des proportions très différentes. La souche chlorophyllienne a un accroissement de poids frais et de poids sec plus élevé à la lumière qu'à l'obscurité, ainsi que nous l'avons indiqué auparavant. La souche caroténogène présente deux valeurs de poids frais qui sont plus grandes à la lumière qu'à l'obscurité. Cependant l'écart est minime et il paraît peu indiqué d'en tirer des conclusions très catégoriques. Toutefois, en

admettant cette différence entre la condition éclairée et la condition obscure, et contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, la souche caroténogène présente, tout en étant très atténué, le même phénomène que la souche chlorophyllienne, alors qu'elle ne possède pas de chlorophylle. On est donc tenté, dans ce cas, de supposer qu'une action de la lumière s'exerce indépendamment de la photosynthèse.

Rôles complémentaires de la lumière et du glucose fourni

Les colonies vertes présentent les caractéristiques que nous avons indiquées précédemment. Elles ont un optimum de croissance en fonction de la dose de sucre fourni. Cet optimum correspond à 3% de glucose. La souche orange présente, elle aussi, un optimum en fonction du sucre. Donc en ce qui concerne l'utilisation du

TABLEAU 16

Croissance comparée de colonies tissulaires de Carotte chlorophylliennes et caroténogènes âgées de 58 jours

Exp. A 310

Glucose fourni en g %	Souche chlorophyllienne		Souche caroténogène	
	Tissus cultivés à la lumière	Tissus cultivés à l'obscurité	Tissus cultivés à la lumière	Tissus cultivés à l'obscurité
<i>Poids frais par colonie exprimé en grammes</i>				
3	2,177	0,630	1,055	0,775
5	1,692	0,747	0,880	0,762
6	1,122	0,485	0,480	0,473
<i>Poids sec par colonie exprimé en grammes</i>				
3	0,117	0,041	0,075	0,055
5	0,143	0,059	0,080	0,068
6	0,094	0,043	0,044	0,046
<i>Poids sec en pour-cent du poids frais</i>				
3	5,37	6,51	7,12	7,08
5	8,47	7,90	9,09	8,94
6	8,38	8,97	9,17	9,72

glucose, bien que nous n'ayons pu entreprendre cette expérience qu'en présence de trois concentrations de ce sucre, les deux souches ont un comportement assez semblable.

Pour les deux types de tissus, la teneur en matière sèche s'élève lorsque la concentration de glucose est plus forte.

Enfin, on remarque que les valeurs du poids sec exprimées en % du poids frais sont plus élevées chez les tissus oranges que chez les tissus verts. D'autre part, la valeur du poids frais des tissus oranges cultivés à la lumière pour 100 g de tissus cultivés à l'obscurité est plus faible que la même valeur donnée par les tissus chlorophylliens. (Voir tableau 16). Le poids sec montre une différence dans le même sens. Pour les tissus oranges, ces valeurs relatives permettent de mieux voir que les tissus éclairés ont un poids légèrement plus élevé que celui des colonies placées à l'obscurité.

D. ANNEXE 1.

Etude des caroténoïdes de deux souches tissulaires de Carotte

Nous utilisons des colonies « vertes » et « oranges » de tissu cambial de carotte, pour nos expériences. Nous avons fait des extractions de pigments à partir de ces deux tissus différents et procédé à des analyses chromatographiques. Nous avons déjà indiqué la teneur en chlorophylle des tissus verts (voir p. 50). La teneur en caroténoïdes des deux sortes de tissus de Carotte nous a donné des résultats complémentaires. Ces travaux ont été entrepris en collaboration avec G. Turian [53].

Caroténoïdes des tissus chlorophylliens

Nous avons identifié les xanthophylles ainsi que l' α -carotène et le β -carotène (voir tableau 17). Les colonies âgées ont un taux de pigments plus élevé que les colonies jeunes. Les xanthophylles, qui dans ces dernières se trouvent en quantités plus faibles que les carotènes, dépassent très rapidement la teneur de ceux-ci dans les colonies plus âgées. L'évolution du taux de ces pigments au cours du développement des colonies, n'est donc pas parallèle.

TABLEAU 17

Teneur en carotènes et xanthophylles des tissus de Carotte exprimée en mg/100 g de poids frais

Caroténoïdes	Souche verte 1		Souche orange 2		Racine de Carotte potagère —
	49 jours	97 jours	67 jours	75 jours	
Carotènes totaux	0,165	0,126	1,400	1,665	8,247
Xanthophylles totales	0,180	0,151	0,254	0,174	0,163
α -carotène	—	—	0,319	0,309	0,652
β -carotène	0,165	0,126	1,081	1,046	7,595
Rapport xanthophylles/ carotènes	1,08	1,20	0,181	0,11	0,02

¹ Les résultats concernant la souche verte se rapportent à la même série d'explantats.

² Les résultats concernant la souche orange se rapportent à deux séries différentes d'explantats.

Les xanthophylles ont été dosées après hydrolyse, donc globalement. Nous n'avons pas cherché à distinguer les xanthophylles libres des éventuelles xanthophylles estérifiées que peuvent contenir les tissus.

Caroténoïdes des tissus caroténogènes. (Souche Eichenberger).

La principale caractéristique de la souche utilisée est l'absence de chlorophylles. Aucune analyse n'a permis de révéler ces pigments. Par contre les tissus considérés synthétisent abondamment des caroténoïdes.¹ La fraction principale est représentée par les carotènes. Les xanthophylles, toujours présentes, s'y trouvent en quantité importante (9,5-15,4% des caroténoïdes totaux). Les tissus oranges possèdent 5 à 6 fois moins de carotènes que la racine de Carotte potagère, mais ils contiennent par contre une quantité analogue de xanthophylles.

Conclusion

Les colonies vertes de tissu de Carotte ont un rapport xanthophylles/carotènes élevé. Cela signifie que leur teneur en xanthophylle se rapproche plus de celle des tissus de feuilles que de celle des tissus de racine de Carotte potagère. Les colonies oranges ont un taux élevé de carotènes et faible de xanthophylles. Pour ces tissus, le rapport xanthophylles/carotènes est donc bas. Les tissus isolés par Eichenberger ont dû subir une perturbation génétique primaire qui est à l'origine de la souche que nous avons analysée. Cela se manifeste donc par une déviation métabolique favorisant une caroténogenèse accrue et supprimant la synthèse des chlorophylles. Nous ne pouvions connaître cette dernière propriété qu'après avoir fait des analyses spectrophotométriques. Elle est très particulière et inattendue et elle nous a permis de comparer la croissance des tissus chlorophylliens et des tissus caroténogènes cultivés à la lumière. Nous disposons donc de colonies qui étaient capables ou non de réaliser un acte photosynthétique.

ANNEXE 2

Croissance des tissus de Carotte à des températures différentes.

Nous avons réalisé toutes nos expériences en plaçant les tissus dans une cabine climatisée à 23° C. Toutefois, sur la base des travaux effectués par de Capite [8], nous voulions savoir quel serait l'effet d'une température élevée sur des tissus cultivés à la lumière et à l'obscurité.

De Capite avait remarqué l'existence d'un optimum de température à 26° C pour des tissus maintenus à l'obscurité et de 31° C pour des tissus cultivés en lumière continue. Nous avons cultivé des explantats d'une souche de tissu cambial de Carotte

¹ Le spectre d'absorption d'un extrait dans l'éther de pétrole révèle la présence de caroténoïdes à 450 et 470 millimètre et l'absence complète de chlorophylle à 660 millimètre.

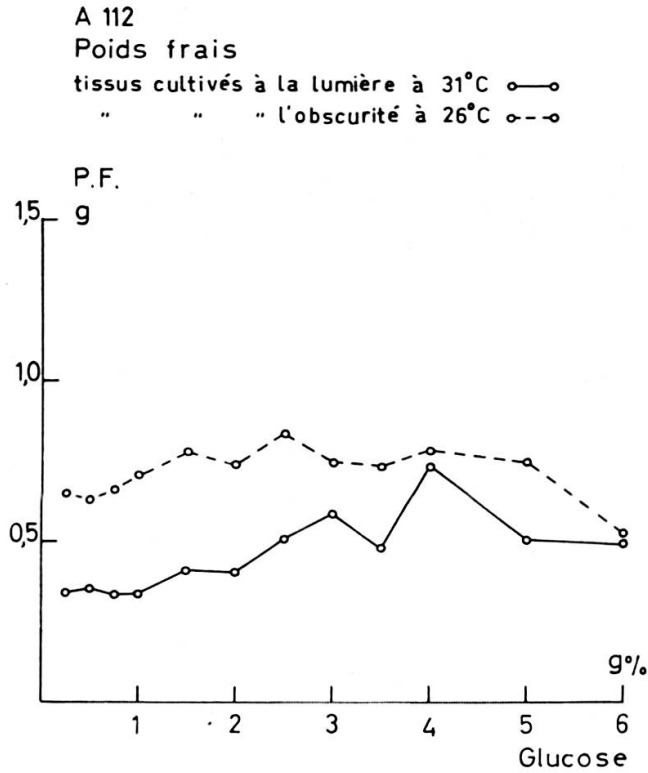


Fig. 23.

Variations de l'accroissement (poids frais) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* dans des milieux contenant diverses doses de glucose et à des températures différentes à la lumière ou à l'obscurité

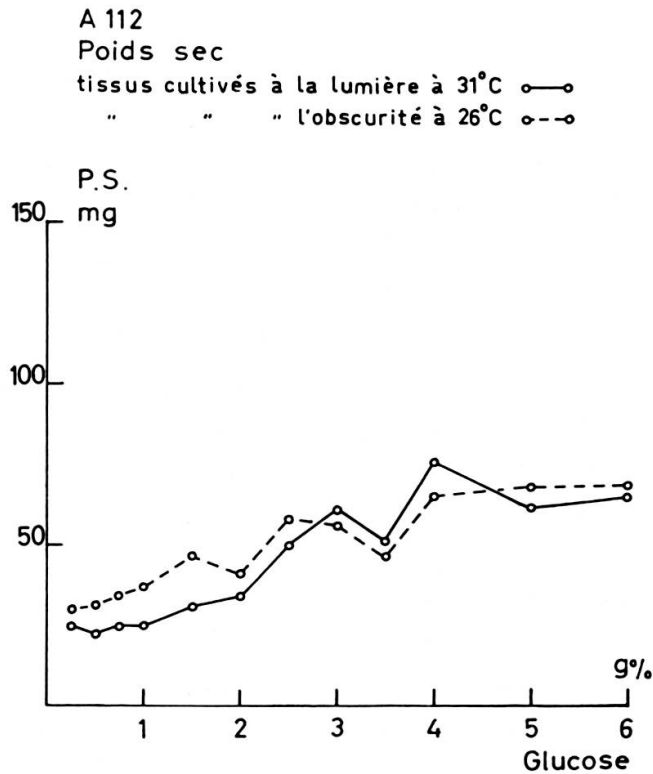


Fig. 24.

Variations de l'accroissement (poids sec) de tissus de Carotte cultivés *in vitro* dans des milieux contenant diverses doses de glucose et à des températures différentes à la lumière ou à l'obscurité.

sur le milieu de culture habituel (milieu de Knop) additionné de glucose (0,25 g% — 6 g %). Une partie des tubes préparés était placée dans une cabine dont la température était réglée à 31° C et en lumière continue. L'autre était mise à l'obscurité continue et à 26° C. Les fragments initiaux pesaient en moyenne 130,7 mg.

Les tissus ont proliféré ainsi pendant 79 jours. Nous en avons déterminé le poids frais et le poids sec. Ces valeurs sont assez irrégulières. Nous pensions que le poids frais des tissus cultivés à la lumière à 31° C serait plus élevé que celui des tissus maintenus à l'obscurité à 26° C. Or nous avons observé le contraire (voir fig. 23,24). Le poids sec par contre, était sensiblement le même dans les deux conditions.

Il semble que la lumière n'a pas manifesté son effet stimulant car les tissus ont un poids frais et sec plus faible que ceux que nous avons obtenus en cultivant les mêmes tissus à 23° C en lumière discontinue.

Cela montre que les phénomènes que nous avons décrits ne peuvent être considérés qu'en choisissant une température bien déterminée. D'autre part, il ne semble pas que la température de 31° C soit favorable aux tissus cultivés à la lumière. Les tissus cultivés à l'obscurité à 26° C ont en règle générale des valeurs de poids frais et de poids sec assez semblables à celles que l'on obtient si on les met à 23° C.

CHAPITRE VI — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A) TISSU CAMBIAL DE CAROTTE CHLOROPHYLLIEN.

Les expériences que nous avons entreprises sur la croissance de ces tissus comprenaient deux variables. D'une part la concentration du sucre offert et de l'autre la présence ou l'absence de lumière. Nous savions, d'après les premiers travaux réalisés dans ce domaine [Gautheret, 19], que ces tissus ne sont pas autotrophes mais semi-autotrophes. Leur régime physiologique est par conséquent mixte. Nous avons considéré en outre dans nos expériences, un régime purement hétérotrophe. Il n'était donc pas possible de dissocier a priori les deux variables qui agissaient sur les colonies. C'est ce qui rend l'interprétation des résultats plus difficile mais c'est aussi une condition biologique de base qui nous était imposée.

Nous pouvons dire que les tissus chlorophylliens ont une croissance évaluée en poids frais, poids sec et azote nettement favorisée par la lumière, quelle que soit la dose de glucose offerte. Notons cependant qu'aux faibles doses de sucre, jusqu'à 1 %, cet effet n'est pas très constant. Le poids frais des tissus éclairés passe nettement par un optimum à 3,5 % de glucose environ. Cet optimum ne paraît pas très marqué chez les tissus cultivés à l'obscurité.

Lorsqu'on suit l'évolution du poids sec des tissus cultivés à la lumière, on constate que les valeurs augmentent progressivement et semblent se stabiliser aux doses

de glucose comprises entre 5 et 6%. Ceci suggère que la lumière agit en augmentant l'accumulation de matières sèches.

Simultanément, nous avons remarqué que l'absorption de glucose par les tissus augmente en fonction de la dose offerte. Le quotient de consommation de glucose nous montre que la consommation de ce sucre augmente à la lumière. Cette augmentation est elle-même liée à la concentration du sucre fourni. En effet, plus il y a de glucose dans le milieu de culture, plus il est consommé. Cependant, la proportion entre le sucre consommé et les glucides solubles totaux accumulés n'est pas la même. Une partie de celui-ci doit être utilisée dans la respiration et dans la constitution des parois. Cette utilisation doit être plus grande à la lumière qu'à l'obscurité.

Le fait de retrouver une forte quantité de saccharose dans les tissus peut s'expliquer selon l'idée de Leloir et coll. [41] par le schéma suivant :

UDP — glucose + fructose = saccharose + UDP. Goris [26] avait déjà émis une hypothèse dans ce sens puis Hassid et Putnam [31] ont précisé les systèmes enzymatiques qui dirigent les transformations glucidiques.

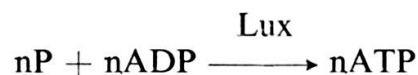
Récemment, Schopfer[60] étudiant la croissance d'Algues unicellulaires a prouvé qu'un effet synergique dans un régime mixte doit être examiné avec soin. Au lieu d'observer dans un régime mixte une synergie totale entre l'autotrophie et l'hétérotrophie, il a constaté que le rendement est moins bon dans ce cas que si chaque système fonctionnait seul. Cela permet de penser que les tissus cultivés in vitro à la lumière pourraient également ne pas avoir un rendement aussi bon que ceux qui sont maintenus à l'obscurité, bien que leur croissance soit nettement supérieure.

Nous avons tenté d'apprécier les possibilités de photosynthèse par la méthode manométrique. Cette méthode appliquée depuis longtemps aux cultures de tissus végétaux n'est pas employée sans réserves. Récemment, Lioret [47] a insisté sur les erreurs qui peuvent être commises dans la détermination de l'oxygène et surtout dans celle de l'anhydride carbonique. Néanmoins les mesures des échanges gazeux fournissent des données très utiles et nous n'avons pas renoncé à poursuivre nos premiers essais. La fonction photosynthétique peut se manifester faiblement chez les colonies que nous cultivions. Nous supposons que la lumière n'agit pas seulement sur un système biochimique mais sur plusieurs et que l'augmentation du poids des tissus est due à plusieurs effets. Il peut y avoir par exemple une photo-utilisation du glucose. Nous avons en outre déjà signalé que la lumière stimule la réduction des ions NO_3 et facilite l'incorporation dans les protides de produits intermédiaires de la photosynthèse. Elle accélère également la genèse des acides aminés [Champigny 9]. Or nous avons pu mettre en évidence que les quantités d'azote des tissus exposés à la lumière sont plus élevées que celles des tissus maintenus à l'obscurité.

Puisque les tissus sont capables d'absorber de plus en plus de glucose au fur et à mesure que sa concentration augmente dans le milieu, cela peut conduire, à la lumière, à une isomérisation plus rapide des sucres intratissulaires en rapport avec un métabolisme augmenté. S'il y a plus de glucides formés, il y a d'une part plus

de réserves solubles et d'autre part davantage de restes glucidiques susceptibles d'être incorporés dans le métabolisme des protides.

Nous pouvons penser que la lumière catalyse les réactions générales du métabolisme et tout particulièrement la formation de l'acide adénosine triphosphorique au cours de la photophosphorylation. L'ATP se forme selon l'hypothèse d'Arnon [1] selon le schéma suivant:



Cette réaction est elle-même couplée à celle de la photoréduction de la pyridine nucléotide:



Maclachlan et Porter [48] ont montré que des disques de feuilles de Tabac sont capables de synthétiser du saccharose lorsqu'on leur fournit des solutions de glucose à la lumière et en condition anaérobie. La phosphorylation du glucose devait être due, dans ce cas à des réactions induites par la lumière qui se déroulaient en l'absence d'air. Il s'agissait d'une formation d'ATP par photophosphorylation cyclique.

Par ailleurs nous pouvons admettre que l'action de la lumière peut se manifester indirectement par l'action de l'auxine. Pilet [55] indique que cette dernière a des propriétés très étendues et l'on constate qu'elles se manifestent parfois de manière divergente. La lumière agit sur la dégradation de l'auxine *in vitro*, en présence d'un photorécepteur. L'auxine aurait des propriétés d'extensibilité des parois, elle favorise avant tout l'entrée de l'eau dans la cellule. D'après Goris et Duhamet [29] elle augmente légèrement la teneur en sucres des tissus de Carotte. Elle pourrait donc augmenter la perméabilité des cellules aux glucides [Gautheret 19]. Si l'auxine favorise l'entrée de l'eau et des glucides dans la cellule, et si l'on suppose que l'activité métabolique est plus grande à la lumière qu'à l'obscurité cela pourrait se traduire par une plus grande utilisation du glucose et une augmentation de la croissance.

B) TISSUS DE CROWN-GALL DE SCORSONERE.

Les résultats que nous ont fourni nos expériences réalisées au moyen de ces tissus sont contradictoires. Dans trois cas il semble que la lumière influence la croissance et dans un cas cela ne se remarque pas. Nous pensons que nous ne devons pas pour autant négliger de prendre en considération ces résultats car ils indiquent justement qu'un effet différent de la photosynthèse peut se manifester dans certains cas, sans que cela soit très net. En effet, la croissance des tissus de Crown-gall, bien qu'elle soit irrégulière, montre dans trois expériences, qu'elle est légèrement plus élevée à la lumière. Dans une autre expérience, nous remarquons que les tissus ont

une croissance analogue tant à la lumière qu'à l'obscurité. Nous supposons que le gain de poids frais et de poids sec des tissus éclairés qui peut se manifester, pourrait être dû à une photophosphorylation et à une stimulation de certains actes métaboliques.

C) TISSUS CAMBIAL DE CAROTTE CAROTÉNOGENE.

Ces tissus que nous avons utilisés avaient une croissance plus lente que les tissus chlorophylliens. Toutefois nous avons noté une légère augmentation du poids des colonies exposées à la lumière. Ceci pourrait s'ajouter à ce que nous avons déjà observé en cultivant les tissus de Crown-gall de Scorsonère. Cependant nous précisons que cette souche n'avait pas une croissance aussi régulière que la souche chlorophyllienne car nous avons constaté que d'autres colonies oranges, dont la prolifération était peut-être stimulée par des repiquages plus fréquents, avaient proliféré plus rapidement.

SOMMAIRE

Nos recherches ont porté principalement sur le comportement des colonies tissulaires de Carotte chlorophylliennes. Nous avons étudié l'effet du glucose lié à celui de la lumière ou de l'obscurité. Cela nous a montré que ces tissus réagissent différemment. Nous avons constaté que l'absorption de glucose varie en fonction de la dose fournie et qu'elle n'est pas la même à la lumière ou à l'obscurité. En outre nous avons pu constater que la photosynthèse se manifeste *in vitro*.

Les colonies caroténogènes ainsi que celles de Crown-gall de Scorsonère nous ont servi à établir des comparaisons. Les premières ne présentent pas de chlorophylle a et b. Elles ont une croissance analogue, à l'obscurité, à celle des colonies vertes. Il semble que leur poids augmente très légèrement si elles sont exposées à la lumière. Les secondes paraissent dans certains cas proliférer mieux si elles sont éclairées.

Nous pensons pouvoir préciser quatre notions :

La croissance des tissus chlorophylliens est fortement stimulée par la lumière. Cette stimulation semble se porter sur une accumulation de matière sèche, par l'intermédiaire des différentes étapes du métabolisme.

La lumière favorise également l'absorption du glucose par les tissus.

La photosynthèse se manifeste chez les tissus chlorophylliens même si la teneur en pigments n'atteint pas une valeur élevée. Cette fonction peut donc ajouter ses produits à l'apport exogène du glucose.

La faible augmentation du poids des tissus non verts constatée à la lumière suggère que d'autres mécanismes que la photosynthèse peuvent entrer en jeu mais avant tout que le fonctionnement cellulaire est meilleur dans les conditions d'éclairage et probablement grâce à des processus de photophosphorylation.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARNON et coll. 1954. *Nature*, 174, 394-396; 1958. *Science*, 127 1026-1034.
2. BALL, E. 1953. Persistence of C14 in a callus culture of *Sequoia sempervirens*. *Growth*, 17, 169-182.
3. ——— 1955. Studies on the nutrition of the callus culture of *Sequoia sempervirens*. *Ann. Biol.*, 31, 81-105.
4. BARNES, R. L. et A. W. Naylor 1962. Formation of β -Alanine by pine tissues supplied with intermediates of uracil and orotic acid metabolism. *Plant Physiol.*, 37, 171-175.
5. BARNOUD, F. 1962. Recherches sur le tissu cambial d'arbres cultivés *in vitro*. Thèse sc. Grenoble.
6. BERTRAND, G. in H. R. OLIVIER *Traité de Biologie appliquée*. Maloine éd., Paris; in Brunel: *Traité de chimie végétale*. Frère éd., Tourcoing.
7. BUNNING, E. et H. WELTE 1954. Photoperiodische Reaktionen an pflanzlichen Gewebe kulturen. *Physiol. Plant.*, 7, 197-203.
8. CAPITE, L. de. 1955. Action of light and temperature on growth of plant tissue cultures in vitro. *Amer. Jour. Bot.*, 42, 869-873.
9. CHAMPIGNY, M. L. 1960. *L'influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les Feuilles de Bryophyllum Daigremontianum*, Thèse, Paris.
10. COMAR, C. L. et F. P. ZSCHEILE, 1942. *Plant physiol.*, 17, 198.
11. CONSTABEL, F. 1957. Ernährungsphysiologische und manometrische Untersuchungen zur Gewebekultur des Gymnosporangium-Gallen von Juniperus-Arten. *Biol. Zentralbl.*, 76, 385-413.
12. DUHAMET, L. 1953. Recherches préliminaires sur les variations du pouvoir de prolifération de cultures de tissus végétaux en fonction du poids de l'explantat ensemencé. *C.R. Soc. Biol.*, 147, 81-83.
14. EMERSON, CHALMERS. *Plant physiol.*, 30, no. 6. 511.
15. GAUTHERET, R. J. 1941. Action du saccharose sur la croissance des tissus de Carotte. *C. R. Soc. Biol.*, 135, 875-878.
16. ——— 1942. *Manuel technique de culture des tissus végétaux*.
17. ——— 1945. *Une voie nouvelle en biologie végétale: La culture des tissus*. Gallimard, éd. Paris.
18. ——— 1947. pH et culture de tissus végétaux. *Rev. Gén. Bot.*, 54, 5-35.
19. ——— 1959. *La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations*. Masson éd., Paris.
20. ——— 1964. La culture des tissus végétaux: son histoire, ses tendances. *Rev. Cyt. et Biol. vég.*, XXVII, 2-3-4.
21. GIOELLI, F. 1938. Morfologia, istologia, fisiologia e fisiopatologia di meristemi secondari in vitro. *Att. Ac. Sc. Ferrara*, 16, 1-87.
22. GORIS, A. 1947. Epuisement des réserves glucidiques de fragments de Carotte cultivés in vitro sur milieux dépourvus de sucres. Influence de l'acide indole-3-acétique en fonction de la saison. *C. R. Soc. Biol.*, 141, 1131-1134.
23. ——— 1948. Epuisement des réserves glucidiques de souches de tissus et de fragments de tubercules de Carotte maintenus in vitro sur milieux dépourvus de sucres. *C.R. Ac.Sc. Paris*, 226, 105-107.
24. ——— 1950. Influence comparée de l'acide indole-acétique et du lait de Coco sur les réserves glucidiques de souches de tissu de Carotte. *C.R. Ac. Sc.*, 231, 870-872.
25. ——— 1952. Influence de l'éclaircissement sur la teneur en fructose de diverses souches de tissus de Carotte et de Crown-gall de Vigne cultivées in vitro. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 527-531.
26. ——— 1954. Transformations glucidiques intratissulaires. *Ann. Biol.*, 30, 297-318.
27. ——— 1963. Influence du froid (température de 4°C) intervenant au moment du repiquage, sur le développement des tissus de racine de Carotte cultivés in vitro. *Ann. Sc. Nat., Bot. et Biol. vég.*, 12e série, 3, 415-423.
28. ——— 1965. Etude comparée de la valeur nutritive du palatinose et du saccharose sur le tissu de Carotte cultivé in vitro. *Rev. Gén. Bot.*, 72, 331-335.
29. ——— et L. DUHAMET. 1958. Etude de l'action du lait de Coco sur la croissance et la composition glucidique des tissus végétaux cultivés in vitro. *Rev. Gén. Bot.*, 65, 5-48.
30. ——— et R. MONIEZ, 1962. Essai sur le comportement métabolique de quelques sucres dans les tissus de racines de Carotte cultivés in vitro. *Ann. Sc. Nat. Bot. et Biol. vég.*, 12e série, III, 3, 415-423.

31. HASSID, W. Z., E. W. PUTNAM, 1950. Transformation of sugars in plants. *An. Rev. Plant Phys.*, 1, 109-124.
32. HELLER, R. 1949. Sur l'emploi de papier filtre sans cendres comme support pour les cultures de tissus végétaux. *C.R.Soc.Biol.*, 143, 335-337.
33. ——— 1953. *Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro*. Thèse, Paris.
34. HILDEBRANDT, A. C., A. J. RIKER et B, M, DUGGAR, 1945. Growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue with different temperatures hydrogen-ion concentration and amounts of sugar. *Amer. Jour. Bot.*, 32, 357-361.
35. ——— et A. J. RIKER, 1940. The influence of various Carbon compounds on the growth of marigold, paris-daisy, periswinkle, sunflower and tobacco tissue in vitro. *Amer. Jour. Bot.*, 36, 74-85.
36. KANDLER, O. 1955. Consideration of energetics in tissue culture. *Ann. Biol.*, 31, 173-184.
37. LACHAUX, M. 1944. Respiration des tissus des tubercules de Carotte et de Topinambour. Ses influences sous l'effet du traumatisme. *C.R.Ac.Sc. Paris*, 219, 218-220.
38. ——— 1944. Respiration des tissus des tubercules de Carotte et de Topinambour. Influence du glucose et de l'acide indole-3-acétique. *C.R.Ac.Sc. Paris*, 219, 244-246.
39. ——— 1944. Etude de la respiration de tissus végétaux isolés cultivés in vitro. Tissus de tubercules de Topinambour. *C.R.Ac.Sc. Paris*, 219, 258-260.
40. LANCE, C. 1957. Remarque sur l'emploi de différents critères de croissance dans le cas des tissus végétaux cultivés in vitro. *Rev. Gén.Bot.*, 64, 123-130.
41. LOLOIR et coll.: C. E. CARDINI, L. F. LOLOIR, and J. CHIRIBOGA, The biosynthesis of sucrose. *J. Biol. Chem.*, 214, 149-155.
42. LIORET, C. 1952. Action du lait de Coco sur les échanges gazeux respiratoires de tissus de crown-gall de Scorsonère cultivés in vitro. *C.R. Ac. Sc. Paris*, 234, 237-239.
43. ——— 1953. Action de l'acide α -naphtalène-acétique sur le métabolisme des tissus de racine de Scorsonère, cultivés in vitro. I. *C.R.Ac. Paris*, 236, 311-313.
44. ——— 1953. Action de l'acide α -naphtalène-acétique sur le métabolisme des tissus de racine de Scorsonère, cultivés in vitro. II. *C.R. Ac.Sc. Paris*, 236, 504-506.
45. ——— 1955. Recherches sur le métabolisme des cultures de tissus normaux et pathologiques. *Ann. Biol.* 31, 185-194.
46. ——— 1960. *Recherches sur le métabolisme de deux tissus végétaux cultivés in vitro*. Thèse, Paris.
47. ——— 1963. *La respiration des végétaux*. In THOMAS, J. A., *Problème de métabolisme respiratoire et d'oxydations cellulaires*. Masson, Paris.
48. MACLACHLAN, G. A., and H. K. PORTER, 1959. *Proc. Roy. Soc. B* 150, 460-473.
49. MICHEJDA T. 1964, Seasonal changes in carrot tissues cultured in vitro. *Acta Soc. Bot. Poloniae*, 33, No. 1, 95-111.
50. MITCHELL, J. E., BURRIS, R. H., RIKER, A. J. 1949. Inhibition of respiration in plant tissues by callus stimulating substances and related chemicals. *Amer. Journl. Bot.*, 36, 368-378.
51. NAEF, J. 1959: Action de la lumière sur l'utilisation du glucose par les tissus végétaux cultivés in vitro. *C.R.Ac. Sc., Paris*, 249, 1706-1708.
52. ——— 1962: Sur les chlorophylles élaborées par le tissu cambial de Carotte cultivé in vitro. *C.R.Ac. Sc., Paris*, 255, 1986.
53. ——— et G. Turian, 1963: Sur les caroténoïdes du tissu cambial de racine de Carotte cultivé in vitro. *Phytochemistry*, 3, 173-177.
54. NICKELL, L. G. et P. R. BURKHOLDER 1950: A typical growth of plants. II. Growth in vitro of virus tumors of Rumex in relation to temperature, pH, and various sources of nitrogen, carbon, and sulfur. *Amer. Jour. Bot.*, 37, 538-547.
55. PILET, P. E. 1961: *Phytohormones de croissance*. Masson, Paris.
56. PLANTEFOL, L. 1938: Sur les échanges respiratoires des tissus végétaux en culture. *C.R. Ac. Sc. Paris*, 207, 1121-1123.
57. ——— et R. J. GAUTHERET, 1941: Sur l'intensité des échanges respiratoires des tissus végétaux en culture: tissu primitif et tissu néoformé. *C.R.Ac.Sc. Paris*, 213, 627-629.
58. PRATT, R. 1943: Studies on Chlorella. vulg.: Influence on photosynthesis of prolonged exposure to sodium bicarbonate and potassium bicarbonate. *Amer. Jour. Bot.*, 30, no. 8, 626.629.

59. ROUX, E. et C. TENDILLE 1954: Pigments des chloroplastes et photosynthèse. *C.R.Ac.Sc.*, 238, 1261-1263.
60. SCHOPFER, J. F. 1966: *Sensibilité à la sulfanilamide de quelques algues vertes cultivées dans des conditions de carboautotrophie et de carbohétérotrophie*. Thèse, Genève.
61. SKOOG F. & B. J. ROBINSON 1950: A direct relationship between indoleacetic acid effects on growth and reducing sugar in tobacco tissue. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 74, 565-568.
62. STEWARD, F. C. et coll. 1956: Protein metabolism, respiration and growth: a synthesis of results from the use of ¹⁴C labelled substrates and tissue culture. *Nature*, 178, 734-738, 789-792.
63. STRAUS, J. et C. D. LA RUE 1954: Maize endosperm tissue grown in vitro. I: Culture requirements. *Amer. Jour. Bot.*, 41, 687-694.
64. UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS, J. F. STAUFFER 1949: *Manometric techniques and tissue metabolism*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 2nd ed.,
65. WHITE, Ph.R. 1943: *A handbook of plant tissue culture*. The Jaques Caltell Press ed., Lancaster.