

N° d'ordre : 360

50376
1973
23

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1973
23

THESE

présentée à

l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir

le grade de Docteur Troisième Cycle

Spécialité : Biologie Végétale

(Option: Biologie Cellulaire)



Henri MORVAN

MESURE DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE

DES SUSPENSIONS CELLULAIRES D'ERABLE (Acer pseudoplatanus L.)

Soutenue le 31 Janvier 1973, devant la Commission d'Examen :

Président :	R. BOURIQUET	Professeur
Rapporteur :	M. THELLIER	Professeur
Examineurs :	P. GUILBAULT	Professeur
	J. L. BONNEMAIN	Maître de Conférences

SOMMAIRE

INTRODUCTION	Page 1
HISTORIQUE	Page 4
ANALYSE DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE	
POTENTIEL INTRACELLULAIRE ET ECHANGES IONIQUES	
MATERIEL ET METHODES	Page 14
I - CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES	Page 15
A - Milieu de culture	
B - Repiquage	
C - Conditions de culture	
D - Mesure de la croissance	
II - METHODE ELECTROPHYSIOLOGIQUE	Page 21
A - Fabrication des microélectrodes	
B - Manipulation	
C - Montage du dispositif d'enregistrement	
D - Les milieux	
III - METHODES D'ANALYSE	Page 25
A - Analyse automatique des cations	
B - Préparation des analyses	
C - Mesure du pH	
RESULTATS	Page 27
I - CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES D'ERABLE ..	Page 28
A - Aspect de la courbe de croissance	
B - Importance de la densité d'ensemencement	
C - Importance de l'âge de la suspension "mère"	
D - Variation du pH du milieu de culture	
E - Composition minérale du milieu de culture	
F - Composition minérale des suspensions cellulaires	

II - ETUDE DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE	Page 44
A - Valeur du potentiel intracellulaire	
B - Compartimentation du potentiel intracellulaire	
C - Evolution du potentiel intracellulaire au cours de la culture	
III - CONTRIBUTIONS IONIQUES A LA GENESE DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE	Page 50
A - Influence de la concentration potassique	
B - Influence de la concentration sodique	
C - Influence de la concentration calcique	
D - Influence de la concentration en magnésium	
E - Rôle des cations	
IV - ACTION DE FACTEURS CHIMIQUES ET PHYSIQUES SUR LE POTENTIEL INTRACELLULAIRE	Page 73
A - Action de la vitamine B ₁	
B - Action du 2,4-D	
C - Action de la lumière	
 CONCLUSION	 Page 80
 BIBLIOGRAPHIE	 Page 89

INTRODUCTION

Les propriétés électriques des végétaux ont été à l'origine de nombreux travaux, toutefois, peu d'entre eux concernent les phénomènes électriques manifestés par les cellules des Végétaux supérieurs (ETHERTON, 1960 ; PALLAGHY, 1968 ; BOWLING, 1968). Les fragments de plantes, d'organes ou même les colonies tissulaires, nous ont semblé trop complexes pour aborder notre étude ; nous leur avons préféré des cellules en suspension dans un milieu liquide qui ont un minimum de contacts entre elles et baignent totalement dans le milieu de culture. Les interactions qui apparaissent habituellement au niveau d'un organe ou même d'une colonie tissulaire, sont donc supprimées et les échanges entre les cellules et la solution extracellulaire sont importants.

Nous avons utilisé une suspension cellulaire d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) isolée par LAMPORT en 1964.

Grâce à une méthode électrophysiologique habituellement utilisée avec les cellules animales, nous avons mesuré le potentiel intracellulaire des cellules d'Erable, en équilibre d'échanges ioniques avec le milieu de culture; nous avons suivi l'évolution de ce potentiel au cours de la culture et étudié le rôle des principaux cations du milieu dans la genèse de ce potentiel.

Il existe une relation directe entre les modifications quantitatives de la composition ionique du milieu extracellulaire et les variations du potentiel intracellulaire.

Selon la loi de NERNST, déduite de la théorie électrochimique, les mouvements des ions résultent simultanément du gradient électrique et du gradient de concentration. Elle est vérifiée quand le gradient électrochimique est nul ; la cellule est alors en équilibre thermodynamique avec le milieu qui l'entoure et les échanges sont purement passifs. Dans le cas contraire, l'équilibre peut être rétabli grâce à l'intervention du métabolisme, selon un processus actif.

Ainsi, la méthode électrophysiologique qui renseigne sur les mouvements des ions, peut constituer un bon moyen d'investigation pour l'étude du mode d'action des facteurs chimiques (substances de croissance) et physiques (lumière, température).

Les suspensions cellulaires d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) sont incapables de se développer en l'absence d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et leur croissance est stimulée par le chlorhydrate de thiamine (Vitamine B₁); afin de vérifier si ces facteurs modifient les échanges ioniques avec le milieu extracellulaire, nous avons étudié leur influence sur le potentiel intracellulaire.

De même, nous avons envisagé l' action de la lumière, qui peut modifier la perméabilité membranaire aux substances ioniques.

HISTORIQUE

Il existe une différence de potentiel (DP) entre l'intérieur des cellules et le milieu qui les entoure : elle peut être mise en évidence en reliant à un millivoltmètre, une électrode plongeant dans le contenu cellulaire et une autre au contact de la solution externe. La déviation lue indique le sens du courant, de telle sorte que le contenu cellulaire apparaît souvent négatif par rapport au milieu externe. La DP varie selon les espèces, les tissus, les cellules et aussi selon la nature du milieu ; elle est de l'ordre de quelques dizaines de millivolts.

Certaines cellules animales (comme les cellules excitables) et végétales sont susceptibles de réagir à une stimulation, par une réponse électrique nommée potentiel d'action (PA). Chez les Characées, Algues d'eau douce, la durée du phénomène est de l'ordre de la seconde (UMRATH, 1935 ; GAFFEY et MULLINS, 1958 ; KISHIMOTO, 1966), alors qu'il est de quelques millisecondes à 1 seconde chez les cellules animales. Si les phénomènes physico-chimiques sont de même nature, les échanges ioniques qui accompagnent ce PA ne sont pas les mêmes dans les deux règnes. La phase de dépolarisation est couplée à une sortie de chlore chez les Characées (GAFFEY et MULLINS, 1958 ; HOPE et FINDLAY, 1964) et à une entrée de Na^+ chez la plupart des cellules animales (HODSKIN et HUXLEY, 1952 ; CASTEELS, 1966) ; par contre, la phase de repolarisation est caractérisée par une sortie de K^+ plus importante.

Malgré les différences qui existent entre les cellules végétales et animales, les phénomènes électriques sont comparables, car ils sont dus à des variations des perméabilités ioniques membranaires.

ANALYSE DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE

Le terme "potentiel intracellulaire" définit la différence de potentiel (DP) entre le contenu cellulaire et le milieu externe. Dans le cas des cellules végétales, il faut tenir compte de la présence de deux phases électrolytiques distinctes : le cytoplasme et le suc vacuolaire.

Il y a en fait non pas une seule, mais trois "membranes" qui séparent la solution externe de la vacuole : ce sont respectivement de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, la paroi squelettique, la membrane ectoplasmique ou plasmalemma (1) et le tonoplaste (2).

La localisation de la pointe de la microélectrode introduite dans la cellule revêt dans ces conditions une importance particulière (WALKER, 1955 ; SPANSWICK, 1970). D'ailleurs, au sein même du cytoplasme (DODD et al. 1966), les valeurs de la DP peuvent changer, puisque les concentrations ioniques sont différentes dans le cytoplasme fluide et la couche à chloroplastes chez Nitella flexilis (KISHIMOTO et TAZAWA, 1965).

Grâce à leur grande taille, certaines cellules d'Algues permettent de mesurer aisément les DP dans le suc vacuolaire et dans le cytoplasme. Il devient alors possible de calculer un "potentiel de tonoplaste" (Tableau I). D'une façon générale, le cytoplasme est plus négatif que le suc vacuolaire et les valeurs de DP à travers le tonoplaste sont faibles, sauf dans le cas de Valonia et de Chaetomorpha, ce qui correspond sans doute à une structure particulière de cette membrane (GUTKNECHT, 1966).

Par ailleurs, un changement expérimental de la composition ionique du suc vacuolaire ne modifie pratiquement pas le potentiel intracellulaire chez Nitella flexilis (TAZAWA et KISHIMOTO, 1964 ; LEFEBVRE et GILLET, 1968). Des modifications de la composition ionique du milieu extérieur n'affectent pas la DP à travers le tonoplaste chez Chara australis (FINDLAY et HOPE, 1964), chez Nitella translucens (SPANSWICK et al., 1967) et Nitella flexilis (LEFEBVRE et GILLET, 1968). De plus, la résistance électrique du plasmalemma ($12 \text{ K} \cdot \text{cm}^2$) est plus importante que celle du tonoplaste ($1 \text{ K} \cdot \text{cm}^2$) chez Chara australis (HOPE et FINDLAY, 1964).

Le tonoplaste ne semble donc pas constituer (sauf chez Valonia et Chaetomorpha), une barrière très importante aux échanges ioniques et la sélectivité membranaire doit intervenir surtout au niveau du plasmalemma.

(1) - (2) : par analogie aux termes : Plasmalemma et tonoplast (UMRATH, 1956 ; BRIGGS et al., 1961).

(2) : on utilise parfois le terme tonoplasme (PILET, 1968).

T A B L E A U I : Différences de potentiel à travers le tonoplaste des cellules d'Algues, en milieu naturel ou artificiel.

Espèces	D.P. (en mV)	Références
<u>Nitella species</u>	0	WALKER, 1955
<u>Nitella flexilis</u>	+ 10	LEFEBVRE et GILLET, 1968
<u>Nitella translucens</u>	+ 24	SPANSWICK et WILLIAMS, 1965
<u>Chara australis</u>	+ 11	FINDLAY et HOPE, 1964
<u>Hydrodictyon africanum</u>	+ 26	RAVEN, 1967
<u>Valonia ventricosa</u>	+ 88	GUTKNECHT, 1966
<u>Chaetomorpha darwinii</u>	+ 45	DODD <u>et al.</u> , 1966



Récemment, ETHERTON et HIGINBOTHAM (1960) ont mentionné que les potentiels intracellulaires des Végétaux supérieurs sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés chez les Algues, les solutions externes utilisées étant généralement des solutions salines de composition simple (KCl dilué) ; les tissus y sont placés pendant un temps variant de 2 à 48 heures avant les mesures (Tableau II).

Les auteurs concluent non seulement que la DP à travers le tonoplaste est négligeable, mais aussi que la résistance de cette membrane est 1/6 de la résistance totale du système membranaire (GREENHAM, 1966), ce qui montre bien que chez les végétaux, la principale barrière à la diffusion des ions est le plasmalemma.

En résumé, toutes les mesures effectuées chez les Algues ou chez les Végétaux supérieurs, indiquent que le cytoplasme présente un potentiel plus négatif que celui du suc vacuolaire par rapport au milieu extracellulaire. Seul, jusqu'à présent, SINCLAIR (1967) a montré que la DP des cellules de feuilles de Hookeria lucens passe de - 140 mV à - 200 mV au fur et à mesure que l'électrode est enfoncée dans la cellule.

POTENTIEL INTRACELLULAIRE ET ECHANGES IONIQUES

Dès le début du siècle, un modèle simple rend compte de la pénétration et de l'accumulation des ions inorganiques dans une cellule :

Un excès d'anions non diffusibles, d'origine organique, à l'intérieur de la cellule engendre une différence de potentiel électrique qui tend à faire pénétrer les cations du milieu extérieur.

Le transfert se fait, soit par diffusion des ions (DONNAN, 1911), soit par un vecteur protéique dont le caractère amphotère lui permet d'être tantôt donneur, tantôt accepteur de cations (LAPICQUE, 1925).

Ces théories se sont révélées insuffisantes pour expliquer la sélectivité du transport cationique et la pénétration des anions. Pour OSTERHOUT (1931), chaque ion traverserait une barrière de diffusion à l'aide d'un transporteur spécifique dont l'activité serait liée directement ou indirectement au métabolisme : LUNDEGARDH et BURSTROM (1933) puis LUNDEGARDH (1954) identifient les vecteurs anioniques aux cytochromes de la chaîne respiratoire.

L'amélioration des méthodes d'analyse quantitative, les techniques électrophysiologiques, l'utilisation de traceurs radioactifs associés aux possibilités de fractionnement cellulaire ont permis l'étude exacte de la distribution des ions dans une cellule et l'ébauche de nouvelles théories cinétiques susceptibles de décrire plus exactement les mécanismes d'absorption (EPSTEIN, 1966, THELLIER, 1969).

L'intervention du métabolisme dans les mouvements ioniques est généralement reconnue par tous les auteurs et le recours à la théorie électrochimique a permis une approche satisfaisante du problème (HOPE, 1971 ; NOBEL, 1970 -a)

Selon GUGGENHEIM (1929), pour un ion "j", le potentiel électrochimique $\bar{\mu}_j$ s'écrit :

$$\bar{\mu}_j = \mu_{jo} + RT \log A_j + Z_j F.E + PV_j \quad (1)$$

- où :
- μ_{jo} : potentiel standard dans l'état initial
 - R : constante des gaz parfaits
 - T : température absolue
 - A_j : activité chimique de l'ion "j"
 - z_j : valence (avec son signe)
 - F : Faraday (96.500 coulombs)
 - P : pression hydrostatique
 - V_j : volume molaire partiel.

Quand l'ion est en équilibre thermodynamique, des flux égaux traversent la "membrane" dans les deux sens et les potentiels électrochimiques sont égaux dans les deux compartiments. L'équation (1) permet de calculer les potentiels à l'intérieur (μ_{ji}) et à l'extérieur (μ_{je}) du système membranaire cellulaire. Après simplification, la différence de potentiel à l'équilibre s'écrit :

$$E_i - E_e = \frac{RT}{zF} \log \frac{A_{je}}{A_{ji}} \quad (2)$$

C'est l'équation de NERNST ; si elle est vérifiée, cela signifie que l'ion est distribué passivement. Dans le cas contraire, l'équilibre thermodynamique est rompu de part et d'autre de la "membrane" et on admet que l'ion peut être soumis à un transport actif.

T A B L E A U II : Potentiels intracellulaires (Pi) de cellules de Phanerogames en équilibre avec des solutions diluées de KCl.

Origine des cellules	KCl (M/l)	Pi	Références
Coléoptile (<u>Avena sativa</u>)	1.10^{-4}	- 120	ETHERTON et HIGINBOTHAM, 1960
Coléoptile (<u>Zea mays</u>)	1.10^{-4}	- 96	" "
Epicotyle (<u>Pisum sativum</u>)	1.10^{-4}	- 132	" "
Racine (<u>Beta vulgaris</u>)	6.10^{-4}	- 153	POOLE, 1966
Racine (<u>Cucurbita pepo</u>)	1.10^{-4}	- 10	SINYUKHIN A.M. et VISKREBENTSEVA E.I., 1967
Tubercule (<u>Solanum tuberosum</u>)	1.10^{-3}	- 81	Mac KLON et Mac DONALD, 1966
Cellules stomatiques (<u>Nicotiana tabaccum</u>)	1.10^{-4}	- 155	PALLAGHY, 1968

BUS
LILLE

Si on substitue aux activités A_{je} et A_{ji} difficiles à mesurer dans les phases intracellulaires, les valeurs des concentrations C_{je} et C_{ji} à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule, l'équation (2) devient une relation simple qui exprime le potentiel d'équilibre d'un ion dans un système donné :

$$E_j = \frac{RT}{zF} \log \frac{C_{je}}{C_{ji}} \quad (3)$$

Le calcul de E_j devient particulièrement aisé dès lors que les concentrations C_{je} et C_{ji} sont connues. Inversement, on peut calculer C_{ji} en supposant que E_j est égal au potentiel intracellulaire mesuré (P_i) :

$$C_{ji} = C_{je} \exp. \frac{z \cdot F \cdot P_i}{R \cdot T} \quad (4)$$

De tels calculs ont été effectués pour K^+ , Na^+ et Cl^- dans les cellules d'algues ou de Végétaux supérieurs en équilibre avec des solutions salines extérieures de composition connue.

Chez Nitella translucens, SPANSWICK et WILLIAMS (1964) observent qu'aucun de ces ions n'est en équilibre thermodynamique : Na^+ diffuse passivement vers l'intérieur, K^+ et Cl^- vers l'extérieur : les auteurs en déduisent qu'il existe un transport actif de Na^+ vers l'extérieur ainsi qu'un mécanisme inverse pour K^+ et Cl^- .

D'ailleurs, les transports actifs du K^+ vers l'intérieur et du Na^+ vers l'extérieur sont signalés dans de nombreux cas :

- Valonia ventricosa (GUTKNETCH, 1966)
- Nitella clavata (BARR, 1965)
- Chaetomorpha darwinii (DODD et al., 1966)
- Hydrodictyon africanum (RAVEN, 1967)

Fréquemment, on a constaté que le potassium est proche de l'équilibre thermodynamique :

- Nitella flexilis (KISHIMOTO et TAZAWA, 1965)
- Nitellopsis obtusa (DAINTY, 1962).

Chez les Végétaux supérieurs, les comparaisons entre le potentiel vacuolaire mesuré et les potentiels d'équilibre calculés pour chacune des espèces ioniques montrent l'existence de gradients électrochimiques, vers l'extérieur si le milieu extracellulaire est pauvre en K^+ et vers l'intérieur si sa concentration en K^+ est élevée.

Par ailleurs, le sodium diffuse passivement vers l'intérieur (ETHERTON, 1963). Ces mouvements impliquent l'existence de flux actifs en sens inverse, de façon à maintenir la concentration interne constante : il se produit soit un rejet, soit une entrée de K^+ ainsi qu'une sortie de Na^+ avec l'aide du métabolisme.

Ce rejet de Na^+ est confirmé par ETHERTON (1967) avec Pisum sativum et par HIGINBOTHAM et al. (1967) avec Pisum sativum et Avena sativa en équilibre d'échanges depuis 48 heures avec une solution externe contenant les huit ions principaux (1). Ces auteurs mentionnent que le K^+ est proche de l'équilibre thermodynamique, alors que Na^+ , Ca^{++} et Mg^{++} sont rejetés activement (le transport actif n'a pas été prouvé et dans ce cas, il peut intervenir une relative imperméabilité de la membrane à ces ions). Les anions Cl^- , NO_3^- , SO_4^{--} , PO_4^{---} seraient absorbés activement.

Si les études entreprises ne sont encore que fragmentaires, il s'avère que la théorie des potentiels de diffusion permet de mettre en évidence la régulation des concentrations ioniques à l'intérieur de la cellule végétale : la concentration du potassium y est maintenue plus élevée que celle du sodium qui est rejeté vers l'extérieur.

Toutefois, l'absence d'équilibre thermodynamique ne signifie pas obligatoirement l'intervention d'un mécanisme actif qui doit déplacer les ions contre leur gradient électrochimique. Il peut exister des radicaux qui participent à des structures et se distribuent donc selon la loi de DONNAN.

La participation de l'activité métabolique dans la distribution et les échanges des ions, est généralement mise en évidence par l'emploi de substances inhibitrices de la respiration : en effet,

(1) : KCl (1,0) ; $Ca(NO_3)_2$, 4 H_2O (1,0) ; $MgSO_4$, 7 H_2O (0,25) ;
 NaH_2PO_4 , H_2O + Na_2HPO_4 , 2 H_2O (Na = 1,0 et pH = 5,5) en $mM.L^{-1}$

le dinitrophénol (D.N.P.) et l'ion cyanure (CN^-) annulent le transport actif du K^+ chez Chaetomorpha (DODD et al., 1966). Ces mêmes substances ont un effet dépressif immédiat et réversible sur le potentiel intracellulaire chez Avena (ETHERTON et HIGINBOTHAM, 1960) et chez Nitella clavata (KITASATO, 1968).

De nombreux auteurs attribuent à la lumière le rôle de source de l'énergie nécessaire à ces mécanismes actifs : HOPE et WALKER (1960), MAC ROBBIE (1962), VREDENBERG (1969 et 1971).

Le transport actif du K^+ pourrait être couplé à la restitution par l'ATP de l'énergie accumulée lors de la phosphorylation cyclique ; celui du Cl^- serait directement lié au transfert d'électrons de la photoréaction II de la photosynthèse.

En outre, la lumière pourrait jouer un rôle sur la perméabilité membranaire, puisque TANADA (1968) et JAFFE (1968) montrent qu'elle peut modifier la structure membranaire en occasionnant un transfert de charges. En effet, il est possible de provoquer des modifications photoinduites de l'adhérence de racines excisées sur des surfaces polarisées.

Toutes les théories envisagées pour expliquer l'origine de l'énergie nécessaire au fonctionnement des mécanismes actifs restent vraisemblablement insuffisantes : en effet, GUTKNECHT (1965) a pu maintenir un rapport K^+ / Na^+ élevé chez Gracilaria folifera à l'obscurité et en l'absence d' O_2 .

Parmi les facteurs biologiques qui peuvent interférer avec le potentiel intracellulaire, les substances de croissance tiennent une place importante. ETHERTON (1970) a signalé, sans pouvoir conclure, que les différentes composantes du potentiel intracellulaire fluctuent selon la teneur en AIA du milieu extérieur. C'est d'ailleurs le seul résultat obtenu au niveau cellulaire, même si on admet généralement que la régulation de la croissance des plantes par l'auxine est en relation avec les phénomènes de polarité électrique (WENT, 1932 ; ROSENE et LUND, 1953).

En outre, l'AIA (BODE, 1969 ; ILAN, 1962, 1971 ; ILAN et REINHOLD, 1963) et la kinétine (JACOBY et DAGAN, 1970) sont susceptibles d'interférer avec l'absorption ionique chez les végétaux supérieurs.

Handwritten notes:
2. 10. 1940
17. 10. 1940
2. 11. 1940

MATERIEL

ET

METHODES

I - CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Les cellules végétales cultivées "in vitro" sur des milieux liquides, représentent un matériel de choix pour le physiologiste, grâce à leurs propriétés clonales. Avant de nous adresser à des cellules ayant des propriétés culturales et des besoins nutritifs différents (Ronce, Vigne vierge, Tabac), nous avons choisi de travailler sur des cellules d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) dont les modalités de croissance ont fait l'objet de nombreux travaux : LAMPORT (1964), LESCURE (1966), STREET (1968), GRIGNON (1969-a), STUART et STREET (1969), SIMPKINS et STREET (1970). La souche utilisée est celle isolée par LAMPORT en 1964.

A - Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est celui mis au point par LESCURE (1966) qui contient notamment de l'acide dichlorophenoxy-acétique (2,4-D) (10^{-6} g.L⁻¹), de la thiamine (vitamine B₁) (10^{-6} g.L⁻¹) et du saccharose (2%) comme source carbonnée (Tableau III). Il est réparti dans des fioles de 500 ml à raison de 200 ml par fiole, puis autoclavé à 110°C pendant 20 minutes.

B - Repiquage

Tous les dix jours, les cellules sont repiquées sur un milieu neuf. Après décantation de la suspension, la moitié du surnageant est éliminée. Le contenu de la fiole est alors agité, afin d'obtenir un mélange homogène. Des aliquotes de 20 ml prélevées aseptiquement par pipetage sont réparties dans des fioles contenant chacune 200 ml de milieu nutritif. Par cette méthode, il n'est pas possible de contrôler avec exactitude la quantité de cellulesensemencées, c'est pourquoi nous avons modifié le protocole expérimental du transfert des cellules.

Pour éliminer le milieu et pouvoir manipuler uniquement des amas cellulaires, le contenu des fioles de culture est versé sur un papier filtre sans cendre dans un entonnoir de Büchner (Figure 1-a). Après filtration, le milieu est recueilli pour effectuer différents contrôles: mesure du pH, dosage des ions.

T A B L E A U I I I

Milieu liquide de LAMPORT modifié par LESCURE (1966).

COMPOSITION DU MILIEU		CONCENTRATION (g.l ⁻¹)
Nitrate de calcium	Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	290.10 ⁻³
Chlorure de potassium	KCl	65.10 ⁻³
Nitrate de potassium	KNO ₃	1.960.10 ⁻³
Sulfate de magnésium	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	360.10 ⁻³
Phosphate monopotassique	KPO ₄ H ₂	500.10 ⁻³
Phosphate disodique	Na ₂ PO ₄ H, 12 H ₂ O	97.10 ⁻³
Acide borique	H ₃ BO ₃	1,5.10 ⁻³
Iodure de potassium	KI	0,75.10 ⁻³
Sulfate de manganèse	MnSO ₄ , 4 H ₂ O	4,50.10 ⁻³
Sulfate de zinc	ZnSO ₄	1,5.10 ⁻³
Sulfate de fer	FeSO ₄ , 7 H ₂ O	2,785.10 ⁻³
	Na ₂ EDTA	3,725.10 ⁻³
Saccharose		20
Thiamine	Vitamine B ₁	1.10 ⁻³
Acide 2,4-dichloro-phenoxyacétique 2,4-D		1.10 ⁻³

315
1111

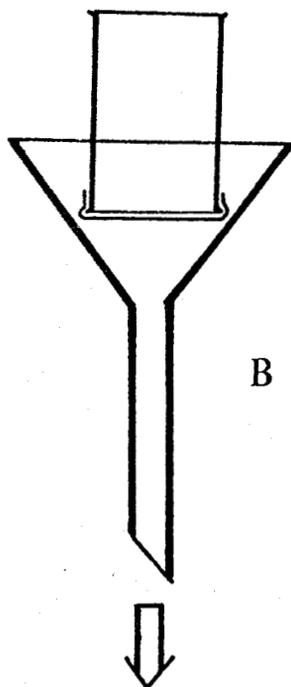
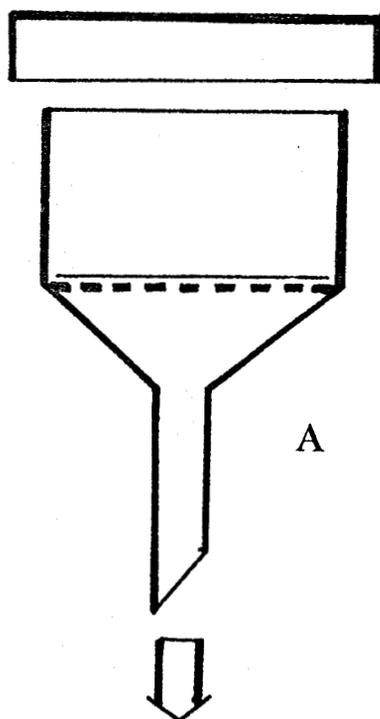


Figure 1 : Dispositifs de filtration

A : Par gravité sur Buchner + papier filtre

B : Par gravité sur manchon + toile à bluter (vide de maille : 35 μm).



Le liquide intersticiel qui peut contenir divers facteurs stimulants ou inhibiteurs (STUART et STREET, 1969) doit être éliminé : les cellules sont donc rincées avec 200 ml de milieu neuf préalablement stérilisé.

A l'aide d'une spatule, $5 \pm 0,1$ grammes de cellules sont transférés dans des fioles de 500 ml contenant 200 ml de milieu neuf. Connaissant le poids de matière fraîche ensemencé dans chaque fiole, on peut suivre la croissance de la suspension cellulaire au cours de la culture.

C - Conditions de culture

Afin d'éviter l'asphyxie des cellules, celles-ci sont soumises à une agitation permanente.

Les fioles sont disposées, inclinées à 45° par rapport à l'horizontale (figure 2-A), sur un agitateur rotatif (figure 2-B) tournant à la vitesse de 60 rotations par minute.

Les cultures sont éclairées (lumière naturelle corrigée par éclairage fluorescent de 2000 lux) douze heures par jour et sont maintenues à la température constante de 22°C .

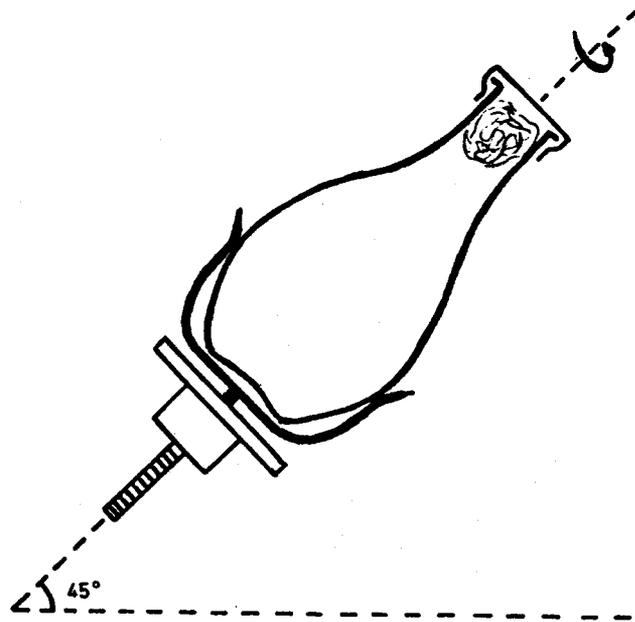
D - Mesure de la croissance

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour mesurer la croissance de cellules en suspension. Les plus couramment utilisées sont les suivantes :

- Mesure du poids de matière fraîche
- Mesure du poids de matière sèche
- Mesure du volume cellulaire après sédimentation (LAMPART 1964, HENSHAW et al. 1966)
- Numération cellulaire (STREET, 1967 ; JOUANNEAU et PEAUD-LENOEL, 1967)
- Mesure de la synthèse protéique (LESCURE, 1966 ; JOUANNEAU et PEAUD-LENOEL, 1967)
- Quantité d'azote total (GRIGNON, 1969-a)

Parmi ces critères, nous avons essayé ceux qui nous ont semblé les mieux adaptés à notre matériel.

A



B

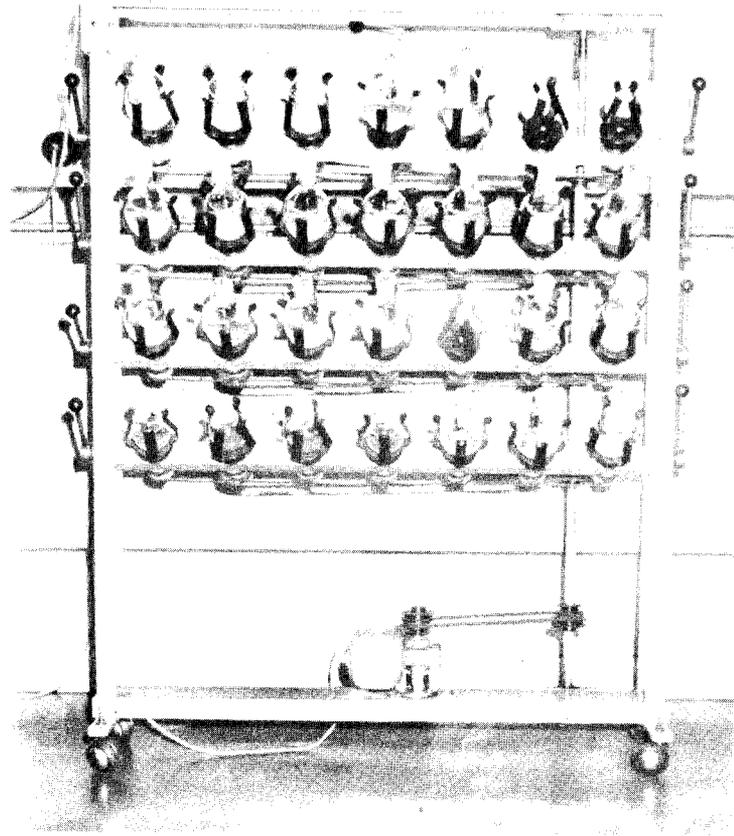


Figure 2 : Dispositif d'agitation continue des suspensions cellulaires d'Erable entretenues dans un milieu liquide.

- A : Position d'une fiole sur l'agitateur
- B : Vue de l'agitateur



1) Mesure du poids de matière fraîche

Après un temps de culture déterminé, le contenu d'une fiole est filtré sur un tamis de nylon (genre toile à bluter), de vide de maille 35 μm , qui retient la totalité des cellules (figure 1-B). Celles-ci sont ensuite recueillies sur une feuille d'étain et pesées (Pf). La croissance peut s'exprimer par la relation suivante :

$$\Delta\text{Pf} = \text{Pf} - \text{Pif} \quad (1)$$

- où Pif est le poids initial des cellules au moment de l'ensemencement.

2) Mesure du poids de matière sèche

L'élimination de l'eau contenue dans la matière vivante peut être obtenue par déshydratation à l'étuve ou par lyophilisation ; c'est ce second procédé qui a été utilisé.

5 à 10 grammes de matière fraîche sont congelés rapidement par immersion dans l'azote liquide, puis déshydratés sous vide pendant 48 heures. Les cellules lyophilisées sont ensuite pesées et placées dans un dessiccateur au chlorure de calcium en vue de manipulations ultérieures.

Dans ces conditions, la croissance exprimée initialement peut être formulée :

$$\Delta\text{Ps} = \text{Ps} - \text{Pis} \quad (2)$$

- où Pis est l'équivalent en matière sèche du Pif.

3) Mesure du volume cellulaire

Trois aliquotes de 10 ml sont prélevées dans une fiole maintenue en rotation, afin que la suspension soit homogène. Après une centrifugation ménagée (600 r.p.m. pendant 5 mn), le volume des culots de centrifugation est mesuré et le volume cellulaire moyen V_m est exprimé en ml par ml de milieu de culture.

4) Numération cellulaire

Nous avons effectué un comptage cellulaire en pratiquant

des dilutions suivant la technique bactériologique, puis un dénombrement sur le quadrillage d'une cellule de MALASSEZ.

Cette méthode nous paraît difficilement applicable dans le cas des cellules d'Erable cultivées selon le protocole que nous utilisons, car toutes les cellules ne sont pas dissociées et la présence d'amas, qui comprennent parfois plusieurs centaines de cellules, fausse à la fois les dilutions et le comptage.

Dans un premier temps, nous avons utilisé une agitation "va et vient" pour dissocier ces agrégats cellulaires, puis nous avons essayé une séparation enzymatique par une pectinase extraite de Rhizopus nigricans (SIGMA CHEMICAL Corporation) à 2 % pendant 2 à 3 heures, à 37°C.

Ces deux méthodes se sont avérées inefficaces, employées séparément ou conjointement.

5) Mesure de la teneur en azote total

200 mg de cellules déshydratées, réduites en poudre, sont minéralisées dans un matras de KJELDAHL en présence de catalyseur au selenium et de 5 ml d' H_2SO_4 concentré.

L'azote est ensuite dosé colorimétriquement à 420 nm par le réactif de NESSLER.

Ainsi est déterminée la teneur en azote total des cellules d'Erable.

II - METHODE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

L'enregistrement du potentiel électrique est réalisé par la technique des micro-électrodes intracellulaires. La mise en place de cette manipulation comprend plusieurs préparations : la fabrication des microélectrodes, le montage d'un appareillage d'enregistrement, la confection de différents milieux de contact et dans certains cas, le pré-traitement du matériel cellulaire.

A - Fabrication des microélectrodes

Les microélectrodes sont fabriquées selon la méthode d'ALEXANDER et NASTUK (1958).

Une microélectrode est essentiellement constituée d'une micropipette de verre obtenue par étirement d'un tube capillaire de 1 mm de diamètre intérieur. Les micropipettes sont disposées sur un portoir et placées dans un récipient contenant une solution de KCl 3M. Le liquide, porté à ébullition et sous vide partiel, pénètre dans les micropipettes ; il forme ainsi la solution de contact indispensable, entre le milieu extérieur que l'on mesure et un fil d'argent qui constitue l'électrode proprement dite, laquelle est reliée au circuit d'enregistrement.

Après refroidissement, les micropipettes sont transférées dans un Bécher contenant une solution de KCl 3M où elles sont conservées jusqu'à leur utilisation (au maximum une semaine).

Les caractéristiques des microélectrodes sont mesurées avant chaque utilisation : leur résistance doit être comprise entre 2,5 et 10 M Ω (ce qui correspond à un diamètre à la pointe d'environ 1 μ m) ; de même, le potentiel de contact entre la pointe de la microélectrode et le milieu extérieur, doit être inférieur à 5 mV et ne doit pas varier au cours d'une manipulation ; il est retranché des valeurs mesurées.

Ainsi contrôlées, les microélectrodes permettent un enregistrement stable et de longue durée du potentiel intracellulaire.

B - Manipulation

Sous le microscope, une microélectrode est implantée dans une cellule à l'aide d'un micromanipulateur. La différence de potentiel entre l'électrode de mesure et celle de référence, est transmise par l'intermédiaire du montage décrit plus loin à un enregistreur graphique.

La déviation lue, correspond donc à la différence de potentiel entre le contenu interne de la cellule et le milieu extérieur avec lequel elle est en contact.

C - Montage du dispositif d'enregistrement

Le montage utilisé pour nos mesures est représenté par la figure 3.

L'élément principal de ce dispositif est un enregistreur graphique ALLCOSCRIP (type EN 216) à encre sous pression. Il est équipé de deux préamplificateurs différentiels (type PA 5), ce qui permet une

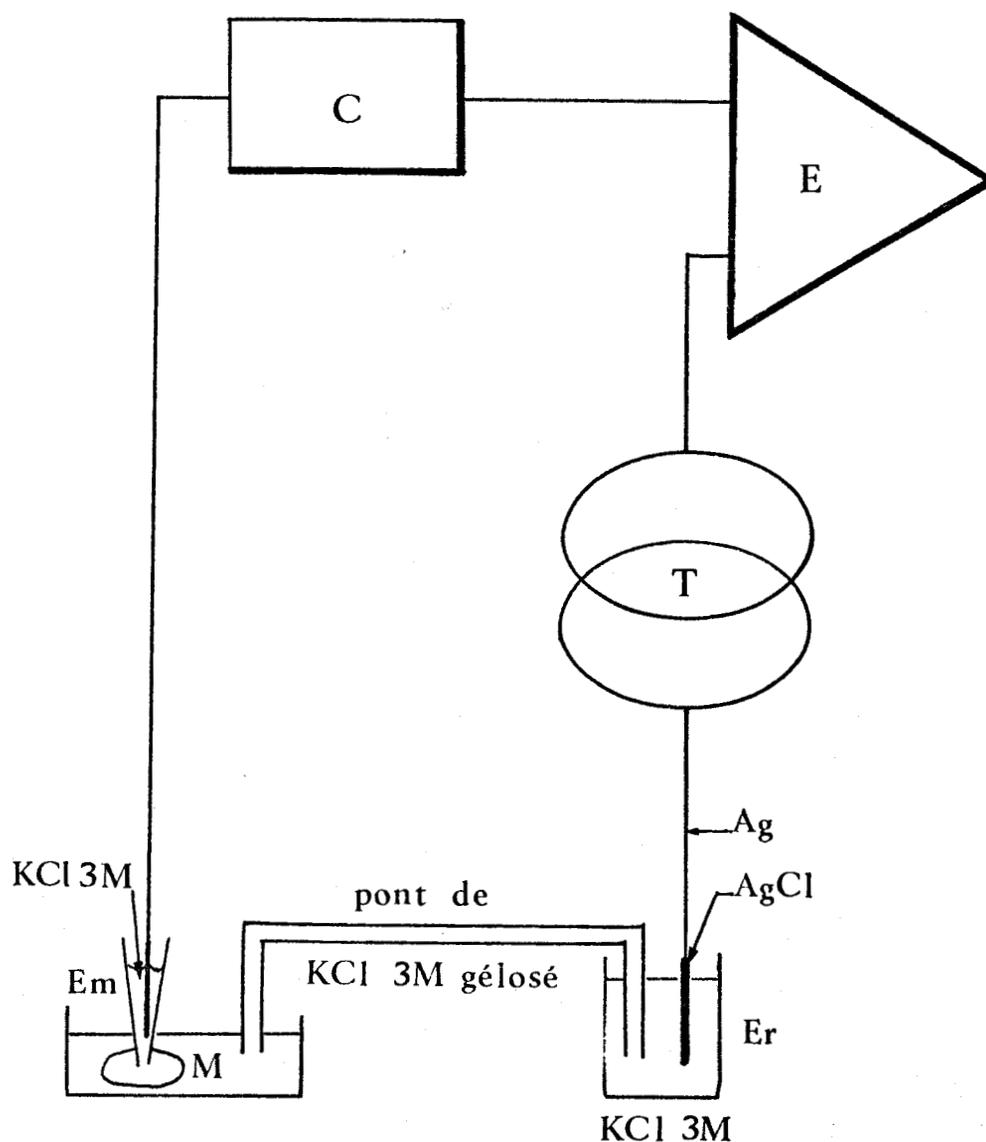


Figure 3 : Dispositif de mesure

E : Enregistreur

C : Changeur d'impédance (Entrée $100\text{ M}\Omega$; Sortie $1\text{ K}\Omega$; Gain ≈ 1)

T : Boîte de tarage (de ± 1 à 100 mV)

M : Milieu de LAMPOR modifié par LESCURE

Em : Microélectrode de mesure

Er : Electrode de référence



gamme d'enregistrement des tensions, allant de 5 mV à 20 V par cm. L'impédance d'entrée de ces amplificateurs est de 5 M Ω ; elle est donc faible par rapport à celle de la microélectrode et à la résistance interne des cellules; il convient donc d'intercaler un abaisseur d'impédance (C) :

- Impédance d'entrée : infinie
- Impédance de sortie : 1 K Ω
- Gain : 1

Afin de contrôler avec précision l'amplitude des potentiels enregistrés, nous utilisons une boîte de tarage c'est-à-dire un générateur de tensions constantes calibré sur deux gammes :

- 1 à 10 mV
- 10 à 100 mV

Pour éliminer les potentiels de jonction, les électrodes sont constituées de fils d'argent chloruré (Ag/AgCl) en contact avec des solutions concentrées de chlorure de potassium (KCl 3M). L'ensemble du dispositif de mesure est installé dans une cage de Faraday.

D - Les milieux

La mesure du potentiel intracellulaire des cellules d'Erable dans les conditions habituelles de culture, se réalise avec le milieu de LAMPORT modifié par LESCURE (1966) comme solution de contact. Il constitue donc le milieu de référence à partir duquel d'autres solutions extérieures seront élaborées en modifiant les concentrations habituelles des différents constituants du milieu de culture.

Dans ces conditions, la pression osmotique est maintenue constante en réglant la concentration en saccharose ; chaque fois que cela a été possible, une substitution équivalente en charge a été effectuée pour maintenir la force ionique du milieu.

Les cellules sont déposées dans une cuvette en plexiglass qui permet les changements du milieu extérieur sans déplacement de la préparation.

Dans certains cas, les cellules ont subi un prétraitement de durée variable (indication figurant au protocole de chaque expérience),

durée qui ne fut jamais inférieure à 2 heures.

III - METHODES D'ANALYSE

Les mesures de potentiels intracellulaires ne sont interprétables en termes de perméabilité cellulaire, que lorsque les concentrations des milieux dans lesquels elles sont effectuées sont connues. Nous avons donc réalisé des analyses quantitatives dans le milieu externe et dans le contenu cellulaire, à l'aide d'une méthode automatisée, du moins, en ce qui concerne les teneurs en cations (K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++}).

A - Analyse automatique des cations

L'analyse est réalisée selon la technique décrite par GRIGNON (1969-a) sur un autoanalyseur Technicon qui comprend une série de modules indépendants.:

- Distributeurs d'échantillons liquides ou solides
- Bain-marie (glycol thermostaté)
- Dialyseur
- Minéralisateur
- Colorimètre
- Photomètre de flamme (émission ou absorption atomique)

1) Dosage du potassium

Le dosage se fait par photométrie de flamme (émission) en présence d'une quantité constante de lithium pour éliminer les interférences.

2) Dosage du sodium

La technique précédente est utilisée en présence de lithium, mais avec des filtres interférentiels différents. La méthode des surcharges (confection d'une gamme au voisinage de la concentration de l'échantillon) a été employée.

3) Dosage du magnésium

Le magnésium est dosé en absorption atomique en présence de strontium.

4) Dosage du calcium

Il se réalise également en absorption atomique en présence de lanthane.

La méthode automatique donne des résultats très reproductible qui ne sont pas significativement différents des dosages manuels que nous avons effectués.

B - Préparation des analyses

En ce qui concerne le milieu liquide, des aliquotes de 20 ml sont évaporées sous vide, puis reprises par 20 ml d'HCl N/10. C'est sous cette forme que les échantillons seront pris en charge par l'analyseur automatique.

Les dosages des contenus cellulaires sont effectués à partir de cellules préalablement lyophilisées : 50 mg de poudre sont repris par 20 ml d'HCl N/10. L'échantillon est ensuite soumis à une vibration ultrasonique pendant 15 minutes. Le volume est ajusté ensuite à 25 ou 50 ml. Les dosages réalisés après cette préparation sont comparables à ceux exécutés après une minéralisation par l'acide perchlorique RP + l'acide nitrique 36°B.

C - Mesure du pH

La mesure du pH du milieu de culture nous est apparue importante pour la compréhension de la physiologie des cellules d'Erable.

Elle a été réalisée à l'aide d'une électrode spécifique reliée à un millivoltmètre (METROHM pHmeter). L'étalonnage de l'appareil est contrôlé avant chaque mesure.

RESULTATS

I - CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES D'ERABLE .

Les différents travaux effectués sur les cellules d'Erable par HENSHAW et al. (1966), LESCURE (1966) et GRIGNON (1969-a) montrent que la croissance dépend essentiellement de trois types de facteurs :

- Facteurs chimiques (composition du milieu de culture)
- Facteurs physiques (éclairage et température)
- Facteurs biologiques (conditionnement du milieu, âge de la suspension "mère" au moment du repiquage).

L'influence des deux premières catégories de facteurs a été maintenue grâce à l'utilisation d'un seul milieu de culture (milieu de LAMPORT modifié par LESCURE) et par un contrôle rigoureux des conditions de température et d'éclairage tout au long de la culture.

L'examen microscopique des suspensions cellulaires d'Erable montre qu'elles sont le plus souvent constituées d'amas comprenant plusieurs dizaines de cellules (Figure 4-A) ; plus souvent on les trouve isolées et groupées par 2 (Figure 4-B). La coloration vitale par le rouge neutre permet de localiser plus exactement l'emplacement des vacuoles (Figure 4-C) et de préciser leur importance relative par rapport à l'ensemble du contenu cellulaire.

A - ASPECT DE LA COURBE DE CROISSANCE

La croissance d'une suspension cellulaire d'Erable exprimée par les variations du poids de matière fraîche (Figure 5) peut être décomposée en trois phases :

1) Phase de latence

Pendant les 6 premiers jours de culture, le poids de matière fraîche varie peu. Les cellules présentent cependant des modifications structurales (accroissement de la masse cytoplasmique, augmentation du nombre de ribosomes, mitochondries et corps de Golgi, diminution puis disparition des grains d'amidon) qui traduisent l'activité métabolique intense qui précède les premières divisions cellulaires.

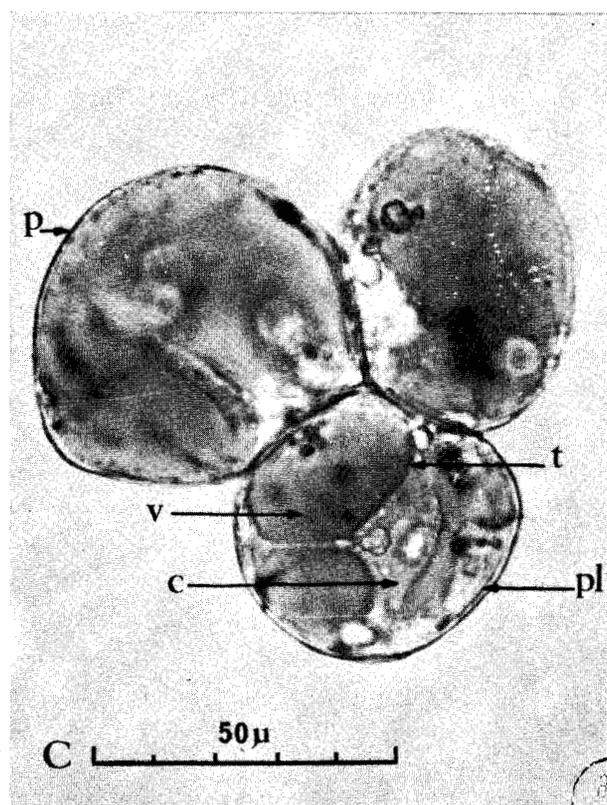
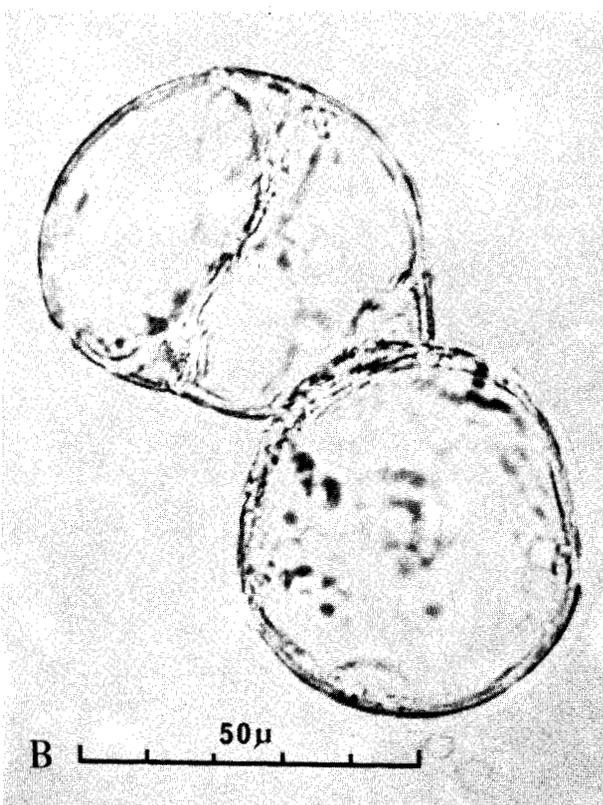
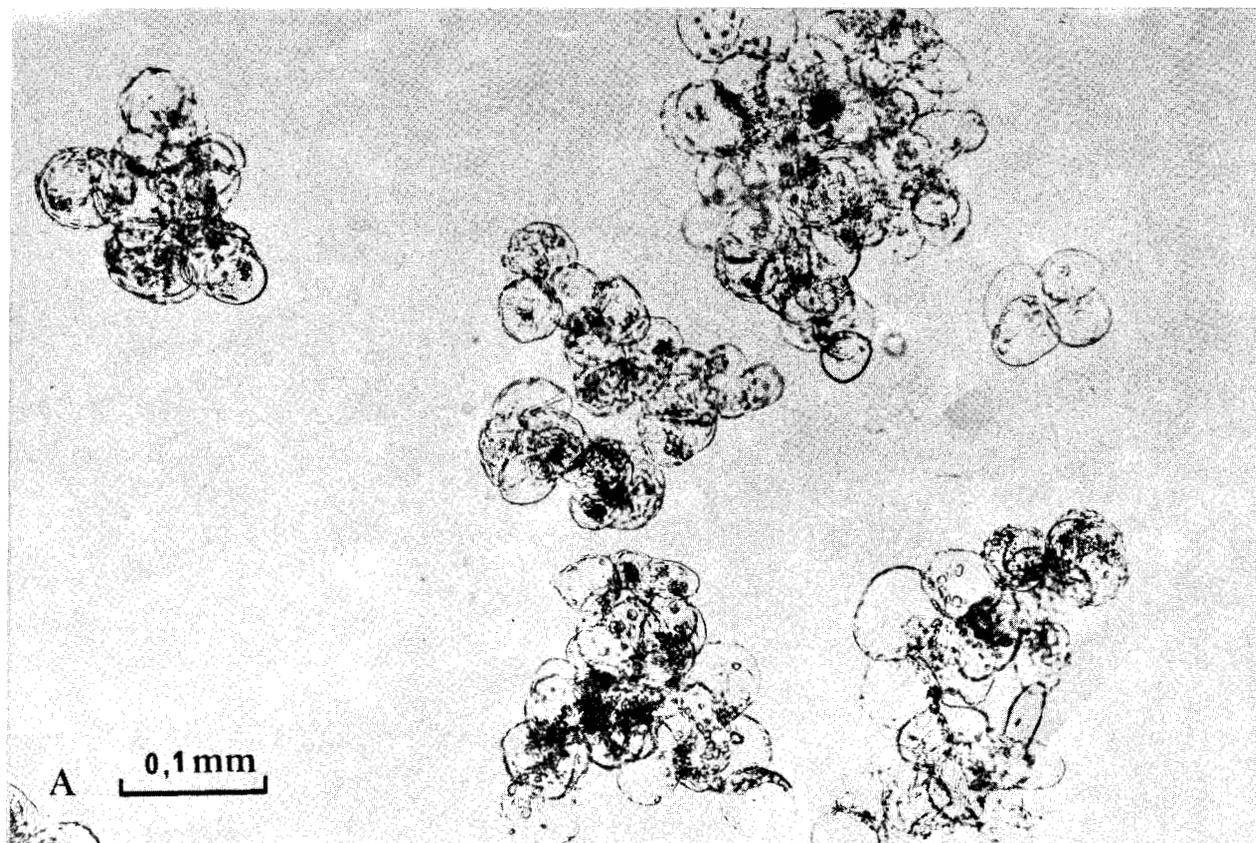


Figure 4 : Aspects des cellules d'Erable cultivées sur le milieu liquide de LAMPORT pendant trois jours.

A : Aspect d'une suspension cellulaire

B : Détail d'un groupe de deux cellules

C : Détail du contenu cellulaire après coloration vitale par le rouge neutre (0,1%); elle permet de distinguer l'emplacement des vacuoles (v), du cytoplasme (c), de la paroi (p), du plasmalemma (pl) et du tonoplaste (t).

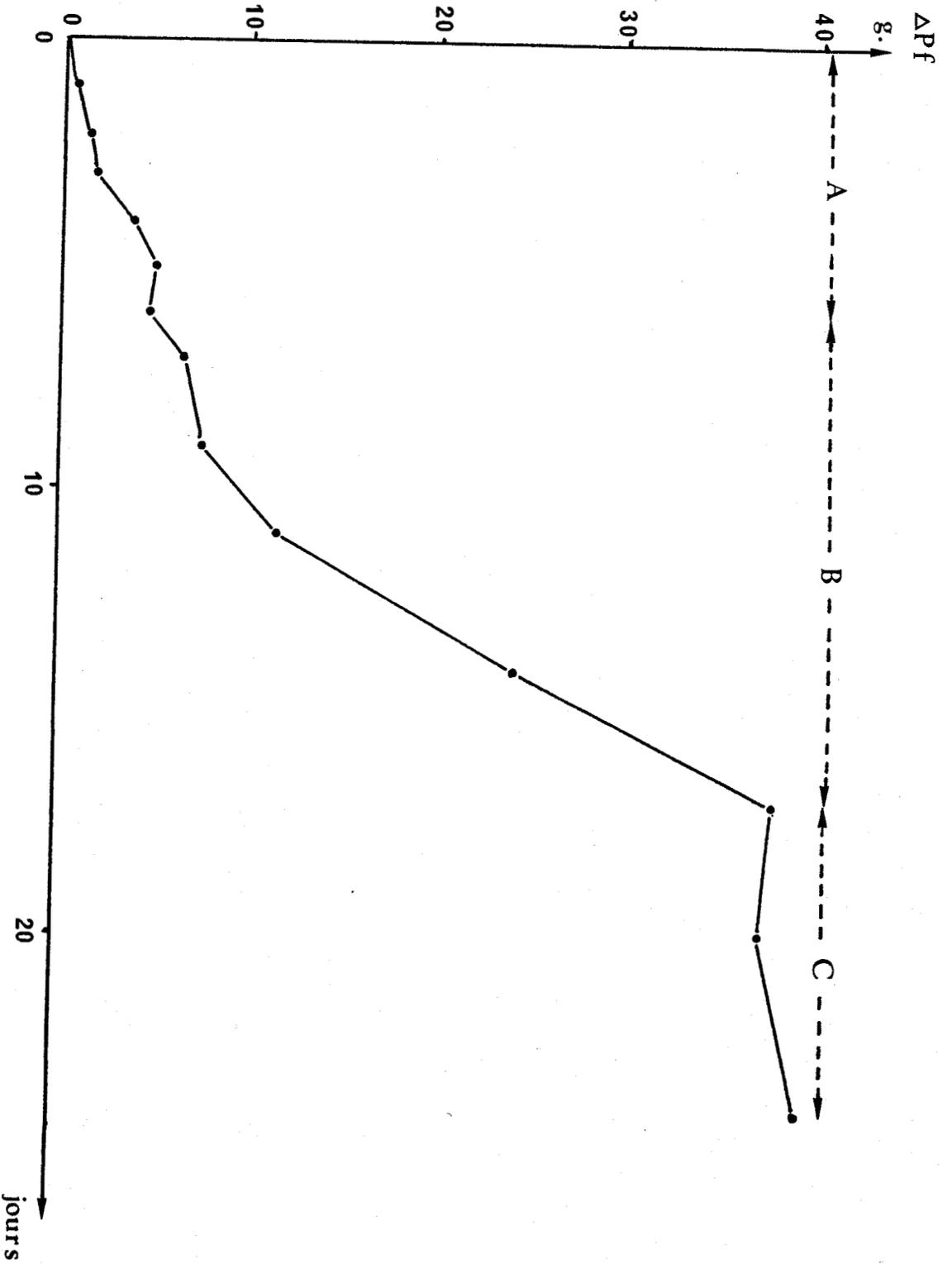


Figure 5 : Variation du poids de matière fraîche au cours de la culture d'une suspension cellulaire d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) âgée de 17 jours au moment du repiquage.
A : phase de latence B : phase de croissance exponentielle C : phase stationnaire.

2) Phase de croissance exponentielle

Le poids de matière fraîche augmente progressivement à partir du 7ème jour, les cellules ont toutes à peu près le même diamètre (environ 30 microns) leur nombre s'accroît, témoignant ainsi d'une prolifération cellulaire importante. En outre, les cellules sont relativement peu vacuolisées.

3) Phase stationnaire

Après 17 jours, l'accroissement du poids de matière fraîche s'arrête. La taille des cellules tend cependant à augmenter, certaines d'entre elles sont plurinuclées. Le nombre des cellules libres augmente.

La littérature abonde en méthodes de mesure de la croissance des suspensions cellulaires. Rejetant la mesure de la densité cellulaire peu applicable à notre matériel, nous nous sommes adressé à l'accroissement des poids de matière fraîche, de matière sèche, à l'augmentation de la matière azotée et du volume cellulaire (Figure 6).

Mise à part la variation de l'azote cellulaire (courbe C) qui est très décalée dans le temps, il semble que les principales différences résident dans l'établissement de la phase stationnaire : celle-ci intervient plus tôt et est plus marquée sur la courbe B représentant l'évolution du poids de matière sèche que sur celle qui traduit les variations du poids de matière fraîche (Courbe A). En effet, les cellules ont tendance à augmenter de taille en fin de culture, ce qui correspond à une accumulation relative d'eau.

En général, nous avons choisi d'exprimer la croissance des suspensions cellulaires par l'augmentation du poids de matière fraîche.

Ainsi, lorsque les cultures proviennent de suspensions cellulaires après 17 jours, l'évolution du poids de matière fraîche est comparable aux données habituelles de la littérature (STREET, 1967). Seule la durée respective des différentes phases varie, elle est en particulier fonction de la qualité des cellulesensemencées.

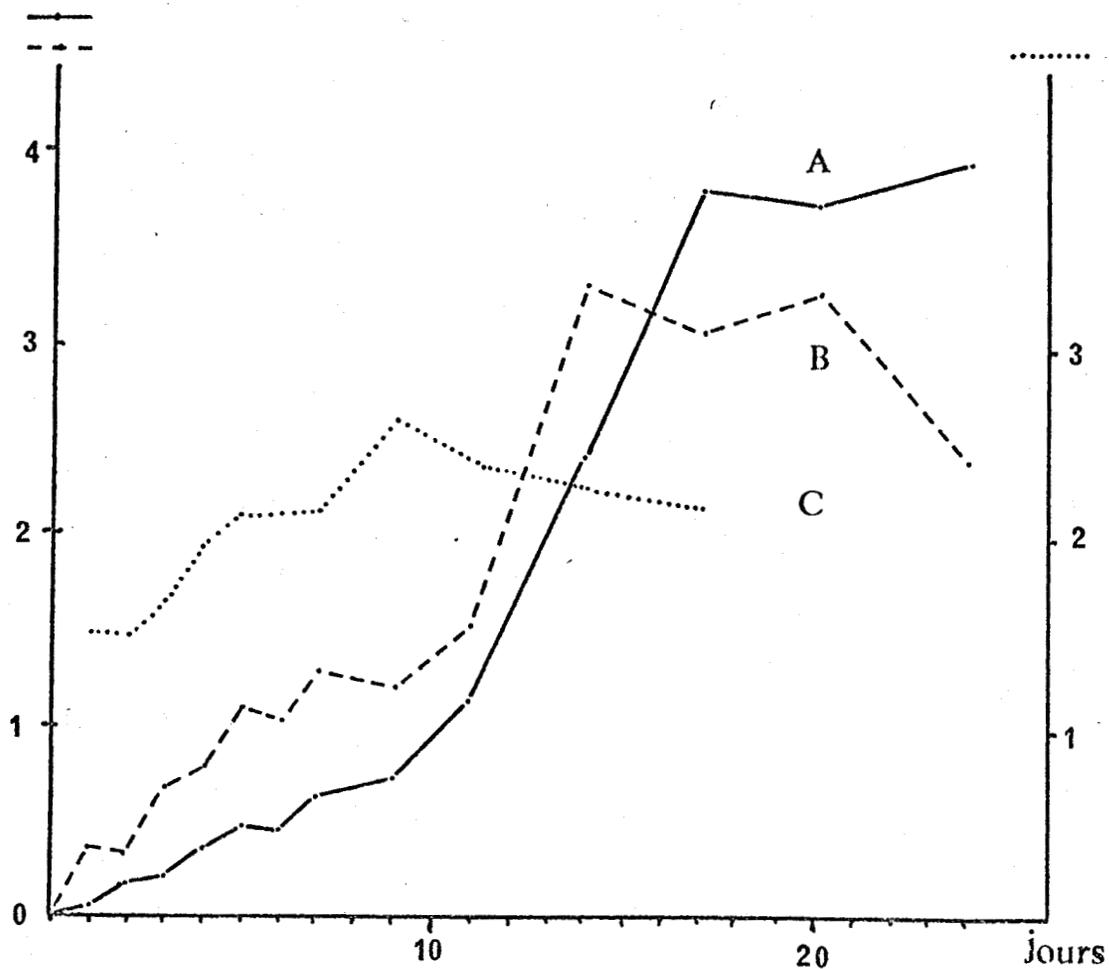


Figure 6 : Variations du poids de matière fraîche (A), du poids de matière sèche (B) et de l'azote total (C) au cours de la culture d'une suspension cellulaire d'Erable âgée de 17 jours au moment du repiquage.

(A) : poids de matière fraîche (en grammes $\times 10$)

(B) : poids de matière sèche (en grammes $\times 0,5$)

(C) : azote total (en $\mu\text{A. mg}^{-1}$ de mat. sèche)



B - IMPORTANCE DE LA DENSITE D'ENSEMENCEMENT

LESCURE (1966) a souligné l'importance de la quantité de cellules d'Erable ensemencées, pour la croissance ultérieure des suspensions cellulaires. STREET (1967) a précisé le "conditionnement" du milieu en s'appuyant sur les résultats obtenus par BENBADIS (1965) sur les cellules de Ronce.

Le poids de cellules ensemencées influence de façon importante la prolifération des suspensions cellulaires (Figure 7) : plus il est faible et moins la reprise de croissance est rapide. Au-dessous d'un certain seuil (LESCURE, 1966), les cellules sont même totalement incapables de proliférer.

Pour réaliser notre étude électrophysiologique, nous avons adopté une densité d'ensemencement de 5 grammes de matière fraîche pour 200 ml de milieu nutritif, ce qui nous permet d'obtenir une croissance importante et relativement constante.

C - IMPORTANCE DE L'AGE DE LA SUSPENSION "MERE"

Généralement, les auteurs précisent l'âge des suspensions cellulaires au moment du repiquage, mais aucune étude détaillée n'avait été entreprise pour préciser l'influence de ce facteur sur la prolifération ultérieure des cellules.

L'état physiologique des cellules au moment de leur transfert dans un milieu neuf, influe de façon nette sur la reprise de la croissance et d'une façon générale, sur la vitalité des cellules en suspension (Figure 8).

Ainsi, la croissance reprend d'autant plus difficilement que les suspensions repiquées sont plus âgées (Courbe C). La phase de latence peut donc être réduite par un repiquage hebdomadaire (Courbe A), ce qui confirme les résultats antérieurs (LESCURE, 1966).

D - VARIATIONS DU pH DU MILIEU AU COURS DE LA CULTURE

Malgré le pouvoir tampon du milieu de LAMPORT, celui-ci

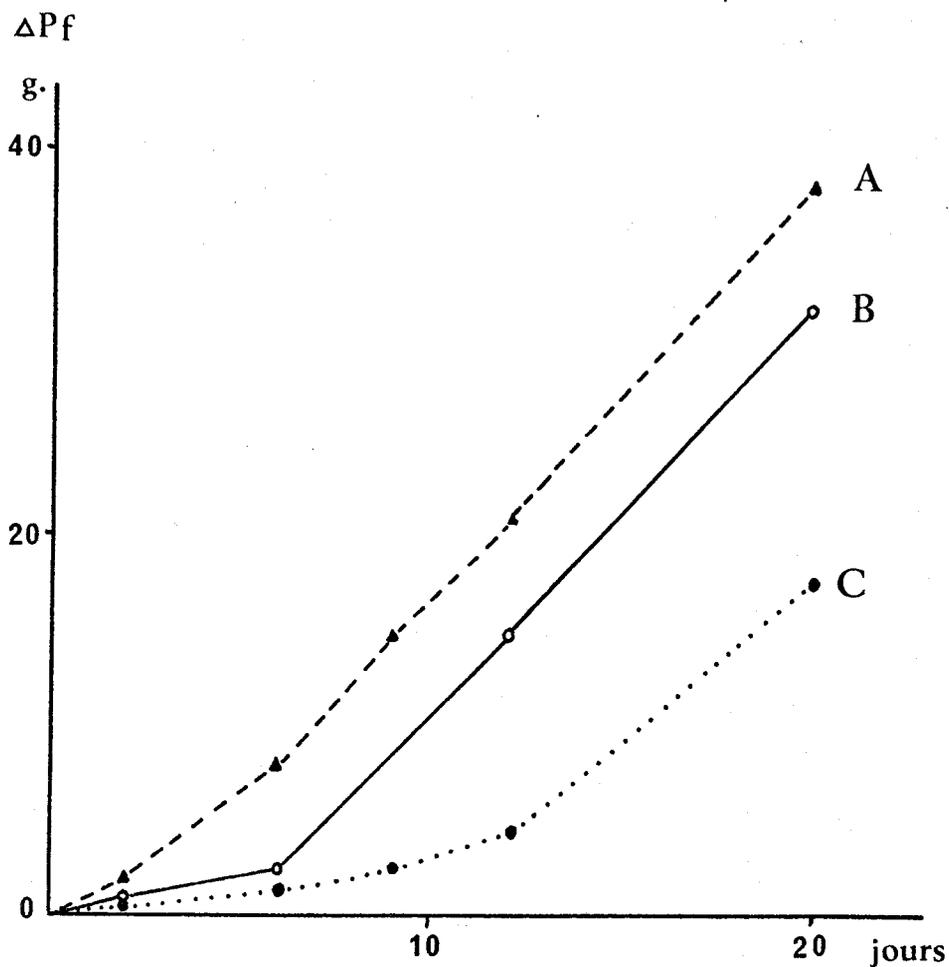


Figure 7 : Variations du poids de matière fraîche des suspensions cellulaires d'Erable, au cours du temps, en fonction du poids de cellules ensemencées.

A : 6 g B : 3 g C : 1 g (par fiole).

(Le repiquage est effectué après 10 jours de culture).



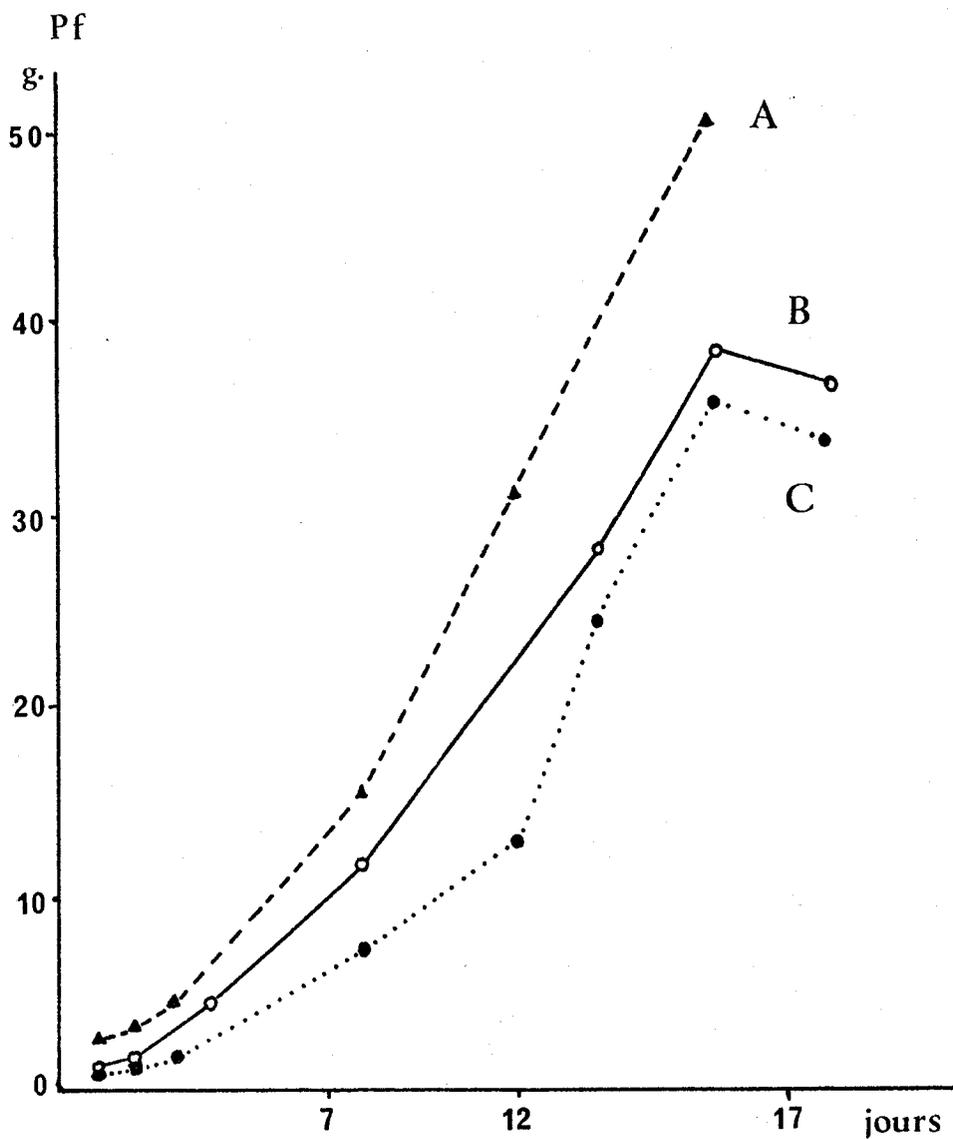


Figure 8 : Variations de l'augmentation du poids de matière fraîche au cours du temps, selon l'âge de la culture au moment du repiquage (poids ensemencé $5 \pm 0,2$ g).

A : 7 jours B : 12 jours C : 17 jours



subit au cours de la culture des modifications importantes.

Dans les conditions normales, le pH du milieu de culture est, après autoclavage, de $5,6 \pm 0,2$. Dès l'introduction des cellules, il augmente rapidement au cours des 5 ou 6 premiers jours (Figure 9), au-delà de la neutralité sa progression est plus lente, mais se poursuit pendant toute la durée de la culture.

La reproductibilité du phénomène nous a amené à l'utiliser comme critère de bon état physiologique des suspensions cellulaires. Il est en effet possible de détecter des fioles infectées par les champignons qui acidifient le milieu 24 heures après la contamination, avant même qu'ils ne soient visibles à l'œil nu.

Nous avons donc systématiquement rejeté les fioles dont le pH du milieu s'écarte de 0,4 unité pH par rapport à la moyenne.

L'obtention de ce résultat semble liée à la composition du milieu de culture, car GRIGNON (1969-a) ne signale pas de variations importantes de pH, alors qu'il utilise le milieu de HELLER. Au contraire, STUART et STREET (1969) montrent que le pH augmente rapidement après le repiquage pour se stabiliser aux alentours de 6,4, ceci sur un milieu synthétique de composition minérale identique à celui de HELLER, mais enrichi en facteurs de croissance et en urée. Ils estiment que cette augmentation de pH est fondamentale pour la reprise de la croissance et le démontrent en améliorant leur rendement par addition de NaOH (pH = 7,2) au début de la culture.

La comparaison des différents milieux utilisés pour la culture des cellules d'Erable, ne nous permet pas de conclure quant à l'origine de la variation que nous observons en début de culture. On peut noter que la quantité d'azote est beaucoup moins importante dans le milieu de HELLER, que dans celui de STUART et STREET où l'on trouve un apport d'urée et dans celui que nous utilisons où la quantité de nitrate est supérieure à celle que l'on trouve dans le milieu de HELLER. Par ailleurs, le rapport K^+/Na^+ de notre milieu de culture (≈ 44) est très différent de celui du milieu de HELLER (≈ 6). Si la modification du pH est due à une absorption de protons, elle peut être liée à un autre mécanisme d'échanges ioniques à travers les membranes cellulaires.

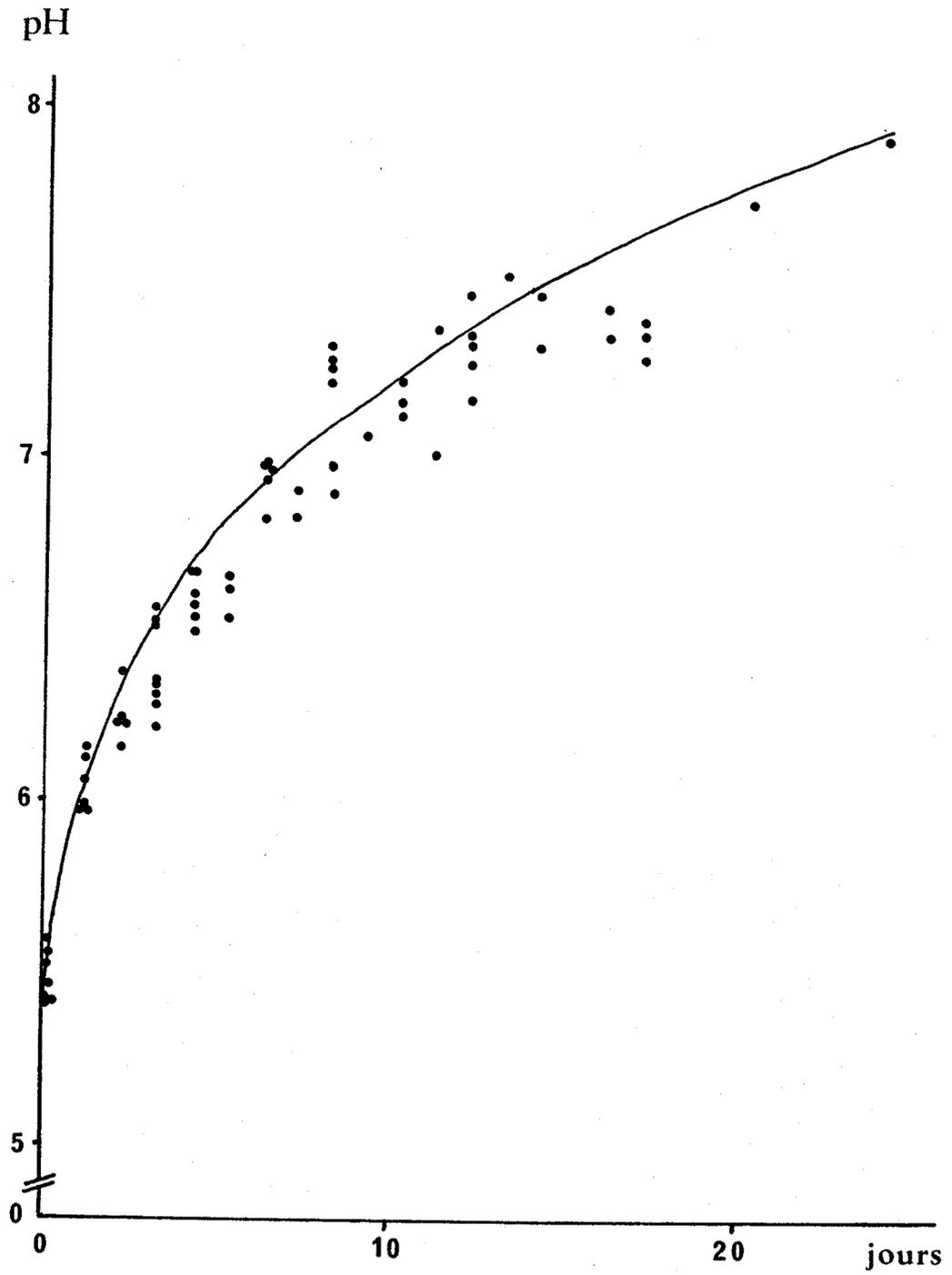


Figure 9 : Evolution du pH du milieu extracellulaire au cours de la culture des suspensions cellulaires d'Erable.



L'étude de la composition cationique du milieu de culture et du contenu des cellules doit nous permettre de discuter cette hypothèse.

E - COMPOSITION MINERALE DU MILIEU DE CULTURE

La composition du milieu de culture a été précisée précédemment (Tableau III). Mais après autoclavage, sa concentration augmente d'environ 10 %, ce dont nous tiendrons compte pour l'établissement des courbes et la réalisation des calculs.

Au cours de leur culture, les cellules puisent dans le milieu nutritif les éléments minéraux qui leur sont nécessaires, ce qui fait varier la composition ionique du milieu (Figure 10).

Ainsi le potassium (K^+) et le magnésium (Mg^{++}) disparaissent progressivement pendant toute la culture ; leur absorption est maximale entre le 7ème et le 15ème jour : elle semble donc suivre le rythme de la croissance.

La concentration du calcium (Ca^{++}) baisse pendant les premières 24 heures, indiquant une absorption rapide, puis demeure stable. Ceci ne signifie pas obligatoirement un changement de perméabilité au calcium, car l'entrée peut être compensée par un rejet équivalent qui annule le résultat global.

La situation est identique en ce qui concerne le sodium (Na^+) dont la concentration ne varie pas au cours de la culture.

F - COMPOSITION MINERALE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Les méthodes de prélèvement, d'extraction et d'analyse ont été précédemment décrites.

Après 12 jours de culture sur le milieu de LAMPORT (Tableau IV), les suspensions cellulaires d'Erable présentent une forte teneur en K^+ et une concentration en Na^+ très réduite. Si nous comparons ces résultats avec les proportions des cations dans le milieu de LAMPORT neuf (Tableau V), nous constatons une accumulation relative de K^+ et Mg^{++} dans les cellules.

Par contre, celles-ci sont moins concentrées que le milieu

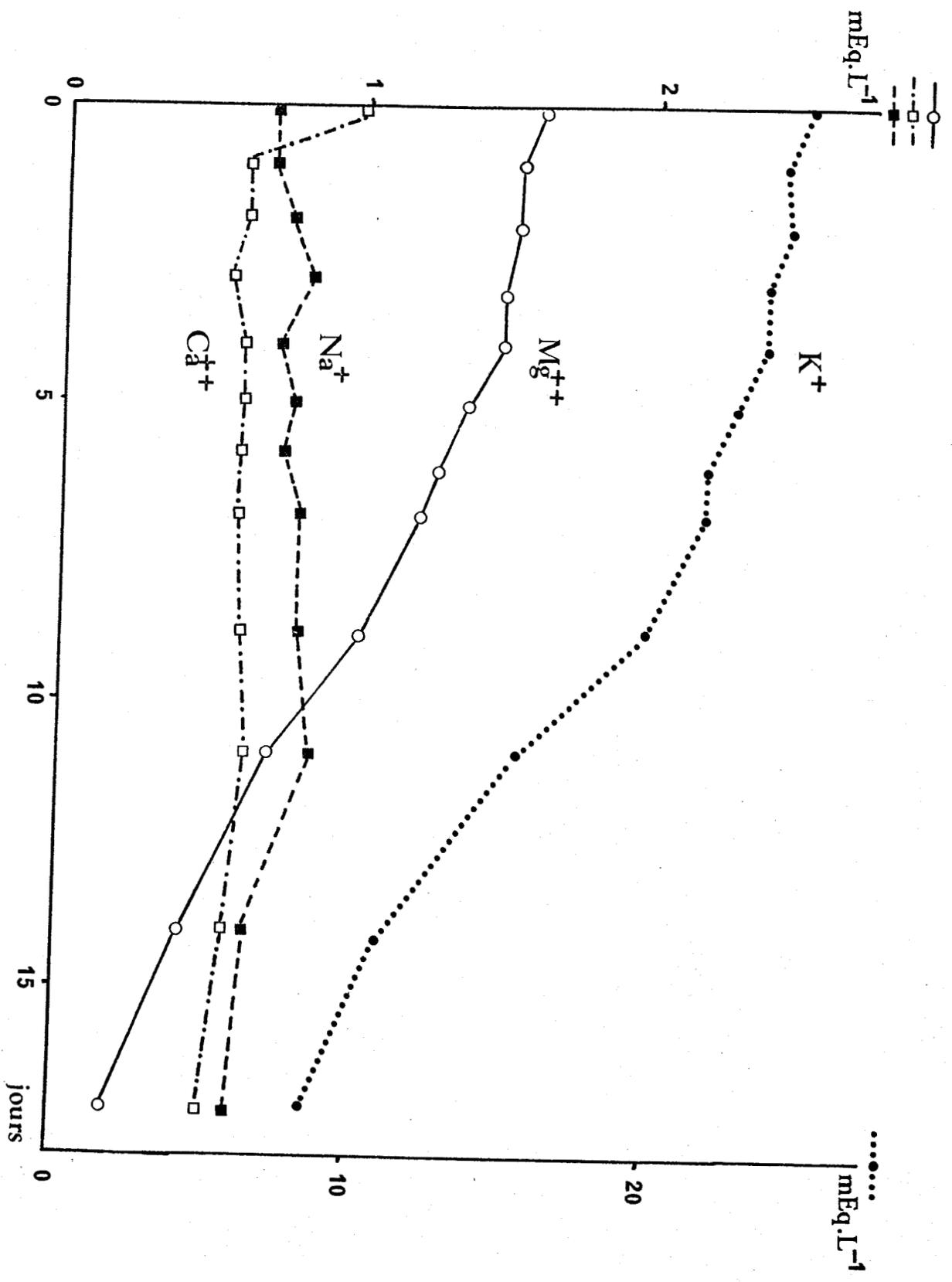


Figure 10 : Evolution de la concentration en cations du milieu de LAMPORF au cours de la culture des cellules d'Acer pseudoplatanus L.



TABLEAU IV : Composition minérale des suspensions cellulaires d'Erable après 12 jours de culture. Les teneurs en ions sont exprimées en μ Eq par gramme de substance fraîche et en pourcentage de la somme des principaux cations.

Elément	N° de l'essai			Moyenne
	I	II	III	
K ⁺	99 90,8 %	93,4 90,8 %	94,5 86,2 %	96,3 89,4 %
Na ⁺	0,171 0,15 %	0,230 0,22 %	0,211 0,19 %	0,200 0,20 %
Ca ⁺⁺	1,89 1,7 %	1,98 1,92 %	2,62 2,4 %	2,16 2 %
Mg ⁺⁺	7,96 7,3 %	7,25 7,05 %	10,38 9,6 %	8,53 8 %
Total	109	102,8	107,7	106,5



TABLEAU V : Comparaison entre les proportions de cations du milieu de LAMPORT neuf et des suspensions cellulaires d'Erable après 12 jours de culture.

(Les pourcentages sont calculés par rapport à la somme des cations).

Espèces ioniques	Milieu de LAMPORT neuf		Suspension cellulaire après 12 jours de culture	
	C mEq.l ⁻¹	%	μEq.g ⁻¹ mat. fraîche	%
Potassium	23,95	88,7	96,3	89,8
Sodium	0,57	2,1	0,2	0,2
Calcium	1	3,7	2,2	2
Magnésium	1,48	5,5	8,5	8
Total	27	100	106,5	100



TABLEAU VI : Concentrations ioniques (en $\mu\text{Eq.g}^{-1}$) des suspensions cellulaires d'Erable à différents moments de la culture.

ELEMENTS	Jours de culture			
	3	7	11	17
K ⁺	83,1	144,7	96,2	92,3
Na ⁺	0,227	0,233	0,197	0,182
Ca ⁺⁺	2,25	2,86	1,94	1,38
Mg ⁺⁺	7,69	13,08	7,60	6,55



en Ca^{++} et surtout en Na^+ ce qui permet d'affirmer que les cellules d'Erable, comme celles des autres végétaux supérieurs, ont tendance à rejeter le Na^+ .

La composition des extraits cellulaires a ensuite été étudiée à différentes périodes de la culture : 3ème jour, 7ème jour, 11ème jour et 17ème jour.

L'augmentation des teneurs en éléments minéraux est particulièrement nette au 7ème jour de culture (Tableau VI) c'est-à-dire au début de la phase exponentielle de croissance. Elle affecte principalement le K^+ qui accuse un accroissement de 75 %, mais ne modifie pratiquement pas la concentration en Na^+ .

Les cellules d'Erable entretenues sur le milieu de LAMPORT accumulent donc des éléments minéraux pendant la phase de latence et les emmagasinent au maximum, au moment où la croissance entre dans la phase de multiplication active. Cette évolution des concentrations ioniques internes au cours de la culture liée à celle du milieu extérieur permet de supposer que les barrières cellulaires sont très sélectives aux différents ions et que leurs perméabilités varient au cours de la culture.

L'étude du potentiel intracellulaire et de ses variations au cours de la culture doit nous permettre de préciser ces observations.

II - ETUDE DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE

A - VALEUR DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE

Les valeurs du potentiel intracellulaire des cellules d'Erable baignant dans leur milieu de culture sont comprises entre - 4 et - 47 mV. L'électronégativité du contenu cellulaire par rapport au milieu externe correspond à celle déjà signalée chez d'autres végétaux supérieurs (voir tableau II). Toutefois, la valeur absolue du potentiel intracellulaire des cellules d'Erable est relativement faible, sans doute à cause de la concentration du milieu de culture en éléments minéraux.

L'influence du milieu extracellulaire sur le potentiel intracellulaire a été étudiée en remplaçant le milieu de LAMPORT par une solution beaucoup plus simple ne contenant que du chlorure de sodium ou de potassium.

Les résultats réunis dans le tableau VII montrent les variations du potentiel intracellulaire vacuolaire obtenues en présence de ces différentes solutions.

L'augmentation d'amplitude du potentiel de la vacuole apparaît donc très nettement liée à la diminution de concentration ionique des milieux extérieurs.

Ces observations sont donc en accord avec la conception "qu'une mesure de potentiel risque de recouvrir des réalités différentes selon la nature du milieu extérieur" (LABRICQUE, 1961). C'est la raison pour laquelle il convient de préciser sa composition lors de chaque expérience.

B - COMPARTIMENTATION DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE

La grande variabilité des mesures peut, au premier abord, paraître surprenante ; toutefois, il faut préciser qu'en enfonçant progressivement la microélectrode dans la cellule, on obtient successivement trois valeurs de potentiels différentes (Figure 11). Ceci est confirmé lorsque l'électrode est retirée lentement de la cellule. Les trois valeurs enregistrées dans une même cellule doivent corres-

TABLEAU VII : Influence de la composition du milieu extracellulaire sur le potentiel intracellulaire vacuolaire des cellules d'Erable.

Composition du milieu extracellulaire	Piv (mV)
<u>LAMPOR</u> K : 23 mEq.l ⁻¹ Na : 0,56 mEq.l ⁻¹	- 36 ± 4
KCl + Saccharose 0,1 mM.l ⁻¹ 20 g.l ⁻¹	- 74 ± 3
NaCl + Saccharose 0,1 mM.l ⁻¹ 20 g.l ⁻¹	- 66 ± 11

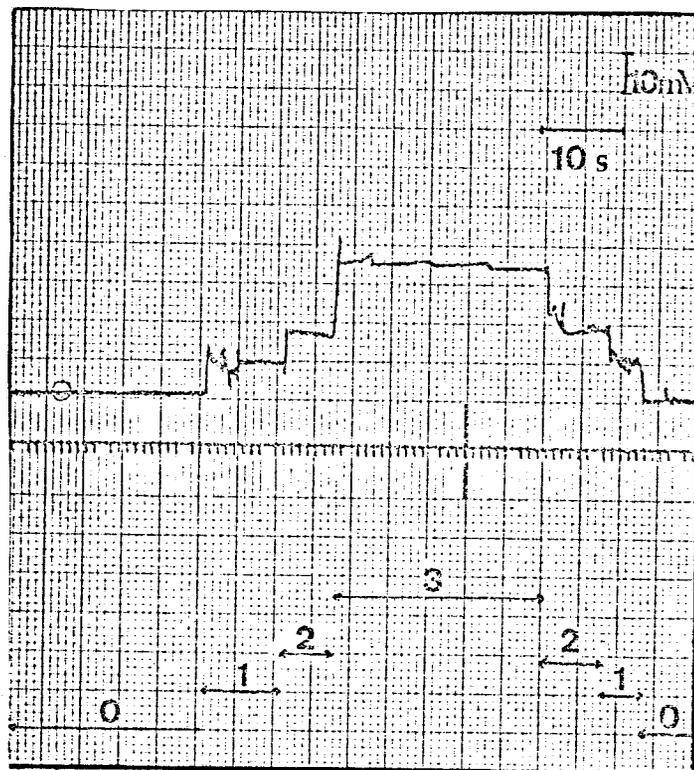


Figure 11 : Enregistrement des variations du potentiel intracellulaire, lors de l'enfoncement (puis du retrait) progressif de l'électrode de mesure dans une cellule d'Acer pseudoplatanus L. provenant d'une suspension cellulaire repiquée depuis 17 jours.

- 0 : Référence (électrode dans le milieu externe)
- 1 : Potentiel de paroi
- 2 : Potentiel de cytoplasme
- 3 : Potentiel de vacuole



pondre aux potentiels de paroi, de cytoplasme et de vacuole envisagés par RADENOVIC et PENCIC (1970) et par ETHEERTON B. (1970).

En appliquant ces données à notre matériel, les mesures obtenues se répartissent de la façon suivante :

- 1° : Potentiel de paroi : de - 4 à - 11 mV
- 2° : Potentiel de cytoplasme: de - 9 à - 27 mV
- 3° : Potentiel de vacuole : de -25 à - 47 mV

Il apparaît que la valeur absolue du potentiel de cytoplasme (Pic) est inférieure à celle du potentiel de vacuole (Piv) conformément aux observations de SINCLAIR (1967) chez Hookeria lucens.

Toutefois, il semble que ces résultats soient en opposition avec la majorité de ceux obtenus chez les autres végétaux supérieurs.

Il est vraisemblable que lorsqu'on enfonce rapidement une électrode dans une cellule, la mesure effectuée correspond au potentiel vacuolaire défini par SCHILDE (1966).

C - EVOLUTION DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE AU COURS DE LA CULTURE

Les valeurs moyennes du potentiel intracellulaire ne sont pas constantes, elles évoluent au cours de la culture. Cette variation est d'ailleurs différente selon l'âge des cellules au moment du repiquage dans un milieu neuf (Figure 12).

Si les cellules sont repiquées après 17 jours, leur potentiel moyen est relativement élevé (- 17 à - 20 mV) ; il diminue régulièrement pendant les dix premiers jours de culture puis s'élève à nouveau.

Au contraire, si les cellules sont repiquées tous les dix jours, au moment où le potentiel est le plus bas, celui-ci reste stationnaire et ne s'élève que si la culture se prolonge au delà de 10 jours.

L'évolution des potentiels intracellulaires moyens au cours de la culture montre que le potentiel diminue pendant la phase

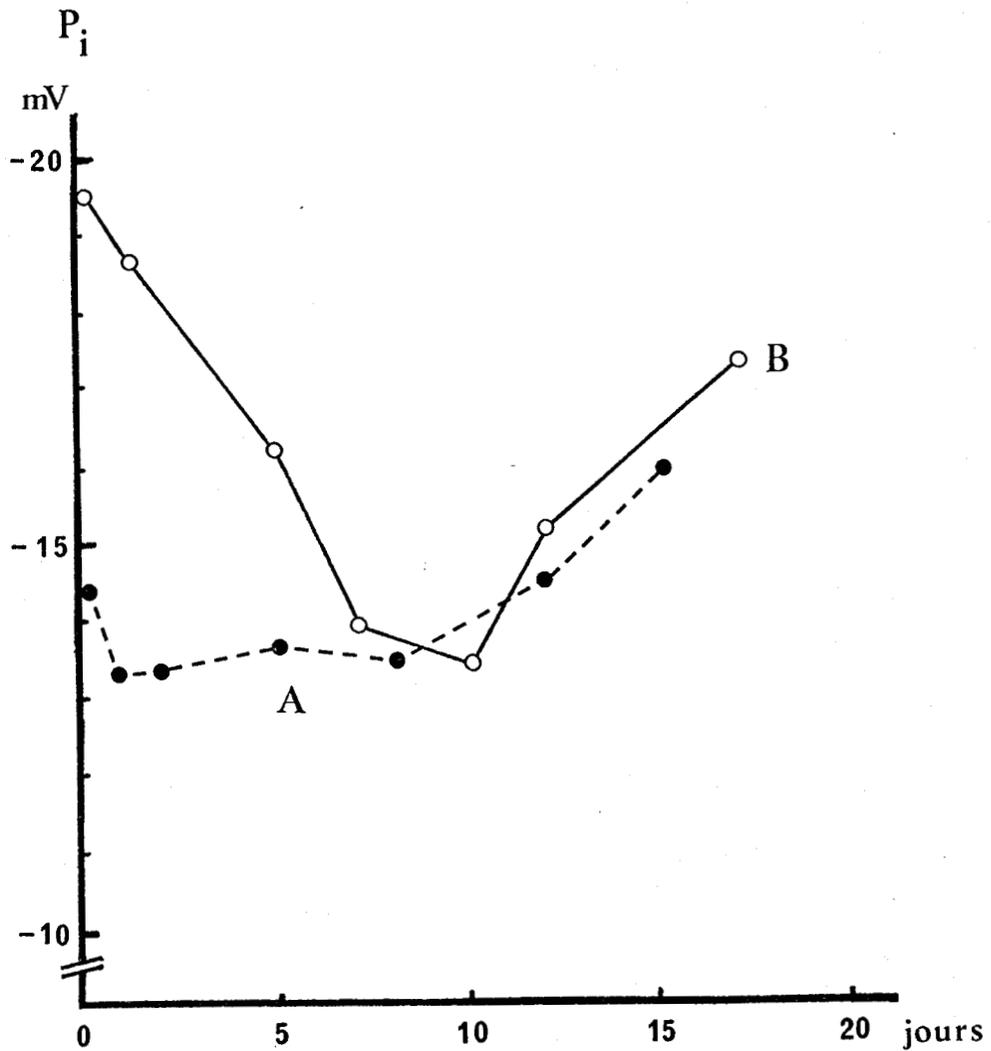


Figure 12 : Evolution des moyennes de potentiels intracellulaires en fonction de la durée de la culture et de l'âge des cellules au moment du repiquage :

A : Repiquage après 10 jours.

B : Repiquage après 17 jours.



de latence, passe par un minimum lors des premières divisions cellulaires, c'est-à-dire au moment où les échanges entre la cellule et le milieu sont importants, comme en témoignent la courbe d'évolution du pH du milieu (Figure 9) et le tableau V, qui montre l'accumulation des cations dans les cellules, pendant les 7 premiers jours de la culture.

L'augmentation du potentiel intracellulaire au cours du vieillissement correspond en premier lieu, à un épuisement du milieu extracellulaire, et probablement à des modifications du métabolisme : la synthèse d'anions organiques semble jouer un rôle important dans l'accumulation du potassium dans la vacuole et par conséquent, influencer sur l'absorption de cet ion (NOBEL, 1970-b).

C'est donc en étudiant la nature du potentiel intracellulaire, qu'il sera possible de décrire en termes d'échanges ioniques les modifications de potentiel que nous venons de mettre en évidence.



III - CONTRIBUTIONS IONIQUES A LA GENESE DU POTENTIEL INTRACELLULAIRE

Pour comprendre la contribution des différentes espèces ioniques qui constituent le milieu extracellulaire des cellules d'Eragrostis, à la génèse de leur potentiel intracellulaire, nous étudions essentiellement les variations du potentiel intracellulaire vacuolaire (Piv) des cellules cultiv es depuis trois jours sur le milieu de LAMPORT et soumises à l'action de milieux de concentration ionique d termin e.

Auparavant, nous avons vérifié que les H^+ n'influencent pas le Piv pour des valeurs de pH comprises entre 4,75 et 7,12 (Figure 13). Ces résultats montrent que le complexe membranaire est peu perméable aux ions H^+ aux concentrations habituelles du milieu de culture.

Les variations du pH occasionn es par des modifications de la composition ionique du milieu sont sans effet sur le Piv dans les limites définies ci-dessus.

Si on représente la variation de Piv par rapport au logarithme de la concentration externe de l'ion étudié, la pente de la courbe est d'autant plus accentu e que la perméabilité membranaire à l'ion est elle-même plus grande.

Ainsi, l'influence des cations : K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} a été envisag e et la participation de leurs mouvements dans l'établissement du potentiel vacuolaire a pu être montr e.

A - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION POTASSIQUE

Le potassium, à la concentration de $23,95 \text{ mEq.l}^{-1}$, représente près de 90 p.100 de l'ensemble des cations du milieu de culture. Il est présent sous quatre formes : nitrate, chlorure, phosphate monopotassique et iodure, ce qui exclut la possibilité de le supprimer totalement du milieu par défaut d'ion de remplacement.

Une augmentation de la teneur en K^+ du milieu de LAMPORT est obtenue par addition de KNO_3 (jusqu'à un maximum de 100 mEq.l^{-1} de K^+). Il en résulte une dépolarisation rapide du Piv qui demeure stable, tant que le milieu enrichi en K^+ baigne les cellules (Figure 14-A).

Figure 13 : Action du pH du milieu extracellulaire sur le Piv des cellules d'Erable après 3 jours de culture.

Remplacement du milieu de Lamport (pH = 5,6) par un milieu modifié :

- par addition de tampon Tris 0,1 M + HCl 0,1 N :

A : pH = 2,6

B : pH = 3,75

C : pH = 4,75

D : pH = 5,5

- par addition de tampon Tris 0,1 M :

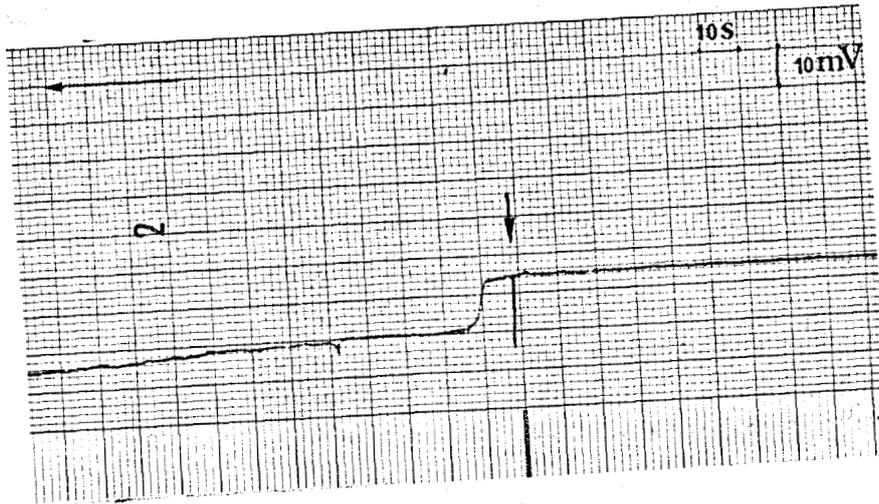
E : pH = 6,4

F : pH = 7,12

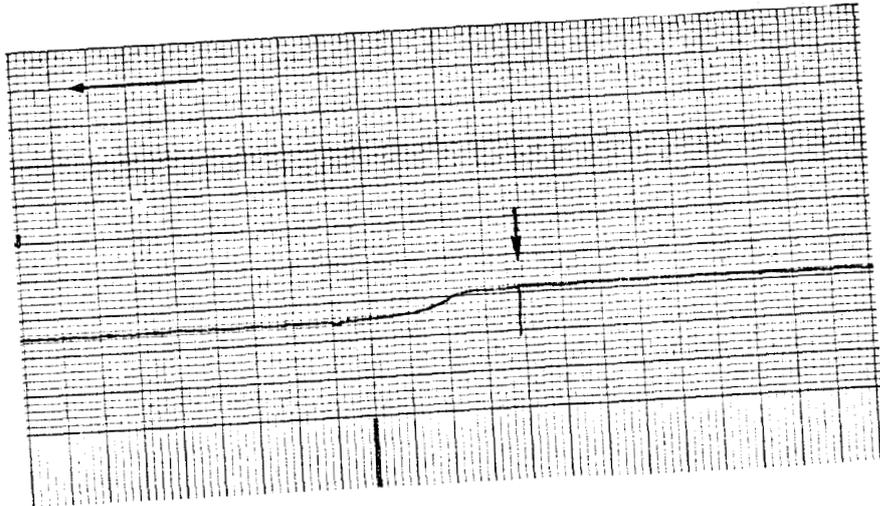
(←) : sens de lecture des enregistrements

(↓) : injections des milieux modifiés

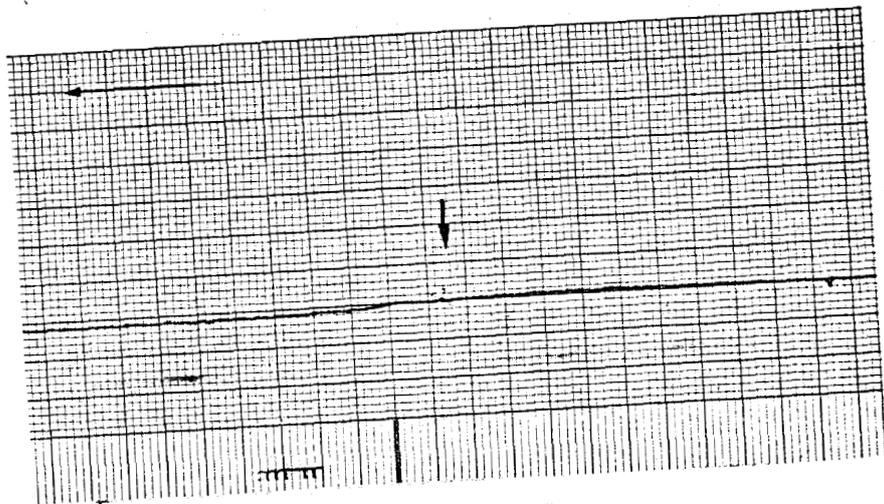
A



B

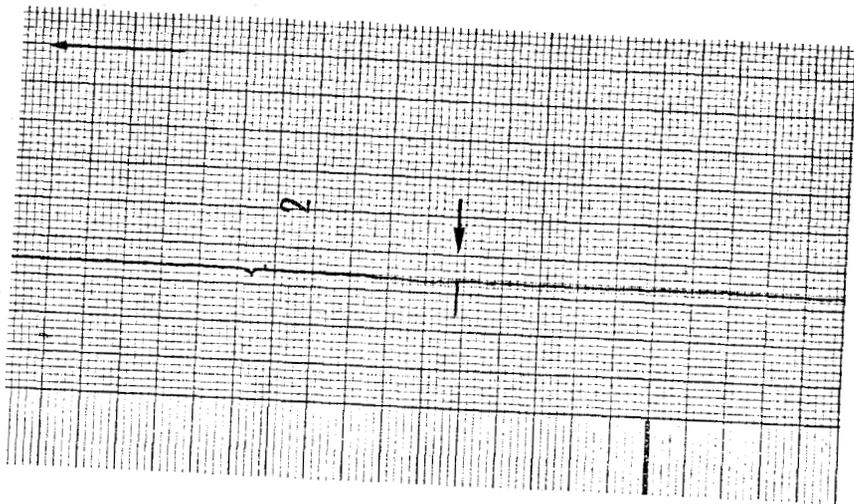


C

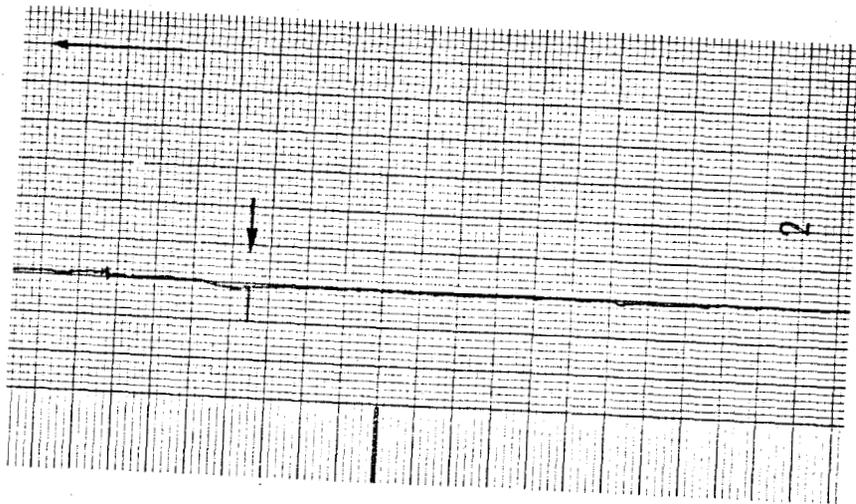


BUS
L'ELLE

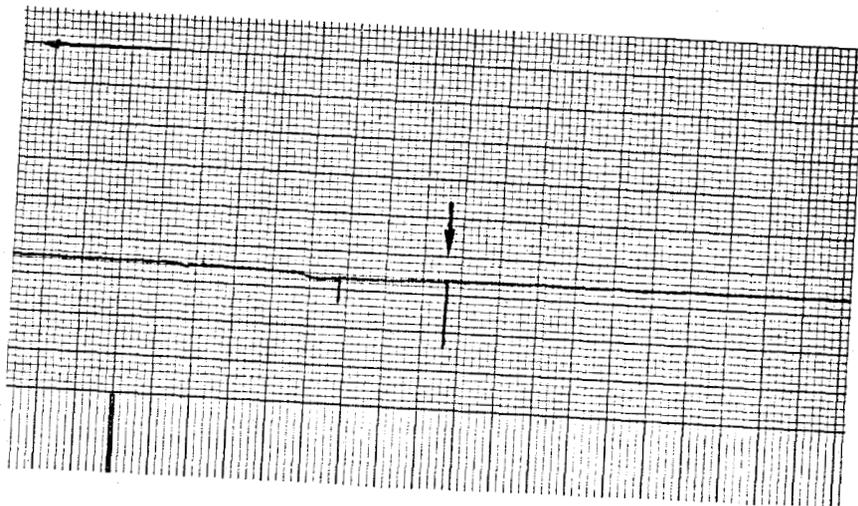
D



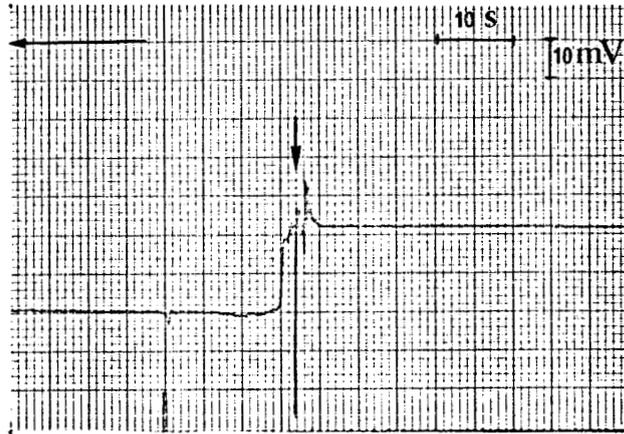
E



F



A



B

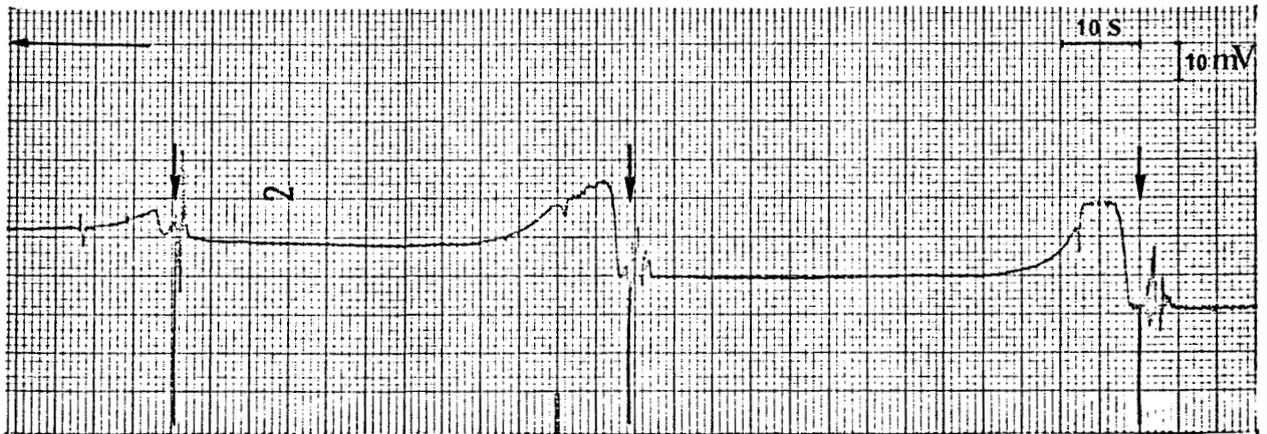


Figure 14 : Action d'une modification du milieu extracellulaire sur le Piv des cellules d'Erable après 17 jours de culture.

- A : Action d'un milieu de LAMPORT enrichi en K^+ (100 mEq.L^{-1}) sur des cellules en équilibre d'échange depuis 2 heures dans le milieu de LAMPORT.
- B : Action du milieu de LAMPORT neuf sur des cellules d'Erable en équilibre d'échange depuis 2 heures dans un milieu de LAMPORT enrichi en K^+ .

(←) : sens de lecture des enregistrements
 (↓) : injections



La dépolarisation membranaire est très rapide, ce qui permet de supposer qu'elle est due exclusivement à l'augmentation du gradient de concentration du K^+ et par conséquent, la $[K^+]_i$ reste probablement inchangée.

Quand les cellules sont replacées dans leur milieu de culture, leur Piv retrouve progressivement sa valeur initiale. Le renouvellement de la solution extracellulaire par injections successives provoque une rééquilibration discontinue qui se traduit au niveau du tracé de l'enregistrement par une remontée en palier (Figure 14-B). Par ailleurs, la présence d'une hyperpolarisation transitoire après chaque renouvellement du milieu est d'interprétation difficile.

Dans l'expérience précédente, l'enrichissement du milieu de culture en K^+ est obtenu par addition de KNO_3 . Par conséquent, on peut supposer que NO_3^- puisse également agir sur le Piv. Cependant, l'effet dû à l'accroissement de $[K^+]_e$ est de même amplitude si on ajoute du K_2SO_4 ou du KCl à la place du KNO_3 . Dans ces conditions, il est logique de penser que l'effet observé est principalement dû à l'excès de K^+ .

Il est également possible d'abaisser la concentration potassique externe $[K^+]_e$ en diminuant la quantité de KNO_3 du milieu ; la pression osmotique est maintenue constante en ajoutant la quantité convenable de saccharose. En remplaçant le milieu de culture par une solution moins concentrée en potassium, on provoque une augmentation de l'amplitude du Piv (Figure 15).

Dans ces conditions, la représentation des variations du Piv en fonction du logarithme de $[K^+]_e$ (Figure 16) montre une relation linéaire pour des $[K^+]_e$ comprises entre 3,55 et 23,95 mEq.L⁻¹. Pour des concentrations supérieures à 23,95 mEq.L⁻¹, la relation reste linéaire, mais avec une pente plus accentuée.

Si une simple diffusion passive règle la distribution du potassium entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, l'équation de NERNST peut rendre compte de la variation de Piv en fonction du logarithme de $[K^+]_e$.

$$\text{Piv (mV)} = E_K = 58 \log \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} \quad \text{à } 20^\circ\text{C.}$$

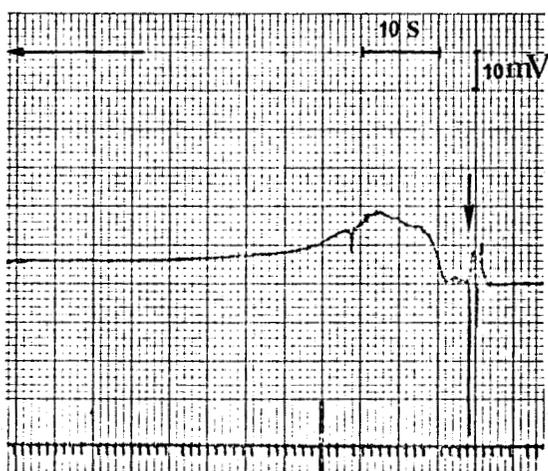


Figure 15 : Action du remplacement du milieu de culture par un milieu appauvri en K^+ (2 mEq.L^{-1}) sur le Piv des cellules d'Erable après 7 jours de culture.

(←) : sens de lecture de l'enregistrement
 (↓) : injection du milieu appauvri en K^+

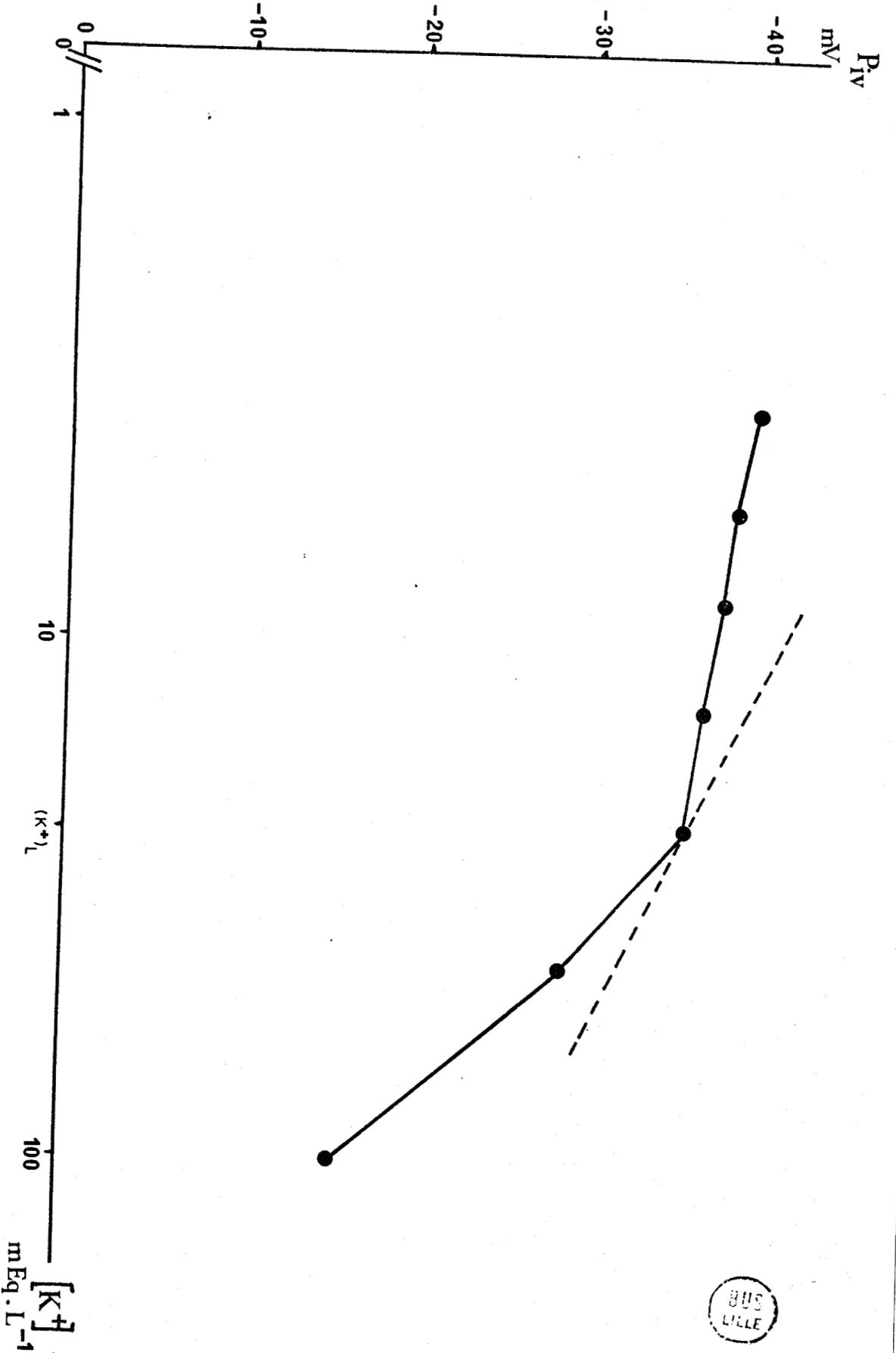


Figure 16 : Variation du potentiel vacuolaire en fonction de la concentration externe en potassium. $(K^+)_L$: concentration habituelle du milieu de LAMPORT en potassium.

La $[K^+]_i$ demeurant constante, une modification de 10 fois la $[K^+]_e$ doit correspondre à une variation de l'amplitude du potentiel de 58 mV. Or, les variations extrapolées à partir de la courbe expérimentale (Figure 16), sont respectivement de 5,3 mV pour les faibles concentrations et de 31,2 pour les fortes concentrations. La pente de la tangente à la courbe au point correspondant à la $[K^+]_e$ du milieu de culture est seulement de 18,2 mV. Dans ces conditions, le potassium ne semble donc pas être distribué passivement.

On peut aussi comparer les valeurs du Piv mesurées et celles des potentiels calculés, E_K , à l'aide de la relation précédente (Tableau VIII).

Il apparaît qu'à la concentration habituelle du milieu de LAMPORT en potassium ($23,95 \text{ mEq.L}^{-1}$), les valeurs de Piv et de E_K sont très proches l'une de l'autre, ce qui indique que la cellule est en équilibre thermodynamique avec le milieu extérieur. Cette conclusion est incompatible avec nos mesures de potentiels qui montrent que la distribution du K^+ ne peut être passive puisque la pente de la courbe (Figure 16) est très largement inférieure à 58 mV. Cette contradiction apparente des résultats peut être due à une appréciation incorrecte de l'activité interne du potassium qui peut dans le cas des cellules d'Erable, être très différente de la concentration globale que nous avons considérée. En outre, notre calcul ne tient pas compte de la présence dans la cellule de deux phases électrolytiques distinctes, dont les propriétés ne sont pas obligatoirement identiques. Peut-être, une partie du potassium intracellulaire se trouve-t-elle sous forme liée.

Toutefois, aux faibles concentrations de $[K^+]_e$, le gradient électrochimique est en faveur d'une sortie nette passive de K^+ qui doit être compensée par une entrée active de cet ion. Par contre, aux concentrations élevées ($[K^+]_e > 23,95 \text{ mEq.L}^{-1}$), les mouvements semblent s'effectuer en sens inverse, conformément aux conclusions d'ETHERTON (1963) sur Pisum sativum.

En résumé, les mouvements du K^+ ne traduisent pas l'existence d'un équilibre thermodynamique du moins, dans les conditions où les cellules d'Erable sont habituellement cultivées. Il faut donc envisager, soit l'intervention d'un processus actif, soit un échange

TABLEAU VIII : Comparaison entre les potentiels mesurés (Piv) et les potentiels calculés (E_K) des cellules d'Erable baignant dans des solutions de concentration variable en potassium.

Concentration de la solution externe (mEq.L ⁻¹)	Différence de potentiel (mV)		
	Piv	E_K	(Piv - E_K)
3,55	- 40	- 83,5	+ 43,5
5,50	- 39	- 72,4	+ 33,4
8,30	- 38	- 61,5	+ 23,9
13,25	- 37	- 50,3	+ 13,3
23,95	- 36	- 36,5	+ 0,5
42,35	- 29	- 21	- 8
100,55	- 16	+ 0,8	- 16,8



ionique avec d'autres cations, comme le suppose GRIGNON (1969-a et -b)

B - ROLE DE LA CONCENTRATION SODIQUE

Présent sous forme de phosphate disodique et de sel d'E.D.T.A., le sodium est très peu concentré ($0,57 \text{ mEq.l}^{-1}$) dans le milieu de LAMPORT neuf.

L'addition de NaCl provoque une modification stable de l'amplitude du potentiel (Tableau IX).

L'addition de NaCl est compensée par un retrait équivalent de saccharose.

La représentation des variations du potentiel vacuolaire en fonction du logarithme de $[\text{Na}^+]_e$ (figure 17), montre une relation linéaire pour les concentrations inférieures à 10 mEq.l^{-1} , relation dont la pente s'accroît pour les concentrations sodiques plus élevées. Néanmoins, la distribution du Na^+ ne peut être considérée comme exclusivement passive : en effet, pour une variation de 10 fois la $[\text{Na}^+]_e$, la pente de la courbe n'atteint au maximum que $13,8 \text{ mV}$ et la tangente à cette courbe à la concentration habituelle du milieu de LAMPORT est de $4,2 \text{ mV}$. Or, on sait que dans le cas d'une distribution passive, la relation de NERNST prévoit une variation d'amplitude du potentiel de 58 mV , pour une modification de 10 fois la concentration externe.

La comparaison entre les mesures de Piv et les valeurs calculées E_{Na} à l'aide de la relation de NERNST, montre que les valeurs mesurées sont beaucoup plus négatives et que la différence ($\text{Piv} - E_{\text{Na}}$) augmente pour des valeurs croissantes de $[\text{Na}^+]_e$ (Tableau X).

Par conséquent, les cellules accumulent moins le sodium que ne le prévoit le gradient électrochimique. Or, la concentration habituelle du milieu de culture en sodium ($0,56 \text{ mEq.l}^{-1}$) est relativement faible et nous avons montré que non seulement, les cellules d'Erable n'accumulent pas le Na^+ , mais elles le rejettent.

Nos résultats indiquent donc que la perméabilité membranaire des cellules d'Erable au sodium est vraisemblablement faible, du fait de la pente de la relation exprimant la variation de Piv en fonction de $\log [\text{Na}^+]_e$, et qu'il y a un rejet de Na^+ contrôlé par le métabolisme.

TABLEAU IX : Variations du Piv des cellules d'Erable placées dans des solutions externes de concentration sodique différente.

Solution extracellulaire	Piv (mV)
LAMPORT	- 37,6 \pm 7,1
LAMPORT + 1 mM NaCl	- 34,3 \pm 6,9
LAMPORT + 10 mM NaCl	- 31,6 \pm 8,4
LAMPORT + 100 mM NaCl	- 19,3 \pm 7,9

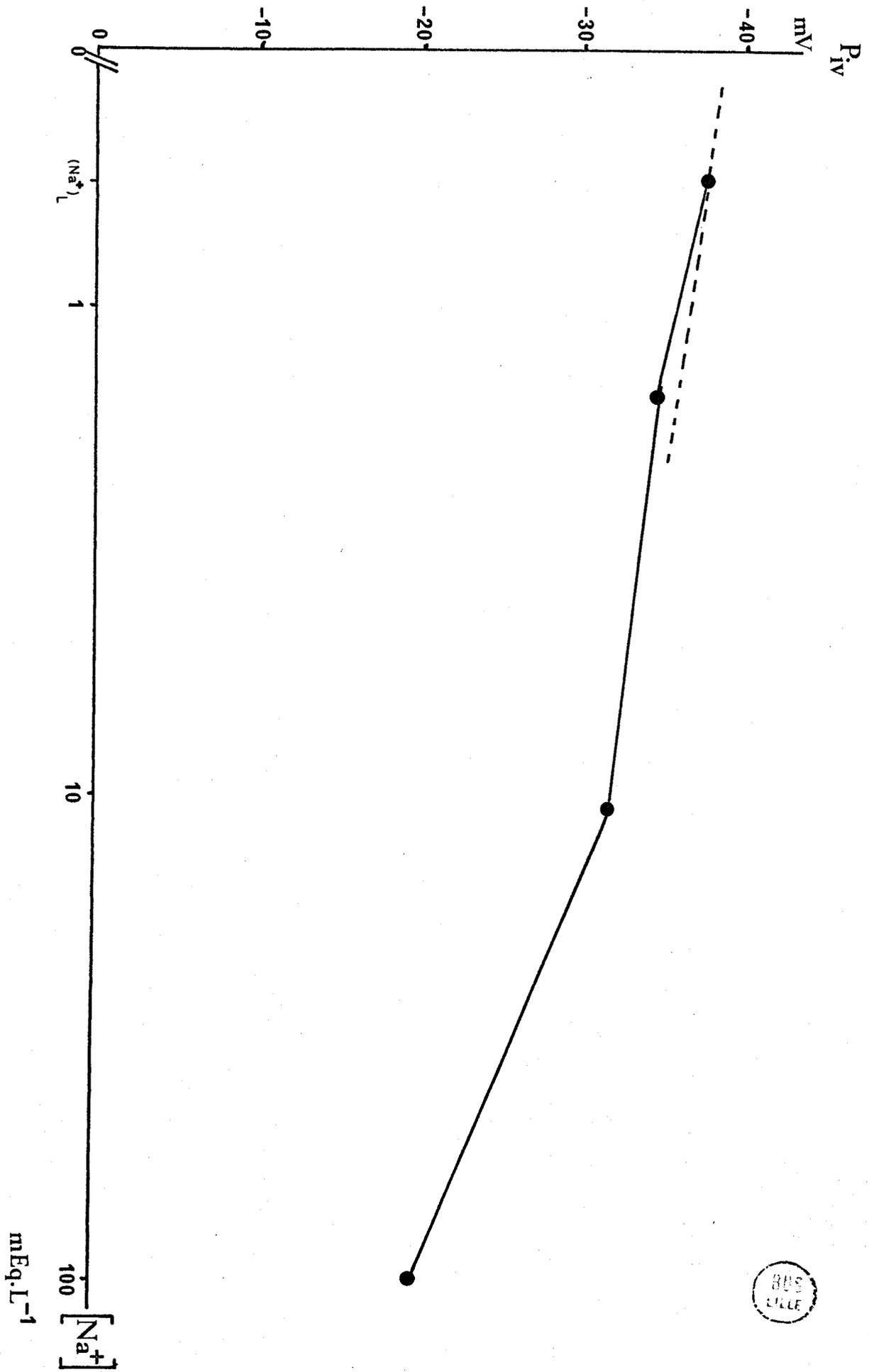


Figure 17 : Variation du potentiel vacuolaire en fonction de la concentration externe en sodium.
 $(Na^+)_L$: concentration habituelle du milieu de LAMPORR en sodium.





TABLEAU X : Comparaison entre les potentiels mesurés (Piv) et les potentiels calculés (E_{Na^+}) des cellules d'Erable baignant dans des solutions de concentration variable en Na^+ .

Concentration de la solution externe (mEq . L ⁻¹)	Différence de potentiel (mV)		
	Piv	E_{Na^+}	(Piv - E_{Na^+})
0,56	- 37,6	+ 18,8	- 56,4
1,55	- 34,3	+ 44,5	- 78,8
10,55	- 31,6	+ 92,8	-124,4
100,50	- 19,3	+149,6	-168,9

C - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION CALCIQUE

Un milieu sans calcium (Ca^{++}_0) est réalisé par suppression du nitrate de calcium du milieu de LAMPORT ; inversement, l'enrichissement du milieu en Ca^{++} est obtenu en multipliant par 2, 5 et 10 la quantité habituelle de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ contenue dans le milieu de culture. Après autoclavage, les pH de ces différentes solutions varient de 5,58 à 4,50 suivant la concentration en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Ils sont ramenés à leur valeur habituelle (5,6) par addition de tampon tris 0,1 M.

Lorsqu' on remplace le milieu de LAMPORT par le milieu (Ca^{++}_0), la cellule s'hyperpolarise de façon réversible d'environ 4 mV.

De plus, le Piv varie linéairement avec le logarithme de la $[\text{Ca}^{++}]_e$; la pente de la tangente à la courbe au point d'abscisse $[\text{Ca}^{++}]_L$ est d'environ 10 mV (Figure 18).

Si le Ca^{++} se distribue passivement, la pente de la courbe $\text{Piv} = f.(\log [\text{Ca}^{++}]_e)$ doit être de 29 mV pour une variation de 10 fois la $[\text{Ca}^{++}]_e$ comme le prévoit l'équation de NERNST :

$$E_{\text{Ca}}(\text{mV}) = 29 \log \frac{[\text{Ca}^{++}]_e}{[\text{Ca}^{++}]_i} \quad \text{à } 20^\circ\text{C},$$

à condition que la concentration interne $[\text{Ca}^{++}]_i$ reste constante, ce que l'on peut supposer, étant donné que les milieux hypocalciques et hypercalciques agissent très rapidement. Or, l'expérience montre que la variation correspondant à une augmentation de 10 fois la $[\text{Ca}^{++}]_e$ n'est que de 10 mV.

L'ensemble de ces résultats indique que le complexe membranaire est perméable au Ca^{++} . Il est néanmoins possible que le Ca^{++} ait, comme cela est généralement admis, une action sur la perméabilité membranaire aux autres ions.

La différence entre les valeurs des potentiels mesurés et celles obtenues par le calcul $E_{\text{Ca}^{++}}$ met en évidence l'existence d'un gradient électrochimique vers l'intérieur de la cellule qui est d'autant plus net que la concentration externe $[\text{Ca}^{++}]_e$ augmente (Tableau XI).

Le sens du gradient électrochimique et la variation du Piv pour une variation de 10 fois $[\text{Ca}^{++}]_e$ plaident en faveur d'un transport actif de Ca^{++} .

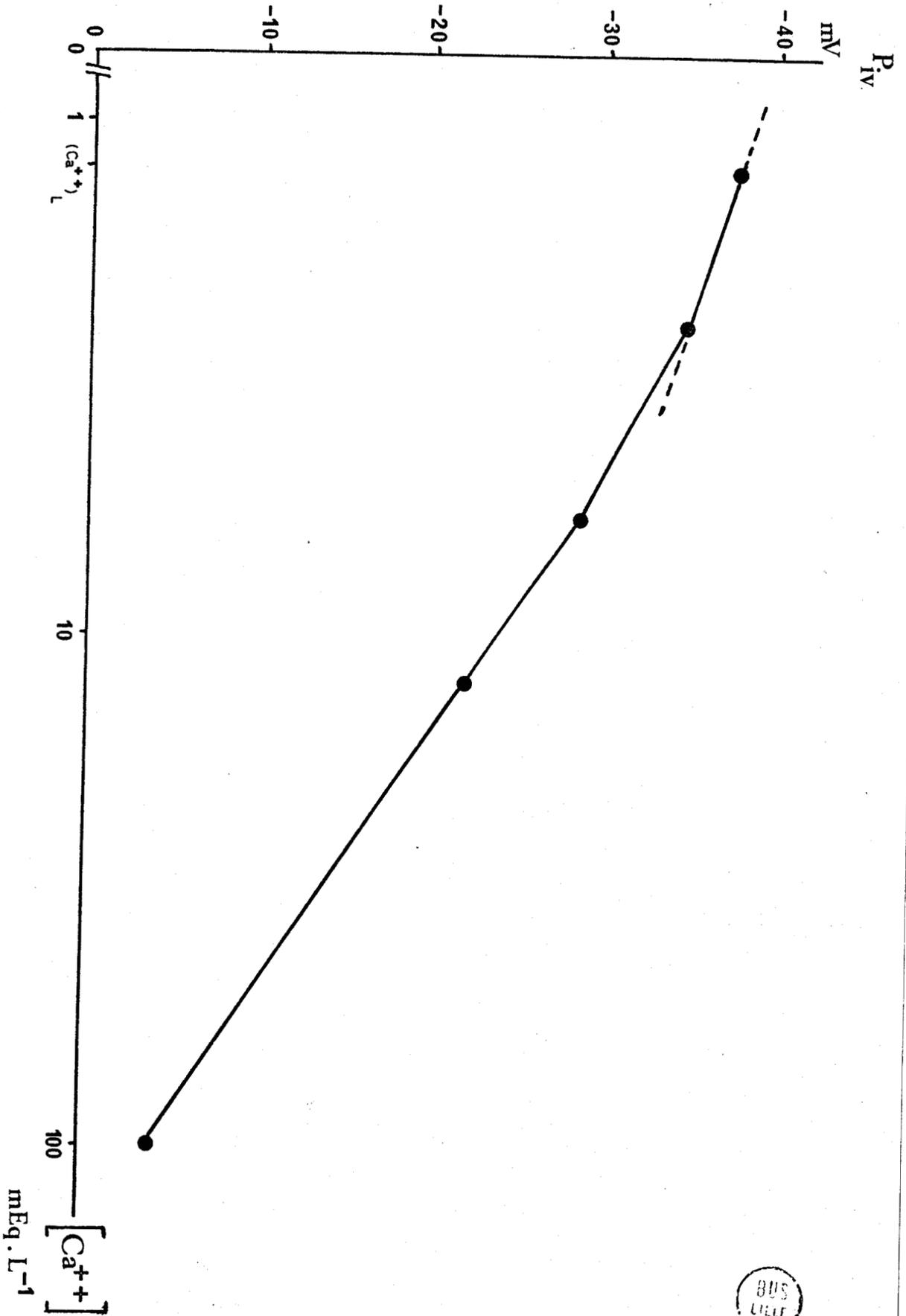


Figure 18 : Variation du potentiel vacuolaire en fonction de la concentration externe en calcium. $(Ca^{++})_L$: concentration habituelle du milieu de LAMPORT en calcium.



TABIEAU XI : Comparaison entre les potentiels mesurés (Piv) et les potentiels calculés ($E_{Ca^{++}}$) des cellules d'Erable baignant dans des solutions de concentration variable en Ca^{++} .



Concentration de la solution externe (mEq. L ⁻¹)	Différence de potentiel (mV)		
	Piv	$E_{Ca^{++}}$	(Piv - $E_{Ca^{++}}$)
1,23	- 38,2	- 9,6	- 28,6
2,45	- 34,7	- 0,9	- 33,8
6,13	- 28,3	+ 10,6	- 39,1
12,27	- 22	+ 19,3	- 41,3
100	- 4	+ 74,8	- 78,8

D - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MAGNESIUM

Un milieu sans magnésium (Mg^{++}_o) est réalisé en supprimant le sulfate de magnésium du milieu de LAMPORT. Des solutions enrichies en Mg^{++} sont obtenues en multipliant par 2, 5 et 10 la quantité de $MgSO_4$ habituelle ou en complétant jusqu'à 100 mEq.l^{-1} de Mg^{++} avec du $MgSO_4$ ou du $MgCl_2$. Après autoclavage, les pH de ces différents milieux sont très voisins les uns des autres, ce qui permet de les utiliser sans réajustement préalable.

Le remplacement du milieu de LAMPORT par le milieu (Mg^{++}_o) cause une augmentation d'amplitude de Piv de 2 à 4 mV qui est immédiate et réversible.

Les variations de Piv en fonction du logarithme de la concentration externe en magnésium $[Mg^{++}]_e$ sont représentées par la courbe (Figure 19), dont la pente de la tangente au point d'abscisse $[Mg^{++}]_L$ est relativement faible (3 mV) pour une variation de 10 fois la $[Mg^{++}]_e$; la pente s'accroît pour des concentrations comprises entre 10 et 100 mEq.l^{-1} , sa valeur étant de 20,6 mV.

Dans le cas où il est distribué passivement, le Mg^{++} étant divalent, la loi de NERNST prévoit une variation d'amplitude de Piv de 29 mV pour une modification de 10 fois la $[Mg^{++}]_e$, la $[Mg^{++}]_i$ demeurant constante.

Par conséquent, on peut déduire de la courbe que le complexe membranaire de la cellule placée dans les conditions normales de culture est faiblement perméable au Mg^{++} .

En outre, la comparaison entre les Piv mesurés et ceux EMg^{++} calculés à partir de l'équation de NERNST, pour différentes $[Mg^{++}]_e$ (Tableau XII), montre l'existence d'un gradient électrochimique en faveur d'un flux net passif et entrant.

En résumé, le Mg^{++} intracellulaire, par ses mouvements, joue certes un rôle dans la genèse du Piv. Il est cependant bien moins important que celui du Ca^{++} .

En outre, le gradient électrochimique du Mg^{++} plaide en faveur d'un flux actif sortant de Mg^{++} analogue à celui mis en évidence par le sodium et le calcium.

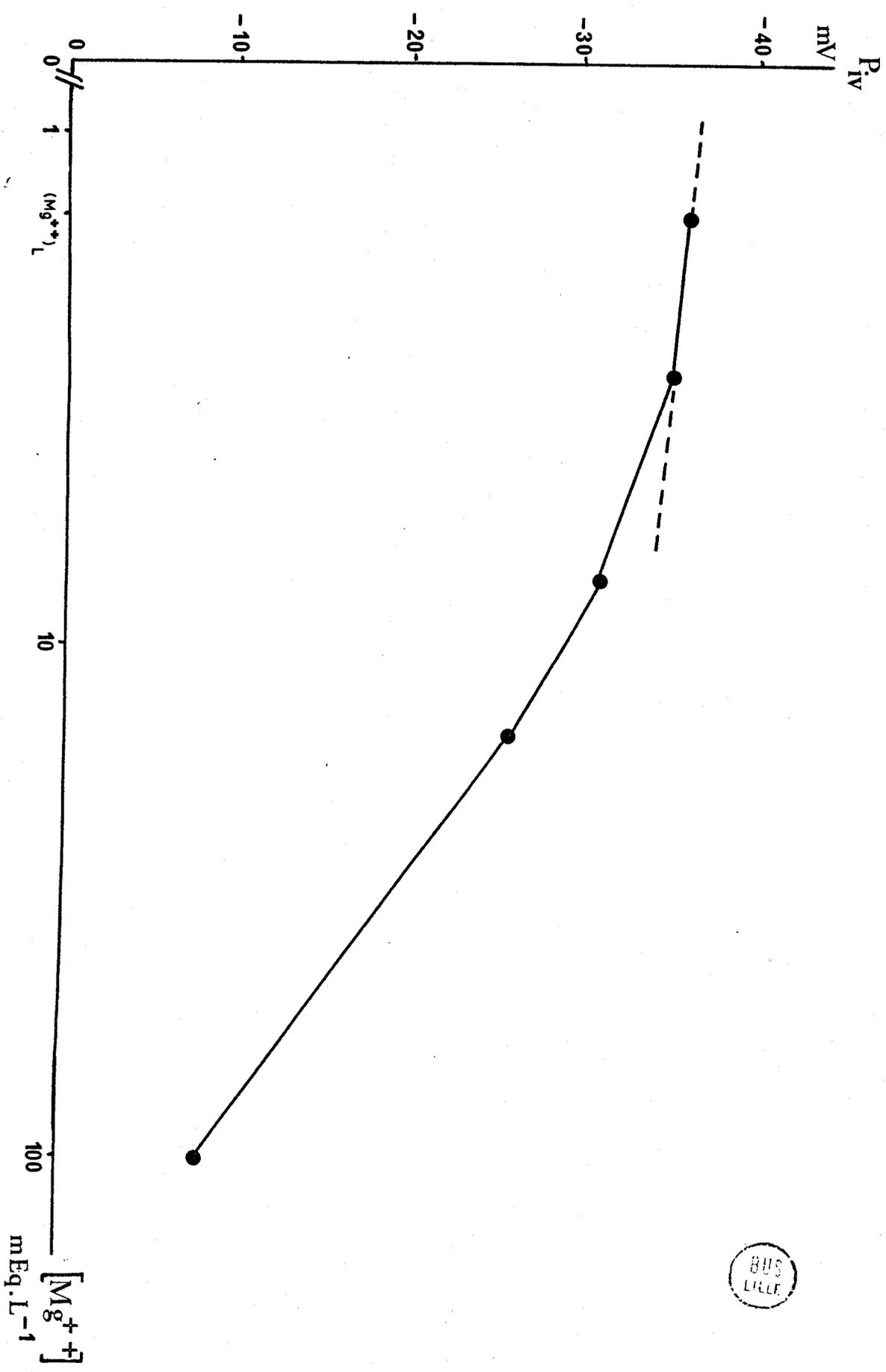


Figure 19 : Variation du potentiel vacuolaire en fonction de la concentration externe en magnésium.

$(Mg^{++})_L$: concentration habituelle du milieu de LAMPORF en magnésium.

Tableau XII : Comparaison entre les potentiels mesurés (Piv) et les potentiels calculés ($E_{Mg^{++}}$) des cellules d'Erable baignant dans des solutions de concentration variable en Mg^{++} .



Concentration de la solution externe (mEq. L ⁻¹)	Différence de potentiel (mV)		(Piv - $E_{Mg^{++}}$)
	Piv	$E_{Mg^{++}}$	
1,46	- 36	- 22,9	- 14,6
2,92	- 35	- 14,2	- 20,8
7,30	- 31	- 2,7	- 28,3
14,6	- 26	+ 6	- 32
100	- 8	+ 30,2	- 38,2

E - ROLE DES CATIONS

Le complexe membranaire des cellules d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) est perméable aux quatre principaux cations contenus dans le milieu de culture : K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} .

En outre, les cellules ne sont pas en équilibre thermodynamique avec le milieu externe, car le gradient électrique ne peut équilibrer plus d'un gradient de concentration.

La représentation de la relation $Piv = f.(\log [J]_e)$ pour une espèce ionique déterminée (J) n'est pas linéaire ; la pente de la tangente au point correspond à l'abscisse représentant la concentration habituelle de l'ion considéré dans le milieu de LAMPORT. Elle est toujours largement inférieure à la pente théorique de la droite prévue par l'équation de NERNST qui doit être de 58 mV pour les cations monovalents et de 29 mV pour les cations divalents à 20°C et pour une modification de 10 fois du rapport $[J]_e / [J]_i$.

Les variations d'amplitude observées lors d'un changement de milieu, sont dans tous les cas instantanées et stables, ce qui permet de supposer valablement que la concentration interne des cations ne varie pas lorsque s'établit le nouveau Piv.

Dans ces conditions, connaissant les valeurs des activités des ions dans le milieu intracellulaire, il est aisé de calculer les potentiels d'équilibre de chacun des ions, pour ses différentes concentrations dans le milieu externe :

$$E_J = \frac{58}{n} \log \frac{[J]_e}{[J]_i}$$

où n est la valence de l'ion.

La comparaison entre les potentiels mesurés Piv et ceux que l'on peut ainsi calculer, permet de montrer qu'aux concentrations habituelles des ions dans le milieu de culture, il existe un gradient électrochimique qui est nul ou en faveur d'une sortie passive pour le potassium et un gradient électrochimique en faveur d'une entrée passive de sodium, de calcium et de magnésium.

Par conséquent, on doit pouvoir envisager l'existence de mécanismes actifs permettant de maintenir les concentrations ioniques internes constantes :

- entrée de potassium
- sorties de sodium, calcium, magnésium.

Cette hypothèse concernant les transports actifs d'ions se devait d'être vérifiée; c'est la raison pour laquelle nous avons entrepris l'étude de l'action sur le Piv d'un poison du métabolisme : le cyanure (CN^-). Le CN^- est un découpleur des phosphorylations oxydatives et il est susceptible d'empêcher la fourniture d'énergie au mécanisme actif par l'intermédiaire de l'ATP.

Pour introduire le CN^- , on substitue au KCl du milieu de LAMPORT ($0,87 \text{ mM.L}^{-1}$), du cyanure de potassium à la même concentration. Dans ces conditions, le Piv n'est pas affecté (Figure 20), même après une heure d'action du milieu modifié.

Ces résultats, qui demeurent préliminaires, permettent de supposer que, s'il existe des transports actifs entrants et sortants, ils sont de même intensité, de telle sorte que l'action d'un inhibiteur du métabolisme n'affecte pas l'amplitude du Piv. Celui-ci est alors exclusivement dû à un courant résultant, passif, traversant la résistance constituée par le complexe membranaire.

Dans ces conditions, le Piv est donné par l'équation de GOLDMAN (1943) dérivée de la théorie du champ constant :

$$E_m \text{ (mV)} = \frac{R.T}{F} \cdot \text{Log} \frac{P_K \cdot A_{Ke} + P_{Na} \cdot A_{Nae} + \dots}{P_K \cdot A_{Ki} + P_{Na} \cdot A_{Nai} + \dots}$$

où :

- P_K, P_{Na}, \dots : perméabilités respectives des différents ions K^+, Na^+, \dots
- A_{Ke}, A_{Nae}, \dots : les activités ioniques dans le milieu extracellulaire
- A_{Ki}, A_{Nai}, \dots : les activités ioniques dans le contenu intracellulaire.

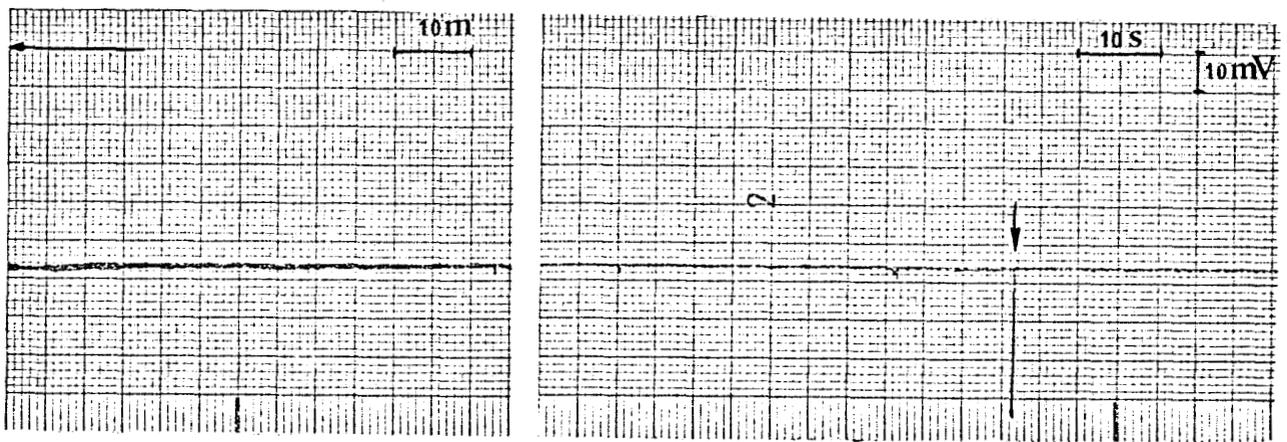


Figure 20 : Action du cyanure (CN^-) sur le Piv des cellules d'Erable cultivées depuis 3 jours dans le milieu de LAMPORT. Le CN^- ($0,87 \text{ mEq.L}^{-1}$) est apporté sous forme de KCN substitué au KCl du milieu de LAMPORT.

(←) : sens de lecture de l'enregistrement

(↓) : injection du CN^-

La vérification de l'équation de GOLDMAN demande donc de connaître, d'une part, la perméabilité membranaire des différentes espèces ioniques impliquées dans la genèse du potentiel, et d'autre part, la valeur de l'activité de ces ions dans les phases extra- et intracellulaires.

Ainsi, les transports actifs d'ions ne provoquent pas de courant, puisque leur somme algébrique est nulle. Ceci s'accorde avec l'hypothèse de GRIGNON (1969-b) selon laquelle il existerait un système d'échanges ioniques :



IV - ACTION DES FACTEURS CHIMIQUES ET PHYSIQUES SUR LE POTENTIEL INTRACELLULAIRE

Pour faciliter l'étude des relations entre la composition cationique du milieu extracellulaire et le potentiel intracellulaire, nous avons fixé dans un premier temps les doses des facteurs de croissance (Vitamine B₁ et 2,4-D), ainsi que les conditions de lumière et de température.

Nous nous proposons maintenant de voir si ces facteurs sont susceptibles d'intervenir directement ou indirectement sur le potentiel intracellulaire.

A - ACTION DE LA VITAMINE B₁

La vitamine B₁ favorise la croissance des tissus d'Acer pseudoplatanus L. cultivés "in vitro".

Si on la supprime du milieu de LAMPORT, son absence provoque une légère modification du potentiel (Figure 21). Cette action dépolarisante de la vitamine B₁ est progressive et ne résulte probablement pas d'une perturbation de l'équilibre ionique. Il peut s'agir d'un effet secondaire dû à sa pénétration dans la cellule.

B - ACTION DE L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIQUE

L'action de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) a été envisagée sous deux angles différents :

- en tant que substance de croissance auxinique
- en tant que facteur intervenant directement sur les propriétés membranaires.

En l'absence de 2,4-D, la croissance des suspensions cellulaires ralentit puis cesse, les cellules s'agglomèrent et la culture perd sa vitalité. Parallèlement, le potentiel intracellulaire est inférieur à celui des cellules cultivées sur le milieu de LAMPORT pendant les premiers jours de culture ; il augmente ensuite comme le montre le tableau XIII.

L'augmentation du potentiel intracellulaire en l'absence

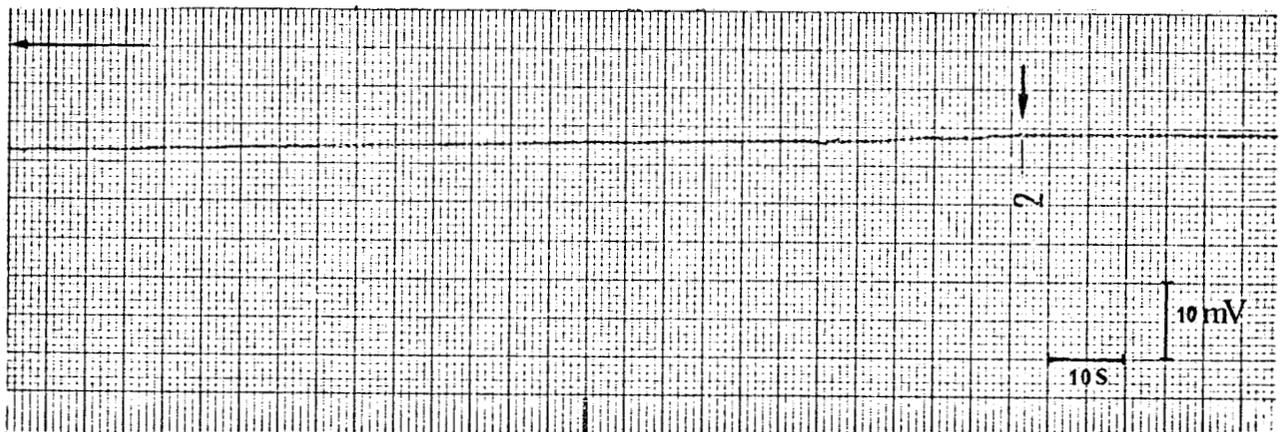


Figure 21 : Action de la vitamine B₁ (Chlorydrate de thiamine) sur le Piv des cellules d'Erable cultivées depuis 3 jours dans le milieu de LAMPORT.

(←) : sens de lecture de l'enregistrement

(↓) : injection du milieu sans vitamine B₁

TABLEAU XIII : Variation du potentiel intracellulaire des cellules d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) cultivées sur le milieu de LAMPORT en présence ou en absence de 2,4-D

Temps de culture	LAMPORT	LAMPORT - (2,4-D)
1 jour	- 13,2 mV	- 10,8 mV
2 jours	- 13,3 mV	- 10,4 mV
6 jours	- 13,6 mV	- 14,8 mV
10 jours	- 15,1 mV	- 17,1 mV



du 2,4-D est parallèle à celle observée dans les conditions habituelles de culture avec un décalage dans le temps ; cette accélération du processus naturel qui est apparente dès le 6ème jour de culture, doit être liée à l'état physiologique des cellules privées de 2,4-D.

Nous avons vérifié que pendant les premiers jours de culture, on provoque une dépolarisation du potentiel vacuolaire si on remplace le milieu de LAMPORT par le même milieu privé de 2,4-D (Figure 22). Après un temps de latence d'environ 1 minute apparaît une dépolarisation qui devient stable. La rapidité relative du phénomène permet de mettre en cause une modification des équilibres ioniques, selon un processus que nous n'avons pas mis en évidence.

Par ailleurs, durant les premiers jours qui suivent le repiquage des cellules sur un milieu carencé en 2,4-D, une addition de cette substance à des doses variant de 10^{-8} à 10^{-4} g.L⁻¹ provoque une hyperpolarisation visible une heure après l'injection du 2,4-D (Tableau XIV) ; cet effet tend d'ailleurs à s'atténuer par la suite.

Ces quelques résultats qui demeurent préliminaires nous permettent néanmoins de supposer que :

- la baisse de croissance provoquée par l'absence de 2-4-D est liée à l'élévation de l'amplitude du potentiel intracellulaire qui apparaît dès le 6ème jour de culture.

- le 2,4-D a un effet immédiat sur le potentiel intracellulaire qui se dépolarise en son absence et qui s'hyperpolarise si on l'ajoute dans un milieu initialement carencé. Il semble donc que le composé auxinique modifie certains échanges ioniques que nous n'avons pu caractériser.

C - ACTION DE LA LUMIERE

Nous avons recherché si la lumière avait une action sur le potentiel intracellulaire pour deux raisons :

- Les suspensions cellulaires d'Erable ne se développent pas ou très peu à l'obscurité.

- Les cellules ne contiennent pas de chlorophylle et sont donc incapables d'effectuer la photosynthèse.

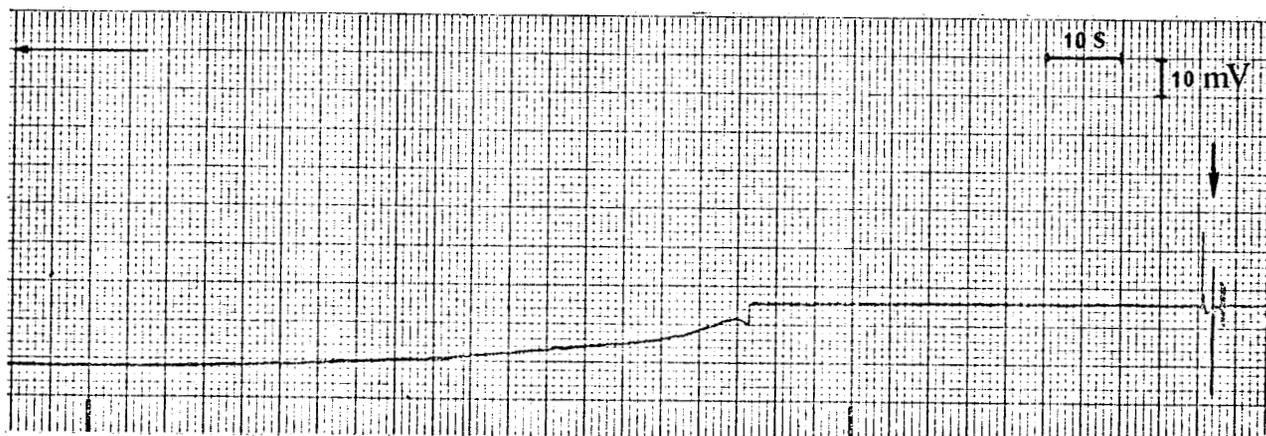


Figure 22 : Action du 2-4D, (acide 2-4, dichlorophenoxyacétique) sur le Piv des cellules d'Erable cultivées depuis 3 jours dans le milieu de LAMPORT.

(←) : sens de lecture de l'enregistrement

(↓) : injection du milieu sans 2-4-D



TABLEAU XIV : Influence de différentes doses de 2,4-D sur l'évolution du potentiel intracellulaire des cellules d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) cultivées depuis 2 jours sur un milieu de LAMPORT carencé en 2,4-D.

Milieu extracellulaire	Potentiel intracellulaire (mV)	
LAMPORT	- 13,3	
LAMPORT - (2,4-D)	- 10,4	
Doses de 2,4-D additionnées (g.l ⁻¹)	Temps d'action du 2,4-D	
	1 heure	6 heures
10 ⁻⁸	- 13,25	- 11,5
10 ⁻⁶	- 14,2	- 13,6
10 ⁻⁴	- 18,5	- 16,3



La lumière, inutile pour la photosynthèse, doit agir à un autre niveau : c'est ce que nous avons voulu montrer.

Une préparation étant mise en place sur la platine du microscope, une microélectrode est implantée dans une cellule, puis on fait l'obscurité totale dans la pièce.

Il n'intervient pas de variation de potentiel vacuolaire durant les deux heures qui suivent la mise à l'obscurité.

En outre, une succession d'éclairements brefs (10, 30, 60 secondes) interrompus par des périodes d'obscurité de même durée, sont sans effet sur le potentiel vacuolaire.

Une augmentation progressive de l'intensité lumineuse d'une source de lumière blanche n'affecte pas non plus le potentiel vacuolaire.

La lumière ne semble donc pas, dans l'état actuel de nos résultats, influencer sur les propriétés membranaires des cellules d'Erable cultivées "in vitro".

CONCLUSIONS

Nous avons, au cours de cette étude, défini les perméabilités ioniques membranaires des cellules d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) Puis à l'aide de ces données, nous avons abordé l'influence des facteurs physiques (lumière) ou chimiques (substance de croissance) sur les mouvements des ions à travers les "membranes" cellulaires.

Si, depuis très longtemps, les auteurs se sont intéressés aux phénomènes électriques manifestés par des cellules vivantes, ce n'est que récemment, grâce aux progrès réalisés sur les cellules animales, que les mesures électrophysiologiques ont pu être utilisées avec précision en vue d'une interprétation en termes d'échanges ioniques.

Pour les organes ou les tissus végétaux, de nombreuses difficultés apparaissent quant à l'expression des résultats et à la compréhension des mécanismes. C'est pourquoi, nous avons préféré nous adresser aux suspensions cellulaires entretenues sur milieux liquides dont les cellules peuvent être considérées comme "libres" physiologiquement.

Nous avons donc implanté des microélectrodes dans les cellules et enregistré des valeurs de potentiel intracellulaire comprises entre - 4 et - 47 mV. Ces valeurs sont relativement faibles (Tableau II) ce qui peut s'expliquer par l'utilisation du milieu de LAMPORT comme solution nutritive ; celui-ci est en effet riche en cations et notamment en K^+ pour lequel la perméabilité membranaire est élevée (GRIGNON, 1969-a) De plus, nos mesures présentent parfois une certaine hétérogénéité, elle est probablement due à l'existence de trois catégories de potentiel :

- Potentiel de paroi
- Potentiel de cytoplasme
- Potentiel de vacuole

Le gradient de négativité que nous mettons en évidence au fur et à mesure que la pointe de l'électrode est enfoncée dans la cellule est en contradiction avec la majorité des résultats obtenus

chez les cellules des végétaux supérieurs (HIGINBOTHAM, 1972 - communication personnelle).

ETHERTON et HIGINBOTHAM, 1960, ont montré sur de jeunes poils absorbants d'Avena sativa, qu'une pénétration de la pointe de la micro-électrode effectuée lentement permet de mettre en évidence différentes catégories de potentiel. L'aspect caractéristique "en escalier" de nos enregistrements nous conduit à postuler l'existence de trois potentiels, puisque trois paliers sont présents avec les mêmes amplitudes lors de la pénétration ou du retrait de l'électrode de mesure.

Dans certains cas, on observe une légère diminution du potentiel intracellulaire vacuolaire au cours de la mesure. Cette variation n'est certainement pas due à une fuite d'ions occasionnée par la pénétration de la microélectrode qui pourrait provoquer un shunt, l'amplitude de la dépolarisation serait alors maximale et le potentiel tendrait rapidement vers zéro. Il semble plus vraisemblable que cette diminution de potentiel puisse résulter du recouvrement de la pointe de la micro-électrode par une pellicule cytoplasmique comme l'a signalé WALKER (1955).

Nos résultats mettant en évidence l'électronégativité du suc vacuolaire par rapport au cytoplasme sont en accord avec ceux de SINCLAIR (1967) sur Hookeria lucens.

Il est toutefois difficile de confirmer cette interprétation en localisant de façon précise, la pointe de la microélectrode en microscopie photonique, comme le signalent POOLE (1966) sur les cellules radicales de Beta et PALLAGHY (1968) sur les cellules stomatiques de Nicotiana.

La dimension des cellules d'Erable (50 μm de diamètre) a constitué une limite à la vérification optique de l'emplacement de la pointe de la microélectrode dans la cellule simultanément à la mesure du potentiel intracellulaire.

Toutefois, il est possible d'implanter directement la microélectrode dans la vacuole en l'enfonçant brusquement dans la cellule. En outre, lorsque se produit une variation "en escalier"

le potentiel le plus négatif peut être sélectionné : on enregistre ainsi un potentiel intracellulaire vacuolaire (Piv) de façon reproductible. Nous nous sommes donc placé dans ces conditions pour aborder l'influence des perméabilités ioniques membranaires.

La relation entre les modifications de la composition ionique du milieu extracellulaire et les variations d'amplitude du Piv, associés à l'évaluation des activités ioniques intracellulaires, permet de définir l'influence relative des ions dans la genèse du Piv et ainsi de préciser la distribution de chaque espèce ionique de part et d'autre du complexe membranaire.

En effet, si la distribution d'un ion ne correspond pas à celle prévue par le gradient électrochimique, on peut parler de distribution non passive et postuler l'existence d'un transport contrôlé par le métabolisme (BRIGGS, HOPE et ROBERTSON, 1961 ; DAINTY, 1962).

Afin de réaliser des calculs analogues à ceux préconisés par ETHERTON (1963) et HIGINBOTHAM et al. (1964), nous avons dû faire quelques approximations :

- Les activités ioniques ont été confondues avec les concentrations intracellulaires, seules mesures réalisables de façon pratique dans nos conditions expérimentales. De ce fait, notre méthode de dosage est globale et ne tient pas compte de la compartimentation cellulaire.

- Nous avons également supposé que l'action des anions d'accompagnement sur le Piv est nulle, puisqu'une hyperpolarisation rapide et fugace est observée lors de l'addition de chlorures et de nitrates et qu'elle est très faible, quand il s'agit de phosphates ou sulfates. Il a d'ailleurs été démontré que la perméabilité au Cl^- est faible par rapport à celle au potassium (PIERCE et HIGINBOTHAM, 1970) puisque $P_{\text{Cl}}/P_{\text{K}} = 0,038$.

D'autre part, ces perméabilités aux NO_3^- et H_2PO_4^- seraient voisines de celle au Cl^- et celle au SO_4^{--} serait négligeable (HIGINBOTHAM et al., 1970).

- Enfin, nous avons montré que la réponse électrique à une modification de la concentration du milieu extracellulaire est dans de nombreux cas, quasi instantanée, ce qui nous a permis d'envisager que les concentrations ioniques intracellulaires sont maintenues à des valeurs constantes, en dépit de la variation du potentiel, grâce à l'intervention de forces moléculaires mises en jeu par le métabolisme cellulaire.

Ces restrictions étant apportées, l'influence des cations sur le potentiel intracellulaire vacuolaire a permis de mettre en évidence la contribution des quatre principaux cations du milieu de culture : potassium, sodium, calcium, magnésium, à la gènesse de ce potentiel. Aucun de ces ions n'est distribué passivement de part et d'autre du complexe membranaire des cellules d'Erable, comme c'est le cas chez Nitella translucens (SPANSWICK et WILLIAMS, 1964) chez Avena sativa et Fisum sativum (ETHERTON et HIGINBOTHAM, 1960 ; ETHERTON, 1963 et 1967 ; HIGINBOTHAM et al., 1967).

Par sa prédominance quantitative dans le milieu de culture ($23,95 \text{ mEq.L}^{-1}$) et à l'intérieur des cellules, par son influence sur le Piv, le potassium apparaît comme l'un des principaux ions, responsable par ses mouvements de l'établissement du Piv. A la concentration habituelle du milieu de culture, le potentiel d'équilibre E_k est de valeur identique à celle du Piv, ce qui laisse supposer que le K^+ est distribué passivement.

La valeur de la pente de la relation $\text{Piv} = f \cdot \log [K^+]_e$, représentée en coordonnées semi-logarithmiques, qui n'atteint au maximum que 30 mV environ pour une variation de 10 fois la $[K^+]_e$ plaide, par contre, en faveur d'une distribution non passive. Cette divergence des résultats est due au fait qu'une partie du potassium intracellulaire se trouve sous forme liée.

Toutefois, aux faibles concentrations de K^+ dans le milieu extracellulaire, on note un flux net sortant de la cellule alors qu'aux concentrations élevées ($[K^+]_e > 23,95 \text{ mEq.L}^{-1}$) le flux devient entrant.

Du fait de l'existence de flux nets passifs entrant ou sortant, il est nécessaire de postuler l'existence d'un flux inverse, d'égale intensité, contrôlé par le métabolisme pour maintenir la $[K^+]_i$

constante. D'ailleurs, ce transport actif est démontré par ETHERTON (1963) chez Pisum sativum. Etant donné que dans les conditions de culture, le potassium tend à diminuer constamment dans le milieu cellulaire, il convient de retenir l'hypothèse d'un transport actif permettant au potassium d'entrer dans les cellules et de s'y accumuler contre son gradient électrochimique.

Cette conclusion est en accord avec le schéma proposé par GRIGNON (1969-b) et n'est pas incompatible avec ses conclusions qui prévoient que l'entrée du potassium est couplée à une sortie d'autres cations, selon un processus actif d'échanges ioniques.

Si on applique le même raisonnement, compte tenu des dosages effectués dans les cellules et des mesures de potentiel, le Na^+ , bien que présent en faible proportion dans le milieu de culture (milieu de LAMPORT) semble strictement et activement exsorbé par les cellules d'Erable.

Ce fait est d'ailleurs bien connu dans les racines de Pisum sativum (ETHERTON, 1967), de Pisum sativum et Avena sativa (HIGINBOTHAM et al., 1967) et d'Hordeum vulgare (PITMAN et SADLER, 1967). Cette sortie active de sodium reste faible en valeur absolue étant donné la faible perméabilité au Na^+ manifestée par le complexe membranaire des cellules d'Erable, puisqu'une modification de 10 fois la Na^+ n'affecte le Piv que de 3 mV environ à la concentration habituelle du milieu de culture.

Les cations divalents : Ca^{++} et Mg^{++} ont un comportement assez semblable à celui du sodium : aux concentrations habituelles du milieu de culture, ils ont tendance à être rejetés activement par la cellule.

Toutefois, la perméabilité du complexe membranaire au Ca^{++} est plus élevée que celle manifestée à l'égard du Mg^{++} , puisque la pente caractéristique de la relation liant les variations de Piv au logarithme de la concentration en Ca^{++} ou en Mg^{++} est beaucoup plus faible pour le Mg^{++} que pour le Ca^{++} , sans toutefois atteindre la valeur prévue par l'équation de NERNST.

Par ailleurs, nous avons montré que, les cellules accumulent peu le Ca^{++} et notablement le Mg^{++} durant les premiers jours de culture, ce qui concorde avec le sens du gradient électrochimique de ces deux ions au troisième jour de la culture ; il n'interviendrait

pas alors de phénomènes actifs importants concernant le transport de ces deux cations.

Cette légère contradiction peut néanmoins se comprendre dans la mesure où une partie du Ca^{++} ou du Mg^{++} entré dans la cellule y serait "piégé" dans une structure (membrane, ergastoplasme, mitochondries).

Par conséquent, les conclusions concernant les transports d'ions à travers le complexe membranaire des cellules d'Erable, obtenues à l'aide d'une méthode électrophysiologique, concordent avec ceux de GRIGNON (1969-a et -b) qui relie l'entrée active du potassium à une exsorption de sodium, calcium et magnésium selon un processus d'échanges ioniques.

Toutefois, nos mesures se situent au 3ème jour de la culture, durant la phase de latence qui correspond au moment d'intense accumulation des ions par les cellules et au potentiel intracellulaire le plus faible en amplitude. Celles de GRIGNON ont été effectuées au 12ème jour de la culture, c'est-à-dire au moment où s'établit la phase stationnaire. Il aurait été judicieux de notre part d'effectuer la même étude à différents moments de la culture, car il est probable que l'état des échanges ioniques évolue parallèlement aux variations du potentiel et à celles des concentrations ioniques intracellulaires.

En résumé, l'ensemble de nos résultats concernant la participation des cations du milieu de culture à la génèse du potentiel intracellulaire des cellules d'Erable, permet de vérifier la théorie des potentiels de diffusion ainsi résumée par DAINTY (1962) :

" le potentiel de membrane est un potentiel de diffusion mais la distribution dissymétrique des ions, cause même de ce potentiel de diffusion, est créée par des "pompes ioniques".

Toutefois, l'action d'un inhibiteur du métabolisme (CN^-) qui s'est révélée sans effet sur le Piv au 3ème jour de culture, ne plaide apparemment pas en faveur de l'hypothèse de DAINTY. La présence de "pompes ioniques" ne peut donc pas être retenue, c'est la raison pour laquelle nous préférons en revenir aux conclusions

de GRIGNON (1969-b), qui résume les transports de cations à travers le complexe membranaire des cellules d'Erable, sous forme d'un processus d'échanges actifs.

L'étude des variations de la composition en cations du milieu externe, nous a permis de mettre en évidence une augmentation importante et régulière du pH du milieu au cours de la culture. Elle est beaucoup plus accentuée que celle enregistrée précédemment par GRIGNON (1969 a) et par STUART et STREET (1969). Ces auteurs relient les variations observées au conditionnement du milieu et montrent que la reprise de la croissance d'une suspension cellulaire dépend de cette augmentation préalable du pH du milieu de culture. Cette hypothèse est parfaitement acceptable, car les cellules d'Erable rejettent des composés organiques tels que des acides aminés et organiques tout au long de la culture; cependant, aucune donnée sur la nature chimique de ces substances de conditionnement n'a été précisée.

L'augmentation du pH peut être assimilée à "l'alcalinisation physiologique" des solutions de culture signalée par COÏC et al. (1961) lors d'une alimentation essentiellement nitrique des plantes vertes. Or, le milieu de LAMPORT contient comme source azotée exclusivement des nitrates et en quantité importante ($21,9 \text{ mEq.L}^{-1}$).

Cette explication apparemment satisfaisante ne concorde pas avec les résultats de STUART et STREET (1969) qui additionnent à leur milieu de culture une dose non négligeable d'urée ($2,85 \text{ mM.L}^{-1}$)

Enfin, l'absorption de protons par les cellules est possible, bien que la perméabilité de la cellules aux ions H^+ soit faible, puisque des modifications du pH du milieu externe ne produisent pas de modification d'amplitude du Piv , pour les valeurs de pH comprises entre 4,5 et 7.

Nous pensons cependant que la composition initiale du milieu de culture en cations peut intervenir, puisque l'ion H^+ se comporte comme un cation monovalent susceptible d'être échangé avec des ions sortants tels que le Na^+ .

L'étude de l'action des substances de croissance sur le

potentiel intracellulaire, a permis de montrer que le 2,4-D en particulier, possède la propriété de maintenir le potentiel; son absence cause une dépolarisation de la cellule. Il est donc probable que cette variation d'amplitude soit couplée à des mouvements ioniques, ce qui confirme les résultats obtenus par ILAN et REINHOLD (1966) et ILAN (1971) qui montrent que l' AIA ou la kinétine sont susceptibles de modifier l'absorption des cations minéraux et en particulier celle du K^+ .

Par ailleurs, l'action de la lumière sur le potentiel intracellulaire n'a pu être mise en évidence, bien que ce facteur soit indispensable à la culture des cellules d'Erable qui dégè-
nèrent en son absence.

BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E

- o -

ALEXANDER, J.T. and NASTUK, W.L. (1953)

An instrument for the production of microelectrodes used in electrophysiological studies.

Rev. Sc. Instrum., 24, 528-531.

BARR, C.E. (1965)

Na⁺ et K⁺ fluxes in Nitella clavata.

J. Gen. physiol., 49 (2), 181

BENBADIS, A. (1965)

Croissance de cellules isolées de Ronce sur des milieux nutritifs "conditionnés" par des quantités variables de tissu.

C. R. Acad. Sc., Paris, 261, 4829-4832.

BODE, H.R. (1959)

Über den Einfluss des Heteroauxins auf die Kationenzusammensetzung der Blattscheibe der Tomate.

Planta, 53, 212-218.

BOWLING, D.J.F. (1968)

Measurements of the potential across the sieve plates in Vitis vinifera.

Planta, 80, 21-26.

BRIGGS, G.E., HOPE, A.B. and ROBERTSON, R.N. (1961)

Electrolytes and Plant cell.

Blackwell, Scient. Publ. Oxford, 1961.

CASTEELS, R. (1966)

The action of ouabain on the smooth muscle of the guinea-pig's Toenia coli.

J. Physiol., 184, 131-142.

COÏC, Y., LESAIN, C. et LEROUX, F. (1961)

Comparaison de l'influence de la nutrition nitrique et ammoniacale combinée ou non avec une déficience en acide phosphorique, sur l'absorption et le métabolisme des anions - cations et plus particulièrement des acides organiques chez le Maïs. Comparaison du Maïs et de la Tomate quant à l'effet de la nature de l'alimentation azotée.

Ann. Physiol. Vég., 3, 141-163.

DAINTY, J. (1962)

Ion transport and electrical potentials in plant cells.
Ann. Rev. Plant. Physiol., 13, 379-403.

DONNAN, F.G. (1911)

Theorie der Membrangleichgewichte und Membranpotential bei vorhanden sei von nicht dialysierenden Elektrolyten : Ein Beitrag zur Physical-schemischen.

Physiol. Ztschr. F. Elektrochem., 17, 572, (in : BRIGGS et Al., 1961).

DODD, W.A., PITMAN, M.G., and WEST, K.R. (1966)

Sodium and potassium transport in the marine Alga : Chaetomorpha Darwinii.

Aust. J. Biol. Sci., 19, 341

EPSTEIN, E. (1966)

Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants.
Nature, 212, 1324-1327.

ETHERTON, B. (1963)

Relationship of cell transmembrane electropotential to potassium and sodium accumulation ratios in Oat and Pea seedlings.

Plant Physiol., 38, 581-585.

ETHERTON, B. (1967)

Steady state sodium and rubidium effluxes in Pisum sativum roots.

Plant Physiol., 42, 685-690.

ETHERTON, B. (1970)

Effect of indole-3-acetic acid on membrane potentials of Oat coleoptile cells.

Plant Physiol., 45, 527-528.

ETHERTON, B. and HIGINBOTHAM N. (1960)

Transmembrane potential measurements of cells of higher plants as related to salt uptake.

Science, 131, 409-410.

FINDLAY, G.P. and HOPE, A.B. (1964)

Ionic relations of cells of Chara australis : VII. The separate electrical characteristics of the plasmalemma and the tonoplast.

Aust. J. Biol. Sci., 17, 62

- GAFFEY, G.T. and MULLINS, J. (1958)
Ion fluxes during action potential in Chara.
J. Physiol. (London), 144, 505-524.
- GOLDMAN, D.E. (1943)
Potential impedance and rectification in membranes.
J. Gen. Physiol., 27, 37-60.
- GREENHAM, C.G. (1966)
The relative electrical resistance of the plasmalemma and tonoplast
in higher plants.
Planta, 69, 150
- GRIGNON, C. (1969 -a)
Absorption du potassium par les suspensions cellulaires d'Erable.
Thèse 3e Cycle, Paris, 1969.
- GRIGNON, C. (1969 -b)
Etude de l'incorporation du ^{42}K par les suspensions cellulaires
d'Erable.
Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét., 15 (2), 193-211.
- GUGGENHEIM, E.A. (1929)
The conception of electrical potential between two phase and the
individual activities of ions.
J. Phys. Chem., 33, 842
- GUTKNECHT, J. (1965)
Ion distribution and transport in the red marine alga Gracilaria fo-
liifera.
Biol. Bull., 129, 495.
- GUTKNECHT, J. (1966)
Sodium, potassium and chloride transport and membrane potentials in
Valonia ventricosa.
Biol. Bull., 130, 331
- HENSHAW, G.G., JHA, K.K., MEHTA, A.K., SHAKESHAFT, D.J., and STREET, H.E. (1966)
Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns
in batch propagated suspension cultures.
J. Exp. Bot., 17, 362-377.

- HIGINBOTHAM, N., ETHERTON, B. and FOSTER, R.J. (1964)
Effect of external K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} and H^+ ions on the cell transmembrane potential of Avena coleoptile.
Plant Physiol., 39, 196-203.
- HIGINBOTHAM, N., ETHERTON, B. and FOSTER, R.J. (1967)
Mineral ion content and cell transmembrane electropotentials of Pea and Oat seedling tissue.
Plant Physiol., 42, 37-46.
- HIGINBOTHAM, N., GRAVES, S.S. and DAVIS, R.F. (1970)
Evidence for an electrogenic ion transport pump in cells of higher plants.
J. Membrane Biol., 3, 210-222.
- HODGKIN, A.L. and HUXLEY, A.F. (1952)
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J. Physiol. (London), 117, 500-544.
- HOPE, A.B. (1971)
Ion transport and membranes. A biophysical outline.
Butterworths (London), University park press, 1971, 121 p.
- HOPE, A.B. and FINDLAY, G.P. (1964)
The action potential in Chara.
Plant cell Physiol., 5, 377
- HOPE, A.B. and WALKER, N.A. (1960)
Ionic relations of cells of Chara australis : III. vacuolar fluxes of sodium.
Aust. J. Biol. Sci., 13, 277
- ILAN, I. (1962)
A specific stimulatory action of indole-3-acetic acid on K^+ uptake by plant cells, with concomitant inhibition of ammonium uptake.
Nature, 194, 203-204.
- ILAN, I. (1971)
Evidence for hormonal regulation of the selectivity of ion uptake by plant cells.
Physiol. Plant., 25, 230-233.

ILAN, I. and REINHOLD, L. (1963)

Analysis of the effects of indole-3-acetic acid on the uptake of monovalent cations.

Physiol. Plant., 16, 596-603.

JACOBY, B. and DAGAN, J. (1970)

Effects of ⁶N-benzyladenine on primary leaves of intact bean plants and on their sodium absorption capacity.

Physiol. Plant., 23, 397-403.

JAFFE, M.J. (1968)

Phytochrome-mediated bioelectric potentials in mung bean seedlings.

Science, 162, 1016-1017.

JOUANNEAU, J.P. et PEAUD-LENOEL, C. (1967)

Croissance et synthèse des protéines de suspensions cellulaires de Tabac sensibles à la kinétine.

Physiol. Plant., 20, 834-850.

KISHIMOTO, U. (1966)

Action potentials in Nitella internodes.

Plant cell Physiol., 7, 559.

KISHIMOTO, U. and TAZAWA, M. (1965)

Ionic composition of the cytoplasm of Nitella flexilis.

Plant cell Physiol., 6, 507

KITASATO, H. (1968)

The influence of H⁺ ions on the membrane potential and ion fluxes of Nitella.

J. Gen. Physiol., 52, 60

LABRICQUE, J.P. (1961)

Electrophysiologie végétale.

Mises à J. Sci., 341-367.

LAMPORT, D.T.A. (1964)

Cell suspension cultures of higher plants : isolation and growth energetics.

Exp. Cell Research, 33, 195-206.

LAPICQUE, L. (1925)

Sur l'absorption des sels par les cellules végétales, épictèse et sélection.

Bull. Soc. Chim. Biol., 7, 621.

LEFEBVRE, J. et GILLET, C. (1968)

Effets du rubidium sur le potentiel de membrane et la résistance électrique de Nitella flexilis L.

Bull. Soc. Roy. Bot. Belg., 102, 61.

LESCURE, A.M. (1966)

Etude quantitative de la croissance d'une culture d'Acer pseudoplatanus L.

Physiol. Vég., 4, 365-378.

LUNDEGARDH, H. (1954)

Anion respiration : the experimental basis of the theorie of absorption transport and exudation of electrolytes by leaving cells and tissues.

Symp. Soc. Exp. Biol., 8, 262-296.

LUNDEGARDH, H. und BURSTROM (1933)

Untersuchungen über die Salzaufnahme der Pflanzen: III. Quantitative Beziehungen zwischen Atmung und Anionenaufnahme.

Biochem. Z., 261, 235-251.

MACKLON, A.E.S. and MACDONALD, J.R. (1966)

The role of transmembrane electrical potential in determining the absorption isotherm for chloride in potato.

J. Exp. Bot., 17, 703-717.

MACROBBIE, E.A.C. (1962)

Ionic relations in Nitella translucens.

J. Gen. Physiol., 45, 861-878.

NOBEL, P.S. (1970 -a)

Plant cell physiology. A physicochemical approach.

W.H.Freeman and Cie (San Francisco), 1970, 267 p.

NOBEL, P.S. (1970 -b)

Relation of light-dependent potassium uptake by Pea leaf fragments to the pK of the accompanying organic acid.

Plant Physiol., 46, 491-493.

OSTERHOUT, W.J.D. (1931)

Physiological studies of large plant cells.
Biol. Rev., 6, 369-411.

PALLAGHY, C.R. (1968)

Electrophysiological studies in guard cells of tobacco.
Planta, 80, 147

PIERCE, W.S. and HIGINBOTHAM, N. (1970)

Compartments and fluxes of K^+ , Na^+ and Cl^- in Avena coleoptile cells.
Plant Physiol., 46, 666-673.

PILET, P.E. (1968)

La cellule. Structure et fonctions.
3e ed., Masson et Cie, Paris, 1968.

PITMAN, M.G. and SADDLER, H.D.W. (1967)

Active sodium and potassium transport in cell of barley roots.
Procl. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 57, 44-49.

POOLE, R.J. (1966)

The influence of the intracellulaire potential on K^+ uptake by beet root tissue.
J. Gen. Physiol., 49, 551-563.

RADENOVIC, C. et PENCIC, M. (1970)

Oscillations bioélectriques dans les membranes de Nitella.
Physiol. Plantarum, 23, 697-703.

RAVEN, J.A. (1967)

Ion transport in Hydrodictyon africanum.
J. Gen. Physiol., 50, 1607

ROSENE, H.F. and LUND, E.J. (1953)

Bioelectric fields and correlation in plants.
in : Symp. Growth and differenciation in plants, W.E. Loomis ed.,
Iowa State Coll. press, 219.

SCHILDE, C. (1966)

Zur Wirkung des Lichtes auf das Ruhepotential der grünen Pflanzenzelle.
Planta, 71, 184-188.

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. Exp. Bot., 21, 170-185.

SINCLAIR, J. (1967)

Nernst potential measurements on the leaf cells of the moss Hookeria lucens.

J. Exp. Bot., 18, 594-599.

SINYUKHIN, A.M. and VYSKREBENTSEVA, E.I. (1967)

Influence of K^+ on the resting potential of the roots cells of Cucurbita pepo.

Plant Physiol., 14 (4), 553-557.

SPANSWICK, R.M. (1970)

Electrophysiological techniques and the magnitudes of the membrane potentials and resistances of Nitella translucens.

J. Exp. Bot., 21, 617-627.

SPANSWICK, R.M. and WILLIAMS, E.J. (1964)

Electrical potentials and Na^+ , K^+ and Cl^- concentrations in the vacuole and cytoplasm of Nitella translucens.

J. Exp. Bot., 15, 193-200.

SPANSWICK, R.M. and WILLIAMS, E.J. (1965)

Ca^{++} fluxes and membrane potentials in Nitella translucens.

J. Exp. Bot., 16, 463-474.

SPANSWICK, R.M., STOLAREK, J. and WILLIAMS, E.J. (1967)

The membrane potential of Nitella translucens.

J. Exp. Bot., 18, 1

STREET, H.E. (1967)

The induction of cell division in plant suspension cultures.

in : Colloque Nat. C.N.R.S. : les cultures de tissus des plantes, Strasbourg, 177-193.

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 pseudo-platanus L..

J. Exp. Bot., 20, 556-571.

TANADA, T. (1968)

Substances essential for a red, far-red light reversible attachment of mung bean root tips to glass.

Plant Physiol., 43, 2070-2071.

TAZAWA, M. and KISHIMOTO, U. (1964)

Studies on Nitella having artificial cell sap : II. Rate of cyclosis and electric potential.

Plant Cell Physiol., 5, 45-49.

THELLIER, M. (1969)

Interprétation électrocinétique de l'absorption minérale chez les végétaux.

Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét., 15 (2), 127-139.

UMRATH, K. (1935)

Über den Erregungsvorgang bei Spirogyra und Vaucheria und über potentialmessungen der Pflanzenzellen.

Protoplasma, 22, 193.

UMRATH, K. (1956)

Elektrophysiologische Phänomene.

in : Handbuch der Pflanzenphysiologie, Springer (Berlin), 2, 747-778.

VREDENBERG, W.J. (1969)

Light-induced changes in membrane potential of algal cells associated with photosynthetic electron transport.

Biochem. Biophys. Res. Com., 37 (5), 785-791.

VREDENBERG, W.J. (1971)

Changes in membrane potential associated with cyclic and non cyclic electron transport in photochemical system I in Nitella translucens.

Biochem. Biophys. Res. Com., 42 (1), 111-118.

WALKER, N.A. (1955)

Microelectrode experiments on Nitella.

Aust. J. Biol. Sci., 8, 476-489.

WENT, F.W. (1932)

Eine botanische Polaritätstheorie.

Jahrb. Wiss. Bot., 76, 528