

50376
1967
70

50376
1967
70

UNIVERSITE DE LILLE — FACULTE DES SCIENCES

MEMOIRE PRESENTE
EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES
DE SCIENCES NATURELLES



CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT DE
TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS "IN VITRO"
EN PRÉSENCE DE DIVERS
MILIEUX DE CULTURE

Soutenu à Lille en Avril 1967 par Aurélien LEFEVRE.

INTRODUCTION

Les milieux nutritifs habituellement utilisés pour la culture "in vitro" des tissus végétaux renferment du sucre, des éléments minéraux et parfois des facteurs hormonaux.

Pendant fort longtemps, on a utilisé empiriquement les éléments minéraux de la solution de Knop diluée de moitié, complétée par les oligoéléments de la solution de Berthelot, modifiée par Gautheret.

Après une étude systématique des besoins minéraux de différents tissus végétaux cultivés in vitro, Heller a proposé une solution type tant pour les macro que pour les microéléments.

Au cours de leurs recherches sur les facteurs de division, Skoog et ses collaborateurs montrèrent que les cellules de moelle de Tabac avaient des exigences particulières. L'auxine provoque seulement l'élongation des cellules, alors que leur prolifération est sous la dépendance de l'action simultanée d'acide indolylacétique et de Kinétine (découverte en 1955 par Miller, Skoog, Von Saltza, Strong dans les produits de dégradation d'un ADN)

De plus, les tissus de moelle de Tabac sont capables selon la dose d'auxine ou de kinétine utilisée, de produire des bourgeons ou des racines.

Enfin, après une série de recherches systématiques, Murashige et Skoog (1962) mirent au point un milieu complexe contenant à la fois des éléments minéraux et des facteurs organiques, en particulier de l'auxine et de la kinétine. Il était cependant intéressant de vérifier si les propriétés exubérantes manifestées par ce milieu à l'égard de la moelle de Tabac, pouvaient également s'exercer à l'égard d'autres tissus.

Nous avons donc fait appel à des tissus ayant des exigences différentes. Nous avons par exemple, utilisé du parenchyme vasculaire de Topinambour ou de Scorsonère qui sont hétérotrophes à l'auxine, des tissus de Ronce qui sont autotrophes à cette hormone ou des tissus de Carotte ayant des besoins intermédiaires. D'autre part, nous avons eu recours à des tissus tumoraux (crown-gall ou anergies) capables de proliférer en absence de tout facteur de division. Enfin, certains tissus tels que ceux d'Endive nous ont permis de préciser les besoins

nutritifs de tissus capables non seulement de proliférer mais aussi de manifester des phénomènes d'organogénèse (bourgeons et racines).

Nous avons donc comparé la croissance et le développement de ces tissus sur les milieux de Gautheret, de Heller et de Murashige et Skoog

Ces travaux ont été réalisés au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Institut de Botanique de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur Bouriquet auquel j'exprime toute ma gratitude pour l'excellente initiation à la recherche qu'il me donne comme pour la bienveillante compréhension qu'il manifeste à mon égard.

J'ai l'honneur d'adresser mes remerciements empressés à Monsieur le Professeur Hocquette Directeur de l'Institut de Botanique présidant le jury d'examen ainsi qu'à Monsieur le Professeur Lacoste qui a bien voulu accepter d'en faire partie.

J'exprime tous mes remerciements et ma reconnaissance à Monsieur Vasseur assistant au laboratoire de Physiologie Végétale pour sa collaboration et ses conseils.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Legrand qui m'a enseigné les techniques du laboratoire.

Je remercie enfin tous ceux, qui à divers titres par leurs conseils, et leur aide matérielle m'ont permis de réaliser ce travail dans une ambiance sympathique que j'apprécie.

LES TECHNIQUES

A- Les milieux de culture- Les milieux solidifiés par de la gélose (0,9%) contiennent du glucose: 30 ou 50g/l selon les tissus étudiés.

1- Milieu de Gautheret

Il comprend les macroéléments de la solution de Knop diluée de moitié, c'est à dire:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
K NO_3	0,125g
$\text{Mg SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,125g
KH_2PO_4	0,125g
Eau Q.S.P.F.	1000 ml

A cette solution, l'on ajoute 10 gouttes par litre de la solution d'oligoéléments de Berthelot modifiée par Gautheret comprenant:

$\text{Fe SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	50 g
$\text{Mn SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	2 g
K I	0,5g
$\text{Ni Cl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$	0,05g
$\text{Co Cl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$	0,05g
$\text{Ti}_2 (\text{SO}_4)_3$	0,20g
$\text{Zn SO}_4, 4 \text{H}_2\text{O}$	0,10g
$\text{Cu SO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$	0,05g
$\text{Be SO}_4, 4 \text{H}_2\text{O}$	0,10g
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	0,05g
$\text{H}_2 \text{SO}_4$	1ml
Eau Q. S. P. F.	1000ml

2 - Milieu de Heller La solution minérale de macroéléments comprend

K Cl	0,750 g
Na NO ₃	0,600 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,250 g
Na H ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,125 g
Ca Cl ₂ , 2 H ₂ O	0,075 g
Eau Q.S.P.F	1000 ml

A cette solution l'on ajoute 10 gouttes par litre de la solution de microéléments qui se compose de :

Fe Cl ₃ , 6 H ₂ O	1 mg
Zn SO ₄ ; 7 H ₂ O	1 mg
H ₃ BO ₃	1 mg
Mn SO ₄ , 4 H ₂ O	0,1 mg
Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,03 mg
Al Cl ₃	0,03 mg
Ni Cl ₂ , 6 H ₂ O	0,03 mg
K I	0,01 mg
Eau Q.S.P.F	1000 ml

3 - Milieu de Murashige et Skoog . Il comprend des éléments minéraux

NH ₄ NO ₃	1,650 g
K NO ₃	1,900 g
Ca Cl ₂ , 2 H ₂ O	440 mg
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	370,mg

KH_2PO_4	170	mg
Na_2EDTA	37,3	mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	mg
H_3BO_3	6,2	mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	mg
K I	0,83	mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	mg
Eau Q.S.P.F	1000	ml

et des éléments organiques :

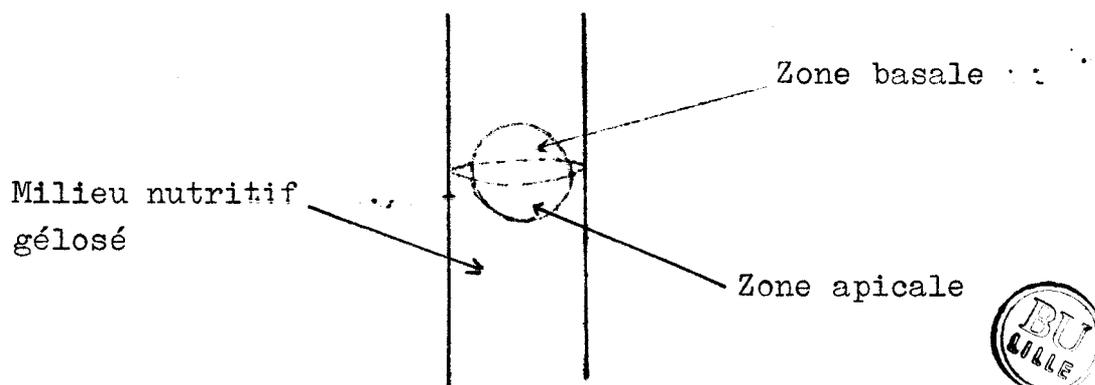
Hydrolysate de caséine	1 g/l
Glycocolle	2 mg/l
Myo inositol	100 mg/l
Acide nicotinique	0,5 mg / l
Pyridoxine, HCl	0,5 mg / l
Thiamine, HCl	0,1 mg / l
Acide indolylacétique	1 - 30 mg / l
Kinétine	0,04 - 10 mg / l

Afin de faciliter la comparaison avec les milieux de Gautheret ou de Heller, nous avons été amenés parfois à n'utiliser que les éléments minéraux de ce milieu complexe.

B - La stérilisation des tissus et leur ensemencement

Nos expériences porteront sur divers tissus, tels ceux de feuilles ou de racines d'Endive, de racines de Carotte, de Salsifi, de parenchyme vasculaire de Topinambour et de souches différentes.

1 - Les feuilles d'Endive - Elles sont stérilisées pendant 20 minutes dans l'hypochlorite de calcium à 70 g/l, puis lavées trois fois par de l'eau stérile afin d'éliminer toute trace d'hypochlorite. Sur ces feuilles, l'on prélève aseptiquement au niveau de la nervure principale, à l'aide d'un trocart, des disques ayant 1,6 cm de diamètre. Les explantats sont ensemencés de telle sorte que leur région apicale plonge dans le milieu de culture.



2 - Les racines L'on choisit des organes sains, c'est à dire dépourvus de toute lésion et de toute trace d'attaque par les parasites. Les régions externes étant polluées, on pèle les racines. Pour les racines d'Endive et de Carotte, il est facile de repérer la région proche du collet, de la pointe de la racine. Par contre, pour le Salsifi on taillera en biseau la face radiculaire, ce qui permettra d'orienter les explantats lors de l'ensemencement. S'il faut éviter de laisser de dessécher les racines, il faut cependant éviter de les

laver, car l'eau non stérile, peut y pénétrer et entraîner des bactéries à l'intérieur des tissus. Les racines sont alors stérilisées dans l'hypochlorite à 90 g/l, recouvertes d'une couche de coton hydrophyle qui s'imbibera d'hypochlorite et facilitera l'immersion complète des organes. Au cours de la stérilisation, les tissus superficiels sont tués, et se décolorent, il est ainsi facile de suivre la pénétration de l'hypochlorite en sectionnant un organe de temps à autre. La stérilisation sera terminée quand la région décolorée atteindra 1,5 à 2 mm, le temps variant de 30 à 90 minutes selon les tissus.

La mise en culture se fait suivant la méthode indiquée par Gautheret. Les racines sont épluchées puis débitées en cylindres de 25 mm de haut, les tissus périphériques nécrosés, éliminés avec soin. Chaque morceau est ensuite partagé en prismes ayant 8 mm de côté qui sont ensemencés dans le milieu de culture. Par suite du transport polarisé de certaines substances de croissance, les fragments sont ensemencés de telle façon que leur face foliaire ou leur face radiculaire plonge dans ce milieu de culture.

3 - Les souches Elles proviennent de repiquages successifs de tissus déterminés sur un milieu mis au point pour chacun d'eux. A la suite d'un repiquage, le fragment se développe, la multiplication cellulaire se faisant à une vitesse variable avec la souche. Lorsque le développement se ralentit ou que la colonie devient trop importante et risque d'être gênée dans sa croissance, on procède au repiquage. Toutefois, avant chaque repiquage, on élimine les cultures qui se sont mal développées ou qui présentent des régions nécrosées étendues. Nous choisissons donc des colonies saines dont la croissance s'est faite de façon homogène.

Le repiquage est réalisé suivant la même technique indiquée par Gautheret. Après élimination des parties nécrosées ou hyperhydriques, les colonies tissulaires sont débitées en petits fragments cubiques de 4 à 5 mm de côté et pesant environ 150 mg.

C- Conditions expérimentales.

Après l'ensemencement ou le repiquage, les tubes sont capuchonnés au moyen de papier d'étain afin d'éviter une évaporation trop intense. Ils sont ensuite placés dans une pièce éclairée douze heures par jour par des tubes luminescents produisant un éclairage d'environ 500 lux à 20 cm, et dont la température est maintenue aux environs de 22°C.

L'ensemencement ou le repiquage se fait toujours par lots de 24 afin que lors des résultats, après avoir éliminé les pollutions et les explantats non repris, il en reste une vingtaine. Toutes les expériences ont été au moins faites deux fois.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 - Tissus hétérotrophes à l'auxine

A - Le parenchyme vasculaire de Topinambour

On sait, comme l'a montré Gautheret que le parenchyme vasculaire de Topinambour est parfaitement hétérotrophe à l'auxine. Une dose très faible d'acide indolylacétique (10^{-9} à 10^{-8} g/ml) suffit à provoquer une prolifération intense et illimitée.

Après stérilisation, les tubercules sont débités en prismes pesant environ 450 mg puis ensemencés dans les milieux de Gautheret, de Heller, ou dans un milieu renfermant soit seulement les éléments minéraux, soit la totalité des éléments proposés par Murashige et Skoog

A chacun d'eux, l'on ajoute 3 % de glucose, de l'acide indolylacétique à 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml, le milieu de Gautheret sans auxine nous servant de témoin. Rapidement, des cals ayant leur surface lisse apparaissent sur les régions immergées dans le milieu nutritif, entourant tout l'explantat. Les fragments ensemencés dans le milieu témoin demeurent intacts. En présence d'AIA à 10^{-6} ; les cals se forment sur toute la surface de l'explantat. l'expérience dure 63 jours.

Comme l'indique la figure 1, quel que soit le milieu utilisé, la croissance est stimulée par l'acide indolylacétique. Cette stimulation est d'autant plus forte que la dose d'auxine est plus élevée; du moins pour les concentrations utilisées, car pour des doses plus fortes, des phénomènes de toxicité interviendraient. En présence du milieu de Murashige et Skoog (complet ou minéral), la stimulation exercée par l'auxine est beaucoup plus importante qu'en présence des milieux de Gautheret et de Heller.

Dans le milieu de Gautheret, à la concentration de 10^{-6} g/ml d'AIA de petites racines (2cm environ) peu nombreuses apparaissent, avec le milieu de Heller, la concentration de 10^{-7} suffit à les provoquer. A cette concentration, dans le milieu minéral et complet de Murashige et Skoog, elles sont plus longues (5cm), le deviennent davantage à 10^{-6} (7 à 8 cm, mais certaines peuvent atteindre 20 cm), elles sont aussi plus nombreuses (2 à 3 par explantat). Le milieu de Murashige et Skoog est donc de loin le plus favorable à la croissance cellulaire des frag-

ments de parenchyme vasculaire de Topinambour. Toutefois, les substances organiques (sauf l'AIR) n'ont que peu d'influence

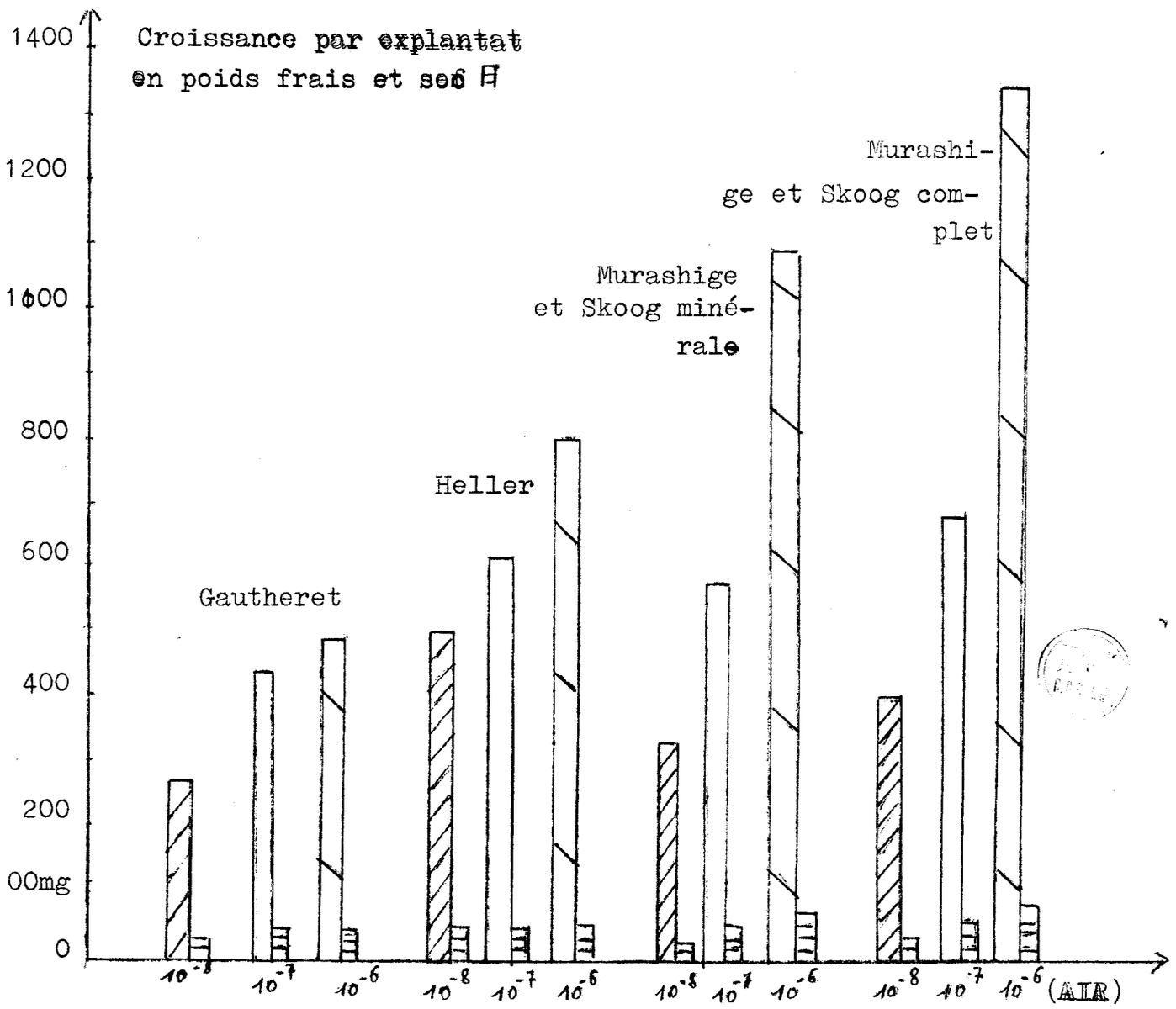


Figure 1 Action des différents milieux (Gautheret, Heller, Murashige et Skoog -minéral et complet-) sur la croissance en poids frais et sec des fragments de parenchyme vasculaire de Topinambour

B- Tissu de Scorsonère

1- Tissu primaire- Les fragments de racines de Salsifi sont ensemencés la face radiculaire dans le milieu de culture contenant 5% de glucose et éventuellement 10^{-8} ou 10^{-7} g/ml d'AIA. Sur les deux faces de l'explantat, apparaît un cal lisse provenant de la prolifération du xylème et de la zone génératrice. A la longue, ce cal se recouvre d'une mince pellicule subéreuse. L'expérience dure 34 jours.

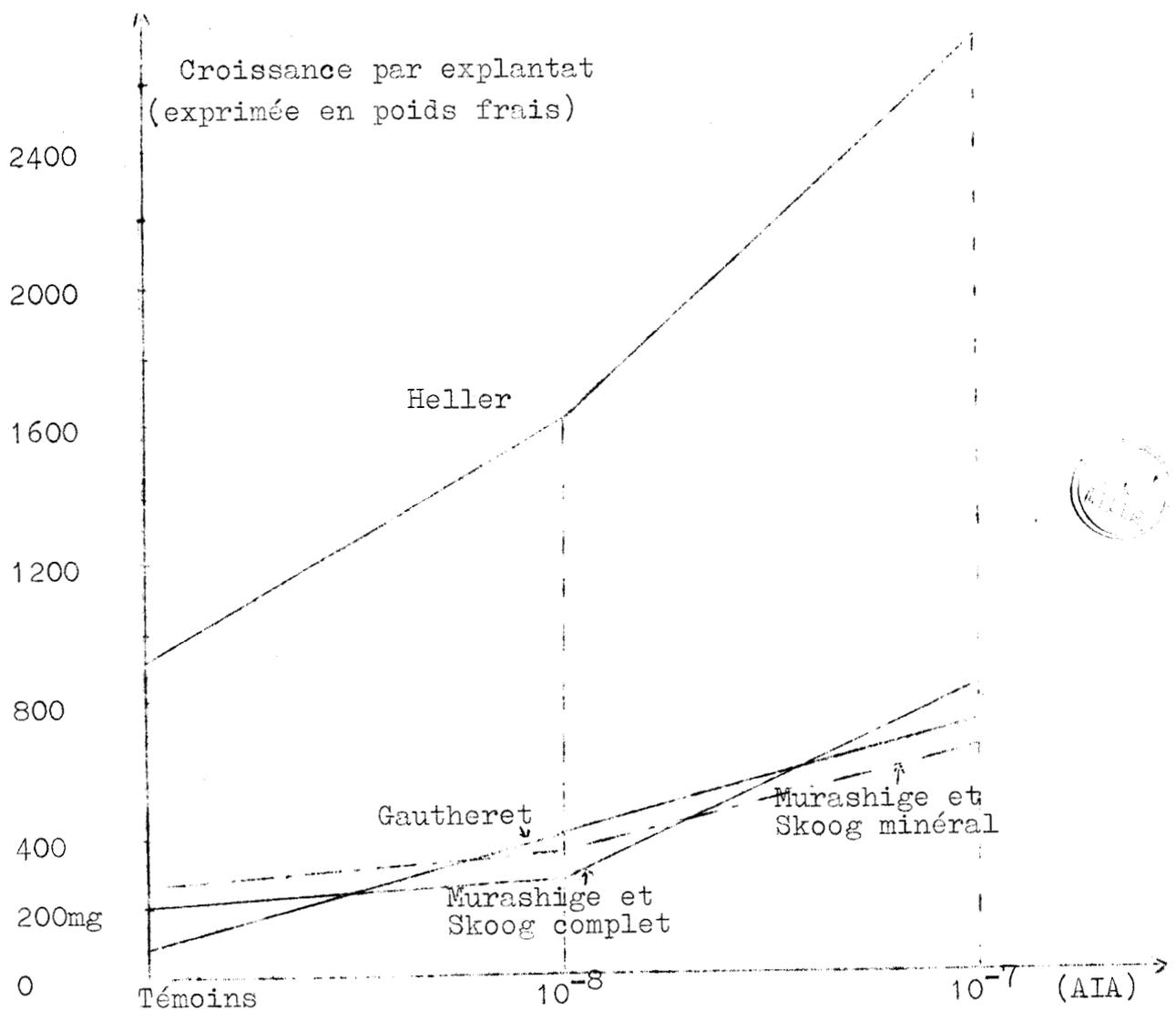


Figure 2. Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la croissance en poids frais des fragments de racines de Salsifi.

La croissance des tissus augmente nettement avec la concentration en AIA, elle est doublée à 10^{-8} et triplée à 10^{-7} . Les milieux de Gautheret et de Murashige et Skoog ont une action sensiblement identique, mais bien inférieure à celle du milieu de Heller

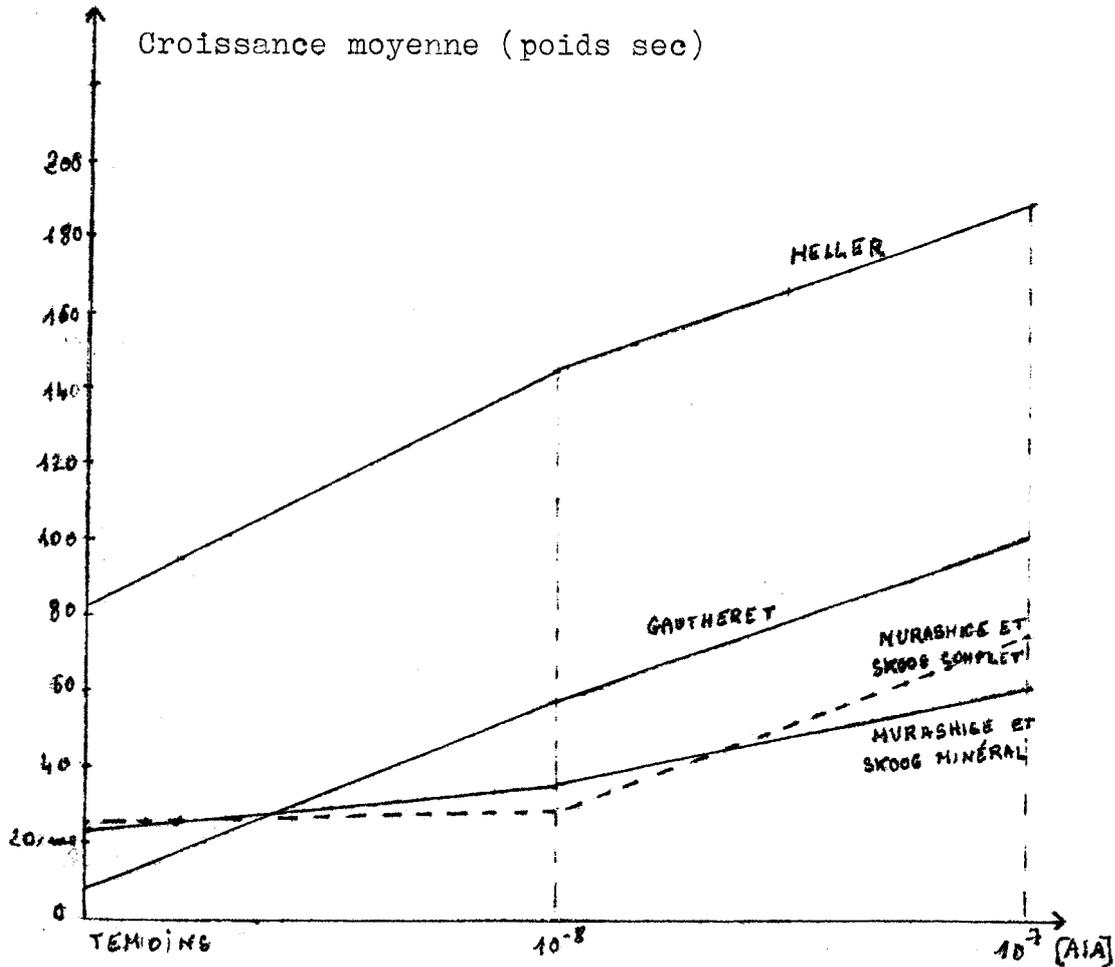


Fig. 3 - Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog sur la croissance en poids sec des fragments de racines de Salsifi.

Sur les explantats des bourgeons sont apparus mais toujours dans les régions situées hors du milieu.

Les substances organiques du milieu de Murashige et Skoog ne provoquent dans leur ensemble aucune action sur la prolifération cellulaire. Le bourgeonnement est réduit par l'auxine dès la concentration de 10^{-7} g/l

MILIEUX (AIA)	GAUTHERET			HELLER			Murashige et Skoog minéral			Murashige et Skoog complet		
	0	10^{-8}	10^{-7}	0	10^{-8}	10^{-7}	0	10^{-8}	10^{-7}	0	10^{-8}	10^{-7}
Nombre moyen de bourgeons par ex- plantat	0,30	0,77	0,26	0,70	1,29	0,47	0,62	0,75	0,46	1,00	1,47	1,20
Longueur moyenne des feuilles des bourgeons mm.	20,4	72,6	44,0	39,0	115,1	23,4	53,3	61,9	57,7	60,6	86,2	82,6

Tableau - 4. Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog sur la formation de bourgeons par les fragments de racines de Salsifi

2 - La souche normale

Cette souche provient de repiquages successifs sur le milieu de Gautheret, qui contient en outre 5 % de glucose et 510^{-8} d'AIA. Les explantats s'accroissent relativement vite sitôt après le repiquage, se couvrent d'une pellicule brunâtre, puis la croissance se ralentit si bien qu'il faut attendre 63 jours pour pouvoir faire une comparaison

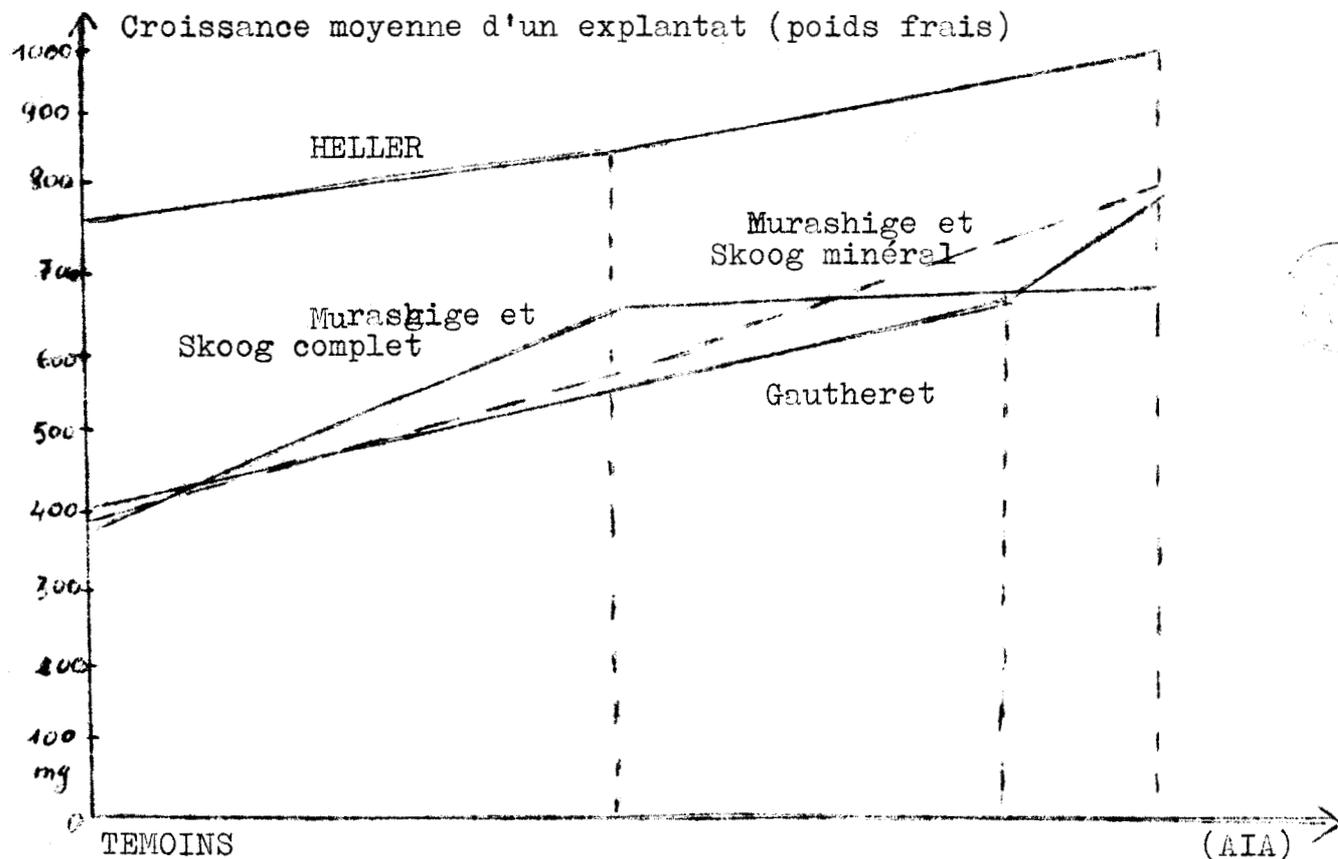


Fig. 4 - Action des milieux de Gautheret, de Heller, de Murashige et Skoog (minéral et Complet) sur la croissance en poids frais des explantats de souche normale de Scorsonère.

Comme le montre la figure 4, la croissance des explantats, exprimée en poids frais, est fonction de la teneur du milieu en auxine dont l'effet optimum se manifeste à 10^{-7} g/ml. Cependant avec le milieu de Murashige et Skoog complet, cette concentration semble déjà trop forte.

Le milieu de Heller est nettement le plus favorable à la croissance cellulaire

MILIEUX	(AIA)	Croissance en poids sec par explantat	Nombre moyen de bourgeons par explantat
Gautheret	0	61,838	0,57
	10^{-8}	63,468	0,62
	10^{-7}	80,631	0,48
Heller	0	81,358	1,07
	10^{-8}	81,155	1,12
	10^{-7}	89,752	0,97
Murashige et Skoog minéral	0	35,142	0,40
	10^{-8}	51,184	0,55
	10^{-7}	71,390	0,52
Murashige et Skoog complet	0	34,604	1,87
	10^{-8}	65,735	2,10
	10^{-7}	45,521	1,27

Tableau 2 - Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la croissance (poids sec) et sur le nombre moyen de bourgeons apparus sur les colonies de tissus normaux de Scorsonère.

A la fin de l'expérience, les explantats sont immergés, car dès l'apparition de bourgeons sur les souches, le milieu gélosé se liquéfie. Le nombre de ces bourgeons (Tableau 2) bien que faible est le plus important pour une concentration d'AIA de 10^{-8} puis décroît à 10^{-7}

Le milieu de Murashige et Skoog est le plus favorable à la néoformation de bourgeons. Outre l'AIA, les substances organiques du milieu de Murashige et Skoog sont pratiquement sans influence.

11 - Tissus n'ayant pas un besoin absolu d'auxine

A - Tissu de Carotte

La Carotte fut une des premières plantes à être utilisée pour la réalisation des cultures de tissu "in vitro".

1 - Ensemencement primaire

Les fragments de racine de Carotte mis en culture comprennent du cambium, du phloème et du xylème facilement reconnaissables. L'ensemencement se fait de telle sorte que la face foliaire plonge dans le milieu qui contient 3 % de glucose et éventuellement de l'acide indolylacétique à 10^{-8} ou 10^{-7} g/ml. Dès le cinquième jour, le tissu cambial prolifère, formant un bourrelet parenchymateux à la face radriculaire. Cette prolifération augmente et forme un cal de teinte verte. Le xylème proche de la zone génératrice s'accroît vigoureusement, tandis que sans auxine le phloème ne prolifère pas. Quand la concentration d'AIA est de l'ordre de 10^{-8} g/ml, le cambium et le xylème prolifèrent davantage, surtout dans la région radriculaire, mais aussi sur les faces latérales et le phloème produit de petits mamelons isolés avec 10^{-7} d'auxine l'ensemble de la face radriculaire se trouve recouverte par le cal. L'expérience dura 38 jours.

Pour chaque milieu, la prolifération cellulaire augmente avec la concentration en acide indolylacétique jusqu'à 10^{-7} sauf pour le milieu de Murashige et Skoog où la toxicité de l'AIA apparaît dès 10^{-7} g/ml. La croissance la moins importante s'observe avec le milieu de Gautheret, au contraire la plus exubérante s'observe en présence du milieu de Heller. Les substances organiques (sauf l'AIA) du milieu de Murashige et Skoog n'ont dans leur ensemble aucune action. Aucune organogénèse n'apparaît, les concentrations en AIA utilisées n'étant pas suffisantes pour produire des racines.

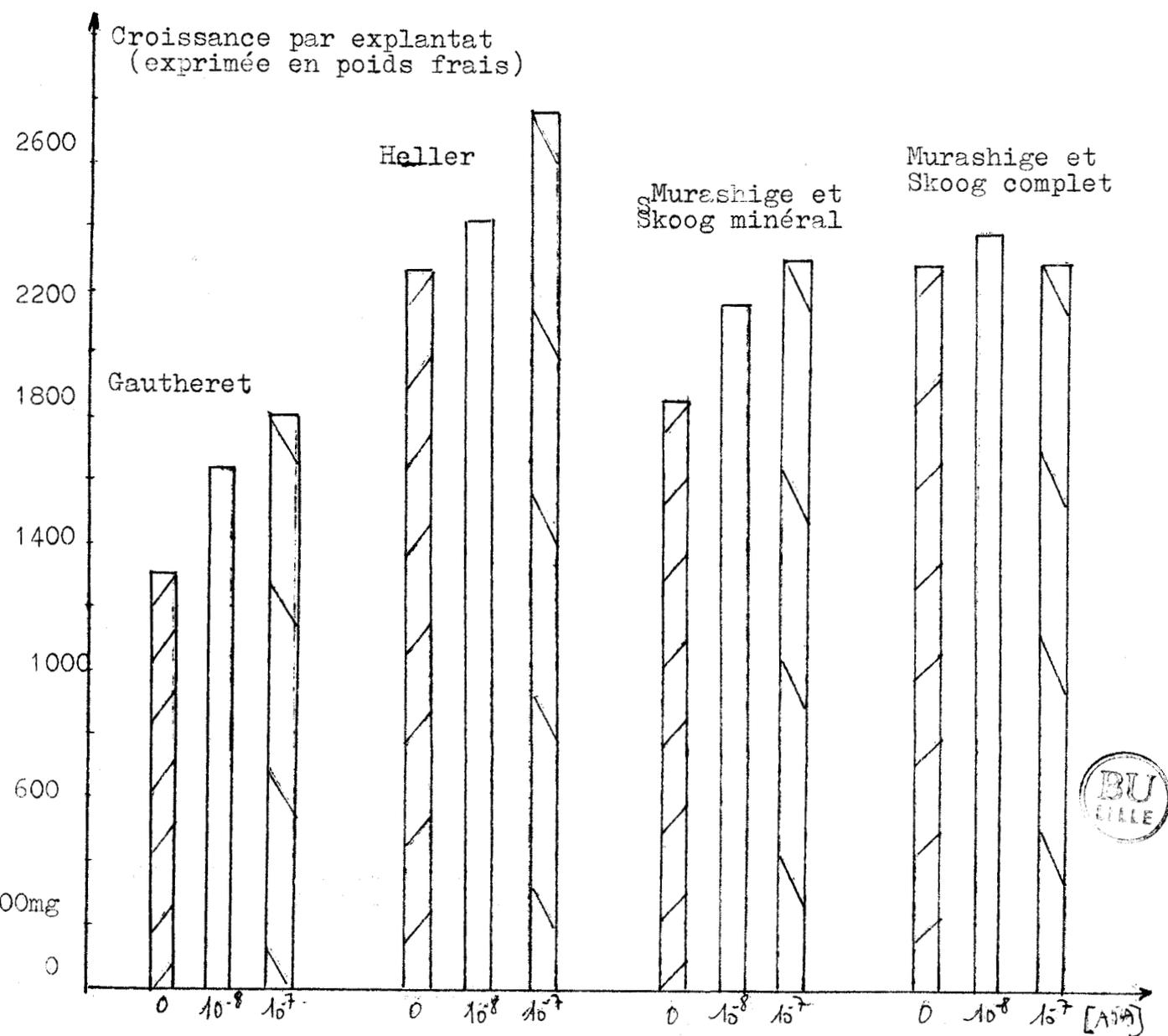


Figure 5. Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur les fragments de racine de Carotte ensemencés la zone foliaire dans le milieu de culture.

2 - Souche normale

En 1955 Melle PARIS remarque que la souche normale de Carotte est insensible à l'action des vitamines, bien que ces substances puissent exercer une certaine action en présence de lait de coco. En 1961, Pilet étudie l'action de la kinétine ajoutée au milieu de Heller, sur une souche particulière appelée N A (Carotte nantaise améliorée) Cette souche est capable selon les doses d'auxine et de kinétine de produire des racines ou des bourgeons, mais Pilet souligne que cette organogénèse varie énormément avec la souche. Ces différentes substances faisant partie du milieu de Murashige et Skoog, il était donc intéressant de comparer l'action de ce milieu à celle connue des milieux de Gautheret et Heller.

La souche provient de repiquages successifs sur le milieu de Heller enrichi de la solution d'oligoéléments de Gautheret, de glucose (3 %) et d'AIA ($5 \cdot 10^{-8}$) Les explantats sont repiqués sur les milieux de Gautheret, de Heller, sur la solution minérale de Murashige et Skoog ou sur le milieu complet proposé par ces auteurs. Dans chaque cas, l'on ajoute 5 % de glucose et éventuellement de l'AIA à 10^{-8} ou 10^{-7} . Les milieux sansauxine nous servent de témoins.

L'expérience dure 46 jours.

En absence d'auxine, les tissus ne prolifèrent que faiblement (environ 300 mg) quel que soit le milieu utilisé. L'AIA exalte la croissance, mais son effet varie selon le milieu utilisé : faible avec le milieu de Gautheret, il est au contraire très spectaculaire avec celui de Heller. Le milieu (minéral ou complet) de Murashige et Skoog a une action intermédiaire.

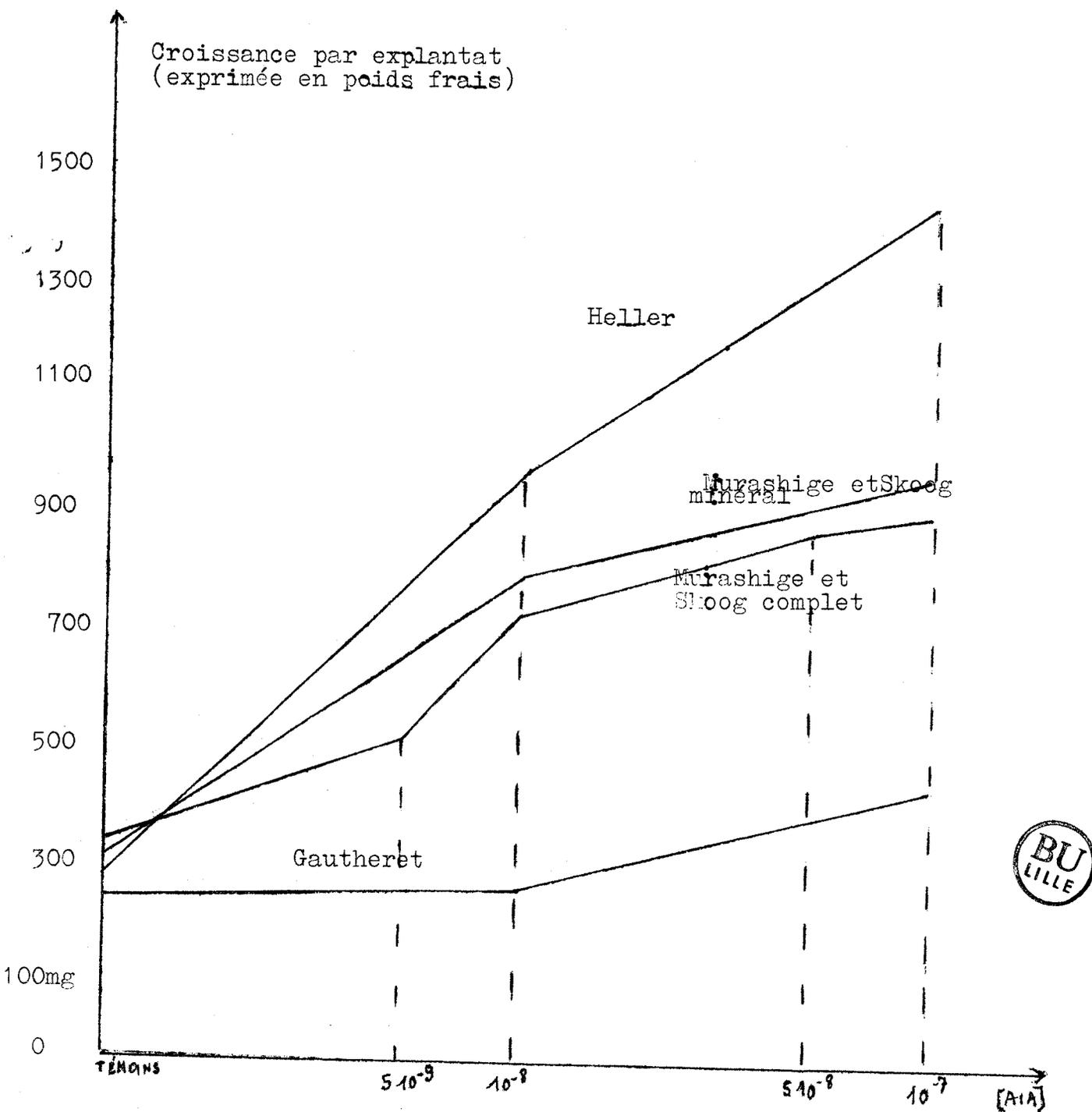


Figure 6. Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (complet ou non) sur la souche de Carotte.

B - Souche normale de Vigne Vierge

Cette souche est entretenue sur le milieu de Heller auquel nous ajoutons la solution de microéléments de Gautheret, de la vitamine B1 à 10^{-6} et de l'AIA à 10^{-8} . Les explantats sont repiqués sur les milieux de Gautheret, de Heller, de Murashige et Skoog (complet ou seulement minéral). Ces milieux contiennent en outre 5 % de glucose et éventuellement de l'AIA à 10^{-8} ou 10^{-7} . La souche normale de Vigne Vierge ayant une croissance lente, l'expérience dure 90 jours

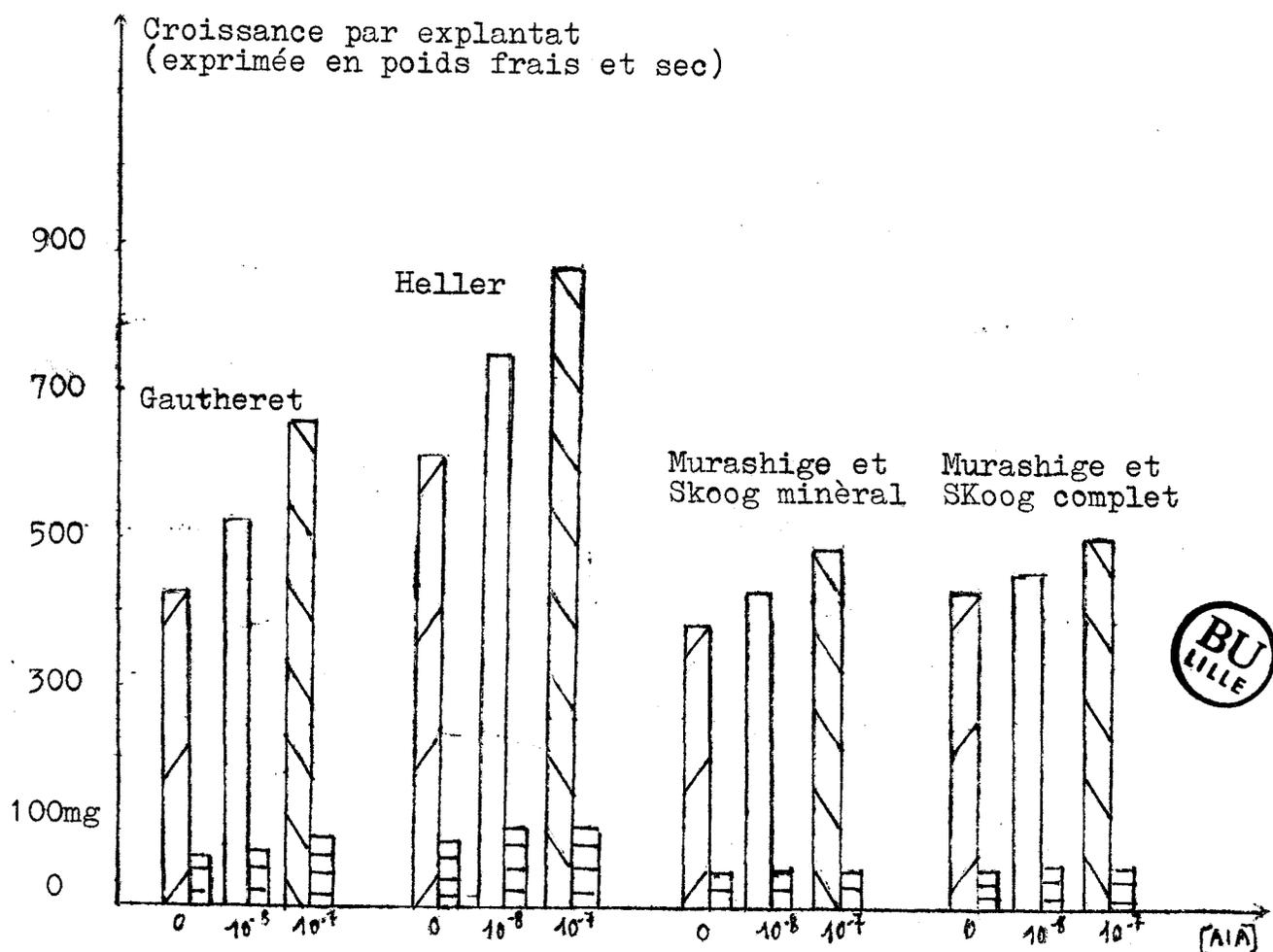


Figure 7 Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la croissance en poids frais et sec de tissus normaux de Vigne Vierge.

La croissance des explantats (figure 7) augmente avec la teneur en AIA du milieu de culture. Le milieu de Heller est nettement le plus favorable. Celui de Murashige et Skoog (complet ou non) ne per-

met qu'un développement réduit des colonies tissulaires.

Pour la majorité des tissus étudiés jusqu'à présent, le milieu de Murashige et Skoog, bien que complexe, n'a pas provoqué une croissance particulièrement exubérante. Son action a toujours été (sauf pour le parenchyme vasculaire de Topinambour) bien inférieure à celle du milieu de Heller. Voyons quelle est son action sur un tissu capable de proliférer et de manifester des phénomènes d'organogénèse.

III - Tissu doué de propriétés d'organogénèse : L'Endive

A - Feuilles

1 - Action comparée des milieux de Gautheret, de Heller, de Murashige et Skoog

Les fragments de feuilles d'Endive sont pris dans la partie moyenne de la feuille, la base, l'apex étant abandonnés. Ces feuilles sont elles-mêmes choisies parmi les feuilles moyennes du bourgeon selon la méthode décrite par Vasseur 1965.

Ces explantats sont ensemencés dans les milieux de Gautheret, de Heller, de Murashige et Skoog (minéral et complet). A ces milieux l'on ajoute 3 % de glucose et éventuellement 10^{-8} ou 10^{-7} d'AIA

De petits cals apparaissent rapidement à la partie basale des fragments de feuille. Le douzième jour, les bourgeons prennent naissance à partir de ces cals, ils apparaissent légèrement plus tôt (10ème jour) sur le milieu de Murashige et Skoog.

Le 39ème jour après la mise en culture, les bourgeons sont comptés et mesurés, les cals détachés du fragment de feuille et on en détermine le poids sec.

La prolifération cellulaire et l'organogénèse sont de loin plus importantes sur les explantats ensemencés dans le milieu de Murashige et Skoog.

Pour chaque milieu, le poids des cals augmente avec la concentration en auxine, mais une comparaison précise entre les effets dus aux différents milieux n'est pas possible, car sur les fragments ensemencés dans le milieu de Murashige et Skoog, les cals apparaissent sur tout le pourtour de l'explantat et le bourgeonnement se produit sans aucune polarité. Les bourgeons étant très nombreux et parfois petits, il est difficile de les isoler correctement du cal

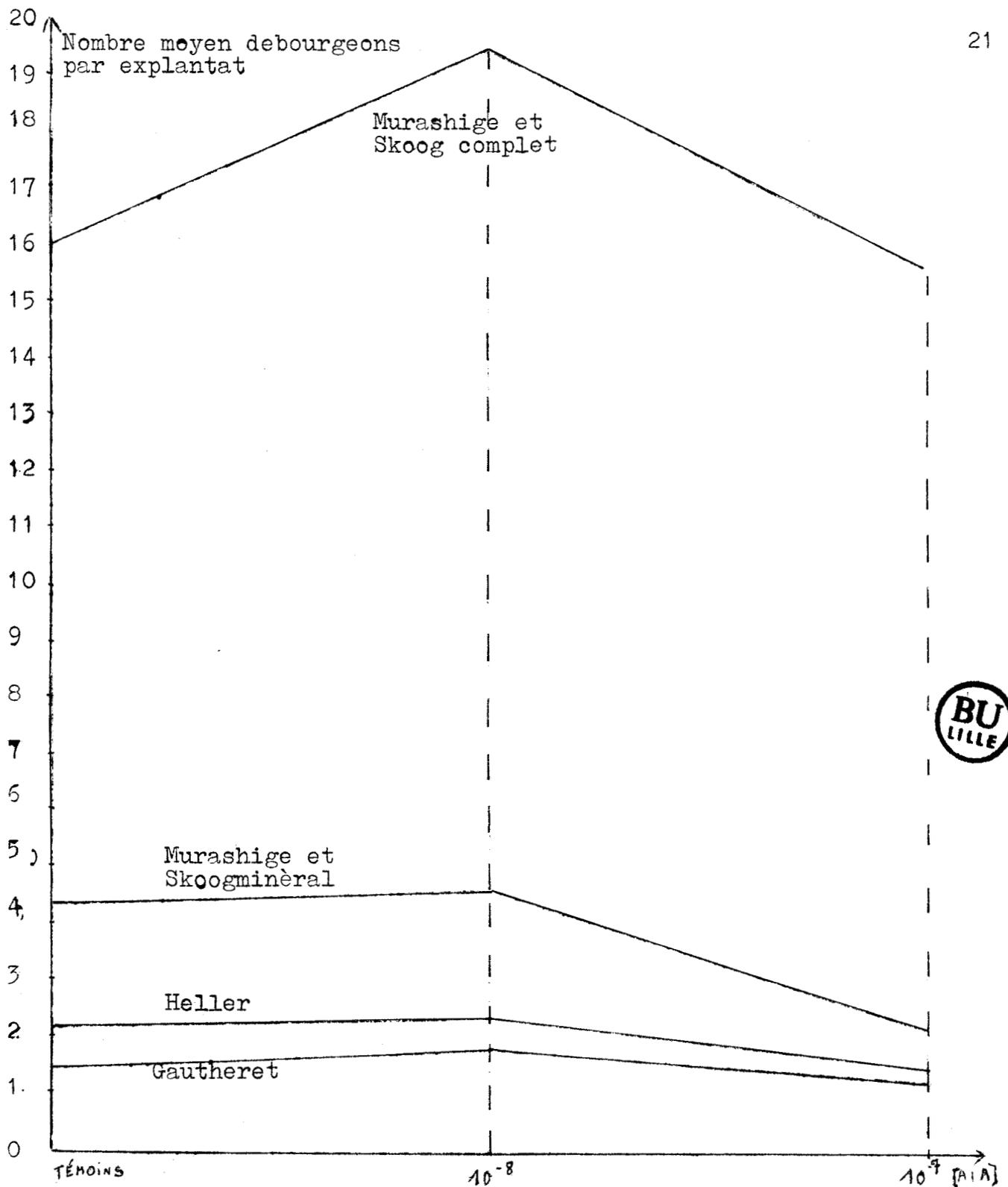


Figure 8. Action des milieux de Gautheret, de Heller, de Murashige et Skoog (minéral et complet) sur le nombre moyen de bourgeons apparus sur les fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans le milieu de culture.

Pour un milieu déterminé, le nombre des bourgeons est légèrement augmenté par 10^{-8} d'acide indolylacétique. De plus (figure 8) pour une même concentration en AIR, le nombre moyen de bourgeons est le plus faible pour les explantats ensemencés dans le milieu de Gautheret, un peu supérieur pour ceux du milieu de Heller. Il est multiplié par quatre par la solution minérale de Murashige et Skoog et par 15 par le milieu complet.

Ces bourgeons apparaissent toujours dans la région basale des fragments de feuilles d'Endive ensemencés dans les milieux de Gautheret et de Heller. Cette polarité n'est pas respectée pour les explantats ensemencés dans la solution minérale de Murashige et Skoog, car 7 à 8 % du nombre total de bourgeons apparaissent dans la région apicale alors que pour le milieu complet de Murashige et Skoog, cette proportion passe à 70 %



Fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans les milieux de Gautheret (Knop), de Heller, de Murashige et Skoog (minéral et complet)

Ces milieux ne contiennent pas d'AIR



Fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans les milieux de Gautheret (Knop), de Heller, Murashige Skoog minéral, Murashige et Skoog complet.

Ces milieux contiennent de l'AIA à 10^{-8}



Fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans les milieux de Gautheret (Knop), Heller, Murashige et Skoog minéral, Murashige et Skoog complet.

Ces milieux contiennent de l'AIA à 10^{-7} - La longueur des bourgeons est très différente selon les milieux

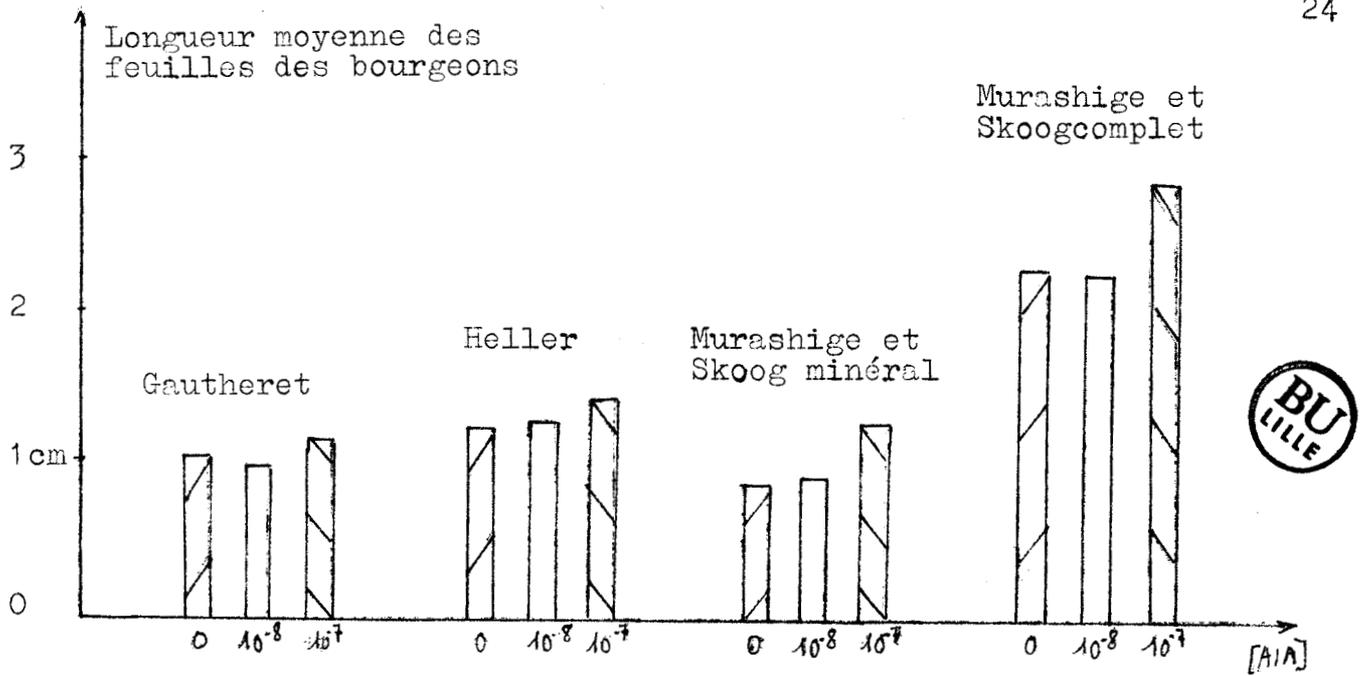


Figure 9. Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la longueur moyenne des feuilles des bourgeons apparus sur les fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans le milieu nutritif.

Les explantats ensemencés dans le milieu complet de Murashige et Skoog, produisent des bourgeons dont les feuilles sont les plus longues, alors que pour ceux ensemencés dans la solution minérale de Murashige et Skoog, les feuilles sont les plus courtes, atteignant à peine 8 mm. Les bourgeons ont alors une forme particulière, les feuilles plus courtes sont étalées et recourbées, les bourgeons plus épanouis.



Bourgeon particulier apparaissant sur les explantats ensemencés dans la solution minérale de Murashige et Skoog.



Bourgeon normal.

Il se forme aussi des racines, fines et peunombreuses. Leur nombre est variable, il augmente avec la concentration en AIA, mais pour une même concentration d'auxine, il est plus important sur les explantats ensemencés dans le milieu de Murashige et Skoog.

Le milieu de Murashige et Skoog est donc nettement plus favorable que les autres à la prolifération cellulaire et à la néoformation de bourgeons par les fragments de feuilles d'Endive. Ces actions sont dues aux substances organiques composant ce milieu puisqu'avec la solution minérale de Murashige et Skoog nous n'avons pas observé ces effets spectaculaires.

Les travaux de Bouriquet et Vasseur incitent à nous demander si cette action ne serait pas due à la présence de facteurs tels la kinétine ou l'AIA dont les doses ne sont pas nettement fixées par Murashige et Skoog.

2 - Action du milieu de Murashige et Skoog, les concentrations d'AIA et de kinétine variant

Faisons varier, à l'intérieur du milieu de Murashige et Skoog les concentrations de ces deux substances. Le milieu sans auxine et sans kinétine nous servira de témoin. L'ensemencement des explantats se fait toujours la zone apicale dans le milieu et l'expérience dure 39 jours comme la précédente.

En absence de kinétine, la croissance cellulaire augmente légèrement avec la concentration en AIA. Réciproquement, en absence d'AIA, la prolifération cellulaire augmente avec la kinétine dont l'effet optimum s'exerce à 10^{-6} . La prolifération cellulaire ainsi obtenue est doublée pour 10^{-8} d'AIA, triplée par 10^{-6} . L'auxine agit ainsi en synergie avec la kinétine.

Le nombre moyen des bourgeons néoformés par les explantats varie selon la teneur en facteur de croissance. La kinétine a un effet très favorable puisque ce nombre passe de 3,30 pour le témoin à 16,50 pour une concentration de 10^{-6} de kinétine. L'AIA, au contraire, ne favorise que faiblement l'apparition des bourgeons jusqu'à 10^{-7} , alors qu'aux doses plus élevées, il y a une inhibition

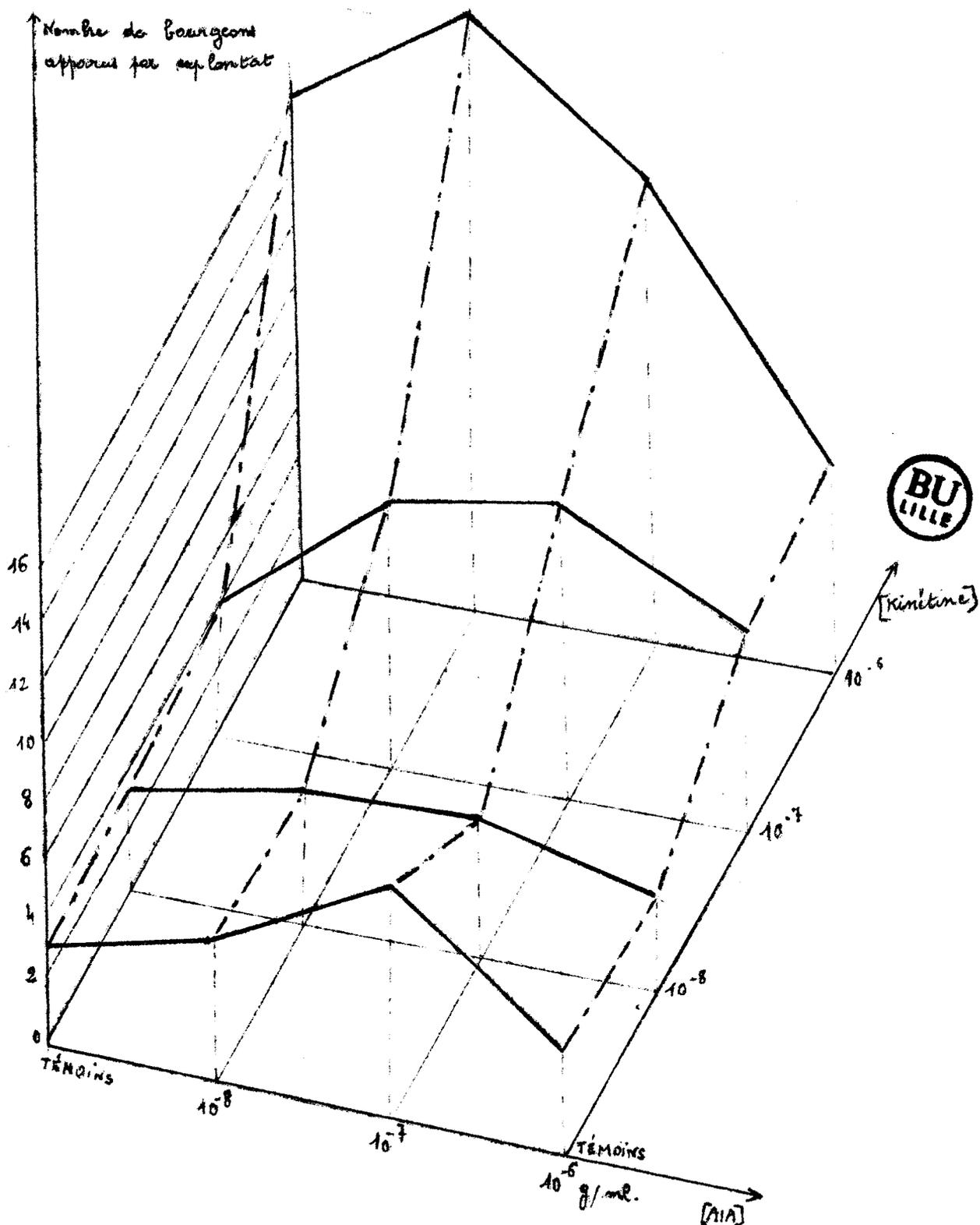


Figure 10 Nombre moyen de bourgeons apparus sur des fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans le milieu de Murashige et Skoog les concentrations de la kinétine et de l'acide indolylacétique variant de 10^{-8} à 10^{-6}

très marquée. Le graphique 10 montre que la kinétine et l'auxine agissent en synergie, le plus grand nombre de bourgeons étant obtenu pour une concentration de 10^{-6} en kinétine et de 10^{-8} et 10^{-7} en AIA, le nombre moyen de bourgeons étant alors de 20,30 et 15,80.

Signalons que ces moyennes sont faites sur un nombre d'explantats compris entre 20 et 24.

La longueur moyenne des feuilles des bourgeons est également influencée. En présence de kinétine seule, les bourgeons ont tendance à être longs et frêles, tandis qu'avec l'auxine, ces bourgeons sont plus gros, le nombre des feuilles étant plus élevé.

[Kinétine] [AIA]	0	10^{-8} g/ml	10^{-7}	10^{-6}
0	6,8mm	6,9	14,9	21,0
10^{-8}	8,0	9,9	14,2	22,5
10^{-7}	10,3	17,9	27,3	25,8
10^{-6}	15,5	24,3	31,9	40,3

Tableau 3. Longueur moyenne des feuilles des bourgeons apparus sur les fragments de feuilles d'Endive ensemencés la face apicale dans le milieu de culture (milieu de Murashige et Skoog), les concentrations de kinétine et d'acide indolylacétique variant de 10^{-8} à 10^{-6} .

Comme nous l'avons déjà signalé, ces bourgeons ne respectent pas une polarité aussi stricte qu'avec les milieux de Gautheret ou de Heller, où ils apparaissent essentiellement dans la région basale des explantats.

[Kinétine] [AIA]	0	10^{-8} g/ml	10^{-7}	10^{-6}
0	6,01%	39,02	66,66	87,87
10^{-8} g/ml	18,95	38,88	59,32	94,82
10^{-7}	26,13	56,00	78,25	95,12
10^{-6}	23,22	25,00	75,88	99,00



Tableau 4. Pourcentage de bourgeons apparus à la face apicale des explantats de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans le milieu de Murashige et Skoog où les concentrations de kinétine et d'acide indolylacétique varient de 10^{-8} à 10^{-6} . Le milieu sans auxine et sans kinétine nous sert de témoin.

L'auxine et surtout la kinétine sont responsables de cette modification. Le pourcentage des bourgeons formés à la face apicale passe de 6,01% en absence de kinétine à 66,66% pour 10^{-7} de kinétine et à 87,87% pour 10^{-6} . Auxine et kinétine associées ont des effets synergiques, ce pourcentage atteignant 99% en présence de

Outre les bourgeons, les explantats peuvent produire des racines dont le nombre et le développement sont variables.

Comme cela est bien connu; l'acide indolylacétique stimule la rhizogénèse. L'effet augmente avec la dose, il est maximum à 10^{-6} . Contrairement à ce qu'on pouvait prévoir, la kinétine stimule également la formation de racines, mais cette action s'exerce surtout aux faibles concentrations (10^{-8} et 10^{-7}). Aux concentrations élevées (10^{-6}), la kinétine est inhibitrice. Si l'on associe $4 \cdot 10^{-6}$ d'AIA à 10^{-7} de kinétine, le nombre de racines est le plus important, certains explantats se trouvant recouverts d'un grand nombre de très fines racines.

Le milieu de Murashige et Skoog comprenant une partie minérale et une partie organique complexe, il s'agit de savoir si à l'intérieur de ce milieu, d'autres substances ne seraient pas responsables de l'organogénèse et de la prolifération cellulaire.

3- Action due à l'association des substances organiques.

Les substances organiques autres que la kinétine et l'AIA n'agissent pas sur la prolifération cellulaire des explantats qui est déjà très fortement stimulée par la kinétine et l'auxine.

Le nombre moyen de bourgeons est important pour tous les explantats.

Le glyco-colle et les vitamines (figure 11) diminuent la néoformation de bourgeons, l'hydrolysate de caséine le stimule légèrement.

Les associations auxine-kinétine appliquées à la solution minérale de Murashige et Skoog provoquent une plus grande formation de bourgeons que lorsqu'elles sont appliquées à la solution complète.

Le développement des feuilles des bourgeons n'est pratiquement pas influencé. La longueur moyenne est de l'ordre de 20mm pour les séries A et de 25mm pour les séries B.

Sur tous les explantats, 90 à 95% des bourgeons apparaissent dans la zone apicale.

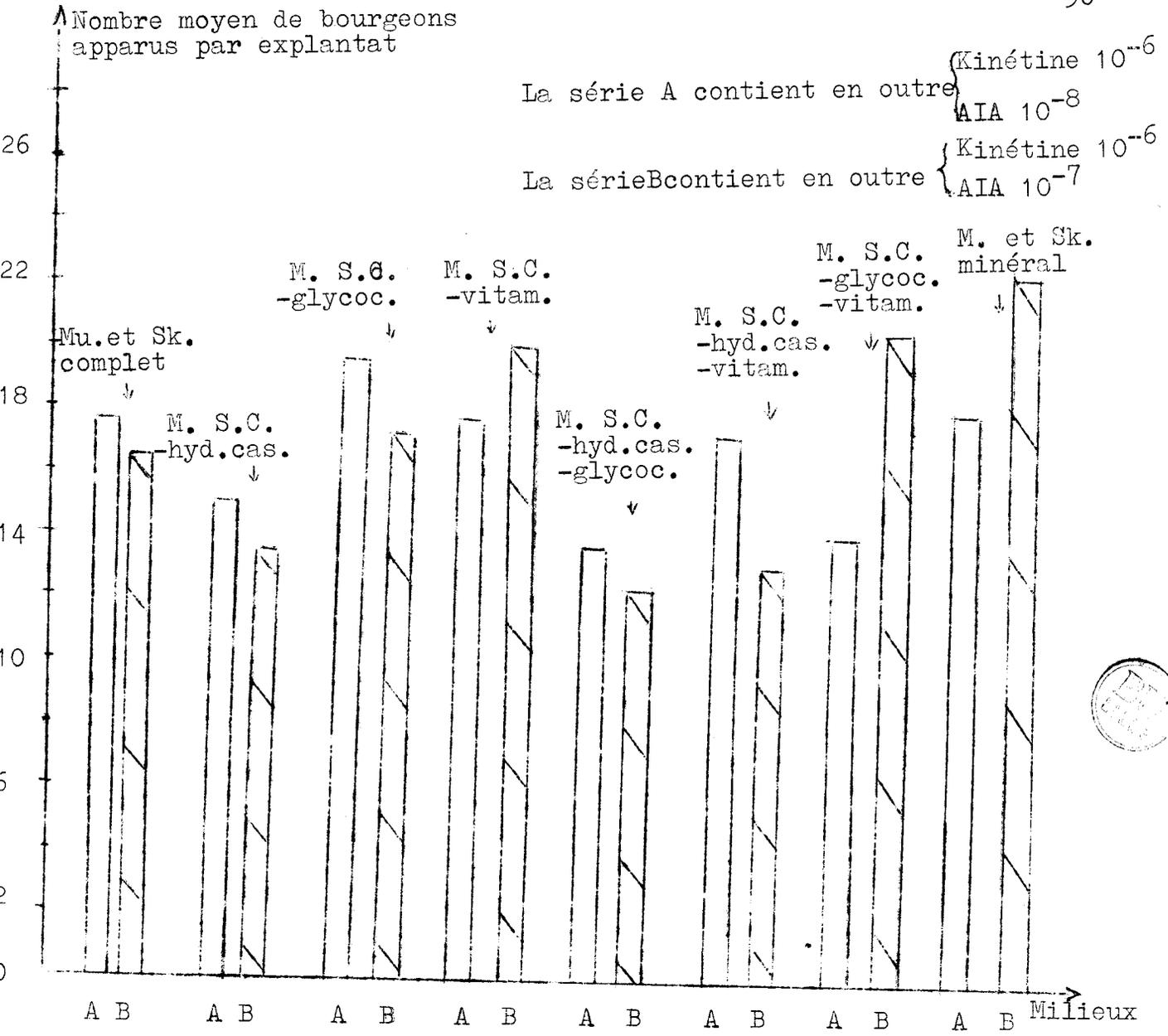


Figure 11. Nombre moyen de bourgeons apparus sur les fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans le milieu de Murashige et Skoog duquel on a été différentes substances organiques.

4 - Rôle de chacun des éléments organiques

On pouvait toutefois se demander si les résultats obtenus n'étaient pas dus à certains effets synergiques. Afin de préciser le rôle de chacun des éléments organiques du milieu de Murashige et Skoog, on les ajoute séparément à la partie minérale de ce milieu.

L'expérience dure 39 jours.

Les caïls se développent toujours dans la région basale des explantats sauf quand le milieu contient de la kinétine (c'est-à-dire les milieux dénommés SM + kinétine et Murashige et Skoog complet). Dans ce cas les caïls apparaissent sur tout l'explantat.

MILIEUX	Poids frais des caïls en mg	Poids sec des caïls en mg
Murashige et Skoog Minéral (M.S.M.)	54,375 mg	3,462 mg
MSM + hydrolysate de caséine	57,637	3,121
MSM + glycolle	55,871	3,268
MSM + myo-inositol	55,753	3,848
MSM + pyridoxine	64,427	4,019
MSM + Vitamine B ₁	53,191	3,083
MSM + acide nicotinique	44,107	1,905
MSM + kinétine 10 ⁻⁶	158,386	7,378
MSM + AIA 10 ⁻⁸	100,556	6,049
Murashige et Skoog complet	497,313	19,601



TABLEAU 5 : Croissance pondérale des caïls formés par les fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans le milieu minéral de Murashige et Skoog auquel l'on ajoute séparément chaque substance organique.

De toutes les substances organiques, seuls la kinétine et l'acide indolylacétique provoquent une prolifération cellulaire importante, puisque le poids des cals qui est de 54,3 mg sur la solution minérale de Murashige et Skoog, est doublé quand on ajoute 10^{-8} d'auxine, est triplé quand on ajoute 10^{-6} de kinétine. Enfin, le cal est neuf fois plus important si les deux substances agissent simultanément.

Les substances organiques telles que l'hydrolysate de caséine, le glycolle le myo_inositol, la pyridoxine, la vitamine B₁, l'acide nicotinique ne favorisent pas le bourgeonnement.

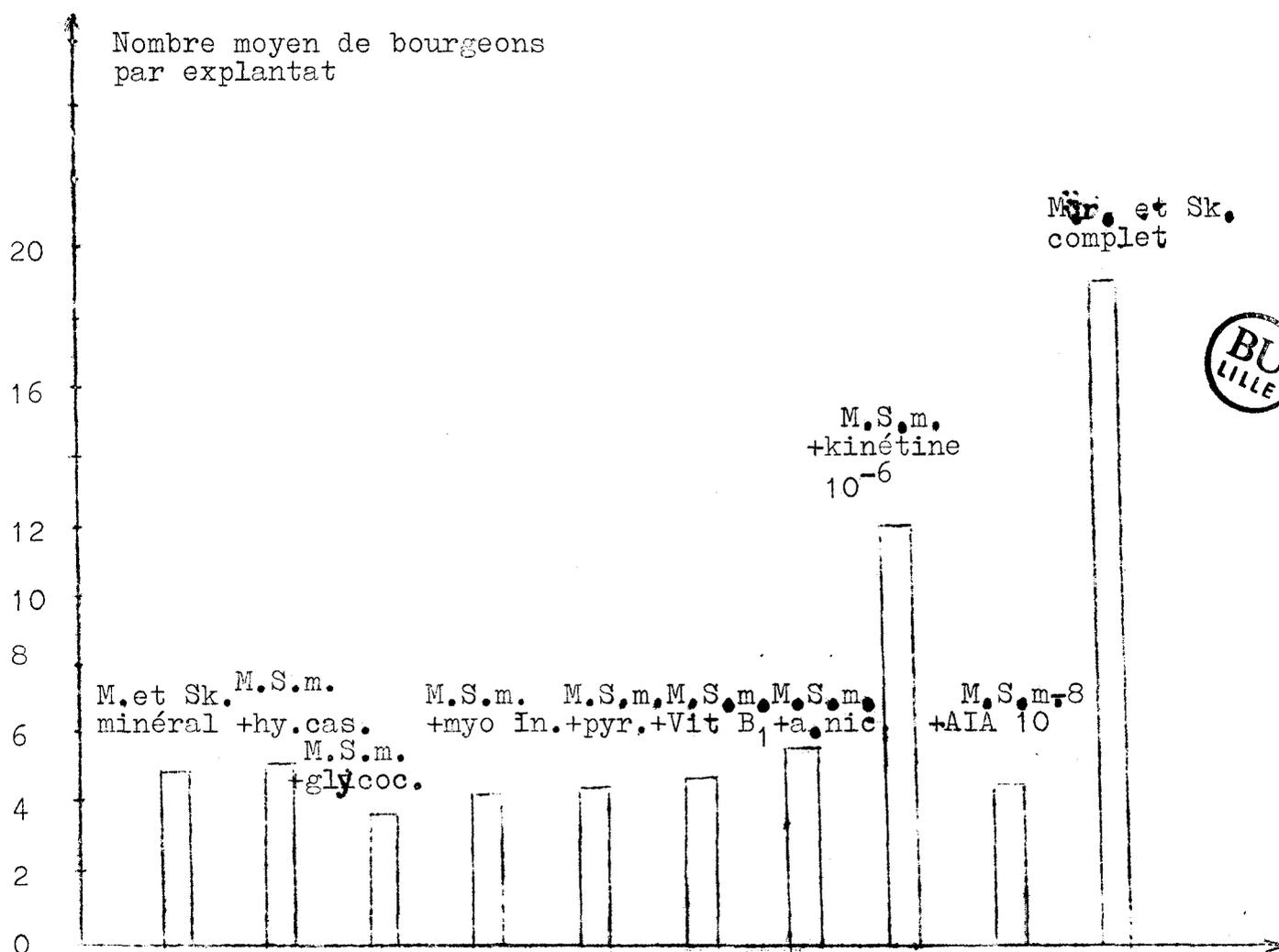
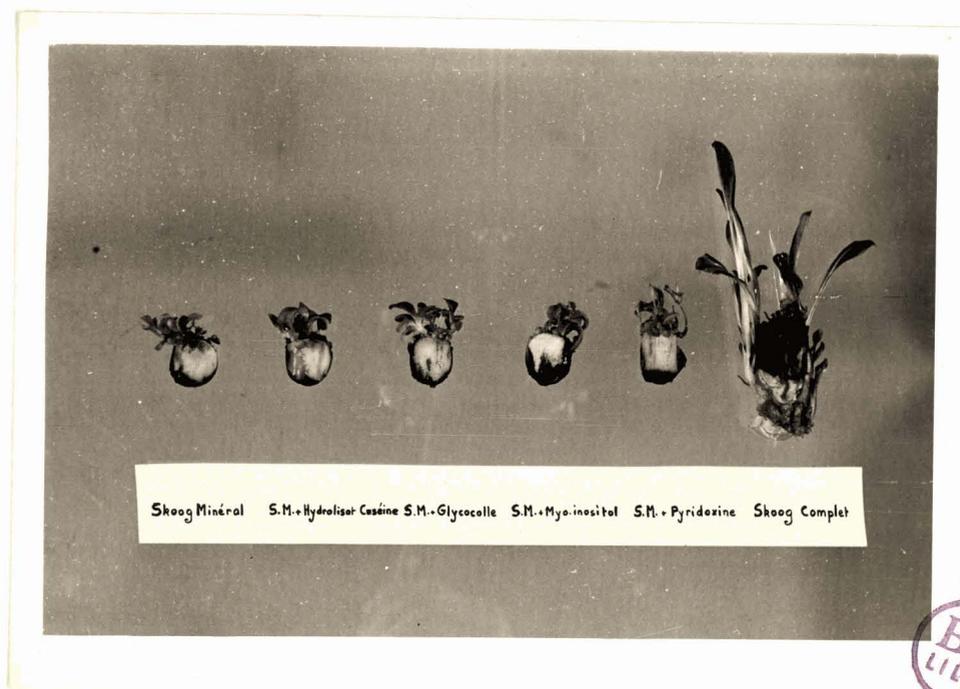
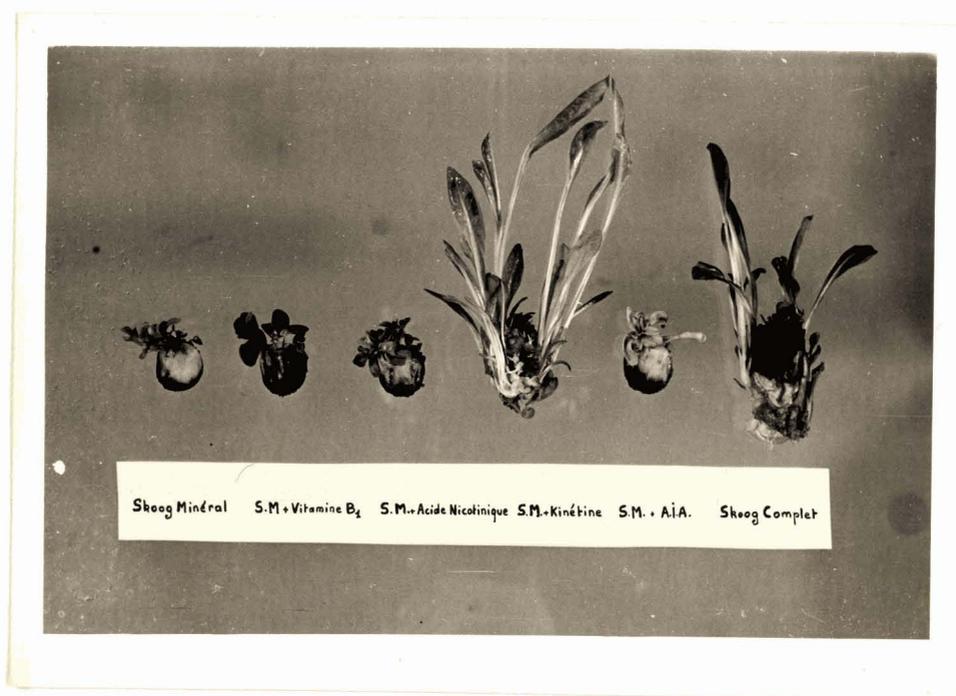


Figure 12 : Influence des différents éléments organiques du milieu de Murashige et Skoog sur la néoformation des bourgeons produits par les fragments de feuilles d'Endive ensemencés la zone apicale dans le milieu de culture.



Influence des différents éléments organiques du milieu de Murashige et Skoog sur les fragments de feuilles d'Endive ensemencés leur région apicale dans le milieu de culture. .



Quant à l'acide indolylacétique son seul effet est de favoriser légèrement la croissance des feuilles, son action restant toutefois

toujours plus faible que celle de la kinétine

Toutes les substances organiques (sauf la kinétine) ne modifient pas la forme particulière des bourgeons qui semble due à la solution minérale de Murashige et Skoog. Cette particularité est même renforcée par la vitamine B 1

A 10^{-6} g/ml, la kinétine seule donne naissance à des bourgeons dont les feuilles sont très longues : 20,6 mm de moyenne

MILIEUX	Longueur moyenne des feuilles des bourgeons	Pourcentage de bourgeons apparus sur la zone apicale
Murashige et Skoog minéral	8,7 mm	4,76 %
MSM + Hydrolysate de caséine	9,4	6,77
MSM + Glycocolle	9,0	2,32
MSM + Myo-inositol	11,2	1,96
MSM + Pyridoxine	10,2	1,92
MSM + Vitamine B 1	10,2	9,25
MSM + Acide nicotinique	11,7	10,60
MSM + Kinétine 10^{-6}	20,6	50,34
MSM + AIA 10^{-8}	13,5	10,00
Murashige et Skoog complet	20,8	93,00

Tableau 6 - Influence des différents éléments organiques du milieu de Murashige et Skoog sur la croissance des feuilles et sur le pourcentage de bourgeons apparus dans la zone apicale des fragments de feuilles d'Endive ensemencés la région apicale dans le milieu de culture

La majorité des bourgeons apparaissent dans la zone basale des fragments de feuilles, sauf en présence de kinétine, ce qui confirme les résultats précédents.



B - RACINE

Chaque fragment comporte du cambium, du xylème et du phloème. Il est ensemencé de telle sorte que la face radicaire soit dans le milieu de culture.

Rapidement de petits cals apparaissent à la face radicaire, intéressant la zone génératrice, le phloème et le xylème. Cependant, cette polarité n'est pas absolue car la face foliaire produit également de petits mamelons au niveau de la zone génératrice et du phloème. Dès le onzième jour, les bourgeons apparaissent sur les explantats ensemencés dans la solution minérale au complète de Murashige et Skoog et le douzième jour seulement sur ceux ensemencés dans le milieu de Gautheret ou de Heller. Dès l'apparition des bourgeons, le développement du cal se ralentit. Les bourgeons croissent rapidement jusqu'au bout de 22 jours il nous faut arrêter l'expérience, les bourgeons devenant trop importants, les feuilles touchant le coton hydrophile



Action des milieux de Gautheret (Knop) Heller, Murashige et Skoog minéral Murashige et Skoog complet sur les fragments de racine d'Endive. Les milieux ne contiennent pas d'acide indolylacétique



Action des milieux de Gautheret (Knop) Heller, Murashige et Skoog minéral, Murashige et Skoog complet sur les fragments de racine d'Endive. Les milieux contiennent 10^{-8} d'AIA



Action des milieux de Gautheret (Knop), Heller, Murashige et Skoog minéral, Murashige et Skoog complet sur les fragments de racines d'Endive. Les milieux contiennent 10^{-7} d'AIA

La prolifération cellulaire se mesure par l'augmentation de poids sec due à la multiplication des cellules et à leur croissance. Elle augmente nettement avec la concentration d'auxine: le poids frais du cal se trouvant multiplié par 2 pour une concentration de 10^{-8} d'AIA et par 3 pour 10^{-7} . La kinétine présente dans le milieu de Murashige et Skoog complet agit fortement sur la multiplication cellulaire: cet effet est surtout visible sur la photo témoin.

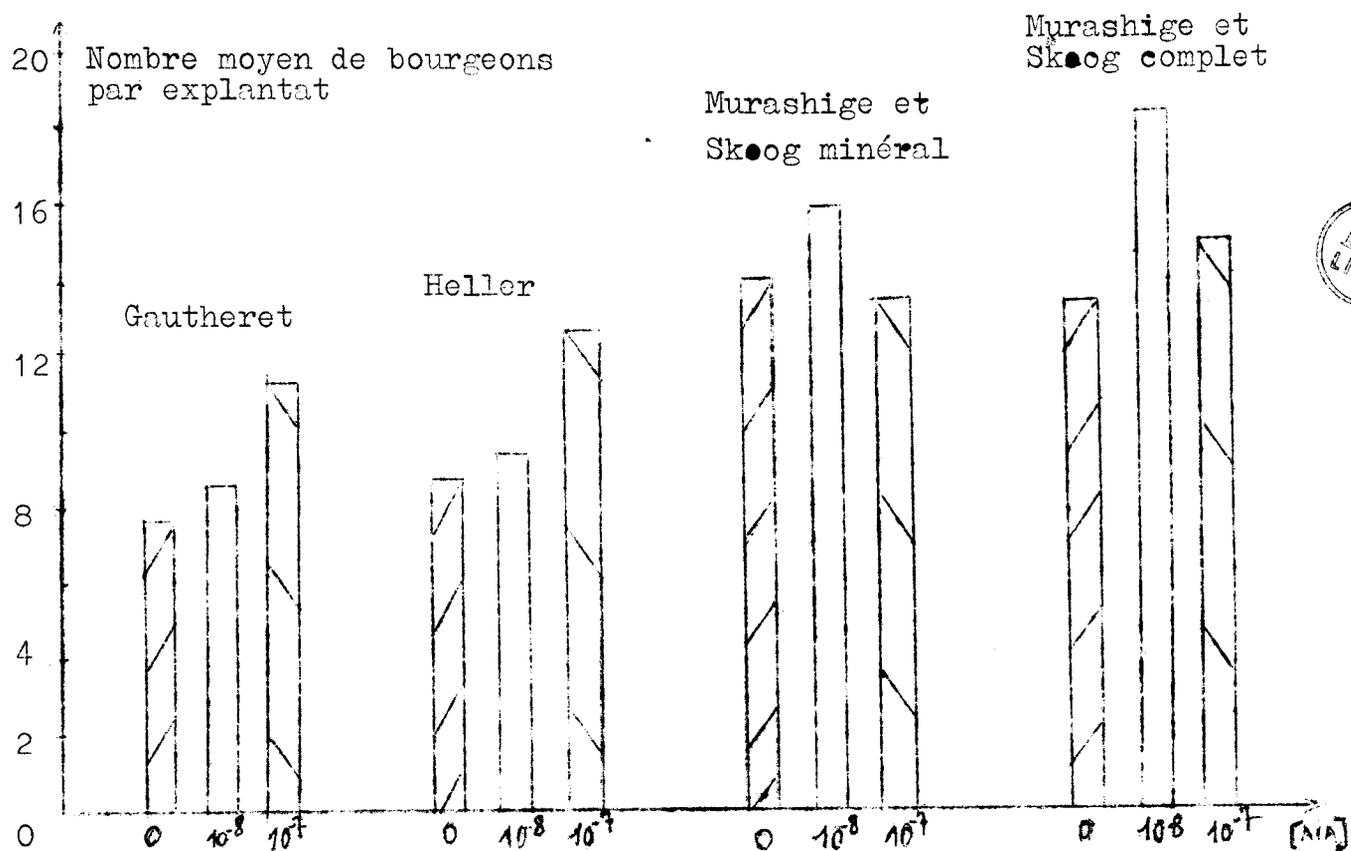


Figure 13. Influence des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (complet ou non) sur le nombre moyen de bourgeons apparus sur les fragments de racines d'Endive.

Pour une même concentration d'auxine, les milieux de Murashige et Skoog minéral ou complet, sont les plus favorables au bourgeonnement. La faible différence entre ces deux milieux étant due à l'action de la kinétine. La croissance des feuilles augmente légèrement avec l'AIA, et la kinétine renforce l'action de l'auxine.

Les bourgeons apparus sur les fragmentsensemencés dans les milieux de Gautheret et de Heller apparaissent tous à la partie foliaire de ces fragments. Par contre, sur les fragmentsensemencés dans le milieu complet ou non de Murashige et Skoog, les bourgeons apparaissent aussi dans la région radiculaire (tableau 7)

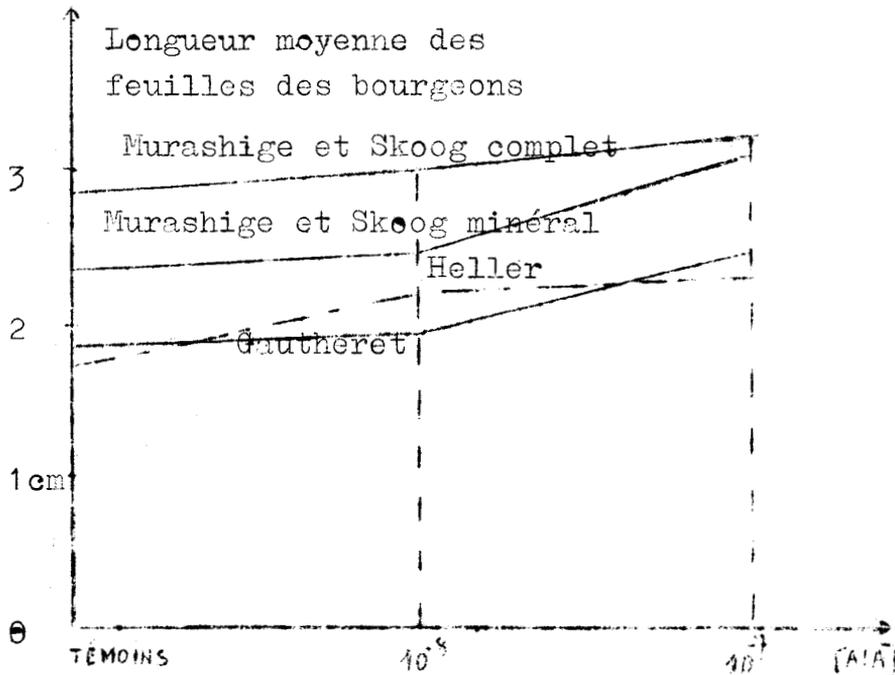


Figure 14. Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la longueur des feuilles des bourgeons apparus sur les fragments de racines d'Endive.

MILIEUX	Murashige et Skoog minéral			Murashige et Skoog complet		
	0	10^{-8}	10^{-7}	0	10^{-8}	10^{-7}
(AIA)						
Pourcentage de bourgeons apparus à la face radiculaire	1,52	2,57	1,68	9,87	12,76	13,06
Pourcentage d'explantats ayant produit des bourgeons à la face radiculaire :	5,26	11,11	5,55	44,44	53,84	46,66

Tableau 7. Action du milieu de Murashige et Skoog (minéral et complet) sur le pourcentage des bourgeons apparus à la face radiculaire des fragments de racines d'Endive.

IV- Tissu autotrophe à l'auxine: la Ronce.

Après l'étude comparative de l'action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog sur des tissus sensibles à l'auxine, voyons quel sera le comportement d'un tissu indifférent à cette substance, la Ronce par exemple.

Kulescha 1951 montre que ce tissu est capable de proliférer sans auxine parce qu'il en élabore lui-même. Duhamet et Gautheret 1957 confirment ces résultats, montrent que l'AIA est inactif ; même ajouté à une substance qui comme le lait de coco agit fortement, il ne renforce pas l'action.

La souche de Ronce provient de repiquages successifs sur le milieu de Heller auquel l'on ajoute 5 % de glucose, 10^{-6} de vitamine B 1.

L'expérience dure 41 jours.

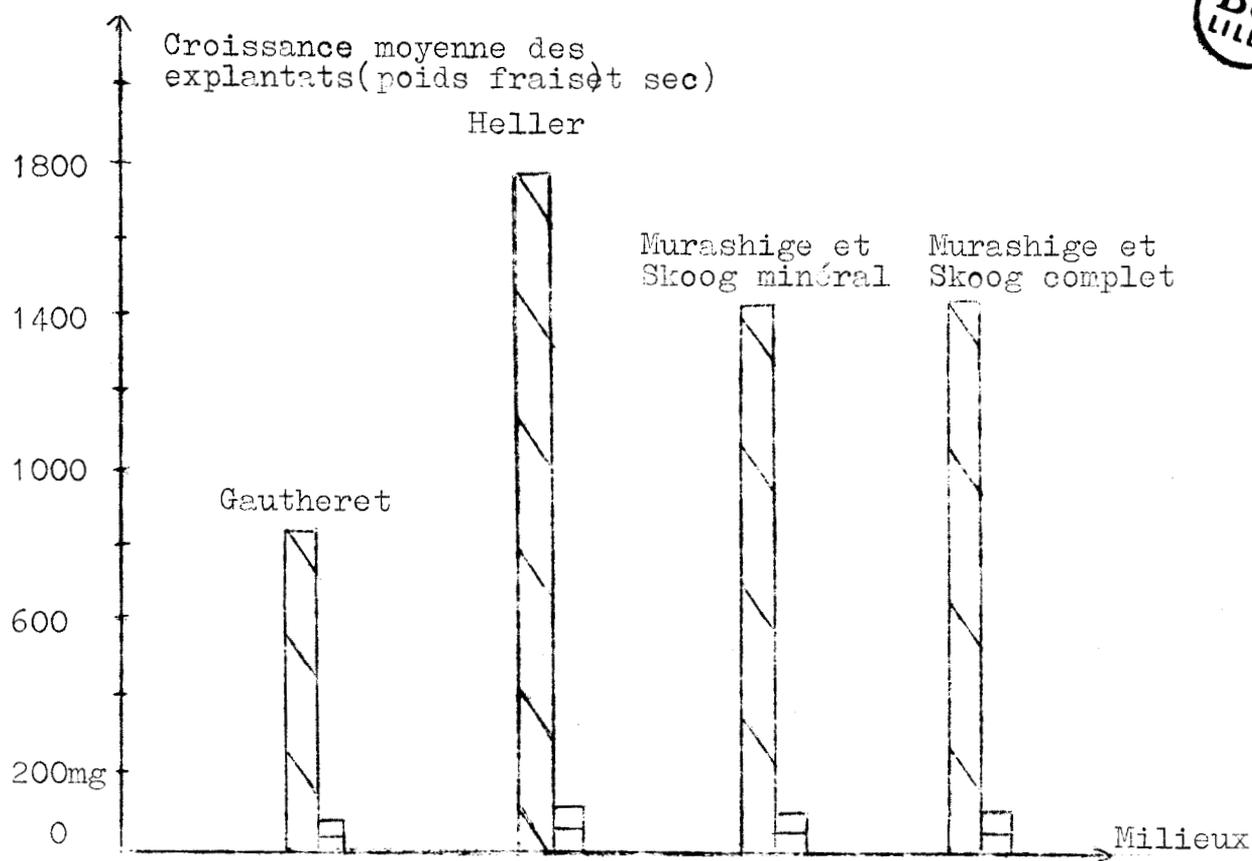


Figure 15 - Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la prolifération de tissus de Ronce

Le milieu de Heller est nettement plus favorable au développement de la souche de Ronce que le milieu de Murashige et Skoog complet ou réduit à ses seuls éléments minéraux. Les résultats obtenus pour ces deux derniers milieux sont sensiblement identiques et intermé-

diaires à ceux fournis d'une part par le milieu de Heller et d'autre part par celui de Gautheret

Les substances organiques du milieu de Murashige et Skoog sont donc dans leur ensemble sans action sur la prolifération des tissus de Ronce.

V - Tissus tumoraux

Les tumeurs végétales contiennent plus d'auxines que les tissus normaux correspondants et jouissent d'une grande autonomie car ils peuvent se développer sur un milieu dépourvu d'auxine.

Il existe chez les végétaux différents types de tissus tumoraux que l'on distingue généralement selon l'agent qui les a provoqués. Nous considérerons d'une part des tissus de crown-gall (tumeurs bactériennes) et d'autre part des tissus énergisés (tumeurs d'origine chimique ou hormonale)

A - Tissus de crown - gall

Notre étude portera sur trois souches : crown - gall de Vigne Vierge, de Tabac et de Scorsonère

1 - Crown - gall de Vigne Vierge

La souche crown gall de Vigne Vierge provient du milieu de Heller enrichi de la solution de Gautheret, de 5 % de glucose, de 10^{-6} de Vitamine B 1. Les explantats sont repiqués sur les milieux de Gautheret, de Heller, de Murashige et Skoog (minéral et complet). L'expérience dure 55 jours.

C'est sur le milieu de Heller que les explantats se développent le mieux. Le milieu de Murashige et Skoog est de beaucoup le moins favorable. Les substances organiques de ce milieu n'ont d'ailleurs aucune action sur la prolifération de ces tissus.

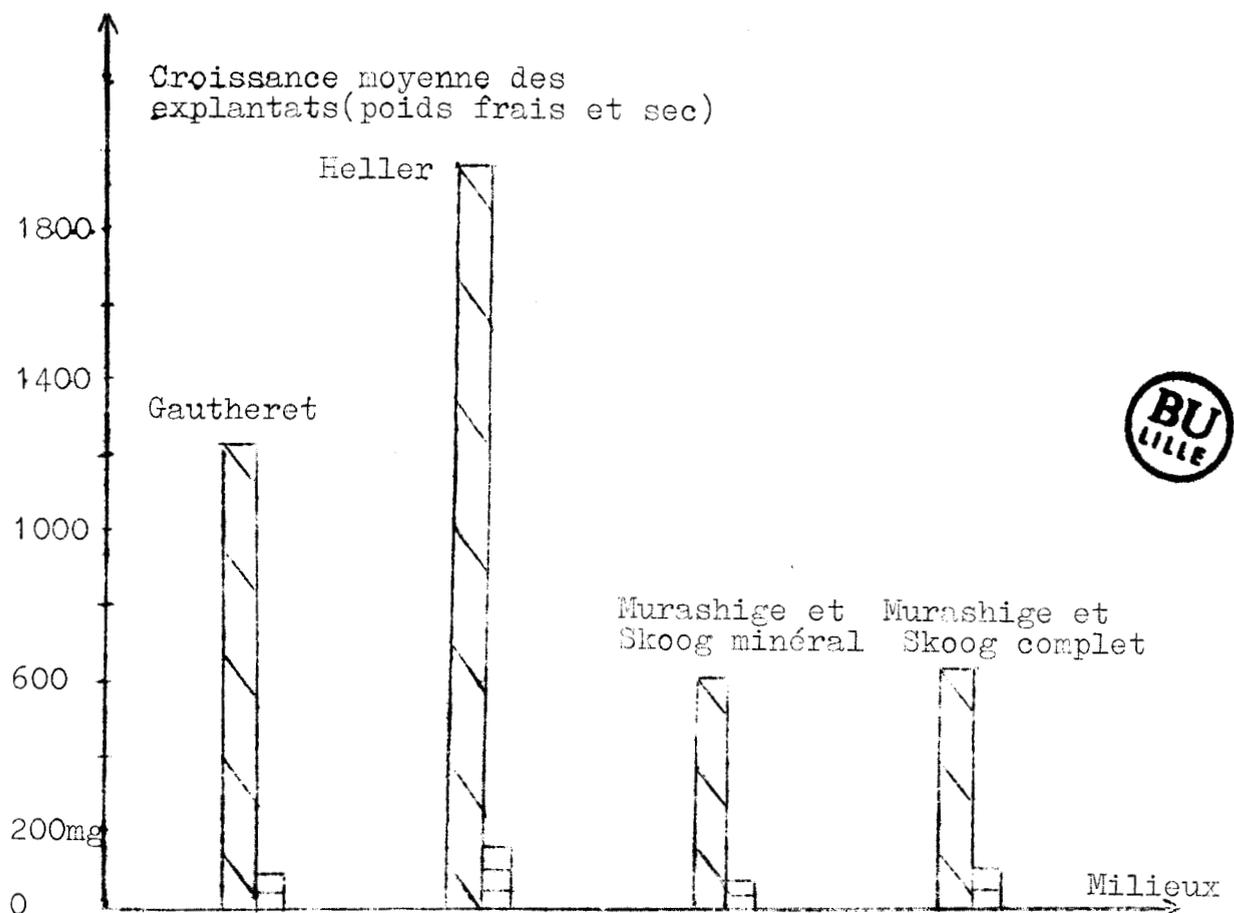


Figure 16 - Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la croissance exprimée en poids frais et sec des tissus crown-gall de Vigne Vierge.

2 - Crown - gall de Tabac

Les souches proviennent de repiquages successifs sur le milieu de Gautheret auquel l'on ajoute 5 % de glucose. Ce milieu nous servira de témoin et l'expérience durera 60 jours.

Sur le milieu de Heller, la croissance des explantats est supérieure de 27,43 % à celle du milieu témoin, alors que les milieux minéral et complet de Murashige et Skoog ne permettent qu'un développement réduit des colonies tissulaires, inférieur de 20 % environ à celui du milieu témoin.

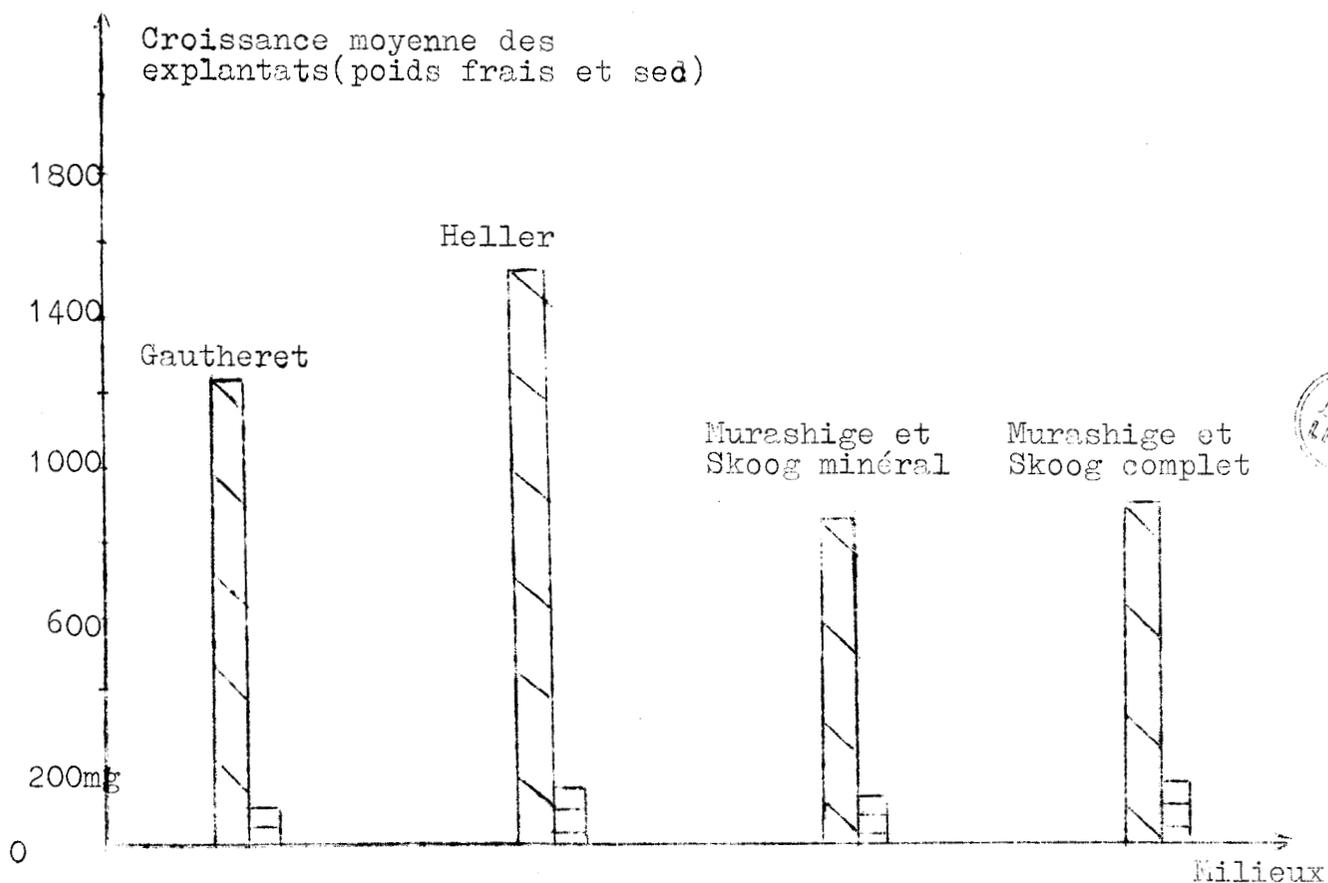


Figure 17 - Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la croissance exprimée en poids frais et sec des tissus crown-gall de Tabac

3 - Crown-gall de Scorsonère

a - Action des différents milieux

La souche crown-gall de Scorsonère provient de repiquages successifs sur le milieu de Gautheret auquel l'on ajoute 5 % de glucose. Cette souche âgée de 40 jours est repiquée sur nos quatre milieux où elle se développe rapidement. Le milieu de Gautheret nous servira de témoin.

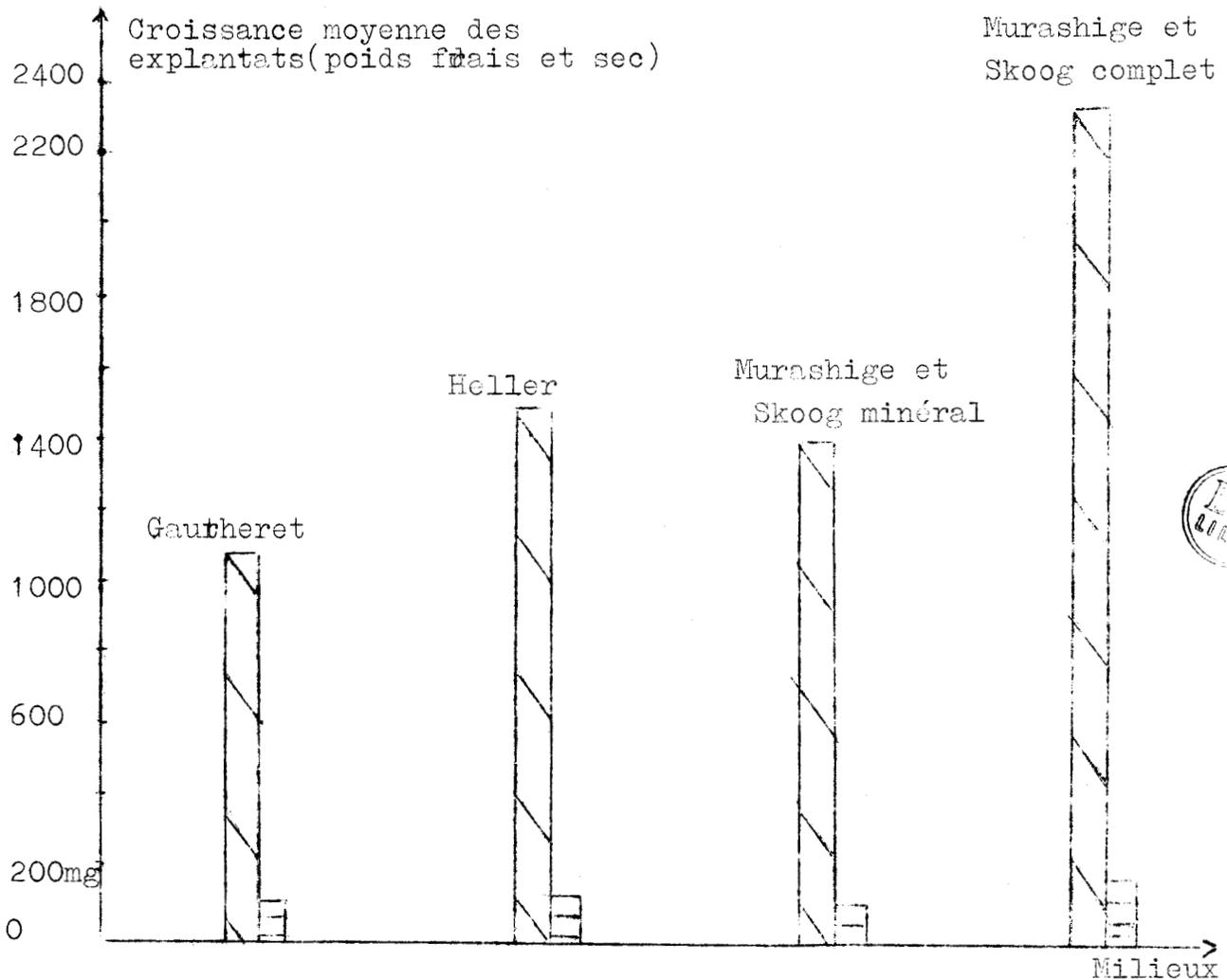


Figure 18 - Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la croissance exprimée en poids frais et sec des tissus de crown-gall de Scorsonère

Des résultats obtenus 39 jours après, il apparaît que le milieu de Heller provoque un développement supérieur de 38,5 % au milieu témoin. Les milieux minéral et complet de Murashige et Skoog permettent respectivement un développement supérieur de 33,7 et 112,7 % au milieu témoin.

b - Action des substances organiques du milieu de Murashige et Skoog

Afin de préciser la substance responsable de ce développement intensif, nous ajoutons séparément à la solution minérale de Murashige et Skoog chaque substance faisant partie de la solution organique

c'est à dire : l'hydrolysate de caséine 10^{-3} g/ml, le glycolle $2 \cdot 10^{-6}$, l'auxine 10^{-8} , la kinétine 10^{-6} , le myo-inositol 10^{-4} , l'acide nicotinique $5 \cdot 10^{-6}$, la pyridoxine $5 \cdot 10^{-6}$, la vitamine B1 10^{-7} .
L'action des ces différents milieux est comparée à celle des milieux contenant la solution minérale (T1) ou la solution complète (T2) de Murashige et Skoog

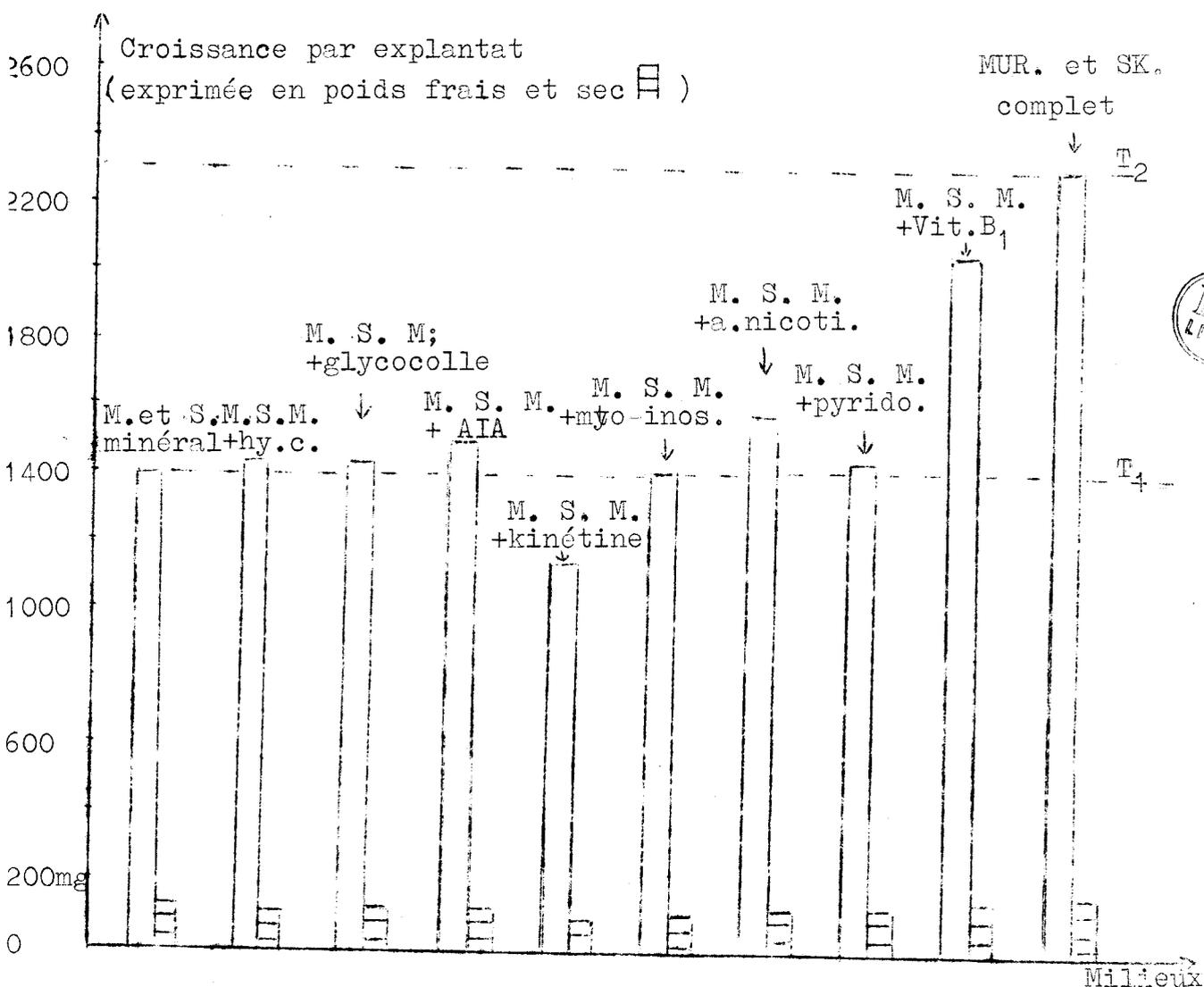


Figure 19 Action des substances organiques sur la croissance en poids frais et sec des explantats de crown gall de Scorsonère.

Les résultats résumés dans la figure 19 montrent que quelques substances sont pratiquement inactives telles : l'hydrolysate de caséine le glyco-colle, l'acide indolylacétique, le myo-inositol, la pyridoxine, d'autres le sont faiblement : l'acide nicotinique. La vitamine B1 a par contre un très gros effet stimulant tandis que la kinétine à 10^{-6} est toxique.

C'est donc essentiellement la vitamine B1 qui est responsable de l'activité du milieu de Murashige et Skoog, ce qui confirme les résultats de Mademoiselle Paris 1955

c - Action de la vitamine B1

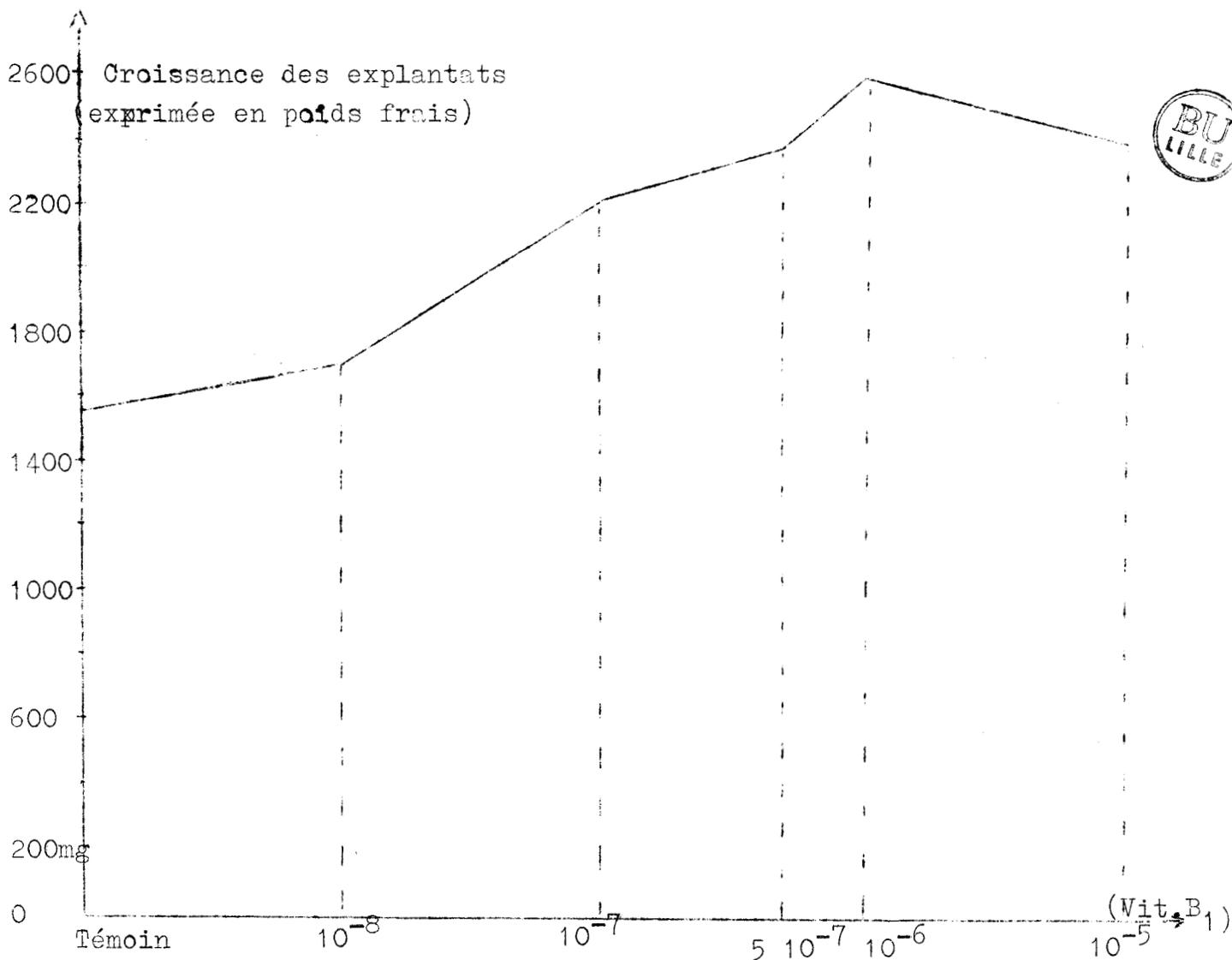


Figure 20 Action de la vitamine B1 sur la croissance pondérale des explantats de crown-gall de Scorsonère repiqués sur le milieu de Murashige et Skoog.

Mademoiselle Paris a étudié en détail l'effet de la vitamine B1 ajoutée aux éléments de la solution de Knop.

En présence du milieu de Murashige et Skoog (figure 20) nous retrouvons une stimulation analogue. La vitamine B1 stimule fortement la prolifération des tissus de crown-gall de Scorsonère, l'effet optimum étant manifesté pour des concentrations de l'ordre de 10^{-6}

B - Tissus anergiés

Nous avons utilisé deux tissus: ceux de Scorsonère et de Tabac.

1- Tissu anergié de Scorsonère.

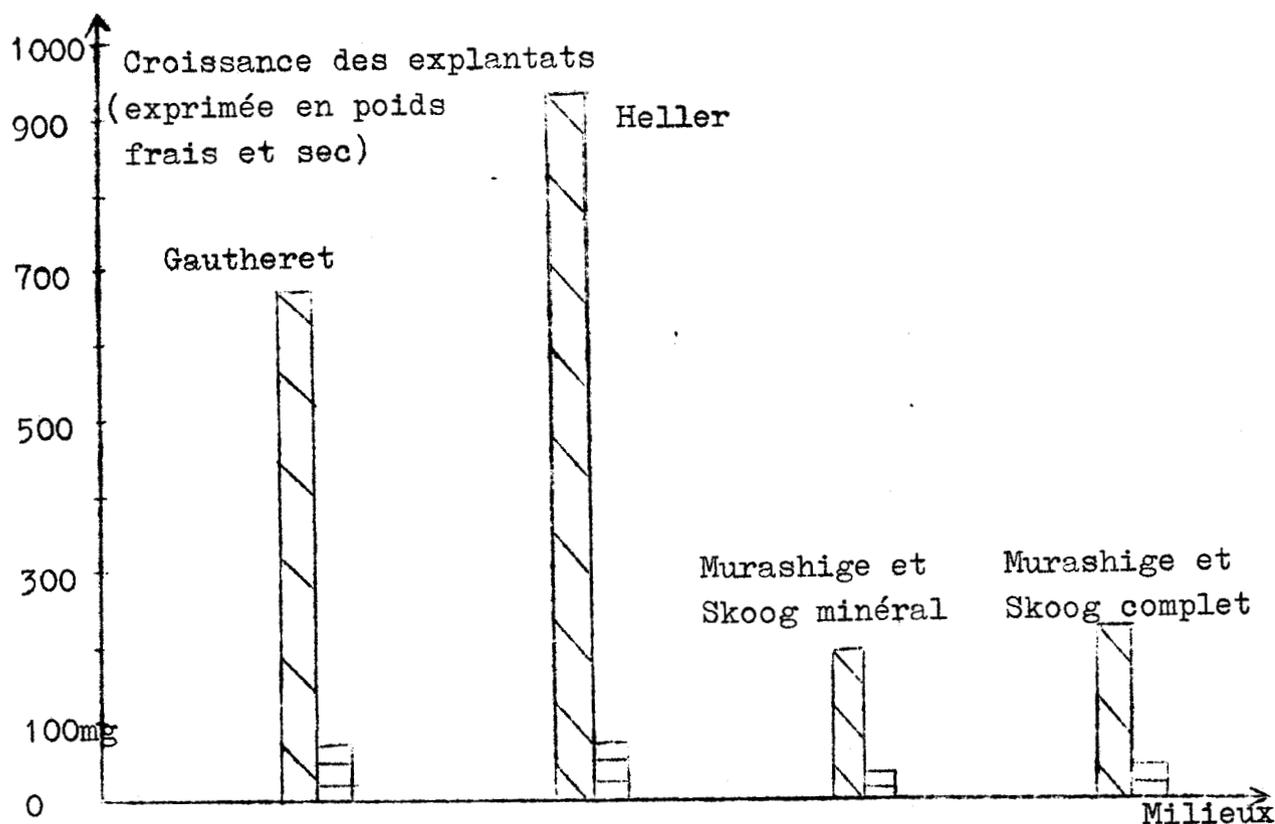


Figure 21 - Action des milieux de Gautheret, Heller, Murashige et Skoog (minéral et complet) sur la croissance pondérale des tissus anergiés de Scorsonère.

Les souches proviennent de repiquages successifs sur le milieu de

Gautheret enrichi de 5 % de glucose et de 10^{-6} de vitamine B1. Les explantats croissent très lentement. L'expérience dure 53 jours.

Le milieu de Heller provoque une croissance supérieure de 38 % à celle obtenue en présence du milieu de Gautheret qui nous sert de témoin. Le milieu de Murashige et Skoog est défavorable au développement de ces tissus, il entraîne même la mort de la plupart des explantats. En effet, dans le milieu minéral de Murashige et Skoog 16 explantats sur 22 ne prolifèrent pas, la proportion dans le milieu complet étant de 17 sur 22.

Les substances organiques dans leur ensemble sont donc sans action. La croissance indiquée sur la figure 21 pour le milieu de Murashige et Skoog représente celle des quelques explantats ayant survécu.

2 - Tissu anergié de Tabac
.....

a) Action des différents milieux

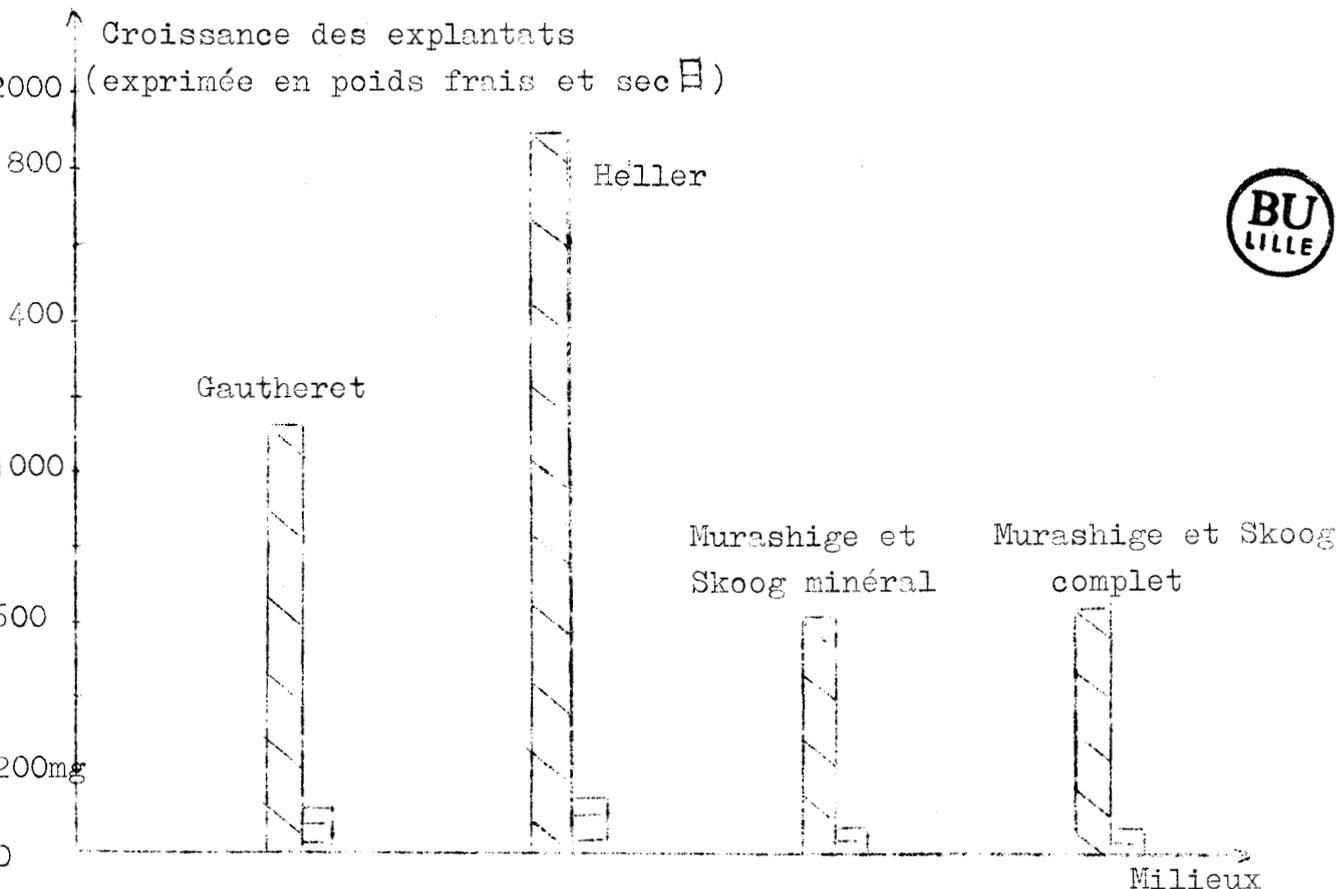


Figure 22 - Action de différents milieux de culture sur la croissance pondérale des tissus anergiés de Tabac.

Les souches proviennent du milieu de Gautheret enrichi de 5 % de glucose et de 10^{-6} de vitamine B1. Ici, le développement est beaucoup plus rapide surtout dans le milieu de Heller, l'expérience ne dure que 34 jours.

Sur le milieu de Heller, la croissance est supérieure de 67,10 % à celle du milieu témoin (milieu de Gautheret). Le milieu de Murashige et Skoog (complet ou non) est au contraire défavorable.

White 1921, souligne que la cellule tumorale est une cellule désorientée et dégénérée. Brown 1951 dit que les cellules cancéreuses restent telles jusqu'à leur mort.

Moutefois en 1947 De Ropp cite la formation de racines par les cultures de tissus de crown gall d'*Helianthus annuus*.

En 1948 Brown a pu obtenir le retour au type normal des tissus de tumeurs complexes de Tabac par leur greffage successif sur une plante saine et par forçage de développement du greffon. Les bourgeons des tératomes ainsi greffés successivement, devenaient de plus en plus normaux et donnaient finalement une plante absolument normale qui fleurissait et formait des graines.

En 1953-54 Demetriades cite encore quelques cas où un retour au type normal est éventuellement possible.

Les explantats repiqués sur le milieu de Murashige et Skoog complet, bien qu'ayant une croissance assez faible, verdissent. C'est pourquoi nous avons cru bon de poursuivre l'expérience. Mais le milieu risquant de devenir pauvre en substances nutritives, on procède au repiquage des colonies tissulaires 80 jours après leur mise en culture. Cinquante jours après, des bourgeons apparaissent sur les explantats, bourgeons naissant aussi bien à l'intérieur du milieu qu'à l'extérieur.

Les explantats cultivés en présence des éléments minéraux du milieu de Murashige et Skoog ne produisent pas de bourgeons. C'est donc aux composés organiques qu'il faut attribuer le bourgeonnement.

b - Action des substances organiques du milieu de Murashige et Skoog sur le bourgeonnement

Afin de préciser le rôle de chacun d'eux, les tissus ont été repiqués sur des milieux constitués de la solution minérale à laquelle on ajoute : les vitamines (myo inositol, vitamine B1, acide nicoti-

nique, pyridoxine), l'hydrolysate de caséine, l'auxine (10^{-7} d'AIA) la kinétine (10^{-6}) le glycolle. Quatre vingts jours après, les tissus sont repiqués sur des milieux absolument identiques.

Les bourgeons apparaissent d'abord sur les explantats repiqués sur le milieu complet de Murashige et Skoog et sur les deux milieux constitués de la solution minérale et de l'hydrolysate de caséine ou de glycolle.

MILIEUX	Nombre moyen de bourgeons par explantat	Pourcentage d'explantats où des bourgeons sont apparus
Murashige et Skoog minéral (S.M.)	0	0 %
S.M. + Vitamines	0,33	15,00
S.M. + Hydrolysate de caséine	1,64	40,52
S.M. + AIA 10^{-7}	0,44	11,11
S.M. + kinétine 10^{-6}	0,40	18,25
S.M. + Glycolle	2,50	81,13
Murashige et Skoog complet (S.C.)-Hydrolysate de caséine	2,28	64,25
S C - Kinétine	2,85	74,27
S C - Glycolle	1,45	41,19
Murashige et Skoog complet	3,15	85,37



Tableau 8

Action des substances organiques du milieu de Murashige et Skoog sur le bourgeonnement des tissus anergiés de Tabac.

Les résultats réunis dans le tableau 8 montrent que deux substances favorisent le bourgeonnement : l'hydrolysate de caséine et le glycolle. Lorsque les acides aminés sont absents du milieu de Murashige et Skoog, le bourgeonnement est réduit de façon importante

Le milieu de Murashige et Skoog sans être favorable à la prolifération des cellules de Tabac anergiés, permet leur organisation comme si, les cellules en perdant le pouvoir de se diviser activement devenaient capables de se différencier et de s'organiser

CONSIDERATIONS GENERALES

Le milieu complexe mis au point par Murashige et Skoog 1962 et contenant des éléments minéraux et des facteurs organiques, manifeste des propriétés exubérantes à l'égard du tissu de moelle de Tabac. Ces propriétés (prolifération cellulaire et organogénèse importantes) nous les avons retrouvées avec le tissu d'Endive (feuilles et racines). Une étude systématique, nous a montré que seule la kinétine était active et qu'elle agissait en synergie avec l'auxine.

Skoog a montré que la kinétine pouvait être considérée comme une "kinine" pour la moelle de Tabac, nous pensons qu'il en est de même pour les tissus d'Endive qui fabriqueraient suffisamment d'auxine mais trop peu de kinines pour utiliser les auxines endogènes.

Toutefois, les propriétés spectaculaires de ce milieu ne peuvent être généralisées.

Sur des tissus autotrophes à l'auxine comme ceux de Ronce, le milieu de Murashige et Skoog a une action inférieure à celle du milieu de Heller quoique supérieure à celle du milieu de Gautheret. Les substances organiques sont sans action, c'est donc que ce tissu fabrique suffisamment de ces substances pour son développement.

Le milieu de Murashige et Skoog n'est pas plus favorable au développement des tissus de Vigne Vierge vis à vis des tissus sains; seul l'AIA, comme on pouvait le prévoir, s'est révélé stimuler la prolifération cellulaire. Et vis à vis des tissus de crown-gall qui sont insensibles à l'auxine, le milieu complexe s'est révélé nettement défavorable, ce qui semble devoir être attribué à un mauvais équilibre minéral par rapport aux besoins de ces tissus.

Sur le tissu de Carotte (primaire et souche), le milieu de Murashige et Skoog exerce une action intermédiaire entre celle du milieu de Heller (le plus favorable) et de Gautheret. Les substances organiques autres que l'auxine n'ont dans leur ensemble que peu d'influence.

Par contre avec les tissus de Scorsonère, le milieu de Murashige et Skoog se comporte très différemment. Les substances organiques sont sans action sur les tissus normaux et anergiés. Avec les tissus normaux, l'action de ce milieu est très peu différente de celle du

milieu de Gautheret, mais bien inférieure à celle du milieu de Heller. Par contre, sur les tissus anergiés, le mauvais équilibre de la solution minérale entraîne la mort de la plupart des explantats. Par contre, les tissus de crown gall se développent tout à fait normalement sur le milieu de Murashige et Skoog. Les éléments organiques semblent cependant sans effet à l'exception de la vitamine B₁, ce qui confirme les résultats de Paris. L'optimum d'action de cette vitamine se manifeste aux environs de 10^{-6} .

Sur un tissu particulièrement hétérotrophe à l'auxine comme le tissu de parenchyme vasculaire de Topinambour, le milieu de Murashige et Skoog (complet ou non) provoque une prolifération cellulaire et une organogénèse importantes bien supérieures à celles du milieu de Heller et surtout de Gautheret.

Le milieu de Murashige et Skoog s'étant montré particulièrement actif pour le tissu de moelle de Tabac, on aurait pu penser retrouver ces propriétés exubérantes sur d'autres tissus de Tabac, comme le tissu crown-gall ou anergié. Or, il n'en est rien et pour ces deux tissus le faible développement des souches doit être attribué sans doute à un mauvais équilibre des éléments minéraux, tandis que les éléments ~~organiques~~ déterminent l'apparition de bourgeons sur les tissus anergiés. Parmi ces éléments organiques, ce sont surtout les acides aminés (hydrolysate de caséine et glyco-colle) qui semblent responsables de cette organogénèse.

Ainsi, les propriétés spectaculaires que possède le milieu de Murashige et Skoog à l'égard de la moelle de Tabac ne semblent pas pouvoir être généralisées à tous les tissus végétaux. Cependant la richesse de ce milieu permet parfois de révéler certaines potentialités des cellules.

BIBLIOGRAPHIE

- Bouriquet (R.) 1960 - Recherche sur l'activité de quelques facteurs de croissance à l'égard des tissus végétaux cultivés in vitro
 Rev. Cytol. et Biol.Vég ; 21; 93-326;
- Bouriquet (R.) Vasseur (J) 1965 - Sur la croissance et le bourgeonnement des tissus de feuilles d'Endive cultivés in vitro.
 Journées internationales d'études sur les phytohormones et l'organogénèse - Liège
- Braun (A.C.) 1948 - Recovery of crown - gall tumor cells
 Cancer Res, 11; 839-844;
- Demetriades (S.D.) 1953 - Sur un cas de différenciation des tissus de crown-gall de Scorsonère cultivés in vitro
 C.R. Soc. Biol; 147; 1713-1715;
- Demetriades (S.D.) 1954 - Sur le phénomène de différenciation des tissus végétaux tumoraux cultivés in vitro.
 Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki année VIII,2; 3-10;
- De Ropp (R.S.) 1947 - The response of normal plant tissues and of crown-gall tumor tissues to synthetic growth hormones.
 Am. J. Bot; 34; 53-62;
- Duhamet (L.) Gautheret (R.) 1957 - Sur la diversité des réactions de quelques tissus végétaux cultivés in vitro en présence de lait de coco, d'auxine et de mélanges de ces substances.
 C.R. Soc. Biol.; 151 (12); 2043-2045;
- Gautheret (R.) 1959 - La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations.
 Masson et Cie Editeurs Paris
- Gautheret (R.) 1961 - Action conjuguée de l'acide gibbéréllique, de la cinétine et de l'acide indole acétique sur les tissus cultivés in vitro, particulièrement sur ceux de Topinambour
 C.R. Acad.Sci; 253 ; 1381-1385;

- Gautheret (R.) 1961 - Nouvelles recherches sur la néoformation de racines par des tissus de Topinambour cultivés in vitro
C.R. Acad. Scie; 253, 4514-4516;
- Heller (R.) 1953 - Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro.
Thèse - Paris - Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.
- Lance (C.) Gautheret (R.) 1951 - Remarques sur la structure des néoformations produites sous l'action de l'acide indole-acétique sur des cultures de tissus de Topinambour.
C.R. Soc. Biol; 145; 240-244;
- Murashige (T.) Skoog R. 1962 A revised medium for rapid growth and bio assays with Tabacco tissue cultures
Physiol. Plant; 15; 473-497 ;
- Paris (D.) Duhamet (L.) Coris (L.) 1954 - Action des vitamines et des acides aminés contenus dans le lait de coco sur la prolifération d'une souche de tissus de Carotte.
C.R. Soc; Biol ; 148; 296-299;
- Paris (D.) Duhamet (L.) 1955 - Action de quelques vitamines hydrosolubles sur les cultures de tissus végétaux
Ann. Biol; 31; 215-229;
- Pilet (P.E.) 1961 - Culture in vitro de tissus de Carotte et organogénèse Bull. Soc. bot. suisse; 71; 189-208;
- Pilet (P.E.) 1965 - Action de la kinétine sur le transport de l'acide indolylacétique marquée par du radiocarbone.
C.R. Acad. Sci Paris ; 260; 4053-4056;
- Vasseur (J) 1965 - Recherches sur la culture in vitro de tissus d'Endive
Mémoire de D.E.S. LILLE



PLAN

	Page
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>Les Techniques</u>	3
A - Les milieux de culture	3
1 - Milieu de Gautheret	3
2 - Milieu de Heller	4
3 - Milieu de Murashige et Skoog	4
B - La stérilisation des tissus et leur ensemencement	6
1 - Les feuilles d'Endive	6
2 - Les racines	6
3 - Les souches	7
C - Conditions expérimentales	8
<u>Résultats expérimentaux</u>	9
I - Tissus hétérotrophes à l'auxine	9
A - Parenchyme vasculaire de Topinambour	9
B - Tissu de Scorsonère	11
1 - Tissu primaire	11
2 - Souche normale	13
II - Tissus n'ayant pas un besoin absolu d'auxine	15
A - Tissu de Carotte	15
1 . Ensemencement primaire	15
2 . Souche normale	17
B - Souche normale de Vigne Vierge.	19
III - Tissu doué de propriétés d'organogénèse : L'Endive	20
A - Feuilles	20
1 - Action comparée des milieux de Gautheret, de Heller de Murashige et Skoog	20
2 - Action du milieu de Murashige et Skoog, les concen- trations d'AIA et de kinétine variant	25

3 - Action due à l'association des substances organiques	29
4 - Rôle de chacun des éléments organiques	31
B - Racines	35
IV - Tissus autotrophe à l'auxine : la Ronce	38
V - Tissus tumoraux	40
A - Tissus de crown - gall	40
1-Crown gall de Vigne Vierge	40
2 - Crown gall de Tabac	41
3 - Crown gall de Scorsonère	42
a) Action des différents milieux	42
b) Action des substances organiques du milieu de Murashige et SKoog	43
c) Action de la vitamine B1	45
B - Tissus anergiés	46
1 - Tissu anergié de Scorsonère	46
2 - Tissu anergié de Tabac	47
a) Action des différents milieux	47
b) Action des substances organiques du milieu de Murashige et Skoog sur le bourgeonnement	48

<u>CONSIDERATIONS GENERALES</u>	50
---------------------------------	----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	52
----------------------	----

PLAN	54
------	----