

Description des expériences

Objekttyp: **Chapter**

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

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

Heft 1

PDF erstellt am: **10.08.2024**

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.

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