

à ma femme

à mes parents



030 026244 6

50 376
1976
118

50376
1976
118

N° d'ordre : 350

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

René LEFEBVRE



**INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LE BOURGEONNEMENT
DES TISSUS DE RACINE D'ENDIVE (*Cichorium intybus* L.)**

Soutenu le 15 Juin 1976, devant la Commission d'Examen

| | | | | |
|-----|------|-----------|---|-------------|
| MM. | R. | GAUTHERET | } | Rapporteurs |
| | R. | BOURIQUET | | |
| | J.L. | BONNEMAIN | | |
| | L. | GENEVES | } | Examineurs |
| | E. | BONNOT | | |

TABLE DES MATIERES

| | <u>Pages</u> |
|---|--------------|
| AVANT-PROPOS | 1 |
| INTRODUCTION | 2 |
| MATERIEL ET TECHNIQUES | 5 |
| CHAPITRE I : La culture " <u>in vitro</u> " de fragments d'organes végétaux | 6 |
| 1.1 - Technique classique | 8 |
| 1.2 - Test quantitatif de bourgeonnement | 12 |
| 1.2.1 - Taille des explantats | 12 |
| 1.2.2 - Technique particulière d'ensemencement | 14 |
| 1.2.3 - Expérimentation | |
| 1.3 - Le milieu nutritif | 16 |
| 1.4 - Précautions d'asepsie | 18 |
| CHAPITRE II : Conditionnement des cultures | 20 |
| 2.1 - Les enceintes expérimentales | 20 |
| 2.2 - Différents types de conditionnement gazeux | 20 |
| 2.3 - Constitution des mélanges gazeux | 22 |
| 2.3.1 - Méthode du vide | 22 |
| 2.3.2 - Pompe mélangeuse (Wosthoff) | 22 |
| 2.3.3 - Membranes de diffusion | 23 |
| 2.3.4 - Contrôles de l'oxygénation | 24 |
| 2.3.5 - Lots témoins | 26 |

| | |
|--|----|
| CHAPITRE III : Les critères de bourgeonnement | 27 |
| 3.1 - Initiation et développement des bourgeons | 27 |
| 3.2 - Autres critères de bourgeonnement | 27 |
| 3.3 - Variations du matériel végétal | 28 |
| CHAPITRE IV : Mesures concernant l'activité physiologique des tissus | 33 |
| 4.1 - La croissance des tissus | 33 |
| 4.2 - Activités respiratoire et fermentaire | 33 |
| 4.2.1 - Echanges gazeux | 33 |
| 4.2.2 - Réserves énergétiques et produits de la fermentation | 34 |
| 4.3 - L'activité enzymatique | 35 |
| 4.3.1 - Activité phosphatasique acide | 35 |
| 4.3.2 - Activité alcool-déshydrogénasique | 35 |
| 4.4 - Les pigments chlorophylliens | 35 |
| CHAPITRE V : Capture et identification des substances organiques volatiles | 37 |
| 5.1 - Capture | 37 |
| 5.1.1 - Pièges à SO_4H_2 | 37 |
| 5.1.2 - Prélèvement gazeux | 37 |
| 5.2 - Identification et dosage | 38 |
| 1ère PARTIE : RAREFACTION DE L'ATMOSPHERE EN OXYGENE ET NEOFORMATION DES BOURGEONS | 39 |

| | |
|---|----|
| CHAPITRE I : Anoxie et bourgeonnement | 40 |
| 1.1 - Résistance à l'asphyxie | 40 |
| 1.2 - Manifestations du bourgeonnement | 42 |
| CHAPITRE II : Essais préliminaires | 45 |
| 2.1 - Durée du traitement | 45 |
| 2.2 - Traitement après l'apparition des bourgeons | 47 |
| 2.3 - Influence du séjour en enceinte limitée | 48 |
| 2.4 - Conclusions | 50 |
| CHAPITRE III : L'anaérobiose stricte | 53 |
| 3.1 - Durée du traitement | 53 |
| 3.2 - Période d'application du traitement | 54 |
| 3.2.1 - Séjours de longue durée | 54 |
| 3.2.2 - Séjours de courte durée | 57 |
| CHAPITRE IV : Le renouvellement continu de l'atmosphère | 59 |
| 4.1 - La faible tension d'oxygène | 59 |
| 4.2 - Durée du traitement | 61 |
| 4.3 - Période d'application du traitement | 63 |
| 4.4 - Comparaison de l'effet stimulant de traitements de courte durée | 65 |
| CHAPITRE V : Anoxie et croissance des feuilles | 68 |
| 5.1 - Fragments de racine d'Endive cultivés " <u>in vitro</u> " | 68 |
| 5.2 - Racines entières forcées | 70 |

| | |
|---|-----|
| 2e PARTIE : RETARDS ET SUPPRESSIONS DU BOURGEONNEMENT | 74 |
| CHAPITRE I : Retards du bourgeonnement | 75 |
| 1.1 - Localisation du facteur responsable | 75 |
| 1.2 - Propriétés conférées au milieu de culture | 78 |
| 1.3 - Nature des substances inhibant l'activité néoformatrice | 81 |
| 1.4 - La faible tension d'oxygène | 85 |
| CHAPITRE II : Capacité à bourgeonner et réserves nutritives | 88 |
| 2.1 - Evolution des réserves glucidiques | 88 |
| 2.2 - Le glucose du milieu de culture | 91 |
| 2.3 - Autres sucres | 95 |
| 2.4 - Glucides, croissance et bourgeonnement | 95 |
| 2.5 - Glucides et anaérobiose | 97 |
| 2.6 - Utilisation du glucose | 98 |
| 2.7 - L'éthanol du milieu de culture | 100 |
| 2.8 - Conclusions | 101 |
| CHAPITRE III : Accumulation et disparition de l'éthanol des milieux de culture | 102 |
| 3.1 - Lieu de formation de l'éthanol | 102 |
| 3.2 - Substrat utilisé | 104 |
| 3.3 - Répartition et rejet de l'éthanol | 106 |
| 3.4 - Disparition de l'éthanol du milieu de culture | 109 |
| 3.5 - Mode d'élimination de l'éthanol du milieu de culture | 109 |

| | |
|--|-----|
| 3.6 - Nature des substances éliminées dans l'atmosphère | 111 |
| 3.7 - Action de la lumière | 114 |
| 3.8 - La chlorophylle des tissus | 114 |
| | |
| CHAPITRE IV : Mode d'action de l'éthanol sur la néoformation des bourgeons | 119 |
| 4.1 - Imprégnation des tissus | 119 |
| 4.2 - Ethanol et synthèse protéique | 119 |
| 4.3 - L'activité enzymatique | 122 |
| | |
| 3e PARTIE : CAUSES DE L'AUGMENTATION DU NOMBRE DES BOURGEONS PROVOQUEE PAR L'ANAEROBIOSE | 124 |
| | |
| CHAPITRE I : Localisation des facteurs stimulant le bourgeonnement | 126 |
| 1.1 - Milieu de culture | 126 |
| 1.2 - Tissus | 130 |
| 1.3 - Transplantation et fermentation intrinsèque | 130 |
| 1.4 - Conclusions | 133 |
| | |
| CHAPITRE II : Transformation de l'éthanol par les tissus | 134 |
| 2.1 - L'alcool déshydrogénase | 134 |
| 2.2 - La formation d'acétaldéhyde | 137 |
| 2.3 - Acétaldéhyde et bourgeonnement | 140 |
| 2.4 - Action des alcools | 141 |
| 2.5 - Conclusions | 143 |

| | |
|--|-----|
| 3.6 - Nature des substances éliminées dans l'atmosphère | 111 |
| 3.7 - Action de la lumière | 114 |
| 3.8 - La chlorophylle des tissus | 114 |
| | |
| CHAPITRE IV : Mode d'action de l'éthanol sur la néoformation des bourgeons | 119 |
| 4.1 - Imprégnation des tissus | 119 |
| 4.2 - Ethanol et synthèse protéique | 119 |
| 4.3 - L'activité enzymatique | 122 |
| | |
| 3e PARTIE : CAUSES DE L'AUGMENTATION DU NOMBRE DES BOURGEONS PROVOQUEE PAR L'ANAEROBIOSE | 124 |
| | |
| CHAPITRE I : Localisation des facteurs stimulant le bourgeonnement | 126 |
| 1.1 - Milieu de culture | 126 |
| 1.2 - Tissus | 130 |
| 1.3 - Transplantation et fermentation intrinsèque | 130 |
| 1.4 - Conclusions | 133 |
| | |
| CHAPITRE II : Transformation de l'éthanol par les tissus | 134 |
| 2.1 - L'alcool déshydrogénase | 134 |
| 2.2 - La formation d'acétaldéhyde | 137 |
| 2.3 - Acétaldéhyde et bourgeonnement | 140 |
| 2.4 - Action des alcools | 141 |
| 2.5 - Conclusions | 143 |

| | |
|--|-----|
| CHAPITRE III : Ethylène et bourgeonnement | 145 |
| 3.1 - Anaérobiose et production d'éthylène | 145 |
| 3.2 - Ethylène et néoformation des bourgeons | 147 |
| 3.3 - Ethylène et anaérobiose | 150 |
| 3.4 - Les pigments foliaires | 151 |
| 3.5 - Conclusions | 153 |
| | |
| CONSIDERATIONS GENERALES | 154 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 165 |
| | |
| RESUME | 183 |

AVANT - PROPOS

Avant d'exposer mes résultats, qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui se sont intéressés à mon travail et ont permis sa réalisation.

Je remercie tout d'abord Monsieur le Professeur BOURIQUET qui a dirigé judicieusement mes recherches et m'a donné la possibilité de les mener à bien dans son laboratoire de physiologie végétale de Villeneuve d'Ascq comme dans celui de l'Institut Agricole de Lille.

Je suis profondément touché de l'honneur que m'a fait Monsieur le Professeur GAUTHERET, membre de l'Institut, en acceptant de juger mon travail.

J'adresse de vifs remerciements à Messieurs les Professeurs GENEVES, BONNOT et BONNEMAIN dont j'apprécie les critiques et suggestions.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues des U.E.R. de Biologie et de Sciences Agricoles, et en particulier à J. DUBOIS, B. LEGRAND, S. RAMBOUR, J. VASSEUR du laboratoire de physiologie végétale, R. BLONDEAU, G. VIDAL du laboratoire de cryptogamie et A. HENRY de l'Institut Agricole pour l'aide qu'ils m'ont toujours accordée en toute amitié.

En travaillant ces dernières années sur les lieux mêmes de l'ancien laboratoire de Botanique, j'ai eu plaisir à me souvenir de Monsieur MONTUELLE dont j'ai pu apprécier les encouragements pour la recherche et les conseils pédagogiques à mes débuts dans l'enseignement supérieur.

J'apprécie beaucoup le climat dans lequel j'ai pu achever mes travaux. J'en remercie le personnel de l'Institut Agricole et notamment Madame BERTOUT dont la collaboration technique m'a été précieuse et Mademoiselle DEMARELLE qui a apporté beaucoup de soin à la dactylographie de ce mémoire.

Enfin, je ne saurais oublier mes anciens collègues Instituteurs qui n'ont cessé de m'encourager depuis mes débuts de chercheur. Avec eux, je ne veux continuer à mieux connaître que pour mieux communiquer.

- I N T R O D U C T I O N -

=====

Dès 1936, PREVOT P. a mis en évidence l'influence favorable de l'anaérobiose dans la néoformation des ébauches gemmaires. Les travaux ont été effectués avec des boutures de feuilles de Bégonia rex qui régénèrent facilement des bourgeons et des racines. Plus tard, en utilisant la méthode de culture "in vitro", WHITE R. P. -1941- notait que des cals de tabac (Nicotiana glauca X N. langsdorfii) produisent des bourgeons lorsqu'ils sont immergés dans un milieu liquide.

L'auteur attribuait cette différenciation aux conditions partiellement anaérobies dans lesquelles étaient placés les tissus, car ceux-ci ne bourgeonnent habituellement pas sur un milieu solidifié par de la gélose.

En 1944, SKOOG F. admettait cette hypothèse, mais en prêtant seulement au gradient d'oxygène un rôle indirect dans l'organogenèse. Nous avons donc pensé qu'une étude approfondie de l'influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement aiderait à comprendre certains aspects de ce phénomène de corrélation complexe (BOURIQUET R. -1966-) que constitue la néoformation des bourgeons.

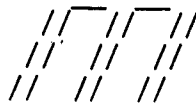
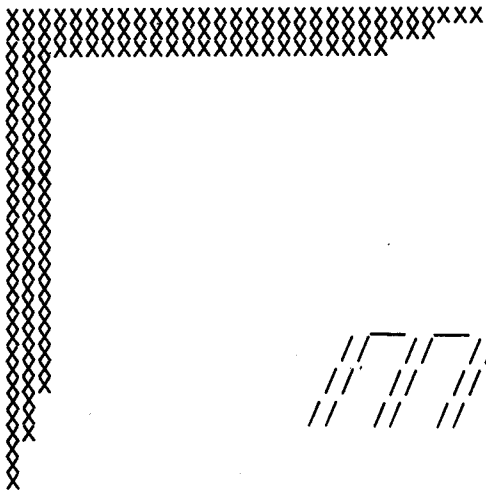
De précieuses indications nous ont été fournies par de nombreux auteurs qui abordaient pourtant des sujets différents du nôtre. Ainsi, dès le début du siècle, CHEVILLARD L., F. HAMON, A. MAYER, L. PLANTEFOL (-1930-) ont mis en évidence qu'une valeur minimale de 1 ou 2 % d'oxygène est nécessaire pour assurer les phénomènes vitaux. De multiples travaux ont été réalisés depuis, concernant l'influence de l'anaérobiose et des faibles

tensions d'oxygène sur le développement des végétaux. La plupart d'entre eux portent sur la germination des graines ou la croissance des plantes vertes. MOLLIARD M. (-1936 - 1938-) étudie notamment l'action de la teneur en oxygène sur le développement des plantules de Raphanus sativus ; bien qu'il ne cherche pas à observer l'influence de ce facteur sur les diverses fonctions du végétal, il nous apprend que la pression de l'oxygène dans l'air atmosphérique ne correspond pas forcément à un optimum de rendement et de vitalité. Dans les années 60, la conquête de l'espace suscite un renouveau d'intérêt pour les recherches effectuées dans des conditions anoxiantes reflétant celles qui règnent sur les planètes de notre système solaire (SIEGEL S. M., L. A. ROSEN -1962-, SIEGEL S. M., L. A. ROSEN, C. GIUMARRO -1962-1963-, SIEGEL S. M., L. A. ROSEN, G. RENWICK -1962-1963-, SIEGEL S. M., L. A. HALPERN, C. GIUMARRO, G. RENWICK, G. DAVIS -1963-, SIEGEL S. M. -1964-). Préoccupés d'abord par la survie des graines et leurs possibilités de développement sous de basses pressions partielles d'oxygène, les chercheurs s'orientent ensuite progressivement vers l'étude de la physiologie des plantes anoxiées (LETEY J., L. M. STOLKY, N. VALORAS, T. E. SZUSZKIEWICZ -1963-, WILKINS M. B., D. M. WARREN -1963-). Ils utilisent le plus souvent des graines ou des plantes entières, quelquefois des organes isolés (HIATT A. J., R. H. LOWE -1967-) et plus rarement des tissus cultivés "in vitro" (KESSEL R. H. J., A. H. CARR -1972-). Certes, tous les résultats confirment la nécessité de l'oxygène dans les processus vitaux, mais soulignent aussi que l'anaérobiose temporaire ou partielle entraîne par exemple la levée de dormance des graines (COME D., C. THEVENOT, T. TISSAOUI -1970-), perturbe le comportement photopériodique de différentes

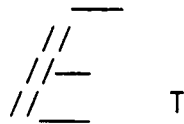
graminées (KONSTANTINOVA T. N. -1963-) ou modifie le développement des germes de pomme de terre (BURTON W. G. -1968-). Actuellement, le métabolisme anaérobie fait l'objet d'actives recherches (LEBLOVA S., I. ZIMAKOVA, J. BARTHOVA, D. EHLICHOVA -1971-, CHIRKOVA T. V., S. E. EGGI, E.H. DUNAEVA -1974-, DOIREAU P. -1974-). On envisage notamment les différentes possibilités d'utilisation par les cellules végétales des métabolites formés en l'absence d'oxygène.

Ces observations nous ont donc aidé à concevoir les modalités d'action de l'anaérobiose dans nos conditions expérimentales et à mieux interpréter nos résultats concernant la néoformation des bourgeons.

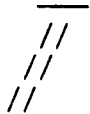
- o o o -



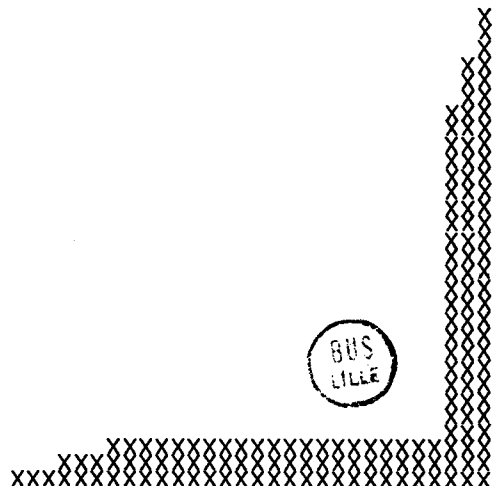
A T E R I E L



T



E C H N I Q U E S



CHAPITRE I :

LA CULTURE "IN VITRO" DE FRAGMENTS D'ORGANES VEGETAUX

- o o o -

Comme l'a souligné GAUTHERET (1959), les tissus de racine d'Endive (Cichorium intybus L) cultivés "in vitro" prolifèrent et produisent spontanément des racines et des bourgeons. Pour étudier l'influence de l'anaérobiose sur les processus d'organogenèse et tout particulièrement le bourgeonnement nous avons donc utilisé une variété d'Endive cultivée, commercialisée sous le nom de chicorée de Bruxelles ou Witloof.

Récoltées au champ de septembre à novembre, les racines ont été privées de leurs feuilles par section au niveau du collet et placées sous abri dans la terre, le sable ou la vermiculite humidifiée. A température comprise entre 10° et 15° C le matériel se conserve ainsi plusieurs mois sans produire de chicon.

Pour chaque essai nous avons sélectionné des échantillons de même taille, de même provenance et ayant subi les mêmes conditions de conservation. La culture "in vitro" des fragments de racine a été faite selon la technique classique mise au point par GAUTHERET (1959). Toutefois, pour mener à bien l'étude quantitative du bourgeonnement nous avons fréquemment utilisé un mode d'ensemencement particulier s'inspirant de la méthode préconisée par CAPLIN et STEWARD (1949 et 1963) et employée par DURANTON (1959), dans la culture "in vitro" de fragments de tubercules de topinambour.

Culture *in vitro* de fragments
de racine d'Endive

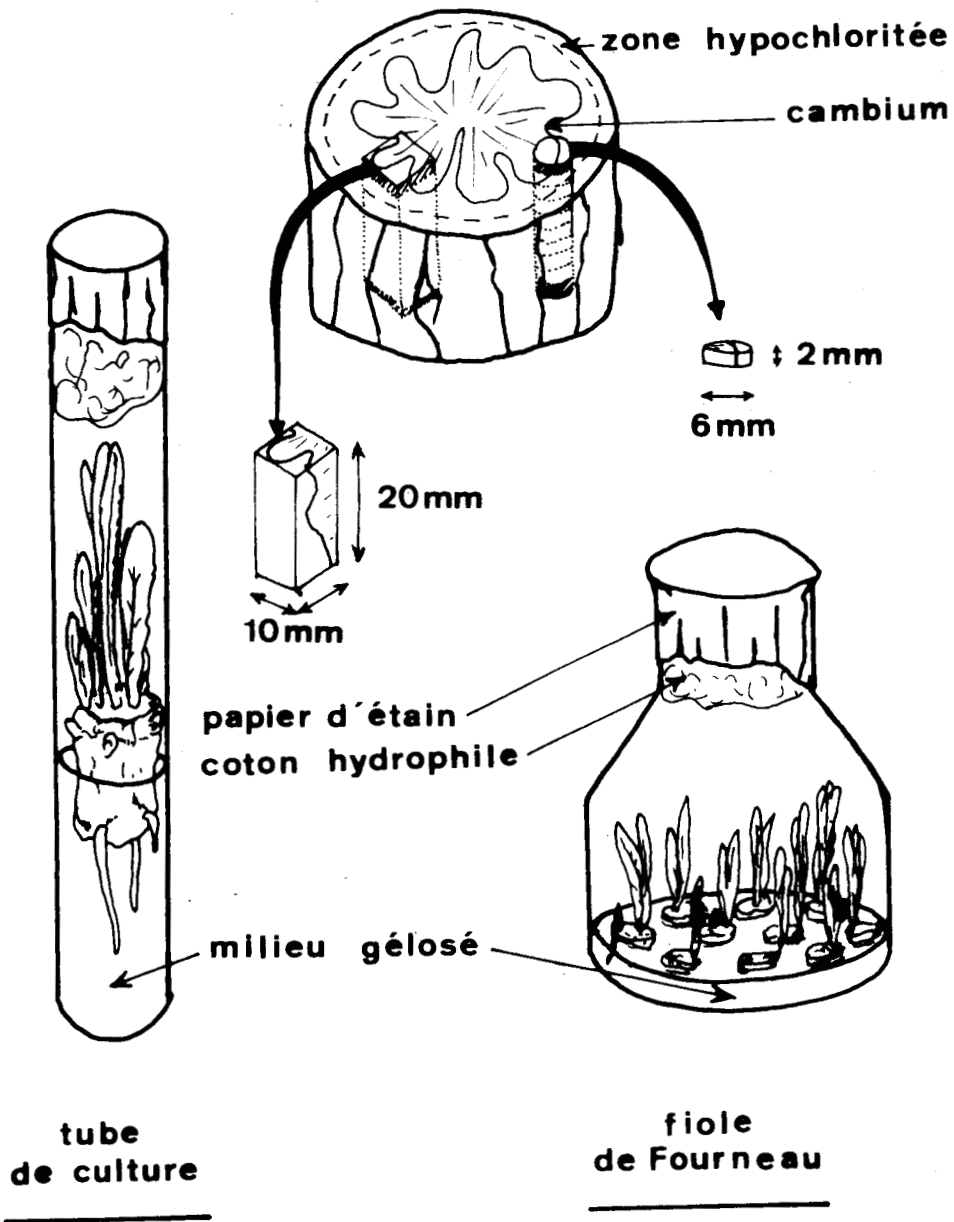


Planche 1 : Comparaison des deux modes de prélèvement et d'ensemencement des fragments de racine d'Endive cultivés *in vitro*.

1.1 - Technique classique :

Les racines sont nettoyées sommairement puis pelées. Sans aucun lavage préalable elles sont immergées pendant 25 minutes dans une solution à 90 g par litre d'hypochlorite de calcium (à 215° Chlorométrique). Cette opération a pour but de détruire les microorganismes (bactéries et champignons) qui infectent fréquemment la zone corticale superficielle. Bien entendu, le coeur de la racine et notamment la zone génératrice libéroligneuse ne doivent pas être atteints par l'antiseptique (planche 1). Après stérilisation, l'organe est débité en deux ou trois tronçons prélevés dans la partie moyenne à l'exclusion du collet et de l'extrémité apicale (MARGARA J., M. RANCILLAC, Mlle A. BOUNIOLS -1966-). On découpe des fragments de 10 mm X 10 mm X 20 mm comportant une fraction de zone libéroligneuse. Ces explantats sont introduits en position normale dans les tubes de culture (hauteur 160 mm X section 20 mm). On veille ainsi à ce que la face radicaire s'enfonce un peu dans le milieu de culture gélosé. Ces opérations d'ensemencement sont effectuées dans des conditions d'asepsie les plus rigoureuses.

Dans les conditions ordinaires, les tissus prolifèrent rapidement et produisent successivement des racines puis des bourgeons. Ces derniers sont visibles à partir du dixième jour après l'ensemencement, leur nombre s'accroît progressivement puis se stabilise après trois semaines de culture environ (photo A). Après un mois de culture les formations caulinaires d'un même explantat sont nombreuses et atteignent des tailles très différentes. On constate (Figure 1), qu'un explantat peut produire en moyenne plus de dix bourgeons qui se répartissent finalement selon

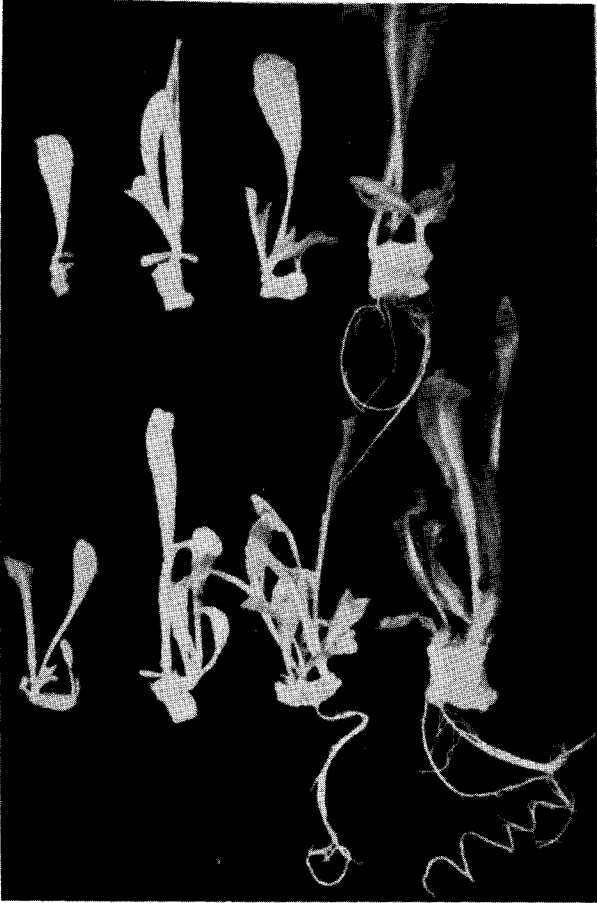


Photo A : Explantats de racine d'Endive de différentes tailles après 1 mois de culture en tubes (ensemencement selon la méthode classique).

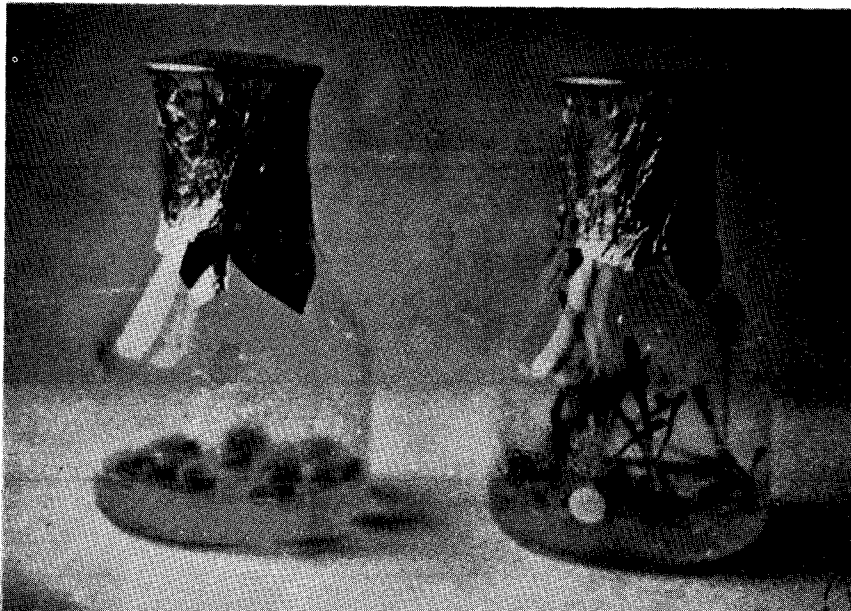


Photo B : Deux aspects du développement "in vitro" de fragments de racine d'Endive ensemencés en fioles de Fourneau.

- a) Explantats âgés de 10 jours (prolifération) ;
- b) Explantats âgés de 1 mois (bourgeonnement).

UHS
LILLE

**nombre moyen de bourgeons
par explantat
de 1cm x 1cm x 2cm**

(nombre moyen global = 12,8 bourgeons par explantat)

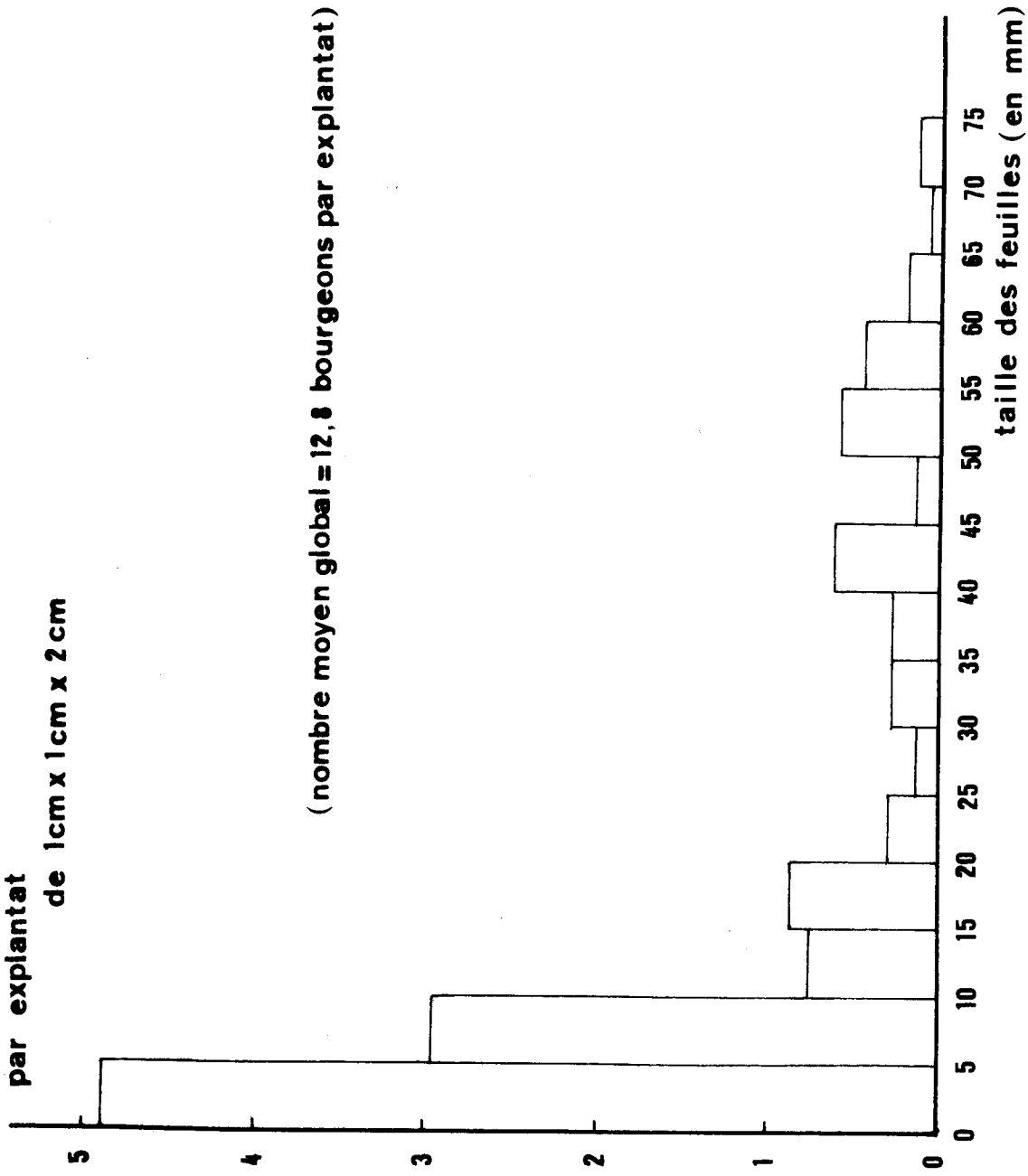


Figure 1 : Répartition des bourgeons en fonction de leur taille dans un lot de fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" selon la technique classique (gros explantats), (1 mois de culture).

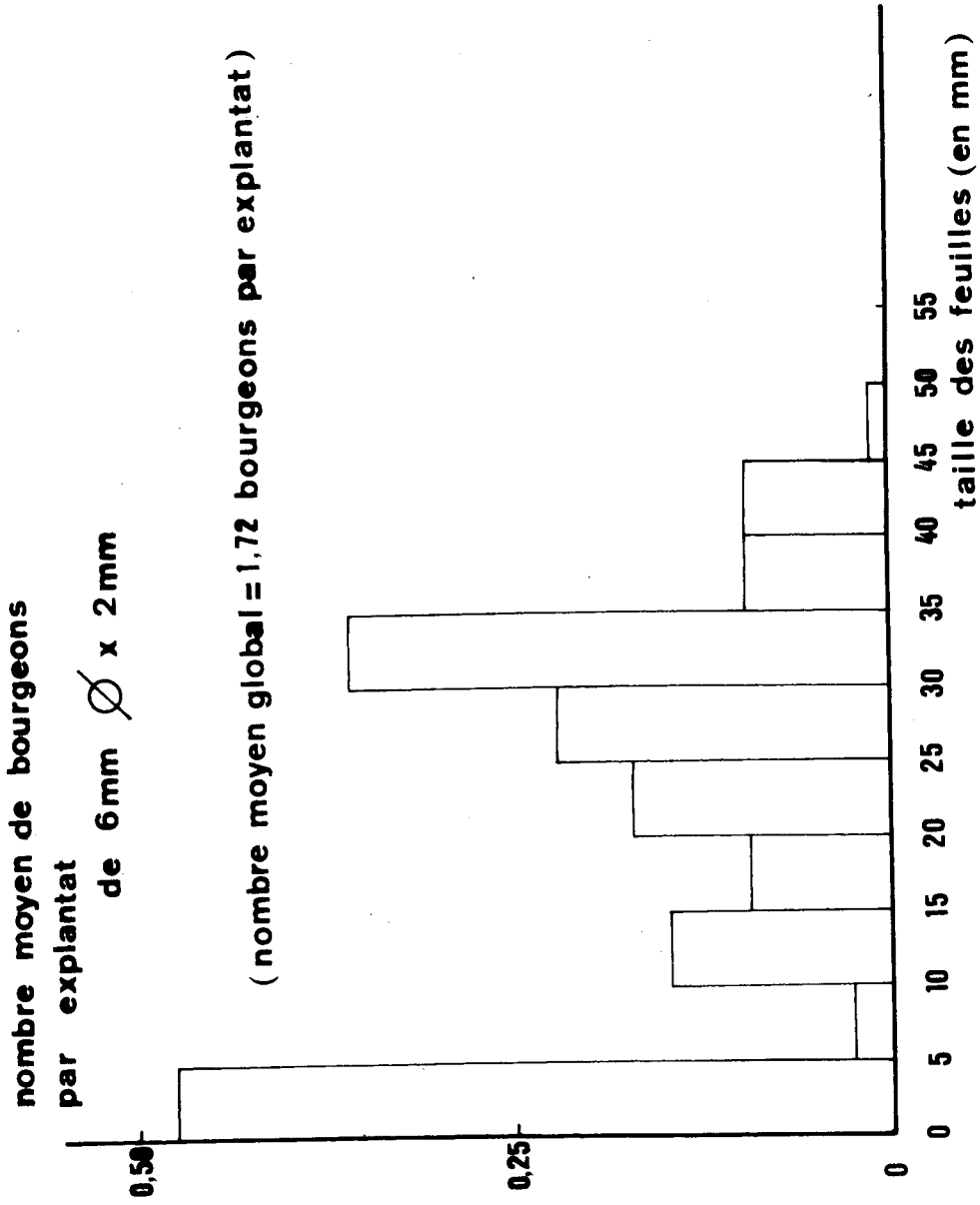


Figure 2 : Répartition des bourgeons selon leur taille dans un lot de fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (petits explantats), (1 mois de culture).

la taille de leurs feuilles en multiples classes constituant un ensemble hétérogène.

Cette méthode convient à l'étude du bourgeonnement mais peut présenter quelques inconvénients lorsqu'il s'agit d'évaluer quantitativement le phénomène. Nous avons donc été amené à réduire la taille des explantats et à en cultiver un plus grand nombre par lot.

1.2 - Test quantitatif de bourgeonnement :

1.2.1 - Taille des explantats :

On pouvait penser que de petits explantats produiraient moins de bourgeons et en faciliteraient le dénombrement. A l'aide d'une emporte-pièce cylindrique nous avons donc débité des fragments de racine de 6 mm de section et 2 mm de hauteur. Le prélèvement s'effectuait dans la zone cambiale (planche 1 - page 7). La figure 2 montre que ces explantats produisent moins de 2 bourgeons en moyenne chacun. Dans un lot de 100 fragments ces formations caulinaires se répartissent d'après la taille de leurs feuilles selon deux modes bien distincts. Ceci nous a donc amené à définir 2 catégories de bourgeons coexistant sur un grand nombre d'explantats : ceux dont les feuilles atteignent rapidement une taille supérieure à 5 mm (B) et ceux qui demeurent encore à l'état d'ébauche après un mois de culture "in vitro" (b). Bien entendu, compte-tenu du petit nombre de formations caulinaires, il convient de calculer les nombres moyens de B et de b à partir des seuls explantats qui portent au moins un bourgeon bien développé. Le tableau 1 a été établi de cette manière à partir de fragments de racine débités à l'aide d'emporte-pièces de 6 et 10 mm de section et mesurant 2 ou 10 mm d'épaisseur.




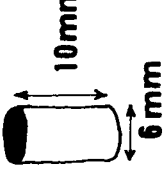

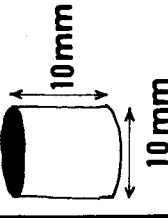
| % d'expl. avec | BOURGEONS > 5 mm | | | | B nombre moyen par expl. | BOURGEONS < 5 mm | | | | b nombre moyen par expl. |
|---|------------------|-----|-----|-----|-----------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------------------------|
| | 1 B | 2 B | 3 B | 4 B | | 1 b | 2 b | 3 b | 4 b | |
|  100 | | | | | 1,00 | 28 | 6 | 5 | | 0,55 |
|  56 | 37 | 7 | | | 1,51 | 31 | 21 | 11 | | 1,06 |
|  29 | 53 | 12 | 6 | | 1,95 | 41 | 23 | 6 | | 1,11 |
|  33 | 60 | 17 | | | 2,74 | 16 | 14 | 26 | 33 | 2,54 |

Tableau 1 : Influence de la taille des explantats sur la production des bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

Nous avons figuré le pourcentage d'explantats porteurs de 1, 2, 3 ou 4 bourgeons de l'une ou l'autre catégorie définie précédemment. En augmentant l'épaisseur ou la section des explantats on augmente le nombre des bourgeons mais aussi l'hétérogénéité des néoformations caulinaires sur les explantats d'un même lot.

1.2.2 - Technique particulière d'ensemencement :

Les observations précédentes nous ont incité à utiliser fréquemment des explantats calibrés de petite taille. Ceci permettait en outre de constituer plus facilement de multiples lots expérimentaux de cent explantats. Les fragments calibrés sont ensemencés, la face radiculaire au contact du milieu gélosé, par groupes de dix, dans des fioles de FOURNEA (Planche 1, page 7 et photo B, page 9). Ces conditions de culture ne modifient pas la date d'apparition des premiers bourgeons. Par contre, il est intéressant de souligner que sur le milieu nutritif habituel les petits explantats produisent plus rarement des racines que les gros fragments. Notre test permet donc d'étudier plus spécifiquement le bourgeonnement.

1.2.3 - Expérimentation :

Nous avons eu fréquemment recours au test précédent lorsqu'il s'agissait de dénombrer les bourgeons produits par les tissus de racine d'Endive dans différentes conditions expérimentales.

Nous n'avons toutefois pas abandonné complètement la méthode traditionnelle d'ensemencement. Ce sont d'ailleurs nos essais préliminaires effectués avec de gros fragments qui nous ont permis de mettre en évidence les différents effets de l'anaérobiose.

D'autre part le mode de culture en tube convenait tout-à-fait à l'étude de l'inhibition du bourgeonnement par l'anoxie. Enfin, pour préciser la sen-

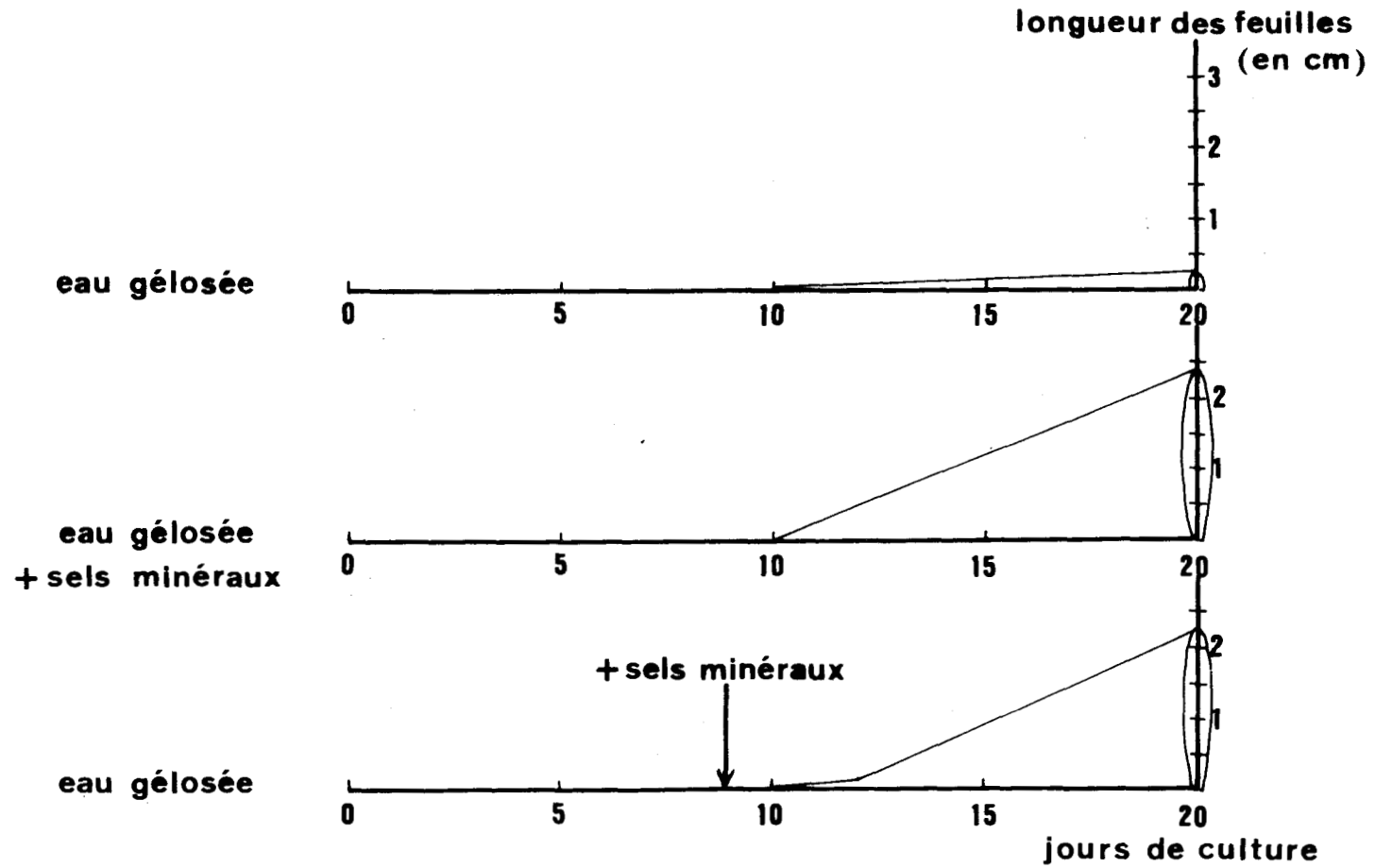


Figure 3 : Influence des sels minéraux du milieu nutritif sur le développement des bourgeons néoformés par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (petits explants).

sibilité de notre matériel végétal à certains traitements, il nous a souvent paru intéressant d'utiliser conjointement les deux modes de culture : en tubes et en fioles de FOURNEAU.

1.3 - Le milieu nutritif :

Le milieu de base préconisé par GAUTHERET (1959) est solidifié par la gélose (0,9 %) et comporte les éléments minéraux de la solution de KNOP diluée de moitié, les oligoéléments de BERTHELOT et du glucose (3 %). Ceci convient aux gros explantats auxquels il n'est même pas indispensable de fournir les oligoéléments.

Si les tissus de racine d'Endive semblent peu exigeants, puisqu'ils sont même capables de bourgeonner sur de l'eau gélosée, les petits explantats sont plus sensibles à l'influence du milieu. En effet, en l'absence de sels minéraux, les bourgeons se forment mais ne se développent pas (figure 3). Dès la fin de la première semaine de culture, les éléments minéraux (solution de KNOP diluée de moitié) sont nécessaires au développement normal des feuilles. Par ailleurs, nous avons observé que le taux de glucose dans le milieu influence le bourgeonnement des petits fragments. A partir de 3 % le nombre d'explantats porteurs de bourgeons décroît considérablement et s'annule même au-delà de 5 %. Nous n'ajouterons donc habituellement que 2 % de glucose au milieu de culture de base. Bien que la gélose en fibres utilisée habituellement renferme des oligoéléments, nous avons le plus souvent ajouté de la thiamine (10^{-6} g/ml) et les microéléments de la solution de HELLER pour éviter les carences éventuelles avec les petits explantats. Avec ceux-ci également le taux de gélose est porté de 0,9 % à 1 % pour éviter

| Mode de culture | Tube avec 1 explantat de 1 cm X 1 cm X 2 cm | Fiole de FOURNEAU avec 10 explantats de 6 mm Ø X 2 mm |
|---|---|---|
| <u>Milieu nutritif :</u> | | |
| 1 - Eléments minéraux de la solution de KNOP diluée de moitié : | | |
| (NO ₃) ₂ Ca, 4H ₂ O..... | 0,5 g/l | idem |
| NO ₃ K..... | 0,125 g/l | idem |
| SO ₄ Mg, 7H ₂ O..... | 0,125 g/l | idem |
| PO ₄ H ₂ K..... | 0,125 g/l | idem |
| 2 - Microéléments de HELLER.... avec Fer.... | non | oui |
| 3 - Glucose..... | 3 % | 2 % |
| 4 - Gélose..... | 0,9 % | 1 % |
| <u>Quantité de milieu par tube ou fiole à FOURNEAU :</u> | 20 ml | 20 ml |



Tableau 2 : Composition du milieu nutritif de base pour la culture "in vitro" des fragments de racine d'Endive.

l'immersion dans le milieu de culture. Le tableau 2 indique les compositions respectives des milieux utilisés pour les deux types d'explantats.

1.4 - Précautions d'asepsie :

Tubes et fioles de FOURNEAU contiennent les uns et les autres 20 ml de milieu gélosé. La stérilisation de ces milieux de culture se fait à l'autoclave à 110° pendant 20 m. Chaque récipient est bouché au coton hydrophile. En atmosphère ordinaire, un capuchon de papier d'étain permet les échanges gazeux avec l'extérieur tout en évitant la dessiccation des milieux.

Les précautions habituelles d'asepsie sont prises en ce qui concerne les instruments et le matériel végétal. Toutefois, nous avons évité tout contact des tissus de racine avec l'alcool qui, comme nous le verrons plus loin, est susceptible d'influencer le bourgeonnement.

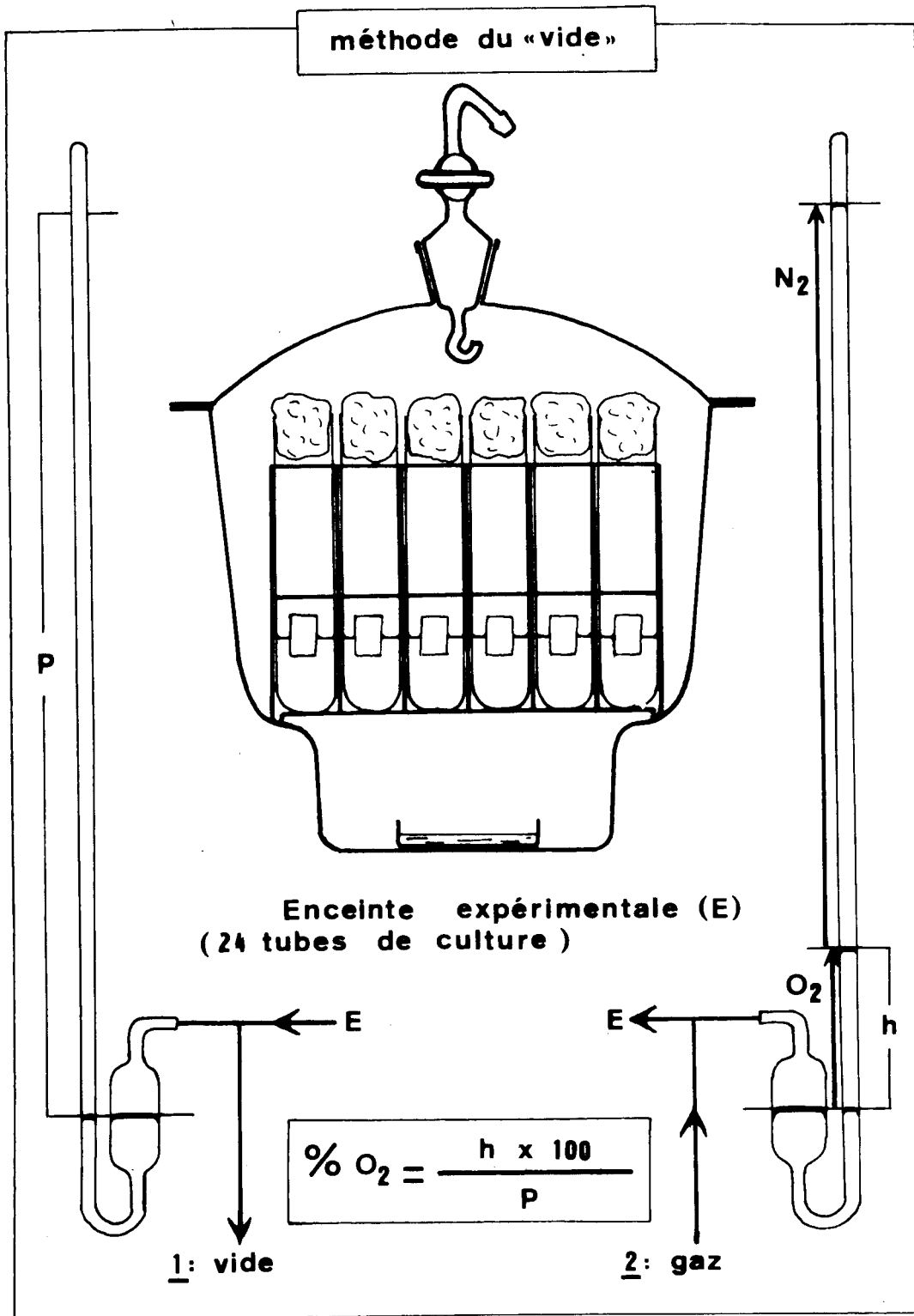


Planche 2 : Conditionnement des cultures en tube, constitution d'un mélange $O_2 - N_2$ de composition définie.

CHAPITRE II :

CONDITIONNEMENT DES CULTURES

- o o o -

2.1 - Les enceintes expérimentales :

Les traitements en atmosphère contrôlée s'effectuent dans des enceintes expérimentales étanches et suffisamment spacieuses pour obtenir un panier de 24 tubes (24 "gros" explantats) ou de 10 à 12 fioles de FOURNEAU (100 à 120 "petits" explantats calibrés). Nous avons utilisé des dessiccateurs en pyrex de 10 l munis d'un ou de deux robinets (planches 2 et 3).

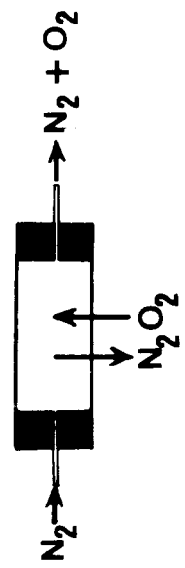
2.2 - Différents types de conditionnement gazeux :

Les essais s'effectuent soit en atmosphère confinée, soit en atmosphère renouvelée.

Dans le premier cas, le traitement doit être de courte durée (trois ou quatre jours) si l'on veut éviter de trop grandes variations des conditions expérimentales initiales. Dans le deuxième cas, par contre, un renouvellement périodique ou continu de l'atmosphère pendant le traitement assure la stabilité et le contrôle permanent du conditionnement gazeux des cultures.

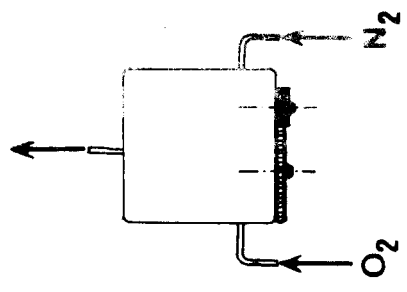
BVS
LILLE

maintien d'une faible tension constante d'oxygène
en circuit ouvert

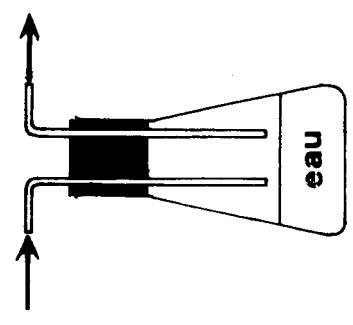


membrane de diffusion (M)

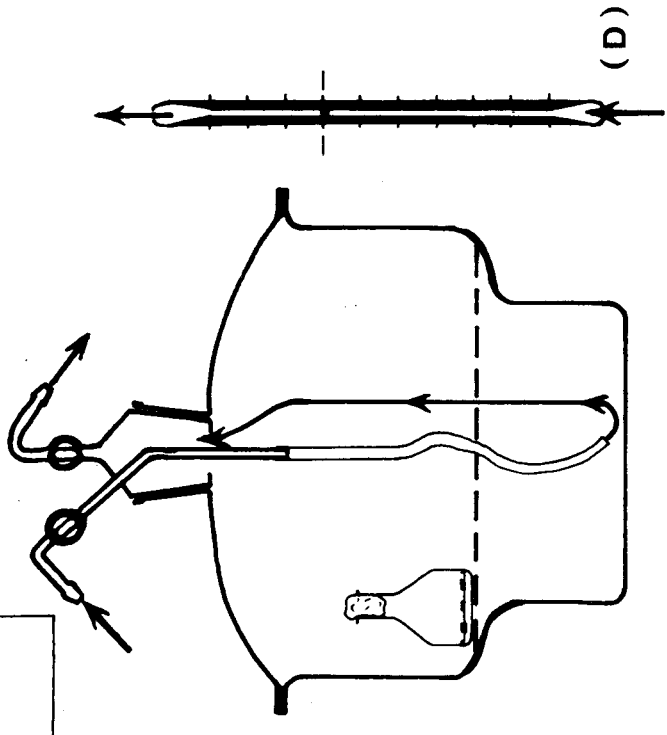
$N_2 + O_2$ (1 à 10%)



pompe Wosthoff (P)



humidificateur (H)



enceinte expérimentale (E)
(12 fioles à culture)

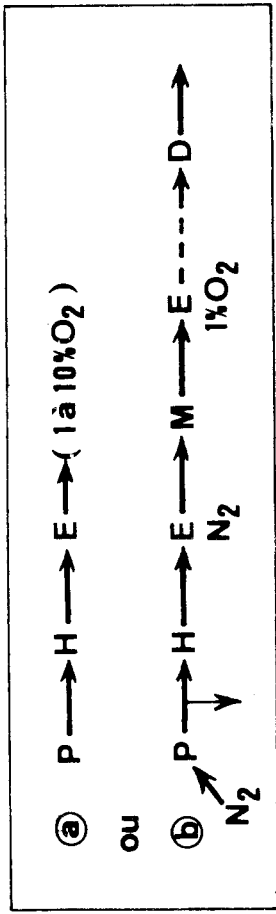


Planche 3 : Appareils et dispositifs nécessaires au maintien d'une faible tension d'oxygène en circuit ouvert. Schémas d'assemblage.

2.3 - Constitution des mélanges gazeux :

Notre étude nous a amené à constituer des mélanges oxygène-azote dans les proportions 1 - 99 à 10 - 90. Différentes méthodes et appareillages ont été utilisés à cet effet :

2.3.1 - Méthode du vide :

Elle permet de mettre le plus rapidement possible les cultures en présence d'une atmosphère de composition déterminée. Cette méthode consiste à évacuer l'air des enceintes expérimentales et à le remplacer par un mélange gazeux de composition définie (planche 2) - (W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, J. F. STAUFFER -1957-).

L'évacuation s'effectue à l'aide d'une pompe à vide. Un baromètre à mercure permet de contrôler l'opération. Lorsque celle-ci est terminée, on introduit successivement l'oxygène et l'azote dans l'enceinte. Le mercure du tube barométrique se déplace en rapport avec le pourcentage de gaz admis. Par exemple, pour une pression barométrique de 76 cm Hg, 1 % d'oxygène correspond à 0,76 cm de dénivellation. Cette façon de constituer les mélanges gazeux convient plus particulièrement aux essais en atmosphère confinée lorsqu'on ne dispose pas de pompe mélangeuse. Limitées à quelques minutes, les manipulations n'affectent pas le développement ultérieur des tissus de racine d'Endive.

Il n'en est pas de même si l'on pratique des vides répétés à plusieurs jours d'intervalle pendant le traitement, aussi avons-nous été amené à abandonner cette méthode pour effectuer le renouvellement périodique de l'atmosphère.

2.3.2 - Pompe mélangeuse (Wosthoff) :

Cet appareil débite à la vitesse de 18 l/heure des mélanges

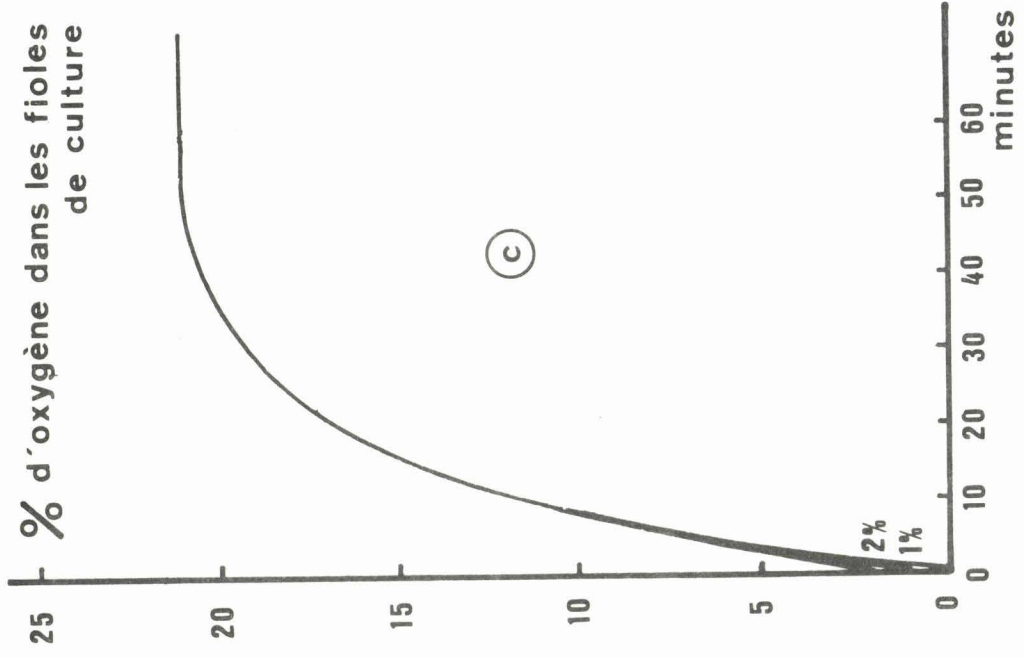
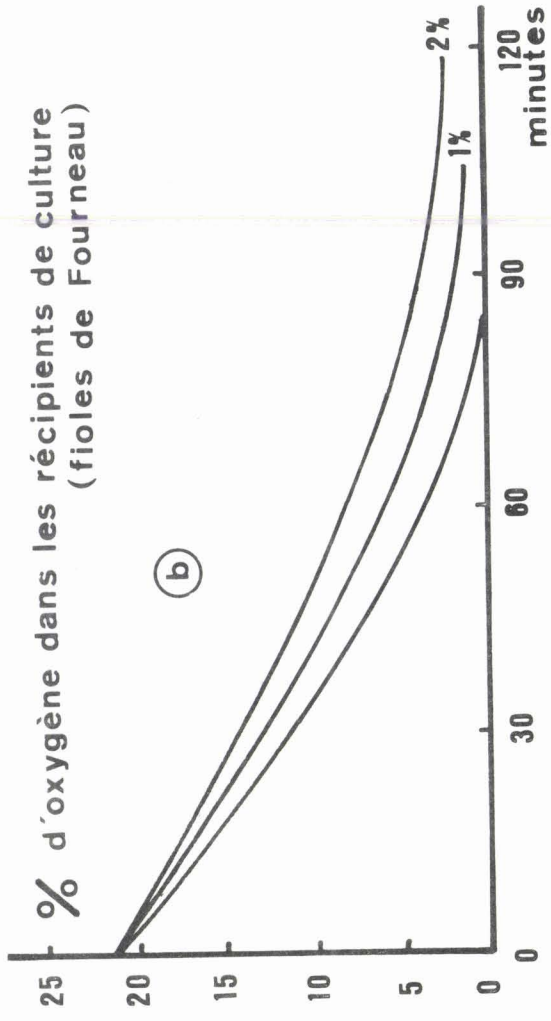
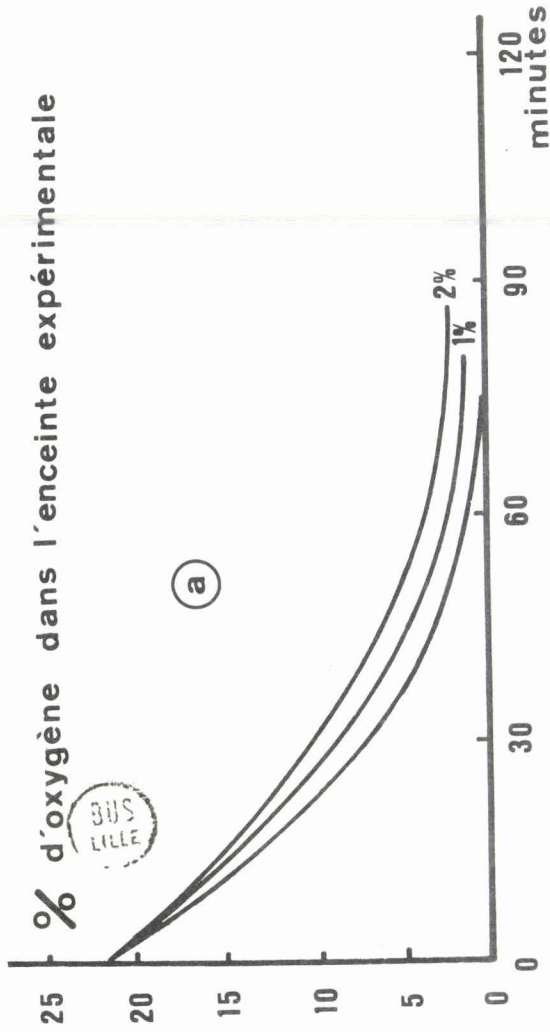
gazeux de composition bien définie (1 à 10 % d'oxygène dans l'azote).

Il permet donc un renouvellement périodique ou permanent de l'atmosphère environnant les récipients à cultures.

2.3.3 - Membranes de diffusion :

De manière à obtenir simultanément des concentrations d'O₂ différentes à partir d'une seule pompe, nous avons utilisé des membranes diffusantes. Une feuille de tissu imprégnée d'un haut polymère synthétique (élastomère silicone) est enroulée sur elle-même pour constituer un cylindre ouvert à chaque extrémité. Ce dispositif est interposé entre deux enceintes expérimentales disposées en série et parcourues successivement par un courant gazeux régulier. Ce diffuseur fonctionne comme ceux utilisés par MARCELLIN P. et J.LETEINTURIER (1964). Au contact de la paroi de diffusion, des échanges s'effectuent entre l'atmosphère extérieure et le gaz circulant à l'intérieur. Ainsi ce dernier s'enrichit-il en oxygène tandis que du gaz carbonique et la plupart des substances volatiles émis par les tissus sont évacués. L'intensité des échanges dépend de la nature de l'élastomère (diméthylpolysiloxane), de la surface de la membrane diffusante et du débit du gaz circulant d'une enceinte expérimentale à l'autre. Lorsque le système est en équilibre, c'est à dire après quelques heures, on contrôle la tension d'oxygène au niveau de chacun des lots grâce à un analyseur BECKMAN muni de l'électrode appropriée.

Pour ajuster les concentrations d'O₂ aux taux recherchés, il est parfois nécessaire de réduire le débit de gaz à la sortie de la pompe à l'aide d'un tube capillaire monté en dérivation. Le contrôle du débit est effectué avec un débitmètre à bille situé après la dernière enceinte expérimentale.



RETOUR
EN

ATMOSPHERE ORDINAIRE

MISE EN CONDITIONS ANOXIANTES

2.3.4 - Contrôles de l'oxygénation :

Nous avons mesuré le temps nécessaire pour chasser totalement l'air des enceintes expérimentales et des récipients de culture et le remplacer par de l'azote ou un mélange de composition définie. La "méthode du vide" (2.3.1 page 21) demande 5 à 10 minutes à peine pour effectuer ces opérations. Mais le contrôle de l'oxygénation ne peut être fait qu'à posteriori car l'électrode polarographique ne supporte pas les fortes variations de pression. D'autre part, tout l'oxygène des cultures n'est pas forcément éliminé par une évacuation trop rapide. Cette remarque vaut surtout pour les tissus eux-mêmes car le milieu gélosé (1 % de gélose) contient ordinairement fort peu d'oxygène (0,78 p. p. m.). Quoi qu'il en soit, nous avons le plus souvent utilisé des pompes Wosthoff qui remplacent progressivement l'air environnant les cultures par l'azote ou le mélange faiblement oxygéné et dont l'efficacité peut être contrôlée à tout moment. Pendant le remplissage, l'électrode à oxygène est placée soit dans les enceintes expérimentales soit dans les récipients de culture. On constate ainsi (Figures a et b, page 23) que les conditions expérimentales sont d'autant plus vite atteintes que l'atmosphère de remplacement est moins oxygénée que l'air initial. La tension d'oxygène diminue moins vite dans les récipients de culture que dans les enceintes expérimentales (Figure b, page 23) car, même en l'absence de capuchon d'étain, le bouchon de coton hydrophile (Planche 1, page 7) ralentit les échanges gazeux. Néanmoins, les délais de mise en condition des tissus n'excèdent pas 2 heures. Ils sont donc très inférieurs à nos traitements qui durent généralement plusieurs jours. Lorsque plusieurs enceintes expérimentales sont raccordées en série à la même pompe Wosthoff il faut plus longtemps pour atteindre les conditions expérimentales. Dans ce cas, on chasse l'air pendant 10 minutes environ avec un courant

d'azote à fort débit (6 à 7 litres par minute) avant de faire circuler le mélange fourni par la pompe Wosthoff.

Après le traitement, les récipients de culture sont replacés en conditions ordinaires. Par suite de l'existence du bouchon de coton, il faut alors 45 minutes environ pour que la pression partielle d'oxygène soit la même au niveau des explantats que dans l'air ambiant (Figure c, page 23). Passé ce délai, on peut donc recouvrir les récipients de culture d'un capuchon d'étain (Planche 1, page 7).

Qu'il s'agisse de la mise en conditions expérimentales ou du retour dans l'air, l'équilibre est un peu plus vite atteint dans les tubes que dans les fioles de Fourneau.

Nous nous sommes demandé dans quelle mesure les conditions d'oxygénation variaient au cours du traitement. En atmosphère confinée (Tableau 2), l'activité respiratoire des tissus diminue sensiblement la tension d'oxygène. Par contre, en atmosphère renouvelée constamment, on n'observe aucune modification des conditions d'oxygénation initiales en cours de traitement.

| | | | | | | | | |
|---|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Tension d'oxygène en atmos- phère con- finée % | 1er jour | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 20,9 |
| | 8e jour | 0 | 1,8 | 3,2 | 4,3 | 6,4 | 7,5 | 17,3 |

Tableau 2 : Modifications de la tension d'oxygène dans les enceintes expérimentales (10 litres) en présence de fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (petits explantats)

2.3.5 - Lots témoins :

Le lot témoin est, par définition, celui qui ne subit pas le traitement. Il est donc cultivé normalement en atmosphère ordinaire. Néanmoins, pour étudier un facteur en particulier, nous serons fréquemment amené à prendre pour référence un lot soumis aux mêmes manipulations que les lots traités. C'est ainsi que les lots témoins pourront être placés dans une enceinte expérimentale, en présence d'une atmosphère contenant 21 % d'oxygène, renouvelée ou non selon le cas et éventuellement dépourvue de CO₂.

- o o o -

CHAPITRE III :

LES CRITERES DU BOURGEONNEMENT

- o 0 o -

3.1 - Initiation et développement des bourgeons :

Dans les conditions ordinaires, les bourgeons se forment à la fin de la première semaine de culture "in vitro" et sont visibles entre le 10^e et le 14^e jour après l'ensemencement des fragments de racine d'Endive. Même lorsque les néoformations caulinaires demeurent à l'état d'ébauches, il est relativement aisé d'en déceler l'existence dans la zone superficielle des explantats. Nous mentionnons donc le plus souvent la *date d'apparition* car la *date d'initiation* des bourgeons nécessiterait pour chaque essai une étude histologique systématique.

Il faut noter que les tissus de racine d'Endive sont capables de produire beaucoup plus de bourgeons que ceux dénombrés habituellement. La suppression des premières ébauches favorise l'activité néoformatrice de nouvelles zones méristématiques caulinaires. Ainsi, un lot ébourgeonné les 12^e, 21^e, 25^e et 28^e jours de culture a produit 15,6 bourgeons en moyenne par explantat au lieu de 8 dans le lot témoin.

3.2 - Autres critères de bourgeonnement :

Même chez les témoins, les explantats ne bourgeonnent pas forcément tous. Nous avons donc exprimé cet aspect de la capacité néoformatrice des tissus par le *pourcentage d'explantats porteurs de bourgeons* dans chaque lot expérimental. Lorsqu'il s'agissait de petits explantats, nous avons mentionné également le *pourcentage d'explantats porteurs de B* (bourgeons avec feuilles $>$ 5 mm) qui traduit une certaine capacité de croissance des feuilles.

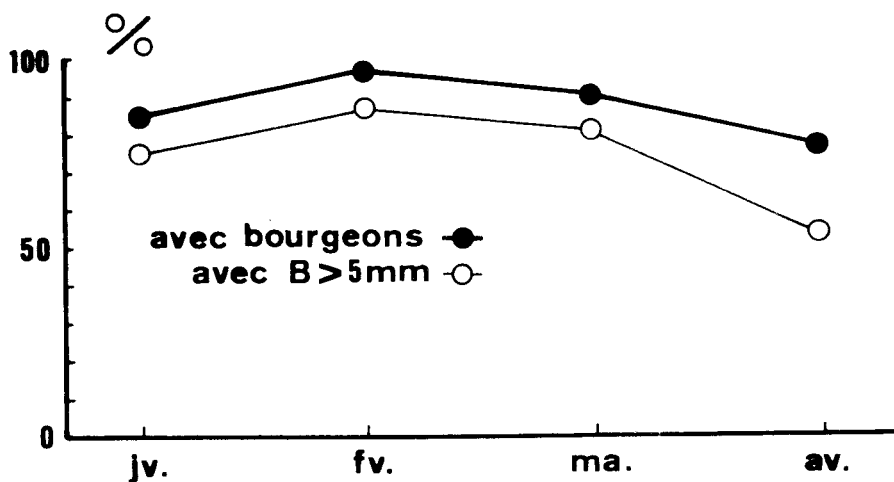
Le nombre moyen de bourgeons par explantat constitue un autre critère du bourgeonnement. Rappelons qu'il est calculé à partir des fragments de racine dont 1 bourgeon au moins atteint une taille supérieure à 5 mm. Ainsi peut-on distinguer *les valeurs moyennes de B et b* par explantat de ce type. *Taille et poids moyen des feuilles par explantat* complètent parfois les informations concernant la croissance des néoformations.

Dans nos essais avec des gros fragments de racine, nous nous sommes contenté de mentionner *le nombre moyen global de bourgeons par explantat*, compte tenu de l'hétérogénéité soulignée antérieurement (Chapitre I, paragraphe 1.2, alinéa 1.2.1 page 12).

3.3 - Variations du matériel végétal :

On observe des différences de comportement entre les Endives dites "Hâtives", "Normales" et "Tardives". D'une manière générale, les premières bourgeonnent difficilement dans les conditions ordinaires de culture en tube ou en fiole de FOURNEAU. A l'opposé, les tissus de racines "Tardives" sont doués d'organogenèse de manière très satisfaisante mais

Ⓐ EXPLANTATS issus de racines de même provenance



Ⓑ BOURGEONS

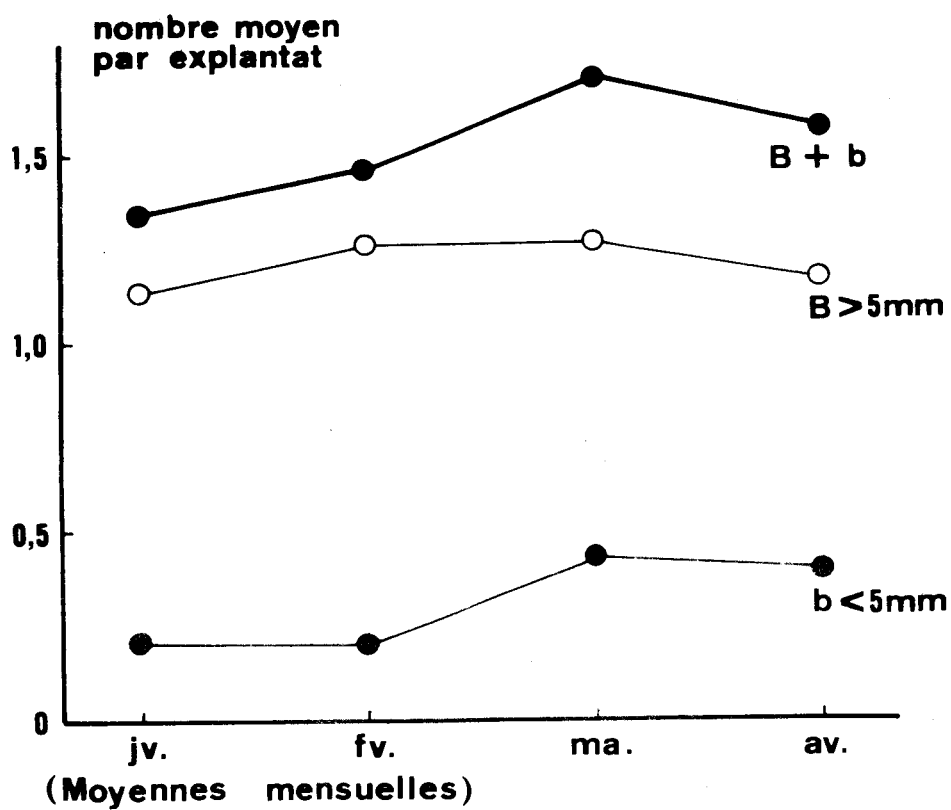
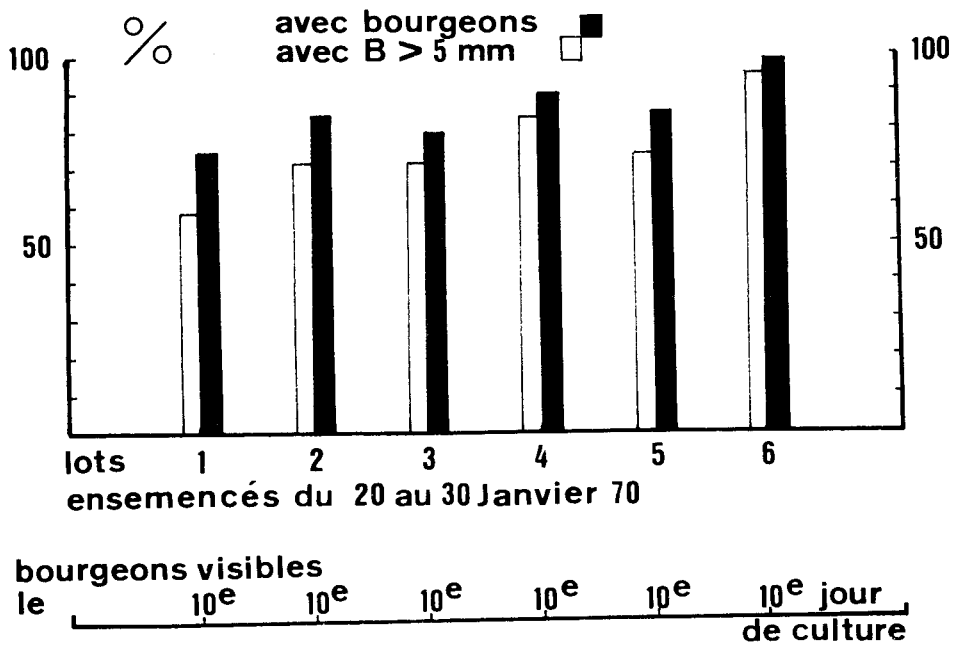


Figure 4 : Néoformation de bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro". Variations au cours de la conservation

④ EXPLANTATS



⑥ BOURGEONS

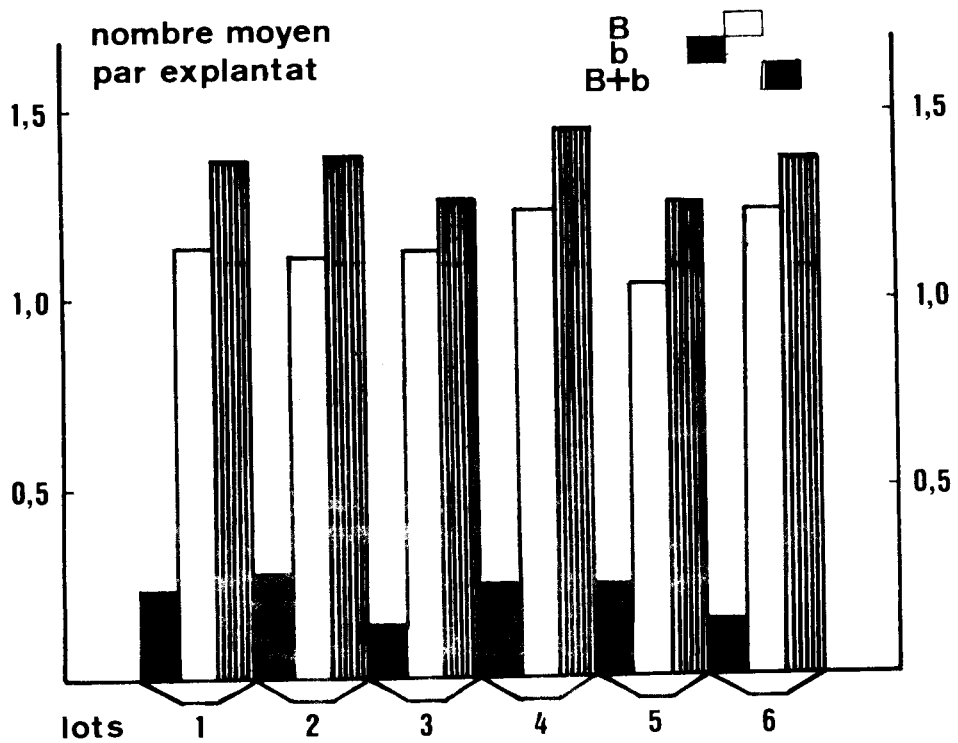


Figure 5 : Néof ormation de bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro". Variations entre différents lots homologues ensemencés à quelques jours d'intervalle.

sont plus difficiles à préserver des infections bactériennes en dépit des précautions habituelles d'asepsie. Nous avons donc utilisé le plus souvent des racines du type "Normales", prélevées fin octobre et novembre au champ (GAGNE J. P. -1960-).

Nous avons étudié l'influence de la durée de conservation des racines sur le bourgeonnement. Dans la figure 4 sont reportées les valeurs moyennes obtenues à partir de lots issus de racines de même provenance, maisensemencés en janvier, février, mars ou avril. Les plus grands nombres d'explantats porteurs de bourgeons et surtout les plus grands nombres moyens de bourgeons par explantat s'observent dans les lotsensemencés le plus tardivement. Ainsi la conservation des racines accroît leur capacité de former des bourgeons. En mars et avril, il y a plus de bourgeons de petite taille. Toutefois, comme l'indique le pourcentage d'explantats porteurs de bourgeons > 5 mm, une longue conservation rend l'ensemble des tissus moins apte à assurer une bonne croissance des feuilles.

Nous avons également étudié les variations de comportement entre lots homologuesensemencés à intervalles rapprochés. La figure 5 concerne les lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 issus de racines de même provenance etensemencés à 1 ou 2 jours d'intervalle entre le 20 et le 30 janvier. Les premiers bourgeons apparaissent à partir du 10e jour de culture dans tous les lots. Mais les pourcentages d'explantats porteurs de bourgeons ainsi que les nombres moyens de bourgeons par explantat diffèrent quelque peu dans les divers lots.

En résumé, ces observations nous amènent à faire quelques remarques préliminaires à l'étude du bourgeonnement. Les racines de même provenance ne sont pas forcément toutes dans le même état physiologique. Il importe donc d'effectuer tout essai comparatif en répartissant les explantats de façon homogène entre les différents lots. A cet égard, notre test en fiole de FOURNEAU a l'avantage d'utiliser un nombre restreint de racines tout en accroissant le nombre d'explantats par lot (70 à 100 explantats par lot au lieu de 24 par la méthode habituelle).

Les modifications du bourgeonnement au cours de la conservation des racines résultent de transformations physiologiques liées par exemple au métabolisme glucidique. On sait en effet (DE CONINCK B., J. P. COCHET, A. FOUREL -1969-, RUTHERFORD P. P., A. A. JACKSON -1965-, RUTHERFORD P. P., E. W. WESTON - 1968-), que le froid provoque l'hydrolyse de l'inuline en sucres à degré de polymérisation faible (glucose, fructose et saccharose). Ces transformations peuvent porter aussi sur d'autres facteurs, puisqu'au cours du stockage il y a enrichissement en matières minérales.

D'autre part, des racines arrachées tardivement (fin novembre) ont un taux élevé de sucres solubles qui se maintient pendant la conservation. En fait, l'évolution des réserves au cours du forçage ou de la conservation est fort complexe et mal connue.

CHAPITRE IV :

MESURES CONCERNANT L'ACTIVITE PHYSIOLOGIQUE DES TISSUS

- o 0 o -

4.1 - La croissance des tissus :

Surtout en l'absence d'organogénèse, nous avons suivi à la fois l'évolution du poids de matière fraîche et de matière sèche qui témoignent l'une et l'autre de la vitalité des explantats. Le séchage a été effectué à 105° pendant deux heures, puis à 70° jusqu'à poids constant (COLLET G. -1963-). Pour rendre compte des phénomènes de protéogénèse, nous avons eu recours aux dosages de l'azote protéique, c'est-à-dire de la fraction organique insoluble dans l'acide trichloracétique. La minéralisation du précipité s'effectue à 320° avec SO_4H_2 en présence de catalyseur au sélénium. Elle est suivie du dosage colorimétrique à l'aide du réactif de NESSLER (STRAUCH L. -1965-).

4.2 - Activités respiratoire et fermentaire :

4.2.1 - Echanges gazeux :

Dans nos conditions expérimentales, les tissus de racine d'Endive manifestent à la fois des activités respiratoire et fermentaire. La quantité d'oxygène absorbée en atmosphère confinée est évaluée par différence entre les taux initiaux et résiduels. Cette méthode a l'avantage de rendre compte uniquement du phénomène respiratoire mais ne peut guère

s'appliquer aux essais en atmosphère renouvelée. On peut aussi évaluer globalement les échanges gazeux en fixant par la soude le gaz carbonique dégagé par les fragments de racine et doser ensuite les carbonates par neutralisation progressive avec HCl (BURTON W. G. - 1962-). Cette méthode convient surtout aux essais en atmosphère confinée et rend compte à la fois de la respiration et de la fermentation des tissus.

Par ailleurs, la reprise d'activité respiratoire des explantats à l'issue d'un traitement a été étudiée à l'aide de l'appareil de WARBURG.

4.2.2 - Réserves énergétiques et produits de la fermentation :

Les glucides des explantats ou des milieux de culture peuvent être évalués globalement par solubilisation à chaud, séparation par filtration et dosage du carbone organique par la méthode d'oxydation chromique. Pour doser plus spécifiquement le glucose, il faut avoir recours à la méthode enzymatique à la glucose-oxydase.

Nous avons également dosé les produits carbonés volatils. Ceux-ci sont d'abord isolés par distillation. La méthode d'oxydation chromique permet ensuite d'évaluer globalement les quantités d'éthanol et d'acétaldéhyde présentes dans le distillat. Parfois, nous avons dosé plus spécifiquement l'éthanol par la méthode enzymatique à l'alcool déshydrogénase (BUCHER Th, H. REDETSKI -1951-). Mais la chromatographie en phase gazeuse nous a permis aussi d'analyser séparément les différents produits carbonés volatils (voir plus loin).

4.3 - L'activité enzymatique :

Quelques enzymes ont retenu notre attention en raison

de leur intervention dans le métabolisme énergétique de la cellule et pour le rôle qu'elles sont susceptibles de jouer dans la transformation des glucides ou de leurs dérivés.

4.3.1 - Activité phosphatasique acide :

L'extraction s'effectue par broyage des explantats dans le tampon : Tris 0,2 M - Na Cl M à pH 8 suivi d'une centrifugation à 10 000 g. Le surnageant contenant les phosphatases est ensuite incubé dans un substrat au glycérophosphate à pH 5 pour évaluer colorimétriquement l'activité libératrice de phosphore (FISKE C.H., Y. SUBBAROW -1925-, GOMORI G. -1942-).

4.3.2 - Activité alcool-déshydrogénasique :

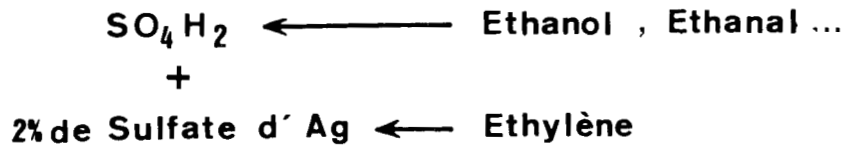
L'enzyme responsable de la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol et vice-versa est extraite par broyage du matériel végétal dans le tampon : glycolle - pyrophosphate de sodium à pH 9. Après centrifugation, le surnageant est additionné d'éthanol et de NAD (B - Nicotinamide - adénine dinucléotide). On peut suivre ainsi au spectrophotomètre l'apparition de NAD H résultant de l'activité alcool-déshydrogénasique. (BIELLMANN J. F., M. J. JUNG -1971-).

4.4 - Les pigments chlorophylliens :

On extrait les chlorophylles A et B ainsi que les caroténoïdes des explantats ou des feuilles néoformées, par broyage à froid dans l'acétone ajusté à 80 % et 20 % d'eau. Après dosage par spectrophotométrie, l'évaluation quantitative des pigments est faite à l'aide des formules proposées par ERUINSMA J. -1963- et HOLM G. -1954-.

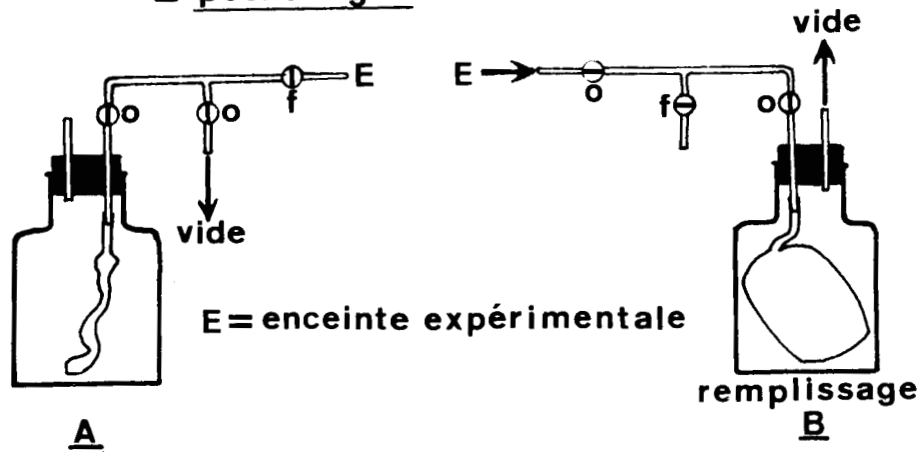
Substances organiques volatiles

Ⓐ fixation chimique



Ⓑ prélèvement gazeux

- poche à gaz



- fiole à ajoutage

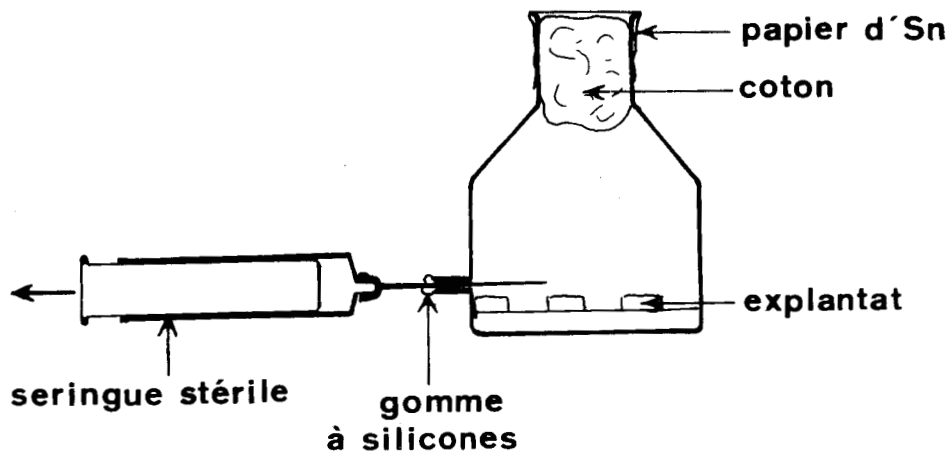


Planche 4 : Modes de capture et de prélèvement des matières organiques volatiles émises par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

CHAPITRE V :

CAPTURE ET IDENTIFICATION DES SUBSTANCES ORGANIQUES VOLATILES

- o 0 o -

5.1 - Capture :

Pour capter les substances organiques émises par les fragments de racine d'Endive et rejetées dans l'atmosphère qui les environne, nous avons utilisé des pièges à acide sulfurique ou pratiqué des prélèvements gazeux.

5.1.1 - Pièges à SO_4H_2 :

L'acide sulfurique concentré fixe la plupart des produits carbonés volatils. En atmosphère confinée, il suffit donc de placer un récipient piège à grande ouverture, dans l'enceinte expérimentale. Pour les essais en atmosphère continue, un flacon barboteur est disposé à la sortie.

5.1.2 - Prélèvements gazeux :

La planche 4 illustre les deux modes de prélèvement réalisés. Le premier consiste à provoquer une dépression à l'extérieur d'une poche à gaz en caoutchouc raccordée à l'enceinte expérimentale de manière à y faire pénétrer une partie de l'atmosphère environnant les fioles à culture. Le second permet de faire le prélèvement directement dans la fiole à l'aide d'une seringue stérile, grâce à un ajutage latéral obturé par de la gomme à silicones.

5.2 - Identification et dosage :

Les substances organiques volatiles fixées par l'acide sulfurique sont dosées globalement par oxydation chromique. Leur identification et répartition quantitative est faite par chromatographie en phase gazeuse à partir de prélèvements gazeux ou de distillats des milieux. Pour évaluer l'importance des émissions volatiles après traitement ou à un moment donné de la culture, nous avons été amené à analyser l'atmosphère environnant les cultures après 30 mn ou 1 heure de confinement. L'analyse chromatographique s'effectue à l'aide du gaz vecteur azote pur (débit 17 ml/m) entraînant des prises d'essai de 1 ml (distillats) ou 5 à 10 ml (prélèvements gazeux) dans une colonne de Porapak Q (100/120 mesh) en acier inoxydable de 2 m X 1/4 de pouce. L'injection s'effectue à 200° et le four est porté à 80°. Le détecteur à ionisation de flamme est alimenté par de l'hydrogène pur et de l'air reconstitué ($N_2 + O_2 / 80 - 20$).



1ère PARTIE

///
//
\\
A R E F A C T I O N

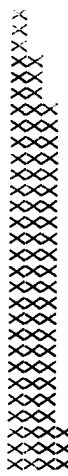
D E L ' A T M O S P H E R E

E N O X Y G E N E

///
//
\\
T

///
//
\\
//
//
\\
E O F O R M A T I O N

D E S B O U R G E O N S



CHAPITRE I :

| |
|---------------------------------|
| <p>ANOXIE ET BOURGEONNEMENT</p> |
|---------------------------------|

- o o o -

1.1 - Résistance à l'asphyxie :

Quelle que soit leur taille, les fragments de racine d'Endive ne se développent pas en l'absence totale d'oxygène, par exemple dans une atmosphère d'azote, d'argon ou d'hélium. Mais les tissus ne meurent pas et se remettent rapidement à respirer dès qu'on les place à nouveau au contact de l'air (tableau 4).

| Conditions d'oxygénation | Age des explantats (en jours de culture) | | | | |
|--------------------------|--|-------|-----------|-----|-----|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Atm. ordinaire | 1 200 | 1 137 | (1 005,5) | - | - |
| Azote..... | - | 520 | 417 | 422 | 688 |

Tableau 4 : Intensité respiratoire (mm³ d'O₂ absorbés/heure/gramme de tissu sec) de fragments de racine d'Endive pendant l'heure qui suit le séjour dans une atmosphère oxygénée ou non.

Nous avons cherché à savoir dans quelle mesure les explantats anoxiés pendant des temps plus ou moins longs conservaient la faculté de bourgeonner. Différents lots ont été privés d'oxygène pendant 3, 6, 8, 10, 14, 21

et 28 jours, puis replacés en atmosphère ordinaire avec le témoin n'ayant jamais séjourné dans l'azote (Tableau 5).

| Durée du séjour dans l'azote (en jours) | Age des explantats (en jours de culture) | | | | | | | | | |
|---|--|-----|----|----|----|----|------|----|----|------|
| | 14 | 18 | 21 | 26 | 30 | 33 | 37 | 42 | 50 | 56 |
| 0 | 87 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 3 | 37 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 6 | 10 | 42 | 72 | 89 | 89 | 95 | - | - | - | 95 |
| 8 | 4,5 | 32 | 59 | 77 | 77 | 82 | - | - | - | 82 |
| 10 | 0 | 5,5 | 39 | 67 | 67 | 82 | - | - | - | 82 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 41 | 50 | 54,5 | - | - | 54,5 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau 5 : Pourcentages de fragments de racine d'Endive capables de produire des bourgeons après avoir été privés plus ou moins longtemps d'oxygène.

Le bourgeonnement a lieu d'autant plus tardivement que le séjour anoxiant est plus long. Le nombre des explantats produisant des bourgeons diminue lui aussi en fonction de la durée du traitement. Lorsque ce dernier est supérieur à 2 semaines, aucun explantat ne bourgeonne dans la limite normale des essais (2 mois).

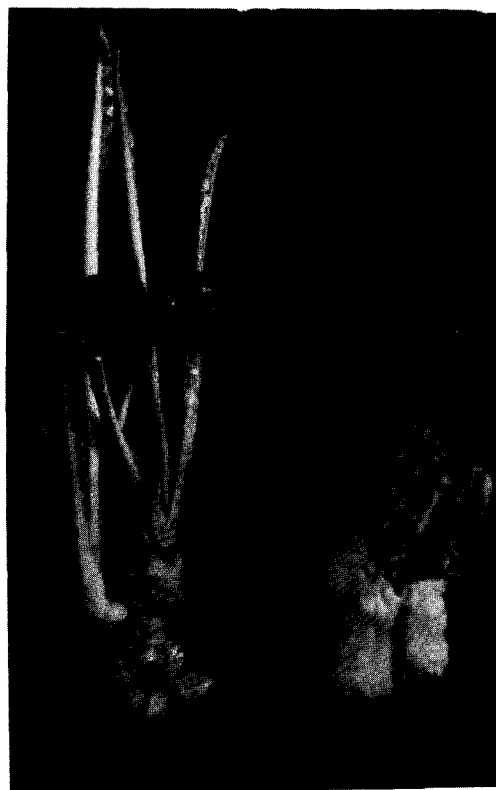
Les tissus de racine d'Endive manifestent une remarquable résistance à l'asphyxie qui leur permet très souvent de poursuivre leur développement "in vitro" après avoir été privé d'oxygène. Toutefois, un séjour

anaérobie trop prolongé peut les rendre incapables de bourgeonner. Lorsque le bourgeonnement a lieu, une phase de récupération fait suite au traitement et entraîne par conséquent un retard plus ou moins accentué dans l'apparition des ébauches gemmaires. Dans des mélanges faiblement oxygénés, mais non renouvelés : azote industriel (contenant 0,5 à 1,5 % d'oxygène) ou encore azote ou hélium additionnés d'un peu d'air ou oxygène, les bourgeons apparaissent aussi, mais très tardivement. L'aération périodique des tissus, ou mieux encore, le renouvellement de l'atmosphère faiblement oxygénée environnant les cultures diminuent le retard de néoformation des bourgeons. Ainsi le bourgeonnement n'est pratiquement pas retardé dans un courant gazeux continu, contenant seulement 2 % d'oxygène.

1.2 - Manifestations du bourgeonnement :

Les explantats témoins cultivés pendant un mois en atmosphère ordinaire produisent en moyenne 2 à 3 bourgeons dont les feuilles de certains d'entre-eux atteignent rapidement plusieurs centimètres de longueur. Lorsque les tissus ont séjourné dans l'azote industriel, les néoformations gemmaires sont plus nombreuses mais ne se développent que très lentement même quand on les replace en atmosphère ordinaire (Photo D).

Explantat Témoin ayant séjourné 1 mois en atmosphère ordinaire.



Explantat ayant séjourné 1 mois dans l'Azote industriel puis 1 mois en atmosphère ordinaire.

Photo D

Mais l'anoxie peut aussi stimuler le bourgeonnement sans entraîner nécessairement un ralentissement de la croissance des feuilles. Ainsi, des explantats privés d'oxygène pendant quelques jours seulement (Tableau 6) bourgeonnent à peu près en même temps que les témoins non traités. L'anaérobiose entraîne la formation d'un nombre de bourgeons plus important que dans les conditions habituelles d'oxygénation des cultures. Certes, beaucoup de néoformations surnuméraires demeurent à l'état d'ébauches, mais certaines d'entre elles se développent aussi comme chez les témoins et leur poids de feuilles atteint même une valeur légèrement supérieure à celle observée dans les conditions normales (Tableau 6). En culture "in vitro", l'asphyxie est donc favorable à la néoformation des bourgeons dans la mesure où les tissus finissent par disposer d'une quantité d'oxygène suffisante à la mise en oeuvre des phénomènes d'organogenèse.

| 1 MOIS DE CULTURE | | AIR (1er - 30e jour) | AZOTE (1er - 4e jour) |
|---|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| Nombre moyen de BOURGEONS par explantat | B > 5 mm..... | 1,18 | 1,82 |
| | b < 5 mm..... | 0,35 | 0,84 |
| | B + b | <u>1,53</u> | <u>2,66</u> |
| Poids moyen des feuilles (mg) | Par explantat.. | 66,2 | 87,8 |
| | Par B | 47,6 | 48,2 |

Tableau 6 : Influence d'un traitement anaérobie du 1er au 4e jour de culture sur le bourgeonnement des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

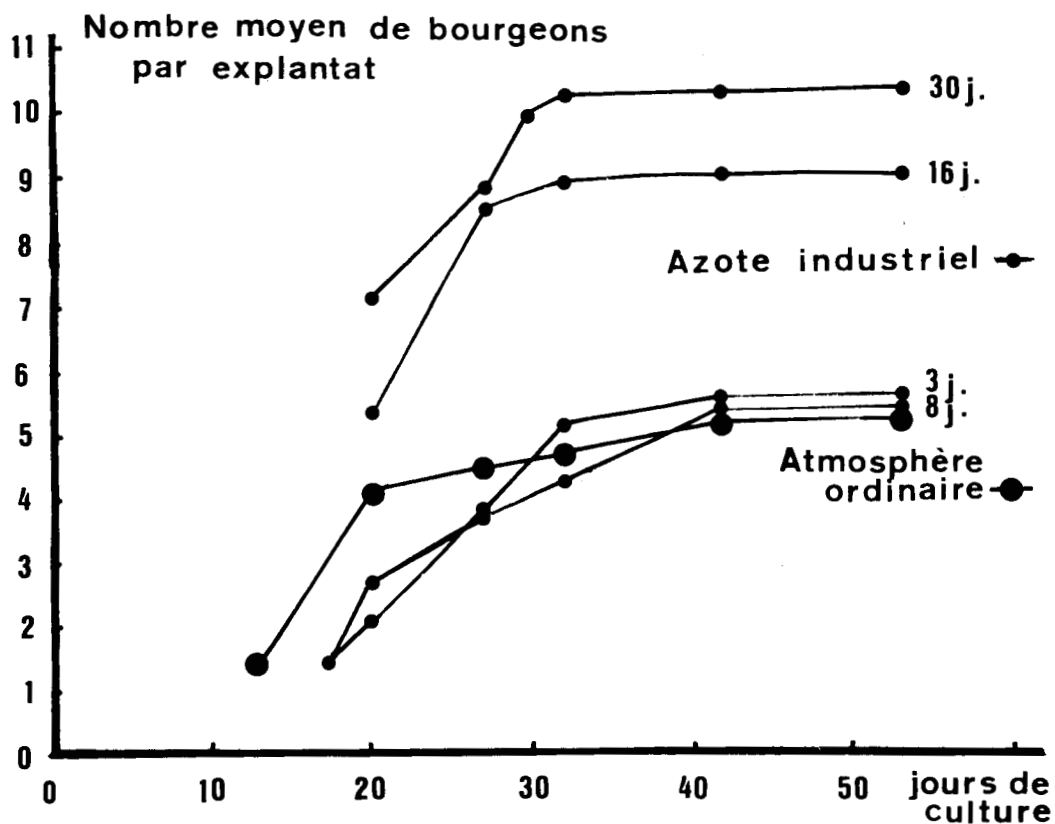


Figure 6 : Influence de la durée du traitement sur des fragments de racine d'Endive soumis à l'anoxie (nombre moyen de bourgeons).

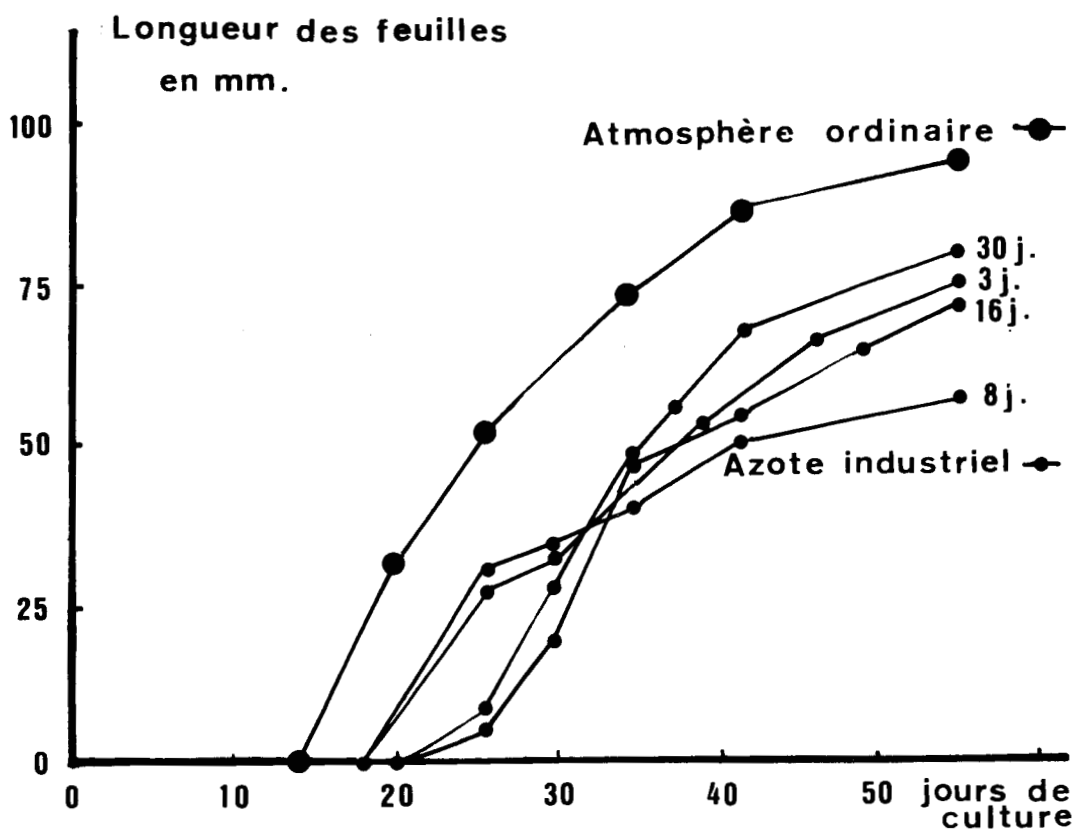


Figure 7 : Influence de la durée du traitement sur des fragments de racine d'Endive soumis à l'anoxie (longueur des feuilles).



CHAPITRE II :

ESSAIS PRELIMINAIRES

- o 0 o -

Au cours d'essais préliminaires, nous avons étudié quelle était l'influence d'une atmosphère faiblement oxygénée constituée par de l'Azote industriel (contenant 0,5 à 2 % d'oxygène). Le conditionnement des cultures était effectué par la méthode du vide (Matériel et Techniques : 2.3.1 page 23).

2.1 - Durée du traitement :

Dans une première série d'essais, différents lots de fragments de racine d'Endive ont été traités immédiatement après leur mise en culture. Ils ont séjourné respectivement 3, 8, 16 et 30 jours dans une enceinte expérimentale hermétiquement close dont le contenu gazeux était renouvelé chaque semaine à l'occasion d'un contrôle ou du dénombrement des néoformations. Les résultats sont comparés à ceux d'un témoin cultivé en atmosphère ordinaire. Sur tous les explantats anoxiés les bourgeons se développent tardivement (Figure 6). Ils apparaissent le 14e jour dans le lot témoin, le 18e jour dans les lots traités 3 et 8 jours, et le 20e jour seulement dans les lots ayant séjourné plus longtemps dans une atmosphère très pauvre en oxygène. Si l'anoxie

dure moins d'une semaine le nombre des bourgeons néoformés est comparable à celui observé dans les conditions ordinaires. Par contre, un traitement plus long accroît sensiblement la production des bourgeons. On constate aussi que les feuilles se développent plus lentement lorsque les explantats ont été privés d'oxygène (Figure 7). Mais cette action n'est pas fonction de la durée du traitement.

Les fragments de racine utilisés mesuraient initialement 1 cm x 1 cm X 2 cm. Ils produisaient aussi un certain nombre de racines néoformées. Ces formations sont d'autant plus rares que le traitement a été plus long (Figure 8).

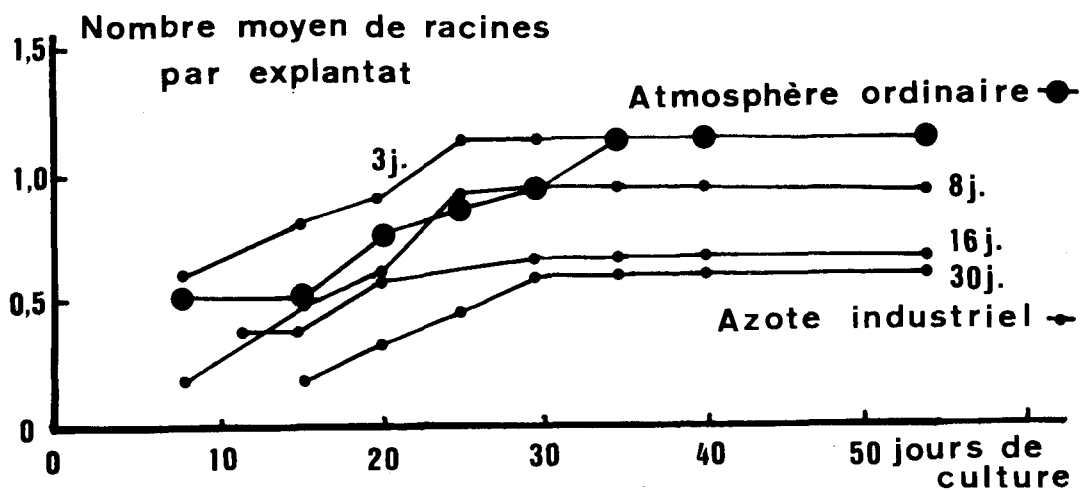


Figure 8 : Influence de la durée du traitement sur des fragments de racine d'Endive soumis à l'anoxie (nombre moyen de racines).

L'anoxie provoque aussi un certain retard dans l'apparition des ébauches racinaires.

En résumé, le séjour dans une atmosphère confinée appauvrie en oxygène retarde l'organogenèse ainsi que la croissance des feuilles. Ces phénomènes traduisent une réduction de l'activité physiologique des explantats qui n'est

pas directement proportionnelle à la durée du traitement. Par contre, l'augmentation du nombre des bourgeons et la réduction de la rhizogenèse provoquées par l'anoxie sont fonction de la durée du séjour anoxiant.

2.2 - Traitement après l'apparition des bourgeons :

Dans les expériences précédentes, les explantats étaient privés d'oxygène dès le début de la culture, c'est-à-dire avant qu'ils aient produit des bourgeons. Nous nous sommes demandé si l'anoxie entraînait aussi des modifications du comportement des tissus en présence de feuilles déjà néoformées et commençant à se développer. Des fragments de racine d'Endive âgés de 2 semaines et ayant produit leurs premières ébauches gemmaires ont donc été placés pendant 28 jours dans une atmosphère d'azote industriel (contenant 0,5 à 2,5 % d'O₂). Après 40 jours de culture, c'est-à-dire à la fin du traitement, on constate (Tableau 7) que les feuilles atteignent pratiquement la même taille en atmosphère faiblement oxygénée que dans l'air ordinaire. Mais les explantats traités ont produit davantage de bourgeons que les témoins. La raréfaction en oxygène peut donc encore stimuler le bourgeonnement de tissus ayant déjà commencé à différencier des bourgeons. Mais elle est alors pratiquement sans effet sur la croissance des feuilles.

| | | Atmosphère ordinaire | Azote industriel (12e à 40e jour) |
|--|----------|----------------------|--------------------------------------|
| Nombre moyen de BOURGEONS par explantat | 12e jour | 4,60 | - |
| | 40e jour | 6,42 | 8,85 |
| Longueur moyenne des feuilles > 5 mm le 40e jour.... | | 87 mm | 85 mm |

Tableau 7 : Néoformation des bourgeons et développement des feuilles en atmosphère ordinaire et après traitement anoxiant intervenant tardivement, lorsque les premiers bourgeons sont déjà apparus.

2.3 - Influence du séjour en enceinte limitée :

Les échanges gazeux des explantats s'effectuant dans un espace restreint, ces conditions pouvaient influencer le bourgeonnement indépendamment de l'oxygénation de l'atmosphère. Nous avons donc refait des essais en renouvelant chaque semaine l'atmosphère des enceintes expérimentales. Celles-ci contenaient soit de l'air, soit de l'azote industriel. Les résultats ont été comparés à ceux d'une série de lots maintenus constamment en enceinte close (atmosphère non renouvelée) ou en atmosphère ordinaire non confinée (Figure 9). Après 26 jours de traitement, continu ou discontinu, les explantats manquant d'oxygène au départ produisent finalement davantage de bourgeons que ceux ayant séjourné dans un air renouvelé ou non. C'est que l'anoxie agit rapidement sur les tissus pendant les premières semaines de culture.

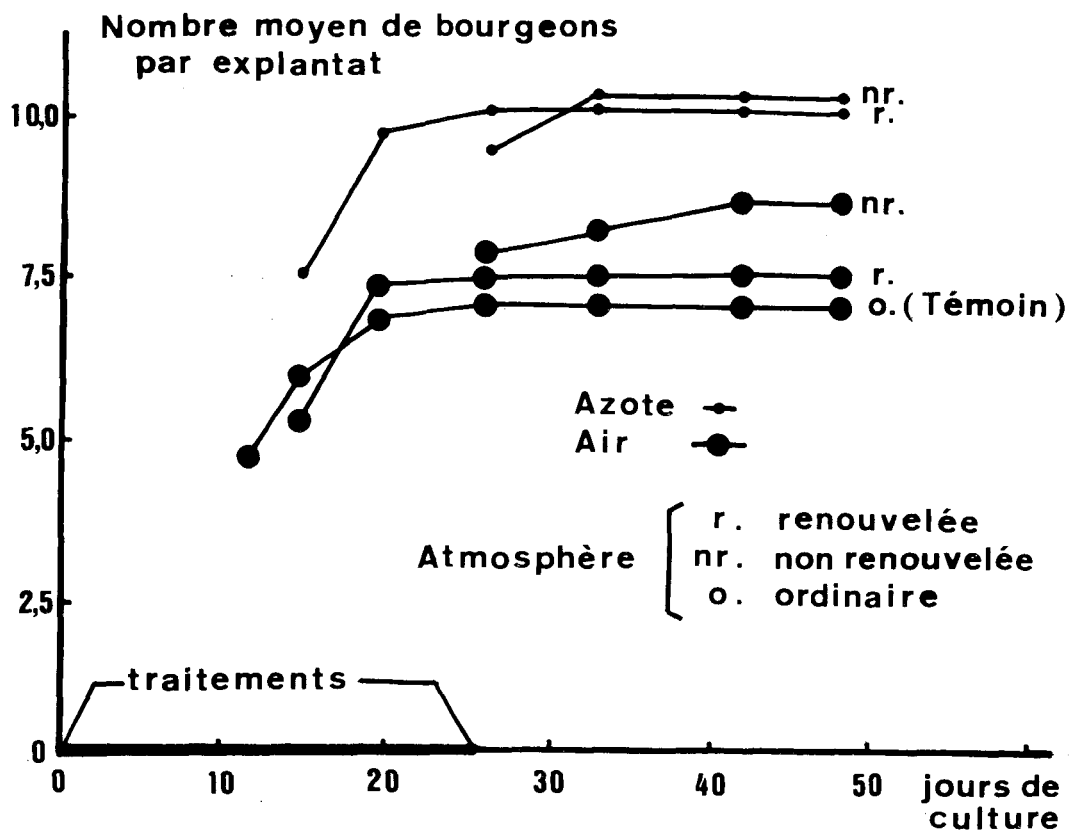


Figure 9 : Influence respective du séjour en enceinte limitée et de l'anoxie sur la production de bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

Renouveler l'atmosphère d'azote industriel ne modifie pas le nombre des bourgeons, mais permet simplement leur élaboration sans grand retard par rapport aux conditions ordinaires. Cette opération assure aussi le développement normal des feuilles (Figure 10).

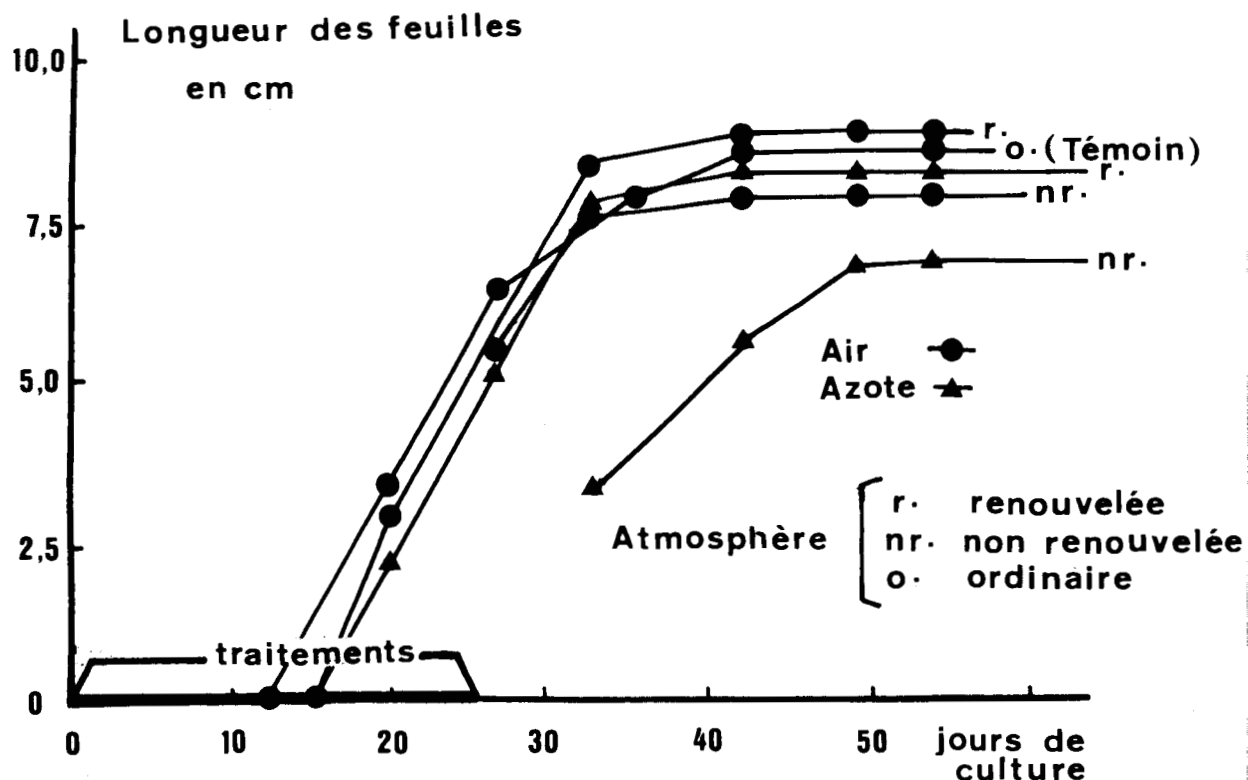


Figure 10 : Influence du séjour en enceinte limitée sur la croissance des feuilles par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

Mais après un séjour dans l'air confiné, on observe aussi une certaine augmentation du nombre des bourgeons. Ils apparaissent tardivement, mais les feuilles se développent ensuite à peu près normalement. L'anoxie ne peut expliquer ces résultats ; en effet, pendant la durée du traitement le taux d'oxygène de l'enceinte expérimentale ne s'abaisse que de 21 à 14 % environ, en raison de l'activité respiratoire des explantats. Il faut noter que le

renouvellement de l'air fournit des résultats voisins de ceux observés en conditions ordinaires, hors des enceintes expérimentales. On peut donc supposer que la culture en atmosphère confinée, même normalement oxygénée, favorise l'accumulation d'éléments favorables à la néoformation des bourgeons.

2.4 - Conclusions :

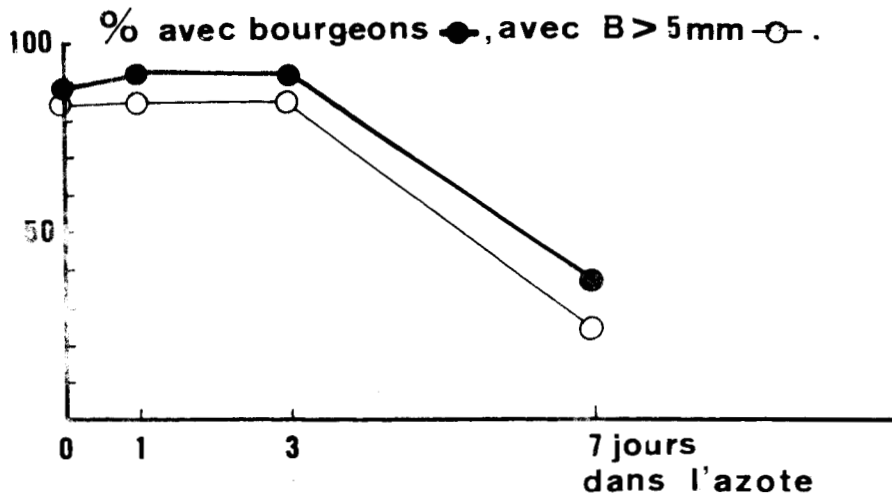
Ces essais préliminaires permettent de préciser les objectifs et les limites d'une étude quantitative plus rigoureuse. L'anoxie influence à la fois la rhizogenèse et le bourgeonnement. Ces 2 phénomènes entrent en compétition lorsqu'ils coexistent. C'est pourquoi, par la suite, nous utiliserons de préférence des fragments de racine d'Endive de petite taille, qui, rappelons-le ne produisent généralement pas de racines. Nous nous limiterons ainsi aux facteurs qui affectent plus particulièrement la néoformation des bourgeons. Celle-ci a lieu à la faveur d'une réoxygénation des tissus après un séjour anaérobie, mais elle peut aussi se faire en présence d'une faible quantité d'oxygène. Nous pourrions donc envisager des traitements strictement anaérobies et d'autres s'effectuant dans des atmosphères dont la teneur en oxygène est contrôlée. De toute manière, les gaz industriels utilisés au cours des essais préliminaires seront remplacés par des gaz purs, ce qui facilitera le contrôle des conditions expérimentales.

Les exigences des tissus de racine d'Endive sont différentes en ce qui concerne d'une part la néoformation des bourgeons et d'autre part la croissance des feuilles. Ces dernières manifestent une activité photosynthétique susceptible de modifier les données expérimentales. Aussi, pour éviter les interférences, nos traitements interviendront alors que les bourgeons ne sont pas encore développés. D'ailleurs, nous avons vu précédemment que l'anoxie peut conditionner rapidement la néoformation gemmaire pendant les 2 premières semaines de

culture. Le maintien prolongé dans une atmosphère confinée fait intervenir des facteurs volatils difficilement contrôlables. Ces éléments agissent indépendamment des conditions d'oxygénation, mais produisent des effets qui risquent d'être imputés à l'anoxie. On peut penser que de petits explantats modifieront moins vite la composition de l'atmosphère des enceintes expérimentales que des fragments de racine de plus grande taille. Nous effectuerons donc certains traitements en atmosphère confinée. Mais nous en limiterons l'application à l'anaérobiose stricte et pour des durées n'excédant pas une semaine. Quant à l'influence de mélanges gazeux faiblement oxygénés, elle sera étudiée en circuit ouvert, l'atmosphère des enceintes expérimentales étant constamment renouvelée au cours du traitement.

- o o o -

① EXPLANTATS



② BOURGEONS

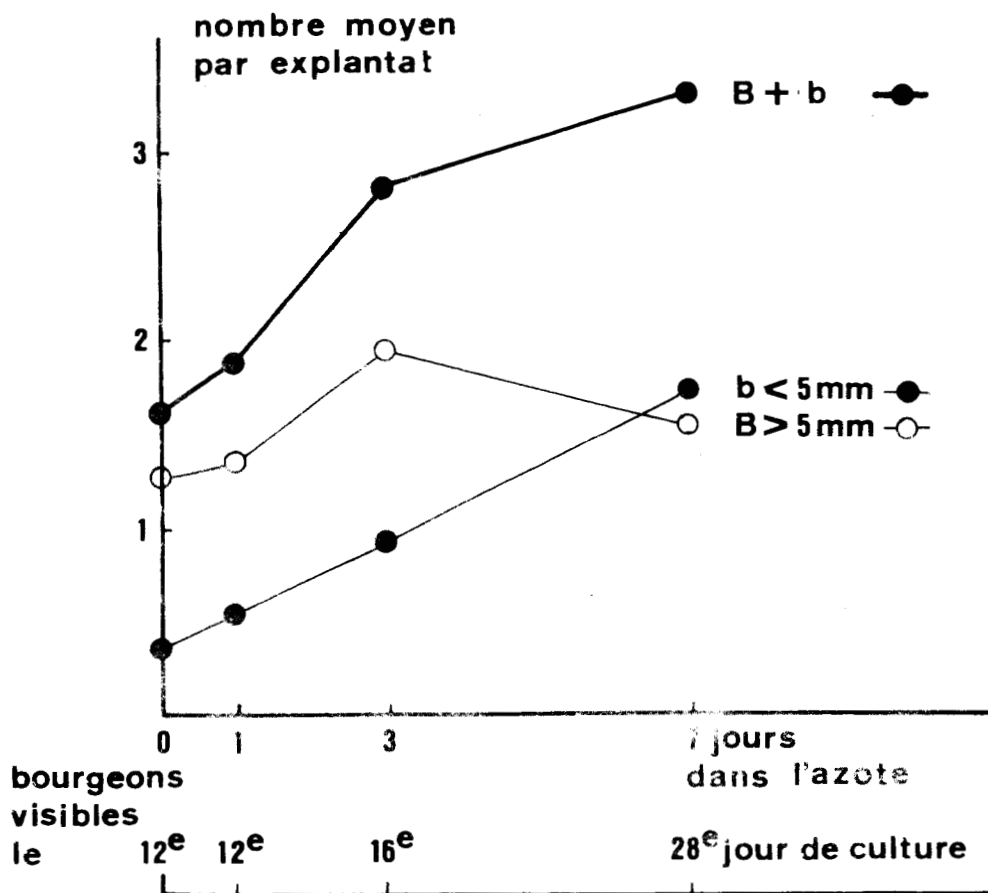


Figure 11 : Influence de la durée du traitement en anaérobiose sur la néoformation des bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

- a) aptitude des explantats à bourgeonner ;
- b) intensité du bourgeonnement.

CHAPITRE III :

L'ANAEROBIOSE STRICTE

- o 0 o -

Les essais qui suivent ont été effectués avec de l'azote dépourvu d'oxygène. La mise en route du traitement comporte un remplissage des enceintes expérimentales précédé d'un vide et suivi d'un balayage par l'azote. Les tissus sont donc placés rapidement dans des conditions d'anaérobiose stricte dès le début du traitement.

3.1 - Durée du traitement :

Différents lots de fragments de racine d'Endive ont été soumis à l'azote pendant 1, 3 et 7 jours à partir de la mise en culture. Les résultats (Figure 11) sont comparés à ceux d'un lot témoin cultivé en atmosphère ordinaire.

Trois jours de traitement retardent l'apparition des premiers bourgeons. Ce retard s'accroît considérablement après une semaine d'anaérobiose. Certes, des coupes histologiques ont montré qu'aucune ébauche gemmaire ne se formait pendant le traitement. Mais les délais d'apparition des bourgeons sont nettement plus longs que les séjours anaérobies qui les ont provoqués. La privation d'oxygène ne se contente pas seulement de prolonger la dormance des tissus, mais elle fait apparaître aussi des éléments qui empêchent la néoformation des bourgeons. Ces facteurs disparaissent progressivement lorsque les explantats

sont replacés en atmosphère ordinaire. Le bourgeonnement est ainsi différé jusqu'à ce que les conditions physiologiques permettent la reprise de l'activité des zones méristématiques génératrices de bourgeons. La phase de récupération des tissus dépendrait de la quantité de substances toxiques accumulées pendant le traitement anaérobie et elle est fonction de la durée de celui-ci. On constate par ailleurs (Figure 11 b) que le nombre des bourgeons néoformés est d'autant plus élevé que le traitement a été plus long. L'anaérobiose stimule donc le bourgeonnement. A cet égard, ses effets se traduisent surtout par la néoformation d'un plus grand nombre de bourgeons demeurant à l'état d'ébauches. Les organes élaborés en premier empêchent naturellement les suivants d'atteindre des tailles supérieures à 5 mm. Il s'agit là d'un phénomène classique de dominance. Néanmoins, plus le traitement a été long, moins on compte de bourgeons dont la taille des feuilles est supérieure à 5 mm. L'anaérobiose prolongée s'avère donc préjudiciable à la croissance des feuilles. Apparemment, le séjour prolongé en l'absence d'oxygène empêche aussi un certain nombre d'explantats de bourgeonner.

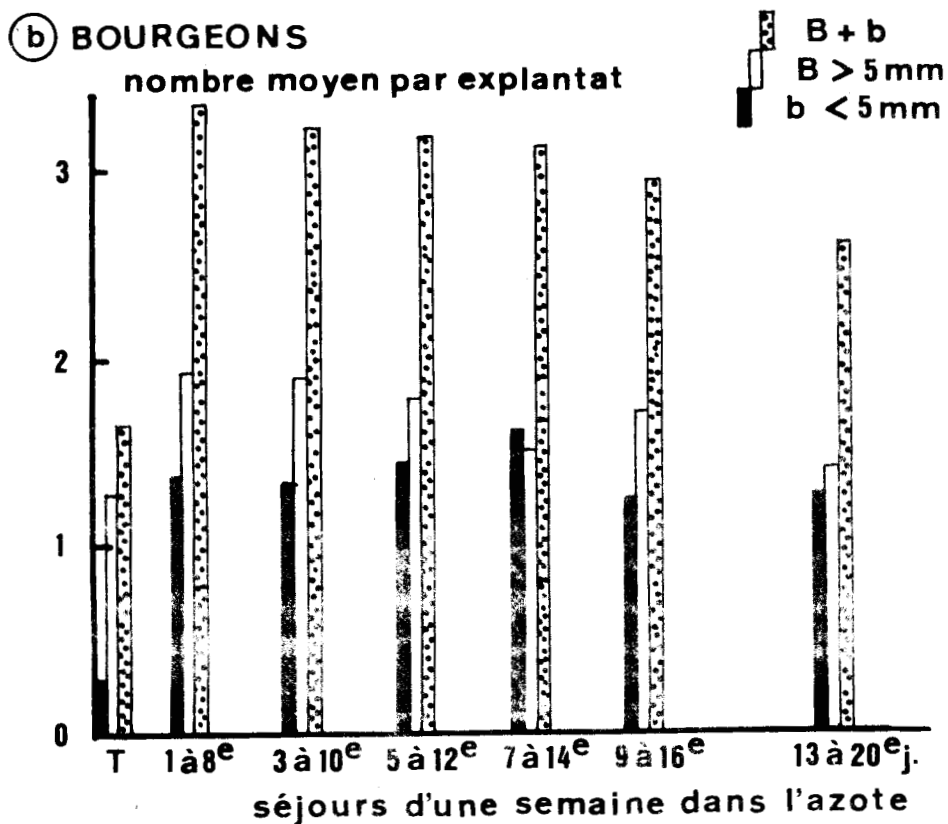
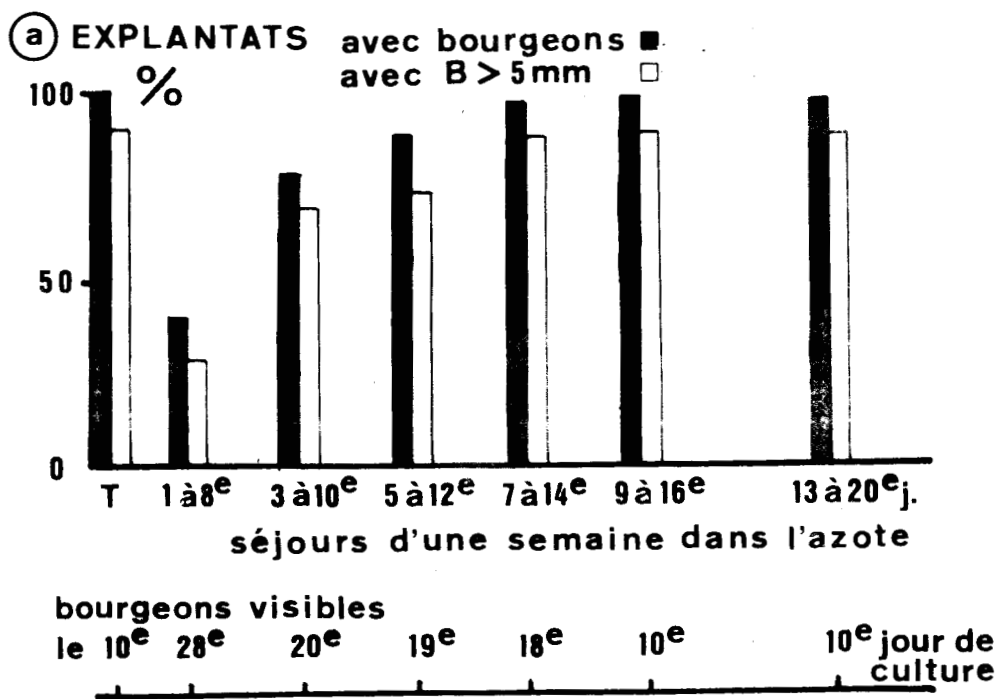
3.2 - Période d'application du traitement :

Nous nous sommes demandé si les tissus de racine d'Endive manifestaient la même sensibilité aux traitements anaérobies quel que soit l'âge des explantats.

3.2.1 - Séjours de longue durée :

Nous avons placé différents lots de fragments de racine d'Endive pendant une semaine dans l'azote, mais en faisant débiter le traitement :

- soit immédiatement après la mise en culture,
- soit 2, 4, 6, 8 ou 12 jours plus tard.



SIS
LILLE

Figure 12 : Influence de la période d'application d'un traitement de 7 jours d'anaérobiose sur le bourgeonnement de fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

- a) aptitude des explantats à bourgeonner,
b) intensité du bourgeonnement.

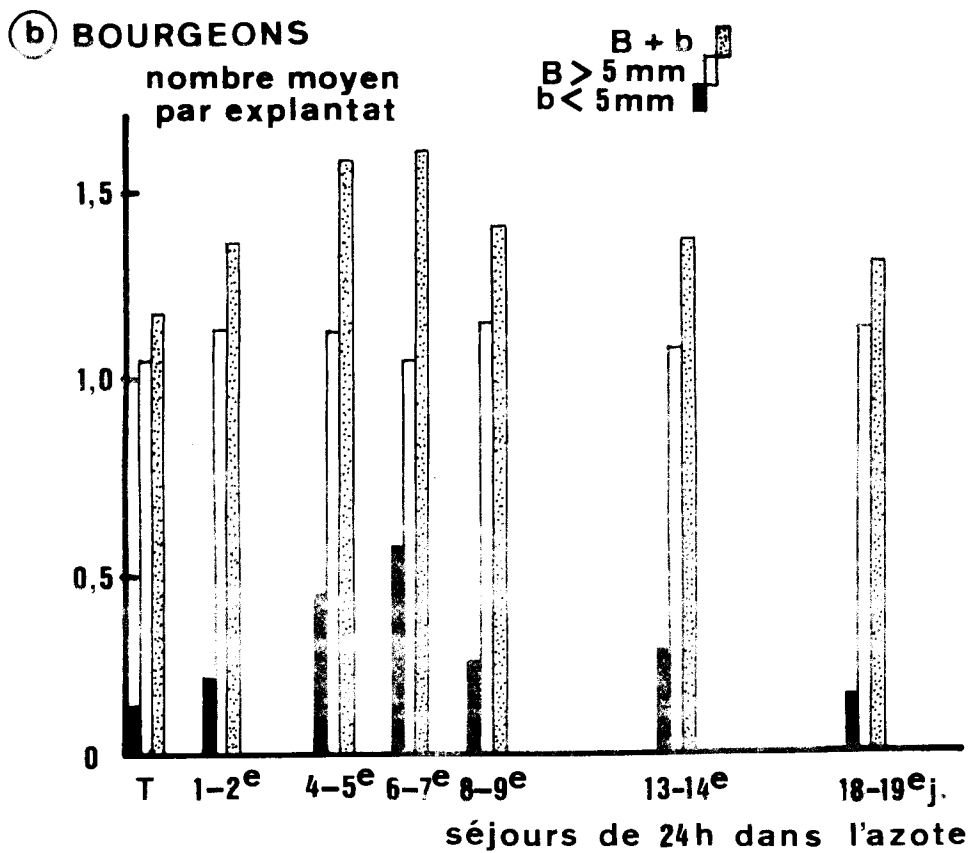
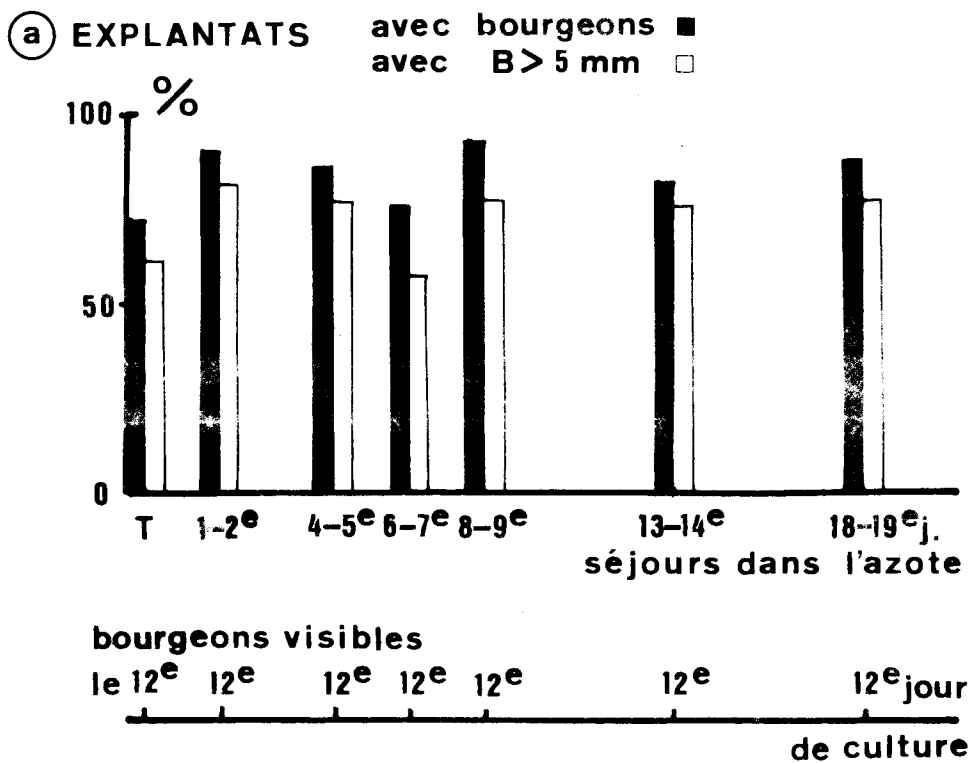


Figure 13 : Influence de la période d'application d'un traitement de 24 Heures d'anaérobiose sur le bourgeonnement de fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

- a) aptitude à bourgeonner,
- b) intensité du bourgeonnement.

Les bourgeons apparaissent sans aucun retard lorsque le traitement a lieu après la première semaine de culture, c'est-à-dire alors que les premières ébauches gemmaires sont déjà formées (Figure 12). La privation d'oxygène affecte donc peu le développement des feuilles. Par contre, l'anaérobiose retarde d'autant plus l'initiation des bourgeons qu'elle intervient précocement. Tous les traitements augmentent sensiblement le nombre des bourgeons (Figure 12 b). Mais l'efficacité du séjour dans l'azote diminue progressivement à mesure que son application est plus tardive. Les stimulations les plus fortes sont observées sur les explantats ayant été traités dès la première semaine de culture. Toutefois, plus le traitement début tôt, plus les explantats risquent de perdre la faculté de bourgeonner.

3.2.2 - Séjours de courte durée :

24 heures d'anaérobiose au début de la culture "in vitro" n'entraînent aucun retard dans la néoformation des bourgeons et n'empêchent aucun explantat de bourgeonner. Mais ce traitement n'augmente pas beaucoup le nombre des ébauches gemmaires. Nous nous sommes demandé quel serait le comportement des tissus soumis à ce même traitement mais à des moments différents de la culture "in vitro".

Des fragments de racine d'Endive ont donc été placés 24 heures dans l'azote, soit dès la mise en culture, soit 3, 5, 7, 12 ou 17 jours plus tard (Figure 13). Les bourgeons apparaissent à la même date dans tous les lots. Les tissus se débarrassent donc facilement des éléments susceptibles de retarder l'initiation des ébauches gemmaires. En général, on compte davantage d'explantats porteurs de bourgeons dans les lots soumis à l'anaérobiose que dans le lot témoin cultivé constamment en atmosphère ordinaire (Figure 13 a). Les

conditions habituelles de culture ne permettraient donc pas à certains explantats de bourgeonner.

D'autre part, pendant la première semaine de culture, la privation d'oxygène provoque une augmentation du nombre des bourgeons. Celle-ci est nettement plus intense aux environs du 6e jour de culture, c'est-à-dire au moment de la néoformation des ébauches gemmaires. Ensuite, l'effet stimulant est moins marqué (Figure 13 b).

Les résultats obtenus avec le lot traité le 6e jour soulignent que les facteurs qui accroissent le nombre des ébauches ne sont pas forcément ceux qui permettent à davantage d'explantats de bourgeonner.

- o 0 o -

CHAPITRE IV :

LE RENOUVELLEMENT CONTINU DE L'ATMOSPHERE

- o 0 o -

Quand l'atmosphère des enceintes expérimentales reste confinée, sa composition varie progressivement en raison de l'activité des cultures. Ces variations sont difficilement contrôlables car elles dépendent de l'état physiologique des explantats au début du traitement. Aussi, pour uniformiser les conditions expérimentales, nous avons renouvelé constamment l'atmosphère pendant toute la durée du traitement.

4.1 - La faible tension d'oxygène :

Si l'absence totale d'oxygène ne permet pas le développement des fragments de racine d'Endive, une faible aération des tissus suffit à assurer la réformation des bourgeons (Ch. 2.1 page 45). Nous avons donc réalisé des conditions d'oxygénation croissantes en intercalant des membranes diffusantes entre les différentes enceintes expérimentales. L'ensemble est parcouru par un courant d'azote à faible débit constant (20 l/h). Ce dispositif expérimental fonctionne sans arrêt pendant toute la durée des essais et maintient le taux d'oxygène constant dans les enceintes expérimentales. Le lot 21 % est placé dans un courant d'air de même débit que celui de l'azote servant au

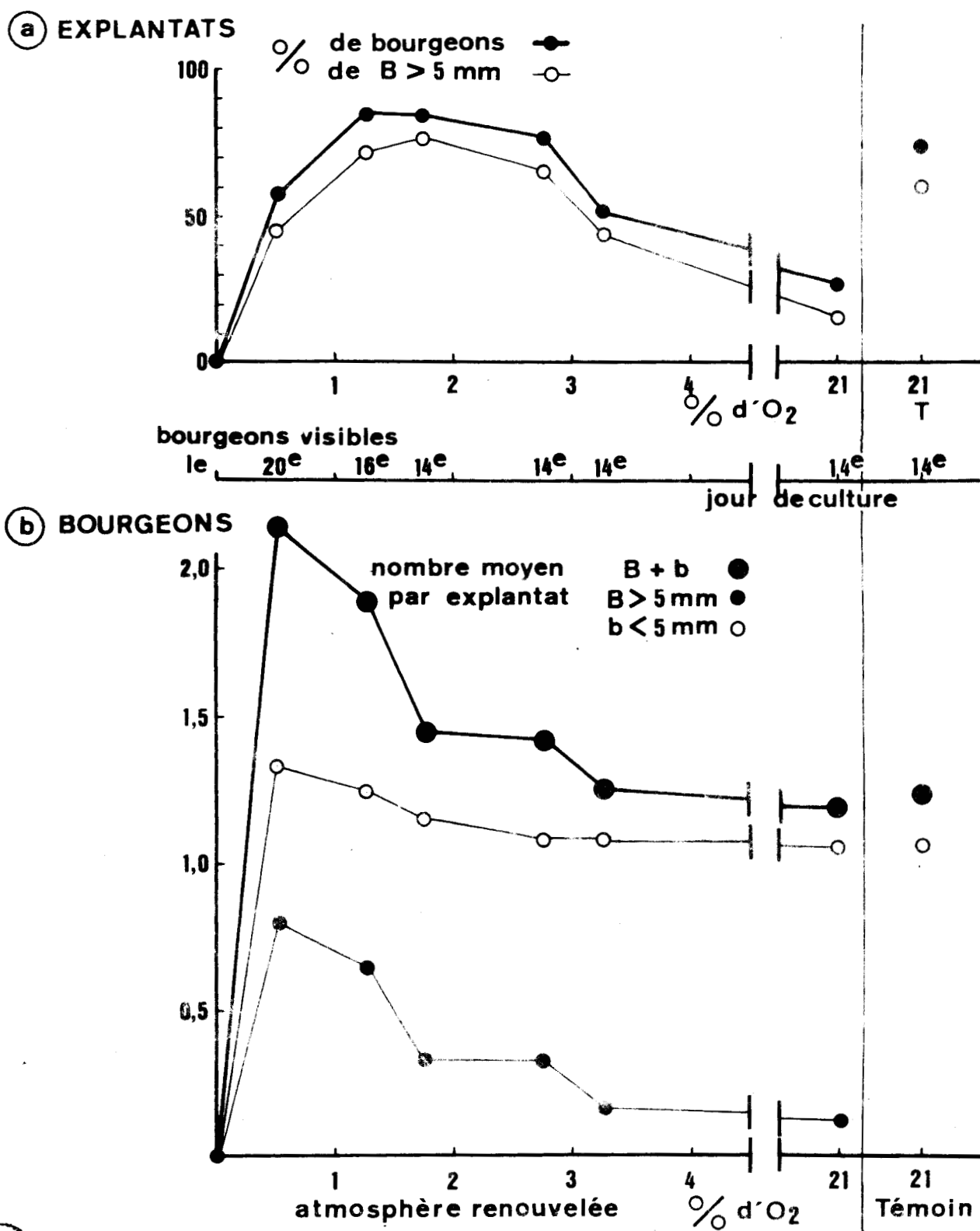


Figure 14 : Influence du renouvellement continu d'atmosphères diversement oxygénées sur la production de bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (1 mois de culture).

- a) aptitude à bourgeonner
- b) intensité du bourgeonnement.



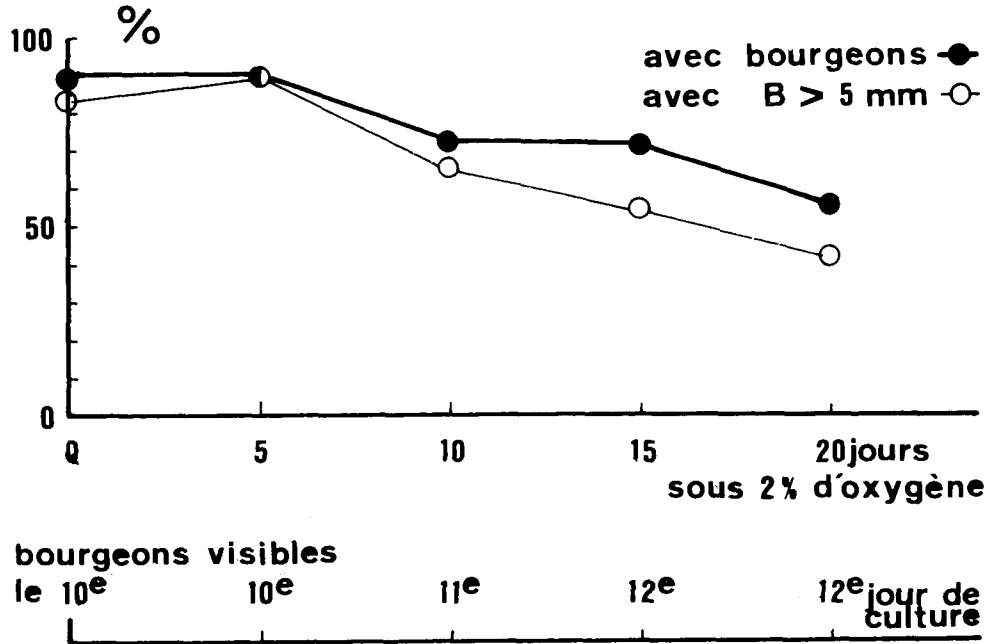
traitement. Un autre lot, servant de témoin, est cultivé en atmosphère ordinaire non agitée.

A un taux inférieur à 1 % environ, la raréfaction en oxygène empêche un certain nombre de fragments de racines de bourgeonner (Figure 14) et retarde l'organogénèse lorsque celle-ci a lieu. Puis, entre 1 % et 3 % d'oxygène environ on n'observe plus de retard considérable dans l'apparition des bourgeons et le nombre d'explantats organogènes devient légèrement supérieur ou au moins égal à celui du lot témoin cultivé hors des enceintes expérimentales. Mais ensuite, à partir de 3 % environ, plus l'oxygénation est forte, plus le renouvellement de l'atmosphère réduit le nombre des explantats capables de bourgeonner. Tout se passe alors comme si, en fonction de la teneur en oxygène, le renouvellement entraînait la disparition d'une quantité de plus en plus importante de facteurs indispensables à la néoformation des bourgeons. Notons que contrairement à la trop grande raréfaction en oxygène, la réoxygénation permanente des tissus ne retarde pas la néoformation des bourgeons quand celle-ci peut avoir lieu. Le nombre moyen d'ébauches gemmaires par explantat est d'autant plus élevé que la tension d'oxygène est moins forte (Figure 15). Le renouvellement de l'atmosphère n'influence pas le phénomène. A des taux supérieurs à 2 %, le traitement cesse d'être efficace. L'augmentation du nombre des bourgeons semble donc imputable au métabolisme anaérobie et la présence de petites quantités d'oxygène ne s'avère nécessaire que pour atténuer certains effets temporairement toxiques qui retardent l'initiation des ébauches.

4.2 - Durée du traitement :

Au cours des essais précédents, les explantats produisaient davantage de bourgeons lorsque la tension d'oxygène de l'atmosphère ne dé-

① EXPLANTATS



② BOURGEONS

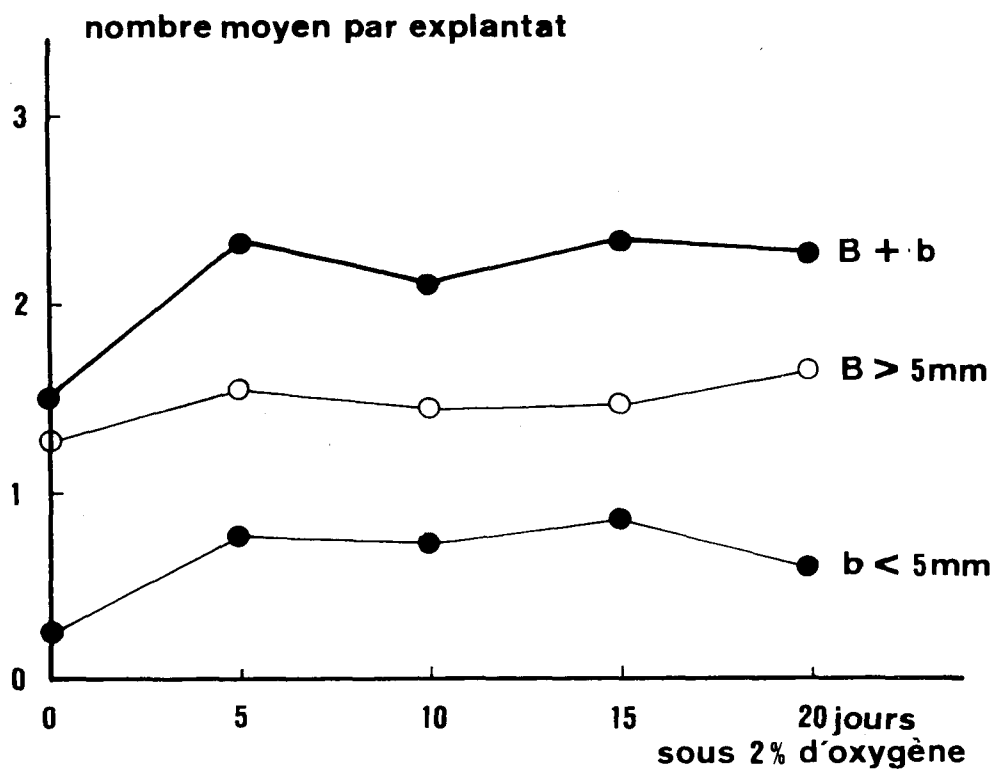


Figure 15 : Influence de la durée du traitement sous faible tension d'oxygène sur la néoformation des bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro", (1 mois de culture).
 a) aptitude des explantats à bourgeonner,
 b) intensité du bourgeonnement.

passait guère 2 % pendant toute la durée de la culture. On pouvait se demander si les tissus réagiraient aussi à des traitements moins longs. Immédiatement après l'ensemencement, nous avons donc placé des fragments de racine d'Endive pendant 5, 10, 15 et 20 jours dans un courant continu oxygène-azote (2-98 %). A l'issue du traitement, les colonies tissulaires sont remises en atmosphère ordinaire avec les témoins.

Lorsque les tissus ont séjourné 5 jours en présence de 2 % d'oxygène (Figure 15 a), on compte autant d'explantats capables de bourgeonner qu'en l'absence de traitement. Mais l'aptitude des tissus à produire des bourgeons risque ensuite de diminuer à mesure que le séjour en anaérobiose partielle se prolonge. C'est également vrai lorsque la durée du traitement dépasse une semaine et qu'il y a un léger retard (1 ou 2 jours) dans la néoformation des ébauches gemmaires.

Par ailleurs, le nombre moyen de bourgeons par explantat organogène est comparable dans tous les lots et par conséquent indépendant de la durée du séjour sous faible tension d'oxygène (Figure 15 b). Les facteurs déterminant l'augmentation du nombre des bourgeons apparaissent donc rapidement au début du traitement, c'est-à-dire pendant la première semaine de culture.

4.3 - Période d'application du traitement :

Mais les résultats précédents, obtenus avec 2 % d'oxygène, dépendent peut-être aussi du moment d'application du traitement au cours de la première semaine de culture.

Nous avons donc fait débiter le séjour dans un courant gazeux contenant 2 % d'oxygène, soit immédiatement après l'ensemencement, soit après 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 jours de culture. Dans tous les cas, le traitement a duré 3 semaines.

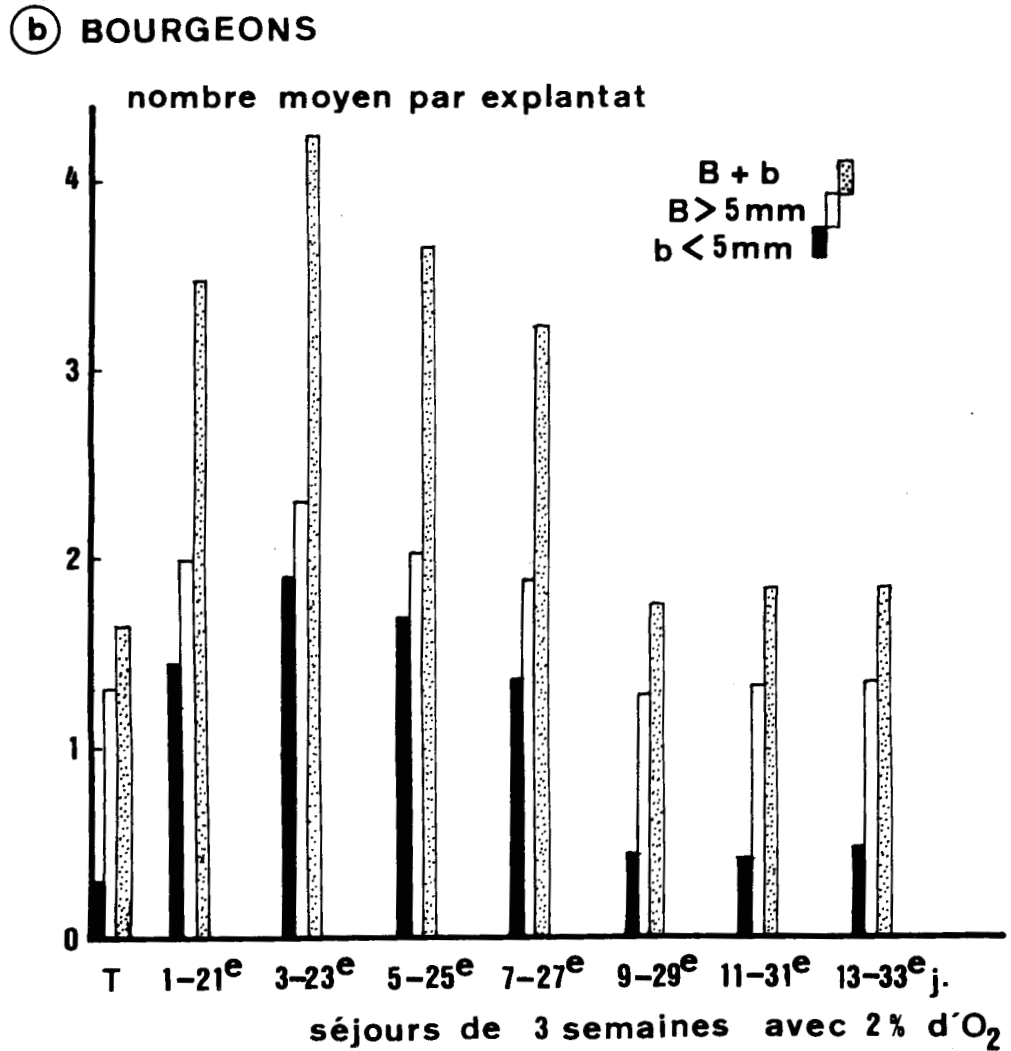
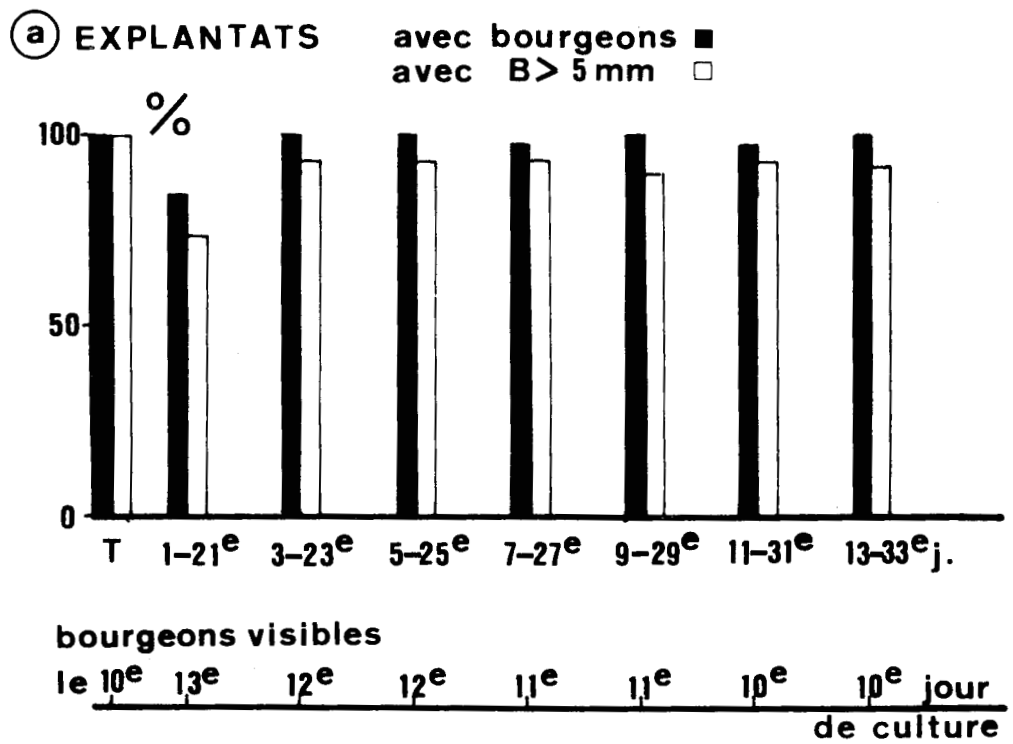


Figure 16 : Influence de la période d'application du traitement sur la néoformation des bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro", (5 semaines de culture).

- a) aptitude à bourgeonner
- b) intensité du bourgeonnement

Malgré sa longue durée, le séjour anoxiant ne réduit le nombre d'explantats aptes à bourgeonner que dans le lot traité avant la cicatrisation (Figure 16 a). Ces résultats précisent ceux que nous avons observés précédemment. Dans la mesure où les exigences en oxygène des tissus fraîchement débités sont assurés au moins en partie, la néoformation des bourgeons peut s'effectuer sans grand retard en présence de 2 % d'oxygène seulement. Les pourcentages d'explantats ayant donné des feuilles de taille supérieure à 5 mm confirme que ces conditions d'oxygénation n'handicapent généralement pas non plus la croissance des feuilles.

Lorsque le traitement débute pendant la première semaine de culture, le nombre moyen de bourgeons par explantat est nettement supérieur à celui des témoins cultivés en atmosphère ordinaire (Figure 16 b). Par contre, s'il intervient après la période d'élaboration des premières ébauches, le séjour anoxiant se révèle beaucoup moins efficace et ne fait apparaître que peu de bourgeons supplémentaires dont les feuilles ne se développent d'ailleurs généralement pas. Comme nous l'avions déjà observé précédemment à propos de traitement par l'azote pur, l'anoxie stimule d'autant plus efficacement la néoformation des bourgeons que les tissus y sont soumis pendant la phase de prolifération et d'initiation des ébauches.

4.4 - Comparaison de l'effet stimulant de traitements de courte durée :

Pratiquement, lorsque la tension d'oxygène est voisine de 2 %, les traitements de 4 à 7 jours, intervenant entre le 3^e et le 12^e jour de culture par exemple, stimulent habituellement la néoformation des bourgeons sans le retarder. De tels séjours de courte durée n'handicapent géné-

Bourgeons visibles
 le 19^e 19^e 13^e 12^e | | 12^e jour
 de culture

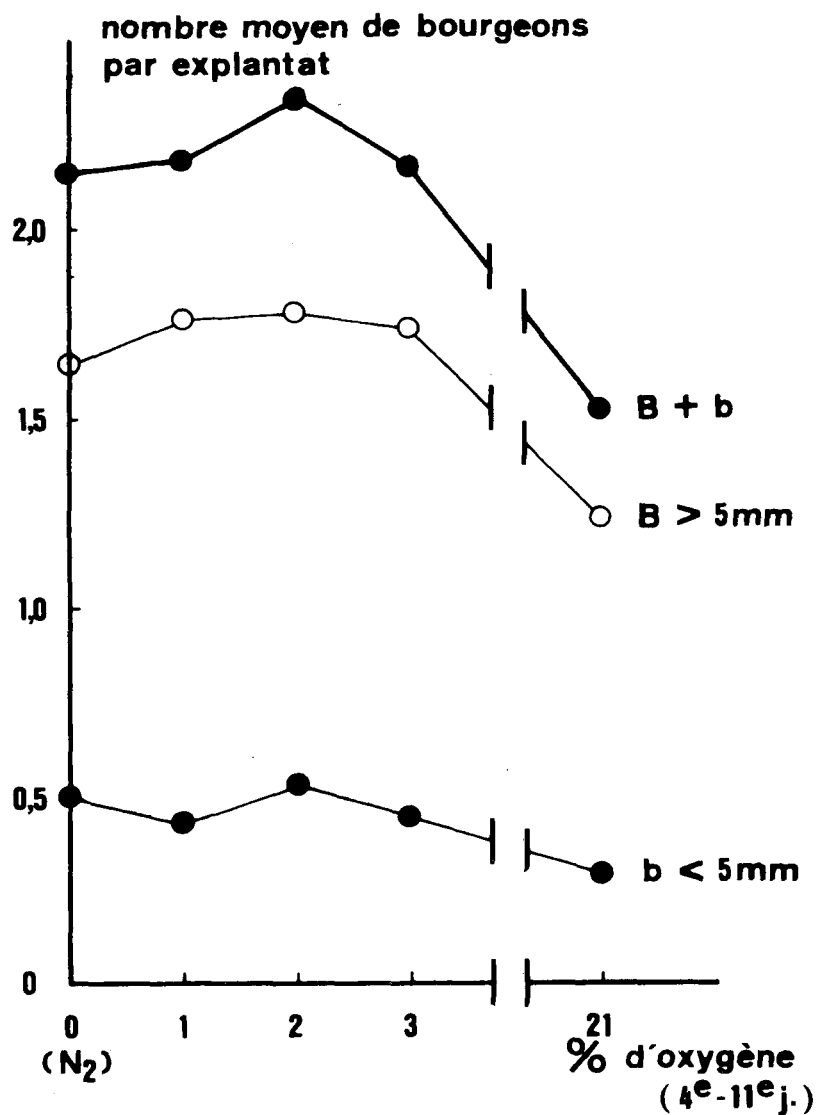


Figure 17 : Influence de différents traitements de 5 jours dans un courant gazeux diversement oxygéné sur la néoformation des bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro", (1 mois de culture).

ralement pas non plus le développement des explantats. Nous avons comparé l'efficacité de divers traitements pratiqués entre le 4e et le 11e jour de culture, c'est-à-dire pendant la période la plus favorable à la stimulation du bourgeonnement. Différents lots ont été placés alors dans un courant d'azote pur ou contenant 1, 2 ou 3 % d'oxygène. Les résultats (Figure 17) sont comparés à ceux d'un témoin cultivé constamment en atmosphère ordinaire.

Dans tous les cas, la majorité des explantats produit des bourgeons. Seuls les traitements par l'azote pur et en présence de 1 % d'O₂ retardent la néoformation des premiers bourgeons en différant surtout le développement des explantats d'un temps égal à la durée du traitement. Finalement, les fragments de racine traités produisent tous plus de bourgeons que les témoins. Mais la stimulation la plus forte est observée dans le lot ayant subi le traitement en présence de 2 % d'oxygène. Cette tension est souvent celle qui favorise le mieux l'élaboration des ébauches gemmaires lorsque les tissus y sont soumis à la fin de la première semaine de culture.

CHAPITRE V :

ANOXIE ET CROISSANCE DES FEUILLES

- o O o -

5.1 - Fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" :

La culture "in vitro" nous a surtout permis de préciser certaines exigences des tissus de racine d'Endive vis-à-vis de l'oxygène et de définir les conditions expérimentales susceptibles d'augmenter la production des ébauches gemmaires. Lorsque ces dernières se développent, les premières d'entre-elles inhibent la croissance de celles formées secondairement. Indépendamment de cela, nous avons vu que des traitements anoxiants trop prolongés affectent plus particulièrement les tissus qui viennent d'être ensemencés et limitent l'allongement des feuilles.

Il nous a paru intéressant de mentionner maintenant quelques résultats concernant la croissance pondérale des feuilles. Ils concernent différents lots de fragments de racine d'Endive placés dans un courant gazeux contenant 0,5 ; 1,25 ; 1,75 ; 2,75 et 3,75 % d'oxygène. Après un mois de traitement, le poids des feuilles supérieures à 5 mm est comparé à celui obtenu dans de l'air constamment renouvelé et dans l'atmosphère ordinaire non agitée.

| Feuilles | % d'Oxygène | | | | | | |
|-------------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|-------------------------|--------------------------|
| | 0,5 % | 1,25 % | 1,75 % | 2,75 % | 3,25 % | 21 % (Air renouvelé) | Atmosphère non agitée |
| > 5 mm | | | | | | | |
| Matière sèche mg/explantat | 16,9 | 39,6 | 36,0 | 41,1 | 26,6 | 18,0 | 32,6 |
| mg/bourgeon feuillé | 12,8 | 31,9 | 32,2 | 37,6 | 24,4 | 16,9 | 30,1 |

Tableau 8 : Influence du renouvellement continu d'atmosphères diversement oxygénées sur la croissance pondérale des feuilles (de taille supérieure à 5 mm) néoformées par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (1 mois de culture).

A partir d'un taux d'oxygène voisin de 3 % le renouvellement permanent de l'atmosphère est préjudiciable à la croissance des feuilles (Tableau 8). Or (GRECHIN I. P. - 1964) les conditions cessent alors d'être anaérobies et la respiration prend le pas sur la fermentation. Par contre, lorsque la tension d'oxygène est comprise entre 1 et 3 %, l'activité fermentaire est nettement plus intense que la respiration et le poids des feuilles supérieures à 5 mm atteint alors des valeurs plus importantes que celles que l'on observe en conditions ordinaires. Toutefois, il existe une limite voisine de 1 % d'oxygène au-dessous de laquelle il y a réduction de la croissance des feuilles. Le poids de feuille correspondant à chaque bourgeon évolue dans le même sens que le poids de la totalité des feuilles supérieures à 5 mm d'un explantat. Les conditions expérimentales modifient donc la crois-

sance de chaque néoformation caulinaire indépendamment de leur nombre.

5.2 - Racines entières forcées :

Les résultats précédents nous ont incité à étudier l'influence de faibles tensions d'oxygène au cours du forçage des racines d'Endive entières. Ces dernières produisent habituellement un "chicon" résultant du développement à l'obscurité, de 16° à 25° C (selon les périodes et les variétés) d'un seul bourgeon à partir du collet. Nous nous sommes demandé si un traitement anoxiant était susceptible de favoriser la croissance des feuilles constituant ce "chicon".

Plusieurs essais de quelques jours dans l'azote se sont révélés infructueux et même particulièrement dépressifs. Nous avons finalement expérimenté le dispositif suivant facilitant le contrôle des conditions d'oxygénation. Des racines d'une variété normale de Chicorée Witloof ont été disposées dans des récipients en plastique percés d'un orifice à la partie inférieure permettant le renouvellement de l'atmosphère au niveau du matériel végétal. Les racines étaient placées verticalement dans une terre légère, humidifiée modérément, de manière à ce que les chicons se développent dans des conditions les plus proches des dispositions culturales habituelles. Le traitement a consisté à introduire de l'azote au niveau des racines. Un débit voisin de 20 l/h permet, grâce aux échanges avec l'atmosphère extérieure par les orifices du couvercle, de maintenir une tension d'oxygène voisine de 2 % pendant la durée du traitement. Le contrôle a été effectué grâce à un tube sonde enfoncé dans la terre jusqu'au niveau des racines et dans lequel on peut introduire l'électrode du doseur d'oxygène.

Deux critères sont retenus pour évaluer la croissance des feuilles du "chicon" la taille et le poids de substance fraîche après 3 à 4 semaines de forçage.

Tout traitement excédant 18 h risque d'entraîner un ralentissement de la croissance des feuilles. Les chicons obtenus sont d'ailleurs d'autant plus petits que les racines ont été soumises plus tôt au traitement de longue durée. On note ainsi une certaine analogie entre le comportement des racines entières et celle des fragments cultivés "in vitro". Lorsqu'il se prolonge, un traitement affectant des tissus à l'état de dormance ou venant d'être débités risque d'handicaper ultérieurement le développement des feuilles.

Nous avons donc aussi effectué des essais à partir du 6e jour de forçage. Les racines étaient placées pendant 3, 6, 9 et 24 h en présence de 2 % d'oxygène. Les chicons obtenus ont été classés en 3 catégories selon leur taille (Tableau 9) et en 3 autres catégories selon leur poids (Tableau 10). La taille des "chicons" est maximale après 6 h de traitement. Dans ces conditions, plus de la moitié des échantillons atteint 20 à 25 cm (Tableau 9).

| | Lot | Séjours sous 2 % d'O ₂ à partir du 6e jour de forçage | | | | |
|----------------------------|-------------------|--|------|------|------|------|
| | | témoin | 3 h | 6 h | 9 h | 24 h |
| % de "chicons" { | de 10 à 15 cm.... | 31 | 23 | 5 | 14 | 13 |
| | de 15 à 20 cm.... | 48 | 41 | 43 | 52 | 61 |
| | de 20 à 25 cm.... | 21 | 36 | 52 | 34 | 26 |
| Longueur moyenne en cm.... | 16,5 | 16,7 | 18,4 | 18,2 | 17,4 | |

Tableau 9 : Influence de séjours sous faible tension d'oxygène sur le développement des "chicons" à partir de racines d'Endive (variété Witloof normale).

| | Lot | Séjours sous 2 % d'O ₂ à partir du 6e jour de forçage | | | |
|------------------------------------|-------|--|-------|-------|-------|
| | | témoin | 3 h | 6 h | 9 h |
| de moins de 100 g... | 52 | 62 | 38 | 47 | 22 |
| % de chicons { de 100 g à 200 g... | 39 | 33 | 42 | 38 | 73 |
| { de plus de 200 g... | 9 | 5 | 20 | 15 | 5 |
| Poids frais (en mg) moyen/chicon | 113,1 | 100,8 | 130,4 | 116,5 | 119,3 |
| Poids sec (en mg) moyen/chicon | 4,49 | 3,98 | 5,28 | 5,68 | 5,01 |

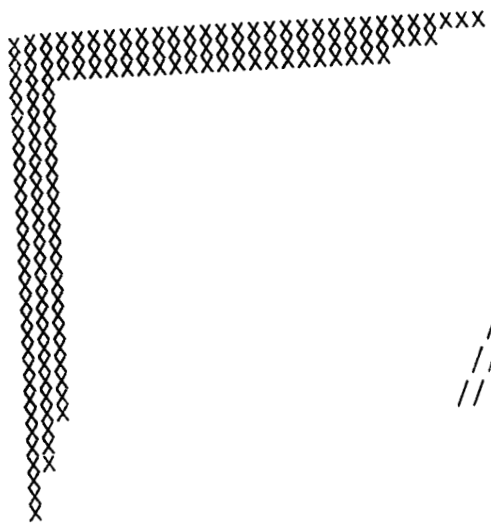
Tableau 10 : Influence de séjours sous faible tension d'oxygène sur la croissance pondérale des "chicons" à partir des racines d'Endive (Variété Witloof normale).


C'est également le séjour de 6 h sous faible tension d'oxygène qui entraîne la plus forte augmentation du poids frais moyen des "chicons" par rapport aux témoins n'ayant subi aucun traitement. Notons aussi qu'un séjour de 24 h sous 2 % d'oxygène favorise encore nettement l'augmentation de la substance sèche, c'est-à-dire la croissance des formations caulinaires. Il présente aussi l'avantage d'accroître le pourcentage des échantillons appartenant aux catégories moyennes de taille et de poids. Il homogénéise ainsi la récolte, ce qui peut intéresser l'endivier. Toutefois, nos conditions de forçage demeurent encore assez différentes de celles qui sont réalisées commercialement. D'autre part, nos résultats dans ce domaine demeurent encore trop fragmentaires pour qu'une application pratique soit d'ores et déjà envisagée à partir de nos observations.


Placées dans des conditions d'anaérobiose stricte ou partielle, les racines entières semblent réagir de façon analogue à celles des fragments cultivés "in vitro". Soulignons néanmoins que dans le premier cas, nous avons affaire à un organe autonome qui produit habituellement une rosette de feuilles à partir d'un seul bourgeon préexistant.

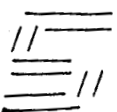
Par contre, les explantats sont des fragments isolés qui portent plus ou moins de bourgeons, tous néoformés et dont le petit nombre de feuilles ne constitue jamais un "chicon" compact.

- o 0 o -




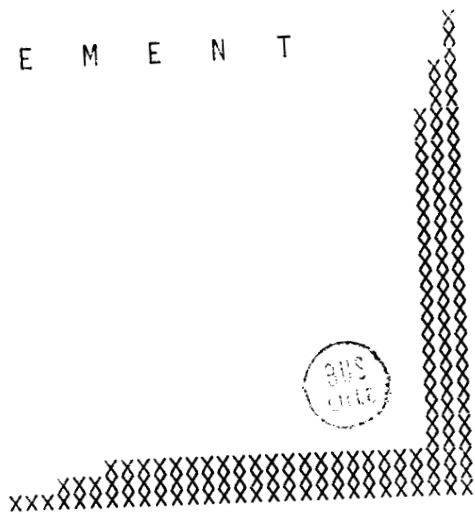
 E T A R D S

 T

 U P P R E S S I O N S

 U

 O U R G E O N N E M E N T



CHAPITRE I :

RETARDS DU BOURGEONNEMENT

- o o o -

Quelle que soit leur taille, les fragments de racine d'Endive produisent ordinairement les premières ébauches gemmaires après une semaine de culture. Les feuilles de ces néoformations se développent ensuite rapidement. Nous avons vu précédemment que l'anaérobiose retardait souvent l'élaboration des bourgeons sans limiter d'ailleurs forcément la croissance des feuilles. Nous nous sommes attaché tout particulièrement à localiser le facteur responsable du retard et à en préciser la nature.

1.1 - Localisation du facteur responsable :

Différents lots de fragments de racine d'Endive sont placés immédiatement après l'ensemencement pendant 7, 14, 21 et 28 jours en conditions strictement anaérobies dans l'azote. Après le traitement, les explantats sont placés en atmosphère ordinaire comme les témoins. Ces derniers produisent tous des bourgeons après deux semaines de culture (Figure 18). Quatorze jours plus tard, les plus grandes feuilles atteignent leur taille maximale. Sous l'effet d'un traitement anaérobie de 7 jours, 40 % seulement des explantats produisent des bourgeons sans retard, mais la totalité du lot finit pourtant par bourgeonner après un mois de culture. En dépit du fait

qu'elles ne se développent pas toutes en même temps, les feuilles atteignent difficilement des tailles comparables à celles des témoins. La prolongation du traitement entraîne un retard de la néoformation des bourgeons d'au moins deux semaines, mais surtout, beaucoup d'explantats restent incapables de bourgeonner pendant la durée des essais. Après 3 à 4 semaines de traitement, plus aucun explantat ne manifestera le moindre phénomène d'organogénèse.

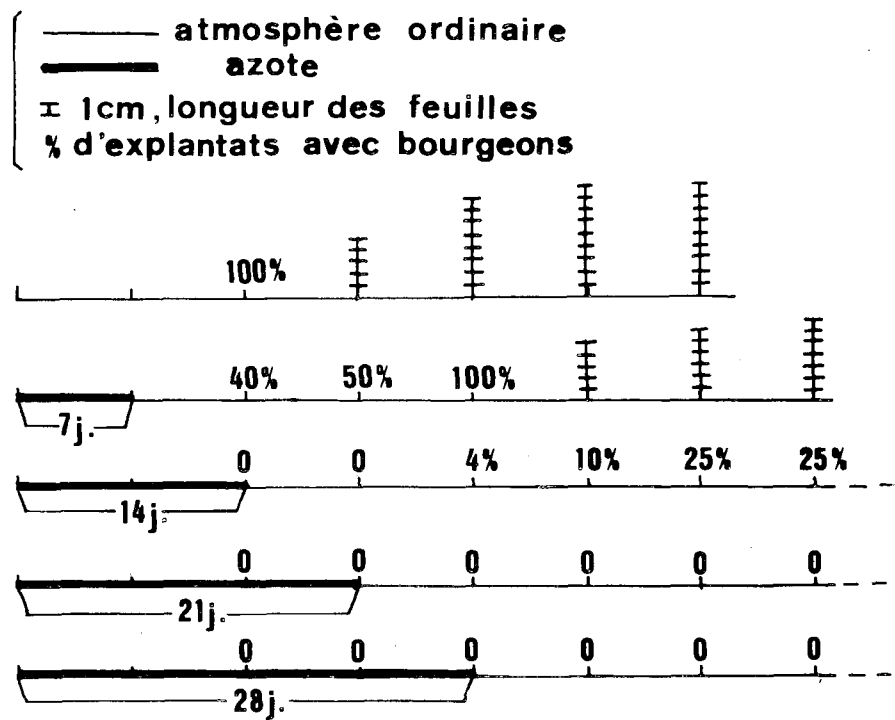


Figure 18 : Néoformation des bourgeons et croissance des feuilles sur les fragments de racine d'Endive traités 7, 14, 21 et 28 jours par une atmosphère dépourvue d'oxygène.

Dans une série d'essais analogues, nous avons transporté les fragments de racine sur un milieu neuf à l'issue du traitement. Tous les explantats se développent alors et produisent des bourgeons deux semaines

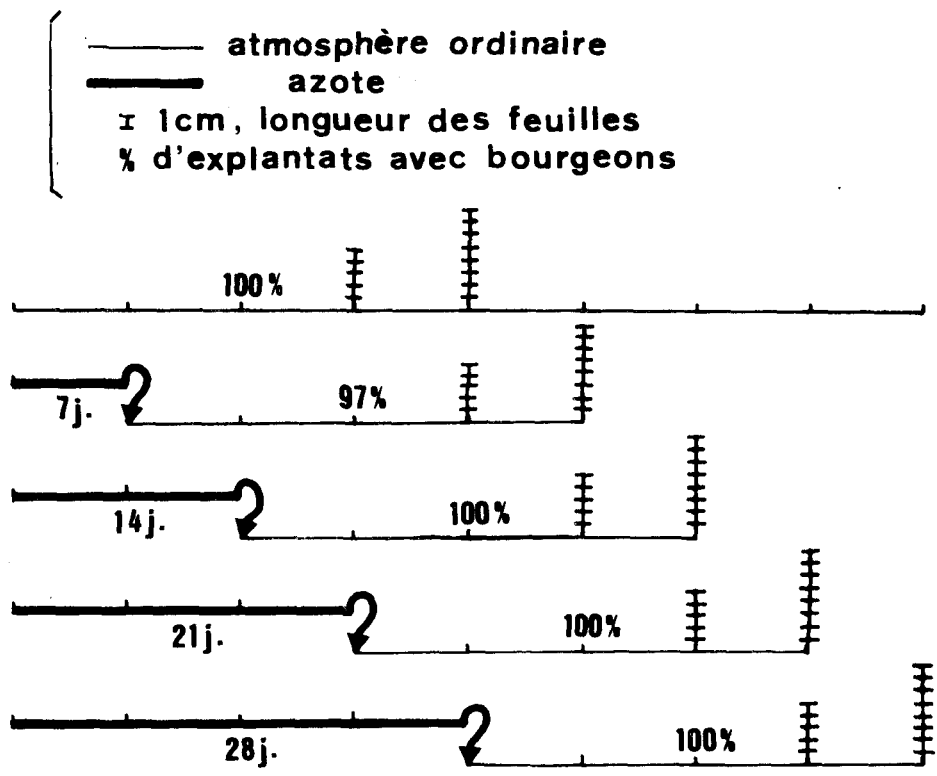


Figure 19 : Néoformation des bourgeons et croissance des feuilles sur les fragments de racine d'Endive après transplantation sur un milieu neuf à l'issue du traitement par une atmosphère dépourvue d'oxygène.



après la transplantation (Figure 19). Les feuilles s'allongent rapidement et atteignent en 14 jours des tailles comparables à celles des témoins. Par contre, si l'on replace les colonies tissulaires sur leur milieu initial (Figure 20) après 21 ou 28 jours de traitement, le bourgeonnement n'est pas restauré. C'est donc essentiellement le contact avec le milieu de culture initial qui perturbe la néoformation des ébauches gemmaires. La privation d'oxygène prolonge simplement la dormance des tissus sans modifier leur aptitude à bourgeonner ni leur capacité d'assurer la croissance normale des feuilles.

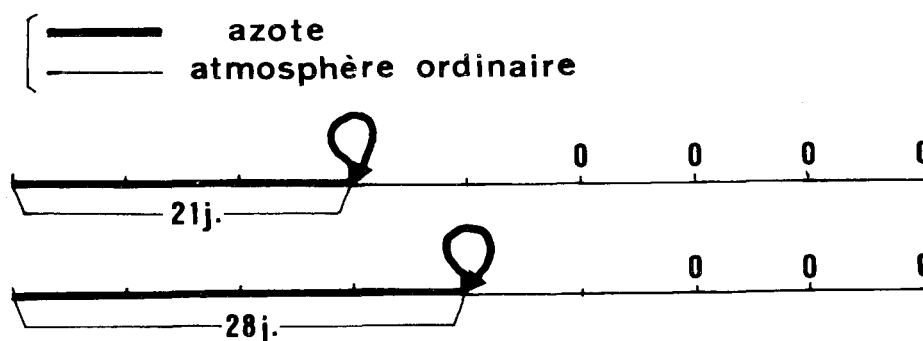


Figure 20 : Déplacement des fragments de racine d'Endive sur leur milieu initial à l'issue du traitement anaérobie.

1.2 - Propriétés conférées au milieu de culture :

Nous nous sommes demandé si à l'issue de traitements anaérobies, les milieux étaient capables d'influencer le bourgeonnement d'autres explantats fraîchement prélevés. Après 7, 14, 21, 28 jours dans l'azote, on

remplace les fragments de racine par des explantats fraîchement prélevés et n'ayant subi aucun traitement (Figure 21).

Au contact des milieux déjà utilisés pendant 21 et 28 jours dans l'azote, les tissus ne bourgeonnent pas. Si les milieux n'ont servi que 14 jours, le bourgeonnement est fortement retardé et 21 % seulement des explantats produisent des bourgeons qui demeurent tous à l'état d'ébauches. Enfin, les milieux, n'ayant servi que pendant 7 jours en anaérobiose, permettent à la moitié des explantats de bourgeonner mais une semaine plus tard que les témoins, la croissance des feuilles s'effectuant à peu près normalement.

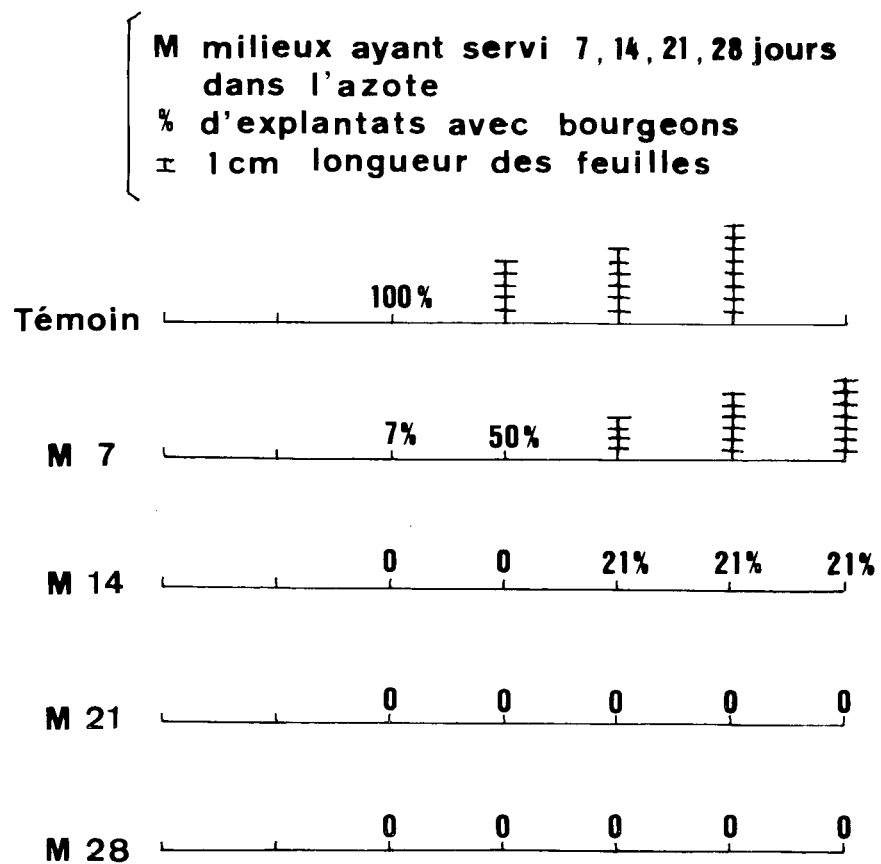


Figure 21 : Développement des bourgeons sur des fragments de racine d'Endive cultivés sur des milieux ayant servi à différents traitements anaérobies (7, 14, 21 et 28 jours dans l'azote).

On pouvait se demander si l'appauvrissement du milieu nutritif était responsable même partiellement de ces résultats. Nous avons doncensemencé des fragments de racine d'Endive sur des milieux ayant déjà servi 7, 14 ou 21 jours en atmosphère ordinaire (Figure 22).

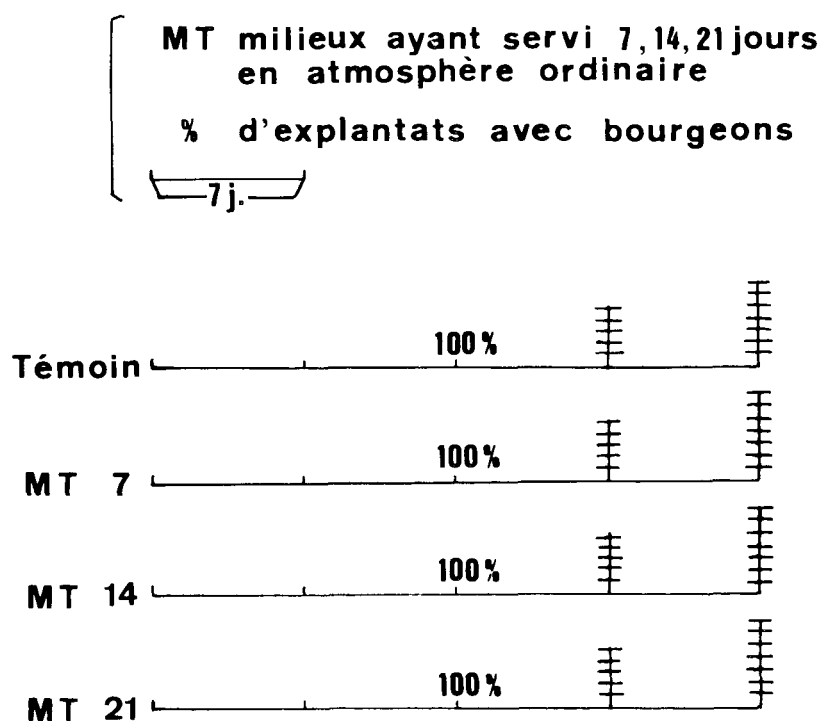


Figure 22 : Bourgeonnement des fragments de racine d'Endive sur des milieux ayant servi plus ou moins longtemps en atmosphère ordinaire.

Dans chacun des lots, les explantats nouvellementensemencés bourgeonnent et assurent normalement la croissance des feuilles. La diminution des éléments nutritifs du milieu de culture ne peut donc pas être invoquée. En anaérobiose, les tissus de racine d'Endive excrètent donc dans le milieu une ou plusieurs substances qui s'y accumulent et empêchent le bourgeonnement de se produire. Selon les explantats et la quantité de substances excré-

tées, on empêche la néoformation des bourgeons ou on la retarde en limitant la croissance des feuilles. Mais les facteurs responsables ne font que suspendre l'activité mitotique qui reprend normalement dès que les tissus ou les formations caulinaires sont soustraits à leur influence.

1.3 - Nature des substances inhibant l'activité néoformatrice :

Le catabolisme anaérobie conduit naturellement à la formation d'acétaldéhyde (FIDLER J.C. - 1948-) et d'éthanol (MATRUCHOT L., M. MOLLIARD -1903 ; THOMAS M. -1925 ; DOIREAU P. -1972 et 1974-). Nous avons donc recherché ces éléments dans les milieux de culture à l'issue des traitements. Des fragments de racine d'Endive ont été ensemencés sur le milieu nutritif habituel et placés immédiatement en atmosphère d'azote. Après 7, 14, 21 et 28 jours les milieux ont été distillés et le liquide recueilli dosé par oxydation chromique. On constate (Tableau 14) que les quantités d'alcool accumulées sont d'autant plus importantes que le séjour anaérobie est plus long.

| Durée du traitement | mm3 d'alcool par tube de culture | mm3 d'alcool par litre de milieu |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| 7 jours..... | 4,5 | 216 |
| 14 jours..... | 6,55 | 314,4 |
| 21 jours..... | 5,22 | 250,5 |
| 28 jours..... | 13 | 624 |
| Atmosphère ordinaire. après 7, 14, 21 ou 28 jours de culture. | 0 | 0 |

Tableau 14 : Accumulation d'alcool dans le milieu de culture en fonction de la durée du traitement en anaérobiose.

Notons que, selon la forme des explantats, des différences assez sensibles sont observées d'un récipient de culture à l'autre. Elles résultent soit de la rétention d'alcool dans les espaces intercellulaires, soit de différences individuelles d'activité fermentaire. Pour déterminer avec précision la nature des produits de fermentation dosés par oxydation chromique et désignés sous le vocable "alcool", nous avons eu recours à l'analyse enzymatique et à la chromatographie en phase gazeuse. Ces deux techniques ont confirmé que les fragments de racine d'Endive rejettent essentiellement de l'éthanol dans le milieu de culture (Figure 23).

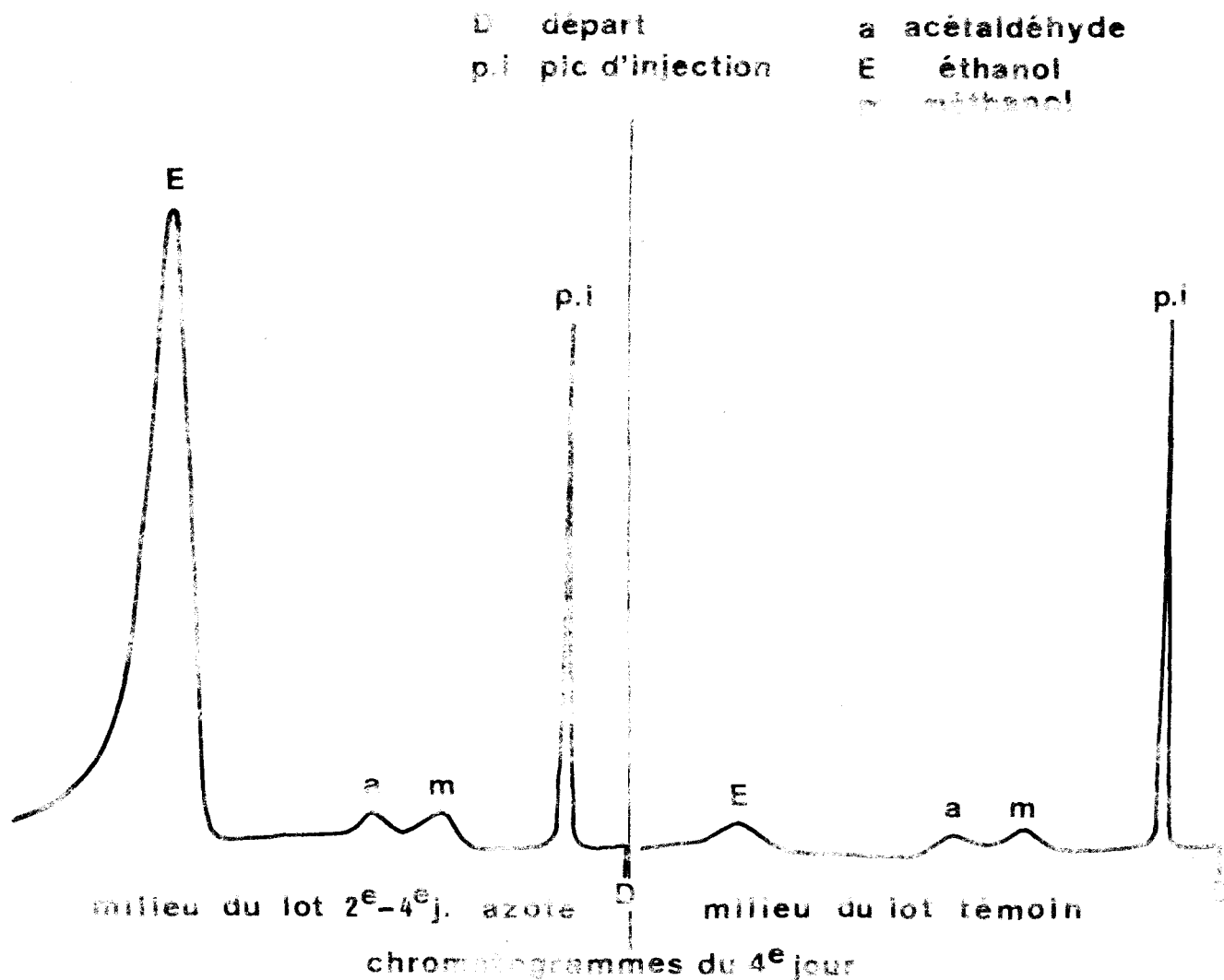


Figure 23 : Substances en solution dans le milieu de culture pendant 4 jours en atmosphère azotée ou après traitement (2^e à 4^e jour) anaérobie. (Fragments de racines d'Endive cultivés "in vitro").

Deux autres éléments carbonés, le méthanol et l'acétaldéhyde, accompagnent en petite quantité l'éthanol. Soulignons d'ailleurs qu'au début de la culture "in vitro", même les explantats témoins cultivés en atmosphère ordinaire rejettent une certaine quantité des trois substances carbonées dans le milieu de culture.

Pour vérifier si l'alcool éthylique pouvait perturber le bourgeonnement, nous avons cultivé des fragments de racine d'Endive en atmosphère ordinaire, mais sur des milieux en contenant différentes quantités. En présence de 1 000 mm³/l d'éthanol, tous les explantats bourgeonnent encore ; il y a seulement une faible réduction de la croissance des feuilles (Figure 24).

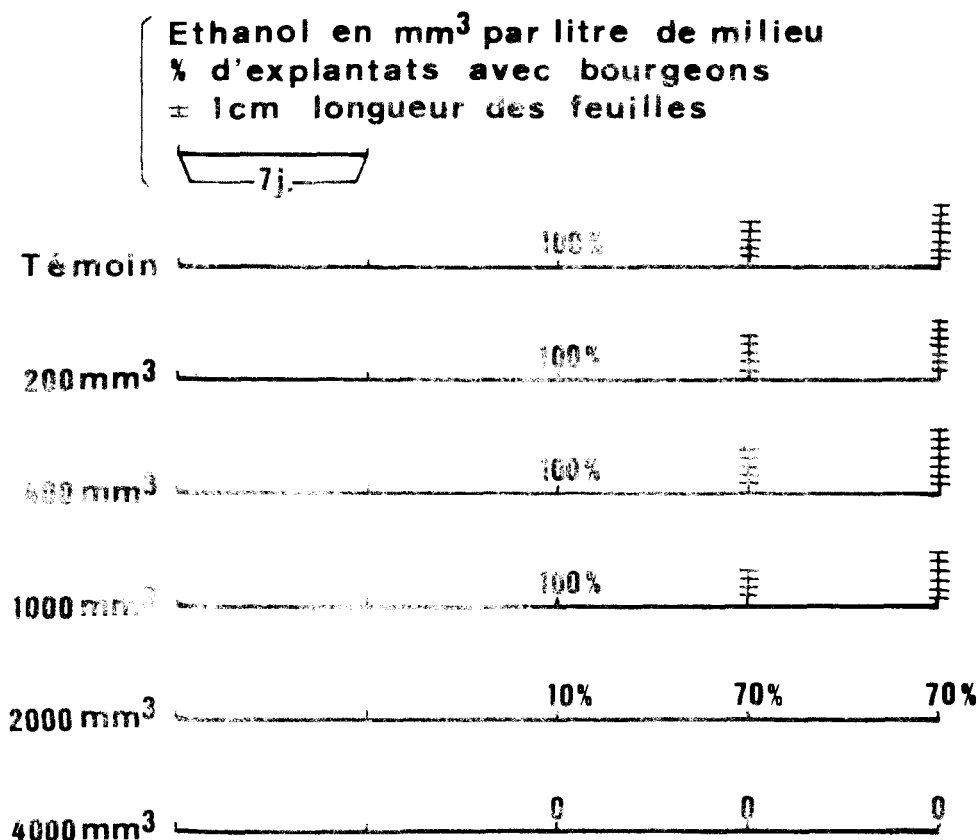
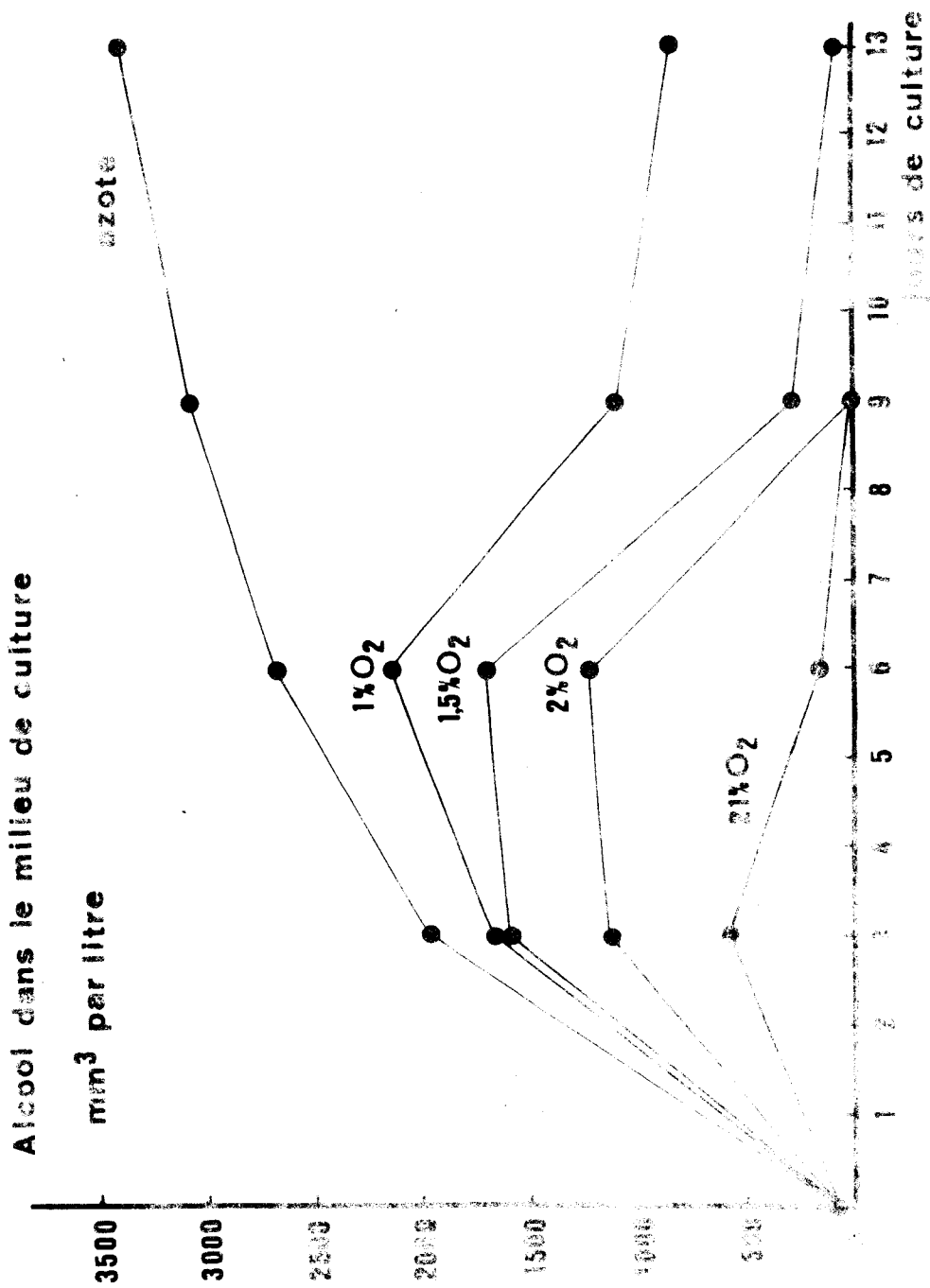


Figure 24 : Influence de l'éthanol incorporé au milieu de culture sur le bourgeonnement des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".



315
LILLE

Figure 29 : Evolution des quantités d'éthanol accumulées dans le milieu de culture, pour les fragments de racine d'olive cultivés "in vitro" dans différentes conditions d'oxygénation.

A des taux plus importants, l'alcool retarde la néoformation des bourgeons chez un grand nombre d'explantats et maintient les néoformations gemmaires à l'état d'ébauches. De fortes doses suppriment totalement le bourgeonnement.

La présence d'éthanol dans le milieu de culture après un traitement anaérobie explique donc le retard ou la suppression du bourgeonnement ainsi que les réductions de la taille des feuilles.

1.4 - La faible tension d'oxygène :

Retards et suppressions du bourgeonnement ainsi que réductions de la croissance des feuilles s'observent aussi sous faible tension d'oxygène. Nous avons donc étudié l'accumulation d'éthanol dans le milieu de culture en fonction de la teneur en oxygène de l'atmosphère.

Au début de la culture "in vitro", quelles que soient les conditions d'oxygénation des tissus, il y a excrétion d'éthanol dans le milieu de culture (Figure 25). Les quantités accumulées sont d'autant plus élevées que la teneur en oxygène est plus faible. En anaérobiose stricte, les explantats continuent à fermenter. L'allure de la courbe traduit seulement une atténuation progressive de l'activité fermentaire en fonction du temps. Par contre, sous faible tension d'oxygène, l'éthanol disparaît progressivement du milieu de culture après une semaine de traitement environ. L'élimination est d'autant plus rapide que l'oxygénation est plus forte. C'est ce qui explique qu'en présence de 2 % d'O₂ la plupart des explantats produisent généralement des bourgeons à peu près en même temps que les témoins cultivés en atmosphère ordinaire. Notons par ailleurs que dans les milieux récloins, l'éthanol commence à diminuer dès le troisième jour de culture.

Nous nous sommes demandé si un traitement sous faible tension d'oxygène entraînait toujours la même accumulation d'alcool dans le milieu de culture quelle que soit la période d'application. Des fragments de racine d'Endive ont donc été placés pendant 3 jours dans un courant gazeux continu contenant 2 % d'oxygène. Mais le traitement a débuté pour certains immédiatement après l'ensemencement et pour d'autres à partir du 4e, 7e ou 11e jour de culture ; c'est-à-dire dans tous les cas, avant l'apparition des ébauches gemmaires. Dans les conditions ordinaires, les tissus n'accumulent plus d'alcool dans le milieu après 3 jours de culture (Tableau 15). Il n'en est pas de même lorsqu'ils sont placés sous 2 % d'oxygène seulement. Les quantités d'éthanol accumulées sont alors d'autant plus importantes que le traitement débute plus tôt. On s'explique ainsi que sous certaines tensions d'oxygène infraliminaires, les traitements intervenant dès le début de la culture "in vitro" retardent le bourgeonnement et la croissance des feuilles.

| Période de traitement | Ethanol accumulé dans le milieu de culture mm ³ /l | | | |
|-------------------------|---|--------------|---------------|----------------|
| | 1er à 4e jour | 4e à 8e jour | 7e à 11e jour | 11e à 15e jour |
| Sous 2 % d'oxygène | 1 070 | 500 | 150 | 115 |
| En atmosphère ordinaire | 315 | traces | 0 | 0 |

Tableau 15 : Accumulation d'alcool dans le milieu de culture pendant un séjour dans une atmosphère contenant 2 % d'oxygène.

Quelle que soit la taille des explantats, le taux d'éthanol du milieu de

culture au-delà duquel la néoformation des bourgeons et la croissance des feuilles sont plus ou moins gravement perturbées est compris entre 1 000 mm³/l et 2 000 mm³/l. Le seuil de toxicité varie ainsi selon l'état physiologique des tissus au moment de leur prélèvement.

- o o o -

CHAPITRE II :

CAPACITE A BOURGEONNER ET RESERVES NUTRITIVES

- o 0 o -

Lorsque la taille des fragments de racine d'Endive diminue, on constate, même à l'air ordinaire, que certains ne bourgeonnent pas ou ne donnent que des bourgeons de petite taille. Nous nous sommes demandé si ces phénomènes, analogues à ceux provoqués par l'anaérobiose, n'étaient pas dus cette fois à une diminution des réserves.

2.1 - Evolution des réserves glucidiques :

Les sucres sont parmi les réserves essentielles des tissus de racine d'Endive. Ils constituent un aliment énergétique indispensable au développement des néoformations (BALLETT P. -1966, MARADA J. -1969, BALLADE P. -1971) et on sait aussi que leur métabolisme évolue différemment en conditions aérobies et anaérobies (MOLLARD M. -1914, PEYNAUD E., G. GUIMBERTEAU -1962, GRANT B.R., H. BEEVERS -1964, DE WIT M.C.J. -1969). Tout cela nous a amené à nous intéresser à l'évolution des réserves intracellulaires ainsi qu'à celle du glucose ajouté au milieu de culture. Huit lots de fragments de racine d'Endive sont placés pendant 2 semaines dans diverses conditions d'oxygénation. Le dispositif expérimental permet le renouvellement permanent de l'atmosphère en six formes 0 - 0,75 - 1,25 - 2 - 3 - 3,5 ou 21 % d'oxygène (A R). Un lot témoin est placé dans une atmosphère ordinaire non agitée.



| | Bourgeonnement (35e jour) | | | Glucides (le 15e jour) (mg C. org par explantat) | |
|--|--|---------------------------------------|--|---|--------------|
| | Alcool le 15e jour dans le milieu de culture mm3 par explantat | Pourcentage explantats sans bourgeons | Explantats à b. seul total explantats sans bourgeons | Milieu | Total |
| Témoin atmosphère ordinaire non agitée.... | 0 | 25 | 0,18 | 9,89 | 20,60 |
| Air renouvelé..... | 0 | <u>95,7</u> | <u>0,68</u> | 9,77 | <u>18,66</u> |
| 3,5 % O ₂ | 0 | 20 | <u>0,25</u> | 10,11 | 20,22 |
| 5 % O ₂ | traces | 15 | 0,17 | 9,15 | 19,55 |
| 7 % O ₂ | 0,164 | 12 | 0,13 | 12,55 | 21,49 |
| 10,5 % O ₂ | 0,277 | <u>51</u> | 0,15 | 13,55 | <u>22,32</u> |
| 15 % O ₂ | 0,333 | <u>50</u> | <u>0,27</u> | 15,53 | <u>23,55</u> |
| 0 (azote)..... | 0,273 | <u>35</u> | <u>0,53</u> | 15,44 | <u>21,88</u> |

Tableau 16 : Utilisation des glucides et aptitude à bourgeonner des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

Après 2 semaines de culture, nous avons dosé les quantités résiduelles de glucides dans les tissus et dans les milieux de culture correspondants. Ces résultats (Tableau 16) sont exprimés en mg de carbone organique par explantat de manière à faciliter les comparaisons. Nous avons mentionné parallèlement le pourcentage d'explantats n'ayant pas produit de bourgeons après 35 jours de culture ainsi que le rapport $\frac{\text{explantats avec petits bourgeons}}{\text{total des explantats organogènes}}$ pour rendre compte du développement des feuilles néoformées.

Au dessous de 3 % d'O₂ dans l'atmosphère, les tissus fermentent plus qu'ils ne respirent et rejettent donc de plus en plus d'éthanol dans le milieu de culture. C'est ce qui explique les suppressions du bourgeonnement et les réductions de la croissance des feuilles.

Mais, en conditions qu'on peut qualifier d'aérobies (CHEVILLARD L., F. HAMON, A. MAYER et L. PLANTEFOL -1930. DUCET G., A. PENELOUX -1962. GRECHIN I.P.-1964). (3 % et plus), la respiration prend le pas sur la fermentation et l'éthanol ne s'accumule jamais en grande quantité dans les cultures. Et c'est alors paradoxalement l'oxygénation des tissus qui entrave le bourgeonnement et perturbe la croissance des feuilles. Ces effets sont d'ailleurs particulièrement remarquables dans une atmosphère normalement oxygénée, mais renouvelée constamment. On ne peut certes pas incriminer la disparition des glucides intratissulaires car l'anoxie la favorise elle aussi. Mais on constate surtout qu'en conditions aérobies, les explantats consomment davantage de glucose du milieu de culture qu'en anaérobiose. La nature des échanges tissu-milieu extérieur comme celle des produits formés apparaît plus déterminante envers le bourgeonnement que la stricte évolution quantitative des réserves glucidiques. Notons que les conditions d'oxygénation voisines de 2 % d'oxygène instaurent un équilibre métabolique réduisant au maximum les perturbations du

bourgeoisement. Le maintien des processus fermentaires accentue le recours aux glucides intratissulaires, et réduit d'autant la disparition du glucose du milieu de culture.

2.2 - Le glucose du milieu de culture :

Nous nous sommes aussi demandé si le glucose était habituellement fourni en quantité suffisante dans le milieu de culture pour permettre à tous les explantats de bourgeonner et d'assurer la croissance des feuilles. Des fragments de racine d'Endive ont donc été ensemencés sur des milieux non additionnés de sucre ou contenant des quantités croissantes de glucose.

Dans le premier cas, les glucides tissulaires constituent le seul aliment énergétique disponible. Il y a donc utilisation intensive des réserves propres comme c'était le cas pour les tissus soumis à l'anaérobiose. On constate (Tableau 17) que ce mode de nutrition carbonée ne carence habituellement pas les explantats et permet à la plupart d'entre-eux de bourgeonner normalement. Par contre, on compte d'autant moins d'explantats organogènes que le taux de glucose est plus élevé dans le milieu de culture. Et cette source exogène de carbone ne favorise d'ailleurs pas pour autant la croissance des feuilles.

| Glucose..... | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 10 |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|----|
| Bourgeons visibles le... | 10e j | 11e j | 12e j | 12e j | 12e j | 12e j | - | - |
| % d'explantats avec bourgeons..... | 98 | 94 | 92 | 50 | 32 | 18 | 0 | 0 |
| Expl. avec petits bourg. | 0,02 | 0,06 | 0,06 | 0,08 | 0,25 | - | - | - |
| Total des expl. avec bourgeons! | | | | | | | | |

Tableau 17 : Influence du glucose du milieu de culture sur le bourgeoisement et la croissance des feuilles néoformées par les fragments de racine d'Endive (1 mois de culture).

Ethanol dans le milieu de culture
mm³ par litre (4^e jour)

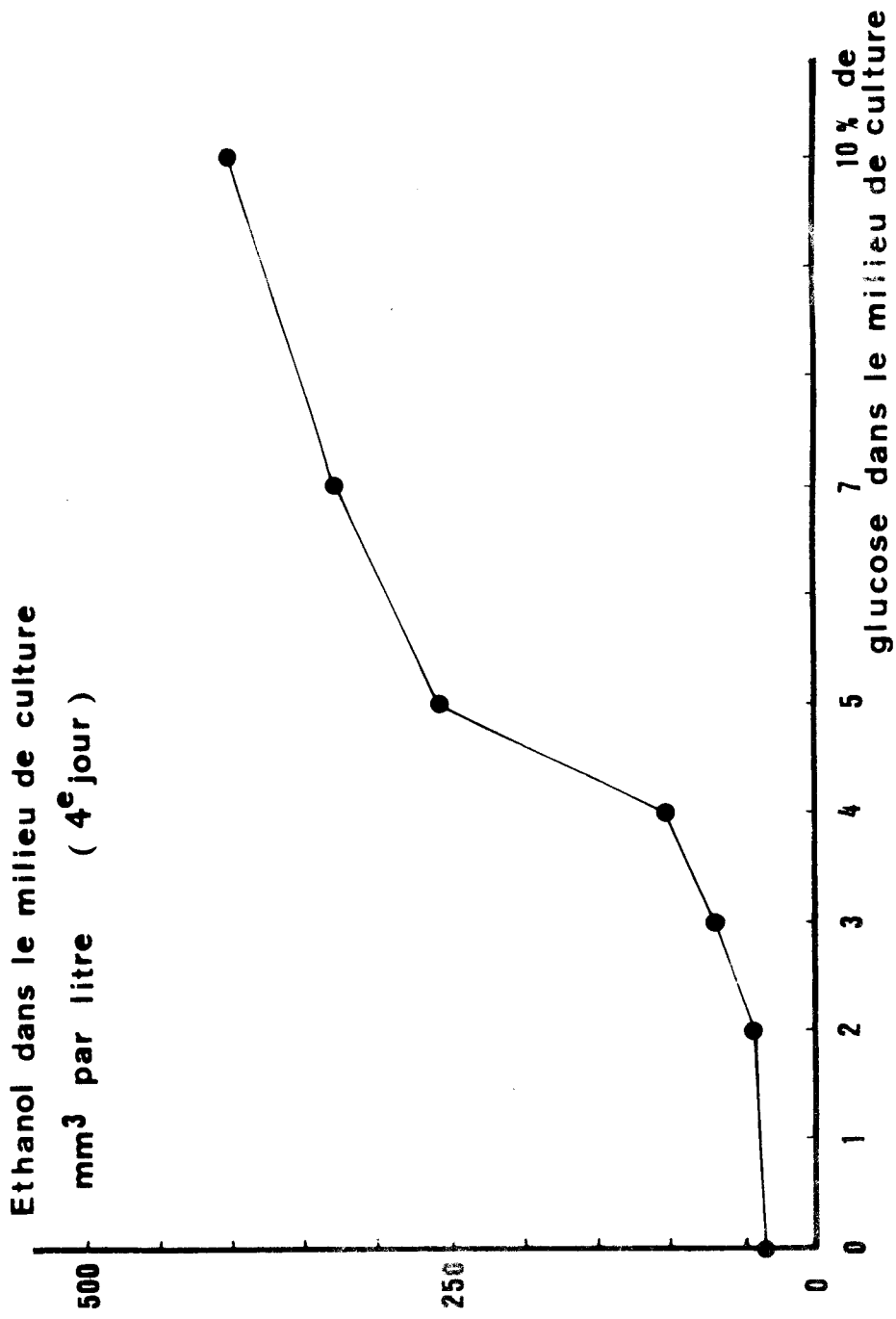


Figure 26 : Accumulation d'éthanol dans le milieu nutritif au début de la culture "in vitro" de fragments de racine d'Endive en présence de différentes concentrations de glucose.



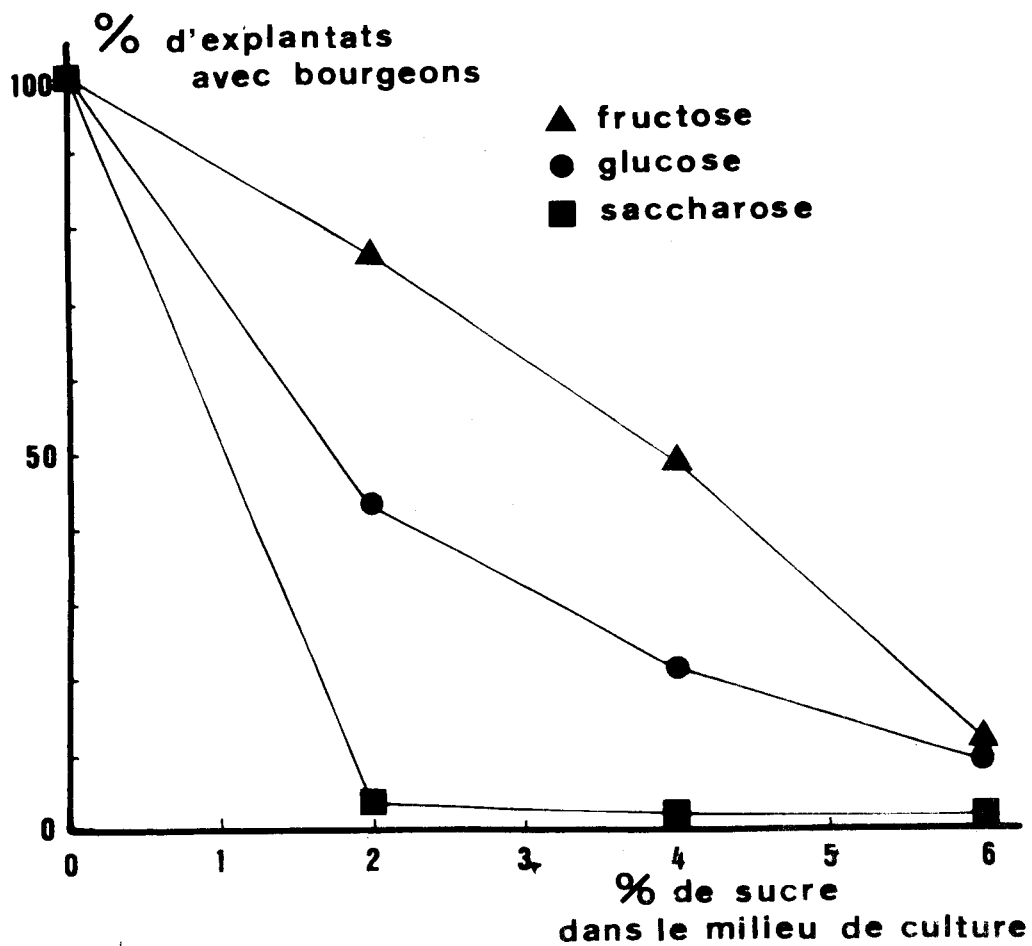


Figure 27 : Influence de différents sucres incorporés au milieu de culture sur l'aptitude à bourgeonner des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (1 mois de culture).



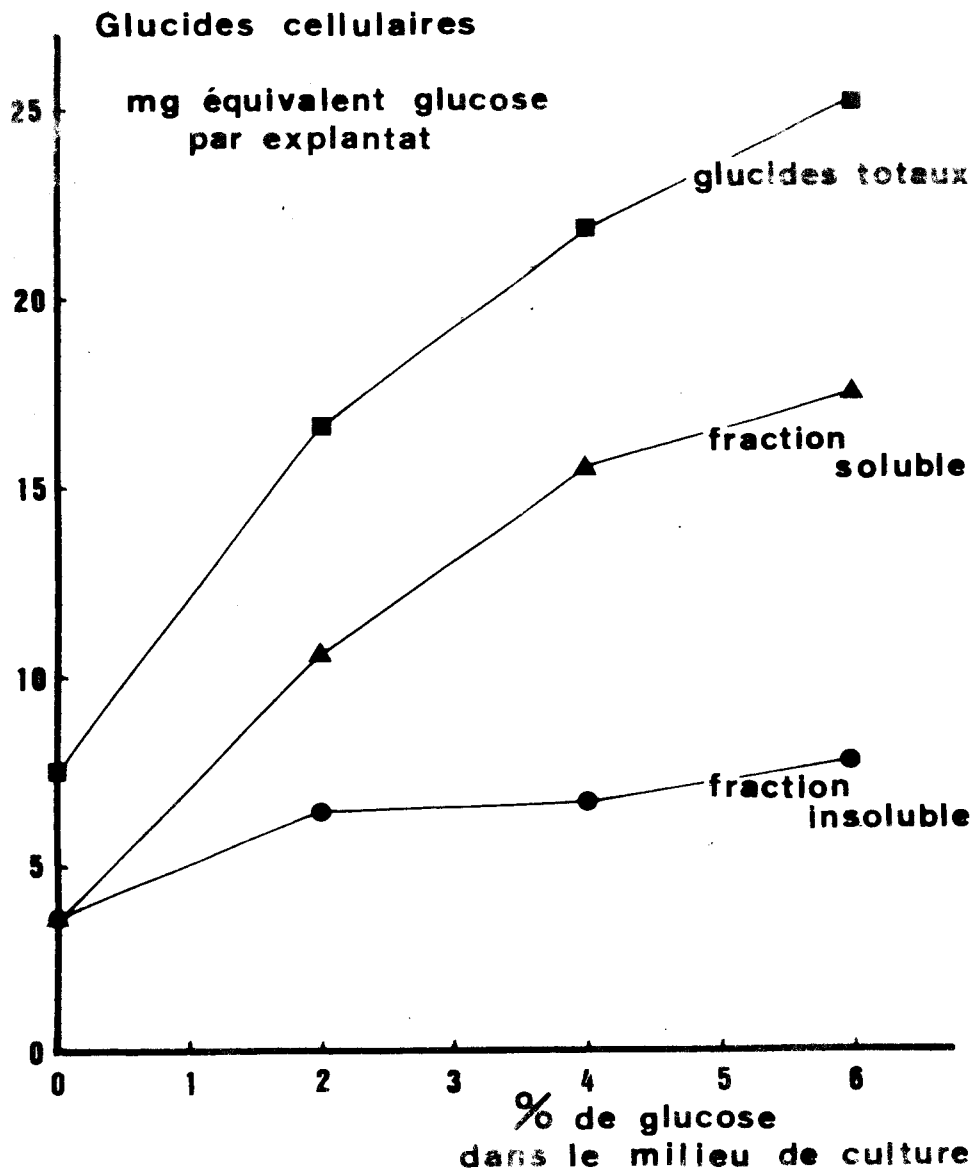


Figure 28 : Influence de l'apport glucosé sur l'évolution des sucres dans les fragments de racines d'Endive cultivés "in vitro" (1 semaine de culture).



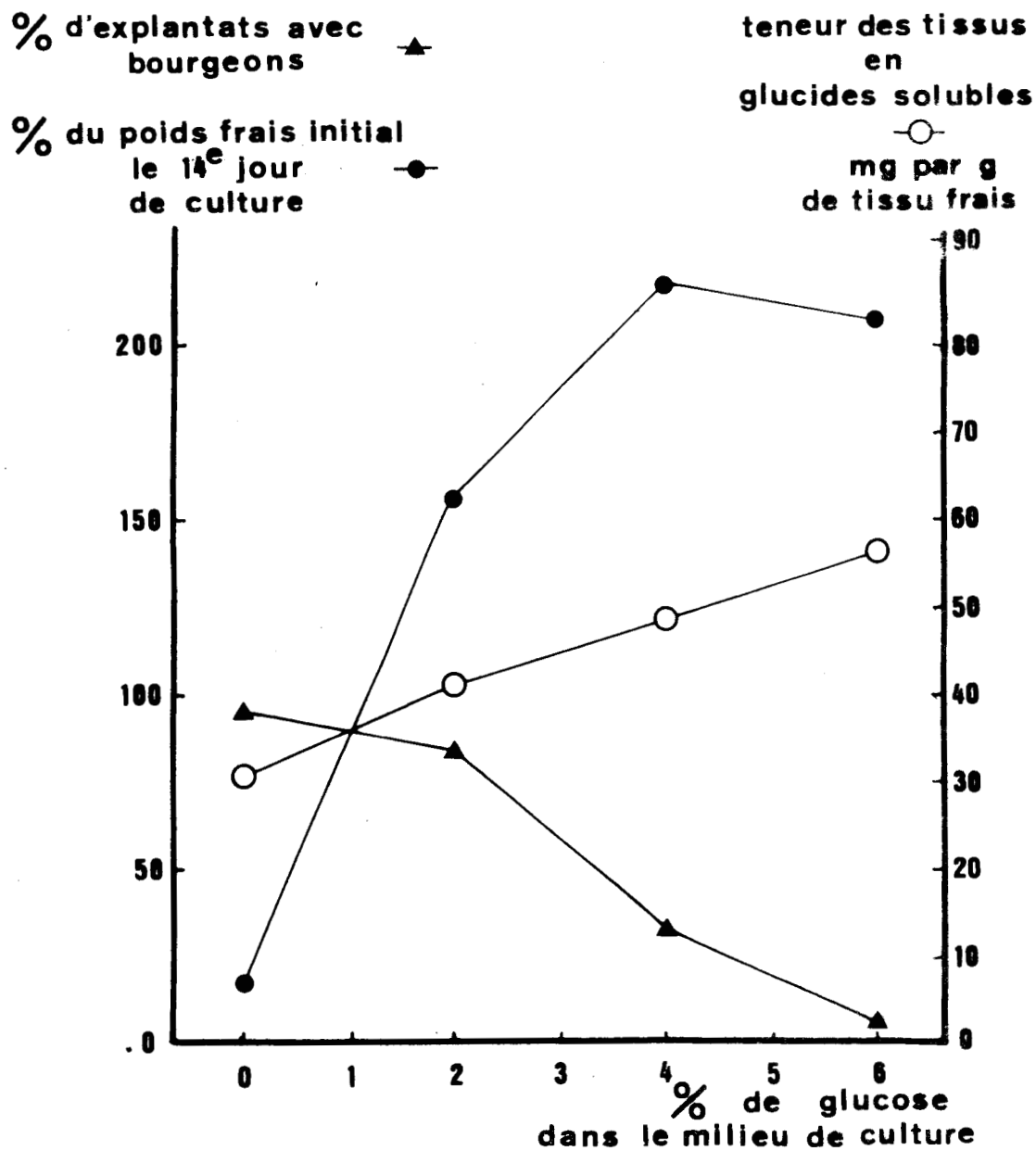


Figure 29 : Croissance pondérale et bourgeonnement des fragments de racine d'Endive en rapport avec la teneur en glucides solubles des tissus. Influence du glucose du milieu de culture.



On constate (Figure 29) que cela permet une meilleure croissance des explantats. Mais, corrélativement, de moins en moins de ces fragments demeurent capables de bourgeonner. Tout se passe comme s'il y avait compétition entre les deux phénomènes, la croissance excluant le bourgeonnement dans les explantats qui contiennent beaucoup de glucides solubles.

2.5 - Glucides et anaérobiose :

Nous avons cherché à savoir si l'anaérobiose était susceptible de modifier l'effet du glucose sur le bourgeonnement. Pour cela, différents lots de fragments de racine d'Endive ont été cultivés sur le milieu de base sans sucre ou additionné de 5 ou 10 % de glucose. Une première série de lots est placée en conditions d'oxygénation ordinaires, la seconde est privée d'oxygène pendant trois jours, du 2^e au 5^e jour de culture. Dans tous les cas, les bourgeons apparaissent dans le courant de la deuxième semaine de culture. Un mois plus tard, on évalue le pourcentage d'explantats ayant produit des bourgeons et les poids de matière fraîche et de matière sèche par fragment (Tableau 18).

Le glucose, à 5 %, réduit de moitié la capacité des explantats à bourgeonner et supprime totalement cette possibilité à 10 %. Le traitement anaérobie accroît le nombre des fragments organogènes et réduit l'effet inhibiteur du glucose.

| % Glucose dans le milieu de culture | | 0 | 5 | 10 |
|-------------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|
| % explantats avec bourgeons | Atm. ord. | 34 | 14 | 0 |
| | Azote 2e- 5e j | 84 | 59 | 11 |
| Matière fraîche mg par expl. | Atm. ord. | 180,4 | 319,6 | 375,1 |
| | Azote 2e - 5e j | 197,3 | 289,1 | 294,6 |
| Matière sèche mg par expl. | Atm. ord. | 10,9 | 42,7 | 58,1 |
| | Azote 2e - 5e j | 10,1 | 39,5 | 52,3 |

Tableau 18 : Actions conjuguées de l'anaérobiose et du glucose sur l'aptitude à bourgeonner et la croissance pondérale des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (Traitement : séjour dans l'azote du 2e au 5e jour de culture. Résultats le 35e jour de culture).

Notons que ce qui stimule la prolifération des explantats eux-mêmes est préjudiciable au bourgeonnement et vice-versa. Ainsi, le glucose supprime progressivement le bourgeonnement tout en favorisant l'accroissement pondéral des tissus. Et, si l'anaérobiose réduit la prolifération des explantats, elle leur restitue en raison inverse la capacité de bourgeonner.

2.6 - Utilisation du glucose :

L'inhibition du bourgeonnement pouvait être provoquée par une accumulation de glucose au sein des tissus. Nous avons donc dosé cet ose à la

fois dans le milieu nutritif et dans les tissus afin d'en connaître la destinée. Les fragments de racine d'Endive sont placés soit en atmosphère ordinaire, soit sous faible tension d'oxygène, en présence ou non de glucose dans le milieu de culture.

Après deux semaines, les explantats cultivés sur milieu glucosé contiennent davantage de glucose que ceux qui ne disposent que de leurs propres réserves glucidiques (Tableau 19). Mais sous faible tension d'oxygène, les tissus absorbent plus difficilement le glucose du milieu et en contiennent donc finalement moins qu'en atmosphère ordinaire.

| Quantités initiales de glucose dans le milieu de culture (mg par explantat) | | | 0 | 125 |
|---|-----------------|---------------------------|-----|------|
| Quantités de glucose (13e jour de culture) | Dans le milieu | En atmosphère ordinaire | 2,1 | 68,5 |
| | | Avec 1 % d'O ₂ | 2,4 | 104 |
| | Dans les tissus | En atmosphère ordinaire | 7,4 | 19 |
| | | Avec 1 % d'O ₂ | 4,4 | 16,7 |

Tableau 19 : Destinée des réserves glucosées en fonction des conditions d'oxygénation et de la richesse initiale du milieu de culture.

Par ailleurs, on note qu'il y a passage de glucose des tissus vers le milieu de culture lorsque ce dernier en est dépourvu initialement. La privation d'oxygène facilite un peu ce mouvement (EHL-KHABBASHA K.M. -1974) mais réduit surtout les quantités de glucose intratissulaire libre. Dans tous les cas, le métabolisme anaérobie favoriserait donc le bourgeonnement en

abaissant le taux du glucose au sein des tissus.

2.7 - L'éthanol du milieu de culture :

Au-delà d'un certain seuil, qui peut varier selon les explantats, l'éthanol supprime le bourgeonnement (Chapitre 1). Mais nous nous sommes aperçu que, dans certains cas, de faibles doses d'éthanol provoquaient l'effet inverse. Aussi, nous avons été amené à utiliser des racines d'Endive dont 68 % des explantats seulement bourgeonnaient en présence de 2 % de glucose. L'adjonction d'éthanol au milieu de culture retarde certes le bourgeonnement et augmente le rapport $\frac{\text{Explantats avec petits bourgeons seulement}}{\text{Total des explantats organogènes}}$ ce qui traduit un effet dépressif sur la croissance des feuilles néoformées (Tableau 20).

| Ethanol mm3 par l..... | 0 | 250 | 500 | 750 | 1 000 | 1 250 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Bourgeons visibles le.... | 12e j | 12e j | 13e j | 14e j | 17e j | 20e j |
| % d'explantats avec bourgeons..... | 68 | 68 | 76 | 78 | 93 | 96 |
| Explantats avec "petits" bourgeons seulement | | | | | | |
| <u>Total des explantats avec bourgeons</u> | 0,16 | 0,12 | 0,21 | 0,23 | 0,16 | 0,25 |

Tableau 20 : Influence de faibles doses d'éthanol incorporées au milieu de culture sur l'aptitude à bourgeonner et la croissance des feuilles néoformées par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (1 mois de culture).

Mais le contact avec un milieu faiblement alcoolisé entraîne aussi une aug-

mentation du nombre des explantats organogènes. Tout se passe comme si l'éthanol restituait aux explantats la capacité de bourgeonner que le glucose leur empêchait de manifester. Cette action est fonction des concentrations initiales d'éthanol dans le milieu de culture.

2.8 - Conclusions :

En résumé, le mode de nutrition carbonée conditionne l'aptitude à bourgeonner des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro". A cet égard, l'anoxie se révèle favorable au bourgeonnement en abaissant le taux du glucose intratissulaire et aussi en faisant apparaître de faibles quantités d'éthanol au sein des tissus. HILDEBRANDT A.C. et A.J. RIKER ont montré (1949, 1954 et 1955) que cet alcool ne pouvait être utilisé comme seule source de carbone pour assurer la croissance "in vitro" de tissus tumoraux. Mais LEBLOVA S., I. ZIMAKOVA, D. SOFROVA, J. BARTHOVA (1969) et DOIREAU P. (1972) ont prouvé que certains tissus végétaux étaient capables de métaboliser l'éthanol. Enfin, OPATRNA J. (1974 et 1975) a décelé de l'alcool déshydrogénase dans des cellules de primordia de bourgeons apicaux de tige de blé. On peut donc penser que les méristèmes gemmaires sont capables de transformer l'éthanol. Quoiqu'il en soit, ce dernier peut induire la caulogénèse comme le confirme BINDING H. (1971) avec des cals de Petunia hybrida cultivés "in vitro".

CHAPITRE III :

ACCUMULATION ET DISPARITION DE L'ETHANOL DES
MILIEUX DE CULTURE

- o o o -

Selon sa concentration dans le milieu de culture, au contact des fragments, l'éthanol retarde la néoformation des bourgeons (1.3 - page 81) ou au contraire la rend possible dans certaines conditions ordinairement inhibitrices (2.7 - page 100). L'existence d'une activité de type fermentaire des tissus, même en atmosphère ordinaire (1.4 - page 85), nous incite à penser que l'alcool éthylique joue un certain rôle vis-à-vis du bourgeonnement. Nous avons donc recherché où se forme l'éthanol, et comment il disparaît des milieux de culture après s'y être momentanément accumulé (1.4 - page 85).

3.1 - Lieu de formation de l'éthanol :

Les fragments de racine d'Endive sont de constitution hétérogène (Matériel et Techniques : Planche I - page 7). Les tissus de la zone cambiale prolifèrent les plus activement. Néanmoins, ils peuvent être influencés par l'activité métabolique des tissus environnants.

Nous nous sommes demandé notamment si l'alcool était formé aussi bien par les cellules cambiales que par les autres. Deux séries de fragments de même taille ont été prélevées, l'une dans la zone cambiale de la racine d'Endive, l'autre dans la zone centrale comprenant du xylème et du parenchyme accompagnateur. Tous les explantats ont été placés sur un milieu gélosé ne contenant pas de substances nutritives et soumis à l'anaérobiose dans un courant d'azote de faible débit pendant deux semaines. Nous avons dosé les quantités d'alcool présentes initialement dans les tissus et à la fin du traitement, dans le milieu de culture. Les résultats (Tableau 21) exprimés en mm³ par g de substance sèche, montrent que les tissus prélevés dans la zone centrale contiennent initialement beaucoup plus d'alcool que ceux de la zone cambiale.

| Ethanol mm ³ par gPS | Quantité initiale | Après 2 semaines d'anaérobiose |
|---------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| Zone cambiale | 1,52 | 114,20 |
| Zone centrale | 5,10 | 102,50 |

Tableau 21 : Ethanol produit par différents tissus de la racine d'Endive (en 2 semaines de culture "in vitro").

C'est qu'habituellement l'alcool éthylique produit "in situ" par les racines en cours de conservation est évacué dans les parois pectocellulosiques et les éléments conducteurs. Par conséquent, ce dernier laisse un espace disponible plus important que les tissus vivants à parois minces et à contenu dense. En culture "in vitro" l'éthanol passe facilement dans le milieu

de culture. Comme celles de la zone cambiale, les cellules vivantes de la zone centrale peuvent fermenter activement. Mais le centre produit un peu moins d'alcool que le cambium car il contient davantage de cellules scléifiées inactives.

3.2 - Substrat utilisé :

Au cours des essais précédents, les tissus élaboraient l'éthanol à partir de leurs propres réserves carbonées. Nous avons déjà observé (2.2 - page 91) qu'en atmosphère ordinaire la présence de glucose dans le milieu nutritif favorisait la fermentation intrinsèque que manifestent les explantats au début de la culture. Mais les faibles quantités d'éthanol produites disparaissent très rapidement.

En anaérobiose (Tableau 22), il se confirme qu'un apport exogène de glucose n'est pas nécessaire à l'élaboration d'éthanol, mais qu'il la favorise jusqu'à un certain point. Notons surtout qu'après le traitement, l'alcool disparaît d'autant moins vite que le taux de glucose est plus élevé dans le milieu de culture.

| Traitement anaérobique 2e à 5e jour | | % de glucose dans le milieu de culture | | | |
|--|-----------|--|------|------|------|
| | | 0 | 2 | 5 | 10 |
| Ethanol dans | 5e jour : | 0,32 | 0,58 | 0,70 | 0,63 |
| le milieu | | | | | |
| mm ³ /explantat | 8e jour : | 0,03 | 0,31 | 0,51 | 0,55 |

Tableau 22 : Production d'éthanol par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" sur milieu contenant ou non du glucose.



Mode d'ensemencement

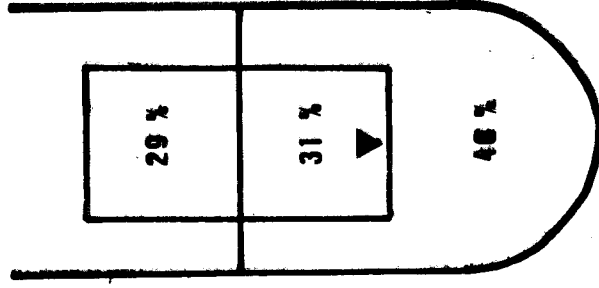
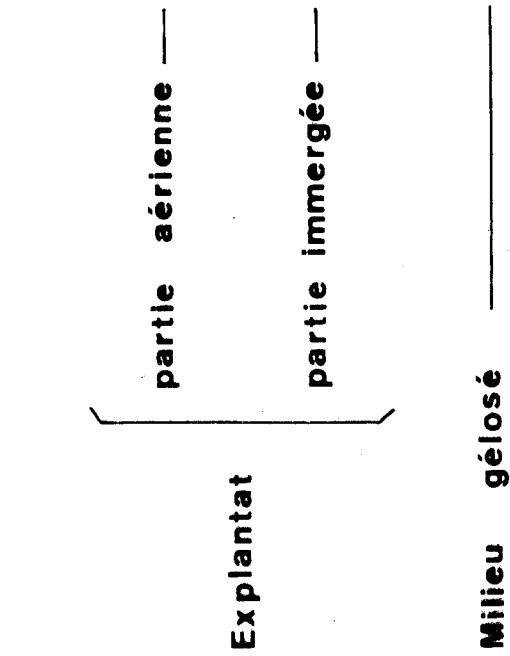
SENS NORMAL

SENS INVERSE

Quantité totale d'alcool
accumulée dans les tissus
et le milieu de culture
(7 jours d'anaérobiose)

1584 mm³
par unité
de culture

1743,5 mm³
par unité
de culture



Répartition de l'alcool produit par les fragments de racine d'Endive ensemencés en sens normal ou en sens inverse et cultivés pendant une semaine en atmosphère d'azote.

3.3 - Répartition et rejet de l'éthanol :

L'ensemencement a lieu habituellement en sens normal, c'est-à-dire la face radicaire des explantats étant placée dans le milieu gélosé. Nous nous sommes demandé si cette position influençait la répartition de l'éthanol dans les tissus et son rejet dans l'atmosphère ou le milieu de culture.

Des fragments de racine d'Endive de 2 cm X 1 cm X 1 cm sont enfoncés à demi dans l'eau gélosée (10 % de gélose, 90 % d'eau), les uns en sens normal, les autres en sens inverse.

Après une semaine de séjour dans une atmosphère d'azote, l'alcool est dosé dans les parties supérieure et inférieure des explantats ainsi que dans le milieu gélosé. Les résultats figurent dans le schéma ci-contre (page 105). Quelque soit la position des explantats, l'alcool est plus abondant dans la partie foliaire que dans la partie racinaire.

L'ensemencement en sens normal favorise donc l'évaporation de l'éthanol dans l'atmosphère tandis que la position inverse accélère la diffusion dans le milieu de culture.

C'est pourquoi, après le séjour anaérobie, on trouve moins d'éthanol dans le lot "sens normal" que dans le lot "sens inverse".



Milieux non ensemencés contenant initialement 0,1% d'éthanol

milieu initial

éthanol

milieu après un mois en
atmosphère ordinaire

éthanol

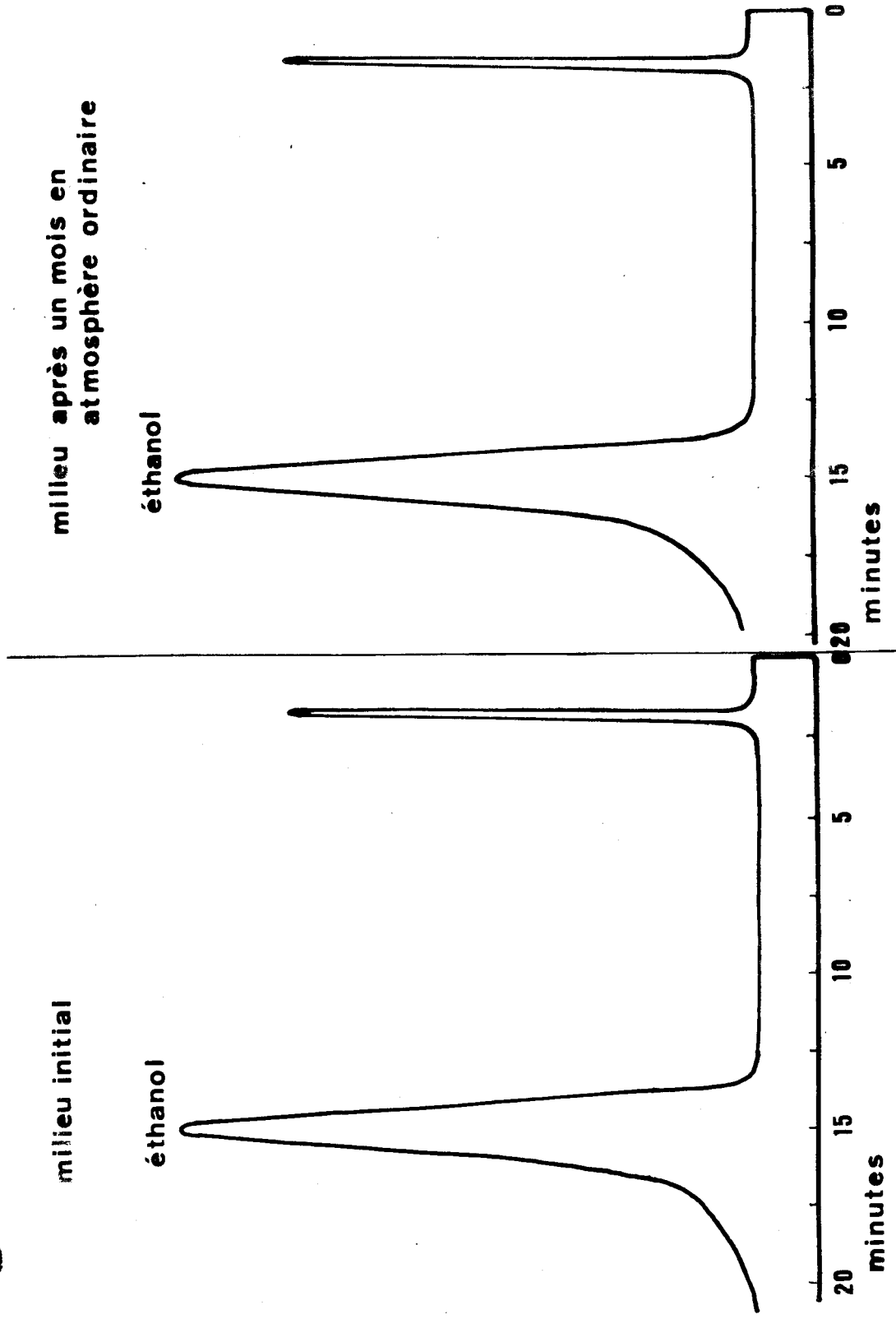


Figure 31 : Rétention de l'éthanol par les milieux gélosés non ensemencés.

Milieux ensemençés

Milieu + Explantats
(Témoins)

Milieu + Explantats
(0,1% Ethanol)

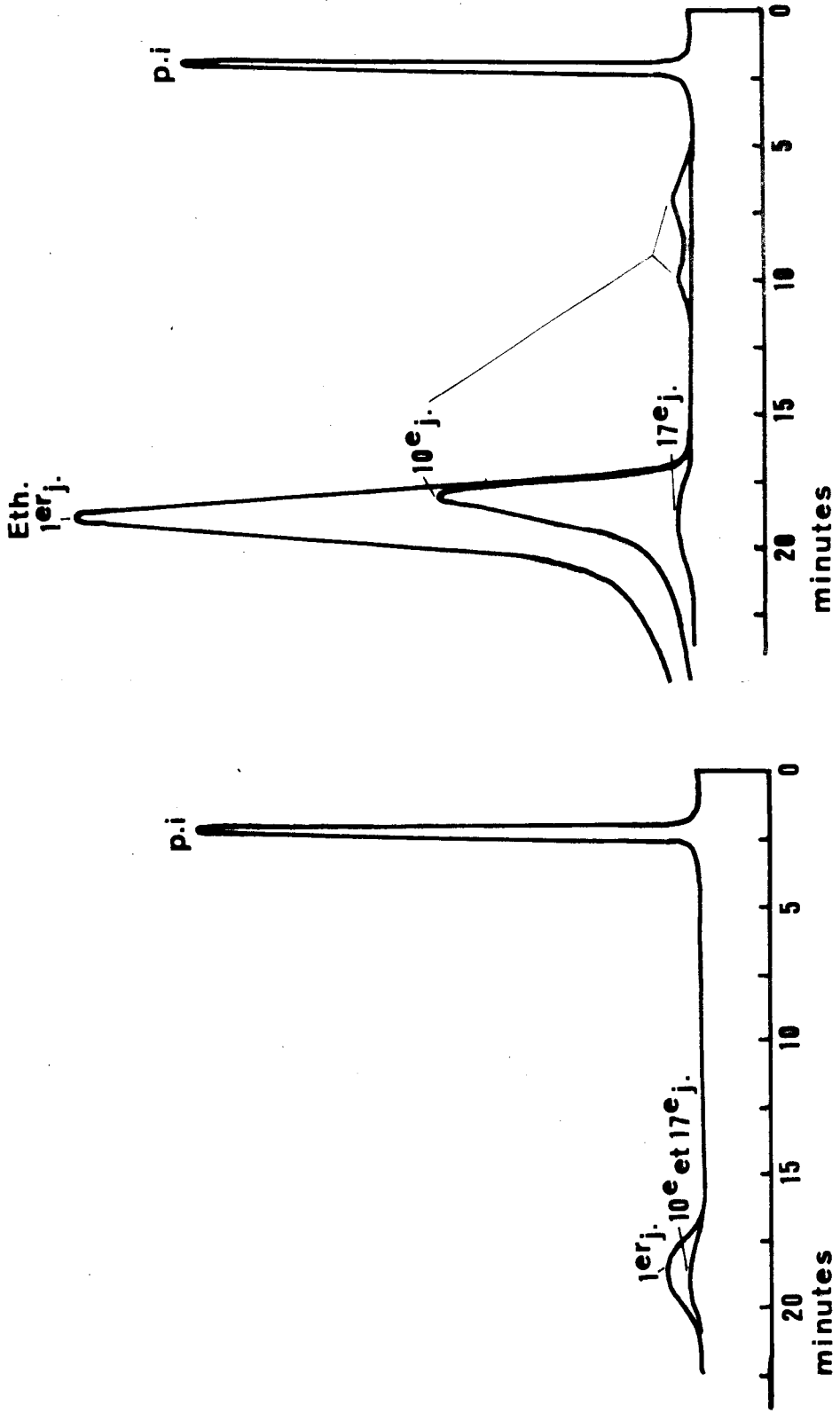


Figure 32 : Elimination de l'éthanol par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

3.4 - Disparition de l'éthanol du milieu de culture :

La disparition de l'éthanol s'effectue en atmosphère oxygénée. Nous nous sommes demandé si les tissus de racine d'Endive intervenaient dans ce processus d'élimination. 0,1 % d'éthanol ont donc été introduits aseptiquement dans les milieux de culture. Des fragments de racine d'Endive sontensemencés dans la moitié des récipients seulement et l'ensemble est placé pendant un mois en atmosphère ordinaire. L'éthanol est dosé par chromatographie en phase gazeuse. Sur les chromatogrammes la surface des pics rend compte des quantités en présence. Lorsque les milieux gélosés ne sont pasensemencés (Figure 31), ils conservent l'alcool qui y a été initialement introduit. Par contre (Figure 32), en présence de fragments de racine d'Endive, l'éthanol disparaît progressivement des cultures (Milieu + explantats). On note également que les explantats finissent par éliminer aussi les petites quantités de méthanol et d'acétaldéhyde élaborées pendant les deux premières semaines de culture.

3.5 - Mode d'élimination de l'éthanol du milieu de culture :

Pour la plante entière de betterave qui manifeste naturellement une certaine activité fermentaire, KENEFICK D. G. (1962) a montré que l'alcool s'éliminait dans l'atmosphère par l'intermédiaire des feuilles. Dans le cas des fragments de racine d'Endive, cultivés "in vitro", l'éthanol présent dans le milieu de culture, quelle qu'en soit la provenance, commence à disparaître avant même l'apparition des premiers bourgeons. Il est donc éliminé des milieux par les tissus eux-mêmes. Nous en avons recherché la présence dans l'atmosphère environnant les explantats en plaçant des pièges à SO_4H_2 concentré

Alcool éliminé dans l'atmosphère

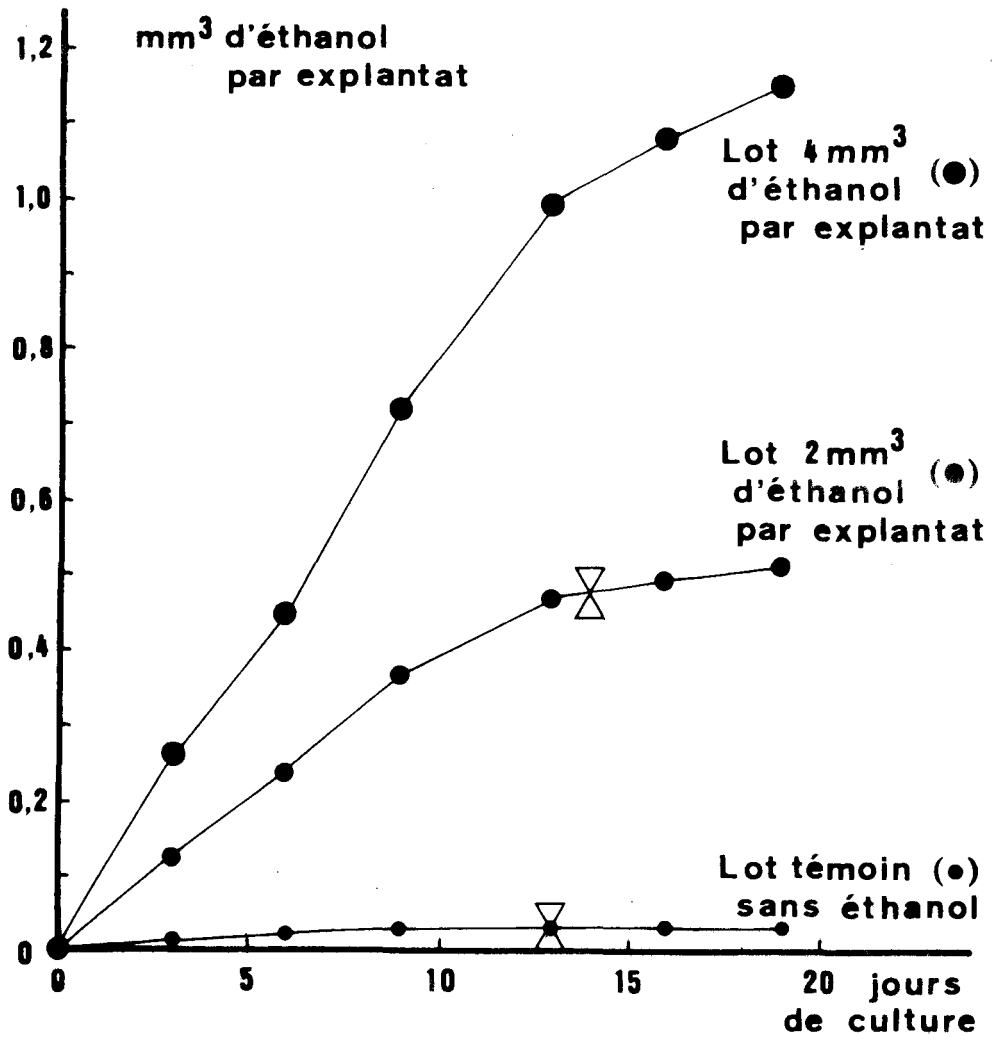


Figure 33 : Alcool éliminé dans l'atmosphère par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" sur des milieux alcoolisés ou non.



X Apparition des premiers bourgeons.

au fond des enceintes expérimentales contenant les récipients à culture. Trois lots de fragments de racine d'Endive ont été cultivés en absence ou en présence de 0,1 et 0,2 % d'éthanol dans le milieu de culture (ce qui correspond à 2 et 4 mm³ par explantat). Quelles que soient les conditions expérimentales, les tissus éliminent l'alcool dans l'atmosphère des enceintes expérimentales (Figure 33). Mais, lorsque les milieux ne contiennent pas d'éthanol, les quantités accumulées demeurent relativement faibles et le maximum est atteint rapidement avant la fin de la première semaine de culture. Par contre, les explantats traités éliminent activement des quantités d'alcool proportionnelles aux concentrations initiales du milieu de culture. Cette élimination dans l'atmosphère diminue progressivement d'intensité, mais ne s'arrête tout-à-fait que si des bourgeons apparaissent. Notons qu'alors, la quantité totale d'alcool rejetée est inférieure à celle que contenaient initialement les milieux de culture. Les tissus pourraient donc en avoir utilisé une partie.

3.6 - Nature des substances éliminées dans l'atmosphère :

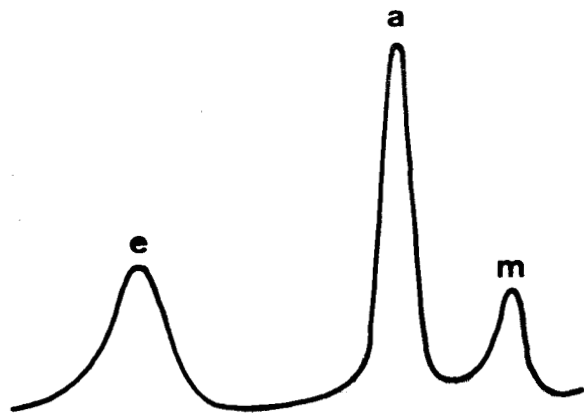
Dans les essais précédents, la méthode employée pour capturer et doser l'alcool dans l'atmosphère n'était pas spécifique de l'éthanol, mais pouvait rendre compte aussi de la présence d'autres éléments carbonés volatils (aldéhydes, alcools). Nous avons donc analysé par chromatographie en phase gazeuse l'atmosphère environnant les fragments de racine d'Endive. Après trois jours de culture dans les conditions ordinaires, on constate (Figure 34) que les explantats éliminent non seulement de l'éthanol dans l'atmosphère, mais aussi de l'acétaldéhyde et du méthanol. Au contact d'un milieu

Atmosphère des fioles de culture

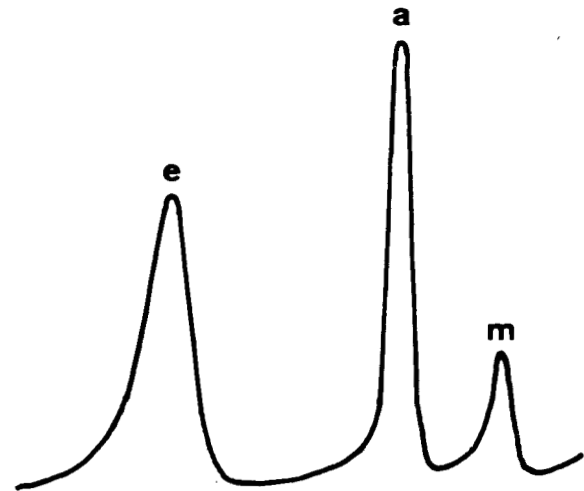
Chromatogrammes le 4^e jour

e éthanol
a acétaldéhyde
m méthanol

Ethanol : 0,1% dans
le milieu de culture



Azote : 2^e à 4^e jour
de culture



Atmosphère ordinaire

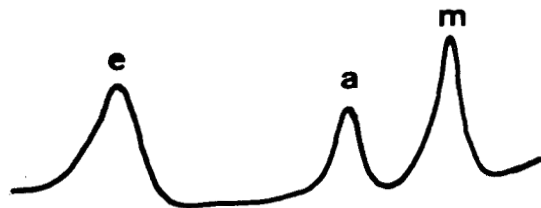


Figure 34 : Substances carbonées volatiles émises après 4 jours de culture par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" en atmosphère ordinaire, dans l'azote (2^e à 4^e jour) ou sur milieu contenant 0,1 % d'éthanol.





| Ethanol (mm3 par explantat) | Milieux de culture alcoolisés | | | | |
|--|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 |
| A l'ensemencement..... | 1 | | | | |
| Lumière { 10e jour de culture.. % d'éthanol disparu.. | 0 | 2,86 | 7,16 | 43,26 | 89,66 |
| | 100 % | 43 % | 28,4 % | 13,5 % | 10,3 % |
| Obscurité { 10e jour de culture.. % d'éthanol disparu.. | 0 | 3,07 | 7,21 | 43,30 | 89,90 |
| | 100 % | 38,5 % | 27 % | 13,4 % | 10,1 % |

Tableau 23 : Influence des conditions d'éclairage sur la disparition de l'éthanol des milieux de culture ensemencés avec des fragments de racine d'Endive.

alcoolisé, les émissions d'éthanol et surtout d'acétaldéhyde sont augmentées. Il en est de même lorsque les tissus sont replacés en atmosphère ordinaire après avoir été soumis à l'anaérobiose. Qu'il soit d'origine endogène ou exogène, l'éthanol présent dans le milieu de culture serait donc réabsorbé par les tissus et réapparaîtrait au moins en partie dans l'atmosphère sous forme d'acétaldéhyde. La présence d'oxygène faciliterait ce double processus d'absorption-élimination. Notons que l'acétaldéhyde passe d'autant plus aisément dans l'atmosphère que c'est un corps extrêmement volatil. Cela explique aussi pourquoi on n'en trouve pratiquement pas dans le milieu de culture.

3. 7 - Action de la lumière :

Nous nous sommes demandé si la lumière était nécessaire pour que l'éthanol disparaisse du milieu de culture. Différents lots de fragments de racine d'Endive ont été ensemencés sur des milieux contenant des quantités croissantes d'éthanol (exprimées en mm³ par explantat - Tableau 23). Cet alcool a été dosé dans les milieux le jour de l'ensemencement et après 9 jours de culture en atmosphère ordinaire, soit à la lumière, soit à l'obscurité. Il se confirme que les tissus se débarrassent d'autant plus activement de l'éthanol que ce dernier existe à un taux plus faible dans le milieu. Mais le phénomène n'est guère influencé par l'éclairement des explantats.

3.8 - La chlorophylle des tissus :

Les explantats cultivés à l'obscurité demeurent chlorotiques sans pour cela cesser d'éliminer activement l'éthanol du milieu de culture. Nous écarterons donc l'hypothèse selon laquelle la chlorophylle jouerait à

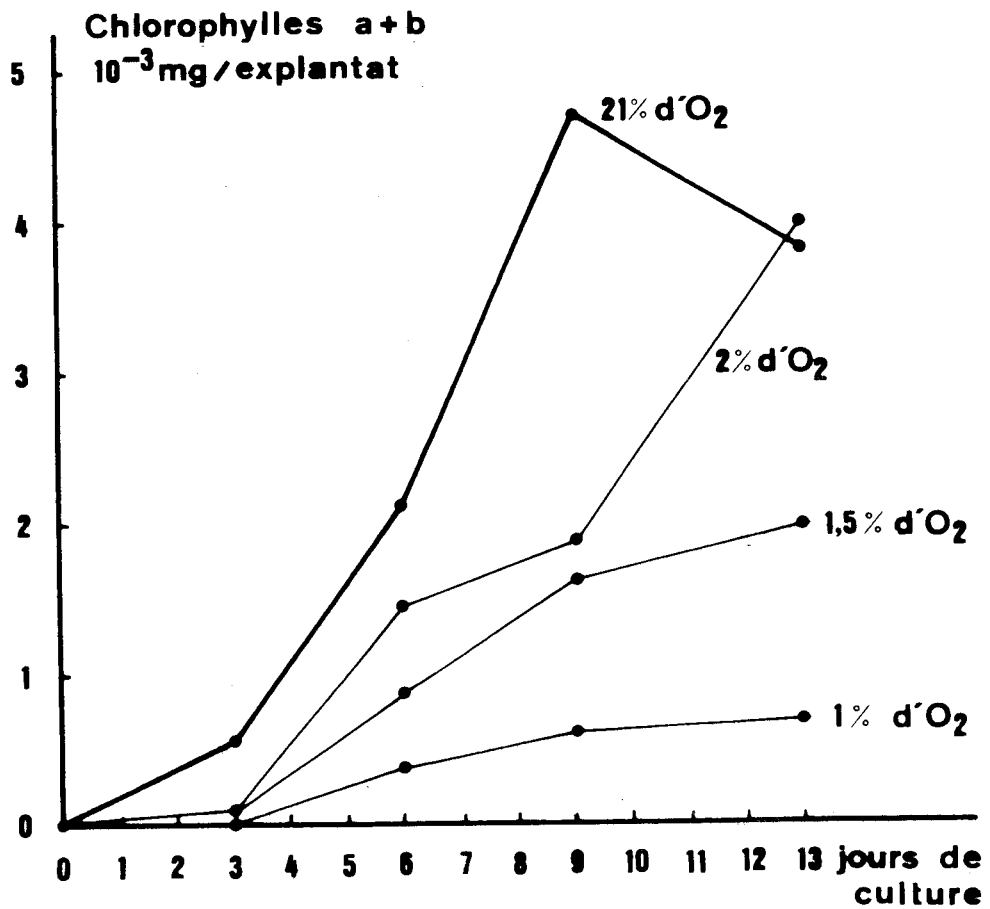


Figure 34 : Influence de la tension d'oxygène sur la synthèse de la chlorophylle par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

cet égard un rôle déterminant. "In vitro", les tissus de racine d'Endive élaborent naturellement ce pigment dès les premiers jours de culture. Comme les fragments de tubercule de topinambour (DURANTON H., R. SCHANTZ, J.G. KIENZ -1964 et SCHANTZ R., H. DURANTON, M. PEYRIERE -1967), et contrairement aux colonies tissulaires de carotte (DUBOIS J. -1973), ils produisent d'autant moins de chlorophylles (a et b) que le milieu de culture contient plus de glucose (Tableau 24). Par contre, la présence de sels minéraux facilite la synthèse des pigments.

| | Chlorophylles a + b 10 ⁻³ mg par explantat |
|--|--|
| Eau gélosée..... | 4,67 |
| Milieu de base (avec sels minéraux)..... | 6,52 |
| Milieu de base + 1 % de glucose..... | 1,60 |
| Milieu de base + 2 % de glucose..... | 0 |

Tableau 24 : Production de chlorophylles par les fragments de racine d'Endive pendant la première semaine de culture (Résultats le 10e jour).

Nous nous sommes demandé si l'anoxie influait sur l'élaboration des chlorophylles par les explantats. Ceux-ci ont été cultivés sur des milieux dépourvus de glucose et placés dans différentes conditions d'oxygénation. On constate (Figure 34) que les quantités de chlorophylles synthétisées sont d'autant plus réduites que la tension d'oxygène est plus faible dans l'atmosphère. Les résultats ne deviennent finalement comparables que

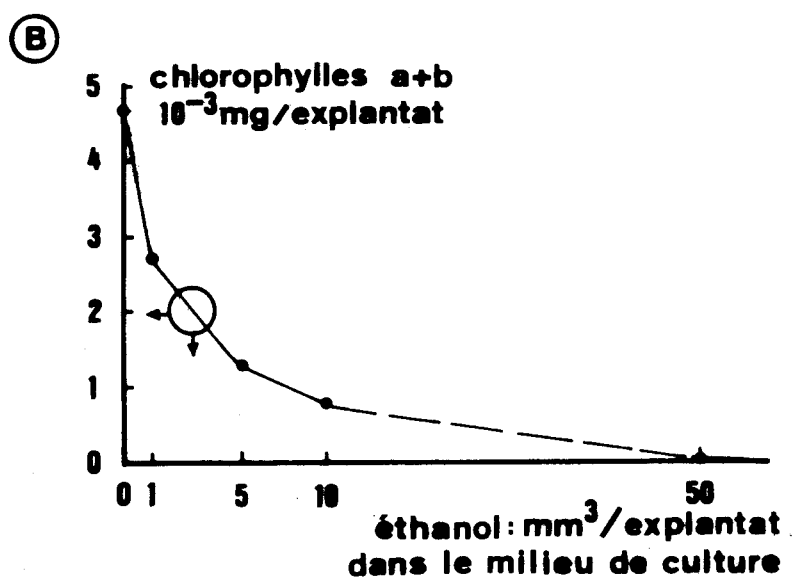
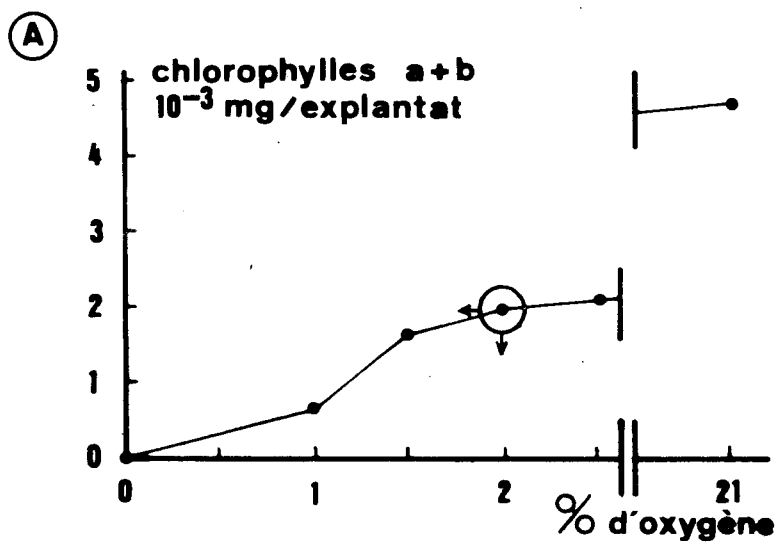


Figure 35 : Comparaison de l'influence de la tension d'oxygène (A) et de celle de l'éthanol (B) sur la synthèse de la chlorophylle par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (8 jours de culture).

lorsque les ébauches de feuilles commencent à apparaître (lots 21 % et 2 % d'O₂). Nous avons comparé l'action de la faible tension d'oxygène à celle de l'éthanol sur la production de chlorophylles par les tissus au cours de la première semaine de culture et avant le développement des bourgeons. Comme la privation d'oxygène (Figure 35 A), l'incorporation d'éthanol au milieu de culture (Figure 35 B) entraîne une réduction des chlorophylles au sein des tissus. Si l'on introduit dans le milieu une quantité d'éthanol équivalente à celle qu'y accumuleraient des explantats anoxiés, on provoque les mêmes effets que le traitement anoxiant correspondant. C'est donc bien l'éthanol qui s'oppose dans l'un et l'autre cas à la synthèse des chlorophylles. Dans nos conditions expérimentales habituelles et en particulier pendant les traitements anoxiants, la présence de glucose et d'éthanol dans le milieu de culture rendent impossible l'élaboration de chlorophylle.

CHAPITRE IV :

MODE D'ACTION DE L'ETHANOL SUR LA
NEOFORMATION DES BOURGEONS

- o O o -

4.1 - Imprégnation des tissus :

Le taux d'alcool au sein des tissus conditionne son action sur le métabolisme. Certes, il dépend surtout de l'activité fermentaire des explantats privés d'oxygène. Mais c'est parce qu'il s'accumule dans le milieu de culture que l'éthanol prolonge ses effets après le traitement. En outre, le mode de culture en tube ou en fiole de Fourneau favorise la concentration d'éthanol et d'acétaldéhyde dans les espaces intercellulaires au cours du processus d'élimination dans l'atmosphère. Or, en phase vapeur, ces deux corps se montrent rapidement toxiques pour les tissus végétaux. Le maintien en enceinte close peut même expliquer, en raison de la fermentation intrinsèque des explantats, les retards de néoformation des bourgeons et les limitations de croissance des feuilles observés parfois dans des conditions d'oxygénation normales.

4.2 - Ethanol et synthèse protéique :

En 1965, MURASHIGE T., L. S. JORDAN, J. D. MANN et E. ENGLISH

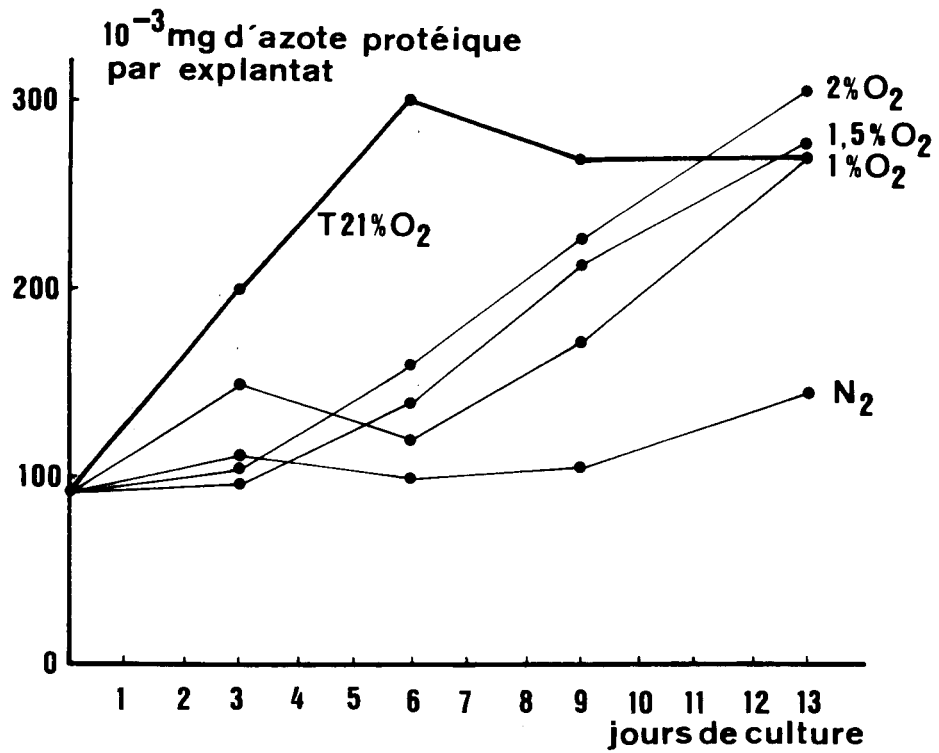


Figure 36 : L'azote protéique dans les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" dans différentes conditions d'oxygénation.

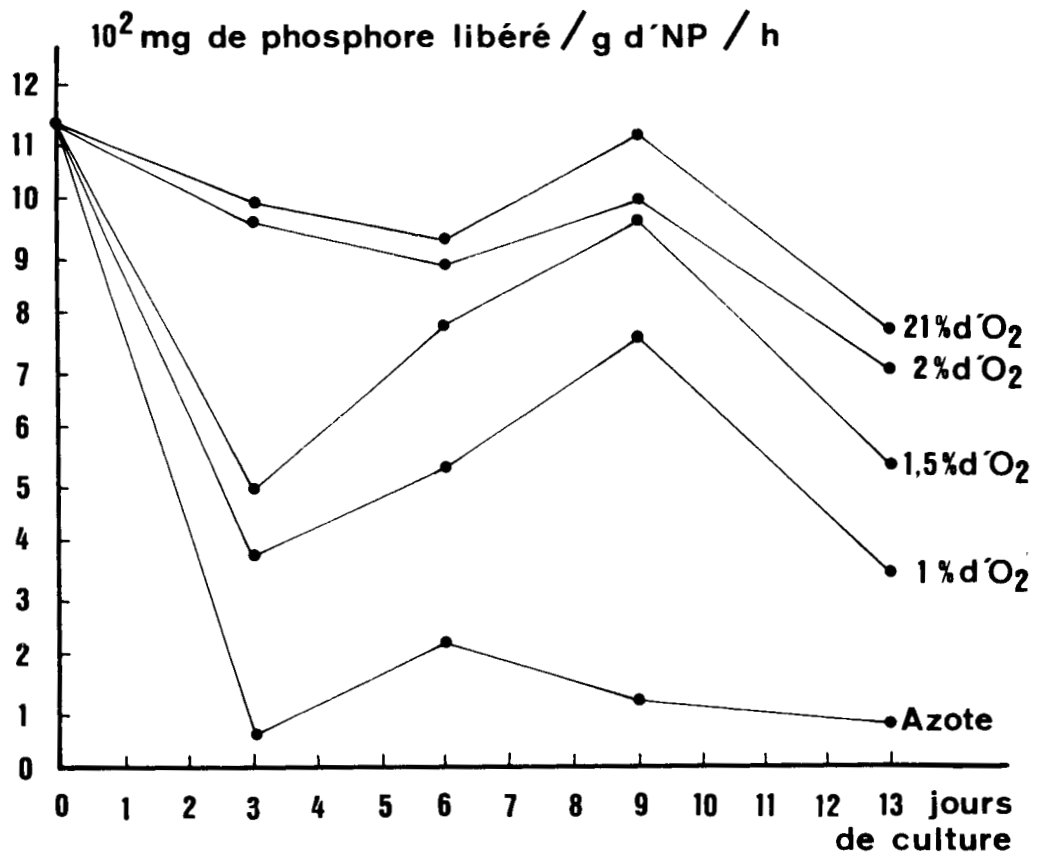


Figure 37 : Activité phosphatasique acide des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" dans diverses conditions d'oxygénation.

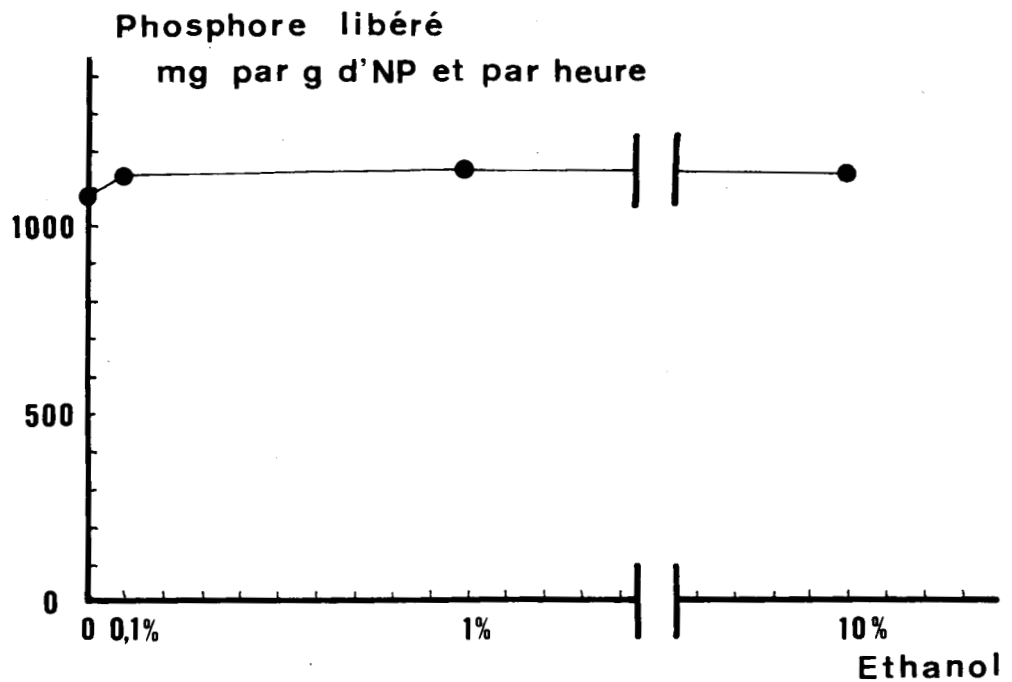


Figure 38 : Influence de l'éthanol sur l'activité phosphatasique acide des tissus de racine d'Endive cultivés "in vitro".



ont souligné la toxicité de l'éthanol à l'égard des colonies tissulaires de tabac cultivés "in vitro". Des concentrations de l'ordre de 2 500 mm³ par litre dans le milieu de culture entraînent une diminution notable de la croissance de ces tissus. Par ailleurs, les mêmes auteurs ont observé que l'éthanol inhibe la synthèse des protéines dans les tissus de coléoptile d'orge. Il va de soi que des fragments de racine d'Endive qui fermentent activement en anaérobiose stricte ne manifestent pratiquement aucune protéogenèse (Figure 36). Par contre, des quantités d'alcool peuvent empêcher l'élaboration des ébauches gemmaires sans pour autant supprimer toute synthèse protéique au sein des tissus. Ainsi (Figure 36), après deux semaines de culture, des explantats cultivés sous 1 et 1,5 % d'oxygène seulement ne se sont pas encore débarrassés de l'éthanol qui les empêche de bourgeonner. Et pourtant, ils contiennent déjà autant d'azote protéique que s'ils s'étaient développés en atmosphère ordinaire en produisant fort peu d'éthanol et en élaborant donc sans retard leurs ébauches gemmaires.

4.3 - L'activité enzymatique :

L'éthanol joue un rôle toxique vis-à-vis d'un bon nombre d'enzymes cellulaires. Mais il n'affecte pas forcément l'ensemble des biocatalyseurs.

Ainsi, la phosphatase acide (phosphomonoestérase II) du cytoplasme a une activité progressivement réduite à mesure que la tension d'oxygène diminue dans l'atmosphère (Figure 37). Mais les conditions d'oxygénation sont ici seules en cause, car l'éthanol n'exerce aucune action sur cette activité phosphatasique (Figure 38). On conçoit ainsi que, dans de nombreux cas,

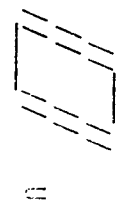
l'alcool produit au cours des traitements anoxiants ne s'oppose pas à une certaine reprise de l'activité cellulaire lorsque les tissus sont remis en présence d'une quantité d'oxygène suffisante.

- o 0 o -



A U S E S D E

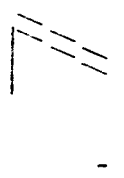
A U G M E N T A T I O N



O M B R E D E S B O U R G E O N S



R O V O O U E E P A R



A N A E R O B I O S E





| Différents lots (1 mois de culture) | Milieu n'ayant pas servi | Milieux ayant servi 9 jours | |
|--|--------------------------|-----------------------------|--|
| | | en atmosphère ordinaire | 2 % d'O ₂ (5e à 9e j.) |
| Nombre moyen de BOURGEONS par explantat | B > 5 mm | 1,42 | 2,20 |
| | B < 5 mm | 0,36 | 0,95 |
| | B + b | 1,78 | 3,15 |
| Alcool initial dans le milieu de culture | 0 | 0 | 1 155 mm ³ /L soit 1,155 ‰ |

Tableau 25 : Néof ormation des bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" sur des milieux ayant déjà servi.

CHAPITRE I :

LOCALISATION DES FACTEURS STIMULANT LE BOURGEONNEMENT

- o o o -

Lorsqu'il y a augmentation du nombre des bourgeons à la suite d'un traitement anaérobie, on peut en rechercher les causes dans le milieu de culture ou dans les tissus eux-mêmes. C'est ce que nous avons envisagé successivement.

1.1 - Milieu de culture :

Des explantats ont été ensemencés d'une part sur le milieu nutritif habituel et d'autre part sur des milieux ayant déjà servi à cultiver des tissus de racine d'Endive pendant 9 jours soit en atmosphère ordinaire, pendant toute cette période, soit en présence de 2 % d'oxygène seulement entre le 5e et 9e jour de culture. Dans ce premier cas, les explantats produisent plus de bourgeons que dans les conditions habituelles (Tableau 25). Ce sont bien les modifications intervenues au cours du traitement anaérobie qui en sont cause puisque le milieu déjà utilisé en atmosphère ordinaire est moins apte à permettre la néoformation des bourgeons.

Dans le cas où le bourgeonnement est stimulé, le milieu de culture renferme de petites quantités d'alcool rejetées par les tissus de

racine d'Endive pendant le séjour anoxiant. Or, on a vu (3e Partie : 2-7, page 100) qu'à faible dose, l'éthanol pouvait accroître le nombre des explantats organogènes. Mais nous nous sommes demandé s'il augmentait aussi le nombre des bourgeons produit par chacun d'entre-eux. Pour cela, des fragments de racine ont été cultivés sur des milieux contenant de 0,25 à 1,50 ‰ d'éthanol (Figure 39).

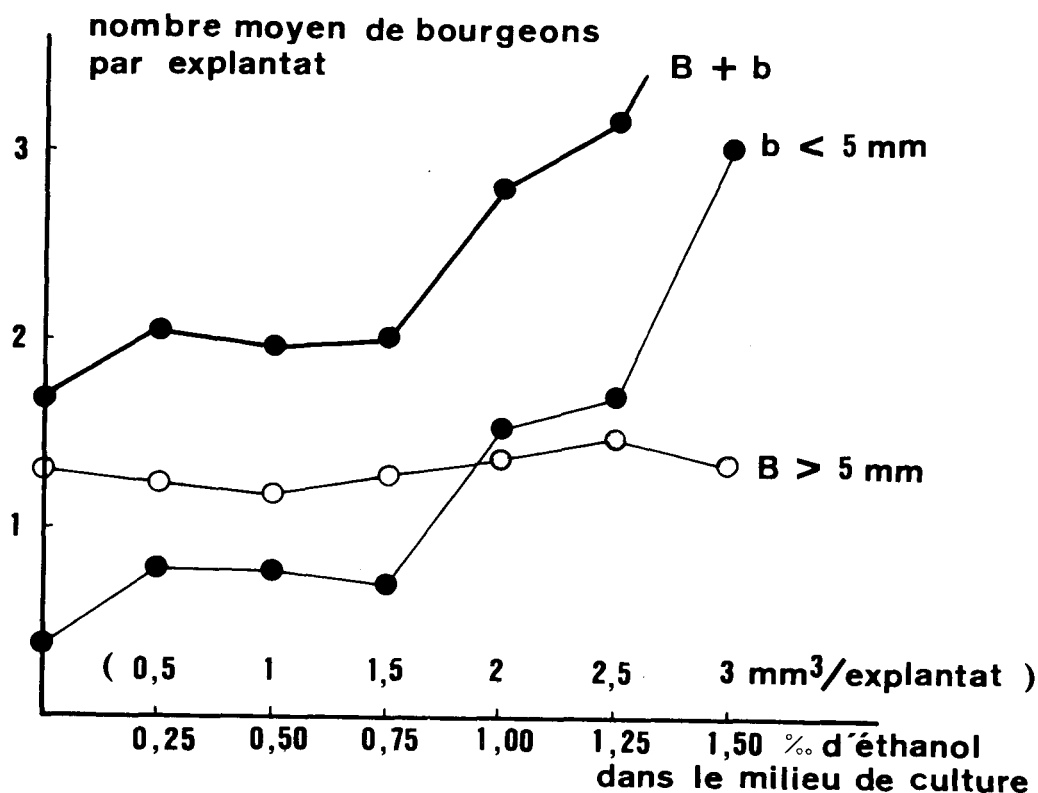


Figure 39 : Influence de l'éthanol à faible dose sur le nombre de bourgeons néoformés par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (1 mois de culture).

Dans tous les cas, en présence de faibles doses d'alcool, le nombre total de bourgeons néoformés est plus important que dans le lot témoin, cultivé dans les conditions ordinaires. Cette augmentation concerne surtout les bourgeons qui restent de petite taille, alors que les premiers formés, qui sont les plus vigoureux et dont les feuilles se développent de façon importante,

demeurent en nombre à peu près constant et inhibent ceux qui apparaissent par la suite. Incorporé au milieu de culture, l'éthanol agit donc de la même façon qu'un traitement anoxiant générateur d'éthanol.

D'une manière générale, une dose relativement faible d'éthanol ne retarde pas considérablement la néoformation des bourgeons et augmente à la fois le nombre des explantats organogènes et celui des bourgeons qu'ils produisent. C'est ce qui se passe généralement lorsque le milieu de culture ne contient pas beaucoup plus de 1 ‰ d'éthanol. Par contre, on sait (2e Partie : 1.3, page 83) qu'à des taux plus élevés, l'alcool s'avère toxique et peut empêcher la néoformation des bourgeons ou limiter la croissance des feuilles. Ainsi, les résultats du tableau 26 montrent qu'à 2,5 ‰ l'éthanol réduit le nombre d'explantats organogènes.

| ‰ d'éthanol dans le milieu de culture | | 0 | 1 | 2,5 |
|---|----------------|----------|----------|----------|
| Date d'apparition des bourgeons | | 10e jour | 12e jour | 20e jour |
| Nombre d'explantats | avec bourgeons | 86 | 88 | 75 |
| | avec B > 5 mm | 74 | 70 | 42 |
| Nombre moyen de BOURGEONS par explantat | B > 5 mm | 1,03 | 1,53 | 1,35 |
| | b < 5 mm | 0,24 | 0,57 | 1,47 |
| | Total : | 1,27 | 2,10 | 2,82 |

Tableau 26 : Influence de l'éthanol sur la production de bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" en atmosphère ordinaire (4 semaines de culture).

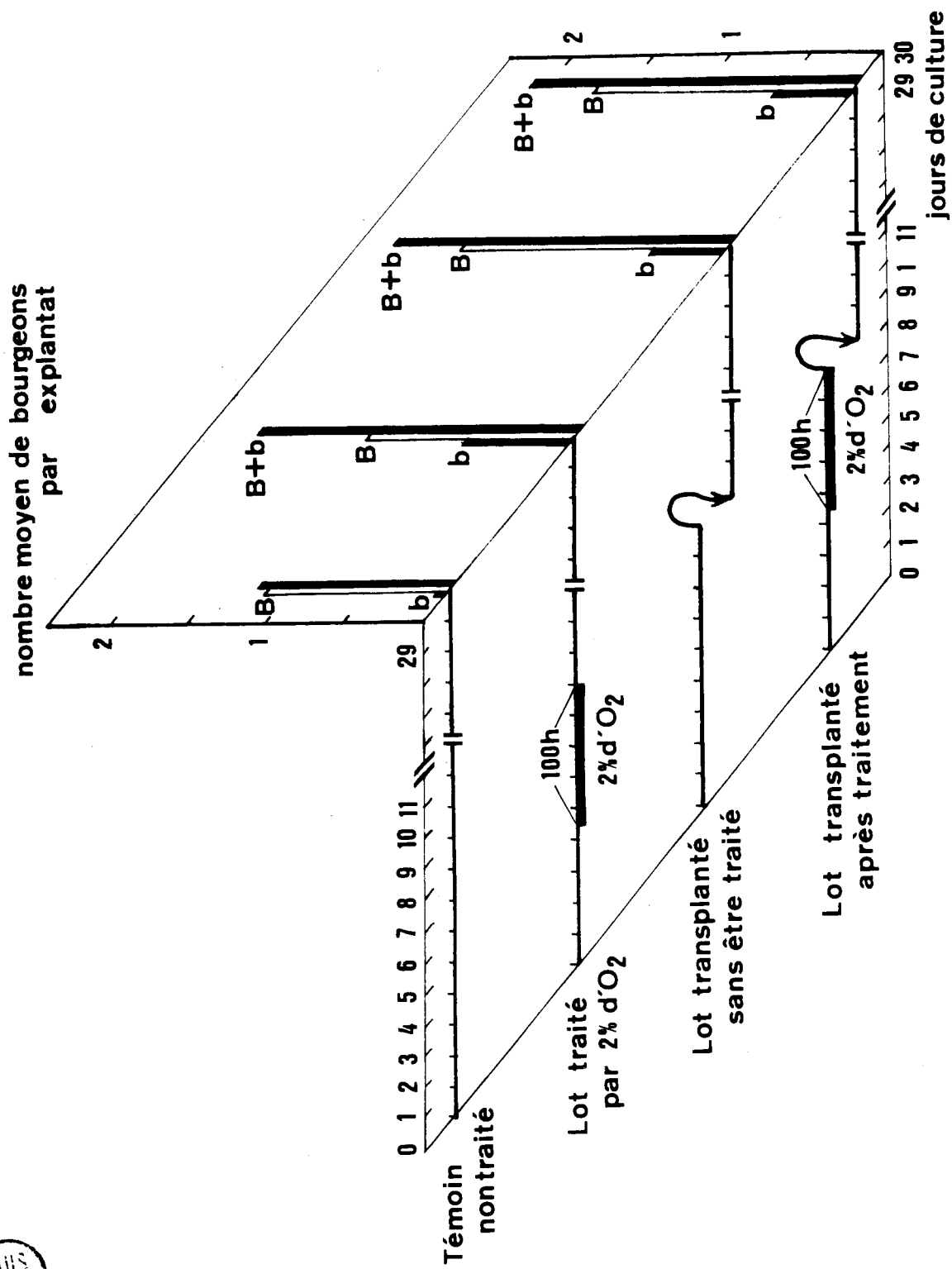


Figure 40 : Transplantation sur milieu neuf de fragments de racine d'Endive soumis ou non à une faible tension d'oxygène (1 mois de culture).

En outre, ceux-ci bourgeonnent tardivement et ne sont pas toujours capables d'assurer la croissance des feuilles. En dépit de cela, le caractère favorable au bourgeonnement de l'éthanol se trouve confirmé car un certain nombre d'explantats cultivés en présence de 2,5 ‰ d'éthanol produisent finalement davantage de bourgeons que ceux des deux autres lots.

1.2 - Tissus :

Nous pouvons nous demander si l'efficacité du traitement anaérobie ne résultait pas du fait que les tissus étaient maintenus en présence de l'éthanol rejeté dans le milieu de culture. Pour le vérifier, nous avons soustrait les explantats à l'influence du milieu immédiatement après leur séjour (100 h.) dans une atmosphère ne renfermant que 2 % d'oxygène. On constate (Figure 40) qu'en dépit de leur transfert sur un milieu dépourvu d'éthanol, ces explantats produisent autant de bourgeons que s'ils étaient restés au contact de leur milieu initial. Mais on obtient la même stimulation quand on change de milieu des fragments de racine n'ayant pas subi de traitement. Ce n'est donc pas forcément l'anoxie, mais plutôt la transplantation elle-même qui a augmenté le nombre des bourgeons.

1.3 - Transplantation et fermentation intrinsèque :

La transplantation, comme l'anoxie, peut-elle favoriser la production d'alcool par les tissus et stimuler ainsi le bourgeonnement ? Pour le savoir, nous avons évalué les quantités d'alcool présentes dans les milieux de culture sur lesquels des fragments de racine d'Endive ont été, soit cultivés selon la méthode habituelle, soit déplacés sur le même milieu,

┌ 5 mm³ d'alcool dans 100 ml de milieu

└ 1 jour de culture

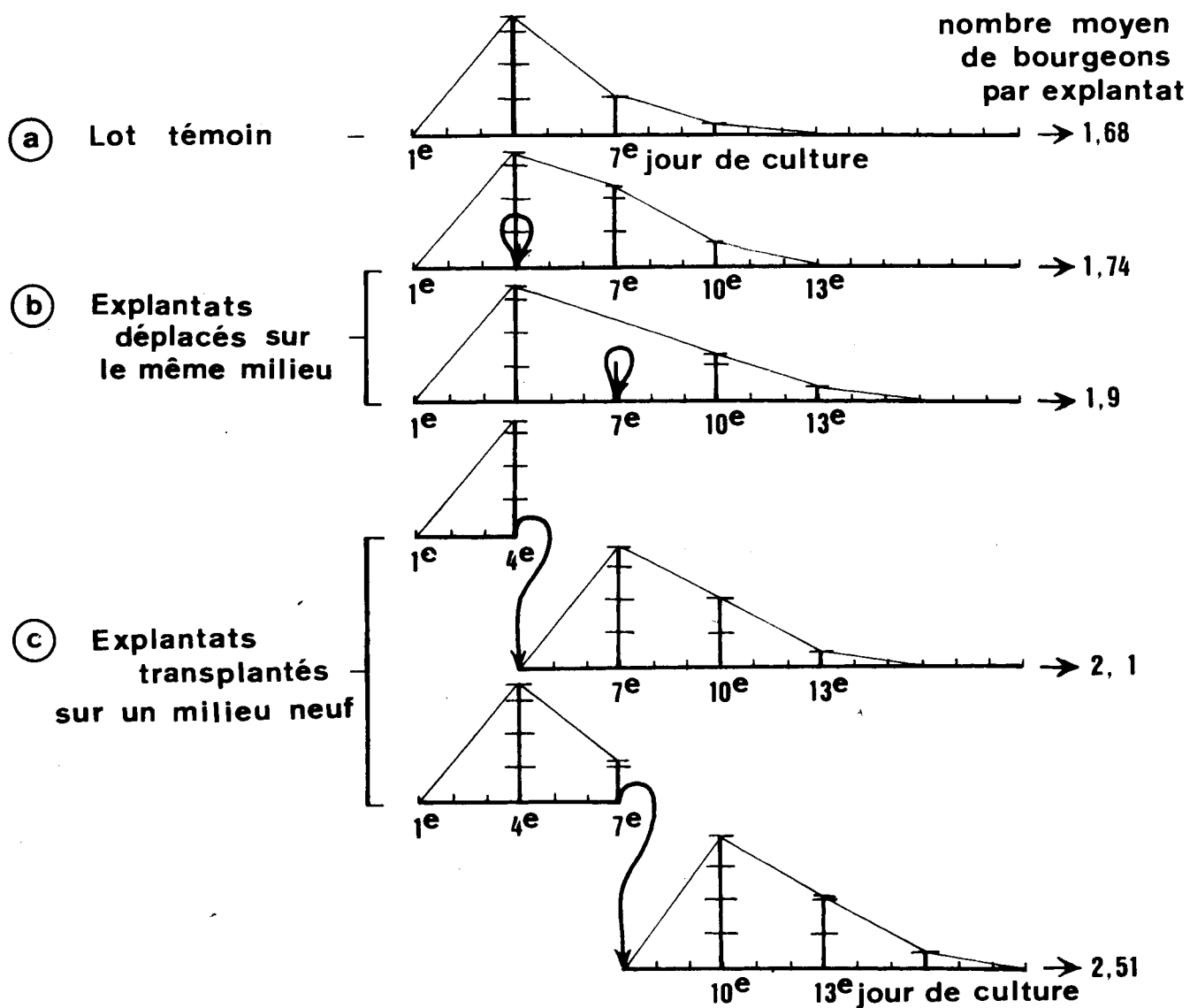


Figure 41 : Influence de la transplantation sur la production d'alcool par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

soit transplantés sur des milieux neufs après 3 ou 6 jours de culture. Tous les lots étaient maintenus en atmosphère ordinaire. La figure 41 résume, sous forme schématique, les différentes conditions expérimentales réalisées. L'alcool a été dosé dans le milieu les 4e, 7e, 10e, 13e, 16e et éventuellement 19e jour de culture. Les bourgeons sont dénombrés après un mois.

Les témoins, qui ne subissent aucune manipulation, rejettent d'abord une certaine quantité d'éthanol dans le milieu. Mais cet alcool disparaît ensuite progressivement après 3 jours de culture. Mais, lorsqu'ils sont transplantés les fragments de racine d'Endive accumulent à nouveau temporairement de l'éthanol dans le milieu, ce qui semble la cause du nombre accru de bourgeons. Le simple déplacement des explantats sur leur milieu initial conduit à des résultats comparables par suite de l'élimination plus lente de l'éthanol du milieu.

On peut penser que toute manipulation des explantats amène à enfoncer plus ou moins les tissus dans le milieu gélosé, ce qui provoque une asphyxie partielle des cellules superficielles et par conséquent une production momentanée d'alcool. Les résultats précédents montrent que ce phénomène est d'autant plus intense que le substrat gélosé contient moins d'alcool, en effet, le transfert sur un milieu neuf est plus efficace que le déplacement sur un milieu renfermant encore un peu d'alcool. C'est ce qui explique aussi qu'un explantat déplacé sur son propre milieu le 7e jour produit finalement plus d'éthanol et donc plus de bourgeons que celui qui subit la même manipulation après seulement 3 jours de culture, c'est-à-dire à un moment où la quantité d'alcool est plus importante. Il y aurait réduction de l'activité enzymatique productrice d'éthanol à mesure que celui-ci

s'accumule. On sait en effet (WRATTEN C. C., W. W. CLELAND -1963-) que l'alcool éthylique est un des multiples produits du métabolisme capable d'inhiber le système enzymatique qui lui a donné naissance (ROBERTS R. B., P. H. ABELSON, D. B. COWIE, E. T. BOLTON, R. J. BRITTEN -1955-).

1.4 - Conclusions :

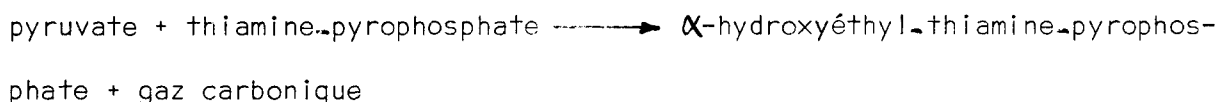
Il y a stimulation du bourgeonnement lorsque les tissus de racine d'Endive sont en présence d'une faible quantité d'éthanol, au moment de l'initiation des bourgeons. Ainsi l'anoxie totale ou partielle au cours de la première semaine de culture, ou même le simple transfert sur un milieu neuf, qui sont des conditions favorables à la production d'alcool, agissent de façon analogue sur le bourgeonnement.

CHAPITRE II :

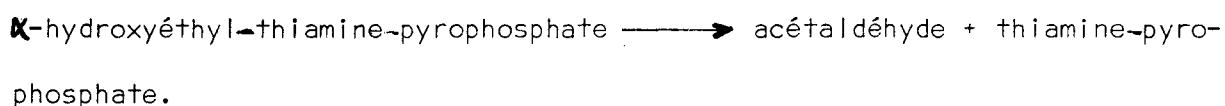
TRANSFORMATION DE L'ETHANOL PAR LES TISSUS

- o 0 o -

Nous avons montré (2e partie : 3.5, page 109) que les fragments de racine d'Endive rejettent de l'acétaldéhyde et de l'éthanol dans l'atmosphère. En l'absence d'oxygène, l'acétaldéhyde provient de l'activité de la pyruvate-décarboxylase. Cette enzyme contient de la thiamine-pyrophosphate et du magnésium et catalyse les réactions suivantes :



et



En milieu oxygéné, par contre, le pyruvate ne donne plus d'acétaldéhyde. Celui-ci résulterait donc, alors, de la déshydrogénation enzymatique d'une partie de l'éthanol.

2.1 - L'alcool-déshydrogénase :

En milieu oxygéné, l'acétaldéhyde peut être produit par l'alcool-N. A. D-oxydo-réductase (alcool-déshydrogénase), capable d'oxyder

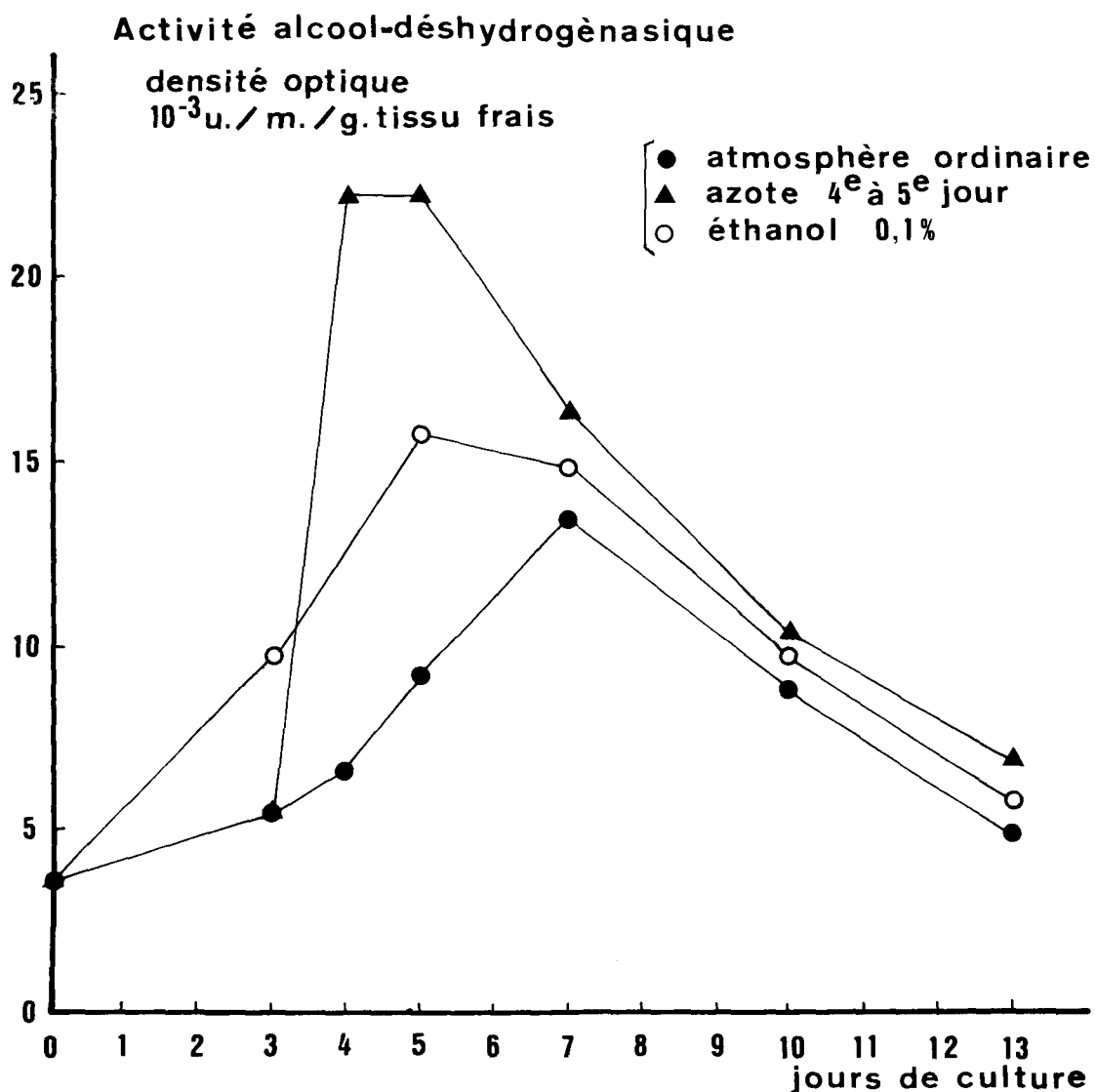


Figure 42 : Influence d'un traitement anoxiant et de la présence d'éthanol dans le milieu de culture sur l'activité alcool-déshydrogénasique des tissus de racine d'Endive cultivés "in vitro".

l'éthanol et les autres alcools primaires (SUND H., H. THEORELL -1963-). Or, c'est précisément cette même enzyme, dont l'action est réversible, qui, en anaérobiose, élabore l'éthanol. Nous avons donc vérifié si, après un traitement anaérobie ou cultivés en présence d'alcool, les tissus de racine d'Endive manifestaient une certaine activité alcool-déshydrogénasique. Des explantats ont été ensemencés sur le milieu nutritif habituel mais soumis à l'anaérobiose entre le 4e et le 5e jour de culture, avant d'être replacés en atmosphère ordinaire avec les témoins. Un autre lot a été cultivé sur un milieu contenant 0,1 % d'éthanol.

A l'ensemencement puis après 3, 4, 5, 7, 10 et 13 jours de culture, nous avons déterminé l'activité alcool-déshydrogénasique potentielle des tissus. Celle-ci est mise en évidence par spectrophotométrie. On suit à 340 nm la formation de NADH à partir de N.A.D.⁺ (β-nicotinamide-adénosine dinucléotide), en présence d'éthanol et d'un extrait tissulaire contenant l'alcool-déshydrogénase. L'adjonction d'éthanol et de N.A.D.⁺ dans un milieu réactif maintenu à pH 9 font agir l'enzyme de manière à produire de l'acétaldéhyde suivant la réaction :



Les résultats (variations de densité optique par minute et par gramme de tissu frais) révèlent donc à la fois la présence de l'enzyme et sa capacité à former de l'acétaldéhyde à partir de l'éthanol.

On constate (Figure 42) que la possibilité d'oxyder l'alcool varie selon les conditions expérimentales. Chez les témoins l'activité alcool-déshydrogénasique augmente progressivement jusqu'à la fin de la pre-

mière semaine de culture et décroît ensuite. En présence d'éthanol dans le milieu, les valeurs obtenues sont rapidement supérieures à celles observées dans les conditions ordinaires mais diminuent aussi après 7 jours de culture. Le séjour anaérobie accroît considérablement les potentialités alcool-déshydrogénasiques des tissus de racine d'Endive. Lorsqu'ils sont replacés en atmosphère ordinaire, les explantats anoxiés sont ainsi capables d'oxyder des quantités d'éthanol plus importantes que les témoins. Cette aptitude à transformer l'alcool en acétaldéhyde diminue progressivement comme dans les autres lots au cours de la seconde semaine de culture. Il est intéressant de noter que dans tous les cas cette diminution de l'activité alcool-déshydrogénasique intervient lorsque les premières ébauches gemmaires sont formées.

2.2 - La formation d'acétaldéhyde :

Nous avons vu (2e partie : 3.5, page 110) que les quantités d'éthanol et d'acétaldéhyde libérées par les tissus de racine d'Endive augmentent au contact d'un milieu alcoolisé ou lorsque les explantats sont replacés en atmosphère ordinaire après avoir été soumis à l'anaérobiose. Ces modifications semblent résulter de l'activité métabolique des tissus et nous avons tenté de préciser dans quelle mesure, en conditions aérobies, l'éthanol endogène était, soit rejeté dans l'atmosphère, soit transformé en acétaldéhyde. Pour cela, nous avons cultivé deux lots de fragments de racine d'Endive dont l'un a été placé dans une atmosphère d'azote du 4e au 5e jour de culture. Nous avons comparé les quantités d'éthanol et d'acétaldéhyde rejetées dans l'atmosphère alors que la culture se poursuit en atmosphère ordinaire. Les 5e, 6e, 7e, 8e, 11e et 13e jour de culture, on injecte dans un chromatographe en phase gazeuse 5 ml de l'atmosphère prélevée dans les fioles où sont cultivés

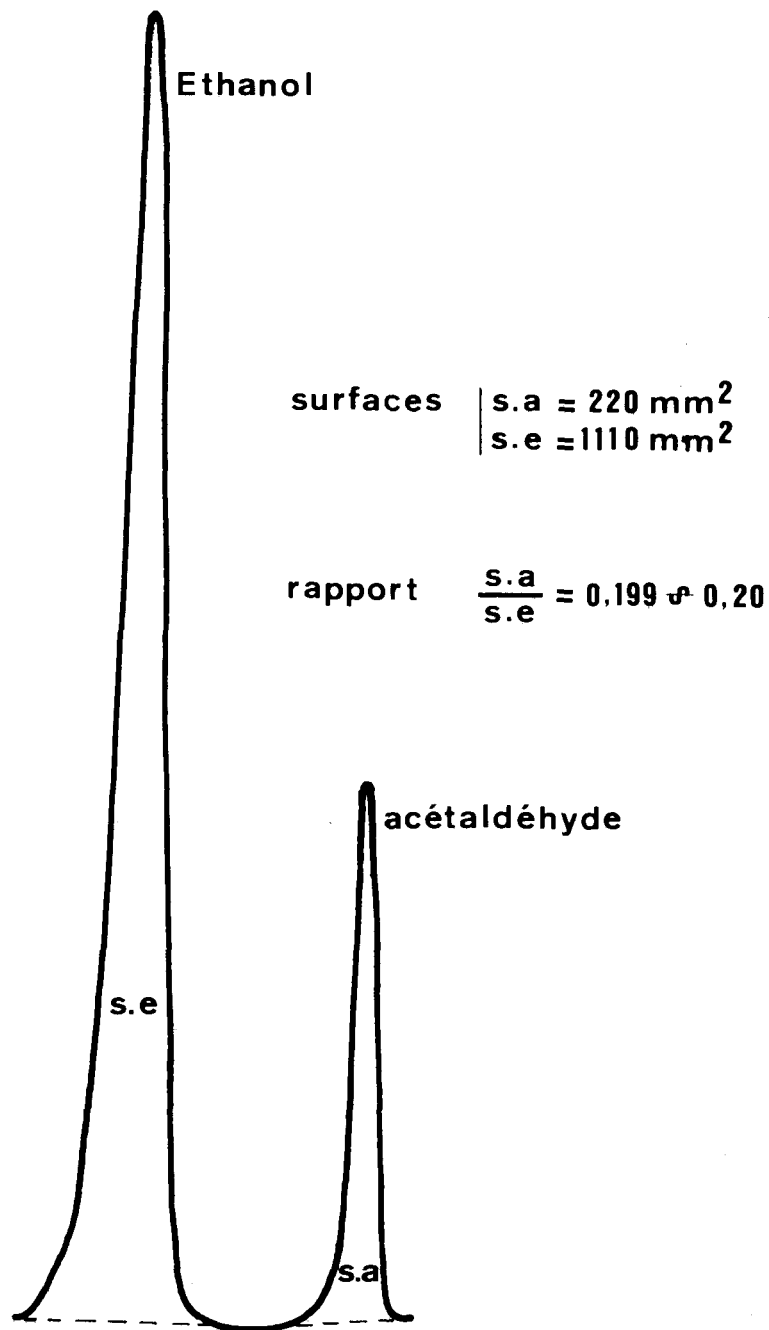


Figure 43 : Chromatogramme obtenu par injection de 5 ml de l'atmosphère prélevée dans les fioles où sont cultivés les fragments de racine d'Endive.

(Gaz vecteur, Azote U, Ionisation de flamme, Colonne de poropak Q 100/120 mesh en acier inoxydable 2 m X 1/8", température du four 80°).

les fragments de racine d'Endive. Les chromatogrammes obtenus comportent généralement les deux pics reproduits dans la figure 43 et dont la surface varie selon les quantités d'acétaldéhyde et d'éthanol présentes. L'évolution du rapport $\frac{S.a}{S.e}$ traduit l'importance relative des deux substances volatiles et renseigne indirectement sur les phénomènes métaboliques qui concernent ces deux composés.

En présence d'oxygène, c'est-à-dire après 4 jours de culture pour les explantats traités comme pour les témoins, les tissus cessent de fermenter. L'éthanol et l'acétaldéhyde qu'ils ont formés s'éliminent dans l'atmosphère. Chez les témoins (Tableau 27), qui ont produit peu d'éthanol, le rapport $\frac{S.a}{S.e}$ oscille d'abord entre 0,2 et 0,3 puis augmente à la fin de la première semaine de culture.

| Jours de culture..... | 5e | 6e | 7e | 8e | 11e | 13e |
|--|------|------|------|------|------|------|
| Lot témoin..... | 0,23 | 0,18 | 0,30 | 0,20 | 0,55 | ∞ |
| Lot ayant séjourné dans l'azote (4e à 5e jour).. | 0,90 | 0,51 | 0,21 | 0,78 | 2,20 | 3,00 |

Tableau 27 : Rapport $\frac{S.a}{S.e}$ des quantités d'acétaldéhyde et d'éthanol rejetées dans l'atmosphère par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" ayant subi ou non l'anaérobiose.

C'est que des quantités appréciables d'acétaldéhyde continuent d'être élaborées tandis que l'éthanol disparaît. La valeur obtenue après 12 jours de culture indique que les explantats éliminent encore de l'acétaldéhyde alors que

l'alcool a complètement disparu des milieux. Immédiatement après le séjour dans l'azote le rapport $\frac{S.a}{S.e}$ est élevé parce que les explantats se débarrassent activement de l'acétaldéhyde formé en anaérobiose et non encore réduit en éthanol. Puis la disparition de cet acétaldéhyde résiduel d'origine anaérobiose accumulé surtout dans les tissus entraîne une diminution rapide du rapport $\frac{S.a}{S.e}$. Mais ce dernier ne descend jamais au-dessous du minimum observé en conditions ordinaires et ceci bien que les explantats anoxiés rejettent beaucoup plus d'éthanol dans l'atmosphère que les témoins. Notons enfin, qu'en raison de l'élimination progressive de l'éthanol du milieu, le rapport $\frac{S.a}{S.e}$ augmente après une semaine de culture. Il faut donc admettre qu'en présence d'oxygène la synthèse d'acétaldéhyde se poursuit en l'absence de processus fermentaire. Compte-tenu des valeurs observées, le phénomène est plus important lorsque les tissus ont subi l'anoxie qu'en conditions ordinaires.

Ces résultats accréditent l'hypothèse de la transformation d'une partie de l'éthanol endogène en acétaldéhyde. On a vu (2.1, page 125) que les tissus de racine d'Endive sont particulièrement aptes à effectuer cette reconversion vers la fin de la première semaine de culture, c'est-à-dire à la période d'élaboration des premières ébauches germaires. La diminution du rapport $\frac{S.a}{S.e}$ qui intervient à ce moment là pourrait s'expliquer en partie par le fait que l'acétaldéhyde produit s'insère alors plus facilement dans le métabolisme qu'il n'est éliminé dans l'atmosphère.

2.3 - Acétaldéhyde et bourgeonnement :

Si l'éthanol stimule le bourgeonnement en se transformant en acétaldéhyde, ce dernier doit produire directement les mêmes effets. C'est

ce que nous avons voulu montrer en incorporant ce composé carboné au milieu de culture. La difficulté résulte de ce qu'à l'état pur l'acétaldéhyde est extrêmement toxique pour les tissus de racine d'Endive. A son contact, à l'état vapeur, les explantats se nécrosent rapidement. D'autre part, comme il est très volatil l'acétaldéhyde employé à faible dose disparaît facilement des milieux de culture même en l'absence de fragments de racine. Nous avons néanmoins obtenu quelques résultats démonstratifs sur un milieu dans lequel nous avons introduit 0,1 % d'acétaldéhyde immédiatement avant l'ensemencement.

Après deux semaines de culture, les explantats bourgeonnent en plus grand nombre et produisent individuellement plus de bourgeons que les témoins (Tableau 28) cultivés sur le milieu habituel.

| (1 mois de culture) | Témoin | Acétaldéhyde 0,1 % |
|---|--------|--------------------|
| % d'explantats avec bourgeons..... | 71 | 90 |
| Nombre moyen de bourgeons par explantat.. | 1,83 | 2,40 |

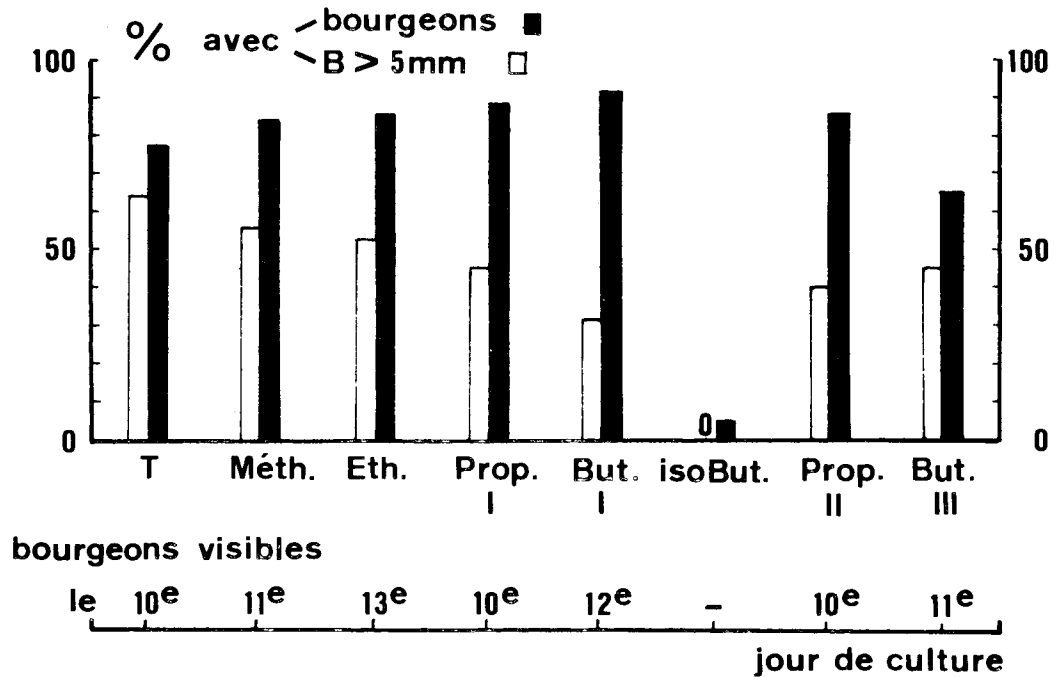
Tableau 28 : Influence de l'acétaldéhyde sur le bourgeonnement des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".

L'acétaldéhyde stimule donc la néoformation des bourgeons. Compte-tenu de son caractère extrêmement volatil, il faut admettre qu'il intervient dès le début de la culture.

2.4 - Action des alcools :

Nous avons montré que l'éthanol pouvait agir sur le bour-

(a) EXPLANTATS



(b) BOURGEONS

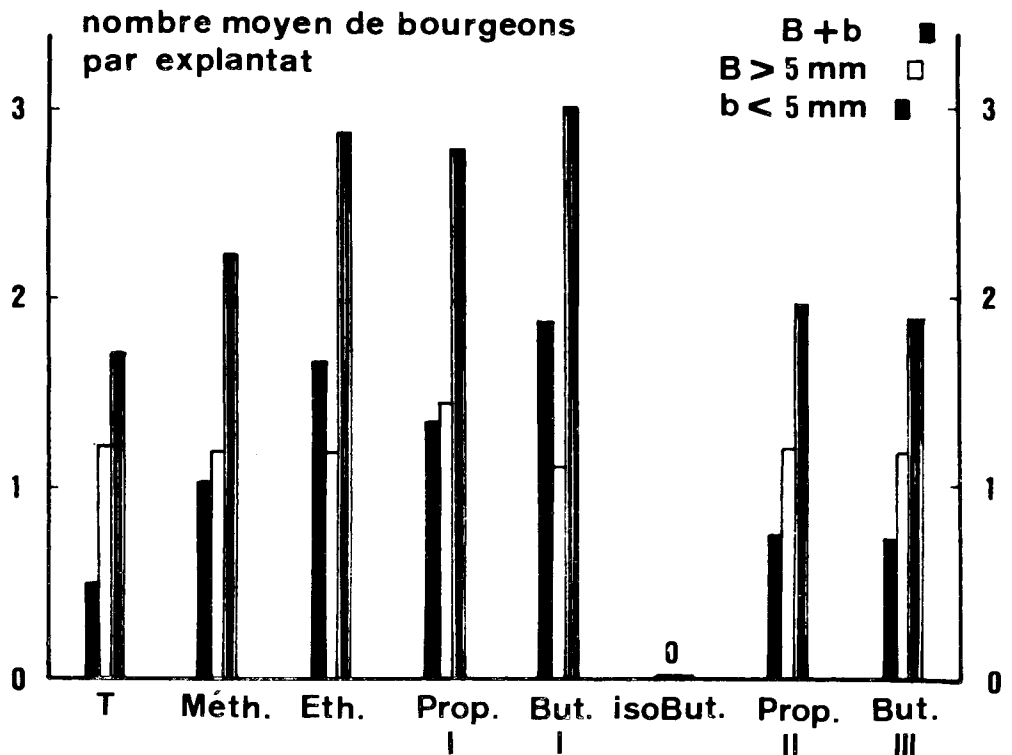


Figure 44 : Action de différents alcools sur le bourgeonnement de fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" (1 mois de culture).

- a) Aptitude des tissus à bourgeonner ;
- b) Intensité du bourgeonnement.

geonnement grâce à sa transformation aérobie en acétaldéhyde par l'intervention de l'alcool-déshydrogénase. Mais cette enzyme peut aussi oxyder d'autres alcools (SUND H., H. THEORELL -1963-) pour donner les aldéhydes correspondants. Nous nous sommes demandé si cela stimulerait aussi la néoformation des bourgeons. Des fragments de racine d'Endive ont été ensemencés sur des milieux contenant du méthanol, éthanol, propanol I, butanol I, isobutanol (butanol II), propanol II et butanol III à des concentrations molaires correspondant à 2 % d'éthanol.

En dehors de l'isobutanol qui est toxique (Figure 44 a), les alcools utilisés stimulent le bourgeonnement en augmentant à la fois le nombre d'explantats organogènes et le nombre moyen de bourgeons par explantat. Certes, le développement des feuilles de ces bourgeons reste souvent limité (inférieur à 5 mm) mais leur apparition a lieu en même temps que sur les explantats témoins, sauf en présence d'éthanol qui retarde quelque peu cette apparition. Les stimulations les plus importantes s'observent en présence d'alcools primaires et précisément de ceux qui réagissent le plus aux alcool-déshydrogénases des tissus végétaux (APP A., A. N. MEISS -1958- ; SUZYKI Y. -1966- ; COSSINS E.A., L. C. KOPALA, L. C. BLOWACKI, B. SPRONK -1968- ; LEBLOVA S., I. ZIMAKOVA, J. BARTHOVA, D. EHLICHOVA -1971- ; HATANAKA A., H. HARADA -1972- ; LEBLOVA S., D. EHLICHOVA -1972- ; DAVIES D. D., K. D. PATIL, E. N. UGOCHUKWU, G. H. N. TOWERS -1973- ; LEBLOVA S., P. MANCAL -1975-).

2.5 - Conclusions :

Les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" réutilisent une partie de l'éthanol formé en conditions anaérobies en le transformant en acétaldéhyde grâce à l'intervention de l'alcool-déshydrogénase. Cela

entraîne une stimulation du bourgeonnement. Mais il reste à savoir si l'éthanol agit par l'énergie que sa dégradation procure aux tissus ou par la nature des produits formés. Dans la seconde hypothèse, l'acétaldéhyde ne peut être considéré comme un effecteur spécifique car plusieurs alcools primaires, comme l'éthanol, stimulent le bourgeonnement bien qu'ils donnent d'autres produits d'oxydation avec l'alcool-déshydrogénase.

- o 0 o -

CHAPITRE III :

ETHYLENE ET BOURGEONNEMENT

- o 0 o -

Pendant les deux premières semaines de culture "in vitro" les fragments de racine d'Endive rejettent dans l'atmosphère de petites quantités d'éthylène. Ce composé volatil dont l'origine métabolique a fait l'objet de nombreuses études, est souvent considéré comme une véritable hormone végétale. Il agit en effet sur beaucoup de tissus végétaux (PHAN CHON-TON -1971-) qui appartiennent à des organes aussi divers que les feuilles, tiges ou racines. De plus, comme le pensent SHIMOKAWA K. et Z. KASAI -1966-, l'acétaldéhyde serait l'un de ses proches précurseurs. Nous nous sommes donc intéressé à la production d'éthylène dans nos conditions expérimentales et avons étudié ses effets éventuels sur le bourgeonnement.

3.1 - Anaérobiose et production d'éthylène :

Par chromatographie en phase gazeuse, nous avons analysé les gaz rejetés par les tissus qui sont, soit cultivés selon la méthode habituelle en atmosphère ordinaire, soit placés dans de l'azote pur entre le 3e et le 4e jour de culture. Après le traitement, les explantats aroxiés sont isolés de leur milieu de culture et placés ainsi que les témoins de même âge dans

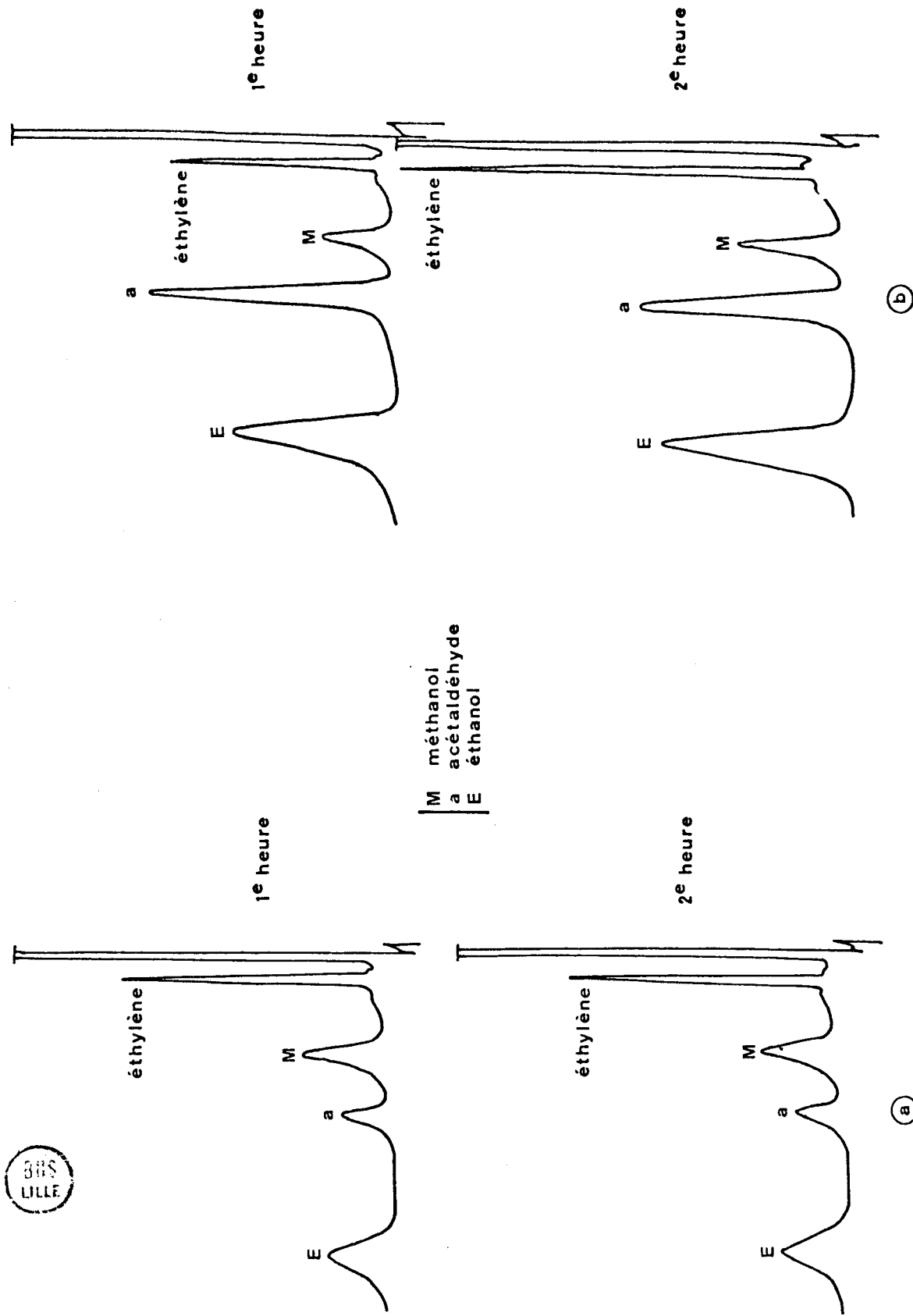


Figure 45 : a) Gaz rejetés par les fragments de racine d'Endive le 4^e jour de culture en atmosphère ordinaire ;

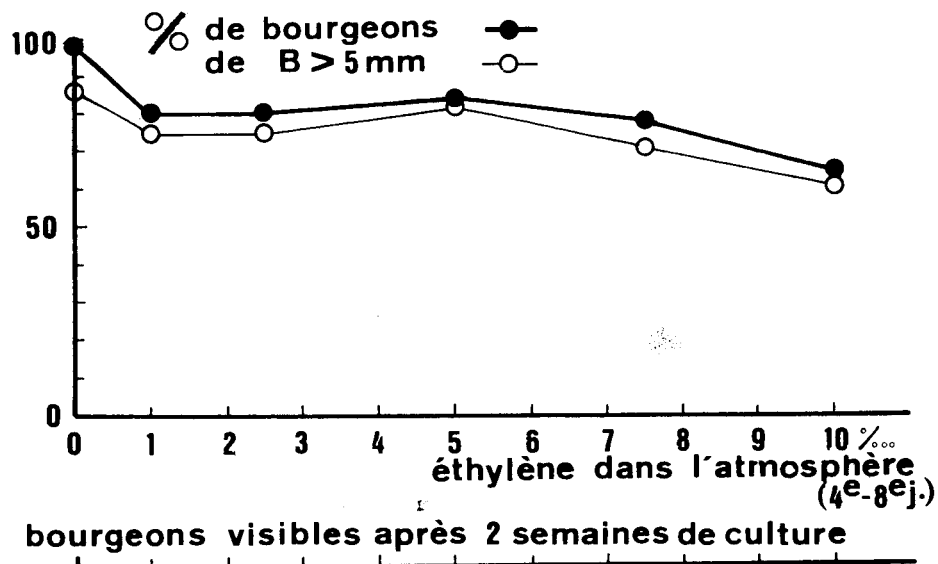
b) Gaz rejetés par les fragments de racine d'Endive après un séjour dans l'azote du 2^e au 4^e jour de culture.

des flacons de 125 ml (pour 10 explantats) que l'on bouche hermétiquement. On prélève l'atmosphère environnant les cultures après une heure d'incubation à température ordinaire. Les échantillons provenant des témoins et des tissus anoxiés contiennent les uns et les autres de l'éthylène (e) et les produits déjà étudiés antérieurement : méthanol (M), acétaldéhyde (a) et éthanol (E). On constate (Figure 45 a et b - 1ère heure) que les quantités d'éthylène rejetées dans l'atmosphère par les tissus anoxiés pendant l'heure qui suit immédiatement le traitement sont inférieures à celles que libèrent les témoins pendant le même temps, car la production d'éthylène dans des conditions anaérobies a été observée par de nombreux auteurs et avec différents tissus (cités par PHAN C. T. -1971- et ABELES F. B. -1973-). Nous avons renouvelé l'atmosphère environnant les explantats et rebouché les flacons de manière à étudier le comportement des tissus pendant l'heure qui suivait (Figure 45 a et b - 2e heure). Pour les tissus ayant été cultivés dans les conditions ordinaires, la composition des gaz reste pratiquement inchangée par rapport à la précédente incubation. Par contre, les explantats anoxiés ont rejeté des quantités d'éthylène plus importantes que la première fois et que les témoins eux-mêmes. Le retour en atmosphère ordinaire après un séjour en anaérobiose entraîne donc une augmentation de la production d'éthylène analogue à la "bouffée" observée par BURG S. P. et K. V. THIMANN -1959- avec des pommes ayant été soumises à un traitement anoxiant.

3.2 - Ethylène et néoformation des bourgeons :

Au vu des résultats précédents, nous nous sommes demandé si l'éthylène était capable de stimuler le bourgeonnement. Pour cela, nous avons placé des fragments de racine d'Endive dans de l'air contenant 0 - 1 - 2,5 -

(a) EXPLANTATS



(b) BOURGEONS

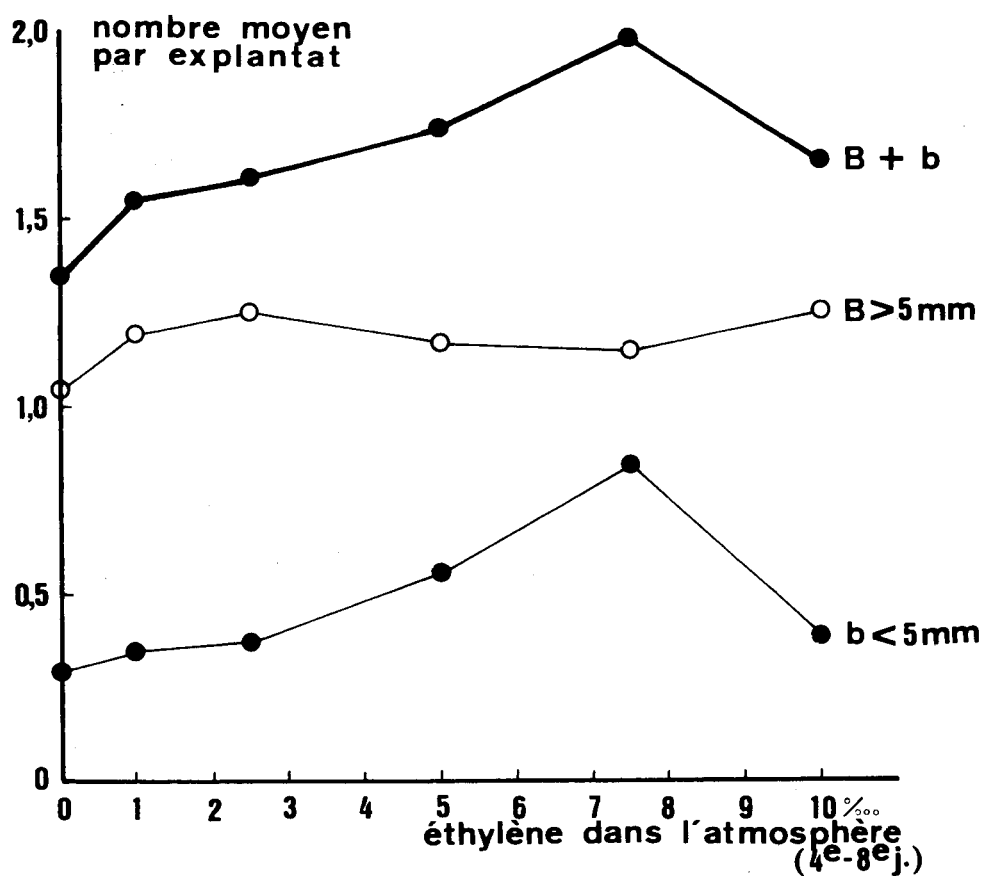


Figure 46 : Action de l'éthylène sur la néoformation des bourgeons par les tissus de racine d'Endive cultivés "in vitro" (explantats de petite taille) - (1 mois de culture).

a) nombre d'explantats ayant bourgeonné ;

b) nombre de bourgeons par explantat.



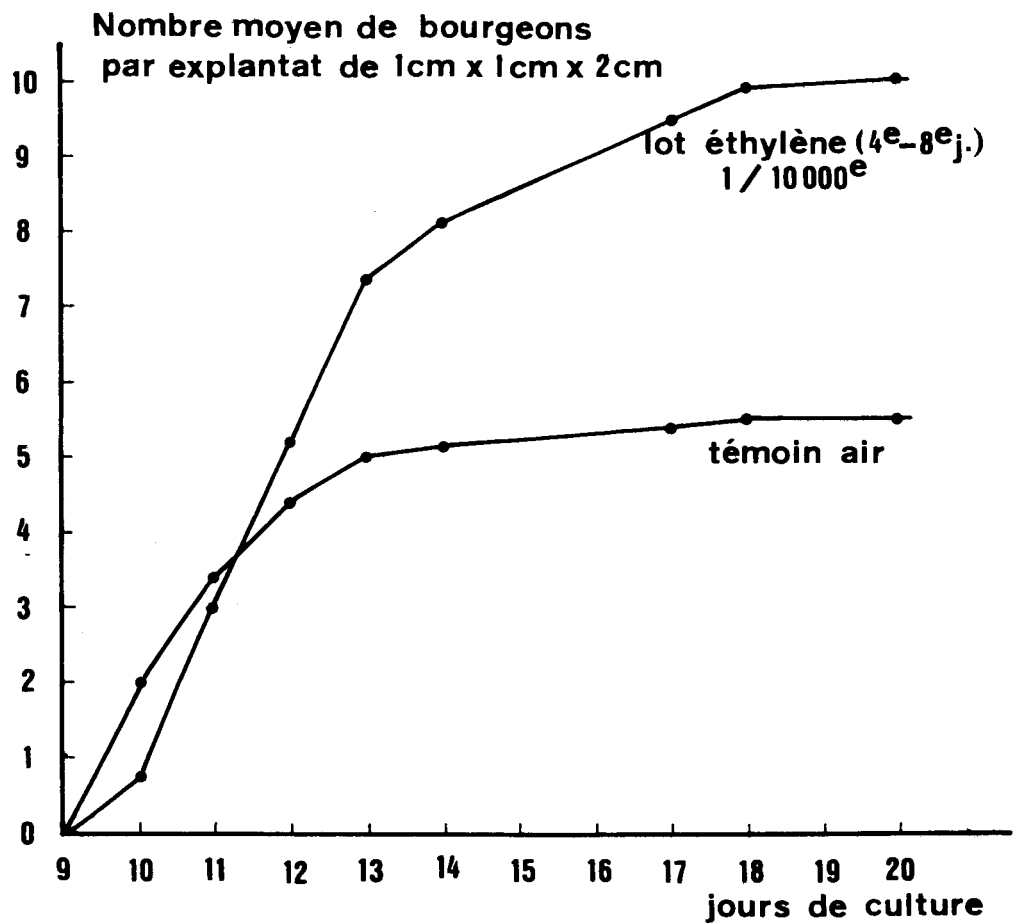


Figure 47 : Action de l'éthylène sur la néoformation des bourgeons par les tissus de racines d'Endive cultivés "in vitro" (explantats de grande taille).

(D'après BOURIQUET R. -1972-).



5 - 7,5 et 10 dix millièmes d'éthylène. Le traitement s'est effectué entre le 4e et le 8e jour de culture, c'est-à-dire pendant la période de néoformation des ébauches caulinaires.

Dans tous les cas, les bourgeons apparaissent comme chez les témoins après deux semaines de culture (Figure 46). La présence d'éthylène, surtout aux doses les plus fortes, réduit quelque peu le nombre d'explantats capables de bourgeonner, mais elle augmente par contre le nombre des bourgeons sur les fragments organogènes. L'éthylène agit donc sur le bourgeonnement des tissus de racine d'Endive de façon analogue à l'anoxie. L'effet stimulant est observé à faible dose et il est même extrêmement net avec des explantats de grande taille (Figure 47) (BOURIQUET R. -1972-) ayant subi un traitement analogue à celui décrit précédemment.

3.3 - Ethylène et anaérobiose :

En utilisant notre test de bourgeonnement habituel avec de petits fragments de racine d'Endive, nous avons fait agir l'anaérobiose et l'éthylène séparément ou conjointement. Ainsi, différents lots ont été placés du 4e au 7e jour de culture dans une enceinte expérimentale contenant de l'azote, de l'air additionné d'éthylène (1/10 000e) ou de l'azote additionné d'éthylène (1/10 000e). Après un mois de culture, les résultats sont comparés avec ceux des témoins cultivés constamment en atmosphère ordinaire (Tableau 29).

| Nombre moyen de bourgeons par explantats | | | |
|--|----------|----------|-------|
| Après 1 mois de culture..... | B > 5 mm | b < 5 mm | B + b |
| Atmosphère ordinaire..... | 1,11 | 0,16 | 1,27 |
| Azote..... | 1,23 | 0,60 | 1,83 |
| Air + éthylène. | 1,12 | 0,40 | 1,52 |
| Azote + éthylène..... | 1,60 | 1,00 | 2,60 |

Tableau 29 : Effets comparés de traitements par l'azote, l'air additionné d'éthylène (1/10 000e) et l'azote additionné d'éthylène (1/10 000e) sur la néoformation des bourgeons par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro".
(Traitements du 4e au 7e jour de culture).

Comme l'azote, l'éthylène augmente le nombre des formations gemmaires et surtout celui des petits bourgeons. En outre, les effets de l'anaérobiose et de l'éthylène s'additionnent dans une certaine mesure. Tout porte ainsi à croire que l'anaérobiose exerce son action sur le bourgeonnement par l'intermédiaire de l'éthylène dont elle contribue à augmenter la production par les tissus de racine d'Endive.

3.4 - Les pigments foliaires :

Les explantats soumis à l'anaérobiose produisent des bourgeons dont les feuilles nous ont paru moins pigmentées que celles des témoins

cultivés en atmosphère ordinaire. Or l'éthylène est utilisée industriellement pour faire régresser la teneur en chlorophylle des fruits (DENNY F. E. -1924-, ULRICH R. -1966-) et des feuilles (blanchiment des céleris) (HARVEY R. B. -1925-). Ce gaz détruit en effet les chlorophylles (LOONEY N.E., M. E. PATTERSON -1967-, PHAN C. T. -1972-, HSU H. -1975-) et diminue aussi la synthèse des pigments caroténoïdes (KANG B. G., S. P. BURG -1972-). Nous avons donc voulu vérifier s'il produisait les mêmes effets dans nos conditions expérimentales. Nous avons retenu comme hypothèse de travail que l'anaérobiose agit en favorisant l'élaboration d'éthylène lorsque les tissus sont replacés en atmosphère ordinaire après le traitement anoxiant. En conséquence, nous avons comparé l'influence d'un séjour du 1er au 4e jour dans l'azote à celle d'un traitement par de l'air contenant 2/10 000e d'éthylène intervenant plus tardivement, du 3e au 8e jour de culture. Un mois après l'ensemencement, nous avons mesuré la teneur en chlorophylles et en pigments caroténoïdes des feuilles dans les lots traités et chez les témoins cultivés constamment en atmosphère ordinaire.

On constate (Tableau 20) que l'éthylène comme l'anaérobiose réduit les taux de chlorophylles et de caroténoïdes dans les feuilles néoformées. Il est intéressant de souligner que dans l'un et l'autre cas l'action a un caractère différé car le traitement intervient à un moment où les tissus ne portent pas encore de bourgeons et ses effets ne se manifestent qu'ultérieurement sur la pigmentation des feuilles.

Les feuilles provenant des tissus traités par l'éthylène ou soumis à l'anaérobiose élaborent moins de pigments que celles des témoins. Mais le défaut de coloration verte n'est pas dû à un déséquilibre en faveur des pigments caroténoïdes car le rapport $\frac{\text{Chl a + b}}{\text{caroténoïdes}}$ n'est pas profondément modifié.

| 1 mois de culture | Atmosphère ordinaire | Azote 1er - 4e jour | Ethylène 3e - 8e jour |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| Chlorophylles a + b..... | 300,2 | 191,4 | 237,7 |
| Pigments caroténoïdes..... | 122 | 86,3 | 97,2 |
| Rapport Chl a + b ... caroténoïdes | 2,45 | 2,22 | 2,44 |

Tableau 30 : Effets comparés de traitement par l'azote (1er à 4e jour de culture) et par l'air additionné d'éthylène (2/10 000e du 3e au 8e jour de culture) sur la teneur en pigments des feuilles néoformées par les fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro". (Les teneurs en chlorophylles a + b et en pigments caroténoïdes sont exprimées en microgrammes par gramme de tissu frais).

3. 5 - Conclusions :

En résumé, en culture "in vitro", les tissus de racine d'Endive réagissent à l'anaérobiose en produisant davantage d'éthylène que dans les conditions ordinaires. Ce métabolite serait formé à partir d'un de ses précurseurs présumés : l'acétaldéhyde, que les explantats sont capables de produire à partir de l'éthanol. L'éthylène agit à son tour sur les tissus en stimulant la néoformation des ébauches gemmaires et en réduisant la synthèse ultérieure des pigments foliaires.

- CONSIDERATIONS GENERALES -
=====

- o O o -

LE PROCESSUS FERMENTAIRE

Les premiers jours de culture sont marqués par une exaltation des échanges gazeux des tissus (LACHAUX M. -1944.a-, GAUTHERET R. J. -1959-, EDELMAN J., M. A. HALL -1965-). Avec des tranches de Topinambour, LANCE C. (1963) a montré que l'augmentation de l'intensité respiratoire dépendait davantage du traumatisme causé par le découpage des tissus que de l'accroissement de la surface de diffusion de l'oxygène. L'afflux de sucre résultant du contact avec le milieu nutritif est aussi considéré comme un facteur stimulant la respiration (LACHAUX M. -1944.b-). Mais la plupart des chercheurs qui travaillent dans ce domaine s'intéressent aux seuls phénomènes respiratoires et les étudient souvent en rapport avec la prolifération des tissus (HACKETT D. P. -1959-, LATIES G. G. -1962-, CLICK R. E., D. P. HACKETT -1963-, LATIES G. G., K. BUDD -1964-, LEE S. G., R. M. CHASSON -1966-, ELLIS R. J., L. R. MACDONALD -1967-, STREET H. E. -1973-). Or, nous avons montré que, même dans les conditions ordinaires, les tissus de racine d'Endive fraîchement ensemencés manifestent aussi une certaine activité fermentaire (2e partie, 1.3 page 81 et 1.4 page 85) susceptible d'influencer le bourgeonnement (3e partie, 1.3

page 130). Comme les phénomènes respiratoires (LACHAUX M. -1944.a et b, LIORET C. -1953 et 1955-), la fermentation consécutive à la mise en culture ne dépend pas de la croissance, elle cesse même pratiquement lorsque les tissus se mettent à proliférer quelques jours après l'ensemencement. La lésion superficielle des explantats joue sans doute un rôle important dans l'induction du processus fermentaire, mais la dégradation des sucres ne conduit à la formation d'éthanol qu'en conditions anaérobies (DESVEAUX R. -1969-). Le fait d'enfoncer plus ou moins profondément les explantats dans le milieu gélosé joue donc un rôle déterminant. D'une part la gélose est peu perméable aux gaz et d'autre part l'oxygène parvient d'autant plus difficilement au sein des tissus qu'il est mobilisé en surface par les phénomènes d'oxydation ou que son taux est faible dans l'atmosphère (DUCET G. -1961-, DUCET G., A. PENELOUX -1962-, PENELOUX A., G. DUCET -1963-). D'ailleurs, jusqu'à ce qu'ils soient cicatrisés, les tissus lésés s'opposent à la pénétration de l'oxygène en profondeur en obturant beaucoup d'espaces intercellulaires (MACDONALD L. R. -1968-).

Les cellules anoxiées se mettent donc à fermenter et tout particulièrement celles qui sont situées à la périphérie, dans le milieu gélosé. Puis, à mesure que le choc initial s'atténue, les besoins respiratoires de la partie aérienne diminuent et l'oxygène diffuse alors dans l'ensemble des tissus qui de ce fait cessent de fermenter. Ainsi, nous avons montré (2e partie, 1.4 page 85) qu'une tension d'oxygène atmosphérique de 2 % suffisait à assurer la prédominance du métabolisme aérobie. D'ailleurs, en général, les tissus végétaux ne manifestent pas de grandes exigences respiratoires (GODDARD D. R., W. D. BONNER -1960-, STILES W. -1960-). Des poires et des pommes entières, par exemple, supportent sans fermenter des taux d'oxygène atmosphérique voisins

de 3 % seulement (ULRICH -1970-).

Dans les conditions ordinaires, les cellules altérées contribuent sans doute pour une large part à la formation d'éthanol. En effet, certaines d'entre elles déversent des enzymes glycolytiques au sein du milieu gélosé. D'autres, moins gravement lésées, ne recouvrent leur intégrité qu'après plusieurs jours de culture (BUVAT R. -1948-).

Si l'on prive les explantats d'oxygène, il va de soi que l'ensemble des tissus fermente (LECHARTIER G., F. BELLAMY -1875-).

L'éthanol est libéré dans les espaces intercellulaires et dans les vaisseaux conducteurs (2e partie, 3.3 page 106) puis passe dans l'atmosphère ou dans le milieu de culture.

Certes, à forte dose, l'éthanol peut se montrer toxique en aggravant les altérations cellulaires et en inhibant la protéogenèse. Mais il n'entraîne généralement pas la nécrose des tissus et les explantats reprennent leur activité néoformatrice lorsqu'ils sont soustraits à son action (2e partie, 1.1 page 78). Après quelques jours de culture les tissus sont généralement capables de se débarrasser de l'éthanol. L'oxygène est indispensable à cette activité. Avec 2 % ou plus d'oxygène dans l'atmosphère, l'alcool disparaît rapidement du milieu de culture. Mais au-dessous de cette concentration critique, l'élimination de l'alcool est ralentie en fonction de la tension d'oxygène. On note d'ailleurs simultanément que la respiration des tissus végétaux décroît avec la tension d'oxygène lorsque celle-ci s'abaisse au-dessous d'une certaine limite. On peut donc supposer que, comme pour la respiration (DUCET G., A. PENELLOUX -1962-, CHEVILLOTTE P., G. DUCET -1969-), la diffusion de l'oxygène à travers les cellules conditionne la métabolisation de l'éthanol. Indépendam-

ment des conditions d'oxygénation, les tissus se débarrassent d'autant plus activement de l'alcool que ce dernier existe à un taux plus faible dans le milieu (2e partie, 3.7 page 114).

Quel que soit l'éclaircissement, les tissus anoxiés sont dépourvus de chlorophylle (2e partie 3.8 page 118) et ne peuvent donc assimiler ni le gaz carbonique atmosphérique ni celui d'origine endogène. C'est pourquoi dans le cadre de nos essais, nous attribuons essentiellement l'augmentation du nombre des bourgeons aux transformations de l'éthanol stocké pendant le traitement anoxiant. En présence d'oxygène, cet alcool se transforme en acétaldéhyde. Ce dernier, très volatil, s'échappe en partie dans l'atmosphère mais peut aussi conduire à la formation d'éthylène contribuant ainsi à stimuler la néoformation des bourgeons. La culture en atmosphère confinée prolonge l'action de la fermentation sur les tissus, car elle favorise l'accumulation, au voisinage des explantats, de l'éthanol et éventuellement de ses sous-produits : l'acétaldéhyde et l'éthylène. On conçoit donc aisément que le maintien dans un air confiné puisse successivement retarder le développement des fragments de racine d'Endive et augmenter le nombre des bourgeons (1ère partie, 2.3 page 43).

L'ALCOOL-DESHYDROGENASE (A. D. H.)

L'enzyme génératrice d'éthanol a une action réservable. Reconnue d'abord par sa propriété d'oxyder l'alcool en acétaldéhyde, l'A. D. H. fut même appelée alcool-oxydase (BATTELLI F., L. STERN -1909-, ANDERSSON B. -1933 et 1934-, LEHMANN J. -1934-). C'est seulement en 1936 que Von EULER H., E. ADLER et H. HELLSTROM montrèrent, chez les levures, qu'elle réduit aussi l'acétaldéhyde en éthanol. Cette enzyme existe dans les tissus animaux et végétaux. L'anaérobiose favorise son apparition. Mais, en conditions oxydantes,

son activité déshydrogénasique s'exerce en présence d'éthanol. On peut supposer que dans notre matériel comme dans les germinations des céréales (OPATRNA J. -1975-), les zones méristématiques sont le siège privilégié de cette activité alcool-déshydrogénasique. En 1975, LEBLOVA S. et P. MANCAL ont comparé l'action des A. D. H. de foie de cheval et de levure mesurées respectivement par WINER A. D. (1958) et DAVIES D. D., K. D. PATIL, E. N. UGOCHUKWU et G. H. N. TOWERS (1973) avec celles des A. D. H. des germinations de pois, de lentille et de haricot. Il s'avère que toutes ces enzymes agissent très efficacement sur l'éthanol, mais sont aussi capables d'oxyder des alcools primaires et même certains alcools secondaires. Notons que le n-propanol et le n-butanol sont toujours attaqués alors que le méthanol ne l'est que rarement. Or, nous avons observé que la présence d'alcools dans le milieu de culture stimule le bourgeonnement (3e partie, 2.4 page 141). Cet effet pourrait être consécutif à la déshydrogénation de ces produits. Ainsi, l'A. D. H. des tissus de racine d'Endive serait particulièrement efficace vis-à-vis de l'éthanol, du propanol I (n-propanol), du butanol I (n-butanol) et à un degré moindre du méthanol. Soulignons que ces substrats sont des alcools primaires, ils forment donc essentiellement des aldéhydes.

LA PRODUCTION D'ETHYLENE

Si l'on admet les transformations qui ont été décrites précédemment, l'éthylène stimulant le bourgeonnement pourrait se former indifféremment à partir de l'acétaldéhyde ou des aldéhydes issus de certains alcools primaires.

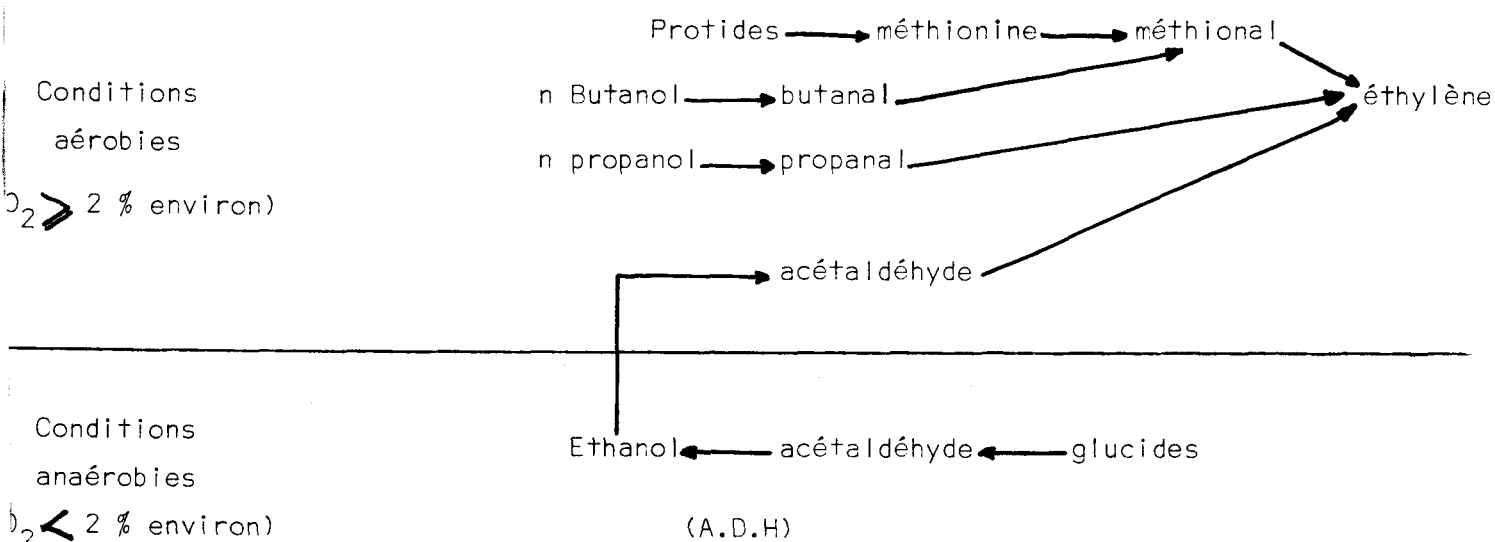
Or, différents chercheurs ont obtenu de l'éthylène à partir de l'acétaldéhyde (SHIMOKAWA K., Z. KASAI -1966-) et du propanal (LIEBERMAN M., A. T. KUNISHI -1967-, BAUR A., S. F. YANG -1969-). Cela confirme les multiples observations selon lesquelles l'oxygène est nécessaire à la biosynthèse de l'éthylène (citées par PHAN CHON-TON -1971- et ABELES F. B. -1973-), mais ne contredit pas l'idée qu'un précurseur s'accumulerait en conditions anaérobies et serait ensuite rapidement converti en éthylène dès que les tissus sont replacés en atmosphère oxygénée (BURG S. P., K. V. THIMANN -1959-). Dans le cadre de notre étude, l'éthanol serait ce précurseur anaérobie produit par les fragments de racine d'Endive anoxiés. Et en présence d'oxygène, cet alcool donnerait de l'éthylène par l'intermédiaire de l'acétaldéhyde, sans qu'il soit nécessaire d'invoquer la déshydratation de l'éthanol évoquée par ULRICH R. (1952) et PHAN (1971), qui peut se produire dans certains cas.

D'autre part, les travaux déjà cités de LIEBERMAN et KUNISHI ont montré que le propanal est une source possible d'éthylène. Cet aldéhyde proviendrait généralement selon ces auteurs de la dégradation des acides gras et en dernier ressort du linoléate actif (péroxyde de l'acide linoléique) (GALLIARD T., A. C. HULME, M. J. C. RHODES, L. S. C. WOOLTORTON -1968-). Mais au cours de nos essais (3e partie, 2.4 page 141) l'attaque du propanol par l'alcool-déshydrogénase suffit à expliquer l'apparition du propanol générateur d'éthylène.

Quant au n-butanol qui stimule lui aussi le bourgeonnement, sa déshydrogénation par l'A. D. H. donnerait naissance au butanal $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH O}$ voisin du méthional $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH O}$ dérivé de la méthionine qui, dans la plupart des cas, est considéré comme le précurseur de la synthèse

de l'éthylène (MAPSON L. W., D. A. WARDALE -1967- KU H. S., S. F. YANG, H. K. PRATT -1967-, MAPSON L. W., A. MEAD -1968-).

En conclusion, on peut admettre (ABELES F. B. -1973-) que dans les conditions ordinaires, les explantats de racines d'Endive produisent de l'éthylène par la voie la plus courante de la méthionine. Mais l'apparition d'aldéhydes dans les tissus à la suite d'un séjour anaérobie ou de la déshydrogénation enzymatique d'alcools primaires incorporés au milieu de culture entraînerait un surcroît momentané de production d'éthylène élaboré par d'autres voies que nous pouvons résumer schématiquement ainsi :

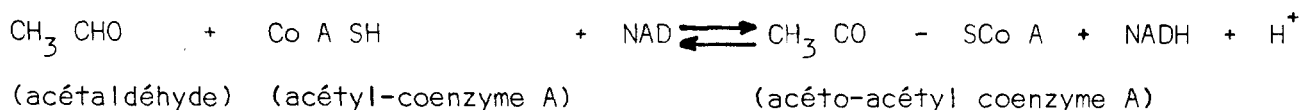


AUTRES DESTINEES POSSIBLES DE L'ACETALDEHYDE

On pourrait aussi considérer que la transformation de l'acétaldéhyde en éthylène n'est qu'un aspect du phénomène et une modalité parmi

d'autres de la stimulation du bourgeonnement. Dans cette perspective, envisageons les principales possibilités de réinsertion de l'acétaldéhyde dans le métabolisme cellulaire.

En premier lieu, on admet généralement que, par l'action de l'acétaldéhyde-déshydrogénase, l'acétaldéhyde se combine avec l'acétyl-coenzyme A pour donner l'acéto-acétyl coenzyme A, point de départ de la synthèse des acides gras à courte chaîne (BARKER H. A. -1956-).



On sait aussi que l'aldolase primitivement appelée zymohehexase (MEYERHOF O., K. LOHMANN, Ph. SCHUSTER -1936-) catalyse la réaction d'addition de l'acétaldéhyde avec la phospho-dihydroxyacétone pour donner le désoxyribose-phosphate. Elle conduit ainsi à la synthèse du désoxyribose. Cette aldolase a été mise en évidence par RACKER E. (1952) chez *Escherichia coli*, mais elle existe aussi dans d'autres organismes (SUN T., T. P. WANG -1957-, BOXER G. E., C. E. SHONK -1958-, CHEH S., T. P. WANG -1958-). Son action réversible l'amène parfois à dégrader le désoxyribose (DOMAGK C. F., B. L. HORECKER -1958-), mais elle sert néanmoins le plus souvent à insérer l'acétaldéhyde dans le métabolisme cellulaire. En outre, l'aldolase n'est pas spécifique et d'autres cétosex-phosphates peuvent être formés par son intermédiaire par condensation de la phospho-dihydroxyacétone et divers aldéhydes.

SUCRES ET BOURGEONNEMENT

Les sucres présents dans le milieu de culture limitent habituel-

lement l'activité néoformatrice des tissus de racine d'Endive (2e partie, 2.3 page 95). Or, de nombreux chercheurs attribuent aux glucides et notamment au saccharose (PAULET P., J. P. NITSCH -1964-, PAULET P. -1965-, MARGARA J., M. RANCILLAC -1966-, MARGARA J., G. TOURAUD -1968-, MARGARA J. -1974-) ou au glucose (NICOLAS-PRAT D., H. EBRAHIM-ZADEH -1967-, DOLLFUS M., D. NICOLAS -PRAT -1969-) un rôle favorable à la formation de boutons floraux. Mais il faut noter qu'en raison de leurs préoccupations ces auteurs font varier les concentrations de sucres dans des conditions d'éclairement et en présence de facteurs hormonaux qui favorisent exclusivement l'initiation florale. Néanmoins, une concentration trop élevée en sucre réduit très souvent (PAULET P. -1965-) ou supprime même le bourgeonnement végétatif (ARNASON A., M. TRAN THANH VAN, P. PREVOT -1967-, MARGARA J. -1969-).

Le comportement varie en fonction de la nature des tissus. Ainsi, contrairement à nos explantats de racine, les fragments de feuille d'Endive produisent d'abord davantage de bourgeons en présence de glucose (VASSEUR J. -communication personnelle-). C'est sans doute parce que les réserves glucidiques sont habituellement insuffisantes dans les tissus de feuille. Mais au-delà de 3 % dans le milieu de culture, le glucose ne stimule plus le bourgeonnement et devient même rapidement inhibiteur.

Le glucose absorbé accroît le taux de glucides solubles intracellulaires (2e partie, 2.4 page 95) et favoriserait ainsi la prolifération aux dépens du bourgeonnement (idem page 97). Soulignons que la pénétration du sucre à l'intérieur des tissus diffère selon la taille des fragments. C'est sans doute pourquoi les "petits" explantats prolifèrent mieux que les "gros" (CAPLIN S. M. -1963-) et qu'il faut un taux élevé de glucose (15 %) pour

inhiber totalement le bourgeonnement des fragments de racine d'Endive de grande taille (BOURIQUET R. -Communication personnelle-).

Nous pensons que la nature et la répartition des glucides intratissulaires conditionnent l'organogenèse beaucoup plus que l'évolution quantitative des sucres. Ainsi, le saccharose pourrait exercer son effet inhibiteur du bourgeonnement (2e partie, 2.3 page 94) en modifiant la répartition des polymères du fructose comme il semble le faire dans les tissus de topinambour (EDELMAN J. -1964-).

L'anaérobiose agit en réduisant l'afflux de sucre dans les tissus (2e partie, 2.6 page 98) et par l'éthanol qu'elle engendre (2e partie, 2.7 page 100). Elle peut même ainsi compenser l'influence inhibitrice du glucose (idem page 100) et du saccharose (LEFEBVRE R. -1973-).

MODE D'ACTION DE L'ETHYLENE SUR LE BOURGEONNEMENT

Les observations précédentes posent le problème de l'intervention éventuelle de l'éthylène dans le métabolisme glucidique. Dans les fruits, ce gaz accélère l'hydrolyse de l'amidon, augmente par conséquent les sucres solubles (WOLFE H. S. -1931-) mais n'en modifie pas les proportions relatives. Toutefois, les tissus de racine d'Endive ne contiennent pas d'amidon, mais on ne peut exclure à priori une action sur d'autres glucides. L'éthylène provoque d'ailleurs la transformation des composés pectiques (HANSEN E. -1938-).

Beaucoup de chercheurs observent une stimulation de l'activité peroxydasique à la suite de traitements par l'éthylène (HERRERO F. A., W. C. HALL -1960-, STAHMANN M. A., B. G. CLARE, W. WOODBURY -1966-, GAHAGAN H.E., R. E. HOLM, F. B. ABELES -1968-, IMASEKI H. -1970-, KU H. S., S. F. YANG, H. K. PRATT -1970-, OGANA M., I. URITANI -1971-, MORGAN P. W., J. L. FLOWER -1971-, ADAMS W. R., GALSTON A. W. -1974-).

Cela suggère la possibilité d'une intervention au niveau des auxines-oxydases. L'éthylène modifierait ainsi le métabolisme auxinique qui est un facteur important de l'organogénèse.

Notre travail nous a montré que, dans les conditions particulières dans lesquelles s'effectue la culture "in vitro", le métabolisme anaérobie intervient d'une manière plus habituelle que nous pouvions l'imaginer tout d'abord et qu'il agit sur la néoformation des bourgeons. Nous avons bénéficié d'un matériel et de conditions expérimentales nous permettant de souligner l'importance de l'A. D. H. non seulement en anaérobiose mais aussi en présence d'oxygène. Cette enzyme est susceptible de favoriser l'élaboration d'éthylène par les tissus. Ce composé a certes des propriétés physiologiques multiples, mais il nous a été possible de souligner son importance à l'égard de la néoformation des bourgeons. Certes, pour mieux comprendre le phénomène, il faudrait encore préciser l'influence exercée par l'éthylène sur certains aspects du métabolisme des tissus d'Endive, par exemple sur l'évolution des glucides intratissulaires ou sur les modifications apportées aux hormones endogènes.

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

=====

- o O o -

ABELES F. B. -1973-

- (147) *Ethylene in plant biology*
(159) Acad. Press (New-York - London) a subsidiary of Harcourt
(160) Brace Jovanovich, publishers

ADAMS W. R., A. W. GALSTON -1974-

- (164) *Differential effects of ethylene on pith peroxidase of intact tobacco plants and excised tissue*
Plant Physiol. 53 : 931-933

ANDERSSON B. -1933-

- (157) *Über Co-Zymaseaktivierung einiger Dehydrogenasem*
Z. physiol. Chem. 217 : 186-190

-1934-

- Die Co-Zymase als Co-Enzym bei enzymatischen Dehydrierungen*
Z. physiol. Chem. 225 : 57-68

APP A. A., A. N. MEISS -1958-

- (143) *Effect of aeration on rice alcohol dehydrogenase*
Arch. Biochem. Biophys. 77 : 181-190

ARNASON A., M. TRAN THANH VAN, P. PREVOT -1967-

- (162) *Capacité formatrice de bourgeons chez les feuilles adultes et chez les jeunes feuilles du Begonia rex Putz*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 264 : 599-602

BALLADE P. -1971-

- (88) *Etude expérimentale de l'organogénèse axillaire chez Nasturnium officinale R. Br. Comportement des noeuds isolés cultivés "in vitro"*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 273 : 2 079-2 082

BATTELLI F., L. STERN -1909-

- (157) *L'alcoolase dans les tissus animaux*
C. R. Soc. Biol. 67 : 419-421

BAUR A. H., S. F. YANG -1969-

- (159) *Precursors of ethylene*
Plant Physiol. 44 : 1 347-1 349

BARKER H. A. -1956-

- (161) *Bacterial fermentations*
Wiley (New-York)

BIELLMANN J. F., M. J. JUNG -1971-

- (35) *Mechanism of the alcohol denhydrogenases from yeast and horse liver*
Eur. J. Biochem. 19 : 130-134

BINDING H. -1971-

- (101) *Organogenese an Kallus von Petunia hybrida*
Z. Pflanzenphysiol., Dtsch. 65 : 359-364

BOURIQUET R. -1966-

- (2) *Le bourgeonnement*
Rev. gen. Sci. 24 : 357-363

BOURIQUET R. - 1972-

- (150) *Action de l'éthylène sur le bourgeonnement et la floraison*
"in vitro" de fragments de racine d'Endive
C. R. Acad. Sci. (Paris) 275 : 33-34

BOXER G. E., C. E. SHONK -1958-

- (161) *Deoxyribose -5- phosphate metabolism by normal liver and malignant hepatoma*
J. Biol. Chem. 233 : 535-540

BRUINSMA J. -1963-

- (35) *The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts*
Photochem. Photobiol. 2 : 241-249

BÜCHER T., H. REDETSKI -1951-

- (34) *Eine spezifische photometrische Bestimmung von Aethylalkohol auf fermentativem Wege*
Klin. Wschr. 29 : 615-616

BURG S. P., K. V. THIMANN -1959-

- (147) *The physiology of ethylen formation in apples*
(159) *Proc. nat. Acad. Sci., U. S. A.* 45 : 335-344

BURTON W. G. -1962-

- (34) *A simple apparatus for measuring oxygen uptake and carbon dioxide*
Eur. pot. J. Netherl. 5 : 220-227

BURTON W. G. -1968-

- (4) *The effect of oxygen concentration upon sprout growth on the potato tuber*
Eur. Potato J. 11 : 249-265

BUVAT R. -1948-

- (156) *Monographie cytologique des tissus de chicorée*
Rev. Cyt. Cytophys. vég. 10 : 55-80

CAPLIN S. M. -1963-

- (6) *Effect of initial size on growth of plant tissue cultures*
(162) *Amer. J. Bot.* 50 : 91-94

CAPLIN S. M., F. C. STEWARD -1949-

- (6) *A technique for the controlled growth of excised plant tissue in liquid media under aseptic conditions*
Nature 163 : 920

CHEH S., T. P. WANG -1958-

- (161) *Synthesis of deoxyribose - 5 - phosphate in animal tissues*
Sci. Sinica. 7 : 333-345

CHEVILLARD L., F. HAMON, A. MAYER, L. PLANTEFOL -1930-

- (2) *Action de l'oxygène libre sur la respiration des tissus végétaux*
(90) *aériens*
Ann. Physiol. Physicochimie biol. 6 : 464-491

CHEVILLOTTE P., G. DUCET -1969-

- (156) *Respiration du tubercule de pomme de terre*
Influence de la tension d'oxygène sur des disques minces
Physiol. vég. 7 : 305-323

CHIRKOVA T. V., S. E. EGGI, EH DUNAEVA -1974-

- (4) *Effet des conditions d'une anaérobiose temporaire sur l'activité fonctionnelle et l'ultrastructure des racines de plantules de pois et des mitochondries qui en sont extraites*
Bot. Zh. (S.S.S.R.) 59 : 110

- CLICK R. E., D. P. HACKETT -1963
 (154) *The role of proteins and nucleic acid synthesis in the development of respiration in potato tuber slices*
 Proc. nat. Acad. Sci. (U. S. A.) 50 : 243-250
- COLLET G. -1963
 (33) *Dosage de l'azote et validité des résultats*
 Ber. Schweiz. bot. Geselloch. 73 : 332-338
- COME D., C. THEVENOT, T. TISSAOUI -1970-
 (3) *La dormance embryonnaire des graines de pommier*
 Bios 1 : 1-7
- De CONINCK B., J. P. COCHET, A. FOUREL -1969
 (32) *L'endive, Chicorée Witloff, Chicorée de Bruxelles*
 édité par l'I.N.V.U.F.L.E.C. et l'A.C.T.A. (Paris)
- COSSINS E. A., L. C. KOPALA, E. BLOWACKI, A. M. SPRONK -1968-
 (143) *Some properties of higher plant alcohol dehydrogenase*
 Phytochemistry 7 : 1 125-1 134
- DAVIES D. D., K. D. PATIL, E. N. UGOCHUKWU, G. H. N. TOWERS -1973-
 (143) *Aliphatic alcohol deshydrogenase from potato tubers*
 (158) *Phytochemistry 12 : 523-530*
- DENNY F. E. -1924-
 (152) *Hastening the coloration of lemons*
 J. Agr. Res. 27 : 757-769
- DESVEAUX R. -1969-
 (155) *Les fermentations*
In "Traité de biochimie générale" de J. Javillier, M. Polonowski, M. Florkin, P. Boulanger, M. Lemoigne, J. Roche et R. Wurmser
 Tome III, 2e fascicule - Masson et Cie (Paris)
- DOIREAU P. -1972-
 (81) *Exhalation d'alcools et d'autres substances volatiles en rapport avec le catabolisme fermentaire, au cours de la germination du haricot*
 C. R. Acad. Sci. (Paris) 274 : 383-386
- DOIREAU P. -1972-
 (107) *Utilisation métabolique de l'éthanol formé au cours de phénomènes fermentaires lors de la germination du haricot*
 C. R. Acad. Sci. (Paris) 275 : 907-910
- DOIREAU P. -1974-
 (84) *Thèse,*
 (91) *Tours, A. O. - C.N.R.S. 19 240*

DOLLFUS M., D. NICOLAS - PRAT -1969-

- (162) *Mise en évidence des potentialités d'organogenèse végétative et florale "in vitro" chez trois digitales : Digitalis lanata Ehrh., Digitalis purpurea L. et sa variété gloxinoeflora*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 268 : 501-503

DOMAGK G. F., B. L. HORECKER -1958-

- (161) *Pentose fermentation by Lactobacillus plantarum*
V Fermentation of 2 - deoxy - D - ribose
J. Biol. Chem. 233 : 283

DUBOIS J. -1973-

- (116) *Action de la lumière sur la croissance et la teneur en pigments plastidaux des tissus isolés de carotte*
Bull. Soc. bot. Fce 120 : 3-26

DUCET G. -1961-

- (155) *Influence de la tension d'oxygène sur la respiration*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 252 : 1 835-1 837

DUCET G., A. PENELOUX -1962-

- (90) *Influence de la diffusion de l'oxygène sur la respiration des végétaux*
(155) *végétaux*
(156) C. R. Acad. Sci. (Paris) 255 : 1 640-1 642

DURANTON H. -1959-

- (6) *Etude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus de Topinambour cultivés "in vitro"*
Thèse, Paris, I.N.R.A.

DURANTON H., R. SCHANTZ, G. KIENTZ -1964-

- (116) *Influence des glucides sur la synthèse de la chlorophylle chez les explantats calibrés de Topinambour cultivés "in vitro"*
Bull. Soc. fr. Physiol. vég. 10 : 185-194

EDELMAN J. -1964-

- (163) *Le métabolisme des polymères du fructose dans les tissus vivants d'Helianthus tuberosus*
Bull. Soc. fr. Physiol. vég. 10 : 127-136

EDELMAN J., M. A. HALL -1965-

- (154) *Enzyme formation in higher plant tissues*
Development of invertase and ascorbate-oxidase activities in
nature storage tissue of Helianthus tuberosus
Biochem. J. 95 : 403-410

EHL-KHABBASHA K. M. -1974-

- (99) *(en russe)*
Influence de l'anaérobiose, du 2-4 dinitrophénol et des lésions
des racines sur la sécrétion des substances organiques par les
racines de haricot
Izvest. timirjazev sel'skokhcz Acad., S.S.S.R. 3 : 8

ELLIS R. J., MACDONALD L. R. -1967-

- (154) *Activation of protein synthesis by microsomes from aging beet disks*
Plant Physiol. 43 : 1 297-1 302

Von EULER H., E. ADLER, H. HELLSTRÖM -1936-

- (157) *Über die Komponenten der Dehydrasesysteme XII Mechanismus der*
Dehydrierung von Alkohol und Triosephosphaten und der Oxydore-
duktion
Z. Physiol. Chem. 241 : 239-272

FIDLER J. C. -1948-

- (81) *Studies of the physiologically active volatile compounds produced*
by fruits
J. hort. Sci. 24 : 178

FISKE C. H., Y. SUBBAROW -1925-

- (35) *The colorimetric determination of phosphorus*
J. Biol. Chem. 66 : 375-400

GAGNE J. B. -1960-

- (31) *Manuel de l'endivier*
Paris, O.N.E.T.E.F, 15 rue du Bouloi, suppl. au N° 19 de l'Endi-
vier français (épuisé)

GAHAGAN H. E., R. E. HOLM, F. B. ABELES -1968-

- (164) *Effect of ethylene on peroxidase activity*
Physiol. Plant. 21 : 1 270-1 279

GALLIARD T., A. C. HULME, M. J. C. RHODES, L. S. C. WOOLTORTON -1968-

- (159) *Enzymic conversion of linolenic acid to ethylene by extracts of apple fruits*
F.E.B.S. letters 1 : 283-286

GAUTHERET R. J. -1959-

- (6) *La culture des tissus végétaux*
(16) *Techniques et réalisations*
(154) Masson et Cie (Paris)

GODDARD D. R., W. D. BONNER -1960-

- (155) *Cellular respiration*
Plant Physiol. 35 : 209-312

GOMORI G. -1942-

- (35) *A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter*
J. Lab. Clin. Med. 27 : 955-960

GRANT B. R., H. BEEVERS -1964-

- (88) *Absorption of sugars by plant tissues*
(95) Plant Physiol. 39 : 78-85

GRECHIN I. P. -1964-

- (69) (en russe)
(90) *Rôle de l'oxygène libre dans les processus du sol*
In "Fizika, Khimija, Biologijà i mineralogij, pochv. S.S.S.R. Doklady k VIII mezhdunarodnomn kongressu pochvoveda Bukharest, Moskva, Izdat. Nauka" : 188-94

HACKETT D. P. -1959-

- (154) *Respiratory mechanisms in higher plants*
Ann. Rev. Plant Physiol. 10 : 113-146

HANSEN E. -1938-

- (163) *The effect of ethylene on pectic changes in ripening fruits*
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 36 : 427-428

HARVEY R. B. -1925-

- (159) *A new method of blanching celery*
Minn. Hort. 53 : 41

HATANAKA A., H. HARADA -1972-

- (143) *Purification and properties of alcohol dehydrogenase from tea seeds*
Agric. Biol. Chem. 36 : 2 033-2 035

HERRERO F. A., W. C. HALL -1960-

- (164) *General effect of ethylene on enzyme systems in the cotton leaf*
Physiol. Plant. 13 : 736-750

HIATT A. J., R. H. LOWE -1967-

- (3) *Loss of organic acids, aminsacids, K, and Cl from barley roots traited anaerobically and with metabolic inhibitors*
Plant Physiol. 42 : 1 731-1 736

HILDEBRANDT A. C., A. J. RIKER -1949-

- (101) *The influence of various carbon compounds on the growth of mari-gold, paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue "in vitro"*
Amer. J. Bot. 36 : 74-85

HILDEBRANDT A. C., A. J. RIKER -1955-

- (101) *Inhibition by alcohols of diseased plant growth in tissue culture*
Cancer Res. 15 : 517-522

HOLM G. -1954-

- (35) *Chlorophyll mutations in Barley*
Acta agric. Scand. 4 : 457-471

HSU H. -1975-

- (152) *Ethylene and the chlorophyll content of plant tissues*
Thèse, University of Alberta, Canad.

IMASEKI H. -1970-

- (164) *Induction of peroxidase activity by ethylene in sweet potato*
Plant Physiol. 46 : 172-174

KANG B. G., S. P. BURG -1972-

- (152) *Involvement of ethylene in phytochrome-mediated carotenoid synthesis*
Plant Physiol. 49 : 631-633

KENEFICK D. G. -1962-

- (109) *The accumulation and elimination of ethanol in roots of sugar beet plants*
Dissert. Abst. U.S.A. 22 : 41-49

KESSEL R. H. J., A. H. CARR -1972-

- (3) *The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (Daucus carota) tissue*
J. exp. Bot. 23 : 996

KONSTANTINOVA T. N. -1963-

- (4) *L'action de l'anaérobiose sur la respiration des plantes, ses rapports avec le photopériodisme*
Fiziol. Rasten (S.S.S.R.) 10 : 480-482

KU H. S., S. F. YANG, H. K. PRATT -1967-

- (160) *Enzymic of ethylene from methional by seedling extract*
Arch. Biochem. Biophys. 118 : 756-757

KU H. S., S. F. YANG, H. K. PRATT -1970-

- (164) *Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening*
Plant Cell. Physiol. 11 : 241-246

LACHAUX M. -1944 a-

- (154) *Respiration des tubercules de Carotte et de Topinambour. Les*
(155) *variations sous l'influence du traumatisme*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 219 : 218-220

LACHAUX M. -1944 b-

- (154) *Respiration des tissus de tubercules de Carotte et de Topinambour.*
(155) *Influence du glucose et de l'acide indol-3-acétique*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 219 : 244-246

LANCE C. -1963-

- (154) *Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de*
tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés "in vitro"
Masson et Cie (Paris)

LATIES G. G. -1962-

- (154) *Controlling influence of thickness on development and type of*
respiratory activity in potato slices
Plant Physiol. 37 : 679-690

LATIES G. G., K. BUDD -1964-

- (143) *The development of differential permeability in isolated steles*
of corn roots
Proc. nat. Acad. Sci. USA 52 : 462-469

LEBLOVA S., D. EHLICHOVA -1972-

- (143) *Purification and some properties of alcohol dehydrogenase from*
maize
Phytochemistry 11 : 1 345-1 346

LEBLOVA S., P. MANCAL -1975-

(143) *Charoacterization of plant alcool-dehydrogenase*

(158) *Physiol. Plant.* 34 : 346-249

LEBLOVA S., I. ZIMAKOVA, J. BARTHOVA, D. EHLICHOVA -1971-

(4) *On plant dehydrogenases*

(143) *Biol. Plant. (Praha)* 13 : 33-42

LEBLOVA S., I. ZIMAKOVA, D. SOFROVA, J. BARTHOVA -1969-

(101) *Occurence of ethanol in pea plants in the course of growth under normal and anaerobie conditions*

Biol. Plant. (Praha) 11 : 417-423

LECHARTIER G., F. BELLAMY -1875-

(156) *De la fermentation des fruits*

C. R. Acad. Sci. (Paris) 81 : 1 127-1 130

LEE S. G., R. M. CHASSON -1966-

(154) *Aging and mito-chondrial development in potato tuber tissue*

Physiol. Plant. 19 : 199-206

LEFEBVRE R. -1964-

- *Influence de la composition de l'atmosphère sur le développement de fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro"*

Bull. Soc. bot. Nd. Fce 17 : 55-61

LEFEBVRE R. -1967-

- *Influence de l'anaërobiose sur le bourgeonnement des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro"*

Bull. Soc. bot. Nd. Fce 20 : 51-58

LEFEBVRE R. -1969-

- *Métabolisme des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro" sous faible tension d'oxygène*

Bull. Soc. bot. Nd. Fce 22 : 177-185

LEFEBVRE R. -1970-

- *Efficacité de traitements anaërobies sur le développement de fragments de racines d'Endive cultivés "in vitro"*

Bull. Soc. bot. Nd. Fce 23 : 53-56

LEFEBVRE R. -1971-

- *Action de différents alcools sur le bourgeonnement des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro"*

96e Cong. nat. Soc. sav., Toulouse, *Sci.* 4 : 43-49

LEFEBVRE R. -1971-

- *Influence de la faible tension d'oxygène sur le développement des fragments de racine d'Endive cultivés "in vitro"*
Rev. gén. Bot. 78 : 261-266

LEFEBVRE R. -1972-

- (163) *Effets comparés d'un traitement anaérobie et de l'éthylène sur le bourgeonnement et la synthèse des pigments foliaires*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 275 : 193-195

LEHMANN J. -1934-

- (157) *Aktivierung von Hefealkoholdehydrogenase durch Co-Enzym*
Biochem. Z. 272 : 95-103
Aktivierung von Alkoholdehydrogenase in Muskel -Leber- und Tumorgewebe durch Coenzym
Biochem. Z. 272 : 144-152

LETEY J., L. M. STOLZY, N. VALORAS, T. E. SZUSZKIEWICZ -1963-

- (3) *Influence of soil oxygen on growth and mineral concentration of barley*
Agron. J. (U.S.A.) 54 : 538-540

LIEBERMAN M., A. T. KUNISHI -1967-

- (159) *Propanol may be a precursor of ethylene in metabolism*
Science. 158 : 938

LIORET C. -1953-

- (155) *Action de l'acide L-naphtalène acétique sur le métabolisme des tissus de racines de Scorsonère cultivés "in vitro". II Variations des échanges gazeux respiratoires*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 236 : 504-506

LIORET C. -1955-

- (155) *Recherches sur le métabolisme des cultures de tissus normaux et pathologiques*
Ann. Biol. 31 : 185-194

LOONEY N. E., M. E. PATTERSON -1967-

- (152) *Chlorophyllase activity in apples and bananas during the climacteric phase*
Nature. 214 : 1 245-1 246

MACDONALD I. R. -1968-

- (155) *Further evidence of oxygen diffusion as the determining factor in the relation between disk thickness and respiration of potato tissue*
Plant Physiol. 43 : 274-280

MACK W. B. -1927-

- (152) *The action of ethylene in accelerating the blanching of Celery*
Plant Physiol. 2 : 103

MAPSON L. W., A. MEAD -1968-

- (160) *Dual nature of cofactors required for the enzymic production of ethylene from methional*
Biochem. J. 108 : 575-581

MAPSON L. W., D. A. WARDALE -1967-

- (160) *Formation of ethylene from methional by a cell-free enzyme system from cauliflower florets*
Biochem. J. 102 : 574-585

MARCELLIN P., J. LETEINTURIER -1964-

- (23) *Conservation des fruits en atmosphère contrôlée : un nouveau dispositif de stabilisation de la composition de l'atmosphère d'entreposage*
C. R. Acad. Agric. (Paris) 50 : 441-448

MARGARA J. -1969-

- (88) *Etude préliminaire des facteurs de la néoformation de bourgeons chez le chou-fleur (Brassica oleracea L. var. botrytis)*
(162) *chez le chou-fleur (Brassica oleracea L. var. botrytis)*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 268 : 686-690

MARGARA J. -1974-

- (162) *Sur les conditions de l'évolution végétative ou inflorescentielle des bourgeons néoformés à partir de fragments de hampe florale de Cichorium intybus L.*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 278 : 1 195-1 198

MARGARA J., M. RANCILLAC -1966-

- (162) *Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs "in vitro" à partir d'explantats d'Endive (Cichorium intybus L.) II Observations sur la vernalisation préalable de la racine*
Ann. Physiol. vég. 8 : 39-47

MARGARA J. , G. TOURAUD -1968-

- (162) *Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs "in vitro" à partir d'explantats d'Endive (Cichorium intybus L.) V L'induction photopériodique*
Ann. Physiol. vég. 10 : 41-56

MARGARA J., M. RANCILLAC, A. BOUNIOLS -1966-

- (8) *Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs "in vitro" à partir d'explantats d'Endive (Cichorium intybus L.) III Etude critique de la méthode*
Ann. Physiol. vég. 8 : 285-305

MATRUCHOT L., M. MOLLIARD -1903-

- (81) *Recherches sur la fermentation propre*
Rev. gén. Bot. 15 : 193-259

MEYERHOF O. , K. LOHMANN, Ph. SCHUSTER -1936-

- (161) *Über die Aldolase, ein Kohlenstoff - verknüpfen des Ferment. I Mitterlung : Aldolkondensation von Dioxyacetonphosphorsäure mit Acetaldehyd*
Biochem. Z. 286 : 301-318

MOLLIARD M. -1914-

- (88) *Modifications chimiques des organes végétaux subissant la fermentation propre*
C. R. Acad. Sci. (Paris) 159 : 512-514

MOLLIARD M. -1936-

- (3) *Le rendement des plantes vertes en fonction de la teneur de l'atmosphère en oxygène*
C. R. Acad. Sci.(Paris) 203 : 8-10

MOLLIARD M. -1938-

- (3) *Action de la composition de l'atmosphère sur le développement d'une plante verte (Raphanus sativus)*
Rev. gén. Bot. 50 : 117-151

MORGAN P. W., J. L. FLOWLER -1972-

- (164) *Ethylene : modification of peroxidase activity and isoenzyme complement in cotton (Gossypium hirsutum L.)*
Plant Cell Physiol. 13 : 727-736

MURASHIGE T., L. S. JORDAN, J. D. MANN, E. ENGLISCH -1965-

- (119) *Inhibition of Tobaccocalthus growth by ethanol*
Plant Cell Physiol. 6 : 785-787

NICOLAS-PRATT D., H. EBRAHIM-ZADEH -1967-

- (162) *Appoint glucidique et éclaircissement dans leurs rapports avec l'organogenèse florale "in vitro" chez Nicotiana tabacum L.*
In : Cult. tissus plantes. Strasbourg (Coll. nat. C.N.R.S.)
Paris, C.N.R.S. 1968 : 83-91

OGAWA M., I. URITANI -1971-

- (164) *Metabolic changes in tissues prepared from irradiated sweet potato roots with regard to ethylene effects*
Rad. Bot. 11 : 67-71

OPATRNA J. -1974-

- (101) *Selective histochemical localization of alcohol dehydrogenase in bud primordia cells of wheat shoot apices*
Biol. Plant. 16 : 149

OPATRNA J. -1975-

- (101) *Histochemical investigation of dehydrogenases in shoot apices*
(158) *of wheat plants at different ontogenetic stages*
Biol. Plant. 17 : 67

PAULET P. -1965-

- (88) *Etude de la néoformation "in vitro" de bourgeons végétatifs et*
(158) *floraux*
Thèse, Paris, Rev. gén. Bot. Fce. 859 : 698-788

PAULET P., J. P. NITSCH -1964-

- (162) *La néoformation de fleurs sur cultures "in vitro" de racines de Cichorium intybus L. Etude physiologique*
Ann. Physiol. vég. 6 : 333-345

PENELOUX A., G. DUCET -1963-

- (155) *Influence de la tension d'oxygène sur la respiration*
Bull. Soc. Physiol. vég. 9 : 16-28

PEYNAUD E., G. GUIMBERTEAU -1962-

- (88) *Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose*
Ann. Physiol. vég. 4 : 161-167

PHAN C. T. -1971-

- (147) *L'éthylène, métabolisme et activité métabolique*
(159) *Monographies de Physiologie végétale N° 8 : 130 pages*

PHAN C. T. -1972-

- (152) *Ethylene and the chlorophyll content of plant tissue*
Plant Physiol. 49 suppl. : 21

POLONOVSKI J. -1964-

- *Tome II 2e fascicule du Traité de Biochimie générale par*
J. Boulanger et J. Polonovski
Masson et Cie (Paris)

PREVOT P. C. -1936-

- (2) *Thèse : La néoformation des bourgeons chez les végétaux*
Mémoires de la Soc. Sci. de Liège, 4e série, 3 : 173-342

RACKER E. -1952-

- (161) *Enzymatic synthesis and breakdown of deoxyribose phosphate*
J. Biol. Chem. 196 : 347-365

RIKER A. J., A. C. HILDEBRANDT -1954-

- (101) *Nutrition and diseased plant growths*
In "Abnormal and pathological plant growth"
Upton (New-York), Brookhaven nat. L. : 79-96

ROBERTS R. B., P. H. ABELSON, D. B. COWIE, E. T. BOLTON, R. J. BRITTEN -1955-

- (133) *Studies in biosynthesis in Escherichia coli*
Carnegie Inst. of Washington, publ. 607

RUTHERFORD P. P., A. A. JACKSON -1965-

- (32) *L'influence du froid sur la dégradation des oligo-saccharides de*
fructose dans les racines de Chicorée de Bruxelles et l'effet sur
la production des chicons
Ann. Gembloux 71 : 187-196

RUTHERFORD P. P., E. W. WESTON -1968-

- (32) *Carbohydrate changes during cold storage of some inulin-containing*
roots and tubers
Phytochemistry 7 : 175-180

SCHANTZ R., H. DURANTON, M. PEYRIERE -1967-

- (116) *Influence du glucose sur la synthèse de la chlorophylle et des caroténoïdes dans les tissus de Topinambour cultivés "in vitro"*
C. R. Acad. Sci.(Paris) 265 : 205-208

SHIMOKAWA K., Z. KASAI -1966-

- (159) *Biogenesis of ethylene in apple tissue. I. Formation of ethylene from glucose, acetate, pyruvate and acetaldehyde in apple tissue*
Plant Cell Physiol. 7 : 1-9

SIEGEL S. M. -1964-

- (3) *Some earth plants and animals can survive in "Mars" laboratory*
Sci and Cult. (India) 30 : 315-317

SIEGEL S. M., L. A. ROSEN -1962-

- (3) *Effects of reduced oxygen tension on germination and seedling growth*
Physiol. Plant. 15 : 437-444

SIEGEL S. M., L. A. ROSEN, C. GIUMARRO -1962-

- (3) *Effect of reduced oxygen tension on vascular plants IV Winter rye germination under near martian conditions and in other non terrestrial environments*
Proc. nation. Acad. Sci. (U.S.A.) 48 : 725-728

SIEGEL S. M., L. A. ROSEN, C. GIUMARRO -1963-

- (3) *Plants at sub-atmospheric oxygen-levels*
Nature 198 : 1 288-1 290

SIEGEL S. M., L. A. ROSEN, G. FENWICK -1962-

- (3) *Effects of reduced oxygen tension on vascular plants. Growth and composition of Red Kidney bean plants in 5 per cent O₂*
Physiol. Plant. 15 : 304-314

SIEGEL S. M., L. A. ROSEN, G. FENWICK -1963-

- (3) *Further studies on the composition of seedlings grown at sub-atmospheric oxygen-levels*
Physiol. Plant. 16 : 549-556

SIEGEL S. M., L. A. HALPERN, C. GIUMARRO, G. FENWICK, G. DAVIS -1963-

- (3) *Martian biology : the experimentalist's approach*
Nature 197 : 329-331

SKOOG F. -1944-

- (2) *Growth and organ formation in tobacco tissue cultures*
Amer. J. Bot. 31 : 19-24

STAHMANN M. A., B. G. CLARE, W. WOODBURY -1966-

- (164) *Increased disease resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production by black rot infected sweet potato tissue*
Plant Physiol. 41 : 1505-1512

STILES W. -1960-

- (155) *The composition of the atmosphere (oxygen content of air, water, soil, intercellular spaces, diffusion, carbon dioxide and oxygen tension)*
In "Handbuch der Pflanzenphysiologie" 12 : 114-148
de W. H. Ruhland, Springer-Verlag, Berlin

STRAUCH L. -1965-

- (33) *(en allemand)*
Ultra micro-méthode pour le dosage de l'azote dans les substances biologiques
Z. Klin. Chem. 5 : 165-167

STREET H. E. -1938-

- (154) *Plant tissue and cell culture*
Botanical monographs n° 11
Blackwell Scientific Publications (Oxford, London, Edinburgh, Melbourne)

SUN T., T. P. WANG -1957-

- (161) *Shang I Hsueh Pao (Acta primae et secundae academiae medicinae Shanghai)*
21 : 324 Cité par Polonowski J. -1964-

SUND H., H. THEORELL -1968-

- (136) In "The enzymes" de P. D. Boyer, H. A. Lardy, K. Myrback,
(143) Eds. 7 : 57 Academic Press (New-York, London)

SUJIKI Y. -1966-

- (143) *Alcool dehydrogenase from pea seedlings*
Phytochemistry 5 : 761-765

THOMAS M. -1925-

- (81) *The controlling influence of carbon dioxide*
Biochem. J. 19 : 927-947

UMBREIT W. W., F. H. BURRIS, J. F. STAFFER -1959-

(22) *Manometric techniques*

Burgess Publishing Co, 426 South Sixth Street, Minneapolis 15,
Minn., U.S.A.

JLRICH R. -1952-

(159) *La vie des fruits*

Masson et Cie (Paris)

JLRICH R. -1966-

(152) *Les effets physiologiques de divers gaz sur les fruits et leurs applications pratiques*

Bull. Soc. Hyg. alim. 54 : 234-253

JLRICH R. -1970-

(156) *Les effets conjugués de la température et de la composition de l'atmosphère sur la maturation des fruits conservés en atmosphère contrôlée*

Bull. Acad. Soc. lor. Sci. 9 : 211-219

WHITE F. P. -1941-

(2) *Plant tissue cultures*

Biol. Rev. 16 : 34-48

WILKINS M. B., C. M. WARREN -1968-

(3) *The influence of low partial pressures of oxygen on the rythm in the growth rate of the avena coleoptile*

Planta 60 : 261-273

WINER A. D. -1958-

(158) *A note on the substrate specificity of horse liver alcohol dehydrogenase*

Acta Chem. Scand. 12 : 1 695-1 696

De WIT M. C. J. -1969-

(88) *Differential effect of low oxygen - tension on protein and carbohydrate metabolism in barley roots*

Acta. bot. neerl. 18 : 558-560

WOLF E. H. S. -1981-

(163) *Effect of ethylene on the ripining of bananas*

Bot. Gaz. 92 : 337-366

R E S U M E

=====

L'influence de l'anaérobiose sur la néoformation des bourgeons est étudiée avec des tissus de racine d'Endive (*Cichorium intybus* L.) cultivés "in vitro".

L'étude quantitative est souvent facilitée par l'utilisation de petits explantats. Différents dispositifs permettent de constituer et de contrôler des mélanges gazeux plus ou moins riches en oxygène. Les récipients à culture sont placés soit en atmosphère confinée, soit en atmosphère renouvelée.

1 - Le bourgeonnement n'a pas lieu lorsque les explantats sont privés d'oxygène pendant plus d'une semaine après l'ensemencement même s'ils sont ensuite replacés dans les conditions ordinaires. Mais quelques jours d'anaérobiose ne font que ralentir le développement des tissus et retarder l'organogénèse. Les délais d'apparition des bourgeons sont alors fonction de la durée du séjour anoxiant et de sa précocité.

Parallèlement, la réoxygénation des tissus anoxiés peut entraîner à la fois :

- une augmentation du nombre des explantats organogènes,
- une augmentation du nombre des bourgeons par explantat organogène, et,
- une augmentation du poids des feuilles issues d'une même néoformation gemmaire.

Ces effets sont accentués quand l'atmosphère n'est pas totalement dépourvue d'oxygène au cours du traitement et lorsque ce dernier intervient pendant la période habituelle d'élaboration des bourgeons.

II - Privés d'oxygène, les tissus de racine d'Endive fermentent. L'éthanol formé s'évapore dans l'atmosphère ou diffuse dans le milieu de culture. A partir d'un certain taux cet alcool freine le développement des explantats en inhibant la protéogenèse. Il retarde et supprime même le bourgeonnement lorsqu'il n'est pas éliminé avant la fin de la culture. Dans une certaine mesure, l'alcool peut aussi ralentir la croissance des feuilles.

Les tissus de racine d'Endive peuvent produire des bourgeons à partir de leurs réserves propres. La présence de glucides dans le milieu de culture stimule la prolifération aux dépens de l'organogenèse sans favoriser d'ailleurs pour autant la croissance des feuilles.

Les tissus anoxiés utilisent leurs réserves propres de préférence aux glucides du milieu de culture. Les produits formés au cours du métabolisme anaérobie créent des conditions favorables à la néoformation des bourgeons, qui éventuellement compensent, dans une certaine mesure, l'influence inhibitrice exercée par un excès de glucides dans le milieu.

III - L'éthanol accumulé pendant le séjour anaérobie est transformé par les tissus lorsque ceux-ci sont réoxygénés. Il y a d'abord formation d'acétaldéhyde grâce à l'intervention de l'alcool-déshydrogénase.

Très volatil, l'acétaldéhyde est partiellement rejeté dans l'atmosphère mais il sert aussi à l'élaboration d'éthylène.

Ce facteur agit à son tour sur les tissus en stimulant la néoformation des ébauches gemmaires et en réduisant la synthèse ultérieure des pigments foliaires.

Différentes hypothèses sont envisagées concernant le mode d'action de l'éthylène sur le bourgeonnement.

- o 0 o -

"Un objet, par les rapports vrais que tu y découvres, te conduit à un autre et à mille autres... Le vrai savoir ne revient jamais à quelque petite chose tout près des yeux ; car savoir c'est comprendre comment la moindre chose est liée au tout."

ALAIN

(Propos sur le bonheur)