

La culture in vitro des cellules végétales

Autor(en): **Barnoud, F.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles =
Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **62 (1973)**

Heft 1

PDF erstellt am: **18.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308491>

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.

La culture *in vitro* des cellules végétales

par F. BARNOUD

Université Scientifique et Médicale de Grenoble – Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, CNRS, BP 53, 38041 Grenoble (France)

La culture *in vitro* des cellules végétales a une origine lointaine que l'on situe classiquement aux recherches originales d'HABERLANDT en 1902. Pendant plus de trente années, cette branche de la Biologie Végétale a connu des difficultés majeures et, en dépit des tentatives de nombreux chercheurs, en particulier celles de KOTTE et ROBBINS (1922), la culture de tissus ou de cellules fut en fait un échec. Ces difficultés ne s'expliquaient guère à l'époque car on savait en fait cultiver avec facilité des végétaux sur des milieux minéraux simples et, dans un domaine voisin, celui de la culture des cellules animales, Alexis CARREL avait obtenu dès 1912 une réussite remarquable dans une série de recherches restées célèbres.

Un grand nom dans le domaine de la culture *in vitro* des cellules végétales, le Professeur Philip R. WHITE, n'hésitait pas à dire, lors du premier grand symposium dans ce domaine, tenu à l'Université de Pennsylvanie en 1963, que les biologistes des années 1920–1930 qui tentaient sans succès la culture des tissus végétaux étaient comparables à des aveugles tâtonnant dans un tunnel obscur. L'image était valable, car les seuls résultats positifs portaient sur la culture des racines isolées qui se développaient d'une manière ordonnée sans perdre leur morphologie et sur la culture de quelques types cellulaires isolés qui survivaient quelques semaines mais ne se multipliaient pas.

C'est en 1934 que les premières cultures illimitées de racines furent réalisées par Philip R. WHITE aux USA. Des résultats prometteurs sur le tissu cambial d'arbre furent présentés en 1937 par R. J. GAUTHERET.

Le succès définitif pour les véritables cultures de tissus fut annoncé seulement en 1939, presque simultanément par le Professeur R. J. GAUTHERET à Paris et par le Professeur NOBECOURT, mon regretté Maître, à Grenoble. Pour la première fois, des cultures illimitées de tissus végétaux avaient été obtenues. Il s'agissait de tissus de carotte dans les deux cas. La mise au point définitive fut le fruit de deux circonstances: le choix d'un matériel favorable, le tissu cambial de racines tubérisées d'une part, et d'autre part l'emploi d'une auxine, l'acide indolyl β -acétique dont le rôle en tant qu'hormone de croissance avait été mis en évidence par divers auteurs dès 1934. Par la suite, d'autres substances stimulant la prolifération cellulaire furent utilisées avec succès, en particulier l'acide naphthyl-acétique, l'acide dichloro 2,4 phenoxyacétique, la kinétine et plus récemment diverses cytokinines dont on sait maintenant qu'elles sont des éléments constitutifs de certains ARN de transfert et dont le rôle a pu être expliqué en termes de biologie moléculaire. Il convient de citer aussi la puissante action stimulante du lait de coco (albumen liquide contenu dans la noix de coco) dont la composition est très complexe et non encore complètement établie,

et qui ne présente de ce fait qu'un intérêt limité dans les études de biologie cellulaire.

Après ces considérations qui fixent un point de l'historique de cette science, on peut se demander quel est son degré de développement actuel. Pour répondre à cette question, nous avons deux éléments. L'International Association for Plant Tissue Culture (IAPTC), fondée il y a 4 ans par le Professeur STREET de l'Université de Leicester, comprend 940 membres en 1972. Dans une interview récente, le Professeur GAUTHERET, Président de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences, déclarait que plus d'un millier de chercheurs étaient actuellement actifs dans le domaine de la culture des tissus végétaux. Il est évident pour beaucoup d'entre nous, et j'ai vécu personnellement cette expérience, qu'il est maintenant impossible de se tenir au courant d'une manière continue face au grand nombre de publications qui paraissent chaque année. Comment expliquer un tel essor sur une période de 35 ans, et plus particulièrement depuis une dizaine d'années? Je crois que la réponse tient dans le fait que de nombreux domaines de la biologie cellulaire et de la physiologie végétale ont pu être étudiés par cette technique avec beaucoup de succès.

Avant d'aborder d'une façon détaillée les domaines de la recherche pure où la culture des tissus végétaux a été un apport considérable dans l'expérimentation, je voudrais citer ici les quelques exemples d'application pratique en agriculture et en horticulture qu'a récemment présentés le Professeur GAUTHERET¹.

Il y a quelques années, certaines variétés de pommes de terre, de dahlias et d'œillets étaient considérées comme perdues. Des attaques massives de virus provoquaient de graves perturbations morphologiques et physiologiques dans leur développement. Il s'était avéré impossible d'éliminer ces virus. On savait toutefois que les apex au niveau des bourgeons n'étaient pas atteints par l'infection. Par la culture *in vitro* de ces apex, correspondant à des zones de quelques dixièmes de millimètre de longueur, il a été possible d'obtenir leur développement en plantes saines. On a pu ainsi régénérer les variétés en voie de disparition. Ces recherches ont eu un succès et une importance considérable. Les planteurs de pommes de terre ont pu de cette manière éviter des pertes se chiffrant par centaines de milliers de francs.

Dans un autre domaine, on sait qu'actuellement chaque année plus de 60 millions de boutures d'œillets sont préparées par cette technique.

Une application encore plus importante est celle qui concerne les orchidées. En croisant des variétés convenablement choisies, les horticulteurs créent des hybrides qui, par sélection dans leur descendance, permettent d'obtenir les plus belles fleurs. Il vous apparaîtra évident que seule la multiplication végétative qui assure le maintien des caractères héréditaires de l'hybride permet de préserver les caractères recherchés et peut fournir des résultats convenables.

¹ Conférence inaugurale devant l'Association Française pour l'Avancement des Sciences, Paris, Sciences, 1972, tome II, p. 119-129.

Malheureusement, chez les Orchidées, elle est très lente et on ne peut ainsi obtenir qu'un très petit nombre de plantes par an. Par contre, si l'on cultive un bourgeon d'Orchidée, il donne dans des conditions définies une masse de cellules qui se couvre d'innombrables bourgeons. Cultivés isolément, ces bourgeons donnent autant de plantes identiques à la plante primitive. Un hybride peut ainsi être multiplié dix mille fois en une seule année. De telles recherches ont véritablement révolutionné la culture des Orchidées, et il est aisé d'en saisir l'importance économique en horticulture.

Je vais maintenant citer des faits plus récents, très prometteurs et probablement inattendus pour vous. C'est la culture des cellules isolées en une production de masse, qui pourrait évoluer vers un stade industriel, ceci en vue de l'obtention en quantités importantes de substances naturelles rares et utiles à l'industrie pharmaceutique. En fait, les espèces moléculaires recherchées sont du type des stéroïdes, des alcaloïdes et des hétérosides (en particulier ceux qui présentent des propriétés cardiotoniques). Lors d'un récent symposium international sur les Fermentations, tenu à l'Université de Kyoto, plusieurs rapports de Sociétés industrielles japonaises ont montré tout l'intérêt de ces réalisations. Je citerai ici la communication du Dr SATO (Meiji Seika Kaisha Ltd), texte à caractère de génie biochimique marqué, précisant les conditions techniques par lesquelles il est possible de cultiver en fermenteur de 570 litres des suspensions cellulaires de plantes médicinales dont les noms spécifiques n'ont d'ailleurs pas été précisés. Le Dr FURUYA a présenté la structure de quelques 30 substances naturelles isolées de ces cultures et montré leur intérêt pharmacodynamique. D'autres publications ont souligné la possibilité de transformations chimiques par culture de souches appropriées, transformations des structures moléculaires qu'on pourrait comparer à celles réalisées par voie bactérienne sur des stéroïdes de grand intérêt biologique. Il est difficile de prévoir l'essor industriel de ces recherches appliquées, mais quand on connaît la valeur et l'importance des réalisations japonaises dans le domaine de la biochimie microbienne, on peut considérer qu'il y a dans cette voie nouvelle un intérêt économique certain.

Je vais ajouter un deuxième exemple qui montrera combien les événements évoluent vite dans le domaine de la recherche sur les cellules végétales cultivées *in vitro*. Depuis quelques années, on parle de la culture des protoplastes, c'est-à-dire de cellules dépouillées de leur paroi pecto-cellulosique. Les premiers chercheurs dans cette voie, à l'Université de Paris VI, me montraient avec beaucoup de fierté il y a trois ans quelques centaines de protoplastes vivants. Actuellement, certains laboratoires obtiennent des protoplastes par centaines de grammes. Au mois de septembre dernier, un premier Colloque International organisé à Versailles par le Centre National de la Recherche Agronomique sous la responsabilité du Dr MOREL a réuni plus de cent participants et a donné lieu à 34 communications. Ces chiffres montrent le développement rapide de cette branche nouvelle dont on attend beaucoup dans le domaine de l'hybridation et de la création d'espèces nouvelles. Il n'est guère possible d'imaginer la plante qui pourrait résulter de la fusion d'une cellule de Mousse et d'une

cellule de Tabac, mais qui peut prédire que ce ne sera pas une réalité dans quelque 5 ou 10 ans ?

Il convient maintenant de quitter le domaine de la prospective et de revenir aux réalités scientifiques passées pour parler des domaines de la biologie végétale qui ont progressé grâce à l'apport de la culture des tissus végétaux.

Il est impossible dans le cadre de cet exposé de développer, même sommairement, les résultats obtenus. Le traité monumental du Professeur GAUTHERET publié en 1958 présente ces données en un volume de plus de 800 pages dans lequel 986 références bibliographiques sont analysées. Depuis cette date (donc depuis 13 ans), c'est probablement plus d'un millier de publications qu'il conviendrait d'étudier pour une mise à jour exhaustive. Je vais donc me limiter à l'énumération des divers domaines abordés par de très nombreux chercheurs et développer seulement l'un d'entre eux qui est à la fois le plus récent et le plus prometteur et qui, à lui seul, représente depuis cinq ans plus d'une centaine de communications. Il s'agit de la culture des cellules isolées par la technique des suspensions cellulaires.

Il convient, au préalable, de voir rapidement quels sont les tissus qui peuvent être cultivés et donner naissance à des souches installées, c'est-à-dire définitives.

Les premières cultures ont été réalisées avec des tissus d'organes charnus, telles que les racines de Carotte, de Scorzonère, les rhizomes de Topinambour. Un grand nombre d'autres ont été obtenues à partir du tissu cambial d'arbres et d'arbustes, de lianes ou de tiges herbacées. C'est ainsi que le Dr G. MOREL a isolé en 1948 des souches de Lilas, de Vigne, de Parthenocissus, de Ronce, de Mauve. Le Professeur JACQUIOT, vers les années 1950-1955 a obtenu des souches de Châtaignier, de Chêne, d'Orme. Nous avons nous-même isolé, entre 1955 et 1962, des souches de Sequoia, de Lilas, de Charme, de Pelargonium et, plus récemment avec mes collaborateurs des souches de Rosier.

Mais on sait cultiver aussi des tissus de feuilles, de racines, de points végétatifs, d'embryons, de fruits. On voit donc qu'il y a une large gamme de possibilités. Plusieurs centaines de souches différentes constituent actuellement le patrimoine des chercheurs du monde entier. L'entretien de ces souches par transferts réguliers sur milieux neufs représente beaucoup de travail et beaucoup de soins. Pour certaines, nous ne rencontrons pas de difficultés particulières. Il s'agit des souches stables. C'est ainsi que j'entretiens dans mon laboratoire une souche de Rosier isolée par le Professeur NOBECOURT en 1946. Depuis 26 ans, ces tissus n'ont pas présenté de variations et ils continuent de croître sur un milieu minéral gélosé et glucosé avec une vigueur remarquable. Par contre, les souches de Carotte sont très instables et, sans cause apparente, elles évoluent en lignées indépendantes. Certaines produisent des tiges feuillées, d'autres des racines, d'autres de multiples embryons. Certaines sont constituées de tissus cohérents dont l'histologie révèle un degré d'organisation notable, en particulier des formations cyclisées cribro-vasculaires, alors que d'autres lignées sont caractérisées par des tissus friables, inconsistants, formés essentiellement par un tissu parenchymateux. On pense dans le cas précis des tissus de Carotte que cette instabilité est la traduction d'une hétérogénéité génétique

au niveau des tissus mis en culture initialement. Tout se passe comme si les divers types de cellules qui les constituaient exerçaient les uns sur les autres des inhibitions ne permettant pas à chacune d'exprimer librement ses potentialités, expression qui se manifeste dans le temps par suite de l'isolement fortuit de lignées cellulaires lors de repiquages.

L'apport de la culture des tissus végétaux en Biologie et Physiologie végétales

Dès l'isolement des premières souches définitives de tissus végétaux, différents types de recherches furent entreprises dont les principales ont porté sur les phénomènes d'histogénèse, de différenciation et de dédifférenciation provoqués par l'action des régulateurs de croissance. Un grand nombre de publications ont permis de préciser non seulement l'action de l'auxine naturelle, l'acide indolyl β -acétique, mais de quantités de structures moléculaires différentes sur les processus d'induction morphogènes et d'histogénèse. C'est là un domaine très vaste où l'expérimentation a été considérable, la masse des résultats importante et où l'imagination des chercheurs s'est donné libre cours dans le monde des hypothèses souvent peu étayées.

C'est incontestablement dans le domaine de la nutrition minérale et organique des tissus que des résultats plus clairs et plus positifs ont été obtenus. Il convient de citer ici les remarquables travaux du Professeur HELLER à l'Université de Paris. Le milieu minéral (macroéléments et microéléments) de HELLER mis au point en 1953 est devenu un classique dans la préparation des milieux de culture encore que la formule initiale du milieu de KNOP dilué de moitié et des oligoéléments préparés selon NOBECOURT ou GAUTHERET soit valable pour de nombreux tissus.

La nutrition organique est un domaine plus vaste. Depuis les travaux originaux de WHITE, plusieurs auteurs américains ont apporté de larges contributions parmi lesquelles il faut rappeler celles de STEWART, de HILDEBRANT et RIKER, de NICKELL, de MURASHIGE et SKOOG, de BALL. Ces recherches ont permis de préciser pour diverses souches de tissus la nature des acides aminés, des sucres, des acides organiques qui sont les plus favorables à la croissance.

Je développerai ici un peu plus longuement le domaine de l'absorption, des modifications intratissulaires des glucides et de leur exorption. J'ai réalisé des recherches dans cette ligne entre 1958 et 1962, d'abord sous la direction du Dr BALL à l'Université de North Carolina, puis à l'Université de Grenoble. J'ai pu montrer alors le rôle nutritionnel et morphogène assez fondamentalement différent des hexoses du type glucose, galactose, mannose et fructose, des disaccharides du type saccharose, maltose, lactose... Suivant la nature du sucre présent dans le milieu de culture, l'interconversion et l'accumulation intratissulaires sont fortement modifiées. J'ai établi également le processus de sécrétion, de diffusion des oses, dans le milieu de culture qui est parfois étonnamment important. Dans une voie parallèle, et à la suite de nos travaux de 1958, BALL a montré par des techniques de microcinématographie très remarquables

l'action des glucides sur l'évolution morphologique des points végétatifs et sur la différenciation des tissus qui en dérivent.

Dans un domaine différent et relevant du domaine de la pathologie végétale, je voudrais présenter quelques propos sur le passionnant problème du cancer végétal. Il a été montré dès 1907 qu'une tumeur végétale de nature cancéreuse pouvait être provoquée par une bactérie spécifique, *Agrobacterium tumefaciens*. En inoculant cette bactérie à des plantes de Tournesol, il se forme à une assez grande distance de la tumeur primaire des tumeurs secondaires complètement dépourvues de bactéries. Les tissus de ces tumeurs ont été cultivés *in vitro* avec beaucoup de succès par WHITE et BRAUN (1942). Les caractères de ces tissus sont très différents des tissus normaux; en particulier ils se développent avec un taux de croissance 12 fois plus élevé. Si ces tissus tumoraux sont greffés sur une plante saine, ils produisent des tumeurs indemnes de bactéries. C'était là une démonstration sans équivoque de la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses. Par la suite, toujours en utilisant la technique des cultures *in vitro*, les méthodes de la biologie moléculaire ont permis de trouver dans l'ADN des cellules transformées des séquences de bases analogues à celles de l'ADN bactérien. On avait ainsi expliqué les propriétés de synthèses spécifiques concernant par exemple celles de substances de division. Enfin, il a pu être établi que la multiplication rapide des cellules tumorisées leur permettait de faire retour à l'état normal. Tous ces résultats expérimentaux sont pleins d'intérêt et montrent que le cancer des plantes n'est pas aussi différent des cancers animaux qu'on a pu le croire à l'origine. Cette voie de recherche fut considérablement développée dans les années 1950–1960 et constitue encore de nos jours un sujet d'investigation plein d'intérêt.

La culture des cellules isolées. La technique des suspensions cellulaires ou culture de masse en milieu liquide

Dès les premières tentatives de culture *in vitro* des tissus végétaux, les biologistes avaient comme centre d'intérêt majeur la réalisation de cultures de cellules isolées. L'échec fut dans ce domaine de longue durée puisqu'il fallut attendre 1958 pour avoir, avec les travaux de TORREY puis ceux de MUIR, HILDEBRAND et RIKER et enfin ceux de STEWARD et SHANTZ les premiers résultats positifs partiels. Il faut retenir de ces recherches originales que les cellules isolées ne sont capables de se multiplier que si elles sont au contact ou au voisinage d'une colonie tissulaire de taille importante. Cette constatation plusieurs fois établie par la suite, notamment par les travaux de LUTZ à l'Université de Strasbourg, de BENBADIS à l'Université de Paris, montre qu'il y a migration de substances nécessaires à la multiplication cellulaire à partir de masses de tissus en voie de division rapide. C'est ce que nous appelons l'effet inducteur des cultures nourrices. Ce fait fut à l'origine de nombreuses autres recherches, notamment celles du Professeur STREET en Angleterre sur la nature de ces facteurs de conditionnement. Notons ici que la nature chimique de ces facteurs est encore inconnue.

Je ne saurais développer ce point important de physiologie cellulaire car je voudrais exposer l'état actuel de nos possibilités en matière de cultures de cellules en masse par la technique des suspensions cellulaires. Je suis personnellement persuadé du grand intérêt que présentent ces techniques nouvelles et l'étude des publications récentes en souligne amplement l'importance. Parmi les domaines de la biologie cellulaire abordés avec succès, il convient de citer la cinétique de croissance (HENSHAW et al., 1966), les synthèses protéiques pendant les diverses phases d'un cycle de croissance, la nutrition organique et l'influence des substances stimulantes du type kinétine et acide gibberellique, la morphologie et l'ultrastructure cellulaire en relation avec ces facteurs, la nature des polysaccharides constitutifs de la paroi pecto-cellulosique, l'évolution des différents types d'activités enzymatiques en relation avec les stades de croissance.

Précisons tout d'abord quelles sont les conditions histologiques favorables qui permettent l'obtention des suspensions cellulaires de durée illimitée. Ce que nous entendons par suspension cellulaire consiste en une culture en milieu liquide à haute densité (10^6 cellules/ml) de cellules isolées ou au plus groupées en amas de 4 à 8 cellules. De toute évidence, il convient d'utiliser au départ une souche de tissus qui se prête à la dissociation, et en fait un petit nombre seulement de souches tissulaires connues peuvent évoluer vers le stade de culture en milieu liquide. Il peut s'agir soit de tissus normaux, soit de tissus anergiés, soit de tissus tumoraux. Des résultats positifs ont été obtenus avec les tissus d'Erable, de Rosier (var. Paul Scarlett), de Tabac, de Carotte. De nombreuses autres tentatives ont été faites, mais beaucoup ont été des échecs. Nous avons dans mon laboratoire cultivé avec succès deux souches de Rosier, mais il nous reste à étudier systématiquement l'amélioration des conditions de croissance. De ce point de vue, une souche seulement a fait l'objet d'investigations très complètes, celle d'*Acer pseudoplatanus* isolée par LAMPORT en 1964 dans le laboratoire du Dr NORTHCOTE à Cambridge. C'est ce qui explique qu'elle est actuellement la seule utilisée dans de nombreux laboratoires (probablement plus d'une vingtaine). Malheureusement cette souche unique, qui présente par ailleurs des caractéristiques cytologiques idéales, exige un milieu de culture complexe et est rigoureusement dépendante de la présence d'une substance de croissance non naturelle, l'acide dichloro 2,4 phénoxyacétique. Il serait du plus haut intérêt de créer d'autres souches dont la croissance pourrait avoir lieu sur un milieu plus simple, par exemple le milieu minéral de HELLER contenant comme source de carbone organique un mono ou un disaccharide (glucose ou saccharose) et une auxine naturelle. Jusqu'ici peu de résultats positifs ont été obtenus avec l'acide indolyl-acétique. C'est souvent le 2,4D associé à la kinétine qui est le meilleur facteur de croissance. C'est ainsi qu'en 1971 des résultats ont été présentés pour les tissus de Carotte par NISHI et SUGANO à l'Université de Toyama et par LA RUE et GAMBORG (NRCC, Prairie Regional Laboratory) pour des tissus d'Avoine, de Glycine et de Soja). Nous avons, dans mon laboratoire, obtenu des résultats très positifs sur des tissus anergiés de Rosier dont la souche est entretenue depuis 1969 sur milieu gélosé de compo-

sition très simple. La culture de ces tissus par la technique des suspensions cellulaires va faire l'objet d'une prochaine communication. Cette souche a la particularité de ne nécessiter aucune auxine pour sa croissance et présente de ce fait beaucoup d'intérêt du point de vue de la biologie cellulaire.

Conditions expérimentales nécessaires à la réalisation d'une souche

Voici, sous forme résumée, les différents stades de préparation d'une souche tels qu'ils sont suivis dans notre laboratoire :

1. Les colonies tissulaires cultivées sur milieu gélosé sont prélevées à un stade de croissance de 3 à 4 semaines. Au-delà de ce stade, la dissociation est plus difficile.

2. Par agitation de 2 à 3 heures sur agitateur à secousses en présence d'une faible quantité de milieu de culture, on procède à la dissociation en massifs cellulaires de taille variée. A ce stade, la proportion de cellules isolées est faible, de l'ordre de 20 % seulement.

3. Les flacons de culture sont placés directement en rotation axiale (vitesse 60 rpm) pendant 4 à 5 jours. Cet aspect technique est fondamental pour assurer une bonne oxygénation des cellules.

4. A l'issue de cette période, on procède à une filtration sur toile de nylon calibrée dont les mailles sont de l'ordre de 500 μ . On élimine ainsi une partie importante de la culture sous forme de refus de filtration.

5. Le filtrat de ces cultures primaires est alors dilué par du milieu neuf. Le nombre de cellules par unité de volume du milieu liquide doit être relativement élevé si l'on veut obtenir de bonnes conditions de croissance (la valeur de 300 000 cellules/ml est souvent citée).

6. La croissance est contrôlée pendant le cycle de 21 jours par des prélèvements à intervalles réguliers sur lesquels sont effectuées des déterminations de poids frais, de poids sec et de volume de sédiment cellulaire (valeur établie par centrifugation).

Lorsque la souche sous forme de suspension cellulaire réelle est créée, elle est alors entretenue par transferts réguliers, sur la base de 10 à 12 jours d'intervalle, dans du milieu neuf, le rapport volume de l'inoculat/volume de milieu neuf étant de l'ordre de 6.

Importance de la croissance

Dans le cas d'*Acer pseudoplatanus*, les données de STREET et coll. montrent que, sur une période de 21 jours, il y a une augmentation du poids sec de 7 fois, une multiplication du nombre de cellules par ml de l'ordre de 6 à 7, et un accroissement de sédiment cellulaire de 8. Ceci correspond par flacon unitaire contenant 4,1 litres de suspension cellulaire à un sédiment de 1,4 litre et à un poids sec de 40 g. La densité cellulaire peut atteindre 22×10^6 cellules/ml.

Des progrès importants dans l'aspect technique des appareils de culture viennent d'être présentés récemment par le Professeur STREET. Il s'agit d'une

version adaptée des fermenteurs connus en microbiologie où tous les facteurs sont sous contrôle électronique et où il est possible à tout moment soit de prélever un volume déterminé de suspension cellulaire soit d'introduire un volume connu de milieu de culture. A ces données il convient d'ajouter qu'il est maintenant possible d'avoir des cultures parfaitement synchrones. En d'autres termes, cela signifie qu'il est désormais possible d'obtenir à un stade défini de la croissance cellulaire des quantités importantes de cellules identiques. Il s'agit là d'un progrès réel dont la portée, j'en suis sûr, ne vous échappera pas.

Depuis les travaux originaux des Professeurs WHITE, NOBECOURT et GAUTHERET dans les années 1934 à 1939, il y a donc eu un long chemin parcouru. J'espère avoir souligné au passage les principales étapes du développement de cette science et montré l'intérêt de la méthode de culture *in vitro* des cellules végétales.

Annexe :

Bibliographie relative aux cellules végétales cultivées en milieu liquide par la technique des suspensions cellulaires

- LAMPORT D. T. A., 1964. Cell suspension cultures of higher plants isolation and growth energetics. *Experimental Cell Res.*, 33 195–206.
- HENSHAW G. G., JHA K. K., MEHTA A. R., JOAN SHAKESHAFT and STREET H. E., 1966. Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J. Experimental Bot.*, 17, 51, 362–377.
- LESCURE A. M., 1966. Etude quantitative de la croissance d'une culture d'*Acer pseudoplatanus* L – *Physiol. Vég.*, 4 (4), 365–378.
- GIVAN C. R. and COLLIN H. A., 1967. Studies on the growth in culture of plant cells. II – Changes in respiration rate and nitrogen content associated with the growth of *Acer pseudoplatanus* L cells in suspension culture – *J. Experimental Bot.*, 18, 55, 321–331.
- JOUANNEAU J. P. et PEAUD-LENOEL C., 1967. Croissance et synthèse des protéines de suspensions cellulaires de Tabac sensibles à la kinétine – *Physiologia plantarum*, 20, 834–850.
- SUTTON-JONES B. and STREET H. E., 1968. Studies on the growth in culture of plant cells. III – Changes in fine structure during the growth of *Acer pseudoplatanus* L cells in suspension culture – *J. Experimental Bot.*, 19, 59, 114–118.
- STUART R. and STREET H. E., 1969. Studies on the growth in culture of plant cells. IV – The initiation of division in suspensions of stationary-phase cells of *Acer pseudoplatanus* L – *J. Experimental Bot.*, 20, 64, 556–571.
- SHORT K. C., BROWN E. G. and STREET H. E., 1969. Studies on the growth in culture of plant cells. V – Large scale culture of *Acer pseudoplatanus* L cell suspensions – *J. Experimental Bot.*, 20, 64, 572–578.
- SHORT K. C., BROWN E. G. and STREET H. E., 1969. Studies on the growth in culture of plant cells. VI – Nucleic acid metabolism of *Acer pseudoplatanus* L cell suspensions – *J. Experimental Bot.*, 20, 64, 579–590.

- SIMPKINS I. and STREET H. E., 1970. Studies on the growth in culture of plant cells. VII – Effects of kinetin on the carbohydrate and nitrogen metabolism of *Acer pseudoplatanus* L cells grown in suspension culture – *J. Experimental Bot.*, 21, 66, 170–185.
- MACKENZIE IAN A. and STREET H. E., 1970. Studies on the growth in culture of plant cells. VIII – The production of ethylene by suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L – *J. Experimental Bot.*, 21, 68, 824–834.
- SIMPKINS I., COLLIN H. A. and STREET H. E., 1970. The growth of *Acer pseudoplatanus* cells in a synthetic liquid medium: response to the carbohydrate, nitrogenous and growth hormone constituents – *Physiologia Plantarum*, 23, 385–396.
- ROBERTS K. and NORTHCOTE D. H., 1970. The structure of Sycamore callus cells during division in a partially synchronized suspension culture – *J. Cell. Sci.*, 6, 299–321.
- SIMOLA L. K. and SOPANEN T., 1970. Changes in the activity of certain enzymes of *Acer pseudoplatanus* L cells at four stages of growth in suspension culture – *Physiologia Plantarum*, 23, 1212–1222.
- NISHI A. and SUGANO N., 1970. Growth and division of carrot cells in suspension culture – *Plant Cell. Physiol.*, 11, 757–765.
- DAVEY M. R. and STREET H. E., 1971. Studies on the growth in culture of plant cells. IX – Additional features of the fine structure of *Acer pseudoplatanus* L cells cultured in suspension – *J. Experimental Bot.*, 22, 70, 90–95.
- STUART R. and STREET H. E., 1971. Studies on the growth in culture of plant cells. X – Further studies on the conditioning of culture media by suspensions of *Acer pseudoplatanus* L cells – *J. Experimental Bot.*, 22, 70, 96–106.
- WILSON S. B., KING P. J. and STREET H. E., 1971. Studies on the growth in culture of plant cells. XII – A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspensions – *J. Experimental Bot.*, 22, 70, 177–207.
- DAVEY M. R., FOWLER M. W. and STREET H. E., 1971. Cell clones contrasted in growth morphology and pigmentation isolated from a callus culture of *Atropa belladonna* var. *Lutea* – *Phytochemistry*, 10, 2559–2575.
- LARUE T. A. G. and GAMBORG O. L., 1971. Ethylene production by plant cell cultures. Variations in production during growing cycle and in different plant species – *Plant Physiol.*, 48, 394–398.
- HORINE R. K. and RUESINK A. W., 1972. Cell wall regeneration around protoplast isolated from *Convolvulus* tissue culture – *Plant Physiol.*, 50, 438–445.