

50376
1980
23

N° d'ordre : 480

50376
1980
23

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Jean DUBOIS

**COMPOSES SULFHYDRILES ET CROISSANCE
DE TISSUS ISOLES DE CAROTTE [*Daucus
Carota* L.] ET DE SUSPENSIONS CELLULAIRES
DE SILENE [*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause]**



Soutenu le *20 Juillet* 1980 devant la Commission d'Examen

R. BOURIQUET
R.J. GAUTHERET
M. GOAS
J.L. GUIGNARD
C. PAUPARDIN

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Physiologie végétale de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, sous la direction de M. le Professeur BOURIQUET. Je lui sais gré de m'avoir suivi avec une attention toujours bienveillante, tout en me laissant une grande liberté dans mes activités de recherche et d'enseignement. Ses conseils, ses critiques pertinentes et ses encouragements ont contribué, pour une grande part, à la mise au point du texte de ce manuscrit. Je suis très heureux de pouvoir lui exprimer ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur GAUTHERET, membre de l'Institut, a bien voulu lire et juger ce travail. J'en suis particulièrement honoré.

J'adresse mes sincères remerciements à Mademoiselle GOAS Professeur à l'Université de RENNES et à Mademoiselle PAUPARDIN, Professeur à l'Université de LILLE I qui me font l'honneur de participer au Jury de cette thèse et qui ont accepté de se charger des rapports.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur GUIGNARD, Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS-Sud, qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à mes recherches sur la croissance des suspensions cellulaires de Silène et qui a bien voulu accepter de faire partie de la Commission d'Examen.

En dehors des membres du Jury, je voudrais exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidé de façon ou d'autre au cours de la réalisation de ce travail.

Je suis particulièrement redevable à M. le Professeur PILET qui m'a accueilli plusieurs fois et toujours très chaleureusement,

dans son laboratoire. Les discussions fructueuses que j'ai eues avec lui et avec ses collaborateurs ont contribué à orienter mes recherches. Je remercie particulièrement M. le Professeur ZRYD qui m'a utilement conseillé pour la mise au point des techniques de dosage des groupements thiols.

Je suis reconnaissant à M. le Professeur GUILLAUME de m'avoir permis d'utiliser les fermenteurs du laboratoire de Microbiologie et je remercie Ph. EB et A. DECQ qui se sont toujours employés à faciliter ma tâche.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues du laboratoire de Physiologie végétale pour l'aide amicale qu'ils m'ont toujours accordée et pour les nombreuses discussions que nous avons eues. La collaboration de C. BRASSART, B. LEGRAND, S. RAMBOUR et J. VASSEUR a été particulièrement précieuse pour définir les principales phases du cycle de croissance des suspensions cellulaires de *Silène*.

Qu'il me soit également permis de remercier M. le Professeur MONTUELLE qui a guidé mes premières recherches, alors que je préparais un Diplôme d'Etudes Supérieures dans le laboratoire de M. le Professeur HOCQUETTE et qui, par la suite, s'est toujours intéressé à mon travail.

Je ne saurais oublier Th. DUBOIS-TYLSKI qui m'a fait bénéficier de sa compétence dans le domaine de la microscopie électronique et qui a bien voulu relire le manuscrit.

Enfin, je remercie le personnel technique des laboratoires de Physiologie et de Biologie végétale et les secrétaires pour le soin qu'elles ont apporté à la dactylographie de ce mémoire.

S O M M A I R E

INTRODUCTION ET HISTORIQUE	1	
MATERIEL ET METHODES		
CHAPITRE 1 : LES CULTURES IN VITRO DE CAROTTE ET DE SILENE		
A - Cultures de fragments d'organes		
1 . Origine et préparation du matériel biologique	8	
2 . Mise en culture	9	
3 . Milieux de culture	9	
B - Les colonies tissulaires		
1 . Les tissus de Carotte	12	
2 . Les tissus de Silene	12	
C - La suspension cellulaire de Silène		
1 . Origine et initiation des cultures	13	
2 . Milieu nutritif	14	
3 . Conditionnement des cultures	15	
D - Conditions expérimentales		
1 . Les tissus de Carotte et de Silène	16	
2 . Les suspensions cellulaires de Silène	18	
CHAPITRE 2 : MESURES DE LA CROISSANCE		
A - Fragments d'organes et tissus isolés		18
B - Cellules en suspension		
1 . Cellules cultivées en flacons de 500 ml	19	
2 . Cellules cultivées en fermenteur	20	
CHAPITRE 3 : MESURES D'ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES DES TISSUS ET DES CELLULES		
A - La respiration		
1 . Mesure de l'intensité respiratoire	21	
2 . Mesure de l'oxygène dissous dans le milieu de culture	21	
B - Dosage des composés azotés		
1 . Dans les cellules	21	
2 . Dans les milieux de culture liquides	22	

C - Dosage des sucres	
1 . Dans les cellules	22
2 . Dans les milieux de culture	22
D - Analyses des acides nucléiques	22
E - Dosage des auxines endogènes	23
F - Activité peroxydasique	23
G - Activité auxine-oxydasique	23
H - Structure et activité des plastes	
1 . Observations cytologiques	24
2 . Dosage des pigments plastidaux	25
3 . Dosage de l'amidon	25

CHAPITRE 4 : DOSAGE DES GROUPEMENTS SOUFRES (-SH ET S-S)

A - Dosage des composés sulphydrilés par la méthode ampérométrique	
1 . Principe	26
2 . Appareil de mesure	28
3 . Préparation des extraits	28
4 . Conduite des dosages	29
B - Réduction des ponts disulfures	
1 . Technique électrolytique	30
2 . Sulfitolyse	32

PREMIERE PARTIE

Participation des composés sulphydrilés au contrôle de la croissance de tissus isolés de Carotte.

CHAPITRE 1 : EFFETS DE QUELQUES COMPOSES SULFHYDRILES ET DE QUELQUES INHIBITEURS DES -SH SUR LA CROISSANCE DE CULTURES IN VITRO

A - Composés sulphydrilés et croissance	
1 . Introduction	35
2 . Résultats	36
3 . Conclusion et discussion	39
B - Inhibiteurs	
1 . Introduction	40
2 . Résultats	40
3 . Conclusion	43

CHAPITRE 2 : DISTRIBUTION DES COMPOSES SULFHYDRILES SOLUBLES DANS DES FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE

A - Analyses effectuées avant la mise en culture	44
B - Fragments de racine cultivés <i>in vitro</i> pendant 30 jours	
1 . Teneur en -SH solubles	47
2 . Variations relatives des -SH	48
3 . Conclusion	49

CHAPITRE 3 : EFFETS DU CONTACT DU MILIEU AQUEUX SUR LA PROLIFERATION DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR LA REPARTITION DES -SH SOLUBLES

A - Introduction	50
B - Position et orientation des fragments	
1 . Conditions expérimentales	52
2 . Résultats	52
3 . Conclusion	55
C - Forme des explantats	
1 . Tranches de racines	55
2 . Explantats de forme particulière	56
3 . Conclusion	57
D - Effets de l'anaérobiose	
1 . Augmentation de la surface de contact	58
2 . Cultures de fragments de racine en atmosphère d'azote ..	60
E - Conclusion	63

CHAPITRE 4 : EVOLUTION DES -SH SOLUBLES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE CULTIVES *IN VITRO*

A - Développement des néoformations	65
B - Evolution des composés sulfhydrilés solubles	
1 . Teneur en -SH des différentes zones des explantats	67
2 . Variations relatives de la teneur en -SH	69
3 . Dynamique des gradients sulfhydrilés	71
4 . Evolution du rapport -SH / -SH + S-S	71
C - Conclusion et discussion	
1 . Etat des composés sulfhydrilés et croissance	72
2 . Gradients auxiniques, auxine-oxydasiques et sulfhydrilés	72
3 . Gradients peroxydasiques et catalasiques	73
4 . Autres gradients	74

CHAPITRE 5 : VARIATIONS DES -SH SOLUBLES AU COURS DE LA CROISSANCE DES COLONIES TISSULAIRES DE CAROTTE

A - Analyse quantitative de la croissance	
1 . Biomasse et intensité respiratoire	77
2 . Auxine endogène et activité auxine-oxydasique	82
B - Variations des -SH solubles	
1 . Teneur en -SH	84
2 . Variations relatives des taux de -SH	86
3 . Evolution du rapport -SH/-SH + S-S	87
C - Conclusion	87

CHAPITRE 6 : EFFETS DE LA LUMIERE SUR LA PROLIFERATION DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR L'EVOLUTION DES COMPOSES SULFHYDRILES

A - Fragments de racine cultivés <i>in vitro</i>	90
B - Colonies tissulaires	
1 . Ultrastructure des plastes des 3 souches de Carotte	93
2 . Effets de la lumière sur la croissance et sur la teneur en -SH solubles	95
a - expériences préliminaires	95
b - durée d'éclairement	97
c - intensité de l'éclairement	104
d - longueur d'onde de la lumière	106
C - Conclusion et discussion	109

CHAPITRE 7 : EFFETS DES SUCRES SUR LA PROLIFERATION DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR L'ETAT DES COMPOSES SULFHYDRILES SOLUBLES

A - Croissance	
1 . Effets de la concentration du glucose présent dans le milieu	112
2 . Utilisation d'autres sucres	116
B - Composés sulfhydrilés acidosolubles	
1 . Souche chlorophyllienne	117
2 . Souche caroténogène	118
C - Conclusion	118

CHAPITRE 8 : EFFETS DE QUELQUES REGULATEURS DE CROISSANCE SUR LA PROLIFERATION
DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR L'ETAT DES COMPOSES SULFHYDRILES
SOLUBLES

A - Fragments de racine	
1 . Effets du AIA sur le développement des cultures	119
2 . Effets du AIA sur la répartition des -SH	120
3 . Conclusion	121
B - Colonies tissulaires	
1 . Effets du AIA, du ANA et du 2,4-D	122
2 . Effets de la kinétine	125
3 . Effets de l'hydrazide maléique	127
4 . Effets combinés du AIA et de l'HM	129
C - Conclusion et discussion	130

DEUXIEME PARTIE

Croissance d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene alba*) :
Analyse des principaux facteurs endogènes et exogènes contrôlant
le cycle de croissance et la synchronisation des divisions cellulaires.
Evolution des groupements -SH dans des cultures partiellement synchrones.

CHAPITRE 1 : ETUDE DE LA CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE

A - Introduction	
1 . Les différentes catégories de suspensions cellulaires ..	135
2 . Courbes de croissance	136
B - Analyse de la croissance d'une suspension cellulaire de Silène (souche Sa ₇), en milieu liquide non renouvelé	
1 . Cultures en flacons de 500 ml	140
a - biomasse et volume cellulaire total	140
b - variations journalières du taux de croissance	143
c - nombre de cellules	143
d - index mitotique	144
e - choix d'un critère de croissance	145
2 . Cultures en fermenteurs	
a - problèmes techniques et méthodologiques	146
b - cycle de croissance	150
3 . Comparaison du cycle de croissance en fermenteur de 20 litres et en flacon de 500 ml	151
C - Observations cytologiques	
1 . Degré de séparation des cellules	153

2 . Taille et forme des cellules	153
3 . Structure et ultrastructure	154
4 . Etude de la division cellulaire	157
D - Evolution des acides nucléiques au cours du cycle de croissance	
1 . Evolution des ARN	159
2 . Evolution des ADN	162
3 . Conclusion	164
E - Evolution des activités auxine-oxydasiques et peroxydasiques au cours du cycle de croissance	
1 . Evolution des auxine-oxydases	165
2 . Evolution des peroxydases	165
3 . Conclusion	167
 CHAPITRE 2 : FACTEURS PHYSIOLOGIQUES CONTROLANT LA CROISSANCE	
A - Masse de l'inoculum	169
B - Age de l'inoculum	172
C - Conclusion	173
 CHAPITRE 3 : FACTEURS PHYSIQUES CONTROLANT LA CROISSANCE	
A - La température	
1 . Résultats et discussion	174
2 . Conclusion	179
B - La lumière	
1 . Résultats	179
2 . Conclusion et discussion	180
C - Le pH du milieu de culture	
1 . Variations du pH au cours du cycle de croissance	181
2 . Modification du pH initial	183
3 . Croissance des cellules dans des milieux tamponnés	184
4 . Conclusion et discussion	186
D - Aération du milieu de culture	
1 . Mesure de l'oxygène dissous et de la respiration	187
2 . Modification de l'oxygénation du milieu	189
3 . Conclusion et discussion	191
 CHAPITRE 4 : FACTEURS CHIMIQUES CONTROLANT LA CROISSANCE	
A - Choix d'un milieu de base pour les cellules de <i>Silène</i>	
1 . Eléments minéraux	192

2 . Importance du 2,4-D et de la vitamine B ₇	193
B - Régulateurs de croissance	
1 . Effets comparés de quelques composés auxiniques	195
a - biomasse des cultures	195
b - observations cytologiques	198
c - activité peroxydasique et isoperoxydases	198
2 . Effets de la kinétine (Kin) et de la 6-benzylaminopurine (6-BAP)	202
3 . Conclusion et discussion	205
C - Nutrition carbonée	
1 . Evolution des sucres présents dans le milieu	206
2 . Influence de la concentration en saccharose	206
3 . Influence de la nature de la source carbonée	211
4 . Conclusion et discussion	213
D - Nutrition azotée	
1 . Utilisation de l'azote nitrique	215
2 . Influence de la nature de la source azotée	218
3 . Conclusion et discussion	222

CHAPITRE 5 : SYNCHRONISATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE

A - Introduction	224
B - Méthodes utilisées et résultats obtenus avec d'autres suspensions cellulaires	
1 . Utilisation d'inhibiteurs	224
2 . Traitements par des substances phytohormonales	225
3 . Starvation	226
4 . Modifications de l'environnement	227
5 . Traitements mixtes	227
C - Résultats obtenus avec les cellules de Silène	
1 . Epuisement du milieu en sucres	228
2 . Pré-culture dans un milieu dépourvu de 2,4-D	229
3 . Chocs thermiques	230
4 . Utilisation d'inhibiteurs	231
5 . Conclusion	235

CHAPITRE 6 : EVOLUTION DES COMPOSES SULFHYDRILES DANS DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE PARTIELLEMENT SYNCHRONES

1 . Synchronisation induite par l'épuisement du 2,4-D	236
---	-----

2 . Synchronisation induite par un choc thermique	238
3 . Conclusion	239

CONCLUSIONS GENERALES

CROISSANCE DES TISSUS DE CAROTTE	240
CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE	246
GROUPEMENTS -SH ET CROISSANCE	251

<i>Modifications de la croissance de cultures in vitro provoquées par l'incorporation de composés soufrés réduits ou oxydés et par des inhibiteurs des groupements -SH dans les milieux de culture</i>	
. Evolution des -SH endogènes au cours de la croissance	251
. Participation des composés sulfhydrylés au contrôle de la croissance	255
. -SH et quelques aspects particuliers du métabolisme	264

BIBLIOGRAPHIE	267
---------------------	-----

PLANCHES	302
----------------	-----

RESUME	333
--------------	-----

TABLE DES PLANCHES

PLANCHE I	: Culture <i>in vitro</i> de fragments de tige de <u>Silene alba</u>	303
PLANCHE II	: Culture <i>in vitro</i> de fragments de tige, de colonies tissulaires et de suspensions cellulaires de <u>Silene alba</u>	305
PLANCHE III	: Colonies tissulaires des souches chlorophyllienne (Fig. 1 à 5) et étiolée (Fig. 6 et 7) de Carotte cultivées à la lumière (lumière du jour + appoint périodique 12 : 12 d'environ 1 000 lux) pendant 30 jours	307
PLANCHE IV	: Colonies tissulaires de la souche caroténogène de Carotte cultivées à la lumière (lumière du jour + appoint périodique (12 : 12) d'environ 1 000 lux, pendant 60 jours	309
PLANCHE V	: Colonies tissulaires de la souche étiolée de Carotte cultivées à l'obscurité pendant 30 jours	311
PLANCHE VI	: Colonies tissulaires de la souche étiolée de Carotte cultivées pendant 21 jours en lumière bleue continue	313
PLANCHE VII	: Colonies tissulaires de la souche étiolée de Carotte cultivées pendant 21 jours en lumière verte continue	315
PLANCHE VIII	: Colonies tissulaires de la souche étiolée de Carotte cultivées pendant 21 jours en lumière rouge clair continue	317
PLANCHE IX	: Cellules de <u>Silene</u> observées au microscope photonique après coloration par le réactif iodo-ioduré plus ou moins dilué	319
PLANCHE X	: Cellules de <u>Silene</u> prélevées dans une suspension cellulaire cultivée pendant 4 jours à 25°C, en lumière continue (environ 500 lux)	321
PLANCHE XI	: Cellules de <u>Silene</u> prélevées dans une suspension cellulaire cultivée pendant 10 jours à 25°C, en lumière continue (environ 500 lux)	323
PLANCHE XII	: Cellules de <u>Silene</u> prélevées dans une suspension cellulaire cultivée pendant 14 jours à 25°C, en lumière continue (environ 500 lux)	325

PLANCHE XIII	: Principaux stades de la mitose et anomalies les plus fréquentes. Cellules de <u>Silene</u> prélevées dans des cultures de 3 à 6 jours et colorées selon la méthode de FEULGEN	327
PLANCHE XIV	: Cellules de <u>Silene</u> cultivées pendant 14 jours à différentes températures à la lumière ou à l'obscurité	329
PLANCHE XV	: Cellules de <u>Silene</u> cultivées pendant 14 jours dans le milieu de LESCURE contenant différentes doses de saccharose	331

ABREVIATIONS UTILISEES

Mesure des activités physiologiques des tissus et des cellules

- ADN = acide désoxyribonucléique
ARN = acide ribonucléique
CH_a = chlorophylle a
CH_b = chlorophylle b
CH₊ = chlorophylle totale
G1 } = phases du cycle cellulaire précédant et suivant la phase de synthèse, S
G2
IR = intensité respiratoire
IRNP = intensité respiratoire rapportée à l'unité de protéines
IRMF = intensité respiratoire rapportée à l'unité de matière fraîche
M F = poids de matière fraîche
M S = poids de matière sèche
NP = azote protéique
NS = azote soluble
NT = azote total
-SH = fonction thiol
S-S = fonction disulfure
-SH/S-S et -SH/-SH + S-S = pourcentage de fonctions thiols

Facteurs de croissance et inhibiteurs

- AIA = acide indolylacétique
ANA = acide naphtylacétique
2,4-D = acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
HM = hydrazide maléique
Kin = kinétine
N-E.M. = N-éthylmaléimide
P-C.M.B. = P-chloromercuribenzoate de sodium

Conditions expérimentales (exemples)

18 : $\overline{6}$ = 18 h de lumière et 6 h d'obscurité, pour un cycle photopériodique de 24 h

1000 lux : environ 4000 - 4500 ergs.cm⁻².s⁻¹ (lumière blanche)

Légende des Planches Hors Texte

cr	=	crête (Plaste)
d	=	dictyosome
E-N	=	entre-noeud
gl	=	globule lipidique
gr	=	granum (Plaste)
la	=	leucoplaste amylicfère
m	=	mitochondrie
N	=	Noyau
nu	=	nucléole
per	=	peroxysome
pp	=	proplaste
pr	=	paroi
re	=	réfliculum endoplasmique
st	=	stroma (Plaste)
t	=	thylacoïde (Plaste)
V	=	vacuole
Vj	=	jeune vacuole (de petite taille)
va	=	vésicule amylicfère (Plaste)
ve	=	vésicule (Plaste)

INTRODUCTION

ET

HISTORIQUE

La croissance des Végétaux demeure un problème actuel, qui présente un grand intérêt tant sur le plan théorique que sur le plan pratique. La culture in vitro des tissus végétaux réalisée depuis une quarantaine d'années a déjà fourni des résultats très intéressants dans des domaines variés : nutrition minérale, utilisation des substances de croissance pour le contrôle de la multiplication cellulaire et de l'organogénèse, embryogénèse, micropropagation des plantes, etc... (GAUTHERET, 1959, 1964 ; STREET, 1973 ; REINERT et BAJAJ, 1977). Plus récemment, la possibilité de cultiver des cellules végétales plus ou moins isolées en milieu liquide agité a suscité de nouvelles recherches, notamment pour mieux contrôler le déroulement de la croissance (PEAUD-LENOEL et JOUANNEAU, 1971 ; KING et coll., 1973 ; GUERN et LEGUAY, 1977). Les cellules en suspension ont l'avantage d'être en contact permanent avec le milieu de culture, manifestent un taux de croissance généralement plus élevé que celui des colonies tissulaires et présentent une plus grande homogénéité. Il est possible de leur appliquer des techniques couramment utilisées en microbiologie pour obtenir des mutants, isoler des clones et synchroniser, au moins partiellement, les divisions cellulaires. Dans le domaine de la recherche appliquée, il faut signaler que de nombreux métabolites secondaires (alcaloïdes, terpènes, stéroïdes, phénols, anthocyanes,

etc...), produits de façon spécifique par certaines plantes entières (BUTCHER, 1977), peuvent être synthétisées par des cellules en suspension (CONSTABEL et coll., 1971 ; DAVIES, 1972 ; BUCKLAND et TOWNSLEY, 1975 ; KAMIMURA et coll., 1976 ; GAMBURG, 1978). Bien que les rendements obtenus soient généralement faibles, les biotransformations réalisées par certaines cellules (FURUYA et coll., 1973 ; REINHARD, 1974 ; STECK et CONSTABEL, 1974) et la possibilité de les cultiver en fermenteurs (CHENIEUX et coll., 1977 ; STREET, 1977) offrent des perspectives nouvelles intéressantes.

L'idée selon laquelle des composés à fonction -SH jouent un rôle dans les processus de la croissance n'est pas nouvelle. Selon PILET (1957), ce serait GOLLA qui aurait signalé pour la première fois l'accumulation de composés sulfhydrilés au niveau des méristèmes, en 1902. Mais ce n'est qu'une trentaine d'années plus tard que les recherches entreprises par HAMMET, RAPKINE et leurs collaborateurs permirent d'établir un rapport entre la multiplication des cellules et les fonctions thiols. Dès 1929, HAMMET confirme l'accumulation de composés sulfhydrilés dans les méristèmes racinaires et constate que les sels de plomb inhibent de façon réversible la croissance des racines d'Ail et de Maïs en se combinant avec des radicaux -SH. Après avoir utilisé de nombreux composés soufrés renfermant des fonctions -SH ou des ponts disulfures, HAMMET (1929, a et b) affirme que seuls les composés sulfhydrilés stimulent la croissance, les formes oxydées étant généralement inhibitrices.

En 1931, RAPKINE analyse les variations de la teneur en -SH acidosolubles lors de la première mitose de l'oeuf d'Oursin et constate qu'elle diminue au cours de la prophase pour augmenter rapidement dès le début de la métaphase et jusqu'au moment où la cellule se divise. C'est la première fois qu'on établissait un rapport direct entre la teneur en -SH endogènes et le déroulement de la mitose. Quelques années plus tard, il démontre que des inhibiteurs des fonctions thiols bloquent la division cellulaire et que le glutathion lève cette inhibition (RAPKINE, 1936, 1937).

Dès le début de ses travaux, HAMMET eut le mérite de tenter de distinguer les effets des composés sulfhydrilés sur les deux principaux

aspects de la croissance : l'augmentation du nombre des cellules et celle de leur taille. Selon cet auteur, il ne paraît pas douteux que les -SH interviennent de manière spécifique sur la division cellulaire. Un peu plus tard, HAMMET et CHAPMAN (1938) signalent une "corrélation positive" entre les -SH et la multiplication cellulaire et une "corrélation négative" entre ces composés et l'élongation des cellules. Ainsi, les -SH et plus spécialement le glutathion (HAMMET en parle comme d'une véritable "hormone mitotique") induiraient d'une manière spécifique la division des cellules.

En utilisant différents inhibiteurs des fonctions thiols, COMMONER et THIMANN (1941) et THIMANN et W.D. BONNER (1948) montrent que les -SH interviennent également dans les processus d'élongation. Simultanément J. BONNER (1949) constate que la cystéine inhibe l'élongation des coléoptiles d'Avoine. Ces résultats apparemment contradictoires s'expliquent si on admet que les deux catégories de substances contrarient l'action de l'auxine qui stimule l'élongation cellulaire. Or, à la même époque, HANSCH, MUIR et METZENBERG (1951) suggèrent que l'auxine agit en se fixant sur une protéine par deux liaisons, dont l'une fait intervenir une fonction thiol. Cette théorie permet d'interpréter les observations de THIMANN et BONNER et rend compte de l'activité d'une majorité de substances auxinomimétiques. Il y a toutefois quelques exceptions qui montrent qu'elle est insuffisante (MUIR et HANSCH, 1953). Par la suite, d'autres complexes auxines-protéines ont été mis en évidence par différents auteurs, notamment par SIEGEL et GALSTON (1953) et par MARRE (1955), sans qu'on sache si les fonctions thiols jouent un rôle important dans leur constitution.

On connaît aujourd'hui la très grande réactivité des radicaux -SH et le rôle de quelques composés sulfhydrylés solubles, notamment celui du glutathion et de la cystéine qui sont des maillons importants des chaînes d'oxydo-réduction (JOCELYN, 1972, p. 190-200). On sait également que de nombreuses enzymes (principalement des oxydo-réductases, des transférases et des hydrolases) présentent des fonctions -SH dont l'intégrité est indispensable à leur activité (BARRON, 1951 ; JAVILLIER et coll., 1964). Par ailleurs, le développement des techniques de fractionnement cellulaire a révélé que l'activité de nombreux organites et plus particulièrement celle des mitochondries et du réticulum endoplasmique est partiellement ou totalement supprimée

quand on bloque les fonctions -SH par des inhibiteurs spécifiques (JOCELYN, 1972, p. 222-235) ; ce qui confirme les travaux déjà anciens de THIMANN et BONNER (1948, 1949).

Il est clair que les conceptions de HAMMET, RAPKINE et BONNER sont beaucoup trop restrictives : le glutathion n'est certainement pas "l'hormone mitotique" et les radicaux -SH n'interviennent pas de façon spécifique dans les processus de mérisis et d'auxésis. Mais le fait que les fonctions thiols, par l'intermédiaire des enzymes -SH dépendantes, contrôlent des chaînes métaboliques aussi fondamentales que la glycolyse et le cycle de KREBS n'exclut pas, bien au contraire, que les radicaux -SH agissent également sur la croissance qui procède en définitive de l'activité du métabolisme cellulaire dans son ensemble. De plus, deux théories récentes, celle de MAZIA (1959) et celle de LAMPORT (1965 ; 1970), que nous exposerons et discuterons plus loin, suggèrent que les -SH jouent un rôle très important d'une part dans la formation et le fonctionnement de l'appareil mitotique, donc dans la dynamique de la division cellulaire ; d'autre part, dans l'extensibilité des parois et par conséquent dans le grandissement des cellules végétales.

Etant donné la grande réactivité des radicaux -SH et leur participation à de nombreux processus physiologiques chez les Végétaux (germination, division cellulaire, élongation, floraison, maturation des fruits, résistance au froid et à la sécheresse etc...) le choix du matériel biologique à utiliser pour analyser les relations entre les -SH et la croissance est particulièrement important. Bien peu de matériels semblent pouvoir offrir les avantages des oeufs d'Oursin employés par RAPKINE puis par MAZIA. La plupart des chercheurs qui se sont servis d'un matériel végétal ont utilisé des méristèmes racinaires (HAMMETT, 1929 ; HAMMETT et CHAPMAN, 1938 ; GOAS, 1955 ; PILET, 1957 ; PILET et ZRYD, 1965 ; ZRYD, 1967 et 1969) ou caulinaires (LANCE, 1955), des germinations (HOPKINS et MORGAN, 1943 ; SPRAGG et Coll., 1962). MARRE et ARRIGONI (1957, a) GOAS (1956, 1964) et quelques autres ont employé des coléoptiles et des fragments de tige. Peu de travaux, et on le comprend, ont porté sur des organes prélevés sur des plantes entières ; citons

cependant les recherches de BRUNEL-CAPELLE (1955) et de GOAS (1954 et 1959).

Lorsque nous avons entrepris ce travail, on connaissait très peu de choses sur la participation des composés sulfhydrylés à la croissance des cultures in vitro des plantes. A la suite de GAUTHERET (1937, 1939) et de NOBECOURT (1937), plusieurs chercheurs préconisèrent d'incorporer de la cystéine dans les milieux de culture ; par la suite, il s'avéra que cette substance n'était généralement pas indispensable. D'autres composés renfermant une fonction thiol peuvent stimuler la croissance, mais les effets varient beaucoup selon la nature du tissu et les conditions de leur utilisation (BOURIQUET, 1960). Aucun travail comportant des dosages des fonctions thiols dans des tissus végétaux cultivés in vitro n'avait encore été effectué.

Nous nous sommes particulièrement intéressé aux "-SH solubles", c'est-à-dire à la fraction des composés sulfhydrylés solubles dans l'acide trichloracétique ou dans l'acide sulfosalicylique. Elle comporte, en plus des acides aminés soufrés, le glutathion qui représente chez les plantes la majeure partie des -SH acidosolubles (JOCELYN, 1972, p. 10-14 et 279-287) et quelques petits peptides dont la présence dépend de l'agent utilisé pour précipiter les protéines (MAZIA, 1959). Les "-SH protéiques" appartiennent à plusieurs catégories, selon leur "accessibilité" au sein des protéines et à la faculté qu'ils ont de réagir avec des agents oxydants (BARRON, 1951 ; JAVILLIER et coll., 1964). Dans les protéines natives, les "freely reacting -SH groups" réagissent avec des oxydants doux tels que le ferricyanure et l'iodosobenzoate, les "sluggish -SH groups" réagissent avec des agents plus puissants comme le p-chloromercuribenzoate par exemple. Enfin, il existe une troisième catégorie de -SH, si bien protégés au sein des protéines natives, qu'ils ne sont pas oxydables par les composés précédents : ce sont les "-SH masqués" que l'on n'atteint qu'après dénaturation des protéines. En raison des différences de réactivité des diverses catégories de -SH protéiques, et parce que les -SH solubles représentent certainement l'un des meilleurs critères pour juger de l'activité des cellules (ZRYD, 1969), nous avons surtout analysé les variations de ces derniers.

Dans la première partie de ce mémoire, nous étudierons la répartition des composés -SH dans des cultures in vitro de Carotte (fragments de racine et colonies tissulaires) et leur évolution au cours de leur croissance. Nous examinerons également les répercussions provoquées par des modifications de l'environnement des cultures sur leur prolifération et parallèlement sur leur teneur en -SH. Dans la seconde partie, nous déterminerons les principaux paramètres de la croissance d'une suspension cellulaire de Silène et nous étudierons les facteurs endogènes et exogènes qui contrôlent le cycle de croissance. La connaissance de ces paramètres devrait nous permettre de synchroniser des suspensions cellulaires de Silène et ainsi de disposer d'un matériel plus favorable pour analyser les variations des composés sulfhydrilés en relation avec la multiplication et le grandissement des cellules. Enfin, nous confronterons nos résultats avec ceux de nos prédécesseurs et nous les discuterons en fonction de plusieurs hypothèses qui font intervenir les groupements -SH dans les mécanismes physiologiques et biochimiques de la croissance des Végétaux.

M A T E R I E L

E T

M E T H O D E S

L'ensemble de ce travail a été effectué avec des tissus et des cellules végétales cultivés in vitro. Nous décrirons d'abord brièvement les techniques de cultures mises en oeuvre, puis nous exposerons les différentes méthodes utilisées pour mesurer la croissance et l'activité physiologique des tissus et des cellules et pour doser les groupements soufrés (-SH et S-S) dans ces cultures.

CHAPITRE 1 : LES CULTURES IN VITRO DE CAROTTE ET DE SILENE

A - CULTURES DE FRAGMENTS D'ORGANES

1 - Origine et préparation du matériel biologique

Les racines de Carotte (Daucus carota L.) proviennent du commerce. Après un tri soigneux pour éviter toute blessure ou nécrose apparente, elles sont pelées, puis plongées pendant 15 à 20 mn dans une solution renfermant 90 g.l^{-1} d'hypochlorite de calcium à 215° chlorométrique (ou 140 g.l^{-1} d'hypochlorite de calcium PROLABO à 110-125°). Après 3 lavages successifs de 10 mn chacun, les racines sont débitées en tronçons de 25 ou 30 mm de longueur. Chez la Carotte, il est facile de localiser la pénétration de l'hypochlorite dans les tissus corticaux. Toutes les zones atteintes blanchissent rapidement ; elles doivent être éliminées. Chaque tronçon est alors découpé au scalpel en prismes de 8 mm de côté ou, à l'aide d'un emporte-pièce, en cylindres de 8 mm de diamètre. Cette seconde méthode est préférable car elle fournit des fragments mieux calibrés. Notons que les explantats sont prélevés au niveau du cambium et qu'ils comportent du phloème et du xylème.

Les tiges de Silène [Silene alba (MILLER) E.H.L. KRAUSE = Melandrium album (MILLER) GARCKE = Lychnis dioica L.] sont récoltées sur des plantes sauvages ou cultivées en pleine terre. Après ablation des feuilles, elles sont désinfectées par une solution de Mercryl laurylé LABAZ (3 % pendant 15 mn), puis par une solution d'hypochlorite de calcium (70 ou 120 g.l^{-1} , selon le degré chlorométrique, pendant 15 mn) et rincées (3 fois 10 mn) à l'eau stérile. Des fragments de 25 mm sont alors prélevés au niveau des entre-noeuds ou des noeuds.

2 - Mise en culture

Les techniques de culture sont celles préconisées par GAUTHERET (1959). D'une manière générale, les fragments de racines de Carotte et de tiges de Silène sont cultivés dans des tubes (120 mm x 20 mm) contenant 20 ml de milieu gélosé (0,9 % d'agar en branches ou mieux 0,6 % d'agar en poudre). Ils sont placés verticalement, à demi-enfoncés dans le milieu, en position normale, N, (face racinaire plongeant dans la solution nutritive) ou en position inverse, I, (face foliaire immergée dans la solution nutritive). Pour quelques expériences particulières, les fragments ont été disposés horizontalement à la surface du milieu gélosé, dans des fioles de FOURNEAU de 125 ml renfermant 50 ml de solution nutritive.

3 - Milieus de culture

a. les racines de Carotte

Les fragments de racine sont cultivés sur un milieu simple contenant les macro- et les microéléments de la solution minérale de HELLER (1953) plus 3 % de glucose. Plusieurs séries de cultures ont été effectuées sur un milieu légèrement différent renfermant en plus de la solution de KNOP diluée de moitié, les oligoéléments de la solution de BERTHELOT modifiée par GAUTHERET (1959, p. 12) et 3 % de glucose.

b. les tiges de Silène

Les conditions de culture et les exigences nutritionnelles des cultures de Silène n'avaient jamais été étudiées. Aussi, avons-nous utilisé simultanément un milieu simple, celui de HELLER, et un milieu plus complexe, celui de MURASHIGE et SKOOG (1962), auxquels nous avons ajouté différents régulateurs de croissance. Des résultats différents ont été obtenus selon l'origine des fragments (entre-noeuds ou noeuds), leur position par rapport au milieu, la nature des substances phytohormonales utilisées.

α- les entre-noeuds

Lorsque des fragments prélevés au niveau des entre-noeuds sont transplantés en position inverse sur les milieux de HELLER ou de MURASHIGE et SKOOG dépourvus de régulateurs de croissance, la face racinaire située hors du milieu prolifère. Ce n'est pas l'assise cambiale qui se divise,

contrairement à ce que nous pensions initialement (DUBOIS et BOURIQUET, 1977). Les tissus néoformés proviennent du reclouonnement des cellules du parenchyme cortical entourant l'anneau de sclérenchyme. Les cellules du sclérenchyme les moins différenciées participent également à la formation du cal (Pl. 1, Fig. 4 et 5).

Après une quinzaine de jours, un cal chlorophyllien dur et compact recouvre la face racinaire des fragments. Sa croissance est lente (Pl. 1, Fig. 6).

Le développement polarisé des cals est bien mis en évidence quand les fragments de tige sont placés horizontalement à la surface du milieu de HELLER dépourvu de phytohormones. Dans ces conditions, la polarité est absolue : les cals se forment uniquement à la face racinaire des explantats. En présence de AIA ou de 2,4-D, la prolifération peut se manifester latéralement et même à la face foliaire des fragments (Tableau I). Curieusement les cals latéraux et apicaux sont toujours plus friables et moins chlorophylliens que ceux qui se forment en position basale.

SOLUTION NUTRITIVE	NOMBRE TOTAL DE CALS DEVELOPPES	POURCENTAGE DE CALS DEVELOPPES	
		Sur la face racinaire	Sur les faces foliaire et latérale
HELLER (H)	20	100	0
H + AIA	10^{-8} g.ml ⁻¹ : 19 10^{-7} g.ml ⁻¹ : 16 10^{-6} g.ml ⁻¹ : 14	100 50 36	0 50 64
H + 2,4-D	10^{-8} g.ml ⁻¹ : 16 10^{-7} g.ml ⁻¹ : 20 10^{-6} g.ml ⁻¹ : 15	100 65 13	0 35 87

TABLEAU I : Effets du AIA et du 2,4-D sur la polarité manifestée par les fragments de tige (entre-noeuds) de *Silène* cultivés en position horizontale sur le milieu de HELLER pendant 30 jours.

Le milieu de HELLER, moins riche en éléments minéraux et dépourvu de substances organiques (à part le glucose) est plus favorable à la callogenèse que celui de MURASHIGE et SKOOG.

Le 2,4-D stimule la prolifération, le ANA provoque surtout la formation de nombreuses racines, alors que le AIA modifie peu la croissance des cals et ne provoque aucune rhizogenèse à la concentration de 1 mg.l^{-1} . La Kin et la BA, à la même concentration, inhibent légèrement le développement des cals et n'induisent pas la formation de racines. Aucune des substances étudiées ne permet d'obtenir la néoformation de bourgeons (DUBOIS et BOURIQUET, 1974).

La capacité de reprise et de prolifération des explantats varie beaucoup selon la position qu'ils occupaient sur la tige. Le pourcentage de cals obtenus est plus élevé lorsque les explantats sont prélevés sur des entre-noeuds jeunes ou sur des tiges dont la croissance n'est pas terminée, c'est-à-dire lorsque le parenchyme cortical est peu ou pas lignifié. La différenciation d'un large anneau de sclérenchyme, à parois très fortement lignifiées, réduit ou inhibe totalement la prolifération.

β- Les noeuds

Des fragments de tiges prélevés au niveau des noeuds et transplantés en position inverse produisent également des cals qui recouvrent progressivement la face basale située hors du milieu.

Les fragments cultivés en position normale sur les milieux de HELLER et de MURASHIGE et SKOOG dépourvus de facteurs phytohormonaux ne forment ni cals, ni racines. Après 2 ou 3 jours, les bourgeons situés à l'aiselle des feuilles nodales se développent et la croissance des tiges feuillées est plus ou moins rapide selon les conditions de culture. Les principaux facteurs favorisant la floraison in vitro ont été étudiés (DUBOIS et BOURIQUET, 1974). L'obtention de fleurs de Silene alba (Pl. I, Fig. 9) et de Silene dioica, à partir de noeuds isolés a permis d'étudier le comportement de l'Ustilago violacea (PERS.) ROUSS., Champignon parasite des anthères des Caryophyllacées dans les conditions d'asepsie de la culture in vitro (BATCHO et DUBOIS, 1975 ; BATCHO et ZAMBETTAKIS, 1975; BATCHO, 1976).

B - LES COLONIES TISSULAIRES

1 - Les tissus de Carotte

La souche chlorophyllienne est celle isolée par GAUTHERET (1939) elle renferme des pigments chlorophylliens et caroténoïdes dont l'analyse a été faite par NAEF (1962) et NAEF et TURIAN (1963). La souche caroténogène isolée par EICHENBERGER (1951) ne présente que des pigments caroténoïdes. Nous avons également utilisé des colonies étiolées provenant de la souche chlorophyllienne. Cultivés à l'obscurité, les tissus chlorophylliens blanchissent rapidement. Leur croissance demeure satisfaisante, bien qu'ils soient totalement dépourvus de chlorophylle dès le 3ème passage et que la teneur en sucre du milieu n'ait pas été augmentée.

Ces tissus de Carotte sont cultivés selon la technique classique imaginée par GAUTHERET et qui a été maintes fois rapportée (voir GAUTHERET 1959). Le milieu renferme les éléments minéraux de la solution de HELLER, du AIA ($5 \cdot 10^{-8}$ ou 10^{-7} g.ml⁻¹), du glucose (3 % pour les colonies chlorophylliennes et étiolées, 5 % pour les colonies caroténogènes).

2 - Les tissus de Silène

Ils proviennent des cals néoformés par les fragments d'entre-noeuds. Après transplantation sur un milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant 0,1 mg de 2,4-D et de Kin, les cals primaires, compacts et très chlorophylliens, se recouvrent d'un tissu blanc-jaunâtre qui prolifère (Pl. II, Fig. 1). Repiqué environ tous les deux mois, ce tissu constitue la souche Sa₁ de Silène (Pl. II, Fig. 4), dont la croissance et les conditions de culture ont été précisées (DUBOIS et BOURIQUET, 1974). Dans les conditions habituelles de culture, la plupart des colonies tissulaires sont recouvertes d'un "feutrage" blanchâtre formé de racines grêles portant des poils absorbants. A la surface de certaines colonies, on remarque des excroissances d'environ 1 mm ressemblant à des embryoides non pigmentés, mais qui ne sont peut-être que des racines modifiées.

Lors du prélèvement des entre-noeuds qui sont à l'origine des cals primaires et des colonies tissulaires de la souche Sa₁, nous avons négligé de relever le sexe des pieds de Silène. Par la suite, nous avons isolé des souches provenant de plantes ♂ et de plantes ♀, sans qu'il nous soit possible de constater de différences, tant sur le plan morphologique que sur celui

de la croissance.

En repiquant des fragments d'entre-nœuds en position horizontale sur des milieux de MURASHIGE et SKOOG renfermant $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D, on observe que le cal basal, d'abord chlorophyllien et compact se transforme spontanément pour donner un tissu beaucoup plus friable, comparable à celui de la souche Sa₁, mais totalement dépourvu de racines. On observe la même transformation du cal lorsque des fragments transplantés en position inverse sont plus profondément enfoncés dans le milieu (Pl. II, Fig. 2). Des cals fortement rhizogènes ont été obtenus de la même manière, en remplaçant le 2,4-D par 1 mg.l^{-1} de ANA (Pl. II, Fig. 3).

C - LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE

1 - Origine et initiation des cultures

La suspension cellulaire a été établie à partir de tissus de la souche Sa₁ de la manière suivante : 2 ou 3 colonies prélevées au cours de la phase de croissance active ont été dilacérées dans une boîte de Pétri stérile et les fragments introduits dans un flacon contenant 100 ml de milieu liquide. Après une dizaine de jours d'agitation, la "suspension cellulaire primaire" est tamisée sur un filtre en inox de 1 mm de vide de maille afin d'éliminer les fragments de tissus non dissociés et le filtrat versé dans un flacon renfermant une égale quantité de milieu neuf.

La "suspension cellulaire primaire" est très hétérogène. Elle contient des cellules de grande taille, qui ne se sont pas encore divisées, des cellules plus petites, généralement arrondies qui se multiplient, des cellules mortes et de nombreux débris cellulaires (Pl. II, Fig. 5). A partir du 3^e passage, la suspension renferme déjà moins de cellules mortes, tandis que la taille des agrégats se régularise (Pl. II, Fig. 6 et 7). Les cellules isolées sont rares ; on peut toutefois en recueillir une certaine quantité par filtration sur des tamis appropriés (Pl. II, 8).

La suspension est entretenue par repiquages successifs, tous les 14 jours. Pour ce faire, nous avons utilisé deux méthodes. La première consiste à prélever à la pipette des fractions de 20 ml dans la culture mère et à les répartir dans les flacons à ensemer. Cette technique est celle qui nécessite le moins de manipulations des cellules et donc celle qui apporte le moins de contaminations dans les cultures. Elle présente pourtant deux inconvénients. On transfère, en même temps que les cellules, une certaine quantité de milieu dont on ne connaît pas la composition. D'autre

part, étant donné la taille et le poids des cellules, celles-ci sédimentent très rapidement ; ce qui ne permet pas de faire des pipetages homogènes dans la fiole à repiquer. La seconde méthode consiste à prélever un volume déterminé de cellules dans la culture mère. Pour cela, on verse le contenu de celle-ci dans un entonnoir de Buchner garni d'un papier filtre et on attend quelques minutes que le milieu s'écoule par gravité. Il ne reste plus qu'à prélever, à l'aide d'une cuiller en verre pyrex calibrée, des volumes déterminés de cellules et à les introduire dans les flacons à ensemercer. Dans les conditions standard, nous répartissons deux cuillers de cellules (ce qui correspond à $3 \pm 0,2$ g de MF) dans 200 ml de milieu nutritif.

2 - Milieu nutritif

Après avoir essayé différents milieux utilisés pour la culture *in vitro* de tissus végétaux, nous avons été amené à choisir une solution nutritive voisine de celle mise au point par LESCURE (1969) pour une suspension cellulaire d'Erable. Sa composition est donnée dans le Tableau II.

<u>MACRO-ELEMENTS</u>	CONCENTRATION	
	mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹
Nitrate de calcium (4 H ₂ O)	290	1,23
Chlorure de potassium	65	0,88
Nitrate de potassium	1960	19,40
Sulfate de magnésium (7 H ₂ O)	360	1,46
Phosphate monopotassique	500	3,70
Phosphate disodique (12 H ₂ O)	97	0,27
<u>MICRO-ELEMENTS</u>		
Sulfate ferreux (7 H ₂ O)	2,80	1,0 . 10 ⁻²
Na ₂ E D T A	3,72	1,0 . 10 ⁻²
Acide borique	1,50	2,4 . 10 ⁻²
Iodure de potassium	0,75	4,5 . 10 ⁻³
Sulfate de manganèse (4 H ₂ O)	4,50	2,0 . 10 ⁻²
Sulfate de zinc (7 H ₂ O)	1,50	5,2 . 10 ⁻³

TABLEAU II : Composition minérale du milieu de LESCURE modifié, utilisé pour les suspensions cellulaires de Silène.

Des essais entrepris en vue de déterminer les conditions optimales de la croissance et le résultat des analyses effectuées par VANDENBOSSCHE (1978) afin de connaître la consommation des ions les plus importants au cours d'un cycle de croissance montrent que ce milieu n'est pas équilibré. Les modifications à apporter seront données dans la partie "RESULTATS EXPERIMENTAUX".

3 - Conditionnement des cultures

a. flacons de 500 ml

La plupart des cultures ont été effectuées dans des fioles d'attaque à fond plat en verre Pyrex de 500 ml, contenant 200 ml de milieu liquide. Pendant la durée des expériences, les flacons sont placés, inclinés à 45°, sur un agitateur rotatif BIOLAFITTE tournant à 70 t.mn⁻¹.

Nous avons également utilisé un autre type d'agitateur. Il s'agit d'un appareil artisanal comportant 2 plateaux horizontaux reliés entre eux par 4 tubes verticaux reposant chacun sur un cylindre-bloc en caoutchouc. La table d'agitation est reliée par l'intermédiaire d'un axe muni d'un excentrique à un moteur dont on peut régler la vitesse. Pour cet appareil, nous avons constaté qu'il valait mieux utiliser des Erlenmeyers à fond large, plutôt que des fioles d'attaque.

Notons qu'il peut être intéressant de remplacer les flacons de 500 ml par des lots de 5 tubes analogues à ceux que l'on utilise pour les cultures de tissus. Ce type de conditionnement s'avère même particulièrement commode pour des essais de courte durée (expériences de marquage, tests biologiques destinés à déterminer l'efficacité d'antibiotiques ou de fongicides, etc...) et chaque fois qu'il n'est pas nécessaire de recueillir des quantités importantes de cellules.

b. fermenteurs

Les essais ont été réalisés dans 3 appareils commercialisés pour des fermentations de microorganismes.

La plupart des cultures ont été réalisées dans un fermenteur BIOLAFITTE, équipé d'une cuve de 20 litres. La description complète de cet appareil figure dans un travail de ROSS (1968), consacré à la mise au point d'une unité de fermentation, au laboratoire de microbiologie de l'Université de Lille.

Nous avons également employé un fermenteur NEW BRUNSWICK muni d'une cuve de 15 litres et qui diffère surtout du précédent par le système d'entraînement de l'axe, électrique sur le premier appareil, magnétique sur le second.

Des difficultés d'ordre technique ont surgi lorsque nous avons voulu passer de la "culture discontinue" à la "culture semi-continue". Le grand volume de la cuve nous contraignait à stocker un important volume de milieu neuf destiné à renouveler la solution nutritive "usée" ; ce qui occasionnait des problèmes de stérilisation (il n'était pas possible d'aseptiser simultanément les récipients, le milieu nutritif et les tubulures de raccordement, compte tenu du modèle d'autoclave disponible).

C'est pourquoi nous nous sommes alors intéressé à un fermenteur SETRIC équipé d'une cuve dont le volume utile est de 3 litres.

Pour ensemer un fermenteur contenant 10 l de milieu, on utilise deux cultures de 500 ml "âgées" de 14 jours. On commence par verser le contenu des deux cultures dans un Erlenmeyer muni d'un ajutage latéral, puis on raccorde l'Erlenmeyer à la cuve du fermenteur par un tuyau de Versilic passé dans une pompe péristaltique. Dans ces conditions, la concentration initiale de la culture en fermenteur est d'environ 200 à 300 g de cellules pour 10 litres de milieu neuf, soit 20 à 30 mg de M.F.ml⁻¹.

D - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1 - Les tissus de Carotte et de Silène

Ils sont cultivés à 21 ± 1°C.

Les cultures destinées à l'entretien et à la multiplication des souches sont placées dans une pièce conditionnée située à l'Est et reçoivent en plus de la lumière du jour, un éclairage d'appoint fourni 12 h/24 par des tubes fluorescents du type "lumière du jour de luxe". L'intensité de l'éclairage (à l'extérieur des tubes de culture) est d'environ 500 lux.

Les cultures effectuées en vue d'étudier des facteurs nutritionnels sont placées dans les mêmes conditions.

Les expériences se rapportant à l'action de la lumière blanche sont conduites dans des chambres climatisées, éclairées par des tubes fluorescents. La photopériode est programmée par une horloge ; l'intensité de l'écl

rement est ajustée en rapprochant plus ou moins les tubes de culture de la source de lumière.

Les expériences se rapportant à l'effet de lumières relativement monochromatiques sont réalisées dans des pièces climatisées plus petites (1,30 m x 0,40 m x 0,70 m). Des batteries de tubes colorés PHILIPS TL 40 w sont disposés le long des parois latérales de chacune des pièces. Des filtres ROHM et HAAS, interposés entre les tubes colorés et les tissus permettent de supprimer les radiations marginales indésirables. Les caractéristiques des tubes et des filtres ainsi que les résultats des analyses de la lumière transmise, mesurée grâce à un spectroradiomètre ISCO, modèle SR, sont indiquées dans la figure 1.

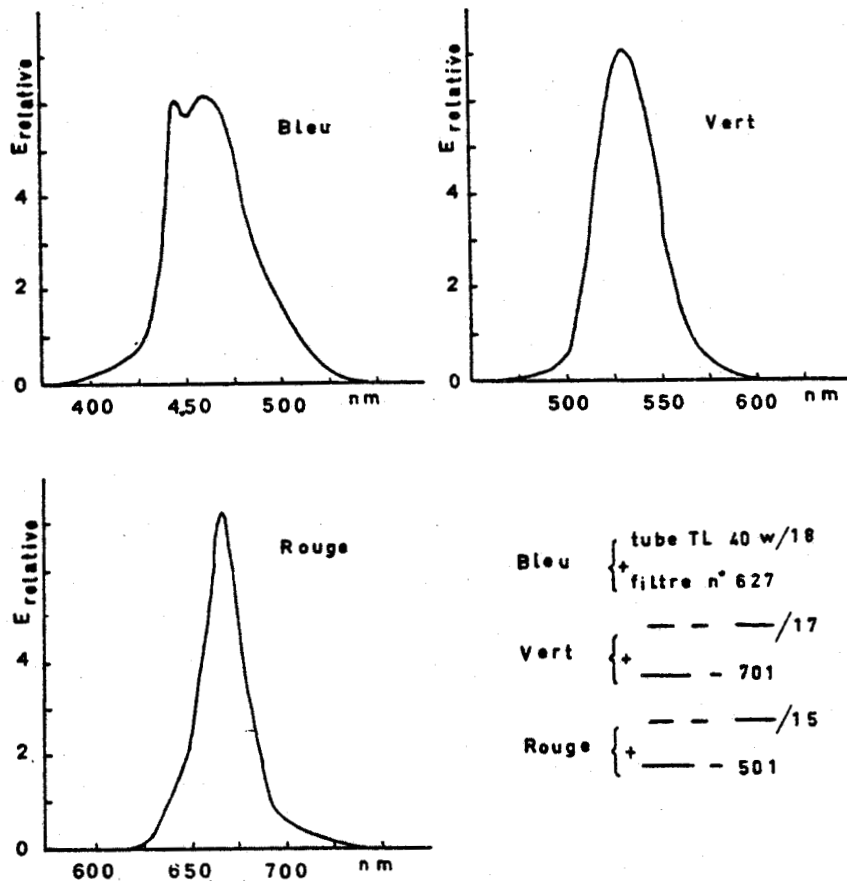


Fig. 1.- Spectres des "lumières relativement monochromatiques" transmises.

Les maximums sont situés respectivement :

- pour le bleu à 460 nm ; largeur de la bande passante : 50 nm ;
- pour le vert à 530 nm ; " " " : 40 nm ;
- pour le rouge à 665 nm ; " " " : 25 nm.

2 - Les suspensions cellulaires de Silène

Quelques expériences préliminaires ont également été effectuées dans ces conditions. Pour les autres, sauf celles se rapportant à la température et à la lumière, les cellules sont cultivées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et en lumière continue ; l'intensité de l'éclairement, mesurée au niveau des flacons est d'environ 500 lux.

CHAPITRE 2 : MESURES DE LA CROISSANCE

A - FRAGMENTS D'ORGANES ET TISSUS ISOLES

Les cultures sont soigneusement séparées de la gélose, rapidement essuyées et pesées (*). On détermine :

- le poids de matière fraîche, au jour J_n : MF_{J_n}
- la croissance, au jour J_n : $\Delta MF = MF_{J_n} - MF_{J_0}$

La mesure de MF_{J_0} s'effectue, au moment de la mise en culture, sur un lot d'explantats non ensemencés.

Le poids de matière sèche, MS, est déterminé de deux façons différentes ;

- quand les tissus secs ne font pas l'objet d'analyses ultérieures on place les cultures à l'étuve à 80°C jusqu'à obtention d'un poids constant
- quand les tissus secs doivent être utilisés pour des dosages, on les congèle rapidement à l'azote liquide et on les lyophilise pendant 48 ou 72 h.

(*) voir la remarque n°1, p. 20.

On détermine ainsi MS_{jn} et ΔMS_{jn}

La teneur en eau des tissus ($\frac{MF - MS}{MS} \cdot 100$) et la teneur en matières sèches ($100 - H_2O \%$) fournissent^{MF} également des indications intéressantes sur le déroulement de la croissance.

B - CELLULES EN SUSPENSION

1 - Cellules cultivées en flacons de 500 ml

a. poids de MF et poids de MS

Le poids de MF est déterminé après filtration sous vide dans un entonnoir de Buchner garni de deux feuilles de papier filtre. Les conditions de la filtration doivent être standardisées. On considère que l'opération est terminée quand une goutte de milieu tombe dans la fiole à vide toutes les 15 secondes environ (*).

Le poids de MS est mesuré dans les mêmes conditions que celui des tissus et des fragments d'organes.

b. volume cellulaire total

On mesure ce volume dans une éprouvette graduée après décantation de la suspension. On peut également centrifuger une partie aliquote de la culture dans un tube gradué. Dans les deux cas, la précision est relativement faible.

c. numération cellulaire

Les dénombrements sont effectués après dissociation partielle des agrégats par l'acide chromique à 10 % pendant 40 mn à 70°C, dans une cellule de Nageotte de 0,5 mm de profondeur. Chaque point sur la courbe est une moyenne de 3 comptages.

d. index mitotique

Les cellules sont fixées par un mélange d'éthanol et d'acide acétique concentré (3 v : 1 v) et les plus gros agrégats dissociés par un ultra-disperseur homogénéiseur du type POLYTRON. Après une hydrolyse de 15 mn à 60°C, on colore par le réactif de SCHIFF. Le développement de la coloration

(*) voir la remarque n°2, p. 20.

nécessite toujours plusieurs heures. Les valeurs des index mitotiques sont des moyennes de 2 ou 3 comptages portant chacun sur 1000 cellules. Parmi les noyaux prophasiques, seuls ceux présentant des chromosomes nettement individualisés ont été comptabilisés en tant que "prophase". Les autres, parfois difficiles à observer en raison des leucoplastes qui se répartissent dans le cytoplasme périnucléaire, ont été comptés en même temps que les noyaux quiescents. Cette pratique limite les erreurs de comptage mais donne de l'index mitotique une valeur par défaut.

2 - Cellules cultivées en fermenteur

On réalise des prélèvements de 10 ou 20 ml de suspension cellulaire à l'aide d'une seringue stérile. Pour cela, on enfonce l'aiguille à travers un morceau de tuyau à vide relié par un tube en Versilic à la cuve du fermenteur. Une pompe péristaltique permet de faire passer la suspension cellulaire dans le circuit de prélèvement.

Les poids de MF et de MS sont mesurés après avoir recueilli les cellules sur une membrane de type Millipore. Le filtrat est utilisé pour déterminer la consommation du sucre et de l'azote.

Remarques :

- 1 - Chaque lot comporte 6 ou 12 cultures et chaque essai est répété au moins deux fois. Les valeurs rapportées sont soit celles d'une expérience donnée, soit les moyennes des différentes expériences
- 2 - Chaque expérience comporte deux séries de flacons de cultures. Chaque essai est répété au moins deux fois et les valeurs rapportées sont généralement les moyennes calculées à partir des résultats de ces différents essais.

CHAPITRE 3 : MESURES D'ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES DES TISSUS ET DES CELLULES

A - LA RESPIRATION

1 - Mesure de l'intensité respiratoire

L'intensité respiratoire est mesurée selon la technique de WARBURG (voir : UMBREIT et coll., 1959), adaptée par LANCE (1963) aux colonies tissulaires entières. Nous introduisons dans les fioles de mesure une ou plusieurs colonies tissulaires, selon leur taille (sans solution tampon) ou 1 g de cellules plus 1,5 ml de milieu de culture liquide. Après équilibrage de l'appareil, on effectue une mesure toutes les 5 mn jusqu'à 30 ou 60 mn selon l'activité des tissus ou des cellules. L'intensité respiratoire est rapportée soit à l'unité de MF ou de MS, soit à une certaine quantité d'azote protéique.

2 - Mesure de l'oxygène dissous dans le milieu de culture

L'oxygène dissous dans le milieu des suspensions cellulaires de Silène est dosé au moyen d'un analyseur BECKMAN. Le zéro est établi en trempant l'électrode dans une fiole témoin contenant 200 ml de milieu liquide dans lequel on fait barboter de l'azote R. Les mesures sont effectuées à 25°C, dans la chambre de culture.

B - DOSAGE DES COMPOSES AZOTES

1 - Dans les cellules

Les dosages sont effectués sur du matériel lyophilisé. Les différentes formes d'azote : azote total, NT, et selon les expériences azote protéique, NP, ou azote soluble, NS, sont dosés par colorimétrie à 420 nm, grâce au réactif de NESSLER (commercialisé par Merck) après minéralisation en présence de H_2SO_4 concentré et de catalyseur ($Cu SO_4$: 1 partie ; K_2SO_4 : 1 partie ; Se : 0,2 partie).

Les protéines ont été dosées par la méthode de LOWRY et coll., (1951), après précipitation par l'acide trichloracétique à 10 % et solubilisation sodique.

2 - Dans les milieux de culture liquides

La teneur en azote nitrique des milieux est mesurée par la méthode au salicylate (RODIER, 1971) ; celle de l'ammonium, par la réaction au "phénol-hypochlorite", selon la méthode décrite par WEATHERBURN (1967).

C - DOSAGE DES SUCRES

1 - Dans les cellules

Les sucres solubles présents dans les cellules ont été extraits par l'eau bouillante et dosés par la méthode à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI modifiée par RIMINGTON (MONTREUIL et SPIK, 1963).

2 - Dans les milieux de culture liquides

On dose les sucres réducteurs dans le milieu de culture filtré avant et après hydrolyse acide (H_2SO_4 , 1N - 100°C - 15 mn) par la méthode au 3,5-dinitrosalicylate de sodium (MILLER, 1959).

Des fractions aliquotes du milieu, prélevées au cours de la culture sont également chromatographiées dans le solvant butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5), sur papier Whatman n° 1 (durée de migration 48 ou 72 h) et révélées au phosphate de p-anisidine de MUKHERJEE et SRIVASTAVA (MONTREUIL et SPIK, 1968).

D - ANALYSES DES ACIDES NUCLEIQUES

Les techniques mises en oeuvre ont été décrites en détail par VASSEUR, dans sa thèse (1978). Nous avons combiné une technique de marquage et une technique de dosage quantitative.

Environ 3 g de cellules sont mises en contact de ^{32}P pendant les 30 mn qui précèdent chacun des prélèvements. L'acide phosphorique marqué est ajouté à raison de $18 \mu Ci \cdot ml^{-1}$ et l'incubation est poursuivie sous agitation à 21°C, et à la lumière. A la fin de cette période, les cellules sont rincées avec du milieu neuf, congelées par l'azote liquide, puis broyées dans de l'acétone à -20°C. L'homogénéisat est centrifugé et le culot traité

afin d'éliminer les composés acidosolubles et les lipides selon la technique préconisée par HUTCHINSON et MUNRO (1961).

Les acides nucléiques sont extraits selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) et le contenu en phosphore est évalué selon ALLEN (1940). L'estimation quantitative est aussi réalisée par spectrophotométrie d'absorption à 260 nm pour l'ARN et à l'aide du réactif à la diphénylamine pour l'ADN (BURTON, 1956).

Des parties aliquotes de ces solutions sont mélangées à 10 ml d'eau désionisée et la radioactivité est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide INTERTECHNIQUE. Les résultats sont exprimés en coups par mn, après soustraction du mouvement propre de l'appareil.

E - DOSAGE DES AUXINES ENDOGENES

Seule la fraction acide de l'extrait acéto-éthylique (PILET, 1963, a), séparée par chromatographie sur SiO_2 (COLLET et coll., 1964), est dosée biologiquement en utilisant d'une part le test "section de racine de Lens" (PILET et coll., 1960) et d'autre part le test "coléoptile de Triticum" (PILET et DUBOUCHET, 1962). Le taux en auxines endogènes est exprimé en μg de AIA pour 5 g de poids de MF.

F - ACTIVITE PEROXYDASIQUE

Les enzymes ont été recherchées dans les cellules de Silène et dans leur milieu de culture liquide. Les étapes de l'extraction ont déjà été décrites (LEGRAND et DUBOIS, 1977 et 1978) ; elles permettent de séparer 3 fractions : E_1 , E_2 et E_3 renfermant respectivement les peroxydases solubles, les ioniques et les covalentes. La méthode de dosage des peroxydases est celle décrite par VASSEUR et LEGRAND (1972) et LEGRAND et coll., (1977).

F - ACTIVITE AUXINES-OXYDASIQUE

Pour les dosages dans les tissus de Carotte, nous avons employé la technique proposée par PILET (1956 et 1957) puis modifiée par PILET et COLLET (1962). On prépare l'extrait brut en broyant environ 1 g de tissus frais en présence d'une solution tampon de pH 6,1 à 4°C, puis on le centrifuge et on le complète à 50 ml avec le tampon. Le mélange d'incubation

contient : 2 ml d'extrait enzymatique, 1 ml de $MnCl_2$ ($0,1 \mu M.ml^{-1}$), 1 ml de 2,4-dichlorophénoI ($0,1 \mu M.ml$) et 5 ml de solution tampon.

Pour les cellules de Silène, l'extraction a été conduite de la même manière que pour les peroxydases, à partir de cellules congelées et broyées dans l'azote liquide. La méthode de dosage est la même que celle utilisée pour les tissus de Carotte.

L'activité auxines-oxydasique est exprimée par la quantité de AIA détruite en 1 h et rapportée au poids de MF, de MS, ou à la teneur en protéines des cellules ou de l'extrait (activité spécifique).

G - STRUCTURE ET ACTIVITE DES PLASTES

1 - Observations cytologiques

MICROSCOPIE PHOTONIQUE .- Les plastes des tissus de Carotte (coupes ou écrasement de fragments) et des cellules de Silène sont observés après coloration par le réactif iodo-ioduré (= lugol) ou par le traitement à l'acide périodique-Schiff (selon JENSEN, 1962, p. 198).

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE .- Pour les tissus de Carotte, on prélève de très petits fragments à 1 mm sous la surface des colonies, dans une zone néoformée aussi homogène que possible. Les échantillons sont fixés, à froid pendant 6 h par une solution de glutaraldéhyde à 8 % dans un tampon cacodylate 0,1 M à pH 6,8. Après un lavage de 2 h dans le tampon, ils sont post-fixés pendant 2 h par de l'acide osmique à 1 % dans le tampon.

Pour les cellules de Silène, la technique de fixation est légèrement différente ; elle comporte une fixation par une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans du tampon cacodylate 0,05 M à pH 6,8, puis, après un lavage, une post-fixation (acide osmique à 1 %, dans le tampon, pendant 3 h).

Les tissus ou les cellules sont ensuite déshydratés progressivement dans l'acétone, puis infiltrés et inclus dans l'araldite. Dans d'autres cas, l'inclusion a été faite dans l'épon après déshydratation par l'éthanol et par l'oxyde de propylène. Les coupes ont été contrastées pendant 30 mn par l'acétate d'uranyle, en solution aqueuse saturée et observées à l'aide d'un microscope HITACHI de type H.S. 75.

2 - Dosage des pigments plastidaux

Les pigments sont extraits par l'acétone à 80 %, à basse température et sous une très faible lumière. Les dosages des chlorophylles et des pigments caroténoïdes sont effectués à l'aide d'un spectrophotomètre à défilement, dans une cuve de 1 cm de largeur. Les teneurs des différents pigments sont calculées d'après les équations proposées par BRUINSMA (1963) et par HOLM (1954) et rapportées à différents critères de référence (MF, MS et azote protéique).

3 - Dosage de l'amidon

L'amidon est extrait des cellules par la méthode décrite par Mac CREADY et coll. (1950). Les dosages sont effectués colorimétriquement, après coloration par l'iode, à 660 nm. Les valeurs obtenues sont comparées à une courbe étalon établie à partir d'une solution d'amylose.

CHAPITRE 4 : DOSAGE DES GROUPEMENTS SOUFRES (-SH ET S-S)

A - DOSAGE DES COMPOSES SULFHYDRILES PAR LA METHODE AMPERO- METRIQUE

Cette méthode a été initialement suggérée par BENESCH et BENESCH (1948), puis améliorée par BENESCH et Coll. (1955) qui proposent de remplacer le tampon $\text{NH}_4\text{OH}-\text{NH}_4\text{NO}_3$ par du tampon tris (pH final : 7,4), ce qui permet de doser les -SH protéiniques dans de bien meilleures conditions.

Elle fut adaptée par la suite par STERN (1963) pour déterminer les fonctions -SH dans de faibles volumes de suspension bactérienne, puis par PILET et ZRYD (1965) et ZRYD (1967) pour le dosage des composés sulfhydrylés non protéiques, dans la racine de Lentille.

1 - Principe

Le principe de la méthode est simple : il s'agit d'une titration des fonctions -SH par AgNO_3 . On sait que les -SH réagissent quantitativement avec les ions Ag^+ pour former des mercaptides insolubles. Le "point final" de cette réaction peut être déterminé ampérométriquement à l'aide d'une électrode de platine associée à une électrode de référence impolarisable Ag/AgCl . Tant que la réaction d'addition entre les radicaux -SH et les ions Ag^+ est complète, le courant de diffusion est pratiquement négligeable. Dès que le point d'équilibre est dépassé, les ions Ag^+ en excès provoquent une forte augmentation du courant de diffusion. La mesure du volume de la solution titrée d' AgNO_3 utilisé pour atteindre le point d'inflexion de la courbe ("point final") permet de calculer la teneur en -SH de la solution analysée (Fig. 2,B).

Selon BENESCH et Coll. (1955), en présence du tampon Tris à pH 7,4, la réaction est spécifique des groupements -SH. De nombreux acides aminés (histidine, leucine, arginine, phénylalanine, sérine, cystine, méthionine), le glutathion oxydé, l'acide ascorbique, l'ADN, l'ARN dosés dans les mêmes conditions, mais à une concentration 10 fois supérieure, donnent un résultat négatif.

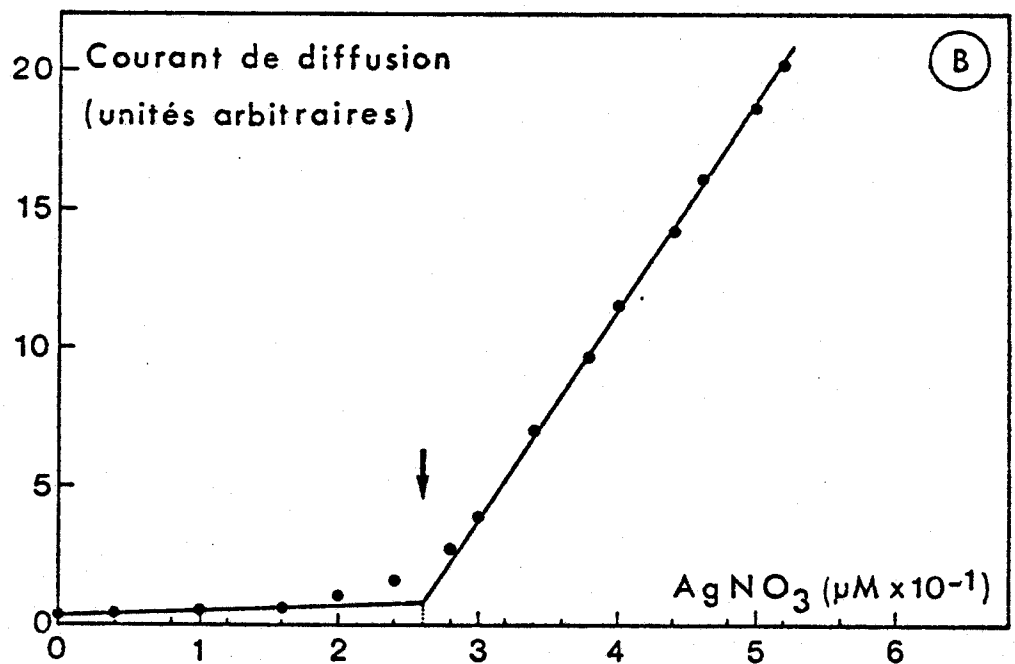
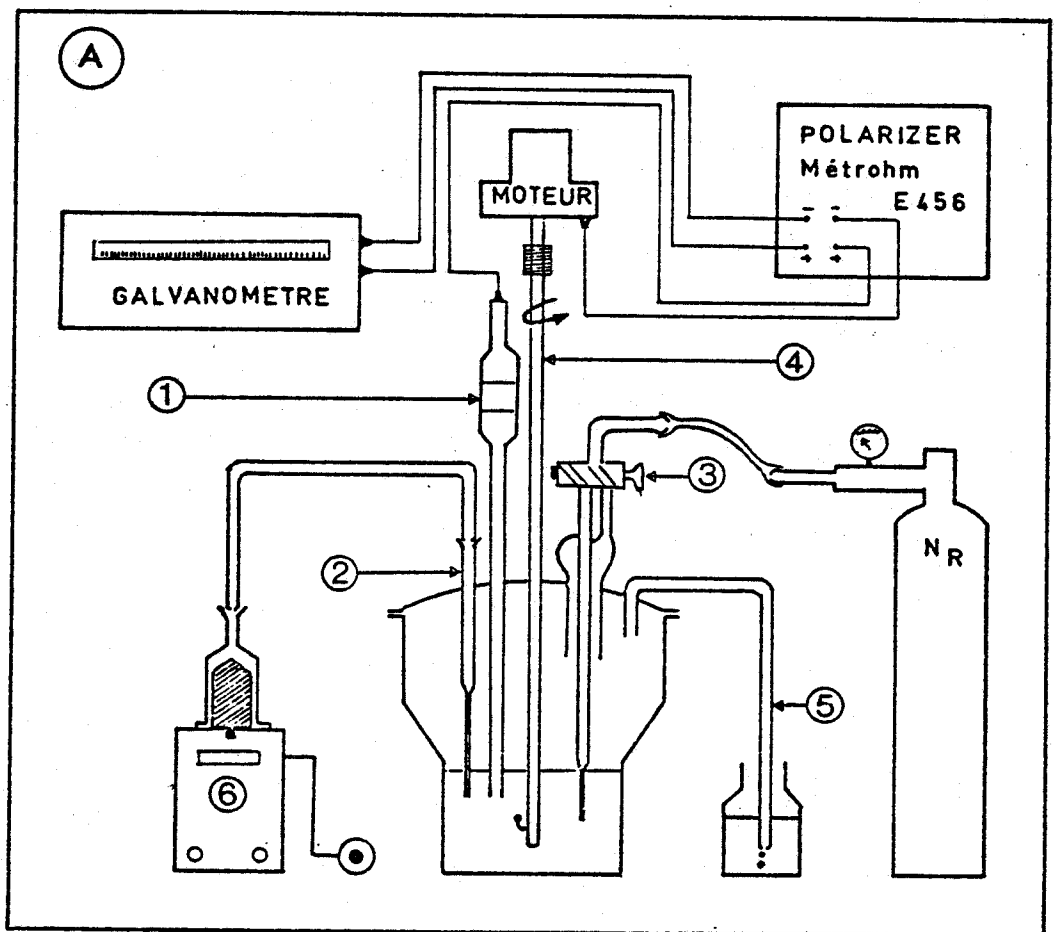


Figure 2,A : Schéma de montage du matériel utilisé pour le dosage ampérométrique des fonctions -SH :

1 : électrode de référence, Ag/AgCl - 2 : pointe de la microburette, 6, - 3 : robinet à 2 voies pour l'introduction de l'azote R - 4 : électrode rotative de platine - 5 : tube de dégagement pour l'évacuation de l'azote R ;

B : Dosage ampérométrique d'une solution de référence (G-SH, $5 \cdot 10^{-4}M$), destiné à vérifier l'étalonnage des électrodes. La flèche correspond au "point final" de la réaction.

D'autres réactifs susceptibles de former des complexes avec les groupements -SH peuvent remplacer les ions Ag^+ (BENESCH et BENESCH, 1952). Le chlorure d'éthylmercure (EMC) a été souvent retenu pour le dosage des -SH protéiques des constituants des farines de céréales (TSEN et ANDERSON, 1963 ; GO 1969) ; il convient également pour la cystéine et le glutathion (STRICKS et CHAKRAVARTI, 1961).

Selon SLUYTERMAN (1957), la technique ampérométrique, avec une électrode de platine et du nitrate d'argent comme réactif, ne conviendrait pas pour doser la cystéine.

2 - L'appareil de mesure

Le montage de l'appareil est illustré par la figure 2, A. Une tension de polarisation de 300 mV, fourni par un polariseur METHROM (type : E 456) est appliquée à la cellule de mesure par l'intermédiaire d'une électrode de référence impolarisable, Ag / AgCl. La cathode rotative en platine est entraînée à 750 t.mn⁻¹ par un moteur synchrone. Il est important d'assurer une vitesse de rotation très régulière, car en ampérométrie, l'intensité du courant dépend de la diffusion et par conséquent de la vitesse d'agitation du milieu. Le courant de diffusion est mesuré par un galvanomètre KIPP et ZONEN (type AL 3) dont la sensibilité est de l'ordre de 0,35 à 0,55 . 10⁻⁹ Amp.mm⁻¹.

Le récipient de dosage comporte une partie inférieure d'une capacité de 20 ml et un couvercle muni de 5 passages à rodage normalisé dans lesquels on introduit :

- l'électrode rotative de Pt (dans le passage central),
- l'électrode de référence, Ag / AgCl,
- la pointe de la microburette à moteur renfermant la solution de AgNO_3 ,
- un robinet à 2 voies, relié à une bouteille d'azote R,
- un tube à dégagement destiné à évacuer l'azote.

La microburette que nous avons utilisée permet d'introduire la solution titrante par fractions de 40 μl .

3 - Préparation des extraits

à. tissus de Carotte

Pour toutes les mesures effectuées dans les cultures de Carotte, nous avons utilisé des tissus frais. Les cultures essuyées sont broyées en chambre froide (ou sur une paille réfrigérée), à 4°C environ, dans un mortier, en présence d'acide sulfosalicylique à 4 %. La précipitation se poursuit au froid pendant 12 h; elle est suivie d'une centrifugation de 15 mn à 10000

Le culot, resuspendu dans l'acide sulfosalicylique froid, est centrifugé à nouveau pendant 10 mn. Les eaux de lavage sont jointes à l'extrait et ce dernier est alors complété à 25 ou 50 ml selon le poids de MF initialement utilisé (de 2 à 10 g suivant les cultures traitées). L'extrait peut être conservé au froid au moins pendant 12 h sans présenter de diminution appréciable de la teneur en -SH.

b. cellules de Silène

Pour les dosages effectués dans les cellules de Silène, nous avons préféré utiliser du matériel congelé. Après filtration des cultures sous vide (voir plus haut), on pèse 3 g de cellules dans un tube en verre pyrex et on congèle très rapidement par l'azote liquide. Le matériel est conservé au congélateur ou immédiatement broyé dans un mortier préalablement refroidi et dans lequel on continue de verser de petites quantités d'azote liquide au cours du broyage.

Selon la catégorie de -SH à doser, on verse la poudre fine ainsi obtenue dans une solution d'acide sulfosalicylique à 4 %, ou bien dans une solution tamponnée par du Tris et renfermant ou non de l'urée 8 M. Les groupements -SH protéiques sont dosés directement dans la solution tamponnée tandis que les thiols solubles sont recherchés dans l'extrait sulfosalicylique après précipitation et centrifugation.

4 - Conduite des dosages

Pour les -SH non protéiques, on introduit successivement dans la cellule de titration :

- 2,5 ou 5 ml d'extrait sulfosalicylique,
- 1 goutte de vert de bromocrésol,
- quelques gouttes de NaOH à 16 %, jusqu'au virage de l'indicateur,
- 2 ml d'une solution tamponnée (Tris-HCl 1M, pH 5,6),
- de l'eau distillée, jusqu'à ce que le volume de la solution soit de 10 ml.

Pour le dosage des -SH protéiques, on ajoute simplement à une partie aliquote de l'extrait, la quantité d'eau nécessaire pour obtenir un volume de 10 ml.

Après élimination de l'oxygène dissous par un barbotage d'azote R de 5 mn (en fait jusqu'à ce que l'aiguille du galvanomètre revienne au 0),

on introduit la solution de AgNO_3 (10^{-3} ou 5.10^{-4} M) par fractions de 40 μl . Après chaque addition de liqueur titrante, on fait barboter l'azote pendant quelques secondes, puis on note l'intensité du courant dès que l'aiguille du galvanomètre se stabilise.

La figure 2,B représente une courbe typique obtenue lors du dosage d'une solution de GSH $0,5.10^{-3}$ M, utilisée comme solution de référence pour l'étalonnage de l'appareil, au début et à la fin de chaque série de mesures.

B - REDUCTION DES PONTS DISULFURES

1 - Technique électrolytique

La réduction électrolytique des liaisons S-S, en milieu acide, sur une électrode de mercure, a été mise au point par DOHAN et WOODWARD (1939), pour le glutathion oxydé. Selon ces auteurs, la réduction est complète et rapide, même lorsque le GS-SG est incorporé à des filtrats biologiques renfermant des protéines (plasma ; sérum). Cette technique s'applique bien à la réduction des ponts S-S des composés acidosolubles.

L'appareil que nous utilisons diffère peu de celui qui fut décrit par DOHAN et WOODWARD ; toutefois, nous avons remplacé le pont d'agar-KCl, peu commode, par un tube en U, dont les extrémités sont "obturées" par un morceau de verre fritté. Le tube est relié à une ampoule remplie d'une solution saturée de KCl et munie d'un robinet. Pendant la réduction, le KCl ne s'écoule pas (robinet fermé). Entre deux réductions, on laisse s'écouler un peu de KCl (robinet ouvert) pour empêcher les morceaux de verre fritté d'interrompre le circuit. La cathode est constituée d'une couche de mercure très propre de 10 mm d'épaisseur, déposée au fond d'un bécber de 40 mm de diamètre. La solution à réduire (environ 6 ml), versée au-dessus du mercure, est agitée au moyen d'un barreau magnétique. Le contact avec la cathode est assuré par un fil de platine passant par un ajustage latéral soudé au Bécber. Enfin celui-ci est placé dans un cristalliseur posé sur un agitateur magnétique et contenant de la glace pilée. Le récipient anodique renferme de l'acid sulfosalicylique à 4 % dans laquelle plonge une électrode constituée d'une lame de platine d'environ 1 cm^2 de surface. Le circuit est fermé par le tube en U rempli de KCl et les 2 électrodes sont reliées aux bornes d'un générateur pour électrophorèse fournissant un courant stabilisé (Fig.3,A).

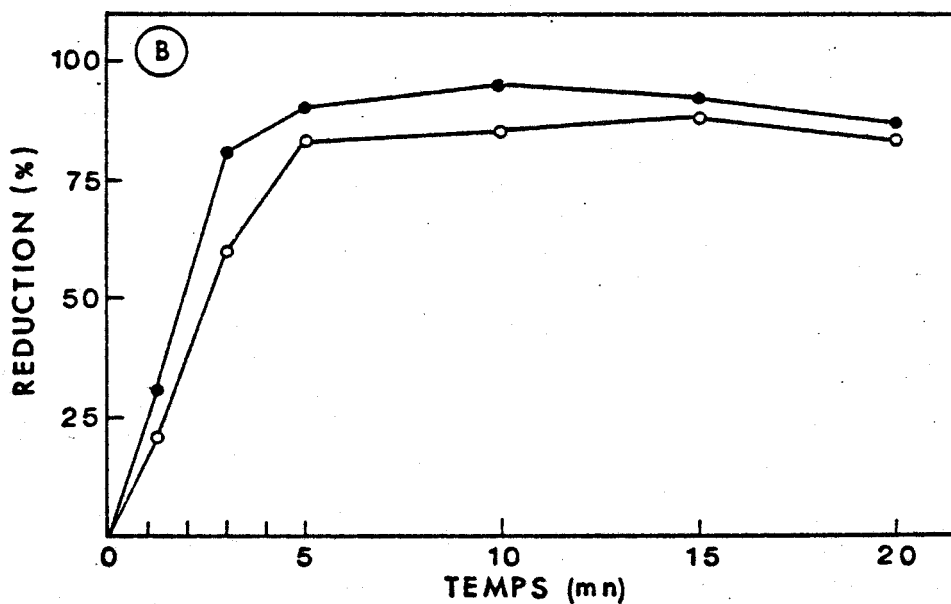
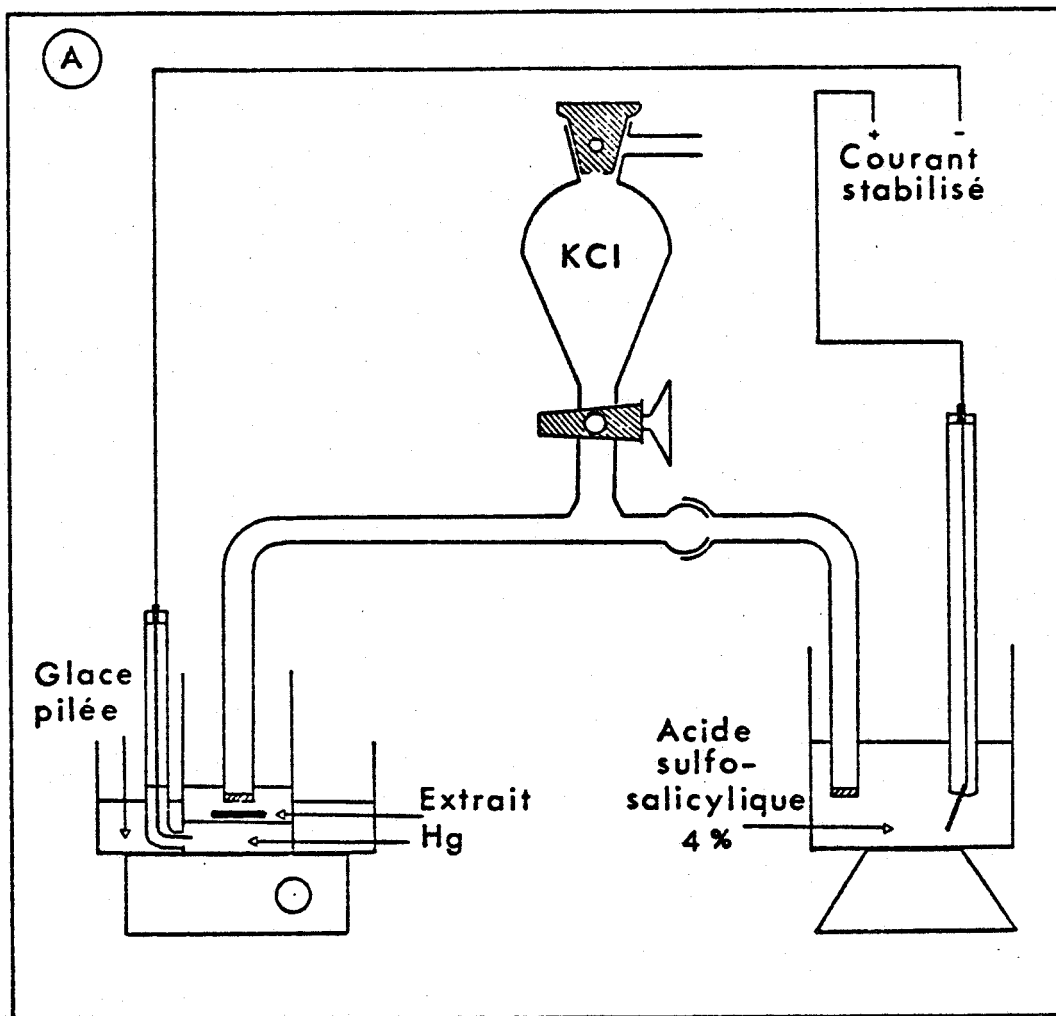


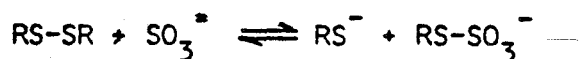
Figure 3, A : Schéma de l'appareil utilisé pour la réduction électrolytique des fonctions -S-S ;

B : Réduction électrolytique de 0,25 μM de GS-SG, lorsque "l'intensité" du courant est de 2,4 mA / cm² (○—○) ou de 4,8 mA par cm² (●—●).

DOHAN et WOODWARD (1939) signalent que le pourcentage de réduction dépend du "current intensity", c'est-à-dire de l'intensité rapportée à la surface de la cathode. Nous avons constaté que pour une électrode de 40 mm de diamètre, le pourcentage de réduction augmente jusqu'à ce que l'intensité courant soit d'environ 60 mA. Le pourcentage de GS-SG réduit, augmente également en fonction du temps (Fig. 3,B) ; il passe par un maximum après 10 mn puis décroît. Contrairement aux résultats rapportés par ces auteurs, nous n'obtenons jamais 100 % de réduction. Dans les meilleures conditions, le pourcentage de GS-SG réduit varie de 90 à 95 %. Le GSH formé s'oxyde rapidement et il convient de le doser dès que la réduction est terminée.

2 - Sulfitolyse

Cette méthode a été fréquemment utilisée pour réduire les ponts disulfure de composés sulfhydrylés acidosolubles et de protéines (BAILEY et COLE, 1959 ; CECIL et WAKE, 1962 ; LEVITT et coll., 1962, PILET et ZRYD, 1965 ; GODON, 1969. L'agent réducteur est le sulfite de sodium. La réaction se déroule selon l'équation :



Elle est réversible (STRICKS et KOLTHOFF, 1951 ; CECIL et WAKE, 1962) ; aussi convient-il de préciser les conditions pour lesquelles le pourcentage des formes réduites est maximal.

A la température du laboratoire (18-20°C) la réduction de 0,25 µM de GS-SG est complète après 5-6 mn, pour une concentration de sulfite de $3 \cdot 10^{-2} M$ (concentration finale de Na_2SO_3 dans l'extrait à réduire). Si on augmente le temps, le pourcentage de GSH obtenu baisse, bien que la réduction s'effectue sous azote, dans la cellule de mesure qui est utilisée pour le dosage ampérométrique des fonctions -SH. BAILEY et COLE (1959) n'observent pas de diminution du pourcentage de GSH ; mais dans des conditions identiques constatent une réoxydation très rapide de la cystéine.

Pour une concentration de sulfite plus faible ($1,5 \cdot 10^{-2} M$) ou plus élevée ($5 \cdot 10^{-2} M$) la réduction du GS-SG est moins rapide et/ou incomplète (Tableau III). Il faut ajouter qu'une teneur élevée en sulfite ($5 \cdot 10^{-2} M$ ou plus) modifie la courbe de titration du GSH total : après le point d'inflexion la pente est plus faible, ce qui entraîne une diminution de la précision.

Na_2SO_3 Concentration finale de l'extrait	TEMPS. (mn)	DEGRE DE REDUCTION (%)
1,5, 10^{-2}M	3	78,5
3. -	3	95,6
3. -	5	100,0
3; -	6	100,0
3. -	10	77,8
5. -	5	90,4

TABIEAU III : Conditions de réduction du GS-SG (0,25 μM) par sulfitolyse. Effets de la concentration du Na_2SO_3 et du temps de contact du sulfite sur le pourcentage de réduction.

Le pourcentage de réduction dépend aussi de la température. CARTER (1959) a montré qu'elle était immédiate et complète à 37°C. A 27°C, la réduction des S-S de certaines protéines est incomplète même quand la durée est optimale (TSEN et ANDERSON, 1963).

Signalons enfin que le pH intervient peu entre 5,6 et 9,6, mais qu'au-dessus il provoque une diminution du pourcentage de réduction (TSEN et ANDERSON, 1963).



R E S U L T A T S

P R E M I E R E P A R T I E

PARTICIPATION DES COMPOSES SULFHYDRILES AU CONTROLE DE
LA CROISSANCE DE TISSUS ISOLES DE CAROTTE.

CHAPITRE 1 : EFFETS DE QUELQUES COMPOSES SULFHYDRILES ET DE QUELQUES INHIBI- TEURS DES -SH SUR LA CROISSANCE DE CULTURES IN VITRO.

A - COMPOSES SULFHYDRILES ET CROISSANCE

1 - Introduction

D'une manière générale, pour les cultures de tissus végétaux, comme pour les plantes entières, les sulfates constituent la source normale de soufre. Les tissus isolés utilisent cependant d'autres sources de soufre, telles que des sulfites, des sulfures et des composés organiques. Leur aptitude à métaboliser les acides aminés soufrés et le glutathion varie selon leur origine. Pour NICKELL et BURKHOLDER (1950), les tissus virosés de Rumex se développent aussi bien en présence de cystéine que de sulfates, mais souffrent de carence ou se nécrosent si on remplace les sulfates par de la cystine, de la méthionine ou du glutathion. HELLER (1955a) a établi que les tissus isolés de Carotte assimilent non seulement les sulfates, les sulfites et les sulfures, mais aussi la cystéine, la méthionine et le glutathion ; par contre la taurine est fortement toxique. Il est clair que ces différences sont liées à la nature des tissus utilisés, à la taille des explantats ou encore à leur état physiologique. NITSCH et NITSCH (1956) ont montré que les résultats varient également selon la manière dont on incorpore les composés soufrés au milieu de culture. Ainsi, la cystéine autoclavée en même temps que le milieu a une action comparable à celle des sulfates sur la croissance des tissus d'Helianthus tuberosus ; par contre, elle présente une certaine toxicité lorsqu'elle est stérilisée par filtration.

Considérés non plus comme substances trophiques, mais comme facteurs de croissance, les composés soufrés réduits ou oxydés ont des effets différents selon la nature des tissus. Compte tenu du rôle qu'on leur attribuait dans la division cellulaire (HAMMET, 1929 ; RAPKINE, 1931), les premiers auteurs qui ont réalisé la culture in vitro des Végétaux ont ajouté de la cystéine dans les milieux nutritifs. Plus tard, NOBECOURT, puis GAUTHERET constatent que cet acide aminé n'est pas indispensable au développement des tissus de Carotte. (GAUTHERET, 1959 p. 623). Ceci est vrai pour les tissus de beaucoup d'autres espèces, bien que certaines cultures semblent proliférer davantage si on ajoute de la

cystéine ou du glutathion dans le milieu (WIGGANS, 1954 ; REINERT et WHITE, 1956). Pour BOURIQUET (1960), les thiols agissent différemment selon que la croissance des tissus est stimulée ou non par le AIA ; ils se comportent comme des antagonistes de l'auxine. De son côté, PILET (1958 et 1963b) démontre que le glutathion inhibe l'activité des auxines oxydases dans des fragments de racine de Carotte ; ce qui favorise l'accumulation d'auxine endogène dans les tissus néoformés, mais ne semble pas modifier l'amplitude de la croissance. Le glutathion ne se comporte donc pas toujours comme un antagoniste de l'au

2 - Résultats

Pour étudier les effets de quelques composés soufrés sur la croissance de tissus cultivés in vitro, nous avons choisi une souche chlorophyllienne de Carotte très sensible à la carence en soufre (HELLER, 1949). Des explants calibrés (environ 150 mg de M F) sont repiqués sur un milieu de HELLER modifié dans lequel le $Mg SO_4$ est remplacé par du $MgCl_2$ plus la substance à étudier. Le pH des milieux est ajusté à $6,0 \pm 0,1$ et les cultures sont placées à $21 \pm 1^\circ C$, en lumière continue.

Des essais préliminaires ont permis d'établir que la croissance des tissus de Carotte est un peu plus faible lorsque la cystéine et le glutathion sont autoclavés en même temps que les milieux. Bien que les différences soient beaucoup moins importantes que celles enregistrées par NITSCH et NITSCH (1956) à propos de la cystéine, nous avons préféré stériliser les composés soufrés par filtration sur une membrane Millipore.

Nous avons ensuite déterminé la croissance et la teneur en chlorophylle des colonies tissulaires cultivées pendant 50 jours sur des milieux contenant des composés soufrés présentant soit un radical -SH, soit une liaison S-S, et sur un milieu renfermant du $MgSO_4$ (milieu de base utilisé comme témoin). Dans les différents milieux, la concentration en soufre est celle du milieu témoin, soit 1 mM. Nous avons également repiqué des tissus sur un milieu carencé en soufre. Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le Tableau IV.

La cystéine et la cystine sont assimilés, mais la croissance est réduite de 60 à 70 % dès la fin du 1er passage. Notons que la teneur en chlorophylle est plus élevée que dans les témoins.

SOURCES DE SOUFRE	1er PASSAGE		2e PASSAGE		3e PASSAGE	
	M F mg	CH ₊ μg·g ⁻¹ M F	M F mg	CH ₊ μg·g ⁻¹ M F	M F mg	CH ₊ μg·g ⁻¹ M F
SO ₄ ⁻⁻⁻	1892	41,1	1582	44,1	2055	49,1
Cy-SH	566	52,6	717	62,0	692	64,3
Cy-S-S-Cy	798	47,5	912	55,7	750	54,7
G-SH	1293	43,2	1165	44,6	1550	58,0
G-S-S-G	776	41,0	1237	46,6	1378	55,5
Méthionine	996	38,4	1026	28,8	1426	35,5
Taurine	181	-	0	-	-	-
Milieux carencés	922	23,0	203	33,6	0	-

TABLEAU IV : Effets de quelques composés soufrés sur la croissance (M F) des colonies tissulaires de Carotte et sur leur teneur en chlorophylle totale (CH₊).

Chaque passage dure 50[±] 1 jour. Tous les milieux sauf les milieux carencés contiennent 1 mM de soufre.

En présence de G-SH et de GS-SG, la croissance est réduite en moyenne de 30 à 35 % et la teneur en chlorophylle est comparable à celle des témoins.

La méthionine est une source de soufre acceptable pour cette souche de Carotte ; elle détermine cependant une forte chlorose.

La taurine, fortement toxique, ne peut être employée.

A la concentration de 1 mM, la cystéine est incontestablement une moins bonne source de soufre que le glutathion. Nous avons recherché s'il en est de même pour des doses plus faibles ou plus élevées. Les résultats obtenus (Tableau V et VI) autorisent les remarques suivantes :

CONCENTRATION EN CYSTEINE (mM)	1er PASSAGE			2e PASSAGE		
	CROISSANCE (M F)		CHLOROPHYLLE	CROISSANCE (M F)		CHLOROPHYLLE
	mg	%		mg	%	
0	915	63,5	+ n	138	7,5	+ n n
0,25	1318	91,5	+ + n	412	22,3	+ n n
0,50	1144	79,4	+ +	709	38,4	+ + n
1,00	821	57,0	+ + +	980	53,1	+ + +
2,00	260	18,0	+ + +	81	4,4	+ n
4,00	150	10,4	+ +	0	0	-
milieu T (S - SO ₄ ⁻⁻⁻)	1441	100,0	+ + +	1843	100,0	+ + +

TABLEAU V : Effets de la concentration en cystéine sur la croissance et la teneur en chlorophylle des tissus de Carotte.

La croissance est exprimée en mg de MF et en % par rapport aux témoins (T) cultivés en présence de 1 mg de sulfate de magnésium. Les signes + permettent d'apprécier la teneur en chlorophylle des tissus et les lettres n témoignent de l'importance des nécroses. Chaque passage dure 45 jours.

CONCENTRATION EN GLUTATHION (mM)	1er PASSAGE			2e PASSAGE		
	CROISSANCE (M F)		CHLOROPHYLLE	CROISSANCE (M F)		CHLOROPHYLLE
	mg	%		mg	%	
0	721	53,4	+ n	302	14,5	+ n n
0,25	1082	80,0	+ +	1275	61,2	+ + n n
0,50	1182	87,4	+ + +	1800	86,3	+ + +
1,00	1047	72,5	+ + +	1840	88,2	+ + +
2,00	658	48,7	+ + + +	1043	50,0	+ + +
4,00	425	31,5	+ +	183	8,7	+ +
milieu T (S - SO ₄ ⁻⁻⁻)	1351	100,0	+ + +	2085	100,0	+ + +

TABLEAU VI : Effets de la concentration en glutathion sur la croissance et la teneur en chlorophylle des tissus de Carotte.

(Légende identique à celle du TABLEAU V).



- quelle que soit la concentration utilisée, la prolifération est plus faible en présence de composés sulfhydrilés qu'en présence de sulfate. A concentration égale, la réduction de la prolifération est plus importante, s'il s'agit de la cystéine.

- des doses de cystéine inférieures à 1 mM réduisent moins la croissance des cultures lors du premier passage, mais provoquent dès le second une carence en soufre qui se traduit par une forte diminution du poids de M F et de la teneur en chlorophylle et par l'apparition de nécroses brunes à la partie supérieure des colonies.

- des doses de cystéine supérieures à 1 mM sont encore plus toxiques.

3 - Conclusion et discussion

Les tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte assimilent le soufre organique, mais sous cette forme cet élément n'assure pas une croissance aussi importante que le sulfate. Parmi les composés essayés, seule le glutathion paraît pouvoir remplacer durablement les sulfates. La méthionine peut être utilisée : elle n'est pas toxique, mais elle réduit la croissance et la teneur en chlorophylle. La taurine est très toxique. Sur ces différents points, nos résultats sont en accord avec ceux de HELLER (1955a).

Il faut bien se garder de généraliser, car d'autres tissus, tels ceux de Rumex (NICKELL et BURKHOLDER, 1950) assimilent la cystéine et non le glutathion. Les tissus de Tabac absorbent de la cystéine ³⁵S sans modification de la croissance (MAROTI, 1967) et ceux de Parthenocissus tricuspidata incorporent cet acide aminé marqué dans leurs noyaux (surtout autour des nucléoles) et dans les cellules qui se transforment en trachéides (RIER et BESLOW, 1967).

Nos essais confirment que le soufre est un élément indispensable au développement des tissus végétaux cultivés in vitro. En revanche, ils ne démontrent aucun effet spécifique des composés sulfhydrilés sur la croissance. La cystine et le GS-SG se comportent de la même façon que la cystéine et le G-SH. Compte tenu de la nature complexe du milieu (nombreux microéléments) et du pH voisin de la neutralité, il est probable que les composés sulfhydrilés sont rapidement oxydés. Pour comparer les effets des thiols et des disulfures correspondants, il faudrait pouvoir stabiliser les

radicaux -SH. La technique des -SH-SEPHADEX, mise au point par JELLUM (1964) et utilisée par NISSEN et ELDJARN (1969) pour étudier la division cellulaire dans des cultures de Euglena gracilis ne semble pas pouvoir être adaptée pour des tissus cultivés en milieu solide. La durée de la culture et le maintien de l'asepsie poseraient également de nombreux problèmes pour des cultures en milieu liquide.

B. - INHIBITEURS

1 - Introduction

De nombreuses substances bloquent les fonctions -SH. Nous en avons choisi 4, qui sont les plus fréquemment utilisées et qui ont un mode d'action différent. Le p-chloromercuribenzoate de sodium (P-C.M.B.) se combine aux fonctions -SH pour former des mercaptides. L'iodoacétate et l'iodoacétamide conduisent à une alkylation des composés sulfhydrilés. La N-éthylmaléimide (N-E.M.), comme d'autres maléimides et certaines lactone donnent des réactions d'acylation.

2 - Résultats

Nous avons comparé les effets de ces quatre substances inhibitrice sur la croissance des colonies chlorophylliennes de Carotte. La prolifération des tissus est déterminée après 45 jours et exprimée en valeur relative par rapport à celle de colonies tissulaires entretenues sur le milieu témoin (Tableau VII).

Entre 0 et 10^{-6} M, ces inhibiteurs ont peu d'influence sur la prolifération; en présence de très faibles doses (10^{-9} ou 10^{-8} M), on observe même assez souvent une certaine stimulation. A la concentration de 10^{-5} M, la croissance est réduite d'environ 30% ; à 10^{-4} M cette réduction atteint 70 à 80 %. Les quatre inhibiteurs utilisés ont un effet comparable sur la prolifération des tissus de Carotte. Le P-C.M.B. qui peut être autoclavé en même temps que le milieu nutritif sera utilisé de préférence aux autres substances.

Des essais complémentaires ont été entrepris avec trois autres tissus végétaux : des colonies caroténogènes de Carotte, des tissus de Ronce et

CONCENTRATIONS MOLAIRES	P-C.M.B.	N-E.M.	IDOACETATE	IDOACETAMIDE
0	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
10 ⁻⁸	97,8 -	113,7 -	102,5 -	95,8 -
10 ⁻⁷	93,6 -	93,4 -	94,7 -	106,3 -
10 ⁻⁶	87,8 -	96,8 -	86,4 -	96,9 -
10 ⁻⁵	78,3 -	72,8 -	68,0 -	67,4 -
5.10 ⁻⁵	50,2 -	52,8 -	43,9 -	26,1 -
10 ⁻⁴	19,8 -	26,7 -	24,2 -	20,4 -

TABLEAU VII : Croissance des colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte en présence d'inhibiteurs des fonctions -SH.

La croissance relative est déterminée après 45 jours de culture par rapport à l'augmentation du poids de M F des colonies cultivées sur un milieu témoin dépourvu d'inhibiteurs.

p-C.M.B. : p-chloromercuribenzoate de sodium

N-E.M. : N-éthylmaléimide

de Crown-gall de Scorsonère (autotrophes à l'auxine) et avec des suspensions cellulaires de Silène. Des résultats comparables ont été observés : les concentrations efficaces s'échelonnent entre 10⁻⁵ et 10⁻⁴M.

Les inhibiteurs des fonctions -SH inactivent de nombreuses enzymes sulfhydrilées, ce qui se traduit notamment par un blocage de la respiration et par une diminution de la synthèse de la chlorophylle. Généralement, la réduction de la prolifération est plus importante que celle de la respiration (Tableau VIII). Certains inhibiteurs tels que le p-C.M.B., le N-E.M. et l'iodoacétate réduisent également le transport polarisé de l'auxine, à des concentrations qui sont sans effets sur la respiration (NIEDERGAN-KAMIEN et LEOPOLD, 1957).

CONCENTRATIONS DU P-C.M.B.	CROISSANCE (%)	RESPIRATION (%)	-SH ($\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}\text{M F}$)	$\frac{-\text{SH}}{-\text{SH} + \text{S-S}} \cdot 100$
0	100,0	100,0	0,33	75,3
10^{-5}M	78,3	107,0	0,57	71,7
$5 \cdot 10^{-5}\text{M}$	50,2	87,5	1,00	61,4
10^{-4}M	19,8	76,5	1,08	55,7

TABEAU VIII : Effets du P-chloromercuribenzoate de sodium (P-C.M.B.) sur la croissance, la respiration et l'état des composés sulfhydrylés des colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte.

La croissance (M F) et l'intensité de la respiration ($\mu\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{M F} \cdot \text{h}^{-1}$) sont exprimées en valeurs relatives par rapport à celles des colonies entretenues sur un milieu témoin ne contenant pas de P-C.M.B.).

La teneur en -SH solubles augmente dans les tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte traités par des doses de P-C.M.B. inhibant la croissance (Tableau VIII). Ce fait nous ayant surpris, nous avons répété plusieurs fois l'expérience : les résultats sont confirmés. La N-E.M. a des effets analogues sur les tissus de Carotte. Cette augmentation ne semble pas due à une réduction des disulfures car le rapport -SH/-SH + S-S, bien qu'assez variable, diminue. On peut supposer que des composés soufrés de faible poids moléculaire proviennent de la dégradation de protéines liée à la nécrose plus ou moins importante des tissus de Carotte traités. La diminution de la teneur en chlorophylle et du rapport azoté protéique/azote total confirme cette hypothèse.

Des maléimides ont été employées aux Etats Unis à partir de 1948 pour provoquer la défoliation des végétaux. En utilisant un "test de défoliation" et un "test d'élongation", VAN OVERBEEK et coll. (1955) ont montré que l'activité de ces substances varie en fonction de la nature de la chaîne latérale.

La N-phénylmaléimide s'est révélée particulièrement active, la N-isopropylmaléimide l'une des moins efficaces.

	CONCENTRATION DES MALEIMIDES	N - éthyl M	N - méthyl M	N - isopropyl M	N - phényl M
CAROTTE	$1. 10^{-5} M$	65,1 %	62,0 %	75,7 %	100,4 %
	$5. 10^{-5} M$	41,5 -	52,8 -	18,2 -	21,8 -
	$1. 10^{-4} M$	16,9 -	26,7 -	1,8 -	5,9 -
SILENE	$1. 10^{-5} M$	82,5 -	85,4 -	94,9 -	113,6 -
	$2.5.10^{-5} M$	77,7 -	83,4 -	75,7 -	89,7 -
	$5. 10^{-5} M$	64,9 -	67,8 -	0	1,3 -
	$1. 10^{-4} M$	0	0	0	0

TABLEAU IX : Croissance des colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte et de suspensions cellulaires de Silène en présence de maléimides substituées.

La croissance est exprimée en % par rapport à l'augmentation du poids de M F de témoins cultivés sur un milieu dépourvu d'inhibiteurs. La durée de la culture est de 45 jours pour les tissus de Carotte et de 12 jours pour les cellules de Silène.

Nous avons comparé les effets de la N-E.M déjà utilisée dans une précédente expérience et de la N-méthylmaléimide (N-M.M.) à ceux des deux composés utilisés par VAN OVERBEEK. Les résultats (Tableau IX) montrent que les quatre substances inhibent la prolifération des cellules végétales, mais de façon plus ou moins importante. La N-isopropyl maléimide et la N-phényl maléimide qui se comportent très différemment sur les tests de "défoliation" et "d'élongation" sont celles qui réduisent le plus la croissance des colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte et de la suspension cellulaire de Silène. La N-E.M. et la N-M.M., qui ont un poids moléculaire plus faible et une chaîne latérale linéaire inhibent moins la prolifération.

3 - Conclusion

Les composés sulfhydrilés, les disulfures et les inhibiteurs des fonctions -SH ajoutés au milieu de culture n'agissent pas d'une manière spécifique sur la croissance des tissus isolés. Il nous a semblé inutile de multiplier ce type d'expériences dont la portée est d'ailleurs limitée. Nous avons préféré étudier les variations des composés sulfhydrilés endogènes en relation avec le développement de tissus isolés et de suspensions cellulaires.

CHAPITRE 2 : DISTRIBUTION DES COMPOSES SULFHYDRIQUES SOLUBLES DANS DES FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE.

A - ANALYSES EFFECTUEES AVANT LA MISE EN CULTURE

Il était nécessaire de préciser tout d'abord si la distribution des radicaux -SH était homogène ou non, dans les racines entières. Pour cela nous avons prélevé à l'emporte pièce des fragments de 30 mm de longueur et de 8 mm de diamètre au niveau du collet de la pointe et dans la partie moyenne de la racine (Fig. 4, A). Le collet, qui est tantôt enfoncé dans la terre, tantôt hors du sol, est plus ou moins riche en pigments (chlorophylle et/ou anthocyanes). Cette hétérogénéité se traduit par une grande variabilité de la teneur en -SH. La partie moyenne et la pointe présentent des taux de -SH comparables. La région moyenne est la plus intéressante, car elle fournit un plus grand nombre d'explantats que la pointe.

Nous avons ensuite recherché si la teneur en -SH était identique dans les différents tissus de la partie moyenne de la racine (Fig. 4, B). Le xylème et les tissus externes (écorce + phloème) présentent des taux de -SH très voisins, mais inférieurs à ceux de la région cambiale (Tableau X). Signalons que dans ces derniers, la teneur en azote (soluble et total) est plus élevée (MENORET, 1957) et la respiration plus active (MOROHASHI et coll., 1966).

Pour la suite de ce travail, les explantats destinés à être cultivés in vitro seront donc prélevés exclusivement au niveau du cambium, dans la partie moyenne de la racine.

ESSAIS	TISSUS PRELEVES DANS LA PARTIE MOYENNE DE LA RACINE			EXPLANTATS PRELEVES AU NIVEAU DU CAMBIUM		
	Phloème	Cambium	Xylème	Z F	Z M	Z R
1	120	240	150	190	220	220
2	330	510	340	-	-	-
3	250	300	160	300	260	300
4	-	-	-	170	-	190

TABLEAU X : Répartition des -SH solubles (nM.g^{-1} de M F) :

- dans différents tissus provenant de la partie moyenne de la racine
- dans les zones foliaires (Z F), médiane (Z M) et racinaire (Z R) d'explantats prélevés au niveau du cambium, dans la partie moyenne de la racine.

Compte tenu de ce que nous savons sur la distribution polarisée d'un certain nombre de substances dans des fragments de racine de Carotte, notamment de l'azote soluble (PILET et FRAGATA, 1963), des auxines (KULESCHA, 1951 ; PILET, 1964 et 1967), des auxine-oxydases (PILET, 1956, 1964 et 1967), il était intéressant de rechercher si la répartition des -SH était uniforme. Nous avons découpé des fragments de racine en 3 zones : foliaire (Z F), racinaire (Z R) et médiane (Z M) (Fig. 4, C). Les valeurs sont présentées dans le Tableau X. On voit que la teneur en -SH est la même, aux variations expérimentales près, pour les 3 zones analysées.

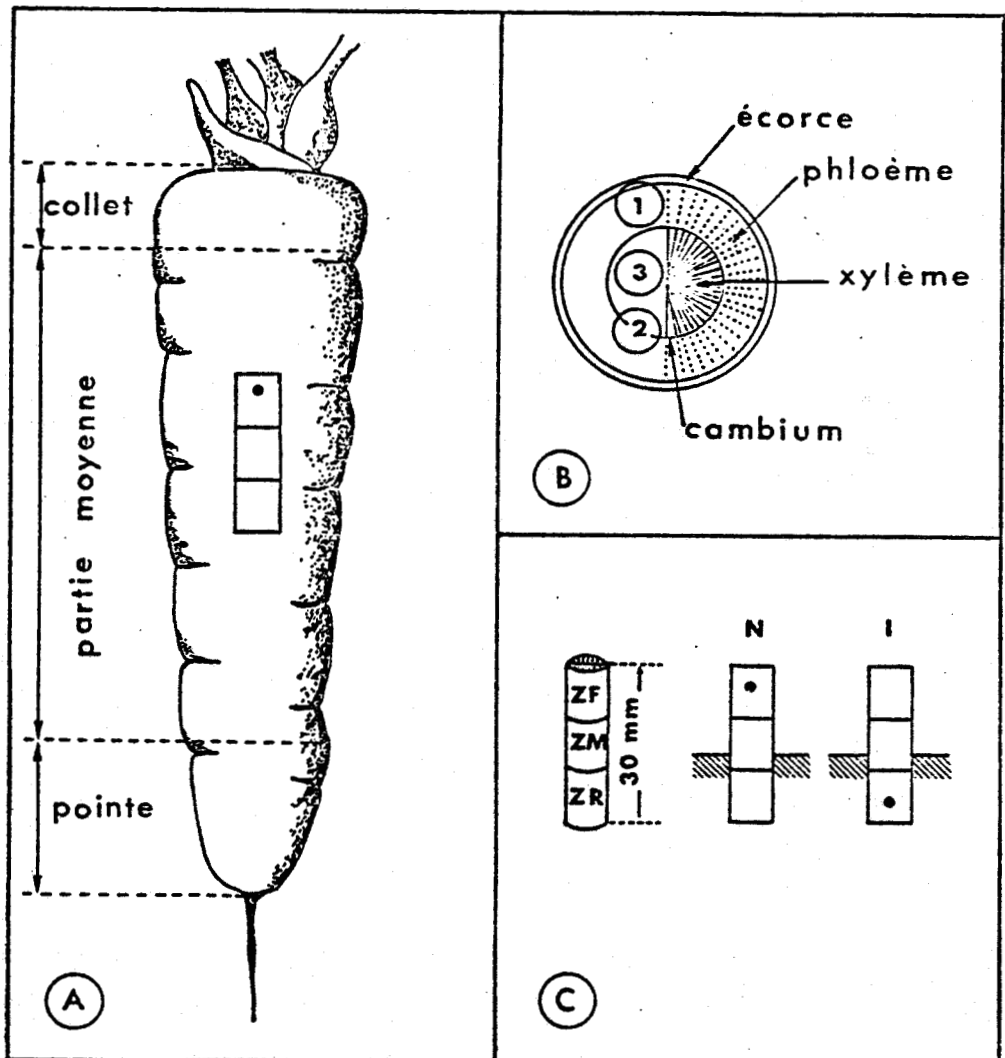


Figure 4, A et B : Lieu de prélèvement des explantats dans la racine de Carotte : phloème (1), zone cambiale (2), xylème (3).

C : Position des explantats par rapport au milieu de culture et zones analysées.

Z F : zone foliaire ; Z M : zone médiane ; Z R : zone racinaire ; ● : Z F ; ▨ : surface du milieu.

Il faut cependant remarquer que la teneur en -SH varie beaucoup d'un lot de racines à l'autre : de 100 à 490 nM par g de M.F, pour 10 lots d'explantats prélevés en vue de leur mise en culture, entre Avril 1966 et mars 1969.

DATE DES ESSAIS	12.04 1966	6.12 1967	10.12 1967	19.09 1968	08.10 1968	15.11 1968	7.02 1969	13.02 1969	28.02 1969	30.03 1969
TENEUR EN -SH	170	290	300	110	100	310	240	260	350	480

TABLEAU XI : Variations de la teneur initiale en -SH solubles ($\text{nM}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) d'explantats prélevés au niveau du cambium, dans la partie moyenne de racines provenant de 10 lots différents de Carottes.

Cette forte variabilité a au moins 3 causes :

- l'origine (variété, clone, provenance) des racines achetées dans le commerce local, au fur et à mesure de nos besoins ;
- le mode de conservation qui modifie de nombreux paramètres (en particulier la teneur en eau, en azote et en sucre) conditionne le développement des explantats. Des faits analogues ont été relevés pour d'autres organes de réserve par KULESCHA (1951) et par LEFEBVRE (1976).
- le stade de développement. BRUNEL-CAPELLE (1955) et GOAS (1959) ont montré que la teneur en composés sulfhydrilés varie au cours du cycle de développement de nombreux végétaux. Etant donné la provenance des racines utilisées, nous n'avons pas pu vérifier ce point.

B - FRAGMENTS DE RACINE CULTIVES IN VITRO PENDANT 30 JOURS

Des fragments de racine (L : 30 mm ; diamètre : 8 mm) prélevés à l'emporte-pièce au niveau du cambium sont cultivés pendant 30 jours sur le milieu standard (HELLER, 1953), en position normale (N), ou en position inverse (I) (Fig. 4 A et C).

1 - Teneur en -SH solubles

Lorsque les fragments sont cultivés en position inverse, un cal se développe à la face racinaire ; il est déjà bien visible le 15e jour. Après 30 jours, la teneur en -SH est plus élevée dans la néoformation que dans les tissus préexistants. Dans ces derniers, elle diminue progressivement de la zone racinaire à la zone foliaire. Il en est de même du rapport -SH/-SH + S-S (Fig. 5, A). Quel que soit le critère de référence retenu, poids de matière fraîche (M F), de matière sèche (M S), de protéines (N P) ou teneur en disulfures, un gradient sulphydrilé conforme à la polarité morphologique des tissus de racine de Carotte (GAUTHERET, 1940 et 1959 ; DE ROOP, 1950) est mis en évidence.

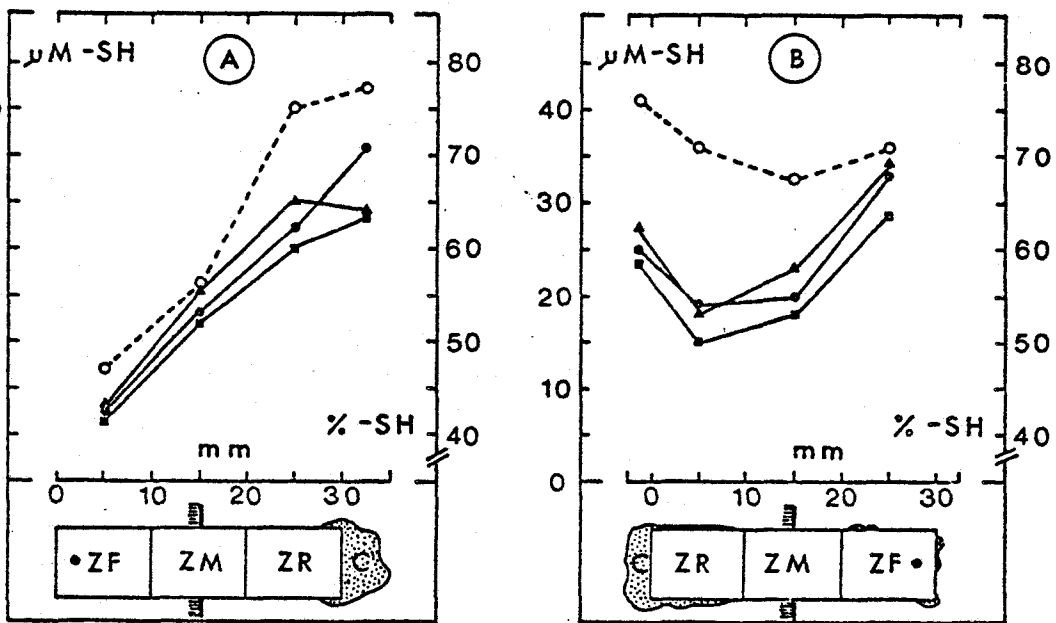


Fig. 5 : Répartition des composés sulphydrilés solubles dans des fragments de racine de Carotte cultivés en position inverse (A) et normale (B).

Les valeurs exprimées en μM de soufre, sont rapportées à :

- 10^2 g de M F
- 10 g de M S
- ▲ 10^{-1} g d'azote protéique

La courbe en pointillé représente les variations du rapport $-\text{SH} / -\text{SH} + \text{S-S}$

Quand les fragments sont placés en position normale, le cal est moins bien délimité et les tissus néoformés recouvrent la plus grande partie de la zone racinaire immergée dans le milieu. Des néoformations

de petite taille apparaissent parfois sur la partie foliaire des fragments. Après 30 jours de culture, la teneur en -SH est maximale dans la zone foliaire du fragment, faible dans les zones médiane et racinaire, moyenne dans les tissus néoformés (Fig. 5, B). Le pourcentage de formes réduites est à peine plus élevé dans les néoformations que dans les tissus préexistants. Un gradient sulfhydrilé inverse de la polarité morphologique apparaît dans les tissus préexistants, tandis que la teneur en -SH dans le cal est comprise entre les valeurs relevées dans les zones foliaire et racinaire du fragment.

2 - Variations relatives des -SH

Si on compare les valeurs présentées dans la Fig. 5 et celles qui furent trouvées dans les fragments le jour de la mise en culture, on peut observer (Tableau XII) :

- une diminution du taux des -SH dans la zone foliaire des fragments placés en position inverse et dans la zone racinaire des fragments placés en position normale ;
- une augmentation du taux des -SH dans la néoformation et la zone racinaire des fragments cultivés en position inverse et dans les zones néoformée et foliaire des autres fragments ;
- une certaine stabilité dans les zones médianes.

POSITION DES FRAGMENTS	LOCALISATION DES TISSUS ANALYSES				
	Z F	Z M	Z R	Cal	Explantat entier
I N V E R S E	- 56	+ 12	+ 69	+ 125	+ 150
N O R M A L E	+ 65	0	- 05	+ 25	+ 85

TABLEAU XII : Variations relatives du taux des -SH dans des fragments de racine de Carotte cultivés in vitro pendant 30 jours en position inverse et normale.

+ : augmentation par rapport au lot initial

- : diminution " " " " "

$$\text{valeur relative} : \frac{V_t - V_o}{V_o} \cdot 10^2$$

V_t : valeur en μM -SH/g de MF après 30 jours

V_o : idem au moment de la mise en culture.

3. Conclusions

- Si on considère les cultures entières, quelle que soit l'orientation des fragments de racine, la teneur moyenne en -SH rapportée à l'unité de M F (ou de M S) est plus élevée au 30ème jour, qu'au moment de la mise en culture ;
- La distribution des -SH dépend de l'orientation des tissus. Les résultats obtenus avec des fragments cultivés en position inverse confirment l'existence d'une relation entre la croissance et le taux de -SH. Cette corrélation, établie et vérifiée à différentes reprises, aussi bien chez les Animaux que chez les Végétaux ne se retrouve pas lorsque les fragments de racine sont cultivés en position normale ;
- L'analyse des variations du taux de -SH dans les explantats montre, quelle que soit leur orientation, qu'il diminue dans les régions en contact avec le milieu et augmente dans les zones qui en sont éloignées. Il semble donc que le contact du milieu aqueux, qui réduit la morphogenèse et le développement de certains tissus (GAUTHERET, 1950 et 1959) provoque également une diminution du taux des -SH solubles dans les tissus de Carotte ;
- Avant de préciser les relations entre le taux des -SH et la croissance des tissus de Carotte cultivés in vitro, il convient de rechercher la cause des variations du gradient sulfhydrilé, et particulièrement de préciser les effets du contact du milieu. Il est en effet indispensable de savoir si le gradient sulfhydrilé est lié au développement du cal ou s'il résulte simplement du contact avec le milieu de culture.

CHAPITRE 3 : EFFETS DU CONTACT DU MILIEU AQUEUX SUR LA PROLIFERATION DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR LA REPARTITION DES -SH SOLUBLES.

A - INTRODUCTION

Rappelons que le milieu est constitué d'une solution nutritive solidifiée par de la gélose et ne renferme pas de substances de croissance ; il s'agit donc d'un milieu "aqueux" solide.

GAUTHERET (1959, p. 293) a montré que le contact d'un milieu aqueux s'oppose à la formation de pseudothalles et exerce une action variable sur les phénomènes de callogenèse. Selon cet auteur, la prolifération des tissus cambiaux d'arbres est presque complètement inhibée, tandis que les tissus d'organes charnus subissent une inhibition très modérée. En présence d'auxine le développement de la partie immergée est un peu plus important, s'il s'agit d'un tissu cambial d'arbre ; au contraire s'il s'agit de fragments d'organes charnus, le développement est souvent plus important au contact de la solution nutritive. D'après PILET (1964), la croissance des tissus néoformés de Carotte est très faible quand la face racinaire des fragments de racine est enfoncée dans le milieu; dans ce cas, la polarité est également moins stricte. Des recherches effectuées sur d'autres plantes, et en particulier sur la Chicorée, la Scorsonère et le Tabac montrent que le contact du milieu aqueux modifie également les phénomènes d'organogenèse (GAUTHERET, 1959, p. 297).

Pour tenter de mettre en évidence le rôle du contact du milieu sur la répartition des -SH solubles et sur le développement des fragments de racine de Carotte, nous avons fait varier :

- la position des explantats par rapport à la surface du milieu ;
- l'orientation des tissus par rapport à celle qu'ils présentent dans la plante entière ;
- la forme des explantats.

B - POSITION ET ORIENTATION DES FRAGMENTS

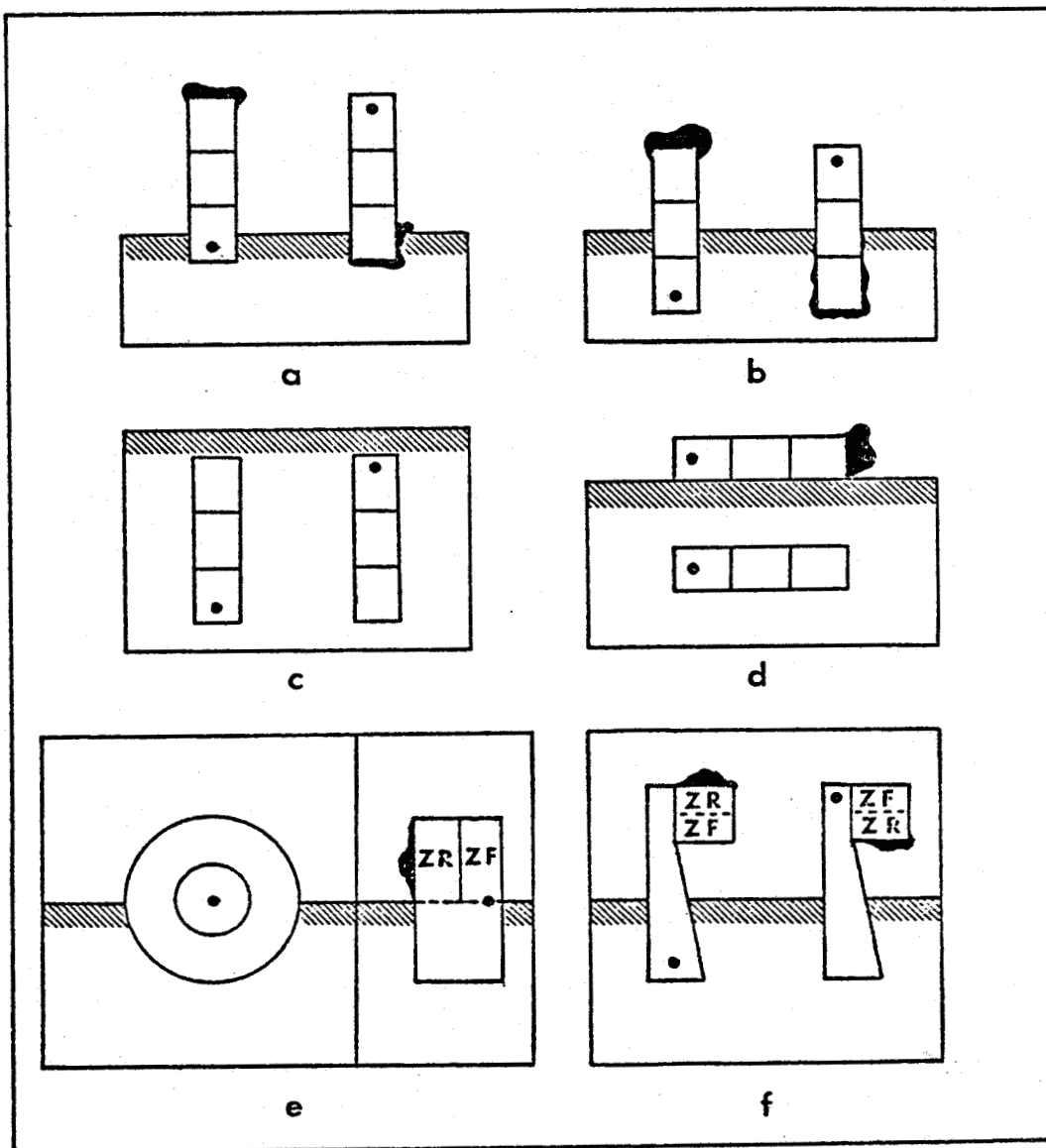



Figure 6 : Différents modes d'ensemencement utilisés pour étudier l'influence du milieu aqueux sur le développement des fragments de racine de Carotte :

- a : fragments placés verticalement, hors du milieu, en position N ou I
 - b : " " " " , à demi-immergés " " "
 - c : " " " " , totalement immergés " " "
 - d : " " " " horizontalement à la surface ou à l'intérieur du milieu
 - e : tranche de racine disposée verticalement
 - f : fragments placés en sens N ou I, de telle sorte que le cal ne soit pas en contact avec le milieu
- (● : zone foliaire des explantats ; cal : )

1 - Conditions expérimentales

La position et l'orientation des explantats sont schématisées sur la figure 6.

- "Hors du milieu" : les fragments de racine (L : 30 mm ; diamètre : 8 mm) sont déposés verticalement, en position normale ou inverse, à la surface du milieu (Fig. 6, a) ;
- "Demi-immersée" : les explantats sont verticaux et enfoncés de 15 mm dans la solution nutritive (Fig. 6, b) ;
- "immersée" : les explantats sont disposés verticalement, à environ 20 mm sous la surface du milieu (Fig. 6, c) ;
- "Horizontale" : les fragments sont placés horizontalement, soit à la surface du milieu coulé dans des fioles de Fourneau, soit 10 mm en-dessous de la surface (Fig. 6, d).

2 - Résultats

a. Cas des fragments verticaux

Le développement du cal est comparable lorsque les fragments de racine sont placés à la surface du milieu ou à demi-immersés ; il est nul quand ils sont totalement immergés. Pour les deux premières positions, le développement des tissus néoformés, exprimé en valeur absolue (M F ou M S) ou en valeur relative (rapportée à la biomasse totale d'une culture) est un peu plus important lorsque les fragments sont repiqués en position inverse, c'est-à-dire lorsque la néoformation se développe en dehors du milieu de culture (Tableau XIII).

Pour caractériser l'état des composés sulfhydrylés, nous avons déterminé :

- la teneur en -SH (nM de $S \cdot g^{-1}$ de M F),
- le pourcentage de formes réduites : $\frac{-SH}{-SH+S-S} \cdot 10^2$,
- le gradient sulfhydrylé ($SH_C - SH_{ZF}$ ou $SH_{ZR} - SH_{ZF}$)

Les résultats des mesures effectuées au 30e jour de culture (Tableau XIII) autorisent les remarques suivantes :

POSITION DES FRAGMENTS	ZONES ANALYSEES	CROISSANCE		COMPOSES SOUFRES			
		mg de MF	relative *	-SH (nM.g ⁻¹ MF)	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 10^2$	SH _C -SH _{ZF} **	
HORS DU MILIEU	C	237	9,9 %	440	74,6	+ 315	
	Z R	-	-	325	70,5		
	Z M	-	-	240	73,5		
	Z F	-	-	125	62,0		
	N	Z F	-	-	305	70,5	- 65
		Z M	-	-	220	71,5	
		Z R	-	-	210	72,5	
		C	204	8,7 %	240	75,0	
DEMI - IMMERGES	C	260	10,3 %	485	73,5	+ 365	
	Z R	-	-	320	70,2		
	Z M	-	-	190	60,5		
	Z F	-	-	120	49,5		
	N	Z F	-	-	385	73,5	- 115
		Z M	-	-	250	71,5	
		Z R	-	-	240	68,5	
		C	167	6,2 %	270	71,0	
IMMERGES	C	0	-	-	-	0	
	Z R	-	-	20	58,9		
	Z M	-	-	20	56,5		
	Z F	-	-	20	55,7		
	N	Z F	-	-	20	57,7	- 10
		Z M	-	-	10	56,2	
		Z R	-	-	10	57,1	
		C	0	-	-	-	
HORS DU MILIEU HORIZONTALE IMMERGES	C	373	14,8 %	425	76,9	+ 160	
	Z R	-	-	315	73,4		
	Z M	-	-	295	69,1		
	Z F	-	-	265	68,9		
	N	C	-	-	-	-	+ 30
		Z R	-	-	110	57,7	
		Z M	-	-	80	56,0	
		Z F	-	-	80	60,8	

TABEAU XIII : Croissance des tissus néoformés (cal) et état des composés sulphydrilés solubles selon la position et l'orientation des explantats (voir la légende de la figure 6).

* : croissance relative du cal : $\frac{\text{poids de MF du cal}}{\text{poids de MF de la culture}} \cdot 10^2$

** : -SH_C : teneur en -SH du cal

: -SH_{ZF} : teneur en -SH des tissus de la zone foliaire

Le gradient sulphydrilé (-SH_C - -SH_{ZF}) est positif (+) s'il est parallèle à l'expression de la polarité morphologique ; il est négatif (-) s'il est contraire

Les mesures sont effectuées après 30 jours de culture.



- dans les fragments totalement immergés, la teneur en -SH est très faible, le pourcentage de -SH réduits est voisin de 50 %, ce qui est très peu par rapport aux autres catégories de cultures et le gradient sulfhydrilé dans les tissus préexistants est nul.
- la répartition des -SH dans les cals et les différentes zones des fragments placés en position inverse sur le milieu ou à demi-immérgés est semblable elle se traduit par un gradient sulfhydrilé positif égal à + 315 dans le 1^{er} lot et à + 365 dans le second.
- dans les explantats repiqués en position normale, le gradient sulfhydrilé négatif : - 65, si les fragments sont placés sur le milieu ,
-115, s'ils sont à demi-immérgés.
- le pourcentage des formes réduites varie de la même manière que la teneur en -SH quand les explantats sont disposés en sens inverse : il est élevé dans le cal et la zone racinaire situés hors du milieu et d'autant plus faible dans les zones médiane et foliaire que les fragments de racine sont plus enfoncés dans la solution nutritive.
- lorsque les explantats sont repiqués en sens normal, le pourcentage des formes réduites est à peu près le même dans toutes les zones, y compris dans les tissus néoformés.

b. cas des fragments horizontaux

- Lorsque les fragments sont placés horizontalement à la surface du milieu, la croissance du cal est rapide et un peu plus importante que lorsqu'ils sont placés verticalement. La polarité morphologique s'exprime totalement. Au 30^e jour, un gradient sulfhydrilé positif est mis en évidence. Il est relativement faible en raison de la teneur en -SH, plus élevée dans la zone foliaire des fragments horizontaux que dans celle des explantats ensemencés en position verticale.

Lorsque les fragments sont totalement immergés, le cal ne se forme pas et la teneur en -SH dans les trois zones du fragment est plus faible. Un faible gradient sulfhydrilé positif existe néanmoins après 30 jours de culture.

3 - Conclusion

L'immersion totale des explantats empêche la prolifération, provoque une diminution importante de la teneur en -SH des tissus préexistants et supprime la répartition polarisée de ces radicaux. Les tissus immergés demeurent pourtant vivants et ils sont susceptibles de proliférer si on les place ultérieurement hors du milieu de culture.

En réduisant la surface de contact entre les tissus et le milieu de culture, on obtient des résultats différents selon l'orientation des explantats; les plus intéressants sont obtenus lorsque les fragments de racine sont cultivés en position horizontale, à la surface du milieu gélosé. Le gradient sulfhydrilé positif mis en évidence n'est pas provoqué par le milieu qui est également en contact avec toutes les zones de l'explantat ; il est en rapport avec le développement polarisé des tissus.

C - FORME DES EXPLANTATS

Nous avons utilisé des explantats ayant une forme différente et nous les avons repiqués de façon telle que les tissus des zones racinaire et foliaire soient disposés hors du milieu aqueux, quelle que soit l'orientation, (inverse ou normale) de la culture.

1 - Tranches de racines

Des tranches de 15 mm d'épaisseur sont découpées dans la partie moyenne de la racine. Elles sont enfoncées à demi dans le milieu gélosé, l'axe de la racine étant parallèle à la surface du milieu (Fig. 6, e).

Après 2 semaines de culture, les explantats sont découpés en 3 zones :

- zone foliaire, située hors du milieu;
- zone racinaire, située hors du milieu;
- zone immergée ;

Un net gradient sulfhydrilé positif existe dans les tissus situés en dehors du milieu, dès que le cal apparaît. Dans la partie immergée de la culture, la teneur en -SH est 2 à 3 fois plus faible. Le pourcentage de

composés soufrés réduits est également plus faible dans les tissus immergés (Tableau XIV)

ZONES ANALYSEES	-SH (nm·g ⁻¹ MF)	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 10^2$	-SH _{ZR} - SH _{ZF}
Racinaire	460	73	+ 100
Foliaire	360	73	
Immergée	170	62	-

TABLEAU XIV : Etat des composés sulphydrilés solubles dans des tranches de Carotte cultivées pendant 2 semaines sur le milieu standard.

-SH_{ZR} : teneur en -SH des tissus de la zone racinaire

-SH_{ZF} : " " " " " foliaire.

2 - Explantats de forme particulière

Nous avons repris le mode de culture imaginé par LEGRAND (1969). On prélève des prismes dans la région moyenne des racines, au niveau de la zone cambiale puis on les découpe de façon à leur donner la forme d'une hache. Le "manche", à demi enfoncé dans le milieu gélosé sert de "support" aux tissus qui prolifèrent (Fig. 6, f).

Les analyses des composés soufrés sont effectuées uniquement dans les parties des explantats maintenus hors du milieu. LEGRAND (1969) a montré que la polarité morphologique n'est pas modifiée et que le développement du cal est un peu plus important si le support est taillé dans le xylème ; il est un peu plus faible s'il ne comporte que du phloème. Ces différences pourraient être dues à un transport plus ou moins actif des éléments nutritifs et des auxines endogènes dans le "support". D'ailleurs, PILET (1964) constate que le transfert du AIA marqué dans les tranches de Carotte est différent selon la nature des tissus conducteurs.

Pour assurer une meilleure stabilité aux cultures et obtenir un développement plus régulier des cals, nous avons augmenté la taille du "support" et nous nous sommes assuré qu'il comportait à la fois du xylème et

du phloème. Les résultats présentés dans le Tableau ci-dessous montrent que la teneur en -SH est plus élevée dans les tissus néoformés que dans les

POSITION	ZONES ANALYSEES	-SH (nM·g ⁻¹ MF)	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 10^2$	SH _C - SH _{ZF}
N O R M A L E	Cal	505	83	+ 190
	Racinaire	350	78	
	Foliaire	315	69	
I N V E R S E	Cal	675	83	+ 305
	Racinaire	425	81	
	Foliaire	370	73	

TABLEAU XV : Etat des composés sulfhydrilés solubles dans des fragments de racine de Carotte en forme de "hache" (voir la figure 6, f) cultivés pendant 25 jours sur le milieu standard.

-SH_C : teneur en -SH du cal

-SH_{ZF} : " " des tissus de la zone foliaire.

tissus préexistants et on observe un gradient sulfhydrillé positif quelle que soit l'orientation (inverse ou normale) des explantats. D'autre part, le pourcentage de composés soufrés réduits est toujours plus important dans les tissus néoformés que dans les tissus préexistants.

3 - Conclusion

La répartition des composés sulfhydrilés n'est pas due au contact d'une partie de l'explantat avec le milieu de culture. Les résultats présentés ci-dessus démontrent qu'elle est liée au développement du cal.

D - EFFETS DE L'ANAEROBIOSE

Dès les premières tentatives effectuées en vue de cultiver des tissus végétaux, les chercheurs se sont aperçus que les colonies tissulaires se développaient mal en milieu liquide et qu'il fallait les placer à la sur-

face d'un milieu solide. D'après WHITE (1939) cité par GAUTHERET (1959, p.672) l'immersion des explantats provoquerait leur asphyxie et les empêcherait de proliférer. Pour GAUTHERET (1950), le contact du milieu suffirait à lui seul à réduire la prolifération, au moins pour des tissus de Saule.

En ce qui concerne les tissus de Carotte, nous avons constaté que l'immersion des explantats dans la solution nutritive gélosée inhibe totalement la callogenèse, réduit beaucoup la teneur en -SH et fait diminuer le rapport -SH/S-S. Pour tenter de "dissocier" les effets du contact du milieu de ceux de l'anaérobiose qui en résulte lorsque les tissus sont complètement immergés, nous avons réalisé deux types d'expériences. Dans la première série, nous avons augmenté la surface de contact entre les tissus et le milieu, sans provoquer d'anaérobiose. Dans la deuxième série, les explantats ont été placés hors du milieu de culture mais en atmosphère d'azote.

1 - Augmentation de la surface de contact

Des explantats de 12 mm de longueur et de 10 mm de diamètre, prélevés dans la zone cambiale des racines sont ensemencés en position normale ou inverse à la surface d'un milieu de culture standard préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. 50 % des fragments sont laissés tels quels et 50 % sont recouverts d'un bloc de gélose de 4 mm d'épaisseur, pendant toute la durée de l'expérience. Les dosages des thiols et des disulfures acidosolubles sont effectués après 25 jours de culture, dans les zones foliaire et racinaire des fragments.

Les résultats (Tableau XVI) montrent que :

- dans les fragments témoins, c'est-à-dire non recouverts d'un bloc de gélose, la répartition des thiols et des disulfures est semblable à celle trouvée précédemment, malgré la différence de forme des explantats. Un gradient sulfhydrilé positif caractérise les cultures placées en sens inverse un gradient sulfhydrilé négatif caractérise celles disposées en sens normal. Les valeurs de ces gradients sont relativement faibles, mais si on calcule les gradients relatifs, en tenant compte de la longueur des fragments de racines, on trouve des valeurs comparables à celles que nous avons précédemment obtenues :

$$\frac{-SH_{ZR} - -SH_{ZF}}{L}$$

Fragment de 12 mm { en position inverse : 13,3
 en position normale : 3,3

Fragment de 30 mm { en position inverse : 10,5
 en position normale : 2,1

- l'application d'un bloc de gélose contre la face racinaire des explantats placés en position inverse, n'empêche pas le développement du cal et ne modifie pas la répartition des -SH ni le rapport -SH/-SH + S-S.

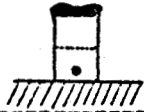
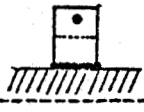
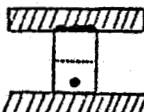
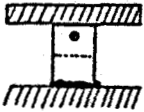

CONDITIONS EXPERIMENTALES	ZONES ANALYSEES	-SH nM·g ⁻¹ M F	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 10^2$	SH _{ZR} - SH _{ZF}
	Z R Z F	220 ± 30 60 ± 10	70 59	+ 160
	Z F Z R	200 ± 62 160 ± 20	62 67	- 40
	Z R Z F	210 ± 30 70 ± 20	72 60	+ 140
	Z F Z R	50 ± 10 130 ± 30	56 64	+ 80

TABLEAU XVI : Influence du contact du milieu aqueux sur l'état des composés sulphydrilés solubles après 25 jours de culture.

 : milieu nutritif

 : cal

Z F : zone foliaire des explantats

Z R : " racinaire " "

Les valeurs présentées sont des moyennes calculées à partir des résultats de deux expériences portant sur des lots différents de racines.

- l'application d'un bloc de gélose contre la face foliaire des explantats disposés en position normale provoque une forte diminution de la teneur en -SH dans cette zone. Il en résulte une inversion du gradient sulfhydrilé, qui devient positif, c'est-à-dire conforme à la polarité morphologique.

Le contact avec le milieu aqueux réduit donc davantage le taux du -SH dans les tissus préexistants que dans les tissus néoformés. Cette diminution n'est pas due à un changement du rapport $-SH/-SH + S-S$. Elle pourrait être provoquée par le passage de thiols de faible poids moléculaire dans le milieu de culture ou par le blocage d'une partie des radicaux -SH par des substances présentes dans celui-ci ; les deux hypothèses n'étant d'ailleurs pas contradictoires.

La différence de comportement des tissus préexistants et néoformés dépendrait donc de la perméabilité sélective des membranes. Or, il est généralement admis que les membranes sont de moins en moins sélectives au fur et à mesure que les cellules vieillissent. On comprendrait, s'il en est ainsi, que le taux des -SH diminue davantage dans les tissus préexistants que dans les tissus néoformés.

2 - Cultures de fragments de racine en atmosphère d'azote

Les fragments de racine (L = 30 mm x d. = 10 mm) sont tous disposés en position inverse soit à la surface d'un milieu standard, soit 2 cm au-dessous de la surface libre. Les cultures sont alors déposées dans des enceintes de 15 litres (dessiccateurs) dans lesquelles on fait le vide. Certaines enceintes sont ensuite mises en communication avec l'atmosphère ordinaire (lots témoins) tandis que les autres sont remplies d'azote R et balayées par un courant de ce gaz pendant 3 semaines.

Les teneurs en -SH et les pourcentages de formes réduites sont déterminés dans les différentes zones de cultures à la fin de la 3e semaine.

- Les fragments repliqués au-dessus du milieu et placés en atmosphère ordinaire sont les seuls à présenter un cal. Les teneurs en -SH dans les trois zones analysées sont semblables à celles que nous avons trouvées précédemment dans des conditions comparables. Il en est de même du pourcentage de thiols réduits et du gradient sulfhydrilé (Tableau XVII).

- l'anaérobiose provoquée en remplaçant l'air par de l'azote R, ou par l'immersion des cultures, provoque les mêmes effets : inhibition du développement du cal, diminution de la teneur en -SH et du rapport thiols réduits/composés soufrés solubles (Tableau XVII).

CONDITIONS position des fragments	EXPERIMENTALES atmosphère	ZONES ANALYSEES	ETAT DES COMPOSES SULFHYDRILES	
			-SH (nM·g ⁻¹ MF)	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 10^2$
HORS DU MILIEU	A I R	C	600 ± 220	70 ± 12
		ZR	350 ± 110	59 ± 10
		ZF	210 ± 110	55 ± 11
	A Z O T E	C	pas de néoformation	
		ZR	150 ± 120	60 ± 11
		ZF	110 ± 80	58 ± 15
IMMERGES	A I R	C	pas de néoformation	
		ZR	30 ± 30	41 ± 10
		ZF	30 ± 30	43 ± 09
	A Z O T E	C	pas de néoformation	
		ZR	40 ± 20	57 ± 10
		ZF	30 ± 10	50 ± 09

TABLEAU XVII : Effets comparés de l'anaérobiose et de l'immersion des tissus dans le milieu nutritif, sur l'état des composés sulfhydrilés solubles, après 3 semaines de culture.

Les valeurs présentées sont des moyennes calculées à partir des résultats de deux expériences portant sur des lots différents de racines.

Après une première période de 3 semaines sous azote, des fragments de racine de Carotte transférés en atmosphère ordinaire produisent un cal, à la condition de les repiquer en même temps sur des milieux neufs. Si on les transpose sur les mêmes milieux, le développement du cal est nul ou très faible, sans doute en raison de la présence de produits de fermentation dans la solution nutritive (LEFEBVRE, 1967 et 1976).

Les résultats rapportés dans le Tableau XVIII complètent ceux de l'expérience précédente :

- les fragments se trouvant dans une atmosphère renouvelée d'azote R ne prolifèrent pas. La teneur en -SH et le pourcentage de -SH réduits diminuent dans les tissus préexistants.

- dans les fragments immergés pendant 6 semaines dans le milieu nutritif, la teneur en -SH est nulle.
- les néoformations qui se développent sur des fragments conservés en anaérobiose pendant 3 semaines, puis repiqués à la surface du milieu et placés en atmosphère ordinaire présentent une teneur en -SH et un rapport -SH/-SH + S- plus élevés que ceux des témoins laissés pendant toute la durée de l'expérience en atmosphère ordinaire, hors de la solution nutritive. Ce résultat montre que l'état des composés sulfhydrilés traduit bien la croissance de ces tissus.

CONDITIONS EXPERIMENTALES				ZONES ANALYSEES	ETAT DES COMPOSES SULFHYDRILES au 42e jour de culture			
1ère période (21 J)		2e période (21 J)			-SH (nM.g ⁻¹ de MF)	-SH / (-SH + S-) . 10 ²		
position des fragments	atmosphère	position des fragments	atmosphère					
HORS DU MILIEU	AIR	HORS DU MILIEU	AIR	C	520	260	76	11
			ZR	410	280	62	15	
			ZF	170	050	63	16	
			AZOTE	C	480	200	70	09
			ZR	460	270	63	16	
			ZF	120	40	56	16	
	AZOTE	MILIEU	AIR	C	890	340	63	09
			ZR	650	190	73	10	
			ZF	230	90	58	15	
			AZOTE	C	pas de néoformation			
			ZR	80	70	44	16	
			ZF	50	40	52	12	
IMMERGES	AIR	IMMERGES	AIR	C	pas de néoformation			
			ZR	0				
			ZF	0				
	AZOTE	HORS DU MILIEU	AIR	C	790	250	78	09
			ZR	310	140	71	11	
			ZF					
				C	830	230	67	08
				ZR	330	110	62	13
				ZF				

TABLEAU XVIII : Effets comparés de l'anaérobiose et de l'immersion des tissus dans le milieu de culture sur l'état des composés sulfhydrilés solubles : expériences de transfert.

Les fragments sont transférés sur des milieux neufs après une 1ère période de 21 jours ; les dosages sont effectués à la fin de la seconde période qui dure 21 jours également. Les valeurs présentées sont des moyennes calculées à partir de deux expériences indépendantes.

La croissance de fragments de tige de Pois est également plus faible en anaérobiose. MARRE et ARRIGONI (1957a) ont constaté que l'immersion de fragments de tige dans un milieu liquide réduit l'allongement d'environ 50 %, par rapport à celui de témoins flottant à la surface de la solution nutritive ou immergés dans un milieu dans lequel on fait "buller" de l'oxygène. Ces auteurs ont montré que la teneur du G-SH diminue dans les fragments immergés, tandis que celle du GS-SG augmente.

La diminution du rapport thiols solubles/disulfures ou thiols solubles/composés soufrés acidosolubles, qui est en relation avec la réduction de la prolifération des tissus de Carotte cultivés in vitro et avec le ralentissement de l'élongation des fragments de tige de Pois reflète donc l'ensemble des processus de la croissance.

E - CONCLUSION

Dans des fragments de racine de Carotte cultivés in vitro il existe un gradient sulfhydrilé conforme à l'expression de la polarité morphologique ; nous l'appellerons : gradient -SH intrinsèque.

Le contact du milieu aqueux inhibe partiellement le développement du cal et réduit le taux des radicaux -SH dans les tissus du fragment de racine. Le gradient sulfhydrilé apparent, calculé à partir des teneurs en -SH déterminées expérimentalement dans les différentes zones de la culture est donc :

- augmenté lorsque la face foliaire est enfoncée plus ou moins profondément dans le milieu (Fig. 7, a et c) ;

- diminué à un point tel que le gradient apparent est inverse du gradient intrinsèque si la face racinaire est en contact avec la solution nutritive. Le gradient apparent est d'autant plus important que la zone racinaire est plus profondément immergée dans le milieu (Figure 7, b et d) ;

- égal au gradient apparent, quand toutes les zones analysées sont en contact avec le milieu (Fig. 7, e et f) ou quand aucune des parties analysées ne se trouve à son contact (Fig. 7, g et h).

L'anaérobiose provoque des effets analogues à l'immersion complète des fragments de racine dans le milieu : inhibition du développement du cal, suppression du gradient sulfhydrilé, diminution de la teneur en -SH et du rapport -SH/-SH + S-S dans les tissus préexistants.

Dans tous les cas, on constate que le développement du cal et l'établissement d'un gradient sulfhydrilé sont concomitants, sans que l'on puisse déterminer si l'un de ces phénomènes est bien la cause de l'autre.

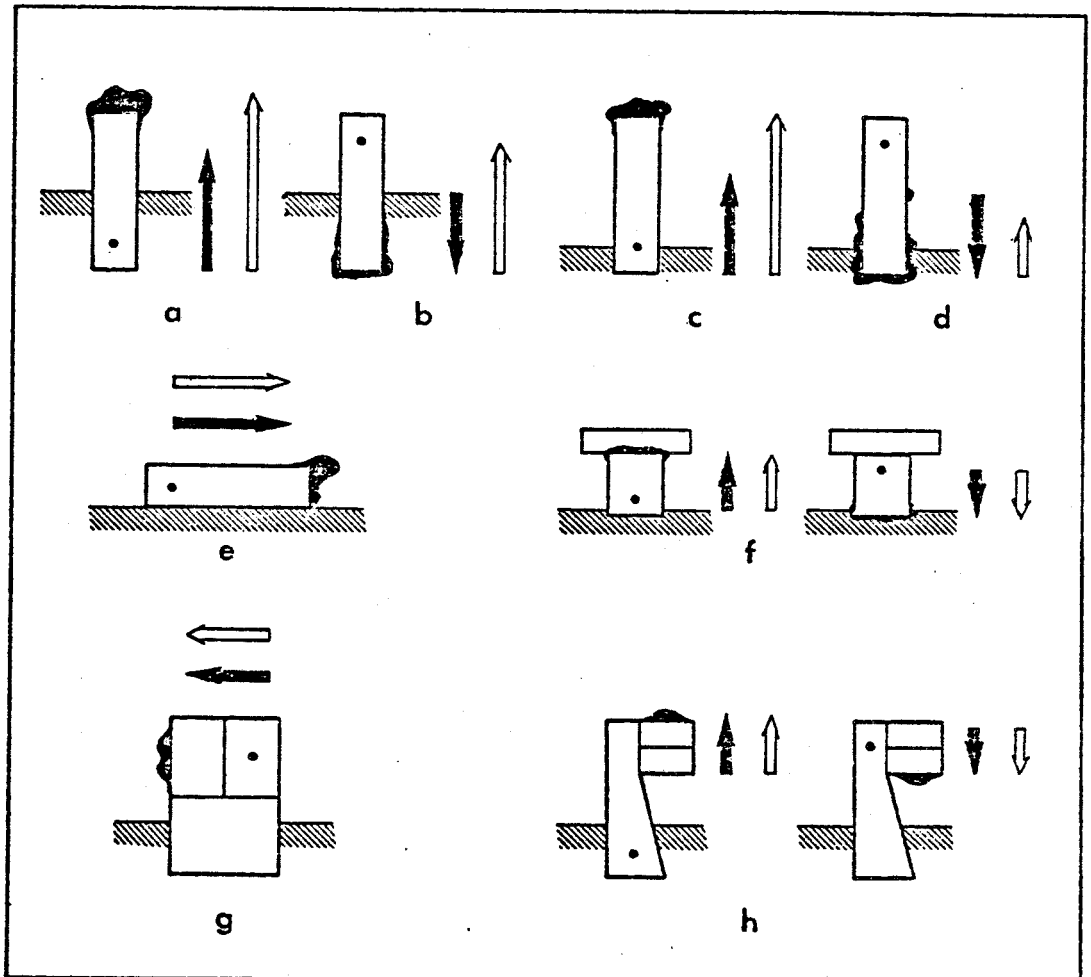



Figure 7 : Représentation schématique du gradient sulfhydrilé intrinsèque (\blackrightarrow) et du gradient sulfhydrilé apparent (\rightleftarrows) dans des cultures in vitro de racine de Carotte, selon la disposition des explantats par rapport à la surface du milieu aqueux, leur forme et leur orientation.

Face foliaire des explantats : •

Néof ormation : 

Surface du milieu de culture : 



CHAPITRE 4 : EVOLUTION DES -SH SOLUBLES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE CULTIVES IN VITRO.

A - DEVELOPPEMENT DES NEOFORMATIONS

Des fragments de racine (30 x 8 mm) sont placés en position inverse sur le milieu gélosé standard. Dès la 2ème semaine de culture, de petites pustules apparaissent au niveau du cambium, sur la face racinaire des explantats. Elle fusionnent ensuite pour former un bourrelet continu qui surmonte la section de l'assise cambiale, puis un cal hémisphérique, dur et compact recouvre progressivement toute la surface des explantats. Lorsque les cultures sont exposées à la lumière, le cal est chlorophyllien.

L'évolution des poids de M F et de M S (Tableau XIX) et des substances azotées (Tableau XX) montre que la croissance du cal est rapide au cours de la 2ème et de la 3ème semaine, plus faible de la 3ème à la 6ème semaine et encore ralentie de la 6ème à la 11ème. Le nombre de mesures est insuffisant pour déterminer la période pendant laquelle le taux de croissance est maximum, d'autant qu'il est difficile de préciser quand le cal commence à se développer ; toutefois, il est clair qu'après 6 semaines, la prolifération des tissus néoformés est fortement ralentie.

Le développement des cultures comporte au moins 4 phases :

- une phase d'intense activité cellulaire, précédant l'apparition du cal et pendant laquelle d'importants remaniements cellulaires se produisent dans la zone racinaire des fragments (GAUTHERET, 1959 p. 353).

- une phase de croissance active, de l'apparition du cal jusqu'à la 6ème semaine, au cours de laquelle le cal recouvre progressivement toute la surface racinaire. La croissance rapide de ce cal se traduit par une importante augmentation du poids de M F et de M S et par des variations qualitatives des composés azotés. Au cours de cette période, le pourcentage de M S et la teneur en N P et en N S sont plus élevés dans les tissus néoformés que dans les tissus préexistants.

PARAMETRES	AGE DES CULTURES (semaines)											
	3				6				11			
	C	ZR	ZM	ZF	C	ZR	ZM	ZF	C	ZR	ZM	ZF
M F (mg)	160	790	882	903	520	818	981	1032	860	891	1017	926
M S (mg)	18	90	109	102	43	90	104	115	105	100	108	105
$\frac{MF - MS}{MF} \cdot 10^2$	88,6	88,6	87,6	88,6	86,7	89,0	89,4	88,9	87,8	88,8	89,4	88,7
$\frac{MS}{MF} \cdot 10^2$	11,4	11,4	12,4	11,4	13,3	11,0	10,6	11,1	12,2	11,2	10,6	11,3

TABLEAU XIX : Evolution des poids de matières fraîche (M F) et sèche (M S), de la teneur en eau et du pourcentage de M S de fragments de racine de Carotte cultivés in vitro, en fonction de l'âge des cultures.

PARAMETRES	AGE DES CULTURES (Semaines)											
	3				6				11			
	C	ZR	ZM	ZF	C	ZR	ZM	ZF	C	ZR	ZM	ZF
N T ($mg \cdot g^{-1}$ M S)	25,7	19,9	19,2	18,0	27,8	22,3	19,9	15,9	33,5	20,0	17,2	15,5
N P ($mg \cdot g^{-1}$ M S)	13,7	9,5	9,1	8,4	9,8	8,3	8,5	8,5	11,0	10,2	9,5	8,6
N S ($mg \cdot g^{-1}$ M S)	12,0	10,4	10,1	9,6	18,0	14,0	11,4	7,6	22,5	9,8	7,7	6,9
N P/N T	53,3	47,7	47,4	46,7	35,3	37,2	42,7	52,2	32,8	51,0	55,2	55,5
N S/N P	0,87	1,09	1,11	1,14	1,83	1,68	1,34	0,91	2,04	0,96	0,81	0,80



TABLEAU XX : Variations des composés azotés de fragments de racine de Carotte cultivés in vitro, en fonction de l'âge des cultures.

Si on considère les variations du rapport N P/N T qui traduisent l'intensité de la protéogenèse, on est surpris de constater que seule la première série d'analyses (3ème semaine) révèle une protéogenèse plus active dans les tissus néoformés. Après 6 et 11 semaines de culture, elle est plus faible dans les néoformations que dans les tissus préexistants. Les variations de ce rapport dépendent surtout de celles de l'azote soluble qui augmente beaucoup plus dans les tissus néoformés et diminue fortement dans la zone foliaire, en contact avec le milieu, et un peu moins dans la zone médiane (Tableau XX).

- une phase de croissance ralentie, entre la 6ème et la 11ème semaine pendant laquelle les poids de M F et de M S augmentent plus lentement, tandis que l'intensité de la protéogenèse et le pourcentage de M S diminuent.

- une phase de sénescence, entre le 3ème et le 4ème mois, au cours de laquelle les tissus néoformés brunissent et se nécrosent progressivement.

B - EVOLUTION DES COMPOSES SULFHYDRILES SOLUBLES

1 - Teneur en -SH des différentes zones des explantats

La fraction soluble des composés thiols et des disulfures, dosée après 3, 6 et 11 semaines, a été exprimée par rapport à trois critères de référence :

- . le poids de M F,
- . le poids de M S,
- . la teneur en azote soluble, N S.

- teneur en -SH rapportée à l'unité de M F (Fig. 8, A). Quelle que soit la durée de la culture, la concentration en -SH est plus importante dans la néoformation que dans les tissus préexistants ; dans ces derniers, elle diminue de la zone racinaire à la zone foliaire. On constate d'autre part que la teneur en -SH diminue au fur et à mesure du vieillissement cellulaire, aussi bien dans les tissus néoformés que dans les tissus préexistants.

Dans les néoformations les plus développées, on distingue deux zones. La plus externe, formée de parenchyme homogène correspond au "cal primaire" selon la terminologie de KRENKE (1933, cité par GAUTHERET, 1944).

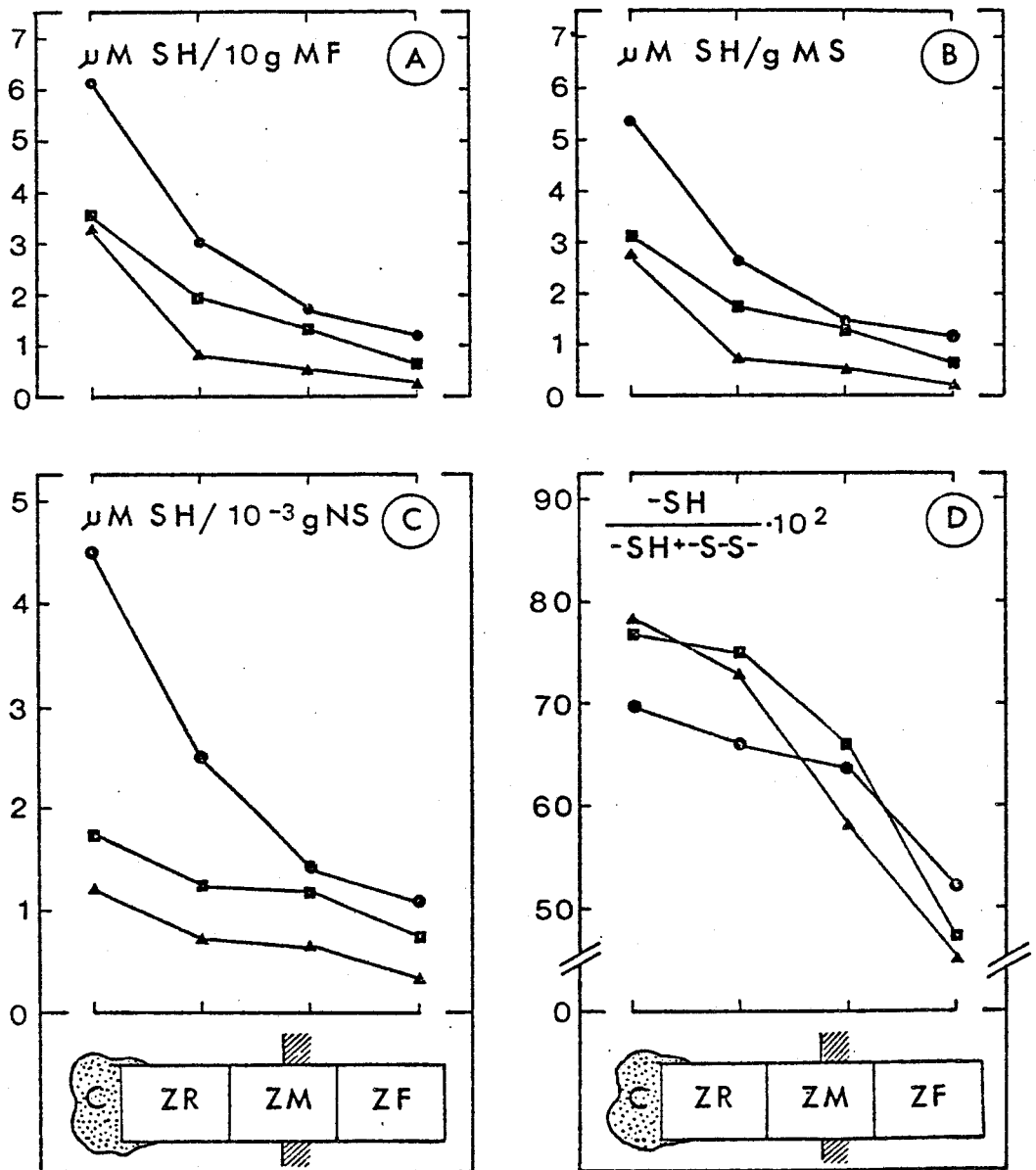


Figure 8 : Variations des composés sulphydrilés solubles dans des fragments de racine de Carotte cultivés in vitro pendant 3 (●-●), 6 (■-■) et 11 (▲-▲) semaines. La teneur en-SH est exprimée par rapport :

- au poids de matière fraîche, Fig. A,
- au poids de matière sèche, Fig. B,
- au poids d'azote soluble, Fig. C,
- à la teneur en composés sulphydrilés réduits et oxydés : Fig. D.

BNS
LILLE

L'autre, plus interne, renferme des flots de différenciation comportant des assises génératrices, des trachéides et des tubes criblés ; elle correspond au "cal secondaire" de KRENKE. Il est clair que la zone externe se forme la

première et que cette partie de la néoformation renferme les cellules les plus âgées. Dans des cals de 11 semaines, la teneur en -SH est moins élevée dans la zone externe que dans la zone interne. Dans la zone de transition, entre les tissus néoformés et la partie racinaire du fragment, la concentration des -SH est intermédiaire entre celle du cal et celle de la zone racinaire des cultures qui est beaucoup plus faible (Tableau XXI).

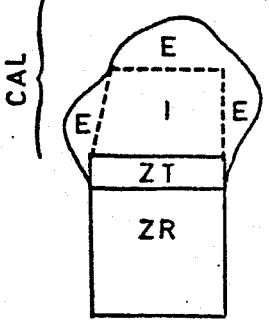
	ZONES	E S S A I S		
	ANALYSEES	N°1	N°2	N°3
E	240	240	260	
I	320	260	310	
ZT	190	120	150	
ZR	80	-	-	

TABLEAU XXI : Répartition des radicaux -SH dans des cultures de fragments de racine de Carotte cultivées pendant 2 mois et demi sur du milieu standard.

E : zone externe du cal
 I : " interne du cal,
 Z T : " de transition entre le cal et la zone racinaire (Z R) du fragment.
 Résultats de 3 essais indépendants.

- teneur en -SH rapportée à l'unité de M S (Fig. 8 B). Les résultats sont sensiblement les mêmes, car le pourcentage de M S varie relativement peu au cours de la croissance (Tableau XIX).

- teneur en -SH rapportée à la teneur en N S (Figure 8 C). L'amplitude et la dynamique des gradients sulfhydrilés ne sont pas modifiées. Ce qui signifie que la proportion d'acides aminés et de petits peptides soufrés est plus élevée dans la néoformation que dans le reste de la culture.

2 - Variations relatives de la teneur en -SH

Si on compare les valeurs présentées sur la figure 8 avec celles

trouvées pour un lot témoin au moment de la mise en culture, on constate les faits suivants (Tableau XXII) :

- Au niveau du cal, la teneur en -SH est nettement plus élevée après trois semaines. Elle diminue lorsque la culture se prolonge, mais reste toujours supérieure à celle des tissus du lot initial ;
- Dans la zone racinaire, le taux des thiols solubles augmente pendant trois semaines, puis diminue ; après onze semaines, il est plus faible que le taux initial ;
- Dans la zone médiane, une légère augmentation peut être relevée à la fin de la première période. La teneur en -SH diminue ensuite pour être plus faible que la teneur initiale dès la 6ème semaine, et plus faible encore à la 11ème.
- Dans la zone foliaire, il y a appauvrissement progressif en composés sulfhydrilés réduits.

AGE DES CULTURES	ZONES ANALYSEES			
	Cal	ZR	ZM	ZF
3 Semaines	+ 262	+ 74	+ 2	- 29
6 Semaines	+ 103	+ 12	- 23	- 63
11 Semaines	+ 91	- 59	- 71	- 85

TABLEAU XXII : Variations relatives de la teneur en composés sulfhydrilés solubles de fragments de racine de Carotte cultivés in vitro en fonction de l'âge des cultures.

+ : augmentation par rapport au lot initial,
 - : diminution " " " " "

$$\text{valeur relative} : \frac{V_t - V_0}{V_0} \cdot 10^2$$

V_t : valeur en nM.g^{-1} de MF, au temps t ,

V_0 : valeur en nM.g^{-1} de MF, au moment de la mise en culture

3 - Dynamique des gradients sulfhydrilés

L'amplitude du gradient sulfhydrilé s'exprime par la différence entre la teneur en -SH du cal (ou de la zone racinaire, quand celui-ci ne se développe pas) et celle de la zone foliaire du fragment de racine. Les valeurs rapportées dans le Tableau XXIII sont calculées à partir des teneurs en -SH exprimées en nM de soufre, par rapport à l'unité de M F, de M S et d'azote soluble (N S).

Lors de la mise en culture, la répartition des radicaux -SH dans le fragment de racine est homogène : il n'y a pas de gradient (Tableau X). Le gradient sulfhydrilé passe par un maximum après trois semaines, diminue rapidement de la 3ème à la 6ème semaine, puis demeure stationnaire de la 6ème à la 11ème semaine.

PARAMETRES	AGE DES CULTURES (semaines)		
	3	6	11
-SH/MF	+ 49	+ 29	+ 30
-SH/MS	+ 4,30	+ 2,50	+ 2,50
-SH/NS	+ 3,40	+ 1,00	+ 0,90

TABLEAU XXIII : Amplitude des gradients sulfhydrilés (-SH = SH_C - SH_{ZF}) en fonction de la durée de la culture et du critère de référence utilisé pour exprimer la teneur en -SH (M F, M S, N S).

4 - Evolution du rapport -SH / -SH + S-S

Le pourcentage de formes réduites diminue régulièrement du cal jusqu'à la région foliaire de l'explantat. Au cours du développement de la culture, les pourcentages de -SH tendent à augmenter dans le cal et dans la zone racinaire du fragment et à diminuer dans les deux autres zones de celui-ci (Figure 8, D). Notons que si la répartition,

le long de l'axe de la culture se retrouve dans les différents essais que nous avons effectués, les valeurs obtenues varient quelque peu. Ce qui s'explique, puisqu'il ne s'agit pas d'une mesure directe, mais d'un rapport.

C - CONCLUSION et DISCUSSION

1 - Etat des composés sulfhydrilés et croissance

Dans des fragments de racine de Carotte cultivés in vitro en position inverse, sur des milieux dépourvus de phytohormones, le développement des néoformations présente une polarité stricte. Après 3 semaines, les cals recouvrent la plus grande partie de la face racinaire des explantats. Diverses substances, plus ou moins uniformément réparties dans les fragments de racine de Carotte se distribuent selon un gradient parallèle à l'axe des explantats dès que ces derniers sont mis en culture. Le développement du cal accélère ces processus et plusieurs gradients ont été mis en évidence.

Après 3 semaines de culture, la teneur en -SH solubles et le pourcentage des formes réduites sont plus élevés dans la néoformation, siège d'une croissance active, qu'au niveau du fragment initial dont les cellules se divisent peu ou pas du tout (zone foliaire). Par ailleurs, la teneur en -SH et le pourcentage de thiols réduits dans les tissus néoformés et les différentes zones du fragment de racine diminuent au fur et à mesure que les cultures vieillissent et que la prolifération du cal se ralentit.

2 - Gradients auxiniques, auxine-oxydasiques et sulfhydrilés

La croissance du cal est évidemment conditionnée par la teneur en auxine endogène, le milieu ne renfermant aucune phytohormone. Dans les explantats préparés en vue de la mise en culture, PILET (1967) observe déjà une dissymétrie de la répartition de l'auxine endogène : la zone racinaire en renferme presque 4 fois plus que la zone foliaire. Après 19 jours de culture, KULESCHA (1951) constate que l'auxine a tendance à s'accumuler dans la région racinaire des explantats. PILET (1967) complète cette observation en mettant en évidence un véritable gradient auxinique le long de

l'axe longitudinal de la culture. Le gradient auxinique augmente de 0 à 19 jours puis reste ensuite stationnaire ou diminue légèrement (KULESCHA, 1951). On peut donc noter que lorsque les explantats sont cultivés en position inverse, les gradients auxinique et sulfhydrilé sont parallèles et varient dans le même sens au cours de la culture.

Trois mécanismes, au moins, peuvent rendre compte de la répartition de l'auxine dans les fragments de racine de Carotte :

- le transport polarisé de l'auxine endogène,
- la formation plus importante d'auxine, à partir de précurseurs dans la zone racinaire (anabolisme),
- la dégradation moins rapide de l'auxine endogène dans cette zone (catabolisme).

Les essais entrepris avec du AIA marqué par du ^{14}C (PILET, 1964) n'ont pas permis à cet auteur de conclure à un transport polarisé de l'auxine ; cependant, il constate que la migration de l'hormone est qualitativement sinon quantitativement différente. Elle emprunte en effet des voies différentes selon l'orientation des fragments. Nous disposons de très peu de renseignements concernant l'anabolisme de l'auxine dans ces tissus (PILET et FRAGATA, 1965). Il est possible que le tryptophane marqué se transforme plus facilement en auxine radioactive dans la zone racinaire si les fragments sont renversés et si la croissance des néoformations est plus active (PILET, 1964). Selon PILET (1956, 1964, 1967), la répartition de l'auxine endogène s'explique essentiellement par l'existence d'un gradient d'activité auxine-oxydasique, inverse du gradient auxinique.

Il résulte des faits précédents que la teneur en -SH est élevée dans les régions où l'activité auxine-oxydasique est faible et réciproquement. La dynamique de ces gradients est intéressante à considérer car elle complète bien ce résultat. Au fur et à mesure que les cultures vieillissent, la teneur en -SH solubles et l'amplitude des gradients sulfhydrilés diminuent ; par contre, l'activité des auxine-oxydases et l'amplitude du gradient auxine-oxydasique augmentent.

3 - Gradients peroxydasiques et catalasiques

Un parallélisme entre l'activité de ces deux catégories d'enzymes a été maintes fois relevé ; citons entre autres les travaux de PERLIS

et GALSTON (1955) de STUTZ (1957) et de GASPAR (1965). GASPAR et XHANFFLAIR (1967) ont bien mis en valeur la similitude des gradients auxine -oxydasiques, peroxydasiques et catalasiques le long de l'axe des racines de Lens. Cependant, sur le même matériel, PILET et GALSTON (1955) avaient précédemment montré que l'activité AIA-oxydasique diminue très fortement de la coiffe vers le méristème racinaire ; tandis que l'activité peroxydasique augmente très faiblement. Aussi, PILET et GASPAR (1968) reconnaissent-ils que la situation est peut-être moins simple qu'on ne peut l'imaginer après une première analyse.

Dans les fragments de racines de Carotte cultivés in vitro, LEGRAND (1969; 1970) montre que le contact du milieu aqueux modifie la répartition des peroxydases et des catalases. Lorsqu'il supprime cet effet, en utilisant des explantats de forme particulière, cet auteur trouve des activités peroxydasiques et catalasiques plus faibles dans la zone racinaire des fragments que dans la zone foliaire ; ce qui est tout à fait conforme aux gradients auxine -oxydasiques précédemment discutés. Cependant, l'activité peroxydasique des néoformations est plus forte que celle de certaines zones du fragment, contrairement à ce que l'on observe à propos des auxine -oxydases. Ces différences s'expliquent sans doute parce que les extraits enzymatiques, dans les deux cas, sont des "extraits bruts" susceptibles de renfermer des inhibiteurs. SEQUEIRA et MINEO (1966) ont montré, en fractionnant sur colonne Sephadex des extraits enzymatiques de racines de Tabac, que toutes les fractions à activité AIA-oxydasique importante ne présentaient pas nécessairement une forte activité peroxydasique. Inversement, plusieurs peroxydases isolées à partir d'un même végétal montrent que leur affinité pour le AIA peut varier considérablement (MacCUNE, 1961; SHIN et NAKAMURA, 1962). Au contraire, PILET et LAVANCHY (1969) trouvent une corrélation satisfaisante entre les activités de ces deux types d'oxydases, dans les racines du Lens.

4 - Autres gradients

Ils sont tous plus ou moins en rapport avec la croissance des néoformations, mais ils ne semblent pas directement liés à l'évolution des fonctions -SH.

LA TENEUR EN EAU.- Pour GORIS (1947), elle est plus élevée dans les tissus néoformés. PILET et FRAGATA (1963) ont trouvé un gradient inverse

et CAPPELETTI (1942 et 1947) obtient à ce propos des résultats contradictoires. Au cours de ce travail, nous avons le plus souvent observé une hydratation légèrement plus faible dans les néoformations. Mais, outre le fait que la teneur en eau varie au cours de la culture (Tableau XIX), il nous est également arrivé de trouver un gradient différent (PILET et DUBOIS, (1968a). Comme PILET (1958), PILET et MEYLAN (1955) et MEYLAN (1960) l'ont déjà signalé à propos de l'organogenèse et de la polarité bio-électrique de ces tissus, l'origine et l'état physiologique des racines de Carotte utilisées sont responsables de ces différences.

L'AZOTE ET LE PHOSPHORE .- Pour les trois catégories d'azote étudiées (N T, N P, N S) des gradients parallèles à l'axe des fragments et conformes à la polarité morphologique ont été établis (Tableau XX). Leurs variations, au cours du développement des cultures soulignent que c'est la teneur en N S qui varie le plus.

L'analyse des rapports NP/NT et NS/NP, qui sont généralement utilisés pour caractériser la capacité protéosynthétique des tissus isolés (LIORET, 1960 ; LANCE, 1963 ; FRAGATA, 1967) fournit des résultats apparemment contradictoires. Après 3 semaines de culture, la protéogenèse est plus forte dans le cal que dans les tissus préexistants. Par la suite, elle diminue dans le cal et augmente dans le fragment, particulièrement dans la zone foliaire qui ne manifeste pourtant aucun signe de prolifération. Comme l'a souligné FRAGATA (1967) à propos du même matériel, l'interprétation correcte de ces rapports suppose un système où les échanges de substances azotées avec le milieu extérieur sont négligeables ou se compensent. Ce n'est pas le cas des tissus de Carotte ; cultivés sur un milieu riche en azote minéral, leur teneur en N T augmente au cours de la culture.

Dès résultats rapportés dans le Tableau XX, nous pouvons surtout retenir une certaine stabilité de la teneur en N P dans les différentes zones de la culture, une augmentation progressive de la teneur en N S dans la néoformation et une diminution dans la zone foliaire du fragment, au fur et à mesure que la culture se poursuit. Ces faits suggèrent un transport des composés azotés solubles de la zone foliaire du fragment vers le cal.

Un processus semblable a déjà été établi pour le phosphore. HELLER (1955b et 1956) a montré que tout le phosphore marqué fourni par le milieu

était absorbé par les tissus, après 2 mois de culture. Cette absorption se réalise en 2 temps : une première migration, au début de la culture, puis une seconde lorsque les tissus néoformés se développent activement. MAROTI (1964) et RICHEZ (1964) ont confirmé ces résultats. Pour ce dernier auteur, la seconde migration du phosphore n'est pas due à une conduction polarisée, mais à l'attraction exercée par les tissus en croissance, et surtout au mouvement passif de l'eau.

CHAPITRE 5 : VARIATIONS DES -SH SOLUBLES AU COURS DE LA CROISSANCE DES COLONIES TISSULAIRES DE CAROTTE.

A - ANALYSE QUANTITATIVE DE LA CROISSANCE

1 - Biomasse et intensité respiratoire

a - Colonies chlorophylliennes

L'évolution des poids de M F, de M S et d'azote protéique (N P) au cours de la croissance de ces tissus est rapportée en coordonnées semi-logarithmiques sur la Figure 9_A. L'observation des pentes des droites et l'évolution de l'intensité respiratoire (Fig. 10_A) montrent que la croissance comporte 4 phases principales :

- une phase de croissance exponentielle : elle débute dès la mise en culture et dure environ 30 jours. Au cours de cette période, le pourcentage de M S, la teneur en N P rapportée à l'unité de M S (Tableau XXIV) et l'intensité respiratoire rapportée à l'unité de matière fraîche (IRMF) augmentent, ce qui traduit à la fois une synthèse et une activité importantes du cytoplasme cellulaire. Cependant, l'intensité respiratoire rapportée à l'unité de protéine (IRNP) diminue à partir du 21^{ème} jour, en raison de la protéogenèse très intense pendant toute cette période (Tableau XXIV).

		SOUCHES	AGE DES CULTURES (Jours)								
			0	2	7	15	21	30	45	60	90
Matière sèche (%)	CHL	5,10	5,80	6,10	6,00	6,05	6,24	5,38	4,75	4,20	4,17
	CAR	6,52	-	7,82	8,23	-	7,34	7,06	6,63	6,27	6,32
Azote protéique (mg·g ⁻¹ M S)	CHL	10,4	10,8	11,8	13,3	14,0	14,4	12,7	11,0	9,2	8,6
	CAR	10,1	-	11,2	10,9	-	10,6	10,7	10,2	10,5	9,9

TABLEAU XXIV : Evolution des taux de matière sèche et d'azote protéique dans les colonies chlorophylliennes (CHL) et caroténogènes (CAR) de Carotte, en fonction de l'âge des cultures.

L'exaltation des échanges respiratoires a sans doute plusieurs causes. Elle peut être provoquée par le traumatisme dû au découpage des colonies tissulaires précédant la mise en culture ou résulter de l'augmentation de la surface des tissus en contact avec l'oxygène, les explantats découpés respirant davantage que les colonies entières. Les essais entrepris par LANCE (1963) pour vérifier ces hypothèses l'ont conduit à admettre, qu'au moins en ce qui concerne le parenchyme vasculaire de Topinambour, le premier facteur est plus important que le second. D'autre part, pour la souche chlorophyllienne de Carotte, comme pour les tissus de Scorsonère utilisés par LIORET (1953 ; 1960), l'afflux d'aliments respiratoires, notamment de glucose rapidement absorbé, stimule certainement la respiration au cours des premiers jours de culture.

Pendant cette phase de croissance, la masse des protéines double environ tous les 11 jours et les temps de doublement des poids de M F et de M S sont respectivement de 12 et de 14 jours.

- une phase de croissance active, entre le 30ème et le 60ème jour. Les poids de M F et de M S augmentent rapidement et la protéogénèse diminue. L'IRNP varie peu tandis que l'IRMF décroît. Au cours de cette période, les cellules produisent plus de constituants du paraplasme (amidon, polysaccharides) et moins de substrats respiratoires.

- une phase de croissance ralentie, du 60ème au 90ème jour. Les matières sèches en général et les protéines en particulier augmentent peu. L'IRMF baisse plus vite que l'IRNP car le poids de M F continue de s'accroître. Cette période est surtout marquée par une entrée d'eau importante qui accompagne le grandissement des cellules.

- une phase de sénescence. Du 3ème au 4ème mois, la biomasse s'accroît très peu. Le pourcentage de M S et les teneurs en NP et en NS restent à peu près stationnaires. L'intensité respiratoire diminue rapidement, ce qui traduit une perte d'activité générale du métabolisme.

La teneur en chlorophylle évolue également au cours de la culture. Les variations étant directement en rapport avec l'éclaircissement des colonies tissulaires, nous les étudierons dans le chapitre consacré aux effets de la lumière sur la croissance (1ère partie, Chap. 6).

Figure 9 : Croissance des colonies tissulaires des souches chlorophylliennes (A) et caroténogènes (B) de Carotte.

La croissance est exprimée en :

- g de matière fraîche (MF) par culture : ●—●
- $g \times 10^{-1}$ de matière sèche (MS) par culture : ○—○
- mg d'azote protéique (NP) par culture : ▲---▲

E : phase exponentielle ; A : phase de croissance active ; R : phase de croissance ralentie ; S : phase de sénescence.

Figure 10 : Intensité respiratoire des colonies tissulaires des souches chlorophylliennes (A) et caroténogènes (B) de Carotte.

L'intensité respiratoire est exprimée soit en $\mu\text{l d'O}_2$ par heure et par g de matière fraîche (IRMF), soit en $\mu\text{l d'O}_2$ par heure et par mg d'azote protéique (IRNP).

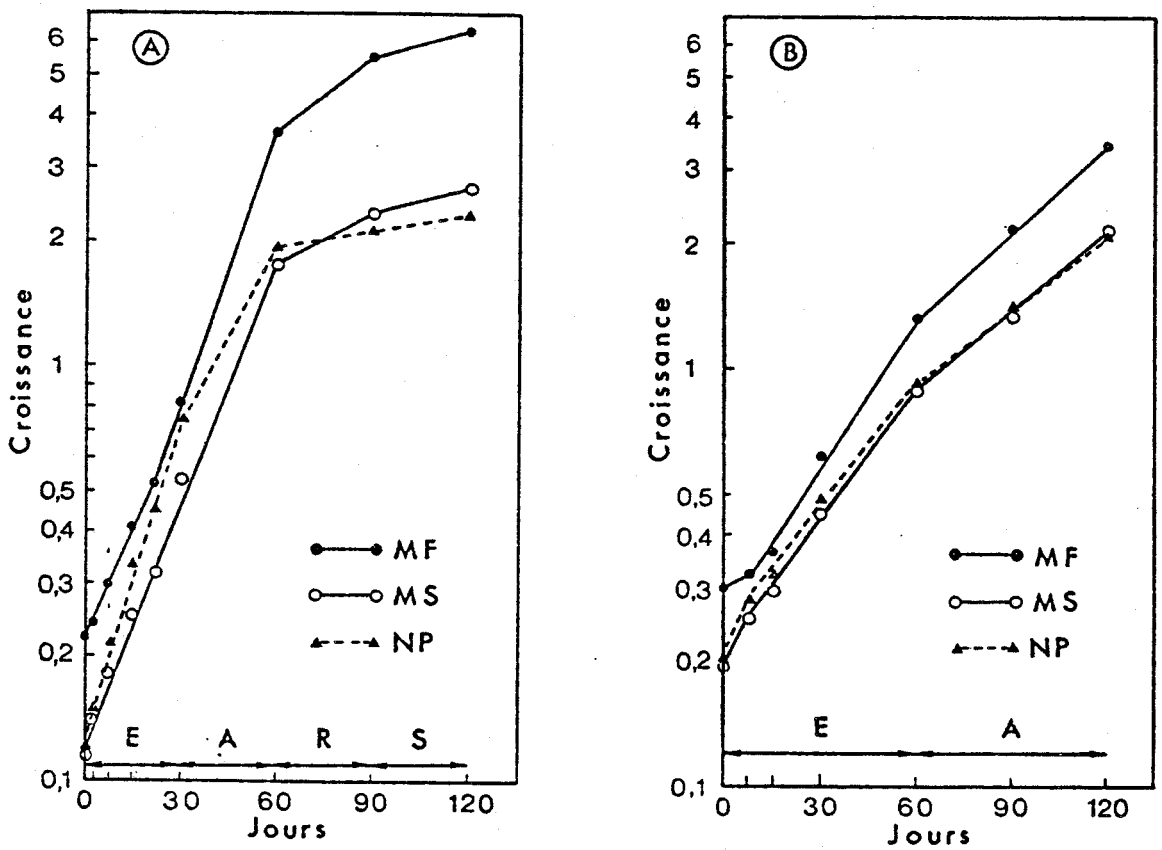


Figure 9

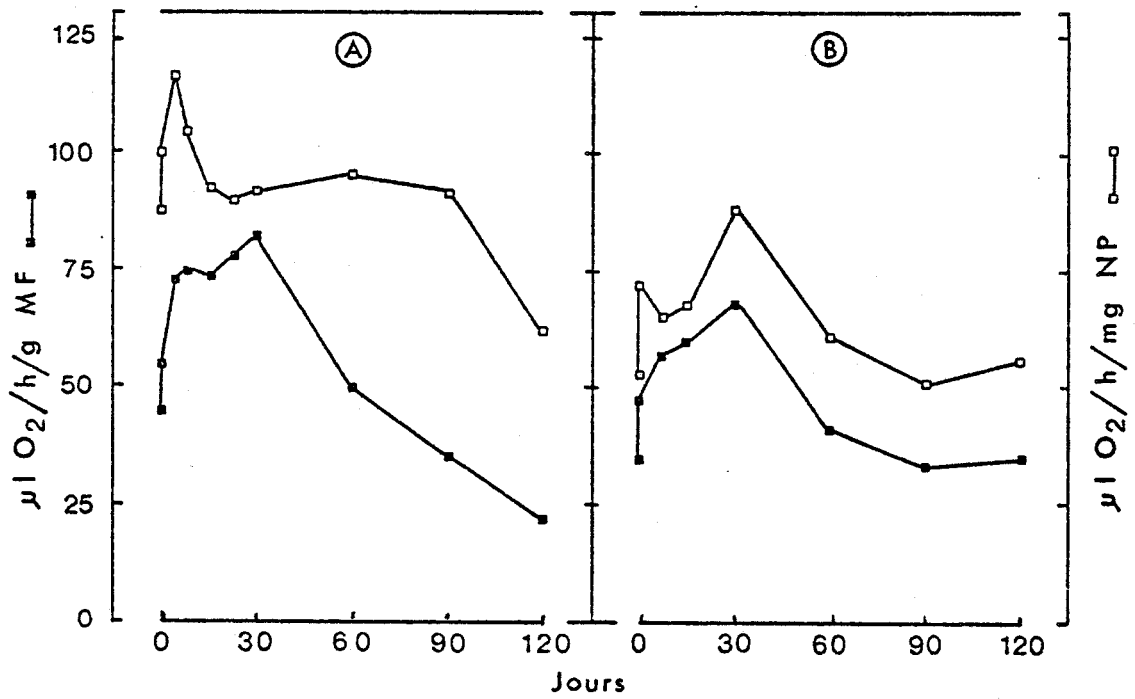


Figure 10

BUS
LILLE

b - Colonies caroténogènes

Leur développement diffère de celui des colonies chlorophylliennes par les trois points suivants :

- un taux de croissance moins élevé (Fig. 9, B) ;
- une amplitude plus faible des variations de la teneur en N P (Tableau XXIV)
- une évolution différente de l'intensité respiratoire (Fig. 10, B).

Deux périodes seulement se succèdent au cours des 4 mois pendant lesquels nous avons poursuivi notre étude :

- une période de croissance rapide de 60 jours pendant laquelle les temps de doublement du poids de M F, de M S et des protéines (N P) sont respectivement de 22, 24 et 30 jours. La protéogenèse est active au cours de la première semaine. Il en résulte une augmentation des échanges respiratoires ; toutefois l'IRNP diminue. Durant la deuxième semaine la synthèse des protéines se poursuit plus lentement et le pourcentage de M S passe par une valeur maximale. L'IRMF et l'IRNP s'élèvent progressivement jusqu'au 30ème jour, puis diminuent.

- une période de croissance ralentie, entre le 60 et le 120ème jour. La biomasse estimée en poids de M F augmente encore, mais plus lentement qu'au cours de la période précédente. La teneur en N P et le pourcentage de M S varient peu, si bien que les courbes de croissance sont parallèles (Fig. 9, B). L'intensité respiratoire demeure à peu près constante.

Etant donné le faible taux de croissance et la quantité importante de substrats dont elles disposent (le milieu renferme 50 g.l^{-1} de glucose), les colonies caroténogènes n'atteignent pas la phase de sénescence, avant le 120ème jour de culture.

2 - Auxine endogène et activité auxine-oxydasique

Les analyses d'auxine endogène et d'auxine-oxydases ont été faite au laboratoire de Mr le Pr PILET, sur des colonies de la souche chlorophyllienne cultivées sur milieu standard (contenant $5 \cdot 10^{-8} \text{ g.ml}^{-1}$ de AIA) et entretenues dans les conditions de lumière et de températures propres à la chambre de culture de ce laboratoire (PILET et DUBOIS, 1968,b).

La teneur en auxine endogène reste à peu près constante durant la première semaine puis s'élève rapidement du 7ème au 18ème jour ; la valeur optimale étant obtenue vers le 15ème jour. Ensuite, la concentration en auxine baisse, d'abord rapidement (du 18ème au 24ème jour), puis plus lentement jusqu'au 90ème jour (Fig. 11).

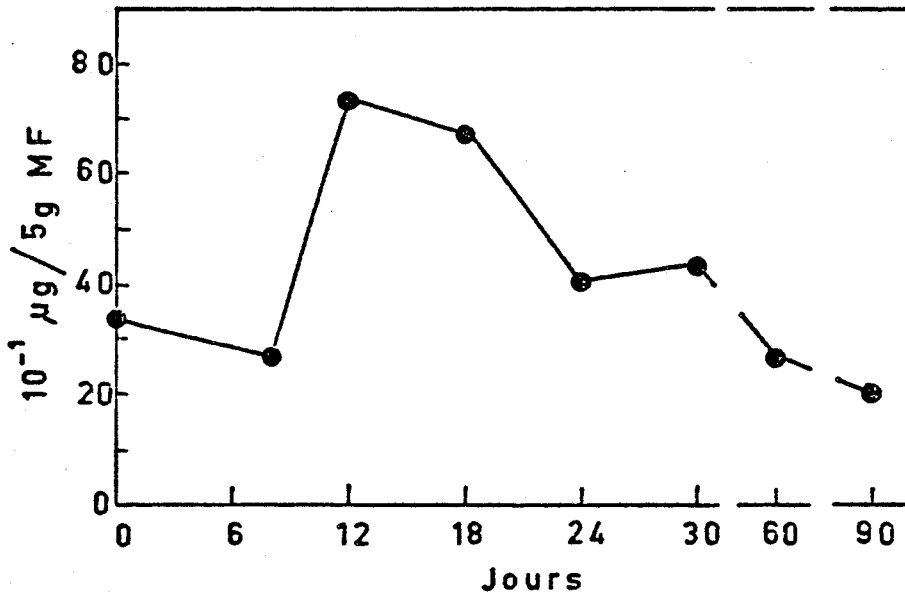


Figure 11 : Teneur en auxine endogène des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte cultivés in vitro. La concentration en auxine est donnée en $\mu\text{g} \times 10^{-1}$ pour 5 g de matière fraîche (M F)

Les valeurs mesurées sont comparables à celles obtenus par KULESCHA (1951) pour d'autres tissus végétaux cultivés in vitro, notamment pour les néoformations qui se développent sur des fragments de racine de Carotte.

Les valeurs des activités auxine-oxydasiques, reportées dans la Figure 12 autorisent les remarques suivantes :

- jusqu'au 18ème jour l'activité auxine-oxydasique, relativement faible, reste constante ;
- à partir du 18ème jour l'activité de ces enzymes augmente, d'abord relativement peu, puis beaucoup plus après le 25ème jour ;
- l'activité des auxine-oxydases atteint une valeur maximale vers le 60ème jour et semble ensuite demeurer constante.

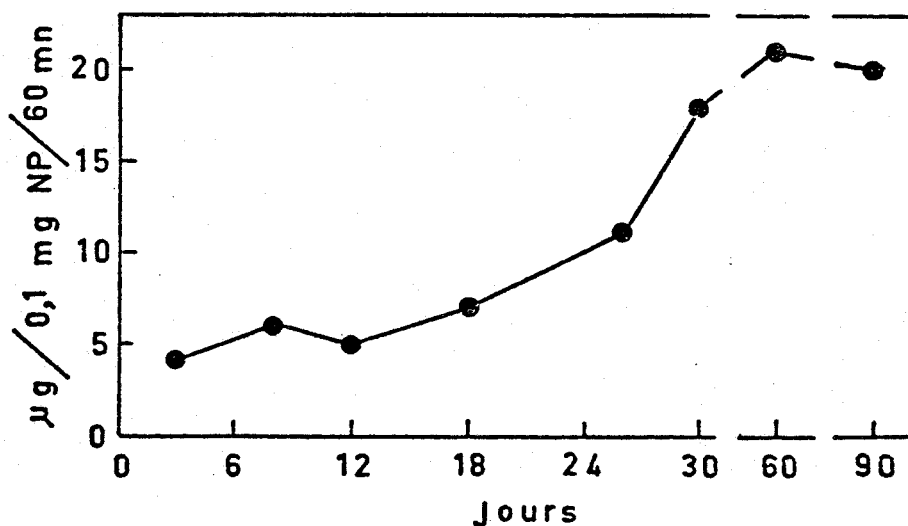


Figure 12 : Activité auxine-oxydasique de tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte cultivés in vitro. L'activité enzymatique est exprimée en µg de AIA détruit pour 0,1 mg d'azote protéique (N P) et pour une incubation de 60 mn.

Ces résultats permettent de confirmer des observations antérieures, relatives aux rapports entre l'auxine-endogène et l'activité auxine-oxydasique (RAY, 1958 ; HARE, 1964 ; et PILET et GASPARD, 1968). Nous avons en effet constaté que - dans des néoformations jeunes (10 à 20 jours) - le taux en auxine est élevé, alors que l'activité auxine-oxydasique, pour des tissus comparables, est faible. Réciproquement, dans des tissus cultivés depuis plus de 70 jours, la concentration en auxine endogène a notablement baissé, alors que l'activité auxine-oxydasique a considérablement augmenté. Une situation en tout point comparable a été mise en évidence pour des plantules de Pisum

(GALSTON et DALBERG, 1954 ; GALSTON, 1956), des racines de Lens (PILET, 1957), des tiges de Vitis (LAMPSIDIS, 1961) et de Phaseolus (COLLET, 1962). Le taux en auxine est donc bien conditionné par l'activité auxine-oxydasique.

B - VARIATIONS DES -SH SOLUBLES

1 - Teneur en -SH

Les -SH acidosolubles sont dosés dans des cultures de 0 à 120 jours. Nous examinerons successivement les valeurs exprimées par rapport au poids de M F et de M S et par rapport à la teneur en N P des tissus (Fig. 13).

a - Colonies chlorophylliennes

-SH rapportés à l'unité de M F : la teneur en -SH augmente progressivement pendant les deux premières semaines. Elle paraît être maximale vers le 15ème jour, puis elle décroît. La diminution est très rapide du 15ème au 30ème jour, plus lente au cours des trois derniers mois.

-SH rapportés à l'unité de M S : le pourcentage de M S variant relativement peu au cours du cycle de croissance, la courbe obtenue est tout à fait comparable à la précédente.

-SH rapportés à la teneur en N P : le taux des composés sulfhydrilés solubles augmente au cours de la première semaine, reste à peu près stationnaire pendant la seconde et décroît ensuite rapidement pour atteindre une valeur minimale le 30ème jour. La baisse rapide du taux des -SH est provoquée par la concentration élevée des protéines au cours de la période correspondante. Du 30ème au 90ème jour, la teneur en -SH augmente, puis elle diminue de nouveau au cours du quatrième mois. Ces variations, d'ailleurs très faibles, sont dues au ralentissement de la protéogénèse, beaucoup plus marqué pendant les deuxième et troisième mois de culture, qu'au cours du quatrième (DUBOIS et DUJARDIN, 1968).

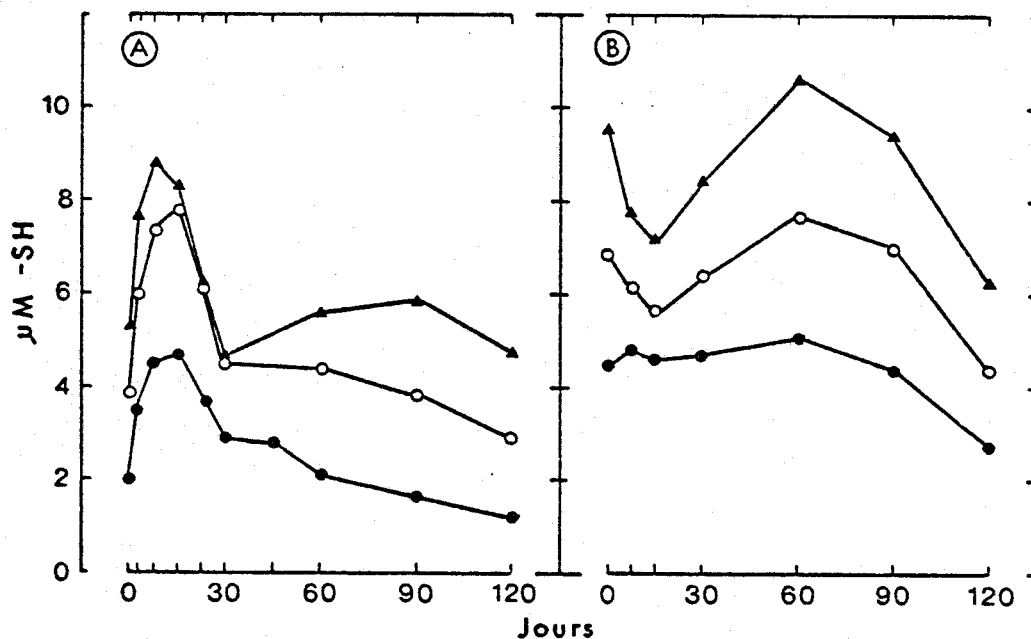


Figure 13 : Evolution de la teneur en composés sulfhydrylés solubles au cours de la croissance des tissus des souches chlorophyllienne (A) et caroténogène (B) de Carotte cultivées in vitro.

Les teneurs en -SH sont exprimées :

- en $\mu\text{M} \times 10^{-1}$ de $\text{S} \cdot \text{g}^{-1}$ de M F ●—●
- μM de $\text{S} \cdot \text{g}^{-1}$ de M S ○—○
- μM de $\text{S} \cdot \text{mM}^{-1}$ de NP ▲—▲

b - Colonies caroténogènes

-SH rapportés à l'unité de M F :

La teneur en -SH varie peu jusqu'au 60ème jour, puis diminue régulièrement du 60ème au 120ème jour.

-SH rapportés à l'unité de M S et à la teneur en N P :

Les résultats sont différents quand on les exprime par rapport à ces critères. En effet, dans les deux cas, la concentration des -SH solubles diminue fortement pendant les 15 premiers jours. Elle augmente ensuite jusqu'à vers le 60ème jour, puis diminue à nouveau jusqu'au 120ème jour. La chute de la teneur en -SH constatée au début de la culture est provoquée par

l'augmentation plus rapide des matières sèches, en particulier des protéines que des composés sulfhydrilés. Par contre, du 15ème au 60ème jour, ces derniers sont synthétisés plus rapidement que les deux autres catégories de substances.

2 - variations relatives des taux de -SH

La concentration relative des composés thiols des colonies chlorophylliennes varie beaucoup plus que celle des colonies caroténogènes (Tableau XXV).

AGE DES CULTURES (jours)	SOUCHE CHLOROPHYLLIENNE		SOUCHE CAROTENOGENE	
	Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité
2	+ 75	+ 60	-	-
7	+ 125	+ 160	+ 7	- 4
15	+ 135	+ 120	+ 2	- 16
21	+ 95	+ 58	-	-
30	+ 45	+ 75	+ 4	- 11
45	+ 25	+ 50	-	-
60	+ 5	+ 30	+ 24	+ 7
90	- 20	+ 20	- 2	0
120	- 40	+ 5	- 38	- 42
180	-	- 21	-	-

TABLEAU XXV : Variations relatives de la teneur en composés sulfhydrilés solubles dans les colonies des souches chlorophyllienne et caroténogène de Carotte.

+ augmentation par rapport au fragment repiqué
 - diminution " " " " " "

$$\text{valeur relative} : \frac{V_t - V_0}{V_0} \cdot 10^2$$

V_t : valeur en nm.g^{-1} de M F, au temps t ,

V_0 : valeur en nm.g^{-1} de M F, au moment de la mise en culture.

Dans les premières, on note surtout une très forte augmentation des -SH en début de culture (+ 135 %, le 15ème jour). Dans les secondes, l'augmentation maximale (+ 24 %) n'est atteinte qu'au 60ème jour. Après quatre mois de culture, les variations relatives sont identiques, pour les deux souches considérées ($41 \pm 1\%$ de la teneur initiale).

3 - Evolution du rapport -SH/-SH + S - S

Dans les colonies chlorophylliennes, le pourcentage de composés réduits augmente rapidement pendant 48 h, puis diminue jusqu'au 120ème jour de culture. On remarque que c'est entre le 60ème et le 90ème jour que la diminution de ce rapport est la plus rapide, de 80,8 % à 64,6 % (Tableau XXVI). Dans les colonies caroténogènes, le pourcentage de -SH varie peu ; il demeure élevé pendant toute la durée de l'expérience ($84,9 \pm 4,4\%$).

		AGE DES CULTURES (Jours)										
		0	2	7	15	21	30	45	60	90	120	
$\frac{-SH}{-SH + S-S} \%$	CHL	L	74,6	92,2	85,5	87,5	82,2	76,3	79,3	80,8	64,6	63,2
		O	74,6	-	86,6	85,4	-	77,7	-	82,2	80,9	77,7
	CAR	L	84,3	-	80,5	83,6	-	86,1	-	86,4	88,0	84,8
		O	84,3	-	82,5	79,6	-	79,0	-	85,7	79,1	80,5

TABLEAU XXVI : Evolution du rapport -SH/-SH + S - S au cours de la croissance des souches chlorophyllienne (CHL) et caroténogène (CAR) de Carotte, à la lumière (L) et à l'obscurité (O).

C - CONCLUSION

La croissance des colonies chlorophylliennes comporte trois périodes successives :

- pendant le premier mois, le taux de croissance est élevé et varie très peu. Par contre, la teneur en -SH augmente rapidement au cours des 15 premiers jours, puis diminue aussi vite du 15ème au 30ème jour ;

- au cours du deuxième mois, le taux de croissance est peu différent et la teneur en -SH varie selon le critère de référence utilisé ;

- du 60ème au 120ème jour, la croissance est fortement ralentie et la teneur en -SH diminue plus ou moins régulièrement suivant le critère de référence retenu.

En quatre mois de culture, la croissance des colonies caroténogènes ne comporte que deux phases de 60 jours chacune :

- au cours de la première, le taux de croissance demeure relativement constant. La teneur en -SH, rapportée à l'unité de M S ou de protéines, diminue pendant les 15 premiers jours puis augmente ; elle varie peu si on la rapporte à l'unité de M F ;

- au cours de la seconde, le taux de croissance est constant, mais beaucoup plus faible. La teneur en -SH diminue, quel que soit le critère de référence utilisé.

De cette première série de résultats, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de rapport direct entre le taux de croissance et la teneur en -SH solubles des colonies tissulaires de Carotte :

- pendant la période de croissance active, les variations de la teneur en -SH et celles du taux de croissance ne sont pas parallèles ;

- la teneur en -SH est du même ordre dans les deux types de tissus de Carotte, alors que les colonies chlorophylliennes prolifèrent deux fois plus vite que celles de la souche caroténogène.

Il y a par contre une relation entre le pourcentage des formes réduites et la croissance :

- le rapport thiols réduits / thiols totaux est élevé jusqu'au 60ème jour de culture dans les colonies chlorophylliennes, puis il diminue rapidement ;

- dans les tissus caroténogènes, le pourcentage de -SH ne diminue pas avant le 120ème jour.

Dans les deux souches, le rapport $-SH / -SH + S-S$ demeure donc élevé tant que la croissance se poursuit.

Considérons maintenant les variations des $-SH$ solubles (Fig. 13,.A), celles de l'auxine endogène (Fig. 11) et de l'activité auxine-oxydasique (Fig. 12) au cours de la croissance des colonies de la souche chlorophyllienne. Trois points méritent d'être soulignés :

- au 15ème jour, la teneur en auxine est maximale, comme celle des $-SH$, alors que l'activité auxine-oxydasique est faible ;

- en vieillissant, les tissus s'appauvrissent parallèlement en auxine et en $-SH$, tandis que leur activité auxine-oxydasique augmente ;

- au 90ème jour, l'activité des auxine-oxydases est forte ; par contre les teneurs en auxine et en radicaux $-SH$ sont les plus faibles. Il résulte de ce qui précède, que la période pendant laquelle la croissance est exponentielle comporte en fait deux phases distinctes. Au cours de la première, qui dure environ 15 jours, les teneurs en $-SH$ et en auxine endogène augmentent et l'activité des auxine-oxydases reste constante. Au cours de la seconde, les teneurs en $-SH$ et en auxine diminuent tandis que l'activité auxine-oxydasique s'élève.

Un tissu riche en auxine l'est donc également en groupes sulfhydrilés, et réciproquement. Des faits analogues ont déjà été relevés, notamment dans des cultures primaires de Carotte où les néoformations contiennent à la fois plus de AIA endogène (KULESCHA, 1951 ; PILET, 1967 ; PILET et FRAGATA, 1963) et davantage de composés sulfhydrilés et où la diminution simultanée de l'auxine et des radicaux $-SH$ s'observe lorsque la culture se prolonge. Dans les racines du Lens (PILET, 1957 ; PILET et ZRYD, 1965), les variations de la teneur en auxine -elle même conditionnée par l'activité des auxine-oxydases (PILET, 1951)- coïncident aussi avec celles des composés thiols.

CHAPITRE 6 : EFFETS DE LA LUMIERE SUR LA PROLIFERATION DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR L'EVOLUTION DES COMPOSES SULFHYDRILES

A - FRAGMENTS DE RACINE CULTIVES IN VITRO

Les fragments de racine ont été cultivés en position inverse sur le milieu de base dépourvu de phytohormones, à la lumière (lumière du jour + appoint photopériodique, 12 : 12 et à l'obscurité.

A la lumière, la croissance du cal est un peu plus rapide et les tissus néoformés sont chlorophylliens. Leur teneur en azote est plus élevée, surtout après 6 semaines de culture (PILET et DUBOIS, 1968 a). Etant donné les variations individuelles et les différences enregistrées selon l'origine des racines, les effets de la durée journalière et de l'intensité de l'éclairement n'ont pu être précisés. Signalons toutefois que les tissus néoformés et préexistants situés hors du milieu synthétisent souvent des anthocyanes lorsque l'intensité de l'éclairement atteint ou dépasse 3 000 lux. Dans ces conditions, la croissance du cal est généralement réduite.

Nous avons déterminé la teneur en -SH solubles après 3, 6 et 11 semaines de culture dans les cals et dans les zones racinaires et foliaires de 2 lots de fragments : le premier éclairé 12 h par jour, le second placé à la même température à l'obscurité. Quel que soit le critère de référence adopté, la teneur en -SH dans les cals est plus élevée lorsque les cultures sont à l'obscurité. Il en est de même dans les parties racinaires des fragments, mais les différences sont moins marquées. Dans les zones foliaires, les teneurs en -SH sont trop faibles pour que les différences enregistrées puissent être prises en considération (Fig. 14).

Les cals qui se développent sur les fragments éclairés sont tous fortement chlorophylliens. Par contre, les cultures placées à l'obscurité sont hétérogènes. Certains cals, de couleur orange, sont riches en pigments caroténoïdes ; d'autres, blanc-jaunâtre, en contiennent beaucoup moins et renferment surtout des xanthophylles. Ils sont généralement portés par des fragments de racine différents, mais on peut également les rencontrer sur le même explantat.

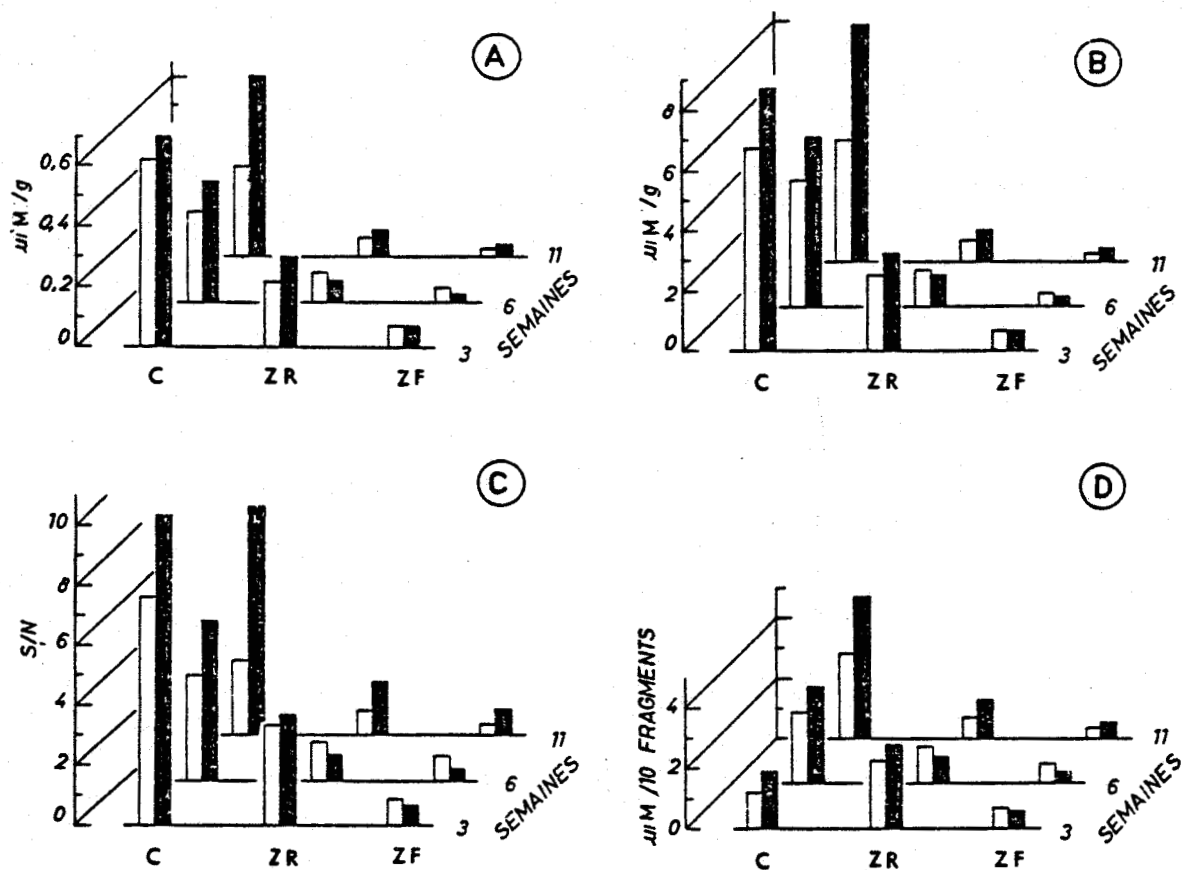


Figure 14 : Variations de la teneur en -SH solubles dans des fragments de racine de Carotte cultivés in vitro à la lumière (□) et à l'obscurité (■) pendant 3, 6 et 11 semaines.

- A : les valeurs des -SH sont exprimées en $\mu\text{M.g}^{-1}$ de M F ;
- B : " " " " " " " $\mu\text{M.g}^{-1}$ de M S ;
- C : " " " " " " " $\mu\text{M.nM}^{-1}$ de N S ;
- D : " " " " " " " μM pour 10 fragments.

L'analyse des composés sulfhydrilés solubles effectuée dans ces 3 types de cals (Tableau XXVII) montre que :

- les cals orange, riches en pigments caroténoïdes, ont une teneur en radicaux -SH plus élevée que les cals chlorophylliens, après 3 semaines de culture. Par la suite, les valeurs s'équilibrent ;
- les néoformations jaunâtres, riches en xanthophylles, présentent les teneurs en -SH les plus élevées quel que soit l'âge des cultures. Les différences enregistrées ne sont pas dues à des modifications du rapport $\text{-SH} / \text{-SH} + \text{S-S}$ qui évolue de façon comparable dans les 3 types de cals.

NATURE DES PIGMENTS												
	CHLOROPHYLLES				CAROTENOIDES				XANTHOPHYLLES			
AGE DES CULTURES (semaines)	3	6	11	18	3	6	11	18	3	6	11	18
TENEUR EN -SH ($\text{nM}\cdot\text{g}^{-1}\text{M F}$)	650	530	380	280	720	510	410	260	880	730	710	380
$\frac{-\text{SH}}{-\text{SH} + \text{S-S}} \cdot 100$	79	68	70	65	70	73	64	62	74	72	68	69

TABLEAU XXVII : Etat des composés sulphydrilés solubles dans les 3 types de cals obtenus sur des fragments de racine de Carotte cultivés à la lumière (blanche) et à l'obscurité.

Les radiations relativement monochromatiques affectent peu la prolifération, mais elles interviennent de façon très nette sur la biosynthèse des pigments plastidaux. Celle des chlorophylles est plus active en lumière bleue qu'en lumière verte. Elle est très faible si les cultures ne reçoivent que des radiations rouge clair. A l'obscurité, les néoformations sont complètement dépourvues de chlorophylle (Tableau (XXVIII)).

CONDITIONS D'ECLAIREMENT	CROISSANCE (mg M F/culture)	CHLOROPHYLLES	-SH ($\text{nM}\cdot\text{g}^{-1}\text{M F}$)
Lumière blanche	601	++++	500
Radiations bleues	411	+++	480
" vertes	504	++	560
" rouges	415	+	760
Obscurité	231	0	700

TABLEAU XXVIII : Effets de la longueur d'onde sur la croissance, la teneur en chlorophylle et la teneur en -SH solubles des cals.

Les analyses sont effectuées après 6 semaines de culture ;
 Les caractéristiques des éclairagements monochromatiques sont données dans la Fig. 1 ;
 Les énergies utilisées sont d'environ $1000 \text{ ergs cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
 pour le bleu ; $1500 \text{ ergs}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pour le vert et $1750 \text{ ergs}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pour le rouge.

La teneur en -SH est plus élevée dans les cals qui se développent sur des explantats maintenus à l'obscurité ou en lumière rouge clair. Elle est plus faible lorsque les cultures sont soumises aux radiations vertes ou bleues et lorsqu'elles sont éclairées par la lumière blanche (Tableau XXVIII).

Il semble donc exister une relation entre la nature des pigments plastidaux -qui varient eux-mêmes en fonction de la nature de l'éclairement- et la teneur en radicaux -SH. Les recherches sur ce sujet sont peu nombreuses et les résultats obtenus par BRUNEL-CAPELLE (1955) sur des feuilles panachées et achlorophylliennes de Acer negundo, Evonymus europaeus, Spiraea Bumalda et Pelargonium zonale sont contradictoires et difficiles à interpréter car l'activité des -SH varie en fonction des espèces et du stade de végétation.

B - COLONIES TISSULAIRES

Avant d'étudier les effets de la lumière sur la croissance et sur la teneur en -SH des tissus de Carotte cultivés in vitro, il nous a semblé utile de faire le point sur la nature et l'ultrastructure des plastes qu'ils renferment dans les conditions standard de culture (lumière du jour + lumière d'appoint (environ 1000 lux), 12 : 12 et température de $21 \pm 1^\circ\text{C}$).

1 - Ultrastructure des plastes des 3 souches de Carotte

Les observations ont été pratiquées sur des échantillons prélevés dans les parties les plus colorées de colonies tissulaires âgées de 30 jours (souche chlorophyllienne) ou de 60 jours (souche caroténogène). Les échantillons de la souche étiolée sont prélevés environ 1 mm sous la surface, dans des colonies de 30 jours.

a - Souche chlorophyllienne

Les chloroplastes, généralement ovoïdes (Pl. III, Fig. 1 et 2) mais parfois très allongés (Pl. III, Fig. 1 et 3) ou de forme très irrégulière (Pl. III, Fig. 5) sont localisés dans une mince couche de cytoplasme pariétal ou dans les échancrures des noyaux qui sont souvent lobés. Dans les conditions d'éclairement précisées ci-dessus, ils ne présentent pas la structure des plastes que l'on rencontre généralement dans les feuilles des plantes entières. Le stroma ne renferme

pas de granums typiques, mais des thylacoïdes très allongés, isolés ou groupés en faisceaux comme chez certaines Algues (Pl. III, Fig. 1, 2 et 3). Les globules lipidiques (= plastoglobules) et les grains d'amidon sont rares et de petite taille. Dans une coupe ultrafine et à fortiori dans une même colonie tissulaire, il n'existe pas un seul type de chloroplaste, mais toute une série de plastes chlorophylliens à différents états de maturation ou de dégénérescence. Le stroma plus ou moins granuleux des chloroplastes parvenus à maturité est occupé par de longs thylacoïdes disposés en un ou plusieurs faisceaux étroitement accolés (Pl. III, Fig. 1) ou s'écartant de part et d'autre d'une vésicule amyloïde (Pl. III, Fig. 3). La dégénérescence de ces plastes se traduit par le gonflement des thylacoïdes, puis par leur transformation progressive en vésicules à contenu clair (Pl. III, Fig. 1 et 2) ; ce qui provoque la désorganisation puis la disparition de tout le système lamellaire (Pl. III, Fig. 4 et 5). Dans ces cultures in vitro, la dégénérescence des chloroplastes ne s'accompagne pas d'une augmentation de la taille et du nombre des globules lipidiques, comme on le voit dans les feuilles des plantes entières.

b - Souche caroténogène

Dans les conditions d'éclairage précédemment rappelées, les cellules de la souche caroténogène ont une structure comparable à celles de la souche chlorophyllienne, sauf en ce qui concerne les plastes. Elles ne renferment pas de chloroplastes. Les chromoplastes, bien visibles en microscopie photonique, sont peu nombreux car beaucoup de sections ultrafines n'en renferment pas (Pl. IV, Fig. 1). Dans des colonies de 60 jours, qui sont en phase de croissance active, on rencontre deux types de chromoplastes. Les plus nombreux, de forme oblongue (environ $2 \times 3 \mu$), présentent dans un stroma abondant et plus ou moins granuleux deux sortes d'inclusions (Pl. IV, Fig. 4, 5 et 6). Les unes, globulaires et généralement fortement contrastées après coloration à l'acide osmique correspondent à des globules lipidiques ; les autres, très allongées et parfois en contact étroit avec l'enveloppe plastidale (Pl. IV, Fig. 6) ressemblent aux structures semi-cristallines décrites par LAVAL-MARTIN (1974) dans la "pulpe" de Lycopersicum esculentum, pendant la phase de maturation du fruit. Leur aspect, en contraste positif, est toutefois assez comparable aux structures lipido-protéiques fibrillaires que l'on rencontre dans les chromoplastes de Capsicum annum (FREY-WYSSLING et KREUTZER, 1958 ; SPURR et HARRIS, 1968), à la différence près que les plastes des colonies tissulaires de Carotte n'en renferment qu'un très petit nombre, alors que ceux du fruit de Piment en sont remplis.

D'autres chromoplastes, fusiformes, ($3 \times 1 \mu\text{m}$ environ), renferment de nombreuses membranes osmiophiles enroulées plus ou moins régulièrement autour de vésicules amylofères disposées dans la partie centrale du plaste (Pl. IV, Fig. 2 et 3). Nous pensons pouvoir rapporter ces chromoplastes au "type membranaire" très rarement observé, puisqu'il n'a été décrit que dans la couronne de la fleur de Narcissus pseudo-narcissus (LIEDVOGEL, SITTE et FALK, 1976). Il existe cependant quelques différences de structure entre les chromoplastes de la souche caroténogène de Carotte et ceux du Narcissus. Chez ces derniers, la partie centrale du plaste est remplie de matériel stromatique parcourue par quelques membranes tubulaires alors que dans les plastes des tissus isolés de Carotte le stroma est très réduit et contient fréquemment des grains d'amidon.

c - Souche étiolée

On rencontre deux types de plastes dans les cellules des colonies étiolées maintenues à l'obscurité : des proplastes et des leucoplastes. Les premiers sont très nombreux et parfois difficiles à distinguer des mitochondries toujours peu structurées. Ils s'en distinguent par une taille supérieure (environ $1 \times 0,5 \mu\text{m}$), par un stroma plus clair et par la présence de globules lipidiques, parfois très nombreux (Pl. V, Fig. 3 et 5). Les leucoplastes, deux à trois fois plus grands que les proplastes, sont dépourvus de thylacoïdes et renferment souvent plusieurs petits grains d'amidon (Pl. V, Fig. 3 et 6).

Bien qu'ils soient cultivés à l'obscurité, ces tissus ne renferment pas de structures comparables aux corps prolamellaires qui caractérisent les étioplastes. Ces derniers se différencient dans le mésophylle de nombreuses plantules se développant à l'obscurité et également dans les jeunes feuilles qui apparaissent sur certaines cultures de Tabac maintenues à l'abri de la lumière. (LAETSCH et STETLER, 1967). Dans ces tissus on rencontre souvent des vésicules limitées par une membrane unitaire et contenant un volumineux cristal protéique. Nous pensons qu'il s'agit de peroxyosomes ; ils sont plus rares dans les tissus des colonies des souches chlorophyllienne et caroténogène cultivées à la lumière. (Pl. V, Fig. 4 et 7).

2 - Effets de la lumière sur la croissance et sur la teneur en -SH solubles

a - Expériences préliminaires

Nous avons comparé la croissance de colonies chlorophylliennes et

caroténogènes exposées à la lumière ou maintenues à l'obscurité. Les résultats rapportés dans le tableau XXIX sont les moyennes de plusieurs séries d'essais au cours desquels les cultures éclairées ont reçu en plus de la lumière du jour un éclairage d'environ 1000 lux, fourni 12h/24 par des tubes fluorescents.

Dans ces conditions, la lumière favorise la croissance des colonies de la souche chlorophyllienne. Quel que soit le stade de leur développement, la biomasse des cultures exprimée en poids de M F, de M S ou de protéines (N P) est supérieure à celle des cultures placées à l'obscurité. Parallèlement à la réduction de la croissance, on note chez ces dernières une importante diminution de la teneur en chlorophylle totale ; toutefois après un passage de 4 mois à l'obscurité, les tissus ne sont pas totalement étiolés.

CROISSANCE			AGE DES CULTURES (Jours)						
			2	7	15	30	60	90	120
SOUCHE CHLOROPHYLLIENNE	M F (mg/colonie)	L	15	75	190	600	3440	5300	6150
		O	0	60	120	390	1050	2100	2650
	M S (mg/colonie)	L	2,4	6,8	13,4	40,0	162,6	220,6	254,4
		O	0	6,0	8,8	24,9	57,1	92,1	123,6
	N P (mg/colonie)	L	0,03	0,10	0,21	0,62	1,80	2,00	2,22
		O	0	0,08	0,15	0,32	0,60	0,90	1,26
SOUCHE CAROTENOGENE	M F (mg/colonie)	L	-	20	60	320	1050	1830	3100
		O	-	30	55	210	1300	2080	3730
	M S (mg/colonie)	L	-	5,4	10,0	25,9	69,9	114,0	195,3
		O	-	4,7	10,5	20,2	92,9	133,2	231,1
	N P (mg/colonie)	L	-	0,08	0,12	0,28	0,71	1,20	1,93
		O	-	0,07	0,11	0,19	0,89	0,95	1,91

TABLEAU XXIX : Croissance des colonies tissulaires des souches chlorophyllienne et caroténogène de Carotte cultivées in vitro à la lumière (L) et à l'obscurité (O).

L : lumière du jour + lumière d'appoint (environ 1000 lux), 12 : 12

D'une façon générale, l'évolution des composés sulfhydrylés en fonction de l'âge des cultures est comparable à la lumière et à l'obscurité (Tabl. XXX). La teneur en -SH rapportée à l'unité de M F est supérieure dans les tissus placés à l'obscurité dès le 7ème jour de culture et les différences s'accroissent progressivement. Le pourcentage de formes réduites, d'abord semblable dans les tissus éclairés ou non, est également plus élevé dans les cultures maintenues à l'obscurité pendant 90 et 120 jours.

La lumière réduit la prolifération des colonies caroténogènes et stimule la synthèse des pigments caroténoïdes (Tabl. XXIX). La teneur en -SH est plus élevée à la lumière jusqu'au 60ème jour de culture. Ensuite les valeurs sont identiques, que les tissus soient éclairés ou non. Le rapport -SH/-SH + S-S varie peu au cours de la croissance ; il ne semble pas modifié par la lumière (Tableau XXX).

COMPOSES THIOLS		AGE DES CULTURES (Jours)						
		0	7	15	30	60	90	120
SOUCHE CHLOROPHYLLIENNE	$\frac{-SH}{(nM \cdot g^{-1} M F)}$ { L O	200 200	450 520	470 440	290 350	210 260	160 240	120 210
	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 100$ { L O	74,6 74,6	85,5 86,6	82,4 85,4	76,3 77,7	80,8 82,2	64,6 80,9	63,2 77,7
SOUCHE CAROTENOGENE	$\frac{-SH}{(nM \cdot g^{-1} M F)}$ { L O	450 450	480 430	460 380	470 400	510 480	440 450	280 280
	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 100$ { L O	84,3 84,3	80,5 82,5	83,6 79,6	86,1 79,0	86,4 85,7	88,0 79,1	84,8 80,5

TABEAU XXX : Evolution des composés soufrés acidosolubles au cours de la croissance des colonies tissulaires des souches chlorophyllienne et caroténogène de Carotte cultivées in vitro à la lumière (L) et à l'obscurité (O).

L : lumière du jour + lumière d'appoint (environ 1000 lux),
12 : 12.

b - Durée d'éclairement

α - Souche chlorophyllienne

La croissance augmente avec la longueur de l'héméropériode. Les colonies tissulaires soumises à un éclairage continu prolifèrent environ deux fois plus vite que les tissus éclairés 12 h par jour et trois fois plus vite que ceux maintenus à l'obscurité (Fig. 15, A). Toutefois la croissance des colonies n'est pas proportionnelle à la durée journalière d'éclairement.

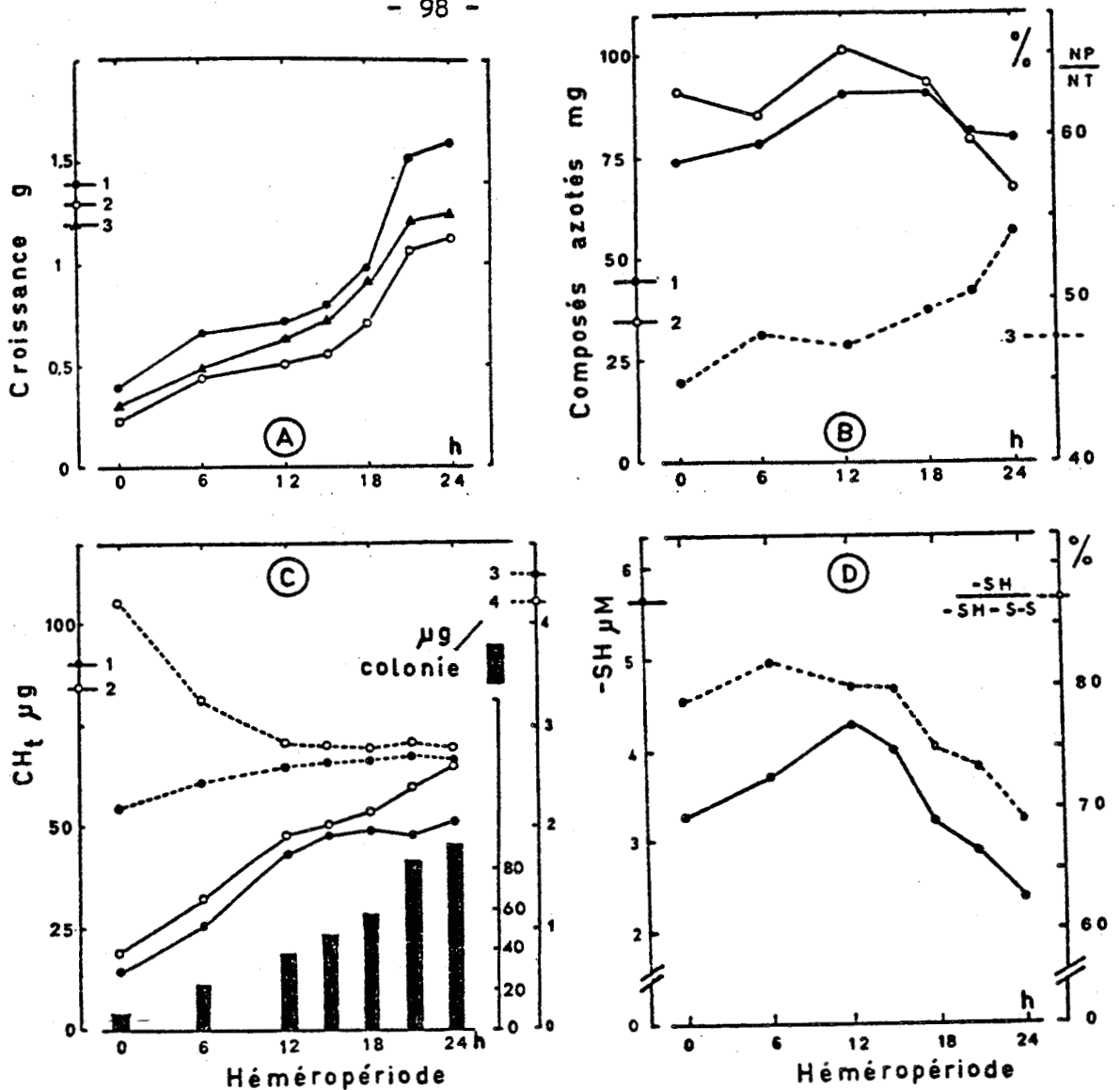


Figure 15 : Croissance des colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte en fonction de la durée journalière d'éclairciment.

A - variations de la biomasse,

1 : g M F / colonie,

2 : g x 10⁻¹ M S / colonie,

3 : g x 10⁻³ NP / colonie,

B - variations des composés azotés,

1 : teneur en azote protéique (mg / 100 g M F),

2 : teneur en azote soluble (mg / 100 g M F),

3 : azote protéique / azote total (% NP / NT),

C - variations des pigments plastidaux,

1 : teneur en chlorophylle totale (µg CH_t / g M F),

2 : teneur en chlorophylle totale (µg CH_t / mg NP),

3 : chlorophylle a / chlorophylle b,

4 : pigments caroténoïdes / CH_t x 10⁻¹,

■ : CH_t / colonie (µg),

D - variations de la teneur en -SH (µM x 10⁻¹ / g M F et du rapport -SH / -SH + S-S (%)).

Les analyses sont effectuées après 45 jours de culture.



La stimulation, qui est faible lorsque l'héméropériode passe de 6 à 12 h, devient importante lorsqu'elle passe de 15 à 21 h. Ces résultats confirment et complètent ceux de MAILLE (1971), mais diffèrent notablement de ceux obtenus par BÜNNING et WELTE (1954) pour une autre souche de Carotte. Ces auteurs signalent en effet que les jours longs (18 : $\bar{6}$ et 20 : $\bar{4}$) stimulent la croissance mais constatent en même temps une forte inhibition pour des héméropériodes de 14 et de 16 h.

La teneur en eau des tissus varie peu dans l'ensemble. Elle est un peu plus importante à l'obscurité et lorsque les tissus sont éclairés 6 h par jour ; mais cela ne change pas l'allure des courbes de croissance.

La durée de l'héméropériode modifie le métabolisme azoté. L'examen de la figure 15, B montre que la teneur en azote protéique augmente progressivement lorsque la durée d'éclairement passe de 0 à 18 h ; pour des colonies éclairées 21 ou 24 h, elle est sensiblement égale à celle des colonies maintenues à l'obscurité. La teneur en azote soluble est plus élevée dans les tissus éclairés 12 h par jour que dans ceux placés à l'obscurité ; pour des héméropériodes plus longues, les composés azotés solubles diminuent beaucoup. Le rapport NP / NT, qui traduit les variations de la protéogenèse, augmente en même temps que la durée de l'héméropériode.

BUS
LILLE

La quantité de chlorophylle totale synthétisée par colonie augmente avec la durée d'éclairement (Fig. 15, C) et malgré la forte stimulation de la croissance, la teneur en chlorophylle rapportée à l'unité de poids frais et d'azote protéique augmente également. Il n'existe aucune différence qualitative entre le spectre d'absorption des pigments des colonies cultivées en héméropériodes supérieures ou égales à 12 h. Par contre, une héméropériode de 6 h produit un déséquilibre pigmentaire qui se traduit par une faible diminution du rapport CH_a / CH_b et une forte augmentation du rapport caroténoïdes / chlorophylle totale. A l'obscurité, le déséquilibre des pigments est encore accru et la diminution du rapport CH_a / CH_b , en l'absence de synthèse de pigments chlorophylliens, signifie que la vitesse de dégradation des chlorophylles a et b est différente.

Pour déterminer si les tissus de Carotte sont sensibles au rythme photopériodique ou s'ils réagissent seulement à la durée globale d'éclairement, nous avons interrompu la période obscure par une heure de lumière blanche ou rouge clair, ou la période lumineuse par une heure d'obscurité.

Les résultats de ces essais (Fig. 16) montrent que ces interruptions sont peu efficaces. La croissance des colonies de la souche chlorophyllienne de Carotte dépend donc du nombre total d'heures de lumière reçues. Il en est de même de la teneur en chlorophylle.

ECLAIREMENT	CROISSANCE (mg M.F.)	CHLOROPHYLLE ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ M.F.)	-SH ($\text{nm}\cdot\text{g}^{-1}$ M.F.)
	650	24,1	330
	800	28,0	310
	730	27,2	300
RC 	1700	46,4	260
	1500	44,9	250

Figure 16 : Influence de l'interruption de la nyctipériode par une heure d'éclairement (lumière blanche ou rouge clair, RC) et de l'interruption de l'héméropériode par une heure d'obscurité sur la croissance des colonies de la souche chlorophyllienne de Carotte et sur la teneur en chlorophylle totale et en -SH solubles.

La teneur en -SH solubles augmente en même temps que la durée journalière d'éclairement entre 0 et 12 h, puis diminue progressivement au fur et à mesure que la durée de la période d'éclairement s'allonge. Le pourcentage thiols réduits est plus élevé en jours courts (environ 80 %) qu'en jours longs.

Pour des héméropériodes supérieures à 15 h, la baisse de la teneur en -SH correspond donc à une diminution du pourcentage des formes réduites. Par contre, entre 0 et 12 h par jour de lumière, l'augmentation de la teneur en -SH n'est pas due à une réduction des ponts disulfures, mais à une synthèse de composés sulfhydrilés solubles (Fig. 15, D).

Une interruption de la nyctipériode par une heure de lumière blanche ou rouge clair et, inversement, l'interruption de l'héméropériode par une heure d'obscurité ne modifie pas la teneur en -SH des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte (Fig. 16).

β - Souche caroténogène

La croissance des colonies caroténogènes diminue progressivement lorsque l'héméropériode passe de 6 à 24 h. Parallèlement, on note une baisse de la teneur en pigments caroténoïdes (Fig. 17, A). A l'obscurité, la croissance est importante et la teneur en pigments est faible. Une synthèse de carotènes relativement active se produit cependant au premier passage des tissus à l'obscurité, puisque des colonies âgées de 90 jours renferment en moyenne 20 μg de carotènes alors que les fragments de tissus mis en culture n'en contiennent que 5 μg .

Quelques colonies soumises à des héméropériodes de 18 h et la plupart de celles placées en lumière continue synthétisent un peu de chlorophylle. Sur certaines d'entre elles, on voit apparaître des nodules verts bien individualisés. Repiqués sur des milieux neufs, ils prolifèrent et donnent, après trois ou quatre passages, plusieurs types de colonies dont certaines sont chlorophylliennes. Or, le tissu caroténogène que nous avons utilisé a été isolé en 1951 à partir de la souche chlorophyllienne de GAUTHERET. L'action simultanée d'héméropériodes longues et d'un éclaircissement relativement fort (égal ou supérieur à 2500 lux) permet donc à ce tissu de retrouver un aspect voisin de celui de la souche d'origine. Toutefois, la dédifférenciation du tissu caroténogène n'est pas complète, car les colonies chlorophylliennes que nous obtenons renferment davantage de pigments caroténoïdes et ont une croissance moins rapide que celles de la souche initiale de GAUTHERET.

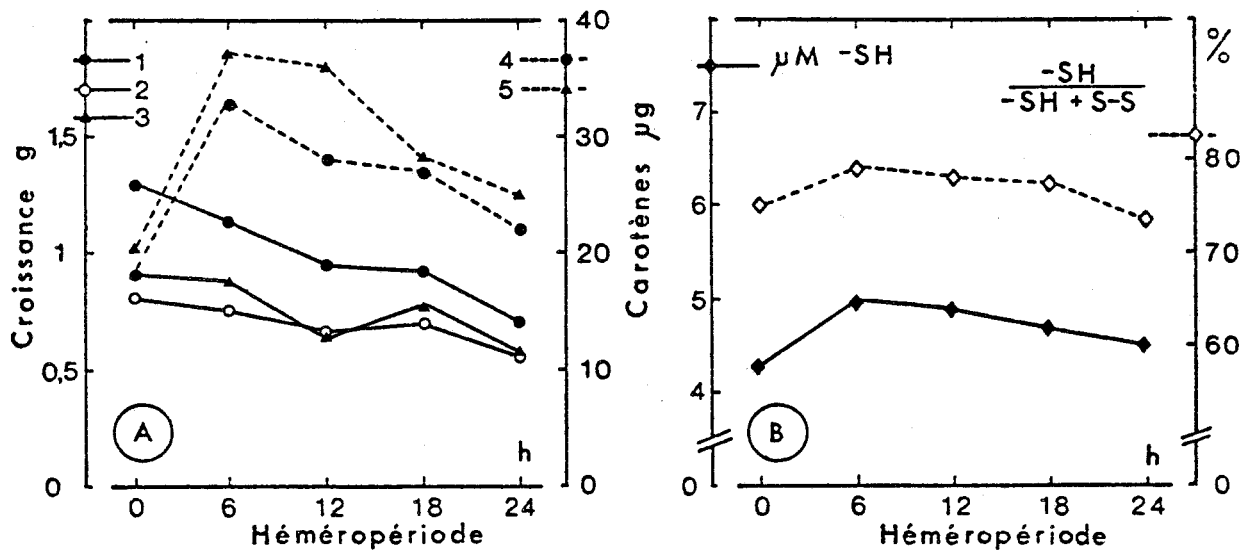


Figure 17 : Croissance des colonies tissulaires de la souche caroténogène de Carotte en fonction de la durée journalière d'éclairement

A - variation de la biomasse,

1 : g M F/colonie

2 : g x 10⁻¹ M S/colonie

3 : g x 10⁻³ NP/colonie

- variations des pigments caroténoïdes

4 : teneur en caroténoïdes (µg.g⁻¹ M F)

5 : " " " " (µg.mg⁻¹ NP)

B - variations de la teneur en -SH (µM x 10⁻¹/g M F) et du rapport -SH/-SH + S-S (%)

Les analyses sont effectuées après 90 jours de culture.

Quelle que soit la durée journalière d'éclairement, les teneurs en -S et les pourcentages de thiols réduits sont sensiblement les mêmes (Fig. 17, B). Remarquons que la teneur en -SH est toujours supérieure à celle que nous avons enregistrée dans les tissus de la souche chlorophyllienne et que les pourcentages de formes réduites sont du même ordre dans les deux souches.

λ - Souche étiolée

Lorsque la durée de la culture n'excède pas trois semaines, la croissance des colonies est peu sensible à la photopériode, mais la quantité de chlorophylle synthétisée est plus importante en jours longs. La teneur en chlorophylle totale, rapportée à 1g de M F, augmente donc en même temps que l'héméro-période. Entre la 3ème et la 6ème semaine, les colonies primitivement étiolées se comportent comme celles de la souche chlorophyllienne : la lumière favorise

simultanément la croissance et la synthèse pigmentaire. Après 45 jours, on constate que la croissance se poursuit quelle que soit l'héméropériode, alors que la teneur en chlorophylle baisse dans les colonies placées en lumière continue. Celles qui sont soumises à des héméropériodes plus courtes (6 : $\overline{18}$ et 12 : $\overline{12}$) ont une croissance moins rapide jusqu'à la 6ème semaine. Notons qu'elles ne présentent pas de signes de sénescence avant le 60ème jour de culture (Fig. 18, A).

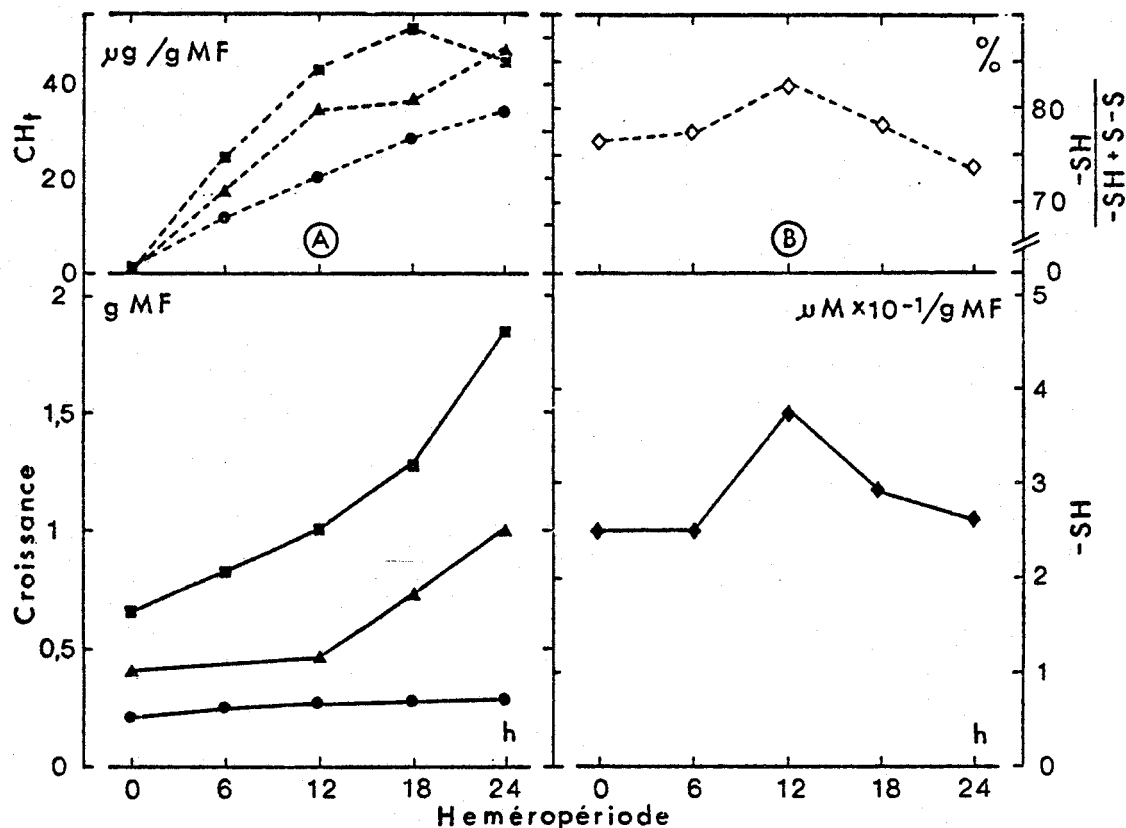


Figure 18 : Croissance des colonies tissulaires de la souche étioilée de Carotte en fonction de la durée journalière d'éclairage

A - variations de la biomasse (g M F/colonie) et de la teneur en chlorophylle totale (µg/g M F) après 3 (●—●; ●---●), 6 (▲—▲; ▲---▲) et 9 (■—■; ■---■) semaines de culture

B - variations de la teneur en -SH (µM x 10⁻¹/g M F) et du rapport -SH/-SH +S-S (%), après 6 semaines de culture.

Les tissus totalement dépourvus de chlorophylle, en synthétisent dès qu'on les éclaire à nouveau. Nous ne pouvons donc pas comparer comme nous le souhaitons, l'action de la lumière sur la croissance de deux souches de Carotte en tous points semblables, si ce n'est que l'une renferme de la chlorophylle et l'autre pas. Toutefois, au cours des trois premières semaines de culture où la

synthèse pigmentaire et la différenciation des chloroplastes (Pl. III, Fig. 5 et 6) sont peu importantes, la croissance des tissus de la souche étiolée est comparable à l'obscurité et en lumière périodique ou continue (Fig. 18, A).

Aucun des essais entrepris jusqu'à présent ne nous a permis d'obtenir un tissu étiolé qui le demeure lorsqu'il est exposé à nouveau à la lumière. Les antibiotiques se sont montrés inefficaces pour ce tissu de Carotte, alors que la streptomycine avait permis à BERTOSSI (1953) d'obtenir des tissus de Topinambou totalement dépourvus de chlorophylle. En remplaçant le glucose du milieu de culture par du fructose on n'empêche pas le verdissement des colonies étiochées, comme le signalait pourtant GORIS (1954) à propos d'autres tissus de Carotte. L'action simultanée de photopériodes courtes et de faibles teneurs en glucose dans le milieu (0,01 à 0,1 %) provoque une diminution importante de la teneur en chlorophylle, mais ne bloque pas totalement la synthèse des pigments plastidiaux.

La teneur en -SH solubles a été déterminée après 45 jours de culture aux différentes photopériodes. Les courbes rapportées dans la figure 18, B sont comparables à celles que nous avons obtenues pour les colonies de la souche chlorophyllienne (Fig. 15, D). Il est vrai qu'après avoir été soumises un mois et demi aux mêmes conditions d'éclairement, les colonies de la souche étiolée et celles de la souche chlorophyllienne sont fort peu différentes, notamment en ce qui concerne la teneur en pigments plastidiaux.

c - Intensité de l'éclairement

α - souche chlorophyllienne

En rapprochant plus ou moins les tubes de culture des sources de lumière, l'intensité de l'éclairement perçu au niveau des tubes varie de 500 à 6000 lux. Pour ces essais, nous avons choisi une photopériode 12 : $\overline{12}$ et placé un lot témoin à l'obscurité.

Quelle que soit l'intensité d'éclairement, la lumière favorise la croissance et stimule la synthèse de la chlorophylle. Après 45 jours de culture sous un éclairement de 6000 lux, la biomasse des tissus et la teneur en chlorophylle sont plus faibles qu'à 3000 lux, qui représente un optimum pour cette souche de Carotte (Fig. 19, A). La diminution de la teneur en chlorophylle n'est pas due à un vieillissement accéléré des cultures, car après 30 jours on constate déjà que la biomasse et la teneur en pigments sont plus faibles à 6000 lux qu'à 3000 (DUBOIS, 1973). Ces colonies tissulaires se comportent donc comme des plantes ombrophiles.

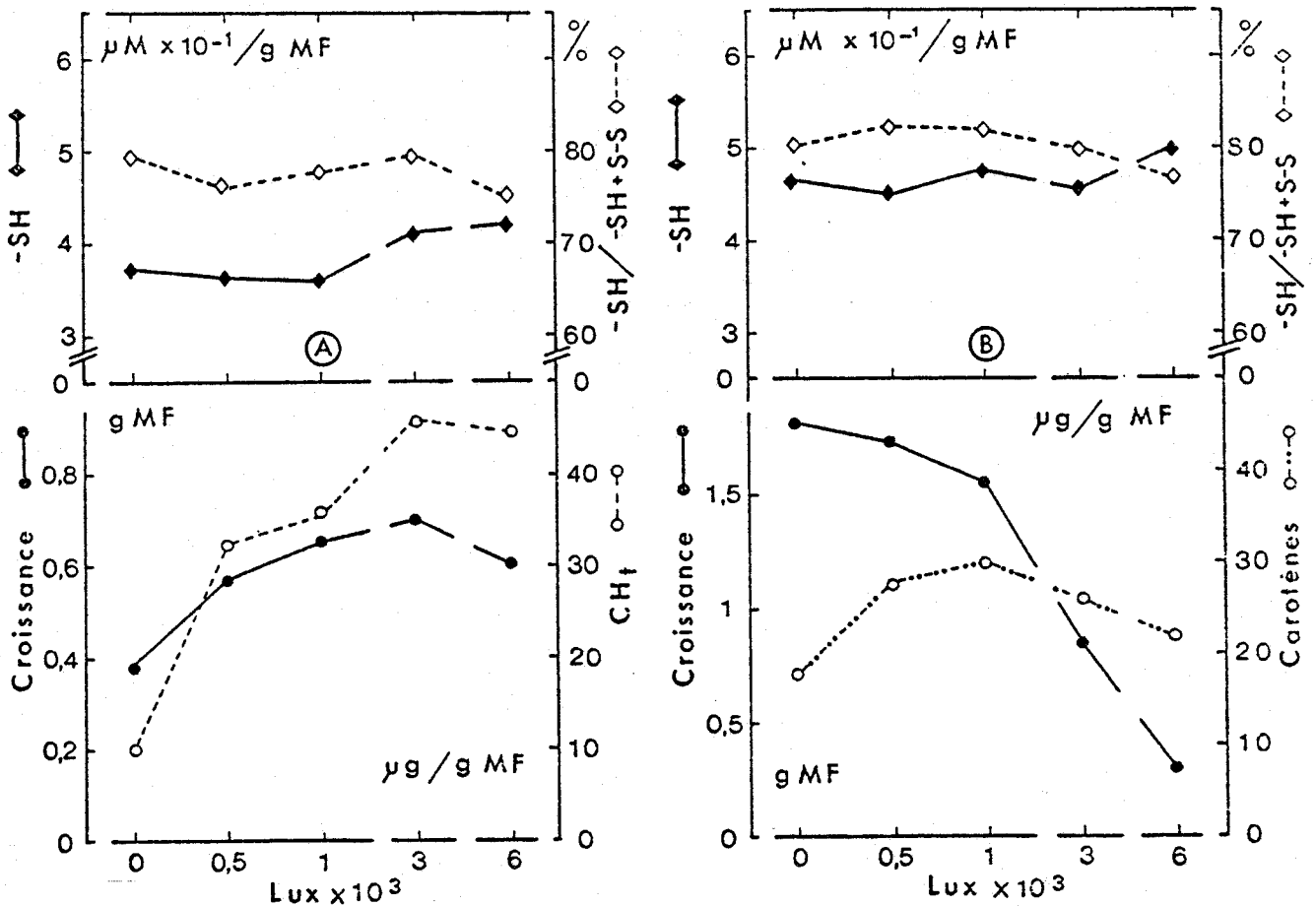


Figure 19 : Croissance des colonies tissulaires des souches chlorophyllienne (A) et caroténogène (B) de Carotte en fonction de l'intensité de l'éclairement

- La biomasse est exprimée en g de M F/colonie (●—●)
- La teneur en chlorophylle (O---O) et en pigments caroténoïdes (O---O) est donnée en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{M F}$
- La teneur en composés sulfhydrylés solubles (◆—◆) est exprimée en $\mu\text{M} \times 10^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
- Le rapport $-\text{SH} / -\text{SH} + \text{S-S}$ est exprimé en % (◇--◇) de M F

Les analyses sont effectuées sur des colonies chlorophylliennes âgées de 45 jours et sur des colonies caroténogènes de 90 jours, cultivées en lumière continue. Un lot témoin est placé à l'obscurité.

La teneur en $-\text{SH}$ solubles et le pourcentage de thiols réduits varient peu entre 0 et 1000 lux. Entre 1000 et 6000 lux, la teneur en $-\text{SH}$ augmente tandis que le rapport $-\text{SH} / -\text{SH} + \text{S-S}$ tend à diminuer (Fig. 19, A).

Afin de comparer l'influence relative de l'intensité de l'éclairement et de sa durée journalière, nous avons réalisé l'expérience suivante : 4 lots de colonies chlorophylliennes sont mis en culture, les 2 premiers lots reçoivent chaque jour un éclairement de 2500 lux, respectivement pendant 12 et 24 heures ;

les 2 autres reçoivent pendant les mêmes périodes un éclairage de 5000 lux. Les résultats résumés dans le tableau XXXI montrent que c'est bien la durée journalière d'éclairage qui est déterminante, puisque les jours longs stimulent la croissance et favorisent la synthèse de la chlorophylle pour les deux intensités utilisées. Autrement dit, l'augmentation de l'intensité de l'éclairage ne compense pas la réduction de la photopériode. Quant à la teneur en -SH, on remarque qu'elle est plus forte en jours courts qu'en jours longs et qu'elle est peu affectée par les variations de l'intensité d'éclairage.

	12 h/JOUR		24 h/JOUR	
	2500 lux	5000 lux	2500 lux	5000 lux
CROISSANCE (mg M F/colonie)	670	600	1580	1460
CHLOROPHYLLE ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ M F)	36,7	30,4	48,5	43,0
THIOLS (nM -SH $\cdot\text{g}^{-1}$ M F)	400	420	280	260

Tableau XXXI : Effets conjugués de la durée journalière et de l'intensité de l'éclairage sur la croissance des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte et sur leur teneur en chlorophylle et en composés sulfhydrylés solubles.

Les analyses sont effectuées au 45ème jour de culture.

β - souche caroténogène

La croissance diminue au fur et à mesure que l'intensité de l'éclairage augmente, surtout à partir de 1000 lux. Elle est très faible quand l'intensité de l'éclairage atteint 6000 lux (Fig. 19, B). La synthèse des carotènes, faible à l'obscurité, augmente jusqu'à 1000 lux puis diminue au fur et à mesure que l'intensité de l'éclairage s'élève (Fig. 19, B). La teneur en -SH solubles et le pourcentage de formes réduites varient peu (Fig. 19, B).

d - Longueur d'onde de la lumière

La croissance des tissus étiolés recevant 18 ou 24 heures par jour des éclairages relativement monochromatiques de 460, 530 et 665 nm est égale à celle des témoins placés à l'obscurité. La teneur en pigments

est par contre très différente. Après 3 ou 6 semaines de culture en lumière rouge clair, la teneur en CH_2 rapportée au poids de M F ou de M S est très faible. En lumière bleue, elle est presque 10 fois plus importante, tandis qu'en lumière verte elle atteint une valeur intermédiaire. Quant à la teneur en radicaux -SH, elle est un peu plus élevée dans les tissus soumis aux radiations bleues et vertes que dans ceux exposés aux radiations rouge clair ou placés à l'obscurité. Remarquons que ces différences ne sont pas dues aux modifications du rapport -SH/-SH + S-S (Tabl. XXXII).

LONGUEUR D'ONDE (*)	CROISSANCE (mg M F/colonie)			CHLOROPHYLLE ($\mu\text{g CH}_2/\text{g M F}$)			COMPOSÉS SULFHYDRILÉS (**)	
	Exp. n°1	Exp. n°2	Exp. n°3	Exp. n°1	Exp. n°2	Exp. n°3	-SH (nm/g M F)	$\frac{-\text{SH}}{-\text{SH} + \text{S-S}} \cdot 100$
Lumière bleue	184	523	571	26,0	32,3	38,8	370 ± 30	79,0 ± 7,6
Lumière verte	208	564	613	14,1	16,0	20,7	370 ± 40	78,9 ± 3,7
Lumière rouge	235	493	537	3,9	3,5	6,6	330 ± 10	76,9 ± 2,6
Obscurité	220	481	517	0	0	0	280 ± 30	76,9 ± 2,5

TABLEAU XXXII : Effets de la longueur d'onde de la lumière sur la croissance, la teneur en chlorophylle et l'état des composés sulfhydrilés solubles dans les tissus de la souche étiolée de Carotte.

Exp. n°1 : lumière, 18 : $\bar{6}$ pendant 3 semaines ;

Exp. n°2 : lumière, 18 : $\bar{6}$ pendant 6 semaines ;

Exp. n°3 : lumière, 24 : $\bar{0}$ pendant 6 semaines ;

★ : voir la Fig. 1. Les énergies utilisées sont de 1000 ergs. $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le bleu et 1500 et 1750 pour le vert et le rouge.

★★ : moyennes calculées à partir des résultats des Exp. 2 et 3.

Les variations importantes de la teneur en chlorophylle nous ont conduit à examiner la structure des plastes, afin de savoir si c'est la biosynthèse des pigments, la différenciation des chloroplastes ou les deux processus qui sont modifiés.

Des observations au microscope photonique montrent que la longueur d'onde de la lumière modifie le nombre et la taille des plastes. Quelle que soient les radiations, les cellules renferment un grand nombre de "petits plastes" mesurant de 0,5 à 1,5 μm de longueur. En lumière verte et surtout en lumière bleue on trouve en plus des "grands plastes" (2 à 6 μm de longueur) riches en grains d'amidon. En

lumière rouge, la plupart des cellules ne renferment que des "petits plastes" (DUBOIS, 1973).

Des observations en microscopie électronique n'ont pas révélé de différences de structure importantes en plus de celles qui affectent le plastidome. Une partie du cytoplasme est repoussé contre la paroi par la grande vacuole centrale que traversent quelques filaments de cytoplasme trabéculaire (Pl. VII, Fig. 1). Le noyau, plus ou moins irrégulier, fait saillie dans la vacuole. (Pl. VI, Fig. 3 et Pl. VII, Fig. 1). Les mitochondries sont nombreuses mais peu structurées. Dans les cellules les plus jeunes on reconnaît de nombreux dictyosomes et des polysomes qui témoignent de l'activité du cytoplasme (Pl. VIII, Fig. 1).

En lumière bleue, les chloroplastes de grande taille (3-6 μm) et de forme parfois irrégulière, renferment plusieurs faisceaux de lamelles stromatiques traversant tout le stroma et souvent des granums typiques formés de 5 à 10 vésicules granaires empilées. De petits globules lipidiques sont souvent visibles à l'extrémité des thylacoïdes. En plus des chloroplastes dont le système lamellaire est très important, on rencontre des chloroamyloplastes dont le stroma contient une ou plusieurs vésicules amylières repoussant quelques rares thylacoïdes contre l'enveloppe plastidale (Pl. VI, Fig. 5) et des leucoplastes amylières dépourvus de lamelles stromatiques (Pl. VI, Fig. 6) et provenant sans doute de la différenciation des proplastes.

En lumière verte, les chloroplastes ont un système lamellaire presque aussi développé mais pas de granums typiques. Des thylacoïdes très allongés s'accrochent sur toute leur longueur ou s'écartent de part et d'autre d'une volumineuse vésicule amylière (Pl. VII, Fig. 2).

En lumière rouge clair, les chloroplastes sont rares et ceux que l'on observe ont un système lamellaire très réduit (Pl. VIII, Fig. 3). Les proplastes sont plus nombreux et ils renferment déjà des globules lipidiques et/ou de petits grains d'amidon (Pl. VII, Fig. 2, 4 et 5).

Les tissus de la souche étioyée soumis aux radiations bleues et vertes montrent souvent une certaine dégénérescence des chloroplastes qui se manifeste par le gonflement des thylacoïdes et par la séparation des lamelles stromatiques. MASHERPA (1971) observe des aspects analogues dans des colonies de la souche chlorophyllienne de GAUTHERET cultivées en lumière continue, périodique ou à l'obscurité. D'après cet auteur, cette dédifférenciation des plastes caractérise la phase de "division cellulaire" au cours de laquelle les protéines qui constituent les membranes du système lamellaire sont détruites et les acides aminés et

les peptides repris dans de nouvelles synthèses. Le gonflement et la vacuolisation des thylacoïdes s'observent également dans les chloroplastes de plantules de Riz cultivées sur des milieux déficients en azote (CHONAN et coll., 1977).

C - CONCLUSION ET DISCUSSION

La lumière joue un rôle très important dans la régulation de la croissance des tissus isolés de Carotte, mais ses effets diffèrent selon les pigments qu'ils renferment. Elle stimule la biosynthèse de la chlorophylle et la prolifération des colonies tissulaires chlorophylliennes et étiolées et des cals qui se forment sur des fragments de racine. Nous avons montré qu'un allongement de la photopériode est plus efficace qu'une augmentation de l'intensité de l'éclairage, au moins pour les souches chlorophylliennes ; il est probable qu'il en est de même pour les deux autres tissus. Au contraire, des héméroperiodes longues et un éclairage de forte intensité réduisent la croissance des colonies de la souche caroténogène et la synthèse des carotènes dans ces tissus.

On ignore encore la nature exacte de l'action de la lumière sur les tissus isolés, mais on peut supposer que ceux qui renferment de la chlorophylle sont susceptibles de bénéficier de la photosynthèse. En utilisant du $^{14}\text{CO}_2$, ROUX et TENDILLE (1954) constatent que les tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte de GAUTHERET (celle que nous utilisons pour ces expériences) incorporent effectivement du carbone marqué dans leurs glucides, alors que ceux de la souche caroténogène dépourvus de chlorophylle ne sont pas marqués. En 1971, EDELMAN et HANSON démontrent que d'autres souches de Carotte fixent du CO_2 marqué, d'autant plus que leur teneur en chlorophylle est plus élevée. S'il paraît bien établi que les souches chlorophylliennes possèdent les structures, l'équipement pigmentaire et enzymatique nécessaires au fonctionnement de la photosynthèse, cela ne signifie pas que la forte stimulation de la croissance induite par des jours longs doive lui être attribuée. D'ailleurs ces tissus sont totalement incapables de proliférer sur des milieux dépourvus de sucres, même lorsqu'on les place dans des conditions d'éclairage qui leur sont habituellement les plus favorables. Nous pensons plutôt que la lumière agit en modifiant l'activité de nombreuses enzymes (NOUGAREDE et PILET, 1967 ; QUEIROZ et TRIPPI, 1969 ; BOUNIAS et PACHECO, 1972 ; MAILLE, 1971) et qu'elle agit sur la division cellulaire.

Les radiations rouge clair inhibent presque totalement la synthèse des chlorophylles dans les tissus des souches chlorophyllienne et étiolée, sans

modifier la prolifération. Ce fait est intéressant à considérer, car il va à l'encontre de la plupart des observations faites sur des plantes entières. Pour vérifier l'efficacité des radiations monochromatiques utilisées, nous avons cultivé des plantules de Sinapis alba L., de Linum usitatissimum L. et de Daucus carota L. dans les mêmes conditions que les tissus isolés de Carotte. Après une semaine de culture en lumière rouge clair, les plantules sont plus riches en chlorophylle, les entre-noeuds plus courts et les feuilles plus grandes. En lumière verte ou bleue, elles sont toutes plus ou moins étiolées. Les radiations rouges inhibent par contre la synthèse de la chlorophylle dans les néoformations qui se développent sur des fragments de racine de Carotte et sur des entre-noeuds de Silene alba MILLER E.H.L. KRAUSE. BEAUCHESNE et POULAIN (1966) ont également établi qu'elles inhibent la synthèse de la chlorophylle et provoquent des modifications histologiques dans des tissus de moelle de Tabac. Notons encore que des racines isolées de Blé (BJORN, 1965), de Pois et de Concombre (BJORN et ODHELIUS, 1966) exposées à des lumières monochromatiques se comportent de la même manière que les cultures de tissus de Carotte : elles ne synthétisent pas de chlorophylle en lumière rouge clair.

Pour BJORN, la longueur d'onde agirait à la fois sur la synthèse de la protochlorophylle et sur sa transformation en chlorophylle. Pour RICHTER (1969), seules les radiations bleues induiraient la différenciation des chloroplastes dans les racines de Blé. Les relations entre la synthèse des pigments plastidiaux et la différenciation des plastes ont suscité de très nombreux travaux, mais la plupart ne s'intéressent qu'à la lumière blanche. Dans les tissus des souches chlorophyllienne et étiolée de Carotte, les radiations vertes et surtout les radiations bleues stimulent la biosynthèse des chlorophylles et la différenciation des chloroamyloplastes ; en lumière blanche, les héméropériodes longues ont un effet analogue.

Les relations entre les radicaux -SH et la lumière sont difficiles à saisir car de nombreux mécanismes physiologiques sont affectés par la teneur en -SH et par la lumière. Chez les plantes entières, BRUNEL-CAPELLE (1955) signale que l'activité des -SH est généralement plus élevée dans les limbes et les organes qui remplacent la feuille dans sa fonction chlorophyllienne (cladodes, tiges assimilatrices) et qui sont plus riches en chlorophylle. L'activité mésoxalique est par contre plus faible dans les organes de transport (tiges), d'absorption (racines) et de multiplication végétative (bulbes, rhizomes) qui renferment peu ou pas de pigments chlorophylliens. Dans des germinations qui se développent à la lumière, la teneur en -SH est généralement plus élevée que dans les plantules maintenues à l'obscurité. Dans des feuilles

panachées, la répartition des thiols entre les zones vertes et les zones blanches varie selon les espèces.

Bien que les tissus de Carotte que nous utilisons soient dépourvus de propriétés organogènes et constituent un matériel beaucoup plus simple, les effets de la lumière sur les -SH sont difficiles à analyser. Comme nous venons de le voir, la lumière contrôle à la fois la prolifération des tissus et la synthèse des pigments plastidaux. Il en résulte que les modifications de la teneur en -SH et du rapport thiols / disulfures ne sont, le plus souvent, que le reflet de la croissance. Considérons par exemple le cas de colonies chlorophylliennes soumises à un éclairage journalier de 12 h ou de 24 h. Les héméropériodes longues -qui stimulent la prolifération- raccourcissent évidemment le cycle de croissance. Les colonies éclairées 24 h par jour entrent plus vite en phase de sénescence ; au 45ème jour de culture, elles présentent une teneur en -SH acidosolubles et un pourcentage de thiols réduits plus faibles. Il est clair que dans ces conditions, la lumière agit surtout de façon indirecte.

L'utilisation de lumières relativement monochromatiques et peu énergétiques nous a permis d'agir sur la synthèse des pigments plastidaux sans modifier la croissance des tissus. On note alors que les teneurs en chlorophylle et en composés sulfhydrilés acidosolubles varient dans le même sens : en lumière rouge clair et à l'obscurité, la teneur en -SH et celle des chlorophylles sont plus faibles qu'en éclairage vert ou bleu. Des radiations rouge clair provoquent également une réduction de la teneur en -SH dans des feuilles étiolées de Haricot (SAIDOV et Coll., 1973). Dans des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte, les teneurs en -SH et en chlorophylle totale varient aussi dans le même sens, lorsque la durée de l'héméropériode passe de 0 à 12 h.

Dans des tissus de la souche caroténogène de Carotte, l'augmentation de la durée et de l'intensité de l'éclairage ne provoque qu'une très faible synthèse de chlorophylle et inhibe la croissance ; la teneur en -SH et le rapport thiols / disulfures sont très peu affectés.

Notons enfin que dans les néoformations qui se forment sur des fragments de racine de Carotte cultivés in vitro, il y a une relation inverse entre la teneur en -SH et la quantité de pigments chlorophylliens. En lumière rouge clair et à l'obscurité, les néoformations pauvres ou totalement dépourvues de chlorophylle présentent une teneur en -SH élevée ; en lumière verte ou bleue, elles sont chlorophylliennes et contiennent moins de thiols.

CHAPITRE 7 : EFFETS DES SUCRES SUR LA PROLIFERATION DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR L'ETAT DES COMPOSES SULFHYDRI- LES SOLUBLES.

Beaucoup de tissus cultivés in vitro sont pratiquement hétérotrophes vis à vis des sucres, bien qu'ils renferment plus ou moins de chloroplastes. C'est le cas des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte isolée par GAUTHERET. Ces tissus incorporent pourtant du CO_2 marqué (ROUX et TENDILLE, 1954) et présentent une certaine activité photosynthétique, lorsqu'on les éclaire (NAEF, 1968).

A - CROISSANCE

1 - Effets de la concentration du glucose présent dans le milieu

Quelle que soit la nature des pigments qu'ils renferment, la concentration du glucose joue un rôle important dans le contrôle de la croissance des tissus de Carotte que nous avons utilisés. Les résultats obtenus pour des doses de glucose s'échelonnant entre 0 et 7 ‰ diffèrent selon que les courbes traduisent les variations du poids de M F ou celles du poids de M S, le pourcentage de M S augmentant en même temps que la concentration initiale du sucre dans le milieu. L'élévation du taux de matière sèche résulte de l'augmentation de la pression osmotique du milieu, d'une synthèse accrue d'amidon et peut-être aussi d'une synthèse de polyholosides pariétaux.

La croissance des colonies chlorophylliennes cultivées en lumière continue est nulle en l'absence de sucre. Elle augmente très rapidement entre 0 et 0,5 ‰ de glucose. Le poids de M F est maximum pour une dose de 2 ‰ ; celui de M S, pour une dose de 4 ‰. Les concentrations de glucose supérieures à 4 ‰ inhibent très fortement la prolifération de ce tissu (Fig. 20, A).

Les colonies de la souche "étiolée" cultivées à l'obscurité réagissent de façon comparable, mais les courbes sont beaucoup plus aplaties. La croissance (M F ou M S) est maximale quand le milieu contient 2 ‰ de glucose

Le poids de M F représente alors 40 % de celui des colonies de la souche chlorophyllienne cultivées sur un milieu identique et éclairées 24h/24. L'augmentation de la dose initiale de glucose ne favorise pas la croissance des tissus de la souche étiolée. En aucune façon, le sucre ne compense l'absence de chlorophylle et/ou l'absence de lumière. Une dose de sucre trop élevée (5 % par ex.) réduit la prolifération des tissus étiolés dans la même proportion que celle des colonies chlorophylliennes (Fig. 20, A).

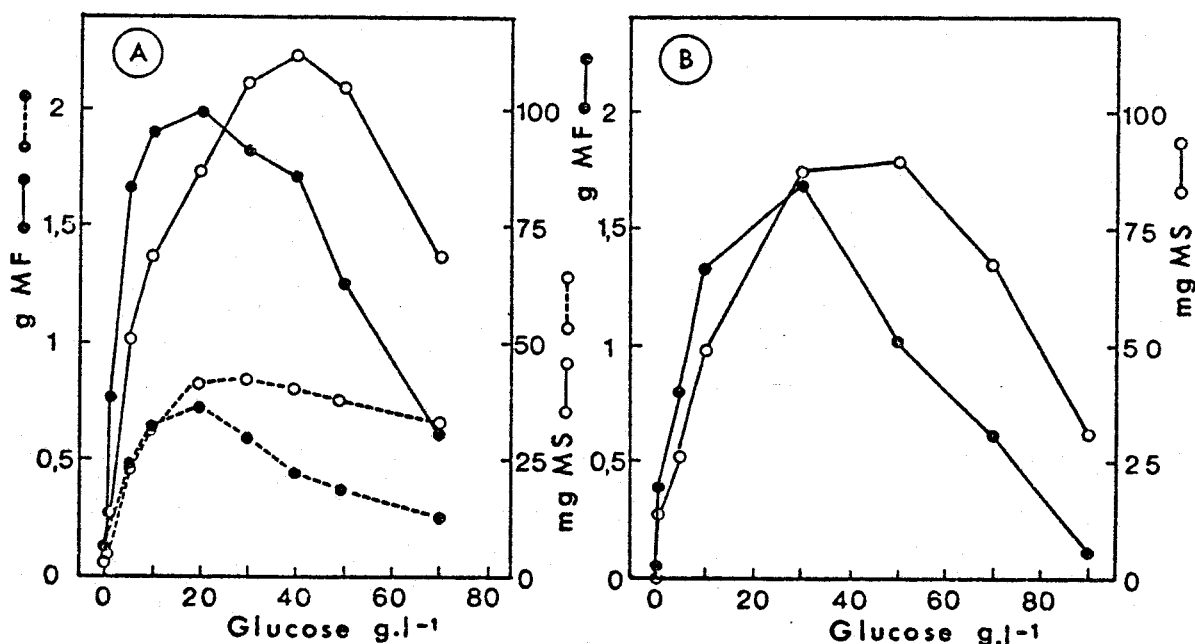


Fig. 20 : Influence de la concentration en glucose du milieu sur la croissance des tissus de Carotte.

A : colonies chlorophylliennes (—) cultivées pendant 45 jours en lumière continue et colonies étioilées (- - -) cultivées pendant le même temps à l'obscurité.

B : colonies caroténogènes (—) cultivées pendant 75 jours en lumière périodique (12 : 12).

Les colonies de la souche caroténogène prolifèrent moins rapidement. Il faut 75 jours, au lieu de 45, à la souche caroténogène pour atteindre une biomasse comparable à celle des colonies chlorophylliennes. Le poids de M F est optimal quand la teneur en sucre du milieu est de 3 % ; le poids de M S, quand elle est de 5 % (Fig. 20, B).

Les courbes de croissance établies pour les colonies chlorophylliennes et étioilées sont très différentes. Au contraire, celles des colonies chlorophylliennes et caroténogènes sont comparables. Ce n'est donc pas la présence ou l'absence de chlorophylle -et par conséquent la photosynthèse- qui joue le rôle essentiel :

c'est la lumière. Or, selon NAEF (1968), la lumière favoriserait la pénétration du glucose dans les cellules de Carotte. Les souches chlorophylliennes et caroténogènes, cultivées à la lumière, utiliseraient donc mieux le glucose présent dans le milieu. On constate effectivement qu'une augmentation de la teneur en sucre favorise la croissance. Par contre, pour les mêmes doses de glucose, la prolifération des colonies étiolées, cultivées à l'obscurité, est beaucoup moins importante.

La concentration du glucose agit également sur la biosynthèse des pigments plastidaux. D'une manière générale, la production de chlorophylle par un tissu donné est d'autant plus importante que le milieu est riche en sucre et que la prolifération est plus faible (GAUTHERET, 1959, p. 341 ; HEMPHILL et VENKETESWARAN, 1978). Selon BANDURSKI (1949), le glucose favorise aussi la synthèse des pigments caroténoïdes. On relève cependant un certain nombre d'exceptions à cette règle. Dans les tissus de Topinambour cultivés in vitro, la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes diminue lorsque le taux de glucose dans le milieu augmente (SCHANTZ et coll., 1967). Chez le Tabac, BARG et UMIEL (1977) et RADOSEVITCH (communication personnelle) constatent qu'une augmentation de la concentration du saccharose réduit la synthèse de la chlorophylle et la néoformation des bourgeons mais stimule la croissance. De même, la quantité de pigments produits par des protocormes de Cymbidium diminue si le milieu est enrichi en saccharose (VANSEVEREN-VAN ESPEN, 1973).

En ce qui concerne les souches de tissus de Carotte que nous utilisons, on constate que la teneur en glucose renforce la pigmentation des colonies chlorophylliennes, stimule la synthèse de la chlorophylle dans celles de la souche étiolée lorsqu'on les éclaire et renforce progressivement la coloration rouge des colonies caroténogènes.

Pour des souches de Carotte différentes, HOMES (1967) et PAMPLIN et CHAPMAN (1975) constatent l'effet inverse : le glucose entraîne la diminution de la teneur en pigments plastidaux. Selon PAMPLIN et CHAPMAN, la suppression des chlorophylles est liée à des modifications de l'activité des enzymes qui interviennent dans la biosynthèse de ces pigments. Dans les tissus de la souche CRT₁ de Carotte, EDELMAN et HANSON (1971, a et b) notent que le saccharose réduit la teneur en chlorophylle, le nombre de plastes par cellule et leur structure lamellaire ; parallèlement, il réduit la fixation du CO₂ marqué. Le glucose et le fructose utilisés à la même concentration (3 %) sont

par contre sans effets. Ces auteurs signalent encore qu'une souche différente (CRT₂), présentant une activité invertasique plus élevée, n'est pas sensible à l'action du saccharose ; ce qui suggère que "l'effet saccharose" est spécifique.

La lumière et la teneur en sucre du milieu contrôlent donc simultanément la croissance des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte et leur teneur en chlorophylle. En conséquence, il nous est apparu intéressant de les cultiver en présence de différentes doses de sucre, en lumière continue (24 : $\overline{0}$), en lumière périodique (12 : $\overline{12}$) et à l'obscurité (0 : $\overline{24}$). Les résultats de cette expérience montrent que, quelle que soit la durée journalière d'éclairement, la teneur en chlorophylle rapportée à l'unité de M F tend à augmenter en fonction de la concentration du sucre. Notons que l'importante augmentation du pourcentage de M S masque plus ou moins l'élévation de la teneur en chlorophylle, rapportée à l'unité de M S (Tableau XXXIII).

	HEMEROPERIODE						HEMEROPERIODE					
	24 : $\overline{0}$		12 : $\overline{12}$		0 : $\overline{24}$		24 : $\overline{0}$		12 : $\overline{12}$		0 : $\overline{24}$	
	A M F (mg)	A M S (mg)	A M F (mg)	A M S (mg)	A M F (mg)	A M S (mg)	$\mu\text{g} /$ g M F	$\mu\text{g} /$ g M S	$\mu\text{g} /$ g M F	$\mu\text{g} /$ g M S	$\mu\text{g} /$ g M F	$\mu\text{g} /$ g M S
GLUCOSE (g.l ⁻¹)	0	0	37	1,4	96	3,5	16,8	472	18,8	508	17,8	493
1	158	3,8	458	16,2	559	18,9	12,9	334	22,0	553	21,2	573
5	389	14,1	520	21,7	1375	57,0	10,0	244	24,1	548	25,5	599
10	416	18,3	874	46,9	1727	77,7	8,6	187	28,9	545	31,0	681
30	343	27,5	569	45,5	1412	105,1	12,2	177	41,0	568	45,0	630
50	232	23,8	426	43,8	586	57,6	20,0	255	50,4	586	54,4	632
100	0	9,0	0	10,4	31	17,3	30,5	274	54,8	510	63,6	538

TABLEAU XXXIII : Effets conjugués de la durée journalière d'éclairement et de la teneur en glucose du milieu sur la croissance des colonies tissulaires de Carotte (souche chlorophyllienne) et leur teneur en chlorophylle totale.

Durée de la culture : 30 jours.

La biomasse des tissus cultivés en photopériode 12 : $\overline{12}$ passe de 520 à 874 mg quand on porte la teneur en sucre de 5 à 10 g.l⁻¹ ; elle passe de 520 à 1375 mg quand on double la photopériode. Il apparaît donc que le doublement de la dose du saccharose ne compense pas la réduction de moitié de la durée journalière d'éclairement. Par contre, l'augmentation de la photopériode peut compenser, au moins partiellement,

une faible teneur en sucre (Tableau XXXIII).

Nous ne pensons pas qu'il faille considérer ces faits uniquement sous l'angle d'une plus ou moins grande autotrophie des cultures de Carotte. La lumière intervient certainement à plusieurs niveaux sur le métabolisme : elle pourrait par exemple accélérer la pénétration du AIA, comme elle favorise celle du 2,4-D dans certaines feuilles (SARGENT et BLACKMANN, 1965 et 1969), agir sur la perméabilité cellulaire et/ou sur l'utilisation de certains ions (NO_3^- , en particulier). NAEF (1968) aboutit à des conclusions comparables après avoir étudié l'action combinée de la lumière et du sucre sur des tissus ayant la même origine que les nôtres. Il souligne en particulier l'importance du facteur lumière, même lorsque les tissus sont dépourvus de chlorophylle. C'est le cas de la souche caroténogène d'EICHENBERGER qui est habituellement entretenue sur un milieu renfermant 50 g.l^{-1} de glucose. A notre avis, cette dose est trop forte. Elle favorise certes, la synthèse des pigments caroténoïdes qui font l'originalité de cette souche, mais elle diminue en même temps le taux de croissance.

2 - Utilisation d'autres sucres

Les colonies de la souche chlorophyllienne prolifèrent aussi bien sur des milieux contenant du saccharose ou du fructose (filtré) que du glucose et nous n'avons pas constaté de différences appréciables quant à la teneur en chlorophylle. Nos observations ne confirment donc pas celles de GORIS (1954) qui avait noté que l'utilisation du fructose réduit le verdissement de ces tissus. Rappelons que l'effet inhibiteur du saccharose sur la prolifération varie selon la souche considérée (EDELMAN et HANSON, 1971, b). Pour une souche de Carotte ayant la même origine que celles que nous utilisons, MLODZIANOWSKI (1973) observe une croissance satisfaisante des tissus en présence de 1 % de saccharose. Il indique également, qu'en augmentant la concentration du sucre dans le milieu, il est possible de réduire la dose d'auxine utilisée, sans provoquer une diminution de la prolifération.

B - COMPOSES SULFHYDRILES ACIDOSOLUBLES

La teneur en composés sulfhydrilés a été mesurée après 45 jours pour les colonies chlorophylliennes et après 75 jours pour les colonies caroténogènes.

1 - Souche chlorophyllienne

Les résultats rapportés sur la figure n° 21 A, montrent que la teneur en -SH :

- diminue entre 1 et 10 g de glucose par litre de milieu, surtout quand on rapporte les -SH au poids de M S, qui est multiplié par 10 entre ces deux valeurs ;

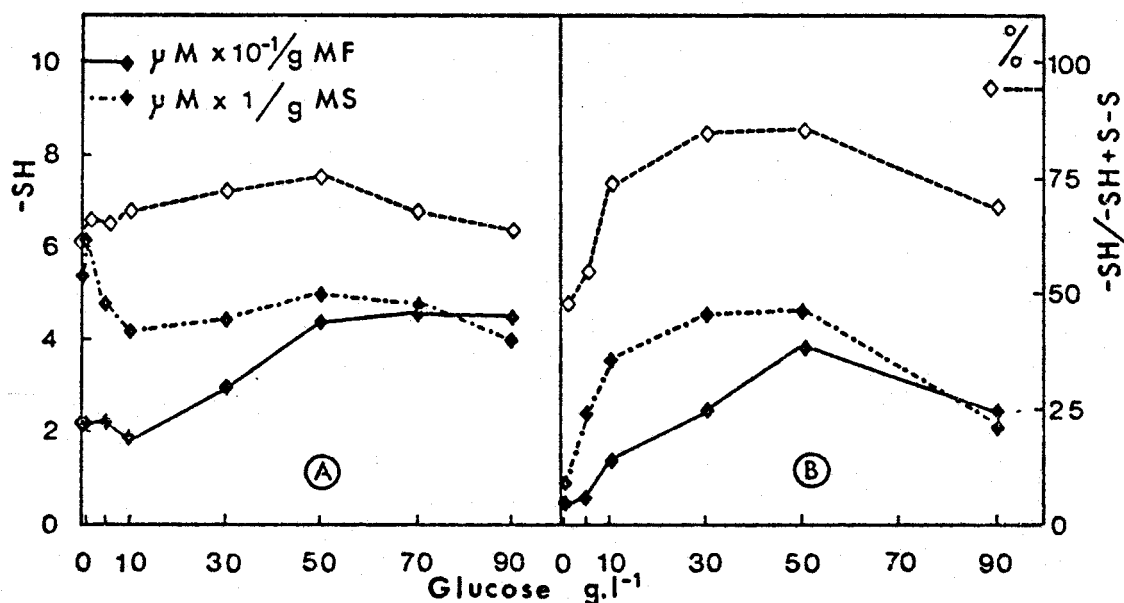


Figure 21 : Effet de la teneur en glucose du milieu de culture sur l'état de composés sulfhydrilés acidosolubles :

- A : dans des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte âgés de 45 jours ;
- B : dans des tissus de la souche caroténogène de Carotte âgés de 75 jours.

- augmente régulièrement quand le glucose passe de 10 à 50 g.l⁻¹ ;
 - reste constante ou diminue légèrement quand la concentration de sucre passe de 50 à 90 g.l⁻¹, selon qu'on l'exprime par rapport à 1 g de M F ou de M S.

Le rapport thiols réduits/thiols totaux varie peu ; il augmente légèrement entre 1 et 50 g.l⁻¹ de glucose, puis diminue entre 50 et 90 g.l⁻¹.

2 - souche caroténogène

La teneur en -SH et le pourcentage de formes réduites augmentent en même temps que la concentration initiale du glucose dans le milieu entre 1 et 50 g.l⁻¹, puis diminuent pour les doses supérieures (Fig. 21 B).

C - CONCLUSION

La concentration initiale du glucose qui contrôle la prolifération des tissus de Carotte et la biosynthèse des chlorophylles et des carotènes, agit également sur l'état des composés sulfhydrylés,

Considérons d'abord le cas des tissus chlorophylliens. La teneur en pigments augmente au fur et à mesure que la dose initiale de glucose s'élève, tandis que la biomasse diminue au-dessus de 2 ou de 4 % de glucose, selon que l'on se réfère au poids de M F ou de M S. Ainsi, des tissus cultivés sur des milieux contenant 2 % ou 7 % de glucose ont un poids de M F comparable au 45ème jour ; mais les premiers sont blanchâtres tandis que les seconds sont vert foncé. La teneur en -SH solubles est de 180 nM de S par g de M F dans les premiers et de 460 nM de S par g de M F dans les seconds. Le rapport -SH/-SH + S-S est voisin de 68 % dans les deux types de colonies.

En conclusion, chez la souche chlorophyllienne, les variations de la teneur en -SH semblent davantage liées à celles de la chlorophylle qu'à celles de la croissance des tissus. Par contre, si on examine les variations des -SH et de la croissance des colonies tissulaires de la souche caroténogène, on constate qu'ils passent tous deux par un optimum entre 3 et 5 % de sucre et que la courbe exprimant les variations du rapport -SH/-SH + S-S en fonction de la teneur initiale en sucre du milieu est parallèle à la courbe de croissance.

CHAPITRE 8 : EFFETS DE QUELQUES REGULATEURS DE CROISSANCE SUR LA PROLIFERATION DES TISSUS DE CAROTTE ET SUR L'ETAT DES COMPOSES SULFHYDRIQUES SOLUBLES.

A - FRAGMENTS DE RACINE

1 - Effets du AIA sur le développement des cultures

Les explantats sont cultivés en position inverse sur des milieux standard renfermant 10^{-9} à 10^{-4} g.ml⁻¹ de AIA et sur un milieu témoin (AIA = 0). Les poids de M F et de M S des cals et des zones racinaire et foliaire des fragments sont déterminés après 6 semaines de culture à la lumière (Tableau XXXIV).

Les fragments de racine cultivés sur le milieu témoin et sur les milieux renfermant de très faibles doses de AIA (10^{-9} et 10^{-8} g.ml⁻¹) présentent un cal chlorophyllien recouvrant la surface racinaire des fragments.

CROISSANCE	ZONES ANALYSEES	CONCENTRATION DU AIA DANS LE MILIEU						
		0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
M F/culture (mg)	Ca I	731	754	732	608	416	207	153
	Z R	943	1016	1114	1032	1385	1346	1307
	Z F	920	980	1053	1381	1590	2005	1678
M S/culture (mg)	Ca I	80	82	71	60	38	17	12
	Z R	94	95	98	83	128	131	109
	Z F	131	138	148	181	234	252	206

TABLEAU XXXIV : Influence de la concentration du AIA sur la prolifération des fragments de racine de Carotte, après 6 semaines de culture.

Des doses moyennes (10^{-7} et 10^{-6} g.ml⁻¹) réduisent la prolifération du cal et provoquent la formation de racines localisées à la partie racinaire des explantats. Les doses les plus élevées (10^{-5} et 10^{-4} g.ml⁻¹) modifient profondément le développement des cultures. Un cal faiblement chlorophyllien recou-

vre lentement la face racinaire des explantats, tandis qu'un tissu hyperhydraté et dépourvu de chlorophylle prolifère rapidement à partir des zones en contact avec le milieu. Des racines courtes et grêles apparaissent sur toute la culture.

GAUTHERET (1944), qui observa des faits analogues, les interpréta en invoquant le transport polarisé de l'auxine endogène ;

- le cal formé à l'extrémité racinaire des explantats cultivés sans substances de croissance résulterait du transport polarisé de l'auxine endogène ;

- la formation des racines sur la face racinaire des explantats, dont la face foliaire reçoit une faible dose de AIA serait, de même, la conséquence du transport polarisé de l'AIA ;

- les fortes doses de AIA exogène, plus ou moins toxiques, masqueraient le transport polarisé de l'auxine endogène.

Les résultats de KULESCHA (1951) confirment l'accumulation d'auxine dans la zone racinaire des fragments cultivés sans phytohormone, ou en présence de faibles doses de AIA. Toutefois, ils ne démontrent pas le transport polarisé de cette substance (PILET, 1964). D'autres facteurs interviennent, tels que l'activité des auxine-oxydases (PILET 1956 et 1964) et des peroxydases (LEGRAND, 1970). De plus, l'anabolisme auxinique n'est sans doute pas identique dans les différentes régions des explantats. Selon PILET (1964), c'est l'ensemble de ces facteurs qui détermine un "état auxinique endogène", responsable des phénomènes de rhizogenèse et de callogenèse observés.

2 - Effets du AIA sur la répartition des -SH

Quelle que soit la concentration initiale du AIA dans le milieu, la répartition des -SH s'établit selon un gradient parallèle à l'axe des cultures, même si la dose d'auxine utilisée supprime la polarité naturelle des tissus de racine de Carotte. Dans ce dernier cas, le gradient sulfhydrylé est plus faible ($-SH_C - -SH_{ZF} = + 260 \text{ nM}$, pour $10^{-4} \text{ g.ml}^{-1}$ de AIA exogène) que celui enregistré dans des fragments cultivés sur le milieu témoin ($-SH_C - -SH_{ZF} = + 390 \text{ nM}$) (Tableau XXXV).

Dans les cultures repiquées sur le milieu témoin et en présence de faibles doses de AIA, le pourcentage de thiols réduits est plus élevé dans la zone racinaire du fragment et dans les tissus néoformés; il est plus

faible dans la zone foliaire en contact avec le milieu. C'est le contraire lorsque la dose de AIA dans le milieu atteint ou dépasse $10^{-5} \text{ g.ml}^{-1}$ (Tableau XXXV).

ETAT DES COMPOSES SULFHYDRILES	ZONES ANALYSEES	CONCENTRATION DU AIA DANS LE MILIEU						
		0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
-SH } $\left. \begin{array}{l} \text{nM.g}^{-1} \text{ de M F} \\ \text{nM. dg}^{-1} \\ \text{de M S} \end{array} \right\}$	CaI	450	430	420	310	330	300	290
	Z R	190	210	120	140	120	90	120
	Z F	60	60	60	30	40	40	30
	CaI	414	394	434	313	363	361	363
	Z R	191	216	136	173	120	100	138
	Z F	42	45	42	24	28	30	24
$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 100$	CaI	71,9	67,0	77,6	72,3	68,3	50,5	44,2
	Z R	70,4	66,2	73,4	70,6	70,1	63,7	63,5
	Z F	60,7	56,8	52,1	65,9	74,1	76,3	74,3

TABLEAU XXXV : Influence de la concentration du AIA sur la teneur en -SH et sur le pourcentage de thiols réduits après 6 semaines de culture.

3 - Conclusion

La comparaison des effets du AIA sur la croissance des tissus néoformés (Tableau XXXIV) et sur l'état des composés sulfhydrilés (Tableau XXXV) montre que :

- des concentrations initiales inférieures ou égales à $10^{-8} \text{ g.ml}^{-1}$ sont dépourvues d'effets sur la croissance du cal basal, ne modifient pas la teneur en -SH des tissus et n'agissent pas sur l'équilibre thiols réduits/thiols totaux ;

- des concentrations supérieures à $10^{-8} \text{ g.ml}^{-1}$ réduisent le développement du cal basal et parallèlement la teneur en -SH et le pourcentage de formes réduites dans les tissus néoformés ;

- des doses supérieures ou égales à $10^{-8} \text{ g.ml}^{-1}$ stimulent la prolifération des tissus de la zone foliaire du fragment et augmentent simultanément le pourcentage des -SH réduits dans cette zone.

Le AIA provoque donc une diminution de la teneur en -SH solubles en même temps qu'il stimule ou inhibe la croissance des tissus néoformés. Par contre, le pourcentage de thiols solubles (-SH / -SH + S-S) augmente dans les tissus qui prolifèrent et diminue dans ceux qui ne prolifèrent pas.

B - COLONIES TISSULAIRES

1 - Effets du AIA, du ANA et du 2,4-D

Des colonies de la souche chlorophyllienne sont cultivées pendant 45 jours à la lumière sur le milieu de base renfermant différentes doses de AIA, de ANA ou de 2,4-D. Ces trois substances ont un effet comparable sur la prolifération (Fig. 22,A).

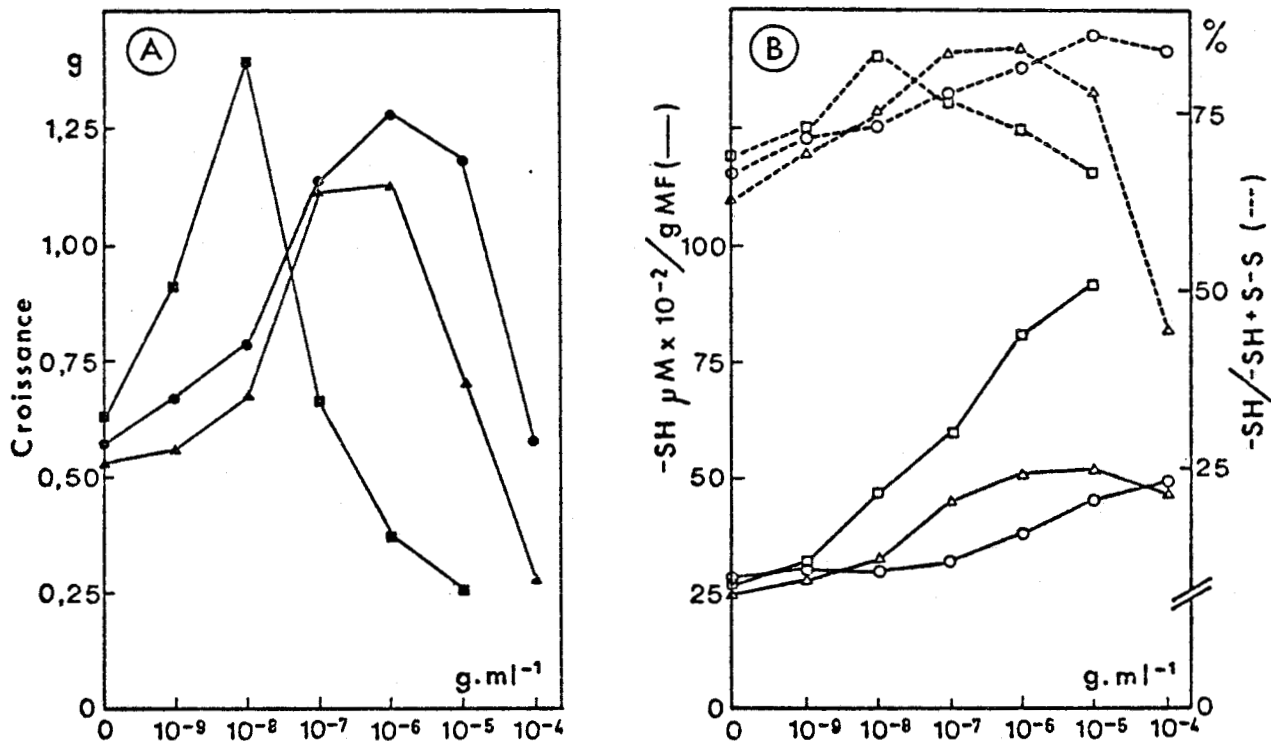


Figure 22 : Influence du AIA (● , ○) du ANA (▲ , △) et du 2,4-D (■ , □) sur la croissance (A) et sur l'état des composés sulfhydrylés solubles (B) des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte. Les mesures sont effectuées après 45 jours de culture.

En l'absence de régulateur de croissance, les tissus prolifèrent très peu. Le ANA stimule 5 à 10 fois plus la croissance que le AIA mais se montre également plus toxique. Le 2,4-D est environ 100 fois plus actif que le AIA ; aux doses optimales, il provoque une forte hydratation des cellules et devient toxique dès que sa concentration dépasse 10^{-7} g.ml⁻¹. Les résultats sont les mêmes si on exprime la croissance en poids de M F, de M S ou d'azote protéique (DUBOIS, 1971).

Les 3 substances de croissance réduisent la teneur en chlorophylle. Cette diminution n'est pas provoquée par un simple découplage de la proliféra-

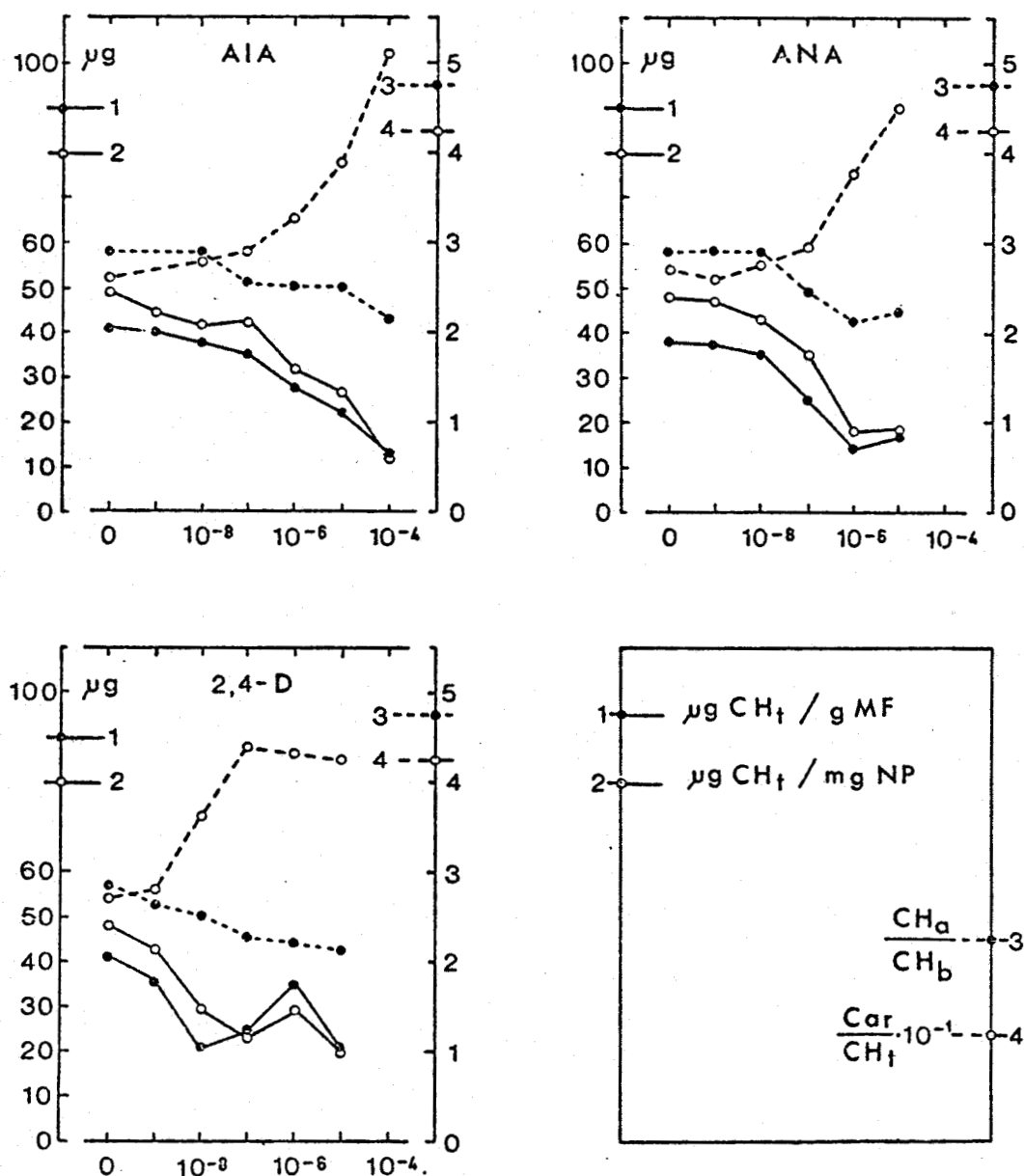


Figure 23 : Variation de la teneur en pigments plastidaux en fonction de la concentration (g.ml⁻¹) du AIA, du ANA et du 2,4-D présents dans le milieu de culture.

tion des cellules et de la biosynthèse des pigments, car les fortes doses de régulateurs de croissance ralentissent à la fois la prolifération cellulaire et la synthèse pigmentaire. En plus des variations quantitatives de la CHT, les substances étudiées provoquent une faible diminution du rapport CHa/CHb et une forte augmentation du rapport carotènes/CHt (Figure 23).

La teneur en -SH solubles est toujours plus élevée dans des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte cultivés en présence du AIA, du ANA et du 2,4-D, que dans ceux des colonies témoins cultivées sans régulateur de croissance (Figure 22,B). L'augmentation de la teneur en -SH s'observe aussi bien pour des concentrations relativement élevées de AIA ou de ANA qui stimulent la croissance, qu'avec des doses comparables de 2,4-D qui la réduisent.

Lorsqu'on cultive les tissus sur des milieux contenant des concentrations infraoptimales ou supraoptimales de l'un de ces régulateurs, les biomasses obtenues, après 45 jours, sont très voisines. Ainsi, en présence de 10^{-7} et de 10^{-5} g.ml⁻¹ de AIA, l'augmentation de la biomasse des cultures est respectivement de 1130 et de 1180 mg de M F par culture. Dans ce cas, les teneurs en -SH solubles sont de 320 nM.g⁻¹ de M F, pour la dose de 10^{-7} g.ml⁻¹ et de 450 nM.g⁻¹ de M F pour celle de 10^{-5} g.ml⁻¹. La teneur en -SH varie donc en fonction de la concentration initiale du AIA : elle est d'autant plus élevée que la dose d'auxine introduite dans le milieu est plus forte. L'ANA et le 2,4-D ont des effets comparables à ceux du AIA sur la teneur en -SH (Figure 22,B).

Examinons maintenant les variations de rapport -SH réduits/-SH totaux (Figure 22,B) :

- il est relativement faible lorsque les tissus se développent sur le milieu de base (dépourvu de régulateur de croissance) ;
- il augmente lorsque la concentration du régulateur utilisée favorise la prolifération ;
- il diminue lorsque la dose employée inhibe la prolifération.

On remarque toutefois une différence entre les effets des fortes doses de AIA et ceux des concentrations élevées de ANA et de 2,4-D. Les premières

réduisent moins le rapport -SH/-SH + S-S que les deux autres, ce qui peut s'expliquer par une moins grande stabilité du AIA lors de la stérilisation des milieux de culture (KULESCHA, 1967). Il est également possible que la teneur en AIA diminue plus rapidement dans le milieu, en raison de l'activité d'auxine-oxydases intracellulaires et/ou présentes dans la solution nutritive, comme nous l'avons démontré récemment à propos de cultures cellulaires de Silène (LEGRAND et DUBOIS, 1978).

2 - Effets de la kinétine

A la suite de recherches menées par DAS, PATAU et SKOOG (1956) et par SKOOG et MILLER (1957), sur des tissus de Tabac, on admet encore aujourd'hui que l'équilibre auxines/cytokinines contrôle la croissance et l'organogénèse de la plupart des tissus de Dicotylédones. Selon leur origine, ces tissus peuvent être autotrophes à l'une ou l'autre ou bien aux deux substances.

Ajoutée au milieu de HELLER, renfermant ou non 10^{-7} g/ml de AIA, la kinétine a peu d'effets sur la prolifération des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte jusqu'à 10^{-7} g.ml⁻¹; les concentrations supérieures sont toxiques (Tableau XXXVI). On peut donc penser que ces tissus

CONCENTRATION EN KINETINE (g.ml ⁻¹)	CROISSANCE (mg M F/culture)	CHLOROPHYLLES			COMPOSES SULFHYDRILES		
		CH _t (µg.g ⁻¹ M F)	$\frac{CH_a}{CH_b}$	Car CH _t	Thiols solubles (nM.g ⁻¹ M F)	(nM/0,1g M S)	$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 100$
0	1150	33,9	2,50	2,90	320	480	77,5
10 ⁻⁹	1170	34,7	2,20	3,00	340	515	88,0
10 ⁻⁸	1050	33,5	2,40	2,90	320	475	78,5
10 ⁻⁷	1100	36,2	2,60	3,15	360	550	82,1
10 ⁻⁶	840	42,4	2,25	3,25	385	540	79,6
10 ⁻⁵	445	40,8	2,55	3,35	410	450	78,8

TABLEAU XXXVI : Effets de la concentration de la kinétine sur :

- la croissance des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte;
- la teneur en chlorophylle totale (CHt) et les rapports CHa/CHb et carotènes/CHt;
- la teneur en -SH solubles et le pourcentage de thiols réduits.

Les analyses sont effectuées au 45ème jour de culture .

fabriquent leurs propres cytokinines et qu'un apport de kinétine exogène provoque un déséquilibre du rapport auxines/kinines endogènes, ce qui réduit la croissance.

Des tissus de Carotte isolés par BANDIERA et MORPURGO (1970) et cultivés sur des milieux plus riches (MURASHIGE et SKOOG, 1962, ou LINSMAIER et SKOOG, 1965) ont fourni des résultats différents, conduisant ces auteurs à conclure que la croissance de leur souche dépend de la quantité de kinétine disponible et qu'elle est indépendante de celle de l'auxine. Afin de déterminer si c'est l'origine des tissus ou la composition du milieu qui est responsable de ces différences, nous avons cultivé des tissus de la souche chlorophyllienne de GAUTHERET sur du milieu de MURASHIGE et SKOOG. Ils ne sont pas plus sensibles à la kinétine dans ces conditions que lorsqu'ils sont cultivés sur le milieu de HELLER.

En retardant la sénescence (RICHMOND et LANG, 1957 ; MOTHESS, 1964) la kinétine provoque généralement une augmentation de la teneur en chlorophylle. Cet effet a été constaté par de nombreux auteurs, aussi bien dans des disques de feuilles (OSBORNE, 1962), des feuilles cotylédonaire (FLETCHER et McCULLAGH, 1971), des plantules (SRIVASTAVA et WARE, 1965), des racines (PILET et HOFER, 1966). Comme le signalent ces derniers, il est possible que la kinétine agisse à la fois sur l'anabolisme de la chlorophylle qu'elle stimule, et sur le catabolisme qu'elle réduit. Les différents essais que nous avons effectués sur la souche de Carotte montrent que la kinétine a peu d'effets sur la teneur en CHT, qu'elle stimule cependant très légèrement à partir de 10^{-7} g.ml⁻¹. Elle ne provoque pas de modifications importantes du rapport CHa/CHb et carotènes/CHt, ce dernier augmentant légèrement (Tableau XXXVI). D'autre part, la kinétine ne ralentit pas la perte de chlorophylle qui accompagne le vieillissement des tissus de la souche chlorophyllienne et ne stimule pas davantage la synthèse des pigments dans les colonies de la souche étiolée soumise de nouveau à la lumière (Tableau XXXVII).

La kinétine augmente légèrement la teneur en -SH rapportée au poids de M F, à partir de 10^{-7} g.ml⁻¹ ; mais ce facteur de croissance est sans effet si la teneur en -SH est rapportée au poids sec ou à l'azote protéique. Le rapport -SH/-SH + S-S varie peu, quelle que soit la dose de kinétine ajoutée au milieu de base (Tableau XXXVI).

SOUCHES	KINETINE (g·ml ⁻¹)	DUREE DES CULTURES (jours)				
		0	21	45	60	120
CHLORO - PHYLLIENNE	0	42,1	44,1	50,3	40,5	30,6
	10 ⁻⁶	44,1	40,8	46,5	44,5	31,1
ETIOLEE	0	0,0	34,3	47,5	45,6	34,0
	10 ⁻⁶	0,0	32,7	48,1	43,7	33,1

TABLEAU XXXVII : Influence de la kinétine sur la teneur en chlorophylle de tissus étiolés ou non de souches de Carotte cultivées à la lumière (24 : 0, 2500 lux).

3 - Effets de l'hydrazide maléique

L'hydrazide maléique (HM) provoque chez les Végétaux des modifications très diverses qui ont retenu l'attention des biologistes depuis une trentaine d'années. Dès 1956, PILET publia une analyse critique des effets de cette substance sur des plantes entières, des organes isolés et des cultures de tissus. L'HM est surtout connu comme un puissant inhibiteur de la croissance, notamment de celle des tissus végétaux cultivés in vitro (GAUTHERET, 1952 ; GORIS et BOURIQUET, 1953 ; BOURIQUET, 1960). Selon NOODEN (1969), l'inhibition provoquée par l'HM résulte principalement du blocage des divisions cellulaires, le grandissement des cellules étant peu affecté. Parmi de nombreuses substances capables d'inhiber la prolifération des tissus de Carotte, nous avons choisi l'HM en raison de son action possible sur les radicaux -SH (MUIR et HANSCH, 1953; HUGHES et SPRAGG, 1958). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'acide maléique dont la molécule a une structure comparable à celle de l'hydrazide réagit avec de nombreux composés thiols, notamment la cystéine et le glutathion (MORGAN et FRIEDMAN, 1938).

LEOPOLD et PRICE (1956), puis WELLER et Coll. (1957) confirmèrent les réactions d'addition entre les composés à fonction -SH et l'acide maléique mais ne purent démontrer que l'hydrazide réagit de la même manière que l'acide correspondant. Cependant, en associant de l'HM, du AIA et de la cystéine dans le milieu de culture, BOURIQUET (1960) constate que ces trois composés modifient réciproquement leur propre action et se comportent donc comme des antagonistes.

Au-dessous du seuil de 10^{-8} g.ml⁻¹, l'HM (seul ou associé à 10^{-7} g.ml⁻¹ de AIA) a peu d'effet sur la croissance des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte ; de très faibles doses stimulent même la prolifération. Entre 10^{-8} et 10^{-5} g.ml⁻¹, l'HM inhibe d'autant plus la prolifération que la dose utilisée augmente. Des concentrations supérieures entraînent la mort des cellules (Tableau XXXVIII).

CONCENTRATION EN HYDRAZIDE MALEIQUE (g.ml ⁻¹)	CROISSANCE (mg M F/culture)	CHLOROPHYLLES			COMPOSES SULFHYDRILES		
		CH _T	CH _a	Car	Thiols solubles	-SH . 100	
		(ug.g ⁻¹ M F)	CH _b	CH _T	(nM.g ⁻¹ M F)	(nM.g ⁻¹ M S)	-SH . S-S
0	1130	48,2	2,65	2,95	330	540	76,2
10 ⁻⁹	1155	44,8	2,95	3,10	345	540	78,1
10 ⁻⁸	1110	44,0	2,60	3,00	340	560	75,3
10 ⁻⁷	1070	41,6	2,75	3,05	350	600	78,5
10 ⁻⁶	800	37,5	2,70	2,85	360	520	76,6
10 ⁻⁵	420	30,1	2,80	2,65	340	495	74,3
10 ⁻⁴	150	25,4	2,50	2,80	-	-	-

TABEAU XXXVIII : Effets de la concentration de l'hydrazide maléique sur :

- la croissance des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte
- la teneur en chlorophylle totale (CHT) et les rapports CHa/CHb et carotènes/CHT;
- la teneur en -SH solubles et le pourcentage de thiols réduits.

les analyses sont effectuées au 45ème jour de culture

On sait depuis longtemps que l'HM diminue les échanges respiratoires et que cette inhibition est plus importante à pH acide (NAYLOR et DAVIS, 1951). Dans les tissus de Carotte, la respiration est ralentie, mais

proportionnellement moins que la croissance (Tableau XXXIX). Il est vrai qu'en milieu gélosé, les variations du pH sont peu importantes. Ce résultat suggère que l'inhibition de la prolifération, provoquée par l'hydrazide maléique, ne résulte pas du seul blocage de la respiration.

En même temps qu'il ralentit la croissance, l'hydrazide maléique provoque une diminution relativement importante de la teneur en chlorophylle. Les rapports CH_a / CH_b et carotènes / CH_f sont cependant peu modifiés (Tableau XXXVIII).

L'hydrazide maléique est sans effet sur la teneur en thiols solubles des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte et ne modifie pas le rapport $-SH / -SH + S-S$ (Tableau XXXVIII).

4 - Effets combinés du AIA et de l'hydrazide maléique

Nous avons associé l'HM (10^{-6} et 10^{-5} mg.l⁻¹) à différentes doses de AIA (10^{-8} à 10^{-4} mg.l⁻¹). La croissance, la respiration et la teneur en -SH solubles des tissus de Carotte (souche chlorophyllienne) ont été mesurées après 45 jours de culture.

HM AIA (μ.l ⁻¹) (μ.l ⁻¹)	CROISSANCE (Δ M F (mg))			RESPIRATION (μl O ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹ M F)			COMPOSES SULFHYDRILÉS (nM -SH.g ⁻¹ M F)					
	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵				$\frac{-SH}{-SH + S-S} \cdot 100$		
	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
0	518	394	338	51,0	55,2	40,4	265	280	265	67,6	73,1	68,9
10 ⁻⁸	614	500	445	55,6	60,5	39,3	285	250	275	76,0	80,9	81,1
10 ⁻⁷	827	692	522	46,8	44,9	41,5	280	305	290	80,0	81,9	80,8
10 ⁻⁶	926	795	615	55,7	49,3	45,2	315	370	320	84,0	81,5	78,0
10 ⁻⁵	810	508	546	62,7	67,5	42,3	390	430	410	83,8	84,2	85,8
10 ⁻⁴	466	498	493	72,5	63,6	39,7	535	490	530	82,7	82,7	80,2

TABLEAU XXXIX : Action conjuguée de l'acide indolylacétique (AIA) et de l'hydrazide maléique (HM) sur la croissance, la respiration et l'état des composés sulfhydrilés acido-solubles dans les tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte, cultivés in vitro pendant 45 jours.

Les résultats (Tableau XXXIX) permettent de constater que :

- L'HM réduit la croissance sauf en présence d'une forte dose de AIA. On retrouve donc un effet antagoniste déjà mis en évidence par GAUTHERET (1952) et par BOURIQUET (1960) pour d'autres tissus végétaux cultivé in vitro ;

- L'intensité respiratoire dépend à la fois de la concentration initiale en AIA et en HM du milieu. Le AIA stimule la respiration, même si la dose utilisée réduit la prolifération des tissus. A 10^{-6} g.ml⁻¹ l'HM a peu d'effets ; à 10^{-5} g.ml⁻¹, il réduit les échanges respiratoires quelle que soit la dose de AIA ;

- les variations de la teneur en -SH sont conformes à celles que nous avons observées quand les deux substances sont utilisées séparément. De plus, il apparaît que l'HM n'a aucun effet sur l'évolution des -SH solubles dans les tissus de Carotte, quelle que soit la dose de AIA avec laquelle on l'associe.

- le rapport thiols réduits/thiols totaux est faible en l'absence de AIA. Il est maximum pour 10^{-6} ou 10^{-5} g.ml⁻¹ de AIA, c'est-à-dire pour les doses qui stimulent le plus la croissance. Il est peu modifié par la présence d'HM dans le milieu de culture.

C - CONCLUSION ET DISCUSSION

Parmi les résultats obtenus, retenons d'abord ceux qui portent sur les variations des composés sulfhydrilés en relation avec la croissance. Dans les fragments de racine, le AIA réduit la teneur en -SH solubles alors qu'il favorise ou inhibe la prolifération selon la zone considérée. Dans les colonies tissulaires, le AIA, le ANA et le 2,4-D provoquent une importante augmentation de la teneur en -SH qui n'est pas en relation avec la croissance des tissus. Par contre, dans les deux types de cultures, les variations du pourcentage de thiols réduits suivent celles de la croissance et un rapport -SH/S-S élevé caractérise les tissus qui prolifèrent activement.

MARRE et ARRIGONI (1957a) ont relevé des faits comparables au cours de la croissance de fragments de tiges de Pois et de coléoptiles d'Avoine. Des concentrations de AIA et de 2,4-D favorisant l'élongation, provoquent une augmentation de la teneur en glutathion réduit (GSH) et une diminution de celle du glutathion oxydé (GS-SG), soit une modification du rapport GSH/GS-SG en faveur des formes réduites.

Le AIA et le 2,4-D, qui stimulent l'élongation de coléoptiles d'Avoine, de fragments de tige de Pois (MARRE, 1954), de germinations de Soja (KEY et WOLD, 1961) et d'hypocotyles de Concombre (KEY, 1962), provoquent également une augmentation de la teneur en acide ascorbique (AA) et une diminution de celle de l'acide déhydroascorbique (DHA), soit une augmentation du rapport AA/DHA. Dans les tiges de Pois -pour des valeurs du AIA favorisant l'élongation- MARRE et Coll.(1957) trouvent une bonne corrélation entre la croissance et la valeur des rapports GSH/GS-SG et AA/DHA. Cependant des doses de AIA supraoptimales qui réduisent l'élongation et diminuent la valeur du rapport AA/DHA déterminent encore l'augmentation du rapport GSH/GS-SG. La diminution du rapport AA/DHA, provoquée par des doses supraoptimales d'auxinomimétiques a été retrouvée plus récemment par LIN et KEY (1967) sur quatre sortes de tissus végétaux. Contrairement aux résultats des travaux antérieurs, ces auteurs n'ont pas observé de corrélation entre les variations de l'équilibre AA/DHA et l'élongation des cellules provoquée par des concentrations optimales de AIA.

Les résultats que nous avons obtenus diffèrent de ceux qui viennent d'être rapportés par trois points principaux :

- le temps de contact des tissus avec les facteurs phytohormonaux est beaucoup plus long ;

- les phénomènes enregistrés, en réponse à l'action des "auxines", ne sont pas exactement les mêmes. Chez la Carotte, la croissance des tissus résulte de la multiplication et du grandissement des cellules. Dans les fragments de tige, les hypocotyles, et les coléoptiles, il s'agit presque exclusivement d'élongation.

- le rapport $-SH/-SH + S-S$ n'augmente que si les composés auxiniques stimulent la croissance.

Entre 10^{-9} et 10^{-7} g.ml⁻¹, la kinétine et l'HM modifient peu la prolifération des tissus de Carotte et le rapport $-SH/-SH + S-S$ dans ces tissus. Des doses plus fortes inhibent la croissance mais influent peu sur le pourcentage des composés sulfhydrylés réduits. En ce qui concerne l'HM nos résultats démontrent que l'inhibition de la croissance qu'elle provoque n'est pas due au blocage des radicaux $-SH$. D'ailleurs, NOODEN (1973) avait déjà montré que l'HM ne se combine pas à la cystéine, contrairement à l'iodoacétate qui est un inhibiteur "classique" des fonctions thiols. Notons qu'aujourd'hui on pense plutôt que l'HM intervient sur le métabolisme des acides nucléiques. Cette substance agit en effet comme un antimétabolite de l'uracile (BUTENKO et BASKANOV, 1961 ; COUPLAND et PEEL, 1972 ; VASSEUR, 1978) ou de la thymine (KIM et GREULACH, 1963) et bloque d'une façon générale, les synthèses d'acides nucléiques (LOBOV, 1971 ; NOODEN, 1972 ; RAKITIN et C 1974).

Tous les facteurs de croissance que nous avons utilisés agissent sur la teneur en pigments plastidaux des tissus de Carotte. Le AIA, le ANA et le 2,4-D réduisent la teneur en chlorophylle ; à faible dose, c'est le 2,4-D qui est le plus actif. D'après ARANCIA et ses collaborateurs (1967), le blanchissement des tissus de Carotte provoqué en remplaçant du AIA par du 2,4-D est dû au blocage de la différenciation des plastes au stade de proplastés. Dans de jeunes feuilles de Haricot traitées par du 2,4-D radioactif, HALLAM et SARGENT (1970) ont démontré que le 2,4-D se fixe davantage sur les chloroplastes que sur les autres organites cellulaires et HALLAM (1970) a pu suivre la désorganisation du système lamellaire. Le 2,4-D n'agit pas uniquement au niveau des structures plastidales ; il intervient aussi sur le métabolisme des pigments, inhibant en particulier la synthèse de la chlorophylle et la régénération de la protochlorophyllide 652 (SHEWRY et Coll., 1971). Tout comme le 2,4-D, le AIA et le ANA interviennent certainement sur le métabolisme des pigments plastidaux, puisque ces trois substances de croissance modifient de façon comparable les rapports CHa/CHb et carotènes /CHt dans les tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte.

Si la kinétine a peu d'effets sur cette souche, elle favorise le verdissement et stimule la différenciation des chloroplastes dans d'autres souches de Carotte (BANDIERA et MORPURGO, 1970). Selon ces auteurs, c'est le rapport kinétine/auxine qui intervient et non les valeurs absolues de chacun de ces deux facteurs de croissance, un rapport kinétine/auxine élevé favorisant le verdissement des tissus. De très nombreux travaux ont montré que la kinétine ralentit la sénescence et retarde la dégradation des chlorophylles. STOBART et Coll. (1972) ont démontré qu'elle stimule également la biosynthèse de la chlorophylle et de ses précurseurs dans des feuilles étiolées d'Orge exposées à la lumière. Notre travail ne confirme pas l'action de cette substance sur l'anabolisme de la chlorophylle. Lorsque la kinétine est sans effet sur la croissance d'un tissu, elle le serait également sur le métabolisme des pigments plastidaux et réciproquement. Chez le Tabac, elle agit sur la prolifération et participe à la "maturation" et à la "différenciation" des chloroplastes (STETLER et LAETSCH, 1965).

L'hydrazide maléique inhibe fortement la prolifération des tissus de Carotte et provoque en même temps une diminution importante de la teneur en chlorophylle.

En définitive, l'utilisation de quelques régulateurs de la croissance confirme que c'est le rapport $-SH/-SH + S-S$ et non la valeur absolue de la teneur en $-SH$ (ou en $S-S$) qui est en relation avec la prolifération des tissus de Carotte.

R E S U L T A T S

D E U X I E M E P A R T I E

CROISSANCE D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE *SILENE* (*Silene alba*) :

ANALYSE DES PRINCIPAUX FACTEURS ENDOGENES ET EXOGENES CONTROLANT
LE CYCLE DE CROISSANCE ET LA SYNCHRONISATION DES DIVISIONS CELLULAIRES.

EVOLUTION DES GROUPEMENTS -SH DANS DES CULTURES PARTIELLEMENT
SYNCHRONES.

CHAPITRE 1 : ETUDE DE LA CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE.

A - INTRODUCTION

Il existe plusieurs types de suspensions cellulaires ; seules les cultures en milieu liquide non renouvelé (= batch cultures) présentent un cycle de croissance typique. Aussi, nous semble-t'il utile d'indiquer en quoi elles diffèrent des autres cultures cellulaires et de rappeler brièvement les modalités de la croissance de chaque type de culture.

1 - Les différentes catégories de suspensions cellulaires

a. Cultures en milieu liquide non renouvelé

Le milieu nutritif n'étant pas renouvelé au cours de la culture, sa composition varie progressivement. Il en résulte que les cultures passent par une série de phases au cours desquelles les caractères cytologiques et biochimiques des cellules ainsi que le taux de croissance changent. L'ensemble de ces phases constitue un cycle de croissance qui se répète à chaque nouvelle culture, quand on utilise des cellules arrivées en fin de cycle pour initier de nouvelles suspensions. Selon le but poursuivi, on utilise des volumes de quelques ml ou des volumes très importants (=large-scale cultures) (SHORT et coll., 1969).

b. cultures en milieu liquide renouvelé

Le milieu nutritif est progressivement renouvelé, mais le volume de la culture demeure constant car les apports de "milieu neuf" sont compensés par le soutirage d'égales quantités de "milieu épuisé", s'il s'agit de cultures fermées ou par le soutirage d'égales quantités de suspensions cellulaires (milieu + cellules), s'il s'agit de cultures ouvertes.

Les cultures en milieu renouvelé sont semi-continues lorsque les opérations de renouvellement du milieu, peu fréquentes, se font manuellement. Dans les cultures continues, ces opérations, beaucoup plus nombreuses s'opèrent automatiquement.

On connaît aujourd'hui différents appareils permettant de réaliser des cultures continues de cellules végétales :

- Les chémostats, dans lesquels le taux de croissance et la densité de la culture sont maintenus constants, en raison du taux de dilution (D) choisi (WILSON et coll., 1971 ; KURZ, 1971) :

$$D = \frac{f}{V} (t^{-1})$$

f, est la quantité de milieu neuf ajouté par unité de temps, t, pour une culture dont le volume est V.

- Les turbinostats, dans lesquels c'est la densité de la culture, déterminée automatiquement par la mesure de la D.O., qui commande l'ouverture des valves d'admission de "milieu neuf" et de sortie d'une égale quantité de suspension cellulaire (ERIKSSON, 1965 ; WILSON et coll., 1971 ; STREET, 1973).

- Les phytostats, ne correspondent pas à un type d'appareil bien précis. Pour TULECKE (1966), c'est un appareil fonctionnant en semi-continu ; pour MILLER et coll. (1968), un appareil utilisé pour des cultures continues ou non, dans lequel il est possible de faire des prélèvements automatiques. Plus récemment, BLIGNY (1977) décrit sous le nom de phytostat un appareil dans lequel la croissance est déterminée par mesure automatique de la turbidité de la suspension et qui fonctionne à volonté selon le mode fermé (batch culture), semi-continu ou continu, suivant le principe d'un chémostat ou d'un turbinostat.

- Les fermenteurs sont des appareils initialement prévus pour cultiver des microorganismes. Il est possible de les adapter pour des cultures de cellules végétales. Ils peuvent être utilisés de la même manière que les phytostats.

2 - Courbes de croissance

a. Batch cultures

La figure 24, A représente la courbe de croissance typique d'une culture cellulaire en milieu liquide non renouvelé. Si le temps séparant

deux repiquages successifs est suffisant, la culture passe par toute une série de stades qui ont été bien analysés chez l'Erable par STREET et ses collaborateurs (KING et STREET, 1973) et retrouvés pour la plupart des suspensions cellulaires cultivées dans un milieu nutritif non renouvelé. On notera que le taux spécifique de croissance, μ , et le temps de doublement, t_d , (que l'on peut assimiler au temps de génération, g) varient au cours du cycle de croissance :

- μ est nul pendant la phase de latence ;
 - μ augmente pendant la phase d'accélération ;
 - μ est constant et maximum, pendant la phase exponentielle ;
 - μ diminue pendant la phase de décélération ;
 - μ est nul (ou presque nul) pendant la phase stationnaire ;
 - μ est "négatif" pendant la phase de déclin de la culture
- (Fig. 24, A).

Figure 24, A : Représentation schématique de la croissance d'une suspension cellulaire, en milieu liquide non renouvelé.

- L = phase de latence,
- Ac = " d'accélération,
- Exp = " exponentielle,
- Dē = " de décélération,
- St = " stationnaire,
- D = " de déclin de la culture.

B : Représentation schématique de la croissance d'une suspension cellulaire, en milieu liquide renouvelé.

- 1 : culture semi-continue fermée,
- 2 : " continue fermée,
- 3 : " semi-continue ouverte,
- 4 : " continue ouverte.

La courbe en trait plein représente les variations de la densité cellulaire (nombre de cellules.ml⁻¹); la courbe en pointillés, les variations du taux de croissance (μ).

La flèche blanche (\Rightarrow) indique l'ensemencement initial ; la flèche noire (\rightarrow), un apport de milieu neuf dans la culture.

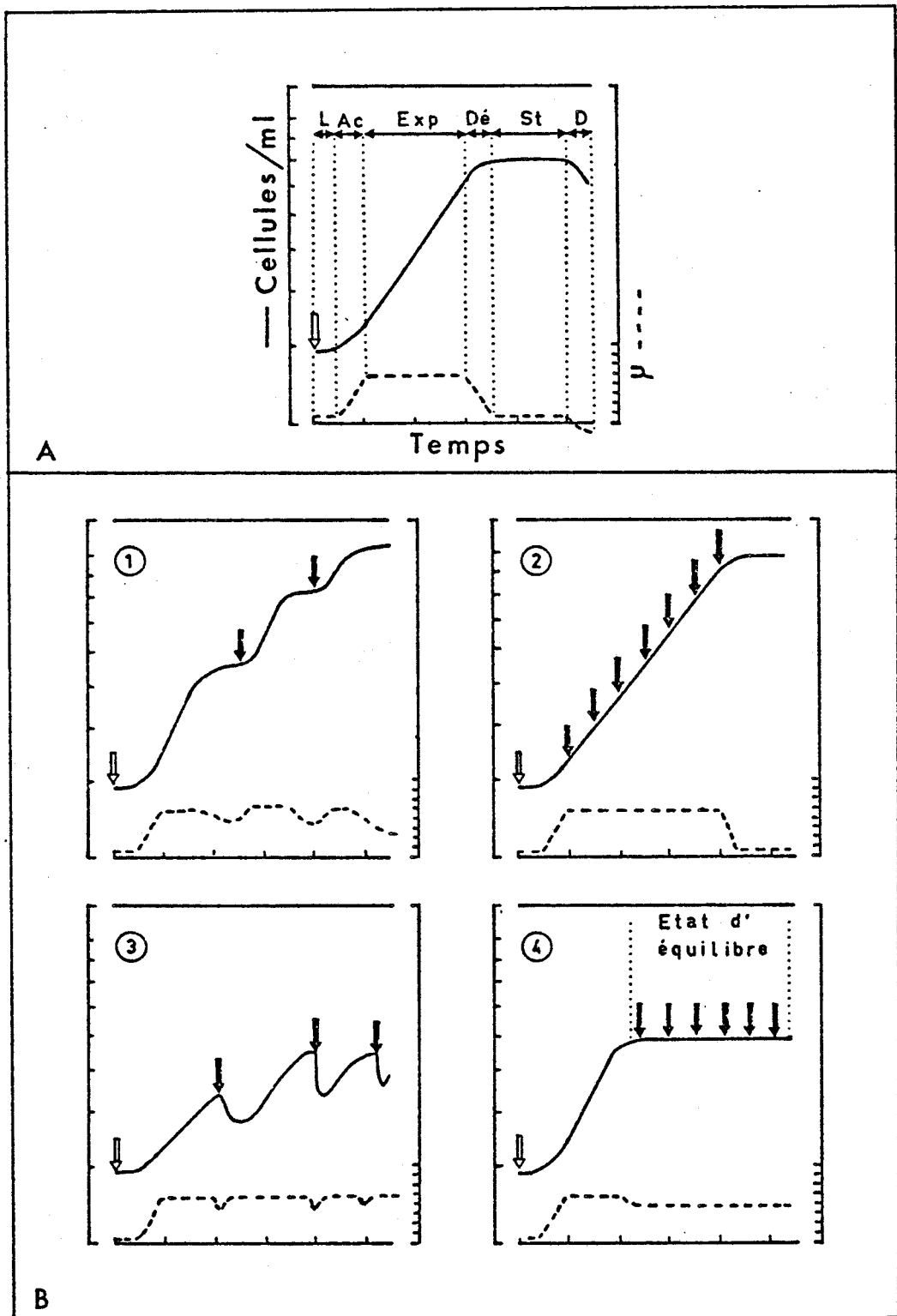


Figure : 24

Pendant la phase exponentielle, $\mu = \frac{dx}{x} \cdot \frac{1}{dt} = \frac{d(\log_e x)}{dt}$ (1)

si x = le nombre de cellules. ml^{-1} au temps t et x_0 = le nombre de cellules. ml^{-1} au temps t_0 .

A partir de l'équation (1), on obtient : $\mu = \frac{\log_e x + \log_e x_0}{t}$

d'où l'on tire : $\log_e x = \mu t + \log_e x_0$, ce qui démontre que la croissance est linéaire pendant la phase exponentielle, et que la pente de la droite est égale à μ .

La biomasse de la culture passe par un maximum au début de la phase stationnaire, reste constante pendant la durée de celle-ci, puis diminue rapidement.

b. Cultures semi-continues et continues fermées

La biomasse augmente jusqu'à ce que tout le volume disponible soit occupé par des cellules (ou jusqu'à ce que l'oxygénation devienne déficiente). Dans une culture semi-continue, le taux de croissance varie plus ou moins selon la fréquence des apports de "milieu neuf" (Fig. 24, B₁). Dans une culture continue, le taux de croissance est déterminé par le taux de dilution, D , choisi (Fig. 24, B₂).

c. Cultures semi-continues et continues ouvertes

La biomasse augmente au début de la culture, puis demeure constante pendant très longtemps. En fait, elle subit des oscillations de très faible amplitude, si la culture est continue (Fig. 24, B₄) et d'amplitude plus forte, si la culture est semi-continue (Fig. 24, B₃).

Dans une culture continue ouverte, dont le taux de dilution est : D ,

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x,$$

- si $\mu > D$, la concentration de la suspension cellulaire augmente ;
- si $\mu < D$, on observe que la concentration diminue (washing-out) ;
- si $\mu = D$, $dx/dt = 0$, ce qui, par définition est le cas d'une culture continue ouverte lorsque celle-ci est en équilibre (steady state).

B - ANALYSE DE LA CROISSANCE D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE
(souche Sa₁), EN MILIEU LIQUIDE NON RENOUVELE

La plupart des cultures ont été effectuées en flacons de 500 ml, disposés sur un agitateur rotatif vertical BIOLAFITTE. Pour déterminer certains paramètres (pH, oxygénation du milieu), et en vue d'appliquer ultérieurement cette technique à d'autres suspensions cellulaires produisant des substances secondaires intéressantes, nous avons également utilisé plusieurs types de fermenteurs.

1 - Cultures en flacons de 500 ml

a. Biomasse et volume cellulaire total

Nous avonsensemencé une série de flacons avec des cellules âgées de 12 jours, à la concentration initiale de 15mg de M F.ml⁻¹ (3 ± 0,2 g pour 200 ml de milieu). Les cultures, placées à 21°C ont reçu en plus de la lumière du jour un éclairage d'appoint fourni par des tubes fluorescents (500 lux, 12 : 12). La croissance a été suivie en mesurant tous les deux ou trois jours, le volume cellulaire total (VCT) d'une culture ainsi que les poids de M F, de M S et d'azote protéique (NP). (DUBOIS, 1975).

Les résultats de ces essais (Fig. 25) laissent apparaître deux périodes différentes au cours du cycle de croissance :

- du 1er au 14ème jour, les quatre courbes sont comparables. Chacun des paramètres peut être utilisé pour mesurer la croissance;
- A partir du 14ème jour, les courbes ne sont plus superposables. Le poids de M F augmente jusqu'au 18ème jour et le VCT jusqu'au 20ème jour. Par contre les poids de N P et de M S diminuent respectivement à partir du 14ème et du 16ème jour. Il en résulte que l'interprétation des expériences sera différente selon le critère de référence retenu.

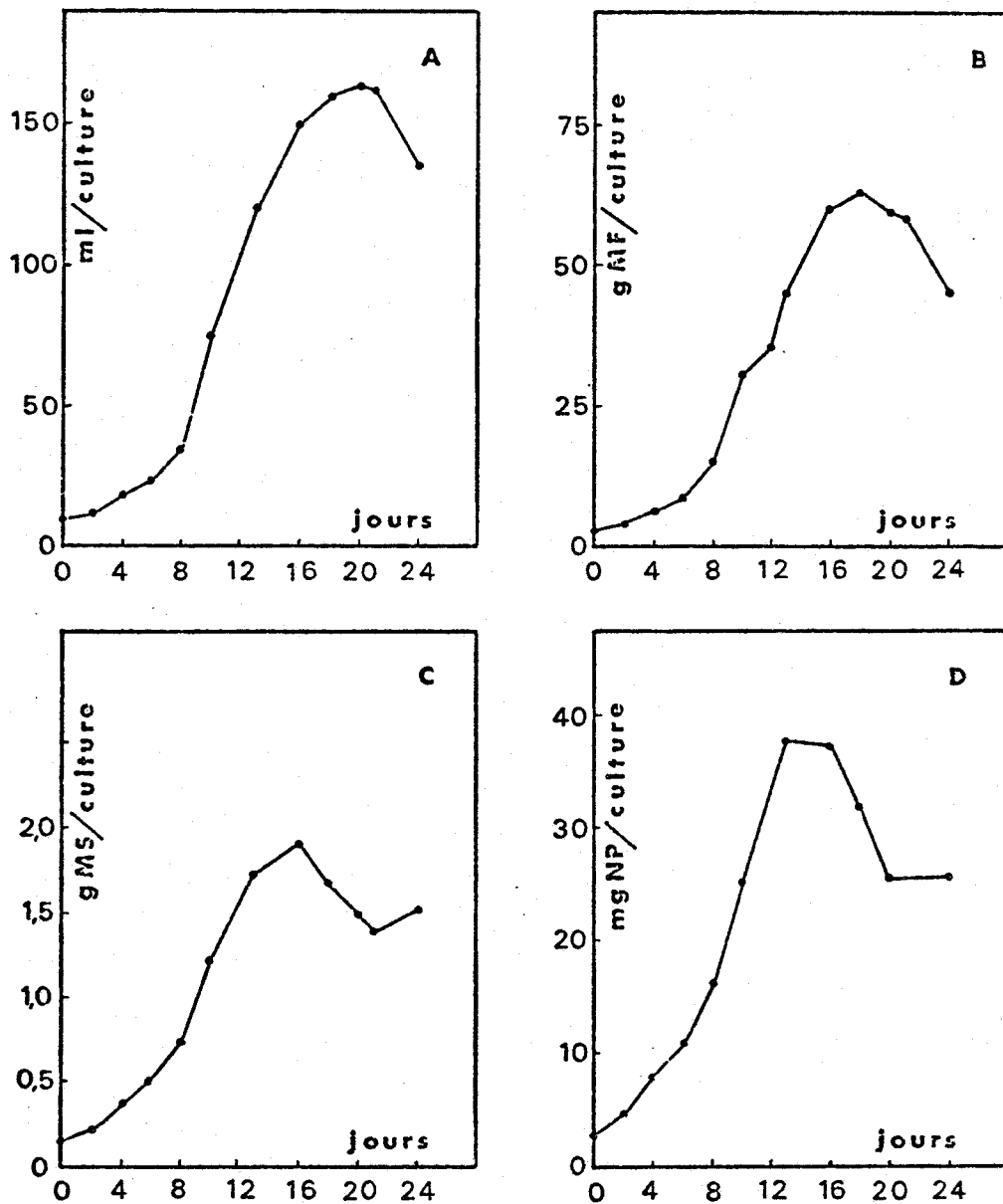


Figure 25 : Croissance d'une suspension cellulaire de Silène exprimée selon différents critères :

A : volume cellulaire total (VCT) ; B : poids de matière fraîche (MF) ; C : poids de matière sèche (MS) ; D : poids d'azote protéique (NP).

Inoculum : $3,0 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 12 jours ; température : 21°C ; lumière du jour + lumière d'appoint : 500 lux, 12 : 12 .

Une représentation semi-logarithmique permet de mieux individualiser les différentes phases de la croissance. Les résultats d'une expérience effectuée dans les mêmes conditions que la précédente, sauf en ce qui concerne la température, portée à 25°C et la lumière qui est continue, sont rapportées dans la figure 26.

La phase de latence est pratiquement inexistante. La croissance est exponentielle du 2ème jour au 6ème ou au 8ème jour, selon le critère de référence utilisé. Après une phase de transition, pendant laquelle le taux de croissance diminue progressivement, la biomasse des cultures passe par un maximum. Selon le critère de référence retenu, il est atteint plus ou moins rapidement : le 12ème jour, si on considère les poids de M S ou de N P, le 15ème jour si on se réfère au poids de M F. La phase stationnaire est très courte et le déclin de la culture rapide.

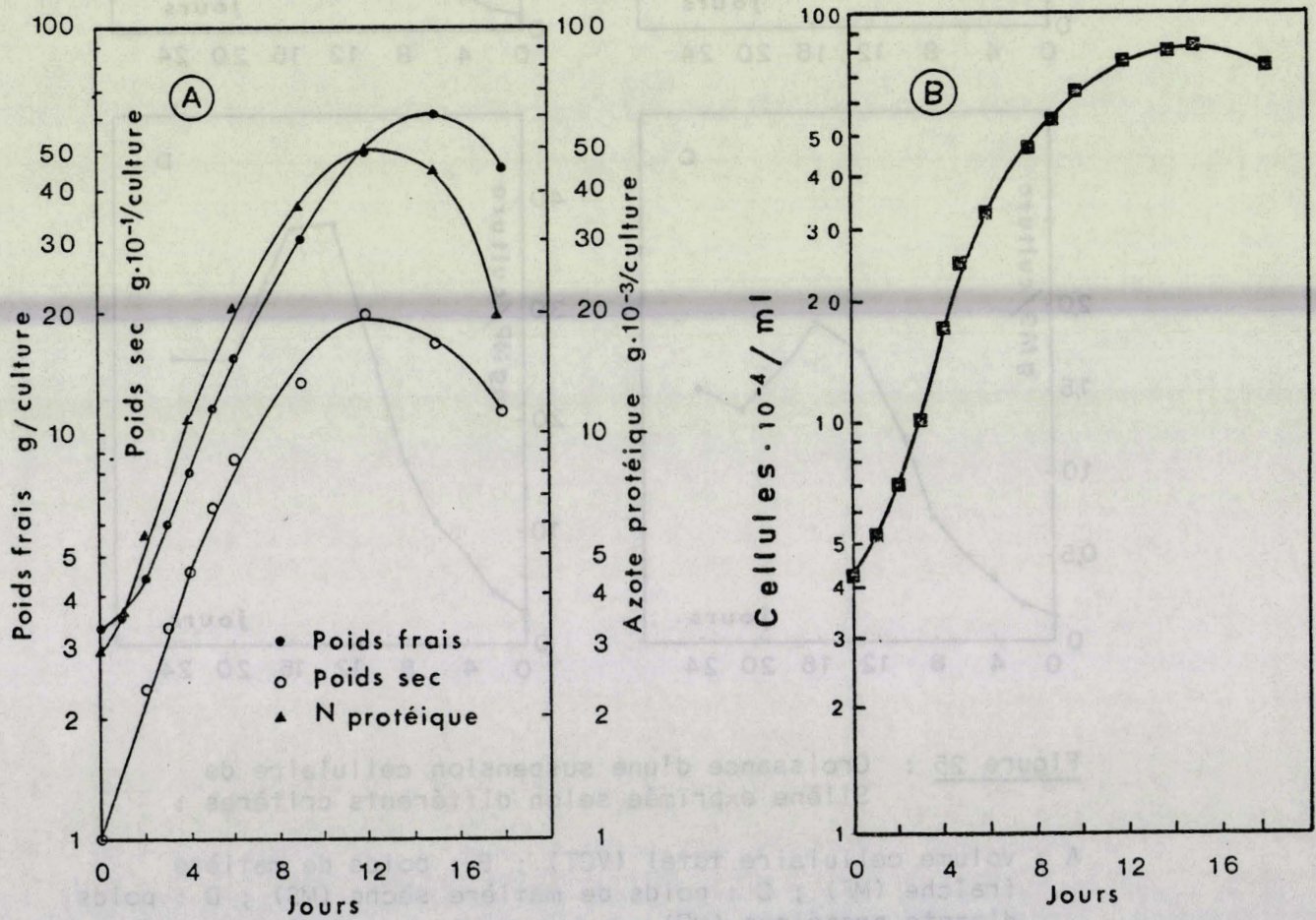


Figure 26 : Représentation logarithmique de la croissance d'une culture cellulaire de Silène (flacon de 500 ml) exprimée selon différents critères :

- A : variations du poids frais, du poids sec et de l'azote protéique
- B : variations du nombre de cellules

Inoculum : $3,0 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

Le temps de doublement du poids frais, mesuré graphiquement pendant la phase de croissance exponentielle est de 55 heures. Le poids sec et la quantité d'azote protéique doublent toutes les 43 heures au cours de cette période.

b. variations journalières du taux de croissance

Les courbes qui traduisent les variations relatives des poids de M F, de M S et de N P sont comparables mais décalées dans le temps (Figure 27). L'accroissement relatif du poids sec est le plus rapide ; il est également le

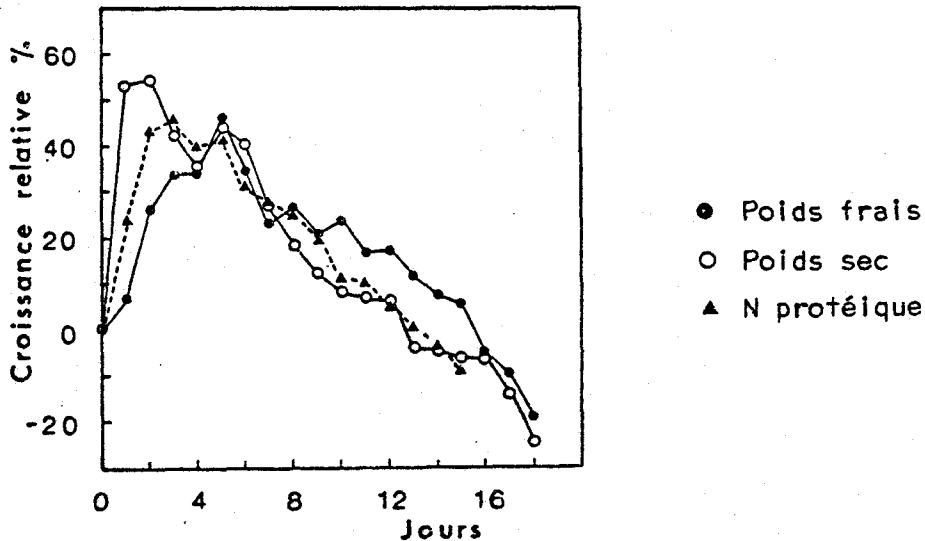


Figure 27 : Variations journalières du taux de croissance. Les accroissements relatifs des poids de matière fraîche, de matière sèche et d'azote protéique sont déterminés de la manière suivante :

$$\frac{\text{Poids (J + 1)} - \text{Poids (J)}}{\text{Poids (J)}} \times 100$$

plus important, dépassant 50 % en 24 heures et 55 % en 48 heures. Il est suivi par l'augmentation de l'azote protéique, maximum le 3ème jour et seulement 2 jours plus tard, par celui du poids frais. A partir du 6ème jour, les courbes évoluent de la même manière ; la diminution du poids de M F étant toutefois moins rapide.

c. nombre de cellules

Une augmentation de la biomasse des cultures exprime aussi bien un phénomène de division ou de grandissement, qu'une modification de la composition

chimique des cellules. Il est donc indispensable d'analyser parallèlement à l'ensemble des critères pondéraux, les variations du nombre de cellules. La comparaison des figures 26A et 26B, autorise les remarques suivantes :

- du 1er au 10ème jour, les variations de la densité cellulaire et celles de la biomasse sont analogues. Au cours de la phase exponentielle, le nombre de cellules par ml double environ toutes les 48 heures ;
- du 10ème au 15ème jour, les 4 courbes de croissance sont différentes ;
- au-delà du 15ème jour, elles traduisent toutes le déclin des cultures.

d. index mitotique

Les cellules utilisées pour initier de nouvelles suspensions ont un index mitotique pratiquement nul. Celui-ci augmente dès le 1er jour de culture, passe par un maximum le 4ème jour puis diminue rapidement du 4ème au 8ème jour et plus lentement par la suite (Figure 28).

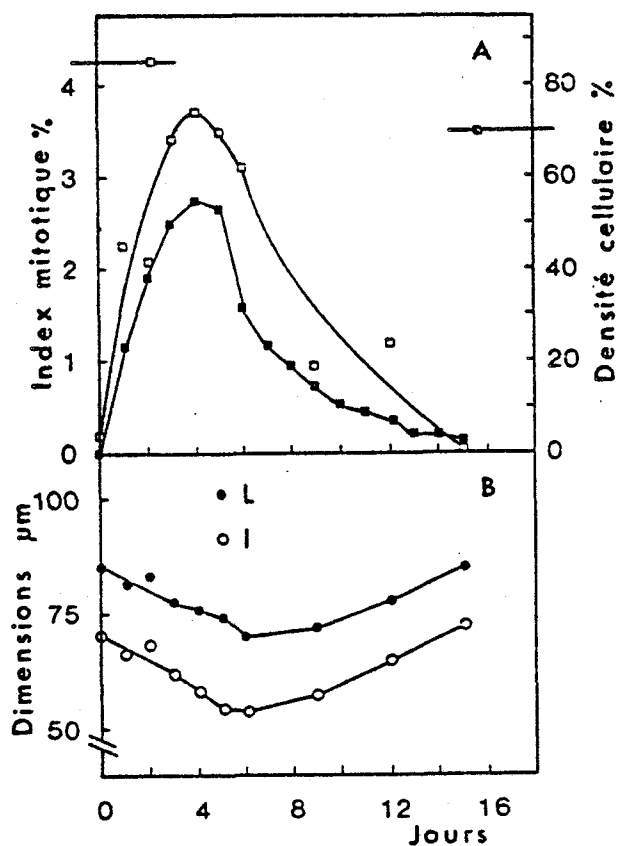


Figure 28 : A : variations journalières de la densité cellulaire (voir légende de la fig. 27) et index mitotique;
B : variations de la taille des cellules au cours de la croissance. L et l représentent respectivement la plus grande et la plus petite dimension des cellules.

Les valeurs de l'index mitotique des cellules de Silène sont faibles. Pourtant, elles sont voisines de celles qui furent déterminées pour d'autres suspensions cellulaires (TORREY et coll., 1962 ; PEAUD-LENOEL et JOUANNEAU, 1971 ; BAYLIS et GOULD, 1974). Rappelons qu'afin de réduire les risques d'erreurs lors des comptages, nous n'avons pas tenu compte des noyaux en début de prophase. Les valeurs rapportées dans la Figure 28 sont donc inférieures aux index mitotiques réels.

Les variations journalières relatives de la densité cellulaire (Figure 28A) suivent très exactement les modifications de l'index mitotique.

e. choix d'un critère de croissance

La comparaison des courbes présentées dans les figures 26 et 27 montre que la croissance des cellules de Silène n'est pas équilibrée pendant toute la durée du cycle, mais uniquement au cours de la phase exponentielle. Il en est d'ailleurs ainsi pour la plupart des autres suspensions cellulaires cultivées en milieu liquide non renouvelé (KING et STREET, 1973). C'est pourquoi le choix d'un critère de croissance est toujours délicat.

Dans les conditions standard de culture, à 25°C et pour un inoculum de 15 mg de M F par ml de milieu de LESCURE modifié, les poids de M F, de M S et de N P, le volume cellulaire total et le nombre de cellules évoluent de la même manière au cours de la phase exponentielle ; ils varient encore dans le même sens pendant la période de croissance ralentie. En conséquence, du 1er au 10ème jour, le poids frais ou le poids sec, faciles à mesurer, seront utilisés pour déterminer la croissance. Au cours de cette période, ils traduisent aussi bien les variations de la biomasse des cultures que celles du nombre de cellules.

Pendant la durée de la phase stationnaire, c'est-à-dire du 12ème au 15ème jour, le nombre de cellules varie peu ; le poids de M F continue d'augmenter, tandis que les poids de M S et de N P diminuent. Nous verrons plus loin (Chap. 4) que des éléments nutritifs essentiels sont épuisés dès le 12ème jour. La mesure simultanée du poids frais et du poids sec permettent encore d'évaluer la croissance globale des cultures, mais on observe des résultats différents et quelquefois contradictoires lorsque l'on rapporte la teneur de certains constituants cellulaires ou les activités enzymatiques à l'unité de M F et de M S.

Pour des suspensions cellulaires cultivées dans des conditions différentes ou sur des milieux différents, on déterminera simultanément les poids de M F et de M S et on calculera le pourcentage de M S. Dès que celui-ci s'écarte des valeurs moyennes obtenues dans les conditions standard de culture il est indispensable de procéder au comptage des cellules (ou de déterminer l'index mitotique) et d'examiner au microscope l'état des cellules. Un pourcentage de M S trop élevé au cours de la phase stationnaire peut aussi bien résulter de l'accumulation de substances de réserve dans le cytoplasme (amidon, par ex.) que de la mort d'un grand nombre de cellules ; la rupture des vacuoles provoquant la diminution du poids frais, sans modifier de façon importante le poids sec.

2 - Cultures en fermenteurs

a. problèmes techniques et méthodologiques

La culture en masse des cellules de *Silène* dans des fermenteurs conçus pour cultiver des microorganismes pose plusieurs problèmes d'ordre technique et méthodologique. Des essais entrepris à partir de 1975 en collaboration avec C. BRASSART et P. EB ont permis de mieux évaluer ces difficultés et d'en résoudre quelques unes. Une partie des résultats obtenus ayant déjà été publiés (BRASSART, 1976 ; BRASSART, EB, PLICHON & DUBOIS, 1976), nous ne mentionnerons ici que les points essentiels.

α. asepsie

Les premières cultures ont été effectuées avec du milieu de LESCURE dépourvu d'antibiotiques. Dans tous les cas des bactéries sont apparues en moins d'une semaine et dès lors se sont multipliées très rapidement. Après isolement des contaminants, nous avons entrepris d'éprouver leur résistance vis à vis de trois antibiotiques : la pénicilline, la streptomycine et l'oxytétracycline. Parallèlement, nous avons déterminé les effets de ces substances sur la croissance des cellules de *Silène* cultivées dans des flacons de 500 ml

La pénicilline est moins efficace que les deux autres antibiotiques

- 8 souches/ 16 sont sensibles à 50 U.ml^{-1} et 10/16 à 100 U.ml^{-1} de pénicilline ;

- 12 souches/ 16 sont sensibles à $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'oxytétracycline
- 14 souches/ 16 sont sensibles à $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de streptomycine

La pénicilline est cependant beaucoup mieux tolérée par les cellules de Silène :

- la croissance n'est pas réduite en présence de 50 ou 100 U.ml^{-1} de pénicilline ;
- la croissance est réduite de 15 à 25 % en présence de $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'oxytétracycline et d'environ 25 % avec $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de streptomycine.

Les courbes rapportées sur la Figure 29 montrent qu'à faible dose (5 U.ml^{-1}) la pénicilline stimule légèrement la croissance des cellules de Silène et que les pourcentages de M S ne sont pas affectés par des doses 10 fois et même 20 fois plus élevées. Par contre, les fortes concentrations des deux autres antibiotiques inhibent la croissance et provoquent une augmentation du pourcentage de M S qui résulte de la mort d'un certain nombre de cellules.

Ces résultats nous ont conduit à ajouter 50 U.ml^{-1} de pénicilline dans le milieu utilisé pour les cultures en fermenteur. Les contaminations ne furent pas totalement éliminées, mais elle n'apparurent plus avant le 8ème ou le 10ème jour. Afin de compenser la perte d'activité de l'antibiotique qui se manifeste au cours de la culture (BRASSART, 1976), on peut soit ajouter 50 U.ml^{-1} de pénicilline à la fin de la 1ère semaine, soit utiliser une dose initiale deux fois plus forte.

Pour maintenir aseptiques des "cultures géantes" de cellules de Menthe, WANG et STABA (1963) utilisent en permanence de la bacitracine ($5 \mu\text{g.ml}^{-1}$) qui est plus active que la pénicilline employée à une dose 10 fois plus élevée. La prolifération des cellules de Menthe, comme celle des cellules de Silène, est inhibée par une dose de $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'oxytétracycline.

Etant donné les modifications d'ordre génétique que les antibiotiques peuvent provoquer, les cellules cultivées en fermenteur n'ont jamais été réutilisées pour initier de nouvelles cultures. Cependant après 4 passages dans un milieu contenant 100 U.ml^{-1} de pénicilline, ni le taux de croissance

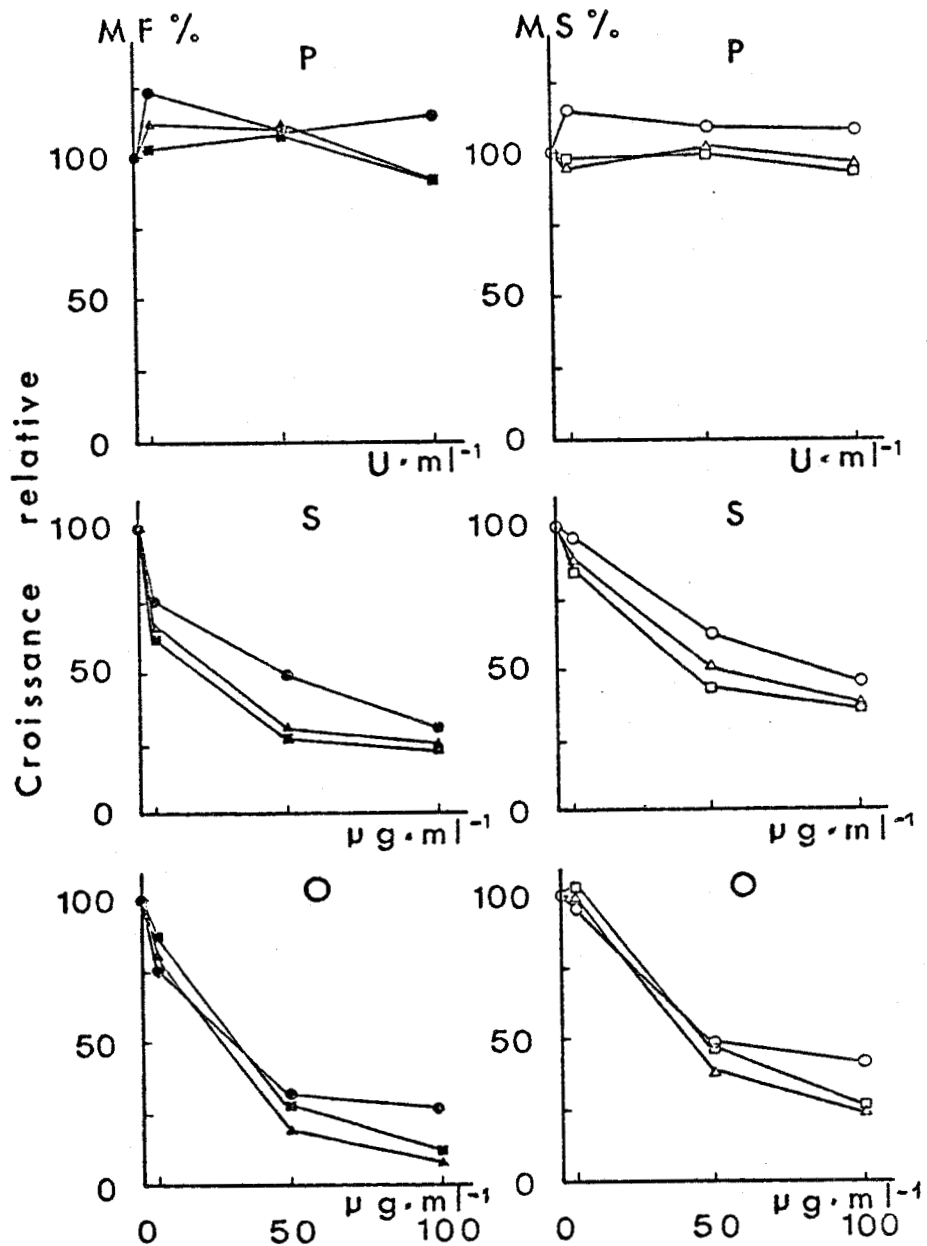


Figure 29 : Sensibilité des cellules de Silène à trois antibiotiques : pénicilline (P), streptomycine (S) et oxytétracycline (O). Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière fraîche (M F %) et de matière sèche (M S %) par rapport aux témoins. Les mesures sont effectuées après trois passages successifs de 14 jours chacun (1er passage : ● ○; 2e passage : ■ □; 3e passage: ▲ △).



ni la biomasse maximum ne diminuent.

Signalons enfin que des cellules de Silène cultivées pendant 14 jours en présence de $5 \mu g \cdot ml^{-1}$ de streptomycine ou d'oxytétracycline, puis transférées dans un milieu neuf dépourvu d'antibiotiques prolifèrent d'une

façon presque normale dès le premier passage.

β. agitation et aération du milieu

On pouvait craindre que l'agitation du milieu provoquée par la rotation de pales métalliques détériore les cellules, en raison de leur taille très importante, comparée à celle des Bactéries (et même des Levures) pour lesquelles ces appareils ont été conçus.

Les deux premiers fermenteurs que nous avons utilisés : un appareil BIOLAFITTE équipé d'une cuve de 20 litres et un appareil NEW BRUNSWICK muni d'une cuve de 15 litres conviennent bien pour des cellules végétales. Au même stade de la culture, il n'y a pas plus de cellules mortes en fermenteur qu'en flacon de 500 ml. Il faut toutefois prendre soin de choisir une vitesse de rotation relativement faible et une aération du milieu modérée pour ne pas provoquer trop de turbulences à l'intérieur de la cuve.

Nous avons également utilisé un fermenteur SETRIC muni d'une cuve beaucoup plus petite (4 litres), qu'il serait plus facile d'utiliser pour des cultures en milieu renouvelé. Le système d'entraînement de l'axe prévu dans ce modèle provoque une détérioration très importante des cellules, même lorsqu'on réduit au minimum la vitesse de rotation. Après avoir fait modifier le dispositif d'entraînement de l'axe, nous avons obtenu d'excellents résultats.

Nous avons effectué une série d'essais en vue de déterminer la vitesse de rotation optimale et les conditions d'oxygénation les plus favorables. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un débit de 3 ou 4 litres d'air par mn dans les fermenteurs de 15 et 20 litres et de 1 ou 2 litres. mn^{-1} , pour la cuve de 4 litres (à la pression de 2 bars). La vitesse de rotation la plus favorable est de 200 t. mn^{-1} .

λ. choix d'un critère de croissance

Le prélèvement d'échantillons significatifs devient difficile après une semaine de culture. En effet, malgré l'agitation, une partie des cellules se déposent dans le fond de la cuve. D'autres s'agglomèrent autour des tubulures et de l'axe ou adhèrent le long des parois latérales du fermenteur, à la limite supérieure atteinte par le milieu. On pouvait donc craindre que l'erreur relative commise augmente au fur et à mesure que la culture se prolonge. Il n'en est rien. Après 2 semaines, la biomasse calculée en multipliant le poids moyen de 2 ou 3 échantillons de 5-10 ml par le volume théorique de la culture diffère peu du poids total de cellules récupérées dans la cuve et pesées immédiatement après l'arrêt du fermenteur.

L'erreur commise est inférieure à 10 %.

Par contre, la valeur du pH ne peut être retenue, car ce paramètre varie relativement peu au cours de la croissance des cellules de Silène (voir chapitre 3,C), contrairement à ce que l'on observe chez l'Erable par exemple (MORVAN, 1974). De même la mesure de la turbidité de la suspension, souvent employée pour contrôler la croissance des cultures continues serait difficile à utiliser, car les cellules de Silène forment des agrégats taille variable et ont tendance à sédimenter.

Les concentrations de saccharose et de nitrates du milieu conditionnent la prolifération des cellules de Silène (voir chapitre 4). Aussi, la consommation du sucre et de l'azote nitrique, facilement mesurables à partir de prises d'essais de quelques ml, permettent-elles de suivre de façon satisfaisante le déroulement des cultures en fermenteur.

Pour évaluer la croissance, nous avons effectué 1 ou 2 prélèvements journaliers de 5-10 ml de suspension et nous avons mesuré d'une part le poids de M F et de M S des cellules, d'autres part la teneur en sucre du milieu.

b. cycle de croissance

Si l'on suit l'évolution de la croissance en fonction du temps (Figure 30), on remarque qu'il n'y a pas de phase de latence. La phase exponentielle dure de 6 à 13 jours selon qu'on se réfère au poids de M S ou de M F. Pendant cette période, le poids de M S double environ tous les 3 jours et celui de M F tous les 4 jours. Le décalage, déjà constaté dans des cultures réalisées en flacons de 500 ml, est encore accusé en fermenteur.

La consommation du sucre est relativement faible pendant les 3 premiers jours; elle est très rapide du 4ème au 14ème jour. L'entrée en phase stationnaire de la culture coïncide avec l'épuisement du milieu en sucre; celui-ci est total au 15ème jour.

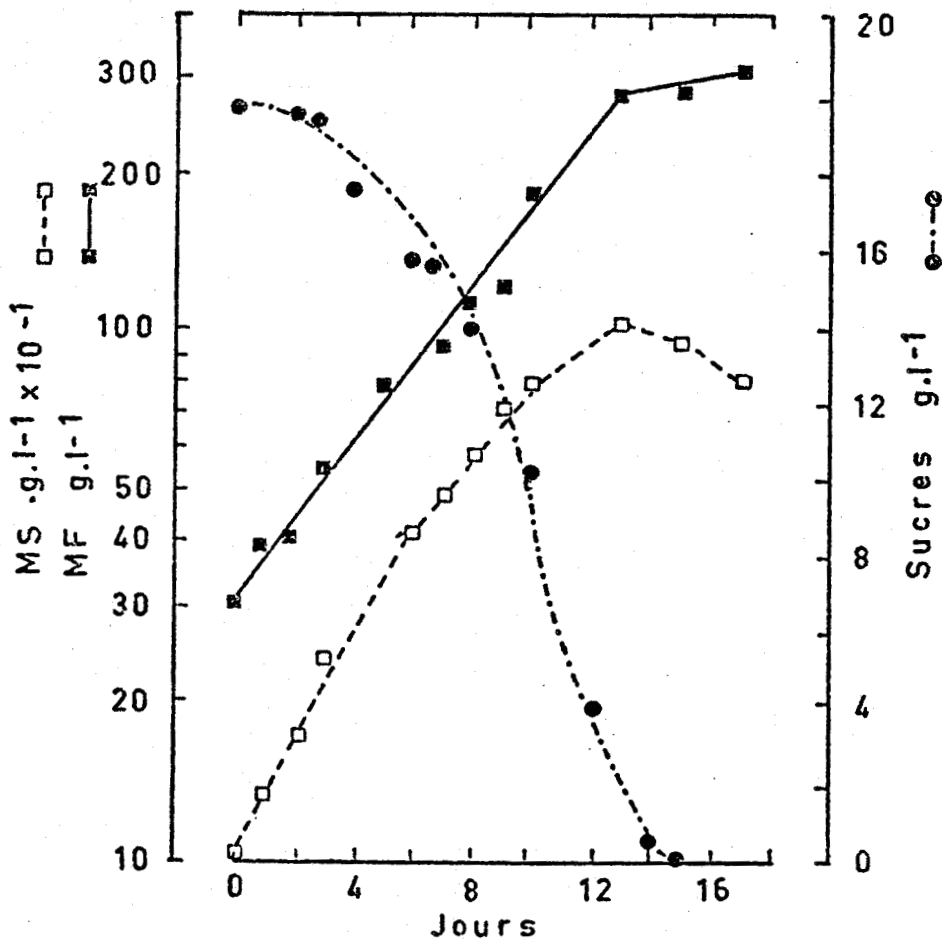


Figure 30 : Croissance des cellules de *Silène* cultivées en fermenteur (cuve de 20 l contenant 10 l de suspension) et variations de la teneur en sucres du milieu de culture.

- la croissance est exprimée en g de M F ou de M S par culture ;
- les sucres sont rapportés en g de saccharose par litre de milieu (concentration initiale : 20 g.l^{-1})

Inoculum : 400 ml de suspension cellulaire, de 14 jours ;
température : 25°C ; lumière du jour .

3 - Comparaison du cycle de croissance en fermenteur de 20 litres et en flacon de 500 ml

Les résultats rassemblés dans le Tableau XL ont été repris ou calculés à partir des figures 26 et 30. Si l'on considère la biomasse et le rendement des cultures, les différences sont minimes. Il y a par contre un décalage des courbes, car le taux de croissance est plus faible en fermenteur. Plusieurs facteurs sont responsables de ce fait :

	FLACON DE 500 ml	FERMENTEUR
<u>CONDITIONS EXPERIMENTALES :</u>		
- Température	25°C	25°C
- Lumière	lumière du jour + appoint photopériodique (500 lux, 12 : 12)	lumière du jour
- Volume du milieu	200 ml	10 l
- Inoculum	cellules de 14 j : 15 mg de MF/ml	suspension cellulaire de 14 j : 40 ml/l
<u>PARAMETRES DE LA CROISSANCE :</u>		
- Durée de la phase de latence	0 - 24 h selon le critère de référence	moins de 24 h
- Durée de la phase exponentielle	5 - 6 j (MS) 6 - 8 j (MF)	6 - 7 j (MS) 10 - 13 j (MF)
- Temps de doublement pendant la phase exponentielle	43 h (MS) 55 h (MF)	72 h (MS) 96 h (MF)
- Temps nécessaire pour obtenir le maximum de biomasse	12 j (MS) 14 j (MF)	12 - 14 j (MS) 16 - 18 j (MF)
- Croissance relative : $\frac{MF (J_n - J_0)}{MF (J_0)}$	19	9
- Rendement : $\frac{\text{biomasse } (J_n)}{\text{saccharose consommé}}$	0,50 g de MS/g de sach. 14,00 g de MF/g de sach.	0,45 g de MS/g de sach. 13,50 g de MF/g de sach.

TABLEAU XL : Comparaison de quelques paramètres de la croissance d'une culture cellulaire de *Silène* en fermenteur de 20 litres et en flacon de 500 ml disposé sur un agitateur rotatif.

- Au cours des premiers jours de culture, la suspension est plus dispersée dans la cuve du fermenteur que dans les flacons de 500 ml, en raison du type d'agitation qui est très différent. Il est possible que l'index mitotique soit plus faible dans de très petits agrégats. C'est en tout cas ce qu'observent TORREY et Coll. (1962) dans des cultures de *Convolvulus arvensis* et HENSHAW et Coll. (1966) dans des suspensions cellulaires d'Erable .

- Nous pensons plutôt que ces différences sont liées au mode d'ensemencement des cultures : cellules seules, pour les flacons de 500 ml, cellules plus milieu pour le fermenteur. Or, le milieu d'une suspension cellulaire de 14 jour renferme de nombreuses substances, notamment des protéines sécrétées par les cellules vivantes au cours de la culture ou provenant de la rupture des parois cellulaires mortes. Nous savons qu'il contient en particulier plusieurs isoperoxydases et qu'il présente une forte activité peroxydasique (LEGRAND et DUBOIS, 1977)

- L'oxygénation des cultures qui intervient sur le déroulement de la croissance (2ème partie, 3, D) est très différent dans les deux types de cultures.

C - OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES

1 - Degré de séparation des cellules

Comme la plupart des autres suspensions cellulaires végétales, celle de Silène ne renferme qu'un petit nombre de cellules réellement isolées. Elle présente surtout des agrégats constitués de quelques cellules à plusieurs centaines d'unités et mesurant de 100 à 4000 μm (Pl. IX). Des tamisages effectués à partir d'une culture entretenue pendant 14 jours à 25°C donnent la répartition suivante :

- agrégats inférieurs à 200 μm (2 à 10 cellules) ..: 2,2 % du poids de M F
- " compris entre 200 et 500 μm :14,3 % " " " "
- " " " 500 et 1000 μm :53,2 % " " " "
- " " " 1000 et 2000 μm :19,4 % " " " "
- " " " 2000 et 4000 μm : 2,7 % " " " "

De nombreux examens microscopiques échelonnés au cours de la culture montrent que la taille des agrégats augmente pendant la phase exponentielle et passe par un maximum pendant la période de croissance ralentie. Quelques rares cellules isolées et des petits amas de moins de 10 cellules apparaissent de nouveau à la fin de la phase stationnaire.

Dans les suspensions cellulaires d'Erable, l'agrégation des cellules s'accroît également pendant la période de croissance exponentielle, puis diminue (HENSHAW et Coll., 1966). Selon KING et STREET (1973), c'est pendant la phase stationnaire que le pourcentage d'amas de moins de 10 cellules est le plus élevé. Il en est de même dans les cultures de Convolvulus arvensis et de Daucus carota, bien que la proportion du poids de M F total que représentent les petits amas de moins de 100 μm diminue régulièrement au cours de la culture (TORREY et REINERT, 1961).

2 - Taille et forme des cellules

A côté des cellules "normales" mesurant de 35 à 100 μm , on rencontre des cellules "géantes" de 100 à 200 μm ; certaines dépassent même 300 μm

(Planche IX, Fig. 7). Les cellules "géantes" étant beaucoup moins nombreuses que les autres, nous n'en avons pas tenu compte lorsque nous avons analysé les variations de la taille moyenne des cellules, au cours du cycle de croissance (Fig. 28, B).

La taille des cellules diminue pendant les premiers jours, passe par un minimum (environ 55 x 70 μm) vers le 6ème jour -au moment où les divisions cellulaires sont les plus nombreuses- puis augmente progressivement au fur et à mesure que l'index mitotique diminue (Figure 28, A et B).

L'augmentation de la taille moyenne des cellules et du pourcentage de cellules "géantes" au cours de la phase stationnaire explique que le poids de M F continue d'augmenter, tandis que le poids de M S et de protéines diminuent. D'autre part, ce sont les cellules les plus grandes et les plus fortement vacuolisées qui se lysent les premières au cours de la phase stationnaire et de déclin, ce qui provoque ou favorise le morcellement des agrégats. Ce processus est très important pour la dynamique de la culture : il empêche la formation de gros amas et contribue à réduire l'hétérogénéité de la suspension (Planche IX, Fig. 7 et 8).

Les cellules isolées sont sphériques. Les autres présentent généralement une face aplatie, en particulier lorsqu'elles viennent de se diviser. En fin de culture, quand elles cessent de se multiplier, elles tendent de nouveau à s'arrondir (Planche IX, Fig. 5 et 7) . Il en résulte une réduction de la surface de contact entre les cellules voisines, ce qui facilite probablement leur dispersion dans le milieu liquide. On ne rencontre jamais d'éléments allongés dans les cultures cellulaires de Silène, alors que des cellules allongées et sphériques s'observent simultanément dans d'autres suspensions cellulaires, notamment de Haricot (NICKELL, 1956) et de Carotte (STEWART et Coll., 1958).

3 - Structure et ultrastructure

Les cellules de Silène présentent la structure habituelle des cellules végétales cultivées en milieu liquide agité (SUTTON-JONES et STREET, 1968 ; NOUGAREDE et Coll., 1968 a et b ; DAVEY et STREET, 1971 ; FOWKE et Coll., 1974 ; WITHERS, 1976).

Elles sont caractérisées par la présence d'une ou de plusieurs vacuoles de grande taille. Leur structure est de ce fait beaucoup plus proche de celle des cellules cambiales que de celle des cellules initiales localisées dans les méristèmes apicaux. Des observations réalisées en microscopie photonique et électronique montrent que leur structure varie au cours du cycle de croissance et permettent de définir trois stades de différenciation.

a. les cellules jeunes (4 - 6 jours)

Ce sont les plus petites ($50 \times 70 \mu\text{m}$). Elles présentent un cytoplasme abondant riche en ribosomes. A côté des mitochondries, on rencontre des proplastes très nombreux, dont certains semblent se diviser, des leucoplastes amylières et quelques petites vacuoles (Pl. X, Fig. 1 et 2).

Le noyau, généralement lobé, a une taille très variable ($10-20\mu\text{m}$) et renferme souvent plusieurs nucléoles. Il se colore rapidement en jaune-brun par le réactif iodo-ioduré et beaucoup plus lentement en bleu-violet par le violet cristal très dilué. La coloration par le réactif de Schiff, après hydrolyse par HCl à chaud est longue à se développer (plusieurs heures) ; elle est très intense. La chromatine colorée par la méthode de Feulgen ou par le carmin-acétique apparaît réticulée et on n'observe pas de chromocentres. De nombreux noyaux sont en prophase. La figure 4 de la planche X montre une plaque métaphasique en vue équatoriale.

En microscopie photonique, on reconnaît des cellules jeunes à leur cytoplasme trabéculaire abondant et à leur cytoplasme périnucléaire riche en leucoplastes contenant plusieurs grains d'amidon (Pl. IX, Fig. 3). Ces organites, colorés en bleu-noir par le réactif iodo-ioduré et en rouge par le réactif de Schiff (technique du P.A.S.) proviennent de la différenciation de proplastes difficiles à distinguer des mitochondries quand ils ne renferment pas de vésicules amylières (Pl. X, Fig. 2 et 3).

b. cellules en phase de croissance ralentie (8 - 12 jours)

Elle se distinguent d'abord des précédentes par une taille plus grande et par une forme plus arrondie. Le cytoplasme est moins abondant et moins dense (Pl. XI, Fig. 1 et 2). On note surtout une réduction importante du nombre et de la taille des leucoplastes amylières présents dans le cytoplasme périnucléaire alors que les mitochondries demeurent très nombreuses (Pl. XI, Fig. 1 et 3).

Après 10 jours de culture dans des conditions standard, les divisions sont rares. La plupart des noyaux sont fortement lobés (Pl. XI, Fig. 1) et les parois sont plus épaisses que dans les cellules jeunes (Pl. XI, Fig. 2).

c. cellules en phase stationnaire (14 jours)

Les cellules prélevées dans des suspensions âgées de 14 jours dépassent généralement 80 μm de diamètre. En microscopie photonique, elles paraissent "vides". Le cytoplasme périphérique est réduit à un mince liseré ; le cytoplasme trabéculaire est inexistant. En plus de la grande vacuole centrale on rencontre de nombreuses petites vacuoles dans le cytoplasme périphérique et périnucléaire (Pl. XII, Fig. 1, 2, 3).

Les noyaux, très fortement lobés, présentent une chromatine très claire ; ils ne se divisent plus (Pl. XII, Fig. 1).

A l'intérieur d'un même agrégat, les parois des cellules diffèrent par leur épaisseur et par leur structure (Pl. XII, Fig. 2). Les plus fines (0,3 μm) sont denses et paraissent homogènes. Les plus épaisses (2 μm) sont claires et constituées d'une série de strates parallèles à la surface de la cellule (Pl. XII, Fig. 3). On observe parfois des fragments de parois provenant de cellules mortes qui relient deux cellules (Pl. IX, Fig. 4), mais pas de paroi épaisse entourant plusieurs cellules, comme c'est le cas pour d'autres suspensions cellulaires (WITHERS, 1976 ; TORREY et LANDGREN, 1977), bien qu'il soit difficile de distinguer cette paroi d'une cloison primaire entourant le protoplaste.

Nous avons tenté de caractériser la nature des principaux constituants des parois de cellules provenant de cultures âgées de 14 jours. Elles renferment beaucoup de composés pectiques, mis en évidence par la coloration au rouge de ruthénium. Par contre, elles présentent peu d'affinités pour le réactif iodo-phosphorique et pour le chlorure de zinc iodé, ce qui indique que la cellulose n'est pas très abondante. Nous n'avons observé aucune coloration des parois après traitement à la phloroglucine (1% dans l'éthanol 50° pendant 10 mn + une goutte de HCl). Par la technique de MAULE (permanganate de K à 1% pendant 5 mn ; HCl à 12%, jusqu'à décoloration ; NH_4OH), la paroi ne se colore pas, tandis que l'intérieur de la cellule est généralement coloré en jaune. TUNMANN et ROSENTHALER (1931, p. 981) signalent que la coloration de MAULE n'est pas toujours spécifique de la lignine ; elle peut avoir lieu même lorsque la coloration à la phloroglucine est négative, ce qui est le cas ici. Dans d'autres suspensions cel-

lulaires, la lignification dépend des conditions de culture, notamment de la teneur en sucre du milieu. CARCELLER et Coll. (1971) observent dans des suspensions cellulaires d'Erable cultivées en présence d'une dose supraoptimale de saccharose une réaction positive de la lignine à l'intérieur du protoplaste, entre les cellules constituant les agrégats et dans le milieu lui-même ; mais ils ne notent aucune lignification des parois cellulaires. Différents polysaccharides pariétaux (acide pectique, arabino-galactanes, fucoxylanes, etc) ont été mis en évidence dans le milieu de culture de plusieurs suspensions cellulaires. Ils ne proviennent pas forcément de la lyse des parois des cellules les plus âgées ou des cellules mortes, car ils apparaissent parfois dès les premiers jours (MARETZKI et Coll., 1974) et varient selon l'équilibre hormonal (MANTE et BOLL, 1978).

L'hétérogénéité structurale de la paroi des cellules âgées, dans lesquelles apparaissent des strates peu denses aux électrons et leur affinité plus grande pour le rouge de ruthénium que pour les colorants de la cellulose suggèrent que la séparation des cellules pourrait être en relation avec la transformation de la nature chimique des parois et en particulier avec une augmentation des composés pectiques et des hémicelluloses hydrosolubles. Une telle hypothèse a déjà été émise par GRANT et FULLER (1968) pour expliquer les variations de friabilité de colonies tissulaires de Tabac. En réalité, ce n'est pas aussi simple et HALMER et THORPE (1976) n'observent pas de différences marquées entre les proportions de pectine, d'hémicellulose et de cellulose dans des cals de Tabac friables se développant sur un milieu contenant une faible dose de kinétine et des cals durs et compacts entretenus sur le même milieu, mais renfermant une forte dose de kinétine. Ils ne constatent que des modifications qualitatives et quantitatives de la composition des monosaccharides, et surtout une augmentation du rapport arabinose / xylose et de la teneur en hydroxyproline dans les cals friables. Par contre, une diminution des composés non celluloses et des polyuronides et une augmentation des xyloglucanes et des composés celluloses ont été signalés par TAKEUCHI et KOMAMINE (1978), au cours de la croissance des suspensions cellulaires de Vinca rosea.

4 - Etude de la division cellulaire

Rappelons que c'est au 4ème jour de la culture que l'index mitotique est généralement le plus élevé, tout au moins dans les conditions standard de culture.

Le dénombrement des différentes phases de la mitose de cellules

prélevées dans une culture de 4 jours nous a fourni les résultats suivants :

- noyaux quiescents	2067			
- prophase	{	début	0 à 12	soit 0 à 0,5 %
		milieu	24	" 1,1 %
		fin	17	" 0,8 %
- métaphase			23	" 1,1 %
- anaphase			06	" 0,3 %
- télophase			05	" 0,2 %
				} 1,9 à 2,4 %
				} 1,6 %
Index mitotique				3,5 à 4,0 %

Comme nous l'avons déjà signalé, il est difficile de distinguer les noyaux en début de prophase des noyaux quiescents, en raison de la présence des plastes amylofères dans le cytoplasme périnucléaire qui se colorent en rouge, comme la chromatine, par la technique de FEULGEN. De plus, on ne peut tenir compte de la taille des noyaux qui varie beaucoup en fonction des taux de ploïdie. Quoiqu'il en soit, la prophase dure plus longtemps que les trois autres phases réunies de la mitose.

Le dénombrement des chromosomes en métaphase révèle que les cellules diploïdes sont exceptionnelles (Pl. XIII, Fig. 5). La plupart des noyaux renferment de 4 à 6 n chromosomes (Pl. XIII, Fig. 6 & 7) et dans certains, on n'en compte pas moins de 8 n (Pl. XIII, Fig. 8 et 10). A un tel degré de ploïdie, il devient tout à fait impossible de dénombrer exactement les chromosomes, et on ne peut donner qu'un ordre de grandeur. De nombreuses cellules renferment des nombres intermédiaires de chromosomes (3n, 5n, 7n) ou bien sont aneuploïdes. Des observations analogues ont déjà été rapportées pour plusieurs autres suspensions cellulaires d'origine végétale (HEINZ, MEE & NICKELL, 1969 ; BAYLISS et GOULD, 1974 ; RASHID et STREET, 1974).

Au cours de cette étude, nous avons rencontré de nombreuses figures de mitoses anormales ; chromatides retardées lors de l'ascension polaire (Pl. 13, Fig. 11 à 14), fragmentation de chromosomes ou de noyaux (Pl. XIII, Fig. 13 et 18), ponts de chromatine entre des noyaux anaphasiques et télophasiques (Pl. XIII, Fig. 13 et 17), rejet d'un chromosome hors du fuseau. Ces anomalies sont sans doute la conséquence de la présence du 2,4-D dans le milieu. Cette substance est également connue pour augmenter la ploïdie des cellules en culture ; la diploïdisation spontanée des tissus haploïdes lors de l'androgyne se expérimentale en fournit de nombreux exemples.

Comme le souligne justement SUNDERLAND (1973), plus le nombre diploïde de chromosomes est élevé, moins on a de chances de voir se former des noyaux haploïdes. Nous n'avons rencontré qu'une seule fois une cellule haploïde de Silène. Dans des populations hautement polyploïdes, la non disjonction des chromatides, les "chromosomes traînards" et les fuseaux multipolaires conduisent au contraire à des états grossièrement hypo- ou hyperploïdes. Dans des cultures de tissus de Tabac établies depuis plusieurs années, FOX (1963) observe des nombres de chromosomes variant de 70 à 220, avec un pourcentage de tétraploïdes supérieur à 85 %. La non séparation des noyaux télophasiques que nous avons observée dans la suspension de Silène conduit à une diploïdisation immédiate de la cellule, et l'opération doit pouvoir se répéter lors de divisions ultérieures. De telles observations ne sont pas rares en culture de tissus ou de cellules (PARTENEN, 1963 et 1965 et SUNDERLAND, 1973).

En plus de son action sur la caryocinèse le 2,4-D perturbe également le déroulement de la cytodivision. Des cloisons incomplètes responsables de la formation de cellules binucléées ont été décrites dans des suspensions cellulaires d'Erable cultivées en turbinostat, lorsque la teneur en 2,4-D est de $1,5 \cdot 10^{-7}$ M (WITHERS, 1976), ce qui représente une concentration très proche de la concentration minimale permettant la division de ces cellules (KING, 1976a). Dans des cultures d'Erable également, NOUGAREDE, GUERN et GRIGNON (1968,b) notent que la reconstitution des noyaux-fils et la cytodivision sont rarement simultanées et que des états "binucléés" proviennent de la lenteur de l'édification de la cloison nouvelle. Il est possible que ces noyaux finissent par se souder et que les gros noyaux, fortement lobés, que nous voyons dans certaines cellules de Silène aient une telle origine.

D - EVOLUTION DES ACIDES NUCLEIQUES AU COURS DU CYCLE DE CROISSANCE

Les analyses ont été effectuées dans des suspensions cellulairesensemencées à la concentration initiale de 15 mg.ml^{-1} , avec des cellules âgées de 14 jours parvenues en phase stationnaire. Pendant la durée des expériences, les cultures sont placées sur un agitateur rotatif, à 25°C et à la lumière (24 : 0 - 500 lux).

1 - Evolution des ARN

La quantité d'ARN rapportée à une culture augmente dès le transfert des cellules sur un milieu neuf, puis atteint un palier le 6e jour (Fig. 31,A).

Rapporté à une cellule (Fig. 31, B), l'accroissement est très rapide pendant les premières 24 heures, puis plus lent jusqu'au 4ème jour. Ensuite la teneur en ARN par cellule diminue régulièrement, bien que la quantité totale d'ARN par culture augmente encore.

Dans une suspension cellulaire d'Erable présentant une phase de latence plus longue (2-3 jours au lieu de 12-24 heures pour celle de Silène), SHORT et Coll. (1969) observent que la synthèse de l'ARN total débute immédiatement après la mise en culture. Elle est même très active pendant la phase de latence, puisque la quantité d'ARN par cellule est multipliée par 2,5 au cours de cette période.

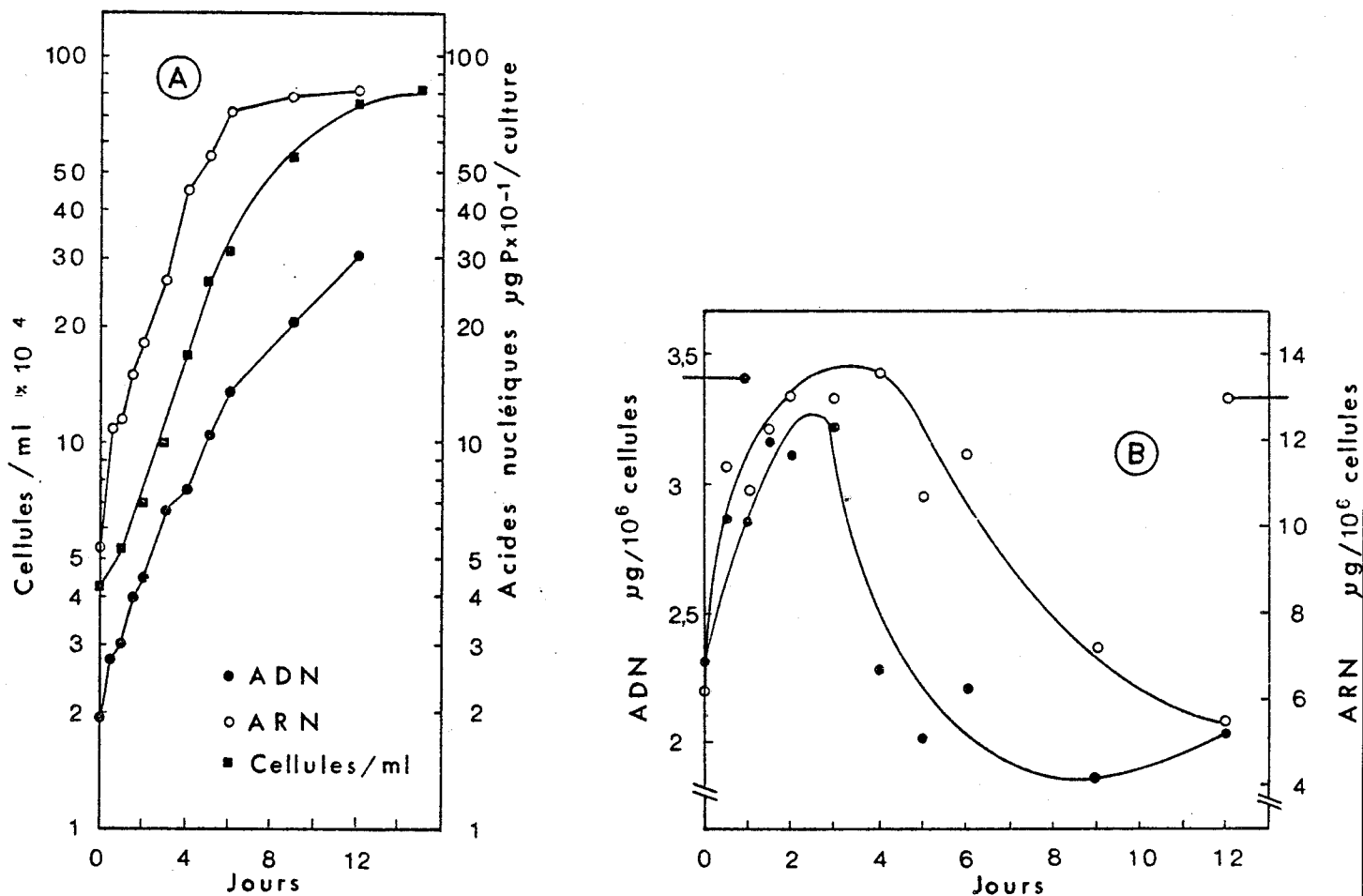


Figure 31 : Variations des acides nucléiques totaux au cours d'un cycle de croissance. L'évolution de la quantité totale d'ARN et d'ADN est rapportée :

- A : en μg de phosphore $\times 10^{-1}$ par culture ;

- B : en μg de phosphore pour 10^6 cellules.

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : $25 \pm 1^\circ\text{C}$; lumière : 500 lux, 24 : 0.

Si l'on suit l'incorporation du ^{32}P dans l'ARN des cellules de Silène et que l'on reporte graphiquement les activités spécifiques en fonction du temps (Fig. 32), il apparaît deux maximums : l'un très précoce, à la 6^e heure, l'autre plus tardif et plus étalé dans le temps, débute le 3^e jour. Le premier pic apparaît donc au cours de la phase de latence et pourrait correspondre à une synthèse d'ARN nucléaire hétérodispersé. Le second, qui se situe pendant la phase exponentielle, au moment où l'index mitotique est maximal, pourrait correspondre à une synthèse prédominante d'ARN ribosomal, en relation avec la protéogenèse très active entre le 2^e et le 5^e jour de culture (Fig. 27).

Afin de vérifier ces hypothèses et de comparer le métabolisme des ARN à ces deux stades de la culture, des cellules de 4 et de 70 heures ont été marquées pendant 2 heures avec du ^{14}C adénosine et les ARN ont été extraits selon une technique séquentielle (à 4 et à 55°C) dans ces deux conditions expérimentales. Les résultats (RAMBOUR, VASSEUR et DUBOIS, 1977 ; VASSEUR et RAMBOUR, 1977 ; RAMBOUR, VASSEUR et DUBOIS, 1978) montrent que les deux pics d'incorporation observés correspondent effectivement à des ARN différents. Les molécules recueillies dans les "extraits chauds" ne représentent qu'environ 5 % de l'ARN analysé, mais leur activité spécifique est toujours 2 ou 3 fois plus importante ; ce qui implique une incorporation préférentielle de l'adénosine marquée dans ces molécules. Dans les "extraits froids", après fractionnement sur MAK colonne, on obtient davantage d'ARN ribosomal à 72 heures qu'à 6 heures et au contraire davantage d'ARN-T.B. (tenaciously bound RNA) dans le second extrait. Notons encore qu'une partie importante de l'ARN-T.B. est polyadénylé et que dans tous les extraits il correspond à un ARN hétérodispersé. Dans les cellules prélevées en phase de latence, la taille moyenne des séquences polyadényliques est de 130 nucléotides. Dans les cellules en phase exponentielle, la taille des séquences poly (A) extractibles "à froid" est encore égale à 130 ; "à chaud" elle est seulement de 90 nucléotides.

Comme le soulignent VASSEUR et RAMBOUR (1977), "la question se pose donc de savoir si cette différence de taille correspond à une réalité biologique ou si elle provient d'un artéfact lié à la méthode suivie". S'il ne s'agit pas d'un artéfact, on pourrait admettre que l'extraction "à chaud" libère des ARN poly (A) nucléaires et/ou issus de polysomes liés aux membranes (TEISSERE, 1974) alors que "l'extrait froid" contiendrait surtout des ARN provenant des polysomes libres. On sait qu'ils contiennent généralement des

séquences poly (A) plus courtes (VERMA et MacLACHLAN, 1976). S'il s'agit au contraire d'un simple artéfact, une extraction séquentielle en fonction du pH et non plus de la température pourrait être utilisée. Selon ESNAULT, TRAPY et VAN HUUSTEE (1975), elle permet également de séparer des molécules polyadénylées de taille différente.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour des suspensions cellulaires d'Arachide, où la synthèse des ARN messagers, le taux de polysomes et la protéogenèse augmentent immédiatement après le transfert de cellules en phase stationnaire sur du milieu neuf (VERMA et MARCUS, 1974). Dans une suspension cellulaire de Melon, les nucléotides, l'ARN et les protéines solubles sont plus élevés au cours de la phase de latence que lors de la période de croissance active (VAJRANABHAIAH et METHA, 1976). Pour des concentrations de ANA inhibitrices de la croissance, ces auteurs constatent que la teneur en ARN diminue. Notons enfin que chez l'Erable, les ribosomes et les polysomes augmentent également au cours de la phase de latence (CELLA, SALA et STREET, 1976) ; cependant, c'est au cours de la phase exponentielle que leur nombre par cellule (ou par ml de culture) passe par un maximum.

2 - Evolution des ADN

L'évolution de l'ADN est sensiblement identique à celle de l'ARN. On notera cependant que la quantité d'ADN par culture augmente au moins jusqu'au 12^e jour de culture, alors que la quantité d'ARN total rapporté au même critère ne s'élève plus beaucoup après le 6^e jour (Fig. 31,A).

Lorsque l'on exprime la quantité d'ADN par cellule en fonction du temps (Fig. 31,B), on constate :

- que l'accroissement est très rapide et qu'il atteint un maximum le 3^e jour,
- que la quantité d'ADN par cellule décroît régulièrement du 3^e au 9^e jour,
- qu'elle augmente légèrement en fin de culture.

Il aurait été intéressant de connaître les teneurs en ADN au 15^e jour, mais des problèmes matériels nous privent de ce résultat. Etant donné l'allure des courbes rapportées sur la figure 31,A, une augmentation de la teneur en ADN, sans qu'il y ait de division cellulaire est toutefois probable. Elle peut avoir au moins trois origines différentes :

- un phénomène d'endomitose conduisant à des noyaux polyploïdes. Nous avons signalé que la plupart des cellules de *Silène* en culture l'étaient ;
- la formation de cellules binucléées, pouvant conduire ultérieurement à des cellules polyploïdes ;
- un phénomène d'endoréplication de chromosomes interphasiques comme cela a déjà été signalé pour divers tissus végétaux cultivés in vitro (PATAU, DAS et SKOOG, 1957 ; BENNICI, BUIATTI et D'AMATO, 1968).

Si le cycle de réplication de l'ADN n'est pas toujours suivi de cytotinèse, c'est sans doute en raison de l'appauvrissement du milieu et/ou d'un déséquilibre hormonal au niveau des cellules. On sait que des cellules de cals de Soja cultivées en présence de Zéatine ont une teneur en ADN et un taux de ploïdie accrus lorsque l'on supprime la kinine (FOSKET et SHORT, 1973). Certes, la souche de *Silène* que nous utilisons est hétérotrophe à la kinétine, mais le transfert des cellules dans un milieu riche en 2,4-D pourrait induire une synthèse de cytokinines endogènes favorisant la division (PEAUD-LENOEL et JOUANNEAU, 1971).

L'activité spécifique de l'ADN évolue au cours de la culture parallèlement à celle de l'ARN total. Toutefois, on remarquera que le premier maximum d'incorporation du ^{32}P se situe après 3 heures au lieu de 6 heures pour l'ARN.

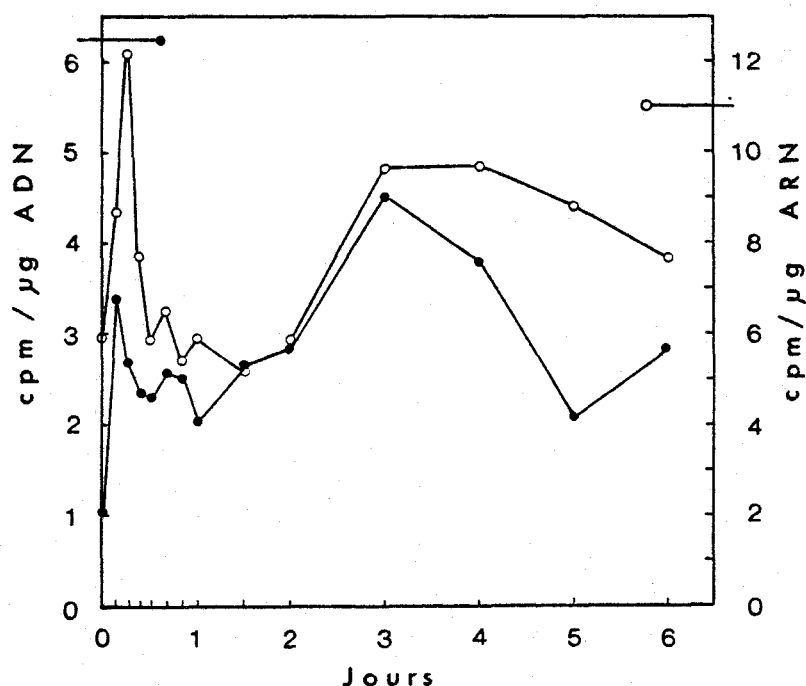


Figure 32 : Evolution en fonction du temps de culture, de l'activité spécifique de l'ADN et de l'ARN, exprimée en c.p.m par µg d'acide nucléique.

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C
lumière : 500 lux, 24 : 0.

La quantité d'ADN rapportée à une cellule et l'incorporation du ^{32}P sont maximales après 3 jours de culture. Ce résultat s'explique facilement, si l'on sait que l'index mitotique est également maximal le 4^e jour. Il est par contre curieux de constater une incorporation précoce dès la 3^e heure alors qu'il est généralement admis que la synthèse d'ARN précède celle de l'ADN (JALOUZOT, 1971, JACOB, 1972). Deux hypothèses au moins sont possibles :

- de l'ARN messager à longue durée de vie (WEEKS et MARCUS, 1971) préexiste dans certaines cellules. Le transfert dans du milieu neuf déclencherait alors très rapidement la réplication de leur ADN ;

- un type déterminé de cellules continue à évoluer au cours du cycle cellulaire même en phase stationnaire et réplique son ADN.

La première hypothèse ne peut être écartée, mais la seconde nous paraît pour le moment, compte tenu des éléments dont nous disposons, la plus probable. D'une part, la teneur en ADN par cellule augmente légèrement en fin de culture. D'autre part, au cours des premiers jours, on rencontre plus fréquemment des agrégats de petite taille formés par 4, 8, 14-17 cellules identiques par leur morphologie et par leur contenu (cytoplasme dense, riche en plastes amylofères, vacuoles relativement petites). Selon toute évidence, ils proviennent de la multiplication synchrone de cellules isolées ou groupées par deux, issues de la fragmentation d'amas beaucoup plus volumineux dans lesquels des cellules "géantes" ou d'autres cellules internes se lysent au cours de la phase stationnaire.

3 - Conclusion

La présence de deux pics de synthèse d'ADN, le premier apparaissant au cours de la phase de latence, le second au début de la phase exponentielle, pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la suspension cellulaire de *Silène* et en même temps par une relative synchronisation induite par le transfert sur un milieu neuf. Le premier pic très pointu serait lié à l'évolution relativement synchrone d'un petit nombre de cellules dont la synthèse d'ARN aurait déjà eu lieu ou serait masquée par celle de l'ensemble de la culture. Le second pic plus important, correspondrait à la reprise d'activité d'un plus grand nombre de cellules déjà sénescents et bloqués à divers stades du cycle cellulaire, mais plus vraisemblablement en G_1 (BAYLISS et GOULD, 1974). Des résultats récents (RAMBOUR et Coll., 1978) montrent que les deux pics d'ADN sont précédés par une synthèse d'ARN riche en séquences poly (A) : cet ARN pourrait intervenir

dans la synthèse de protéines spécifiques indispensables au déclenchement de la mitose, ou bien d'enzymes agissant sur la pénétration ou l'utilisation de certains ions, dont l'induction serait provoquée par le transfert des cellules dans un milieu neuf.

E - EVOLUTION DES ACTIVITES AUXINE-OXYDASIQUES ET PEROXYDASIQUES AU COURS DU CYCLE DE CROISSANCE

Les analyses ont été réalisées dans des suspensions cellulaires ensemencées et cultivées dans les mêmes conditions que celles qui furent utilisées pour l'étude des acides nucléiques. Les cellules prélevées après 1, 2, 4, 6, 8, 11 et 15 jours de culture, sont rapidement pesées et broyées sous azote liquide. La technique d'extraction fractionnée nous a permis de séparer trois fractions : E_1 , qui renferme les enzymes solubles, E_2 , qui contient les enzymes liées ioniquement et E_3 dans laquelle se trouvent les enzymes liées de façon covalente aux parois cellulaires.

1- Evolution des auxine-oxydases

Les activités auxine-oxydasiques des extraits E_1 et E_2 sont rapportées dans la figure 33. L'allure des courbes est identique quand les activités enzymatiques sont exprimées par rapport au poids de M S ou à la teneur en protéines de l'extrait (activité spécifique). Le résultat des analyses diffère, surtout pour celles qui sont effectuées entre le 2e et le 11e jour, si l'activité est rapportée au poids de M F.

Les activités auxine-oxydasiques des extraits E_1 et E_2 vont dans le même sens. Des inhibiteurs présents dans les solutions de pectinase et de cellulase utilisées pour extraire les enzymes liées aux parois ne permettent pas le dosage de l'activité auxine-oxydasique de la fraction E_3 .

Dans les extraits E_1 et E_2 les activités auxine-oxydasiques diminuent rapidement au cours des deux premiers jours de culture, puis demeurent faibles jusqu'au 6e jour ; elles augmentent ensuite progressivement jusqu'au 15e jour. C'est dans la fraction E_2 que l'on trouve la plus grande activité.

2- Evolution des peroxydases

Les activités peroxydasiques des extraits E_1 et E_2 rapportées au poids de M S des cellules ou à la teneur en protéines de l'extrait sont comparables. Elles diffèrent plus ou moins, selon l'âge des cellules, des activités exprimées

par rapport à l'unité de M F. L'activité spécifique de la fraction E₃ n'a pu être déterminée, le dosage des protéines étant faussé par la présence de pectinase et de cellulase.

L'activité des trois catégories de peroxydases diminue au cours des deux premiers jours de culture ; c'est celle des peroxydases liées aux parois qui décroît le plus vite. Les activités enzymatiques restent stationnaires ou diminuent légèrement jusqu'au 6e jour, puis augmentent de nouveau jusqu'au 15e jour. Comme pour les auxine-oxydases, c'est dans la fraction E₂ qu'on mesure la plus grande activité (Fig. 33).

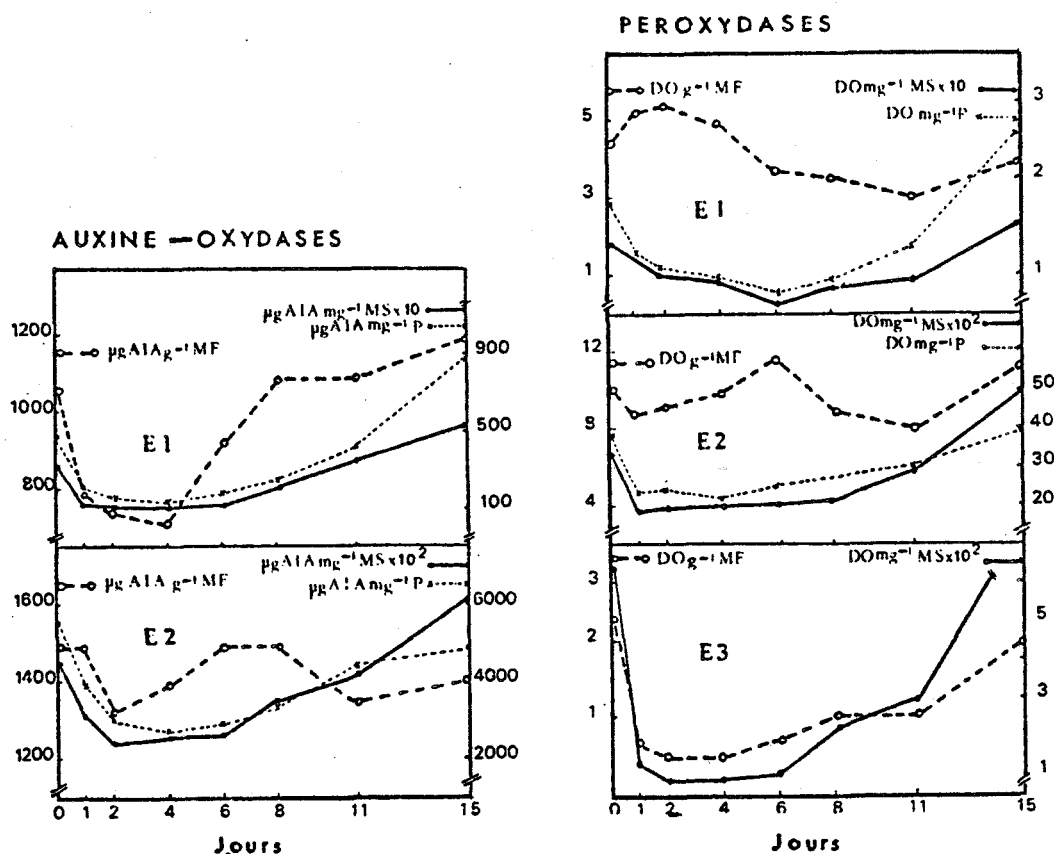


Figure 33 : Evolution des activités auxine-oxydasiques (μg de AIA détruit en 1 h) et peroxydasiques (D.O. à 420 nm en 1 mn) au cours d'un cycle de croissance des cellules de Silène.

E₁, fraction soluble ; E₂, fraction ionique ; E₃, fraction covalente ;
 M F, matière fraîche ; M S, matière sèche ; P, protéines de l'extrait.
 Inoculum : 3 ± 0,2 g de cellules âgées de 14 jours. Température : 25°C.
 Lumière : 500 lux, 24 : 0.

3.- Conclusion

Les variations importantes de la teneur en eau des cellules, au cours du cycle de croissance peuvent expliquer les résultats différents selon qu'ils sont rapportés à l'unité de M F ou de M S.

Les variations de l'activité spécifique confirmant les valeurs des activités enzymatiques rapportés au poids de M S, nous ne tiendrons pas compte des valeurs rapportées au poids de M F.

Les activités des auxine-oxydases et des peroxydases sont élevées dans les cellules de l'inoculum. Elles diminuent dès le premier jour de culture et demeurent faibles pendant toute la durée de la phase exponentielle. L'augmentation des activités peroxydasiques coïncide avec le ralentissement de la croissance et s'accélère au cours de la phase stationnaire et de déclin des cultures.

Une évolution comparable a déjà été signalée pour les peroxydases dans des cultures cellulaires d'Erable (SIMOLA et SOPANEN, 1970) de Tabac (OLSON et Coll., 1969) et d'Arachide (VERMA et VANHUUSTEE, 1970 ; KOSSATZ et VANHUUSTEE, 1976). En démontrant que les activités peroxydasiques et auxine-oxydasiques des cellules de Silène évoluent parallèlement au cours du cycle de croissance, nous soulignons une fois de plus le rôle des peroxydases dans le catabolisme auxinique.

La séparation des peroxydases de la fraction cellulaire soluble par électrophorèse sur gel d'amidon a permis d'établir que la composition isoperoxydasique varie au cours du cycle de croissance (LEGRAND et DUBOIS, 1977). L'intensité des isoenzymes C_1 et A_5 augmente progressivement et deux isoenzymes cathodiques apparaissent au 15e jour (C_3 et C_4). Ces variations reflètent celles des activités enzymatiques rapportées ci-dessus et particulièrement l'augmentation de l'activité auxine-oxydasiques. Par contre, l'intensité de A_1 reste constante pendant toute la durée de la culture ; ce qui suggère qu'elle pourrait avoir une activité moins importante, tout au moins in vitro.

Signalons enfin qu'une activité peroxydasique a été mise en évidence dans le milieu de culture (LEGRAND et DUBOIS, 1977). Elle est décelable à partir du 3e jour et augmente ensuite jusqu'à la fin du cycle de croissance. Cette augmentation est concomitante à l'apparition d'isoenzymes et à l'augmentation de l'intensité de coloration de certaines d'entre elles au cours de la culture. OLSON et Coll. (1969) ont relevé des faits comparables dans le mi -

lieu de suspensions cellulaires de Tabac où les isoenzymes changent non seulement en fonction de l'âge de la culture, comme nous le voyons chez le Silène, mais également en fonction de la température. Les auteurs notent que l'intensité de la coloration des isoenzymes anodiques est beaucoup plus forte à 25°C qu'à 35°C; ces peroxydases disparaissant complètement à 13°C.

CHAPITRE 2 : FACTEURS PHYSIOLOGIQUES CONTROLANT LA CROISSANCE.

Deux facteurs ont plus particulièrement retenu notre attention : la masse de l'inoculum et l'âge des cellules ensemencées.

A - MASSE DE L'INOCULUM

Elle s'exprime, selon la nature de la culture, par un poids ou un volume de tissu ou bien par un nombre de cellules. S'il s'agit d'une culture de tissu, on s'arrange pour calibrer les explantats et au besoin, on les pèse avant de les repiquer. Les recherches de DUHAMET (1953 et 1955) ont montré que de très petits fragments (quelques mg) sont capables de se développer et que la taille limite dépend de la nature et de la concentration des substances stimulantes ajoutées au milieu. Cependant, la diminution de la taille des explantats entraîne une augmentation du coefficient de variation (HELLER, 1953).

Pour une suspension cellulaire, ce n'est ni la masse ni le nombre de cellules ensemencées qui est important : c'est la "densité initiale" de la culture. Ceci s'explique, car dans une telle culture, la plupart des cellules sont en contact avec la solution nutritive. Au contraire, seule une partie d'un fragment d'organe isolé ou d'une colonie tissulaire se trouve directement en contact avec le milieu gélosé.

La détermination de la concentration cellulaire initiale, par comptage sur une cellule de NAGEOTTE, est longue et fastidieuse. Aussi, avons-nous cherché à établir une relation simple entre le nombre de cellules de l'inoculum et le poids de celui-ci. Nous avons obtenu des résultats reproductibles en opérant de la manière suivante :

- on verse la suspension cellulaire à répartir dans de nouvelles cultures dans un entonnoir de Buchner garni d'une feuille de papier filtre, et on laisse s'écouler le milieu par gravité ;
- on prélève à l'aide d'une "cuiller" en verre pyrex un volume déterminé de cellules, que l'on transfère dans le flacon à ensemencer ;
- pour mesurer le poids de M F correspondant à n "cuillers" de cellules, on verse leur contenu dans un petit entonnoir de Buchner et on filtre

sous vide jusqu'à ce que tout le liquide se soit écoulé ;

- on recueille les cellules, on les pèse et on réalise des comptages de parties aliquotes sur une cellule de NAGEOTTE.

Plusieurs séries de mesures nous ont permis d'établir les relations suivantes :

. 1 "cuiller" de cellules $\left\{ \begin{array}{l} \text{correspond à } 1,5 \pm 0,1 \text{ g de M F} \\ \text{contient } 0,4-0,5 \cdot 10^7 \text{ cellules} \end{array} \right.$

. concentration initiale d'une culture de 200 mlensemencée avec 1 "cuiller" de cellules : $7,5 \text{ mg de M F.ml}^{-1}$, soit $2,0 - 2,5 \cdot 10^4 \text{ cellules.ml}^{-1}$.

Pour déterminer l'influence de la concentration initiale de la culture sur la croissance, nous avonsensemencé 4 séries de flacons respectivement avec 1,5, 3,0, 4,5 et 6,0 g de cellules âgées de 12 jours. L'expérience démontre que l'augmentation du poids de l'inoculum raccourcit la durée du cycle de croissance. A la concentration initiale de $30 \text{ mg de M F.ml}^{-1}$, la biomasse passe par un maximum le 13e jour. Il faut 20 jours pour l'atteindre quand la concentration initiale est égale à $7,5 \text{ mg de M F.ml}^{-1}$.

Les courbes rapportées sur la Figure 34 montrent que le raccourcissement du cycle de croissance n'est pas dû à une modification du temps de doublement du poids de M F au cours de la phase exponentielle, ni à la prolongation de celle-ci. C'est la durée de la période précédant la phase exponentielle qui change. De 6 jours, elle passe à 2 jours quand le poids de l'inoculum varie de $7,5$ à $15 \text{ mg de M F.ml}^{-1}$; elle s'annule lorsque la concentration initiale atteint $30 \text{ mg de M F.ml}^{-1}$. Dans les conditions expérimentales retenues, cette période est une phase d'accélération et non une phase de latence. L'accroissement de la biomasse, mesurée au début de la phase stationnaire, est peu affecté. La croissance relative ($\Delta \text{ M F/M F initiale}$) augmente donc au fur et à mesure que la concentration initiale diminue : de 10,7 pour $30 \text{ mg de M F.ml}^{-1}$, elle passe à 19,9 puis à 36,6 quand les flacons sontensemencés respectivement avec 2 ou 4 fois moins de cellules.

Des concentrations initiales relativement faibles favorisent également la croissance des suspensions cellulaires d'Erable. Contrairement à ce que nous observons pour le Silène, ces conditions peuvent déterminer l'apparition d'une phase de latence (STUART et STREET, 1969), prolonger la durée de la phase exponentielle et stimuler le taux de croissance au cours de cette période (STREET, 1973, p. 86). Selon cet auteur, à la "densité" critique de $9-15 \cdot 10^3 \text{ cellules.ml}^{-1}$, les cellules d'Erable se multiplient 8 fois avant

que la densité cellulaire maximale soit atteinte. La concentration initiale critique pour une suspension cellulaire de *Silène* est d'environ 1.10^4 cellules par ml ; dans ces conditions, les cellules se multiplient 6 ou 7 fois avant que la biomasse passe par un maximum. Il est possible qu'en remplaçant une partie de la solution nutritive (milieu neuf) par du milieu conditionné, on puisse diminuer encore un peu la densité critique.

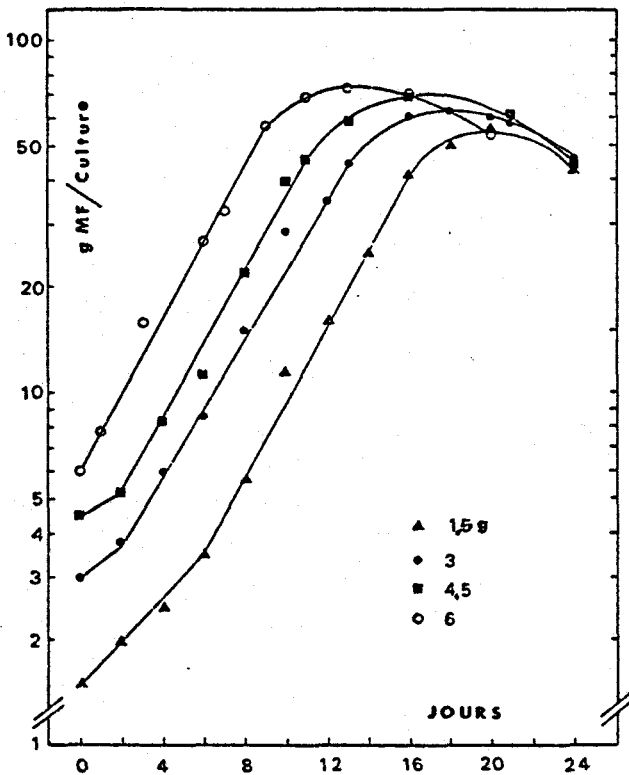


Figure 34

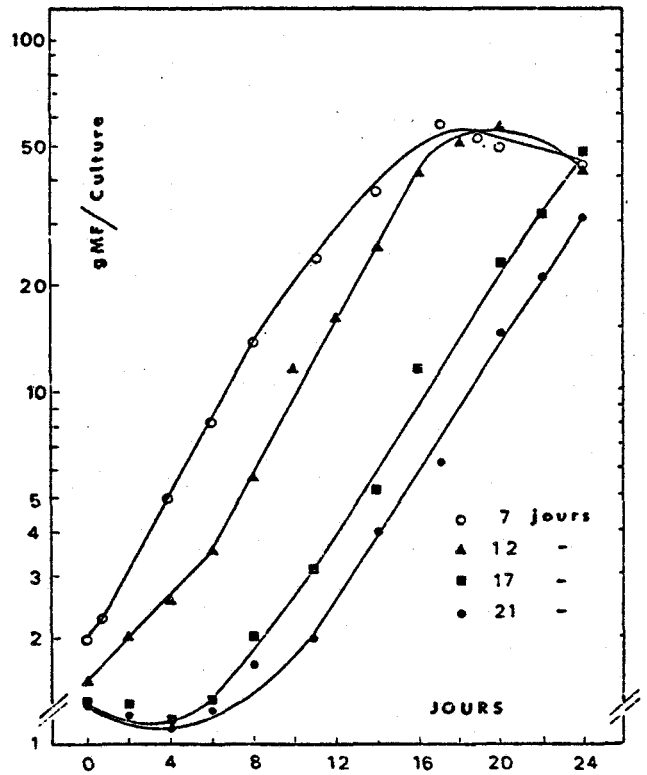


Figure 35

Figure 34 : Effet de la concentration cellulaire initiale sur la croissance de la suspension cellulaire de *Silène*.

Représentation semi-logarithmique des variations du poids de M F, au cours de la culture.

Inoculum : 1,5, 3,0, 4,5 et 6,0 \pm 0,2 g de cellules âgées de 12 jours ; température : 21°C ; lumière du jour + appoint de 500 lux, 12 : 12.

Figure 35 : Effet de l'âge des cellulesensemencées sur la croissance de la suspension cellulaire de *Silène*.

Représentation semi-logarithmique des variations du poids de M F, au cours de la culture.

Inoculum : 1,5 \pm 0,2 g de cellules âgées de 7, 12, 17 ou 21 jours ; température : 21°C ; lumière du jour + appoint de 500 lux, 12 : 12.

B - AGE DE L'INOCULUM

L'importance de ce facteur est également très différente selon qu'il s'agit de colonies tissulaires ou de suspensions cellulaires, en raison du mode d'ensemencement des cultures. Quand on repique une colonie tissulaire on découpe la masse de tissu dans une boîte de Pétri stérile et on sélectionne les parties les plus jeunes (les plus vertes, s'il s'agit d'une colonie de la souche chlorophyllienne de Carotte). Quand la colonie découpée est en phase de croissance active, pratiquement tous les fragments bien calibrés sont repiqués : quand elle se trouve en phase stationnaire ou de déclin, on ne retient au contraire qu'un petit nombre de fragments. En ne transplantant que des fragments "physiologiquement jeunes", on exerce une sélection qui masque dans une large mesure l'influence de l'âge des tissus. Par contre, il n'est pas possible de choisir un type particulier de cellules, et l'âge de la suspension cellulaire utilisée pour initier de nouvelles cultures devrait être déterminant.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons ensemencé 4 séries de cultures, à la concentration initiale de $7,5 \text{ mg de M F.ml}^{-1}$, avec des cellules provenant de flacons entretenus à 21°C pendant 7, 12, 17 et 21 jours. Les résultats (Fig. 35) montrent que c'est principalement la durée de la phase de latence qui varie :

- elle est nulle, quand les cellules ensemencées, âgées de 7 jours, proviennent d'une culture en phase exponentielle ;
- elle est remplacée par une phase d'accélération, d'une durée de 6 jours, quand les cellules sont prélevées dans des cultures âgées de 12 jours ;
- elle dure 5 ou 6 jours, lorsque l'inoculum est prélevé dans une culture de 17 jours, déjà en phase stationnaire ;
- elle dure 5 ou 6 jours, et elle est suivie d'une phase d'accélération de même durée, lorsque les cellules ensemencées proviennent d'une culture de 21 jours dont le déclin est amorcé.

La durée de la phase exponentielle et le taux de croissance sont relativement peu affectés par l'état physiologique des cellules. Le temps de doublement du poids de M F, calculé à partir des courbes rapportées sur la Figure 35 est d'environ 70 h pour un inoculum de 7 jours et de 80 h pour un inoculum de 21 jours.

Tout se passe comme si les cellules âgées avaient besoin de plus de temps pour atteindre un état physiologique critique les rendant aptes à se diviser. Dès qu'elles l'ont atteint, le taux de croissance ne semble plus dépendre que du génome. Au cours de la période de latence et de la période transitoire (phase d'accélération) dont l'existence s'explique par l'hétérogénéité de la culture, la teneur en M S et en protéines augmente et une synthèse active d'ARN messager a été mise en évidence (DUBOIS et Coll., 1976 ; RAMBOUR et Coll., 1977 et 1978).

L'inoculum renferme toujours un certain pourcentage de cellules mortes. Il est clair que celui-ci est plus élevé quand les cellules utilisées proviennent d'une suspension en phase stationnaire ou en phase de déclin. Or, nous savons que la densité cellulaire influe sur le déroulement du cycle de croissance. Les résultats rapportés sur la Figure 35 devraient donc être corrigés : pour compenser un plus faible pourcentage de cellules vivantes dans les inoculums de 17 et de 21 jours, il faudrait augmenter leur poids dans les mêmes proportions. Néanmoins, les résultats présentés demeurent tout à fait valables, car la densité initiale choisie est proche de la densité critique. Ce qui signifie que le pourcentage de cellules mortes est faible, même dans une suspension cultivée pendant 21 jours à 21°C.

C - CONCLUSIONS

- la "densité" initiale intervient sur la durée de la phase d'accélération. Elle modifie peu le temps de génération, au cours de la période exponentielle, et la biomasse atteinte à l'entrée de la phase stationnaire ;

- l'âge des cellulesensemencées modifie la durée des phases de latence et d'accélération ainsi que le temps de doublement mesuré pendant la période exponentielle ;

- on raccourcit le cycle de croissance en ensemençant les cultures à la concentration initiale de $15 \text{ mg de MF.ml}^{-1}$, avec des cellules âgées de 10 à 12 jours.

CHAPITRE 3 : FACTEURS PHYSIQUES CONTROLANT

LA CROISSANCE.

A - LA TEMPERATURE

Des recherches bibliographiques ont permis d'établir que les suspensions cellulaires sont généralement cultivées entre 22 et 25°C. Cependant, les températures optimales varient beaucoup selon les espèces - de 20-21°C pour une souche de Lolium perenne (TULECKE et NICKELL, 1960) à 30-34°C pour une culture de Calystegia sepium (SANDMEIER, 1974) - et sont différentes à la lumière et à l'obscurité (KOHNO et YOSHIDA, 1977).

1 - Résultats et discussion

Pour déterminer les effets de la température sur la croissance des suspensions cellulaires de Silène, des cultures ont été placées dans des enceintes climatisées (10-35°C), éclairées continuellement (environ 500 lux au niveau des flacons). Les écarts entre les températures programmées et les températures effectives sont inférieurs à 1°C. Nous avons mesuré les poids de M F et de M S tous les 2 ou 3 jours. Les résultats montrent qu'à la concentration initiale retenue (15 mg de M F.ml⁻¹), il n'y a pas de phase de latence et que la température agit sur la vitesse et l'amplitude de la croissance (Fig. 36, A) et sur l'hydratation des cellules (Fig. 36, B).

Entre 10 et 25°C, les temps de doublement du poids frais et du poids sec, mesurés au cours de la phase de croissance active diminuent rapidement ; ils varient peu entre 25 et 35°C. Quelle que soit la température, le temps de doublement du poids sec est plus court que celui du doublement du poids frais (Fig. 37, A). A 35°C, le taux de croissance des cellules est aussi rapide qu'à 25°C pendant les 4 premiers jours (Fig. 37,A) mais la biomasse de la culture mesurée à l'entrée de la phase stationnaire est environ 3 fois plus faible (Fig. 37,B). A cette température, le pourcentage de cellules mortes augmente beaucoup plus vite, ce qui se traduit par une réduction de la durée de la période de croissance active et provoque le déclin des cultures dès le 8ème jour.

La teneur en eau des cellules varie au cours du cycle de croissance (Fig. 36,B). Elle diminue au cours des premiers jours, puis augmente progressivement au cours de la phase de croissance active et passe par un maximum au début de la phase stationnaire. Elle diminue à nouveau en fin de culture, cause de la lyse des cellules les plus âgées, qui sont aussi les plus riches en eau. En raison de ces variations, on ne peut comparer l'hydratation des

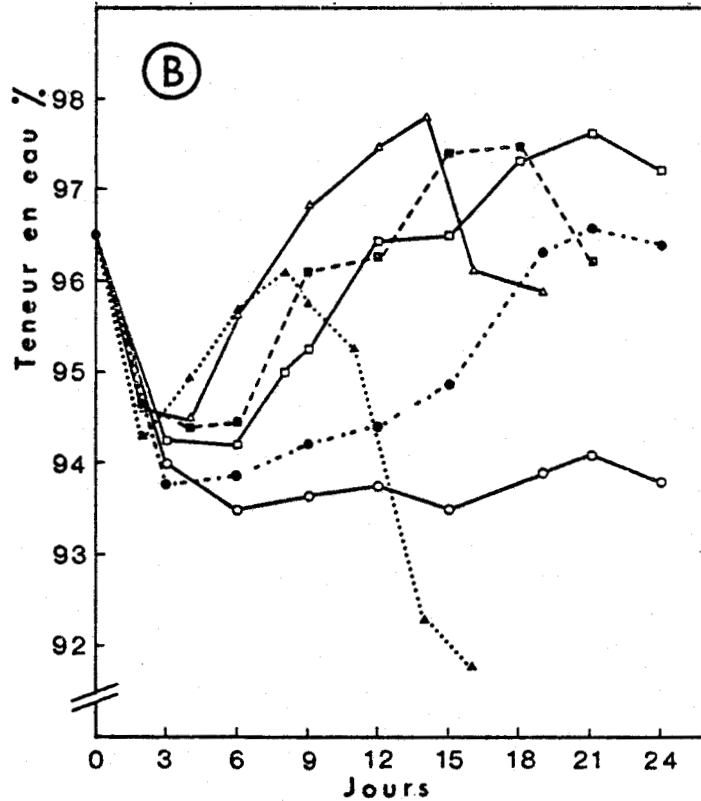
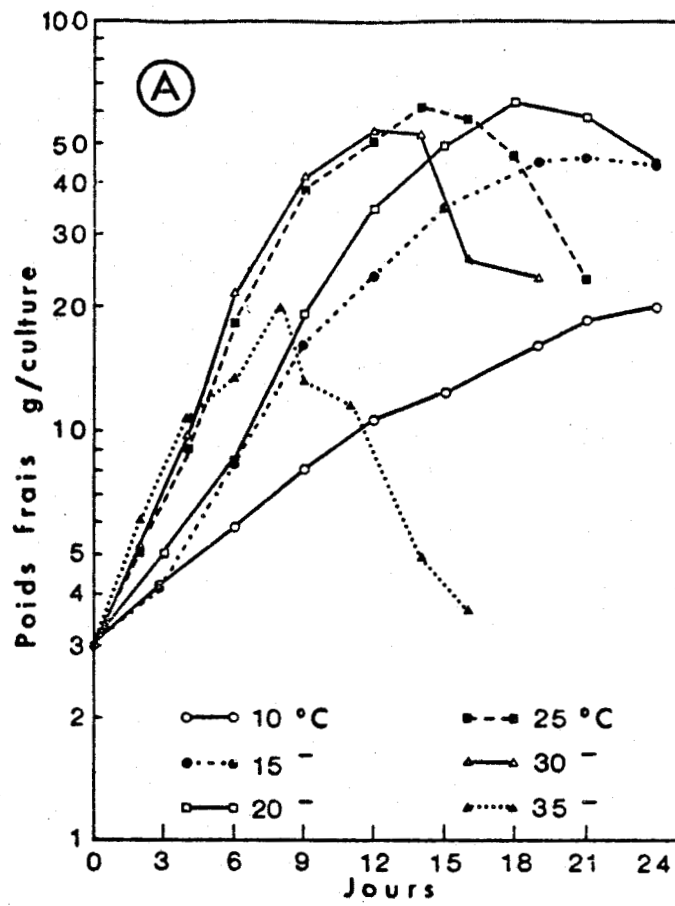


Figure 36 : Effets de la température :

A : sur l'évolution du poids de M F des suspensions cellulaires de Silène.

B : sur la teneur en eau (H_2O % : $\frac{M F - M S}{M F} \cdot 100$) des cellules au cours de la croissance

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; lumière : 500 lux, 24 : $\bar{0}$.

BUS
LILLE

cellules que lorsqu'elles sont à un même stade du cycle de croissance. Nous avons choisi, pour chaque température, le moment où les poids de M F et de M S des cultures sont les plus élevés. Les résultats rassemblés dans le Tableau XLI montrent que l'hydratation des cellules augmente avec la température entre 10 et 30°C et diminue légèrement entre 30 et 35°C.

TEMPERATURE (° C)	T E N E U R E N E A U	
	quand le poids de M F est maximum	quand le poids de M S est maximum
10	93,8	93,8
15	96,6	94,8
20	97,3	96,5
25	97,4	96,3
30	97,5	97,5
35	96,1	96,1

TABLEAU XLI : Teneur en eau des cellules de Silène prélevées dans des cultures au moment où les poids de M F et de M S passent par un maximum, pour chacune des températures étudiées.

Pour déterminer la température optimale, il convient donc de tenir compte :

- du taux de croissance pendant la phase de croissance active,
- de la durée de celle-ci,
- de l'état physiologique des cellules et notamment de leur teneur en eau et de leur dispersion au sein du milieu.

C'est à 25°C que le temps de doublement des poids de M F et de M S de cultures de Silène sont les plus courts, respectivement 50 et 44 h (Fig. 37, A) et que l'on obtient la biomasse la plus importante (Fig. 37, B). A cette température, les variations des poids de M F et de M S traduisent correctement la croissance, puisqu'elles sont parallèles à celles de critères plus spécifiques de la division cellulaire, tels que l'index mitotique, le nombre de cellules, leur teneur en protéines et en ARN (2ème partie, 1). Il est probable qu'à d'autres températures des découplages se produisent entre certaines biosynthèses et la division des cellules ; la connaissance du nombre et de la taille des cellules serait alors utile.

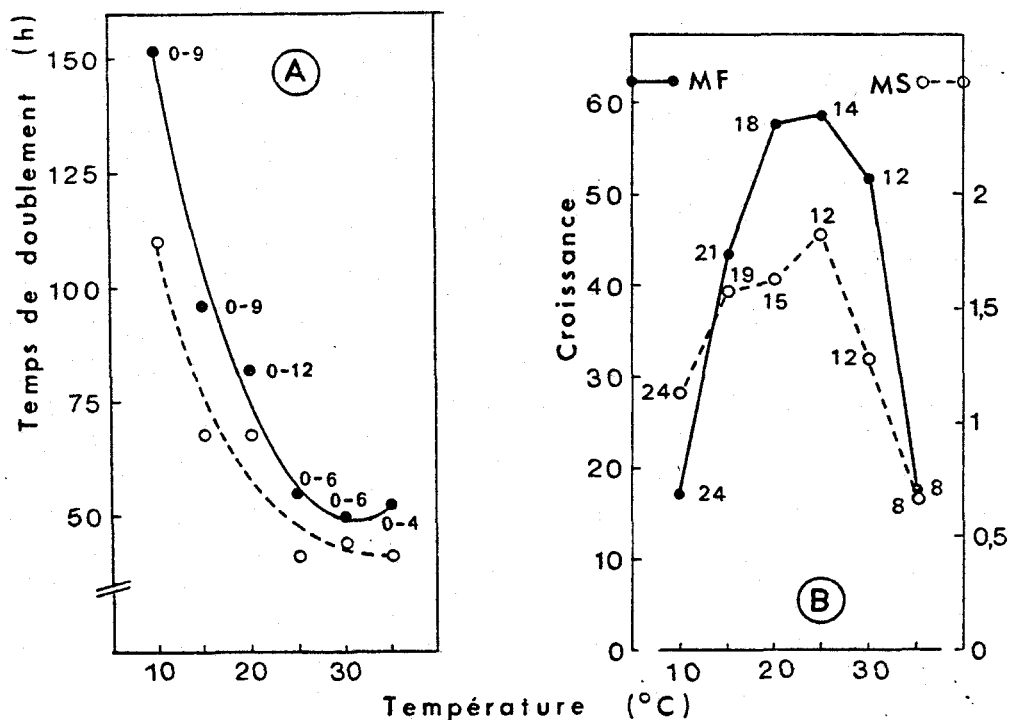


Figure 37 : Effets de la température sur les paramètres de la croissance.

A : variations du temps de doublement du poids de M F (●—●) et du poids de M S (O---O) des suspensions cellulaires de Silène. Les chiffres indiquent le début et la fin de la phase de croissance active, à chaque température.

B : variations du maximum de la croissance. La biomasse est exprimée en g de M F (●—●) et de M S (O---O) par culture. Les chiffres indiquent le nombre de jours nécessaires pour obtenir la biomasse correspondante.

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; lumière : 500 lux ,
24 : 0.

A 30 et à 35°C, le taux de croissance demeure élevé mais la biomasse des cultures est plus faible et elles contiennent davantage de gros agrégats. A 10°C, le taux de croissance est très faible. Les suspensions cellulaires présentent cependant deux caractères remarquables : d'une part les cellules sont plus riches en cytoplasme et d'autre part elles sont plus dispersées dans le milieu liquide. (Pl. XIV, Fig. 1 et 2).

La température intervient sur de nombreux mécanismes physiologiques agissant plus ou moins directement sur la croissance, et notamment sur l'absorption de certains composants du milieu. C'est le cas du potassium, chez l'Erable (GRIGNON,

1969). Chez l'Ipomea, les basses températures provoquent un déséquilibre entre l'utilisation du glucose -qui n'est pas affectée- et celle de l'azote aminé -fortement réduite- (ROSE et MARTIN, 1975). Selon ces auteurs, c'est ce déséquilibre qui réduirait la vitalité des cultures et entraînerait la mort des cellules, après 2 passages à 17°C.

Chez le Silène, la température agit simultanément sur l'absorption de nitrates et du saccharose (Tableau XLII). 25°C, la totalité du saccharose présent dans le milieu est consommé et il ne reste plus que 6 % des nitrates, 14ème jour. A 10°C, on note un ralentissement simultané de la consommation du saccharose et des nitrates ; les milieux renferment encore 80 % du sucre et 83 % de l'azote au 14ème jour. L'équilibre C/N n'est pas perturbé. La croissance est fortement ralentie (environ 85 % par rapport aux cultures placées à 25°C) mais les cellules gardent toute leur vitalité, au moins pendant un mois. Transférées dans du milieu neuf et placées à la température optimale, elles présentent un taux de croissance normal.

	TEMPERATURE	NOMBRE DE JOURS DE CULTURE					
		2	4	6	8	10	14
Sucres totaux (g.l ⁻¹)	10	0	0	0,5	1,5	2,5	3,5
	25	2	5	11	15	20	20
Azote N-NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	10	0	18	31	-	50	45
	25	40	80	150	205	260	281

TABLEAU XLII: Influence de la température sur la consommation des sucres et de l'azote nitrique par les cellules de Silène

(concentration initiale en sucres : 20 g.l⁻¹ de saccharose
 " " " azote : 300 mg.l⁻¹ d'azote nitrique).

Dans certaines cultures de Tabac, l'augmentation de la température réduit l'activité peroxydasique (DE JONG et coll., 1968). Si cet effet était général, la stimulation de la croissance des cellules de Silène, très importante entre 10 et 30°C, pourrait s'expliquer par une augmentation de la teneur en auxines endogènes, en rapport avec un ralentissement du catabolisme auxinique. Les essais entrepris pour vérifier cette hypothèse n'ont pas permis d'établir une corrélation entre la température et l'activité peroxydasique.

2 - Conclusion

La température joue un rôle important pour le contrôle du cycle de croissance de la suspension cellulaire de Silène. Le Q_{10} , calculé à partir de l'accroissement du poids de M F (et de M S), au 6ème jour de culture est égal à :

- 2,0 (et 1,4), entre 10 et 20°C ;
- 3,0 (et 2,3), entre 15 et 25°C ;
- 3,4 (et 2,2), entre 20 et 30°C.

La température de 25°C, proche de l'optimale sera utilisée pour la suite de notre travail. Les cultures destinées à entretenir la souche cellulaire seront cependant maintenues à 21°C et repiquées toutes les deux semaines.

B - LA LUMIERE

Bien que le contact du milieu liquide ne favorise pas la synthèse des pigments chlorophylliens et que la majorité des cellules cultivées en milieu liquide agité ne possèdent pas de chloroplastes, de nombreuses souches sont maintenues en lumière continue ou périodique. D'autres, telles que les souches isolées par LAMPORT (1964) et la souche de Tabac cultivée par KATO et Coll. (1972) sont placées à l'obscurité. Depuis leur isolement les cellules de Silène ont été entretenues à la lumière (lumière du jour + éclairage d'appoint d'environ 500 lux, fourni 12 h sur 24, par des tubes fluorescents).

1 - Résultats

Pour étudier les effets de la lumière sur la croissance, des cultures ont été placées dans des chambres conditionnées dont la température était fixée à 25°C et l'éclairage programmable.

Quand l'intensité de l'éclairage est faible (environ 500 lux au niveau des flacons de culture), la croissance est la même en lumière continue, en photopériode 12 : 12 et à l'obscurité.

En éclairage continu, l'augmentation d'intensité entre 500 et 4000 lux, ralentit la croissance. Au-dessus de 2000 lux, l'inhibition est déjà importante lors du premier passage ; elle augmente encore pendant le second passage (Tableau XLIII).

Contrairement à ce qui a été rapporté pour des suspensions cellulaires de Tabac (KOHNO et YOSHIDA, 1977) et d'Erable (DAVEY et STREET, 1971), la lumière est sans effet sur la différenciation des chloroplastes dans les cellules

de Silène cultivées en milieu liquide agité. Dans les mêmes conditions, on observe une augmentation importante de la taille et du nombre des leucoplastes amylofères dans une culture cellulaire d'Erable, mais pas de chloroplastes typiques (DUBOIS et MORVAN, 1978).

CONDITIONS D'ECLAIREMENT		CROISSANCE					
Intensité (lux)	Photopériode	Δ MF (g/culture)			Δ MS (g/culture)		
		P I	P II	P III	P I	P II	P III
500	24 : $\bar{0}$	43,6	44,9	49,7	1,82	1,22	1,57
500	12 : $\bar{12}$	41,4	44,0	50,0	1,89	1,25	1,54
500	0 : $\bar{24}$	45,9	42,5	47,0	1,87	1,26	1,68
0	24 : $\bar{0}$	48,0	46,4	-	1,36	1,38	-
500	24 : $\bar{0}$	48,2	44,8	-	1,40	1,37	-
1 000	24 : $\bar{0}$	40,6	38,5	-	1,23	1,21	-
2 000	24 : $\bar{0}$	36,7	36,3	-	1,08	1,02	-
4 000	24 : $\bar{0}$	27,9	20,6	-	0,98	0,70	-

TABLEAU XLIII : Influence des conditions d'éclairement sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

P I, P II, P III : 1er, 2ème et 3ème passage d'une durée de 13 ± 1 jour ;

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température 25°C .

Les effets de la longueur d'onde de la lumière ont été peu étudiés car les cultures en milieu liquide agité se prêtent mal à ce type d'expériences. Nous n'avons pas encore eu la possibilité matérielle de cultiver des cellules de Silène en lumière monochromatique. D'après MATSUMOTO et Coll. (1972) les radiations rouges stimulent légèrement la croissance des cellules de Tabac et de Peuplier et les radiations bleues réduisent surtout celle des cultures cellulaires de Peuplier.

2 - Conclusion et discussion

Il est difficile de comparer les effets de la lumière sur différentes suspensions cellulaires parce que les conditions expérimentales varient beaucoup d'un laboratoire à l'autre et surtout parce que les recherches effectuées dans ce domaine sont très peu nombreuses. Compte tenu de ces réserves, on peut cependant

classer les suspensions cellulaires en trois catégories, selon leur réponse vis à vis de ce facteur :

- suspensions cellulaires dont la croissance est stimulée par la lumière : Pinus banksiana (DURZAN et CHALUPA, 1976), Nicotiana glutinosa (KOHNO et YOSHIDA, 1977) ; Marchantia polymorpha (OHTA et Coll., 1977), dont les cellules sont très riches en chlorophylles et Acer pseudoplatanus (DUBOIS et MORVAN, 1978) ;

- suspensions cellulaires dont la croissance est réduite à la lumière : Calystegia sepium (ROSSINI, 1974) et Silene alba (DUBOIS et MORVAN, 1978).

- suspensions cellulaires dont la croissance n'est pas (ou peu) affectée par la lumière : Daucus carota (TORREY et REINERT, 1961) Populus hybrides et Nicotiana glutinosa et tabacum (var. Xanthi), (MATSUMOTO et Coll., 1972).

C - LE pH DU MILIEU DE CULTURE

Des recherches entreprises sur des cultures de tissus végétaux entre 1945 et 1955 permirent d'établir que la croissance est généralement maximum en milieu légèrement acide. Elles ont également montré que des tissus cultivés sur des milieux gélosés dont le pH initial varie de 6 à 9 tendent à ramener progressivement le pH au voisinage de la neutralité (GAUTHERET, 1959, p. 665-666). Les cellules cultivées en milieu liquide agité sont plus sensibles aux variations du pH (ROSSINI, 1972 ; NESIUS et FLETCHER, 1973). Selon MARTIN et ROSE (1978), les variations de la croissance seraient provoquées par des modifications de la nutrition azotée et carbonée en relation avec le pH du milieu.

1 - Variations du pH au cours du cycle de croissance

Le pH du milieu est de $5,7 \pm 0,1$ avant l'autoclavage et de $5,6 \pm 0,1$ après. L'introduction de 3 g de cellules provenant d'une suspension cellulaire de 14 jours le ramène à $5,7 \pm 0,1$. Le pH est mesuré tous les deux jours sur une partie aliquote du milieu prélevée aseptiquement ou bien directement dans le flacon de culture ; les valeurs obtenues par les deux

méthodes sont les mêmes à 0,1 ou 0,2 unités près.

Nous avons effectué 7 séries de mesures dans des cultures maintenues à $21 \pm 1^\circ\text{C}$. D'une expérience à l'autre, le pH varie de 0,2 à 0,3 unités au cours de la première partie du cycle de croissance et de 0,4 à 0,6 unités au cours de la seconde partie. Il augmente légèrement pendant 3 ou 4 jours, puis diminue, sans toutefois revenir à la valeur initiale ; il augmente de nouveau du 8e au 18e jour (Fig. 38).

Le milieu renfermant des nitrates comme seule source d'azote, l'augmentation du pH est sans doute provoquée par la consommation des ions NO_3^- entraînant une exsorption d'ions OH^- . L'absorption plus ou moins rapide des nitrates au cours des premiers jours de culture, en relation avec l'état physiologique des cellules ensemencées, rendrait compte des différences enregistrées selon les expériences.

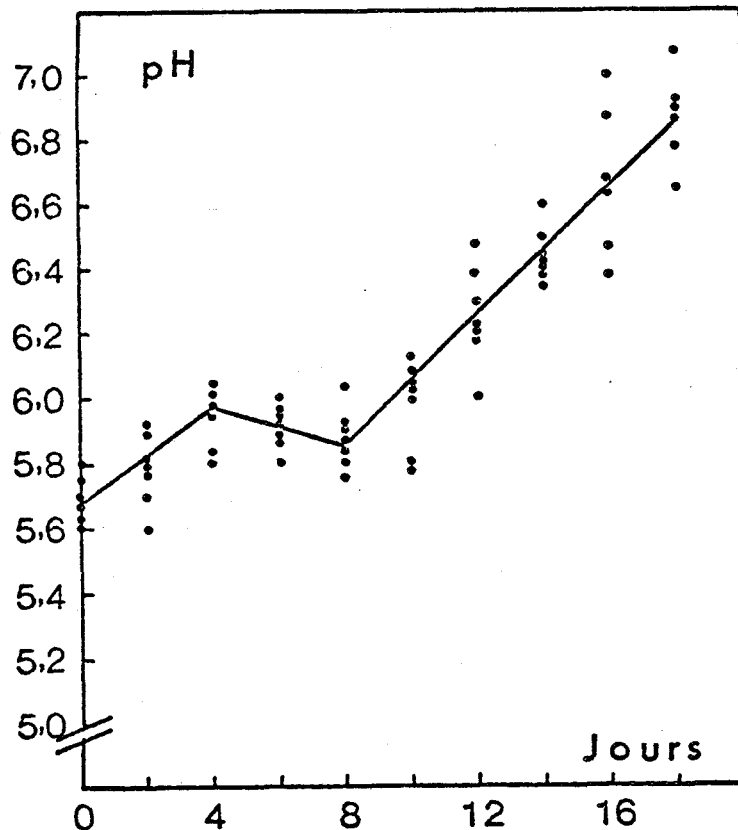


Figure 38 : Variation du pH du milieu au cours d'un cycle de croissance des cellules de Silène.

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 13 ± 1 jours ; température 21°C ; lumière du jour + lumière d'appoint : 500 lux, 12 : 12 .

On obtient des résultats comparables lorsque les cellules de Silène sont placées à 25°C. A cette température, le pH reste stationnaire ou diminue à partir du 12e jour. L'inflexion de la courbe correspond à l'épuisement des nitrates exogènes (2e partie, 4, E).

2 - Modification du pH initial

Pour déterminer le pH le plus favorable à la multiplication des cellules de Silène, nous avons ajouté de l'HCl, 2 N ou du KOH, N au milieu après autoclavage, de manière à ce que le pH initial du milieu varie entre 3,0 et 10,0. Les valeurs du pH mesuré d'abord toutes les 24 h, puis à partir du 4e jour, toutes les 48 h et celles de la croissance mesurée au début de la phase stationnaire sont rapportées dans la figure 39.

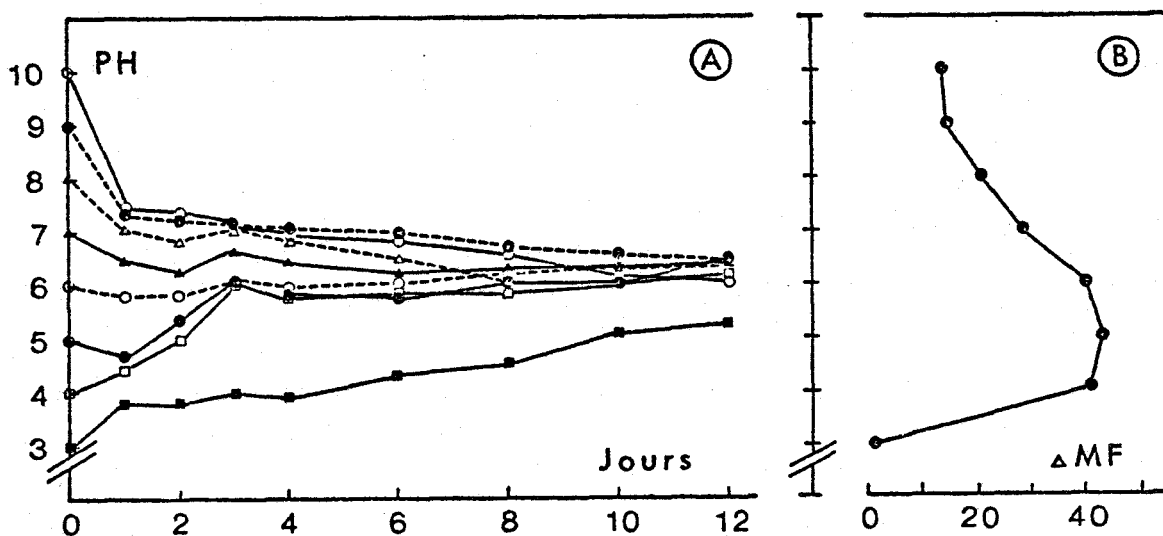


Figure 39 : Effet de la valeur du pH initial du milieu sur l'évolution du pH du milieu, au cours du cycle de croissance (A) et sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène (B). La croissance, exprimée en g de MF / culture, est mesurée le 12e jour).

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C ;
lumière : 500 lux, 24 : 0.

Comme les cultures de tissus, les cellules en suspension tendent à ajuster progressivement le pH du milieu, sauf si celui-ci est trop acide ($\text{pH} < 4,0$). Quand le pH initial est égal à 6,0, les variations enregistrées au cours de la culture sont faibles (Fig. 39, A).

Bien que les pH se rapprochent peu à peu de celui des suspensions cultivées sur le milieu standard, la croissance varie en fonction du pH

La croissance des cellules varie en fonction du pH :

- à pH 4,5, elle est plus importante que dans le milieu standard (non tamponné) ;
- à pH 5,7, elle est du même ordre que dans le milieu standard ;
- à pH 6,5, elle est fortement ralentie (Fig. 40, B).

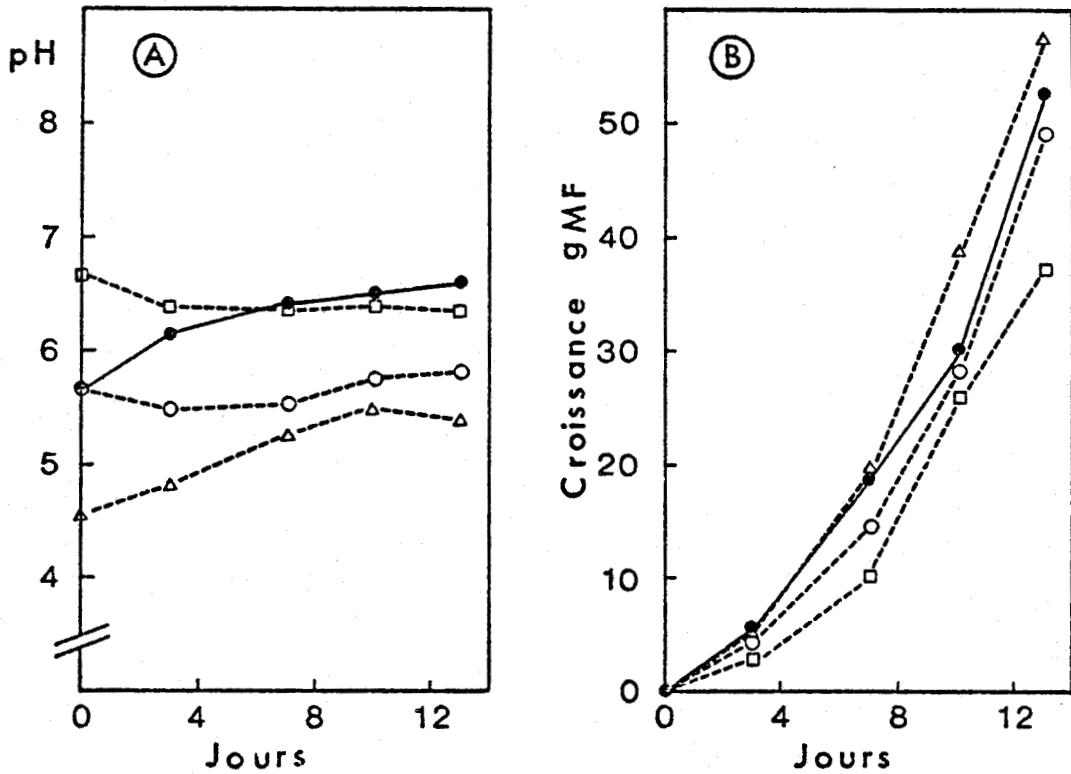


Figure 40 : Effets du pH initial des milieux contenant du M.E.S., 0,05 M sur l'évolution du pH du milieu au cours de la culture (A) et sur la croissance des suspensions cellulaires de *Silène* (B).

pH initial $\left\{ \begin{array}{l} 4,5 : \Delta \text{---} \Delta \\ 5,7 : \text{O} \text{---} \text{O} \\ 6,5 : \square \text{---} \square \\ 5,7 : \bullet \text{---} \bullet \end{array} \right\}$ milieux tamponnés
 milieu standard (non tamponné)

Inoculum : 3⁺ 0,2 g de cellules âgées de 12 jours ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

Une solution de M.E.S. deux fois plus concentrée (concentration finale, 0,1 M au lieu de 0,05 M) stabilise complètement le pH pendant toute la durée de la culture mais provoque une réduction importante du taux de croissance.

Nous avons également effectué plusieurs cultures dans un fermenteur équipé d'un système de régulation du pH. C'est la seule technique qui permette

d'ajuster le pH sans trop modifier l'équilibre de la solution nutritive, en ajoutant progressivement de l'acide chlorhydrique ou de la potasse. Nous n'avons pas pu poursuivre nos essais suffisamment longtemps pour obtenir des résultats reproductibles. De plus, pour établir des comparaisons, il faudrait disposer de plusieurs fermenteurs de manière à les ensemercer avec des cellules provenant d'un même lot de cultures.

4 - Conclusion et discussion

Les résultats obtenus en modifiant le pH initial par HCl ou KOH, en présence ou non de M.E.S. montrent qu'un pH initial inférieur à 4,0-4,5 ou supérieur à 6,0-6,5 inhibe très fortement la croissance des cellules de Silène. Pour cette suspension cellulaire, le pH optimum est compris entre 4,5 et 5,5.

Comme beaucoup de cultures de tissus végétaux, les suspensions cellulaires de Silène se développent mieux en milieu légèrement acide. C'est le cas également des cultures cellulaires de Rosier (NESIUS et FLETCHER, 1973).

On sait depuis longtemps, et MARTIN et ROSE (1978) viennent de le vérifier avec des suspensions cellulaires d'Ipomoea que l'absorption des ions NO_3^- est favorisée lorsque le pH est légèrement acide. Or, les nitrates représentent la seule source d'azote du milieu de LESCURE modifié que nous utilisons pour nos cultures de Silène.

Le pH intervient également sur la pénétration des régulateurs de croissance dans les cellules. Un pH faiblement acide favorise la pénétration du ANA dans des cellules isolées de feuille de Poirier (NORRIS et BUKOVAC, 1972). Plus récemment LEGUAY et GUERN (1977) ont montré que l'entrée du 2,4-D dans des cellules d'Erable cultivées en milieu liquide agité dépend à la fois du pH du milieu et du pH intracellulaire.

Les effets du pH sont-ils aussi importants à tous les stades du cycle de croissance, ou plus importants à une période particulière ? Nos résultats montrent que ce facteur joue un rôle déterminant pendant les 2 ou 3 premiers jours. Pour répondre plus complètement à cette question, il faudrait faire varier le pH à d'autres stades de la culture, notamment à la fin de la période exponentielle.

Le travail de STUART et STREET (1969) concernant le conditionnement des milieux souligne également l'importance du pH initial. En effet, si ce pH est optimal (6,4 pour des cellules d'Erable), la densité cellulaire critique est plus faible et la période de latence est plus courte. Le pH optimal produit donc les

mêmes effets que l'emploi d'un milieu conditionné. De plus, l'utilisation d'un tel milieu n'est totalement efficace que si le pH est voisin de l'optimum. On peut donc en conclure que le pH initial représente l'un des facteurs qui interviennent dans le conditionnement du milieu.

D - AERATION DU MILIEU DE CULTURE

Dans des cultures en fermenteur, l'aération du milieu est maintenue constante en faisant barboter dans la cuve soit de l'air comprimé, soit un mélange air-oxygène. Nous avons obtenu de bons résultats avec un débit d'air de 3 ou 4 l.mn⁻¹, sous une pression de 2 bars. Dans les flacons de culture, l'aération du milieu ne résulte que des échanges gazeux à travers le bouchon de coton qui les obture. C'est pourquoi nous nous sommes demandé si l'oxygénation du milieu était suffisante ou si, au contraire, elle était l'un des facteurs limitant la croissance des cellules de *Silène*.

1 - Mesure de l'oxygène dissous et de la respiration

Nous avons mesuré l'oxygène dissous dans le milieu au cours d'un cycle de croissance de 14 jours, à 25°C et en lumière continue. Les résultats rapportés sur la figure 41, A montrent que la tension d'oxygène diminue rapidement : au 7e jour, elle est 2 fois plus faible qu'au démarrage de la culture ; au 14e jour, elle est 3 fois plus faible.

Parallèlement aux mesures de l'oxygène dissous, nous avons analysé l'évolution de l'intensité respiratoire des cellules et mesuré leur croissance (Fig. 41, A et B). L'intensité respiratoire augmente au cours de la première journée, puis diminue pour atteindre vers le 7e jour, la valeur initiale ; au cours de la seconde semaine de culture, l'IRMF et l'IRMS diminuent rapidement. L'intensité respiratoire est donc élevée au début du cycle de croissance, quand le milieu est bien oxygéné ; elle est faible à la fin de la phase stationnaire, lorsque le milieu est peu oxygéné. Malgré la diminution specta -

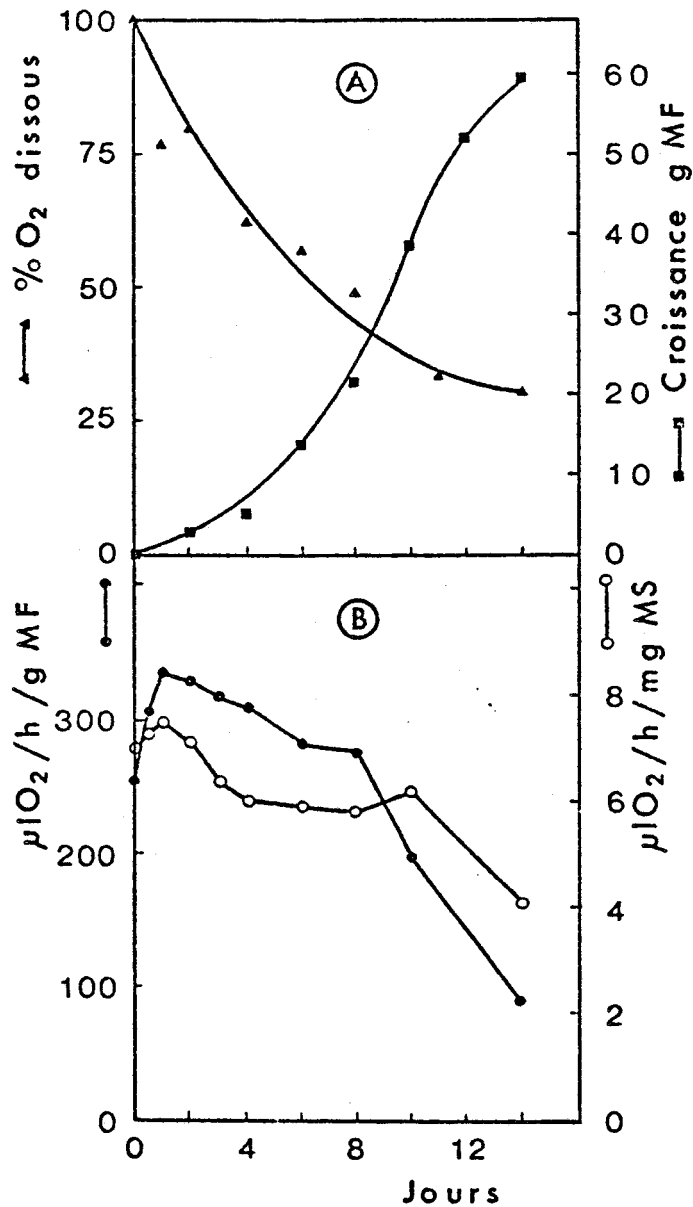


Figure 41 A : Variations de l'oxygénation du milieu de culture (en % par rapport à un milieu non ensemencé) et de la croissance (M F) d'une suspension cellulaire de Silène.

B : Evolution de l'intensité respiratoire au cours d'un cycle de croissance.

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

culaire du pourcentage d'oxygène dissous, l'intensité respiratoire d'une culture ne diminue pas : elle est d'environ 2 ml d'O₂ par heure le 2ème jour et passe à 5 ou 6 ml par heure entre le 7ème et le 14ème jour.



2 - Modification de l'oxygénation du milieu

a. importance du rapport : $\frac{\text{volume milieu}}{\text{volume flacon}}$

Les cellules ont été introduites à la concentration initiale de 15 mg de M.F.ml⁻¹ dans des fioles d'attaque de 250, 500 et 1000 ml contenant chacune 100 ml de milieu standard. Les mesures de l'oxygène dissous effectuées après 3, 7 et 12 jours de cultures ont fourni les résultats suivants :

Jours	volume du flacon de culture		
	250 ml	500 ml	1000 ml
0	100 %	100 %	100 %
3	92 %	90 %	95 %
7	43 %	52 %	65 %
12	25 %	36 %	44 %

En augmentant le volume du flacon, on réduit l'épaisseur du liquide qui se déplace le long des parois de celui-ci et on augmente en même temps la surface libre du milieu. Les échanges gazeux sont facilités et il en résulte une meilleure oxygénation de la solution nutritive.

b. mode d'obturation des flacons de culture

Nous avons constitué 3 lots de culture :

- lot n° 1 : les flacons sont obturés par un bouchon de coton hydrophile normalement serré et recouverts d'un morceau de papier craft maintenu par un bracelet de caoutchouc ;
- lot n° 2 : les flacons sont obturés par un bouchon de coton très lâche ;
- lot n° 3 : les flacons sont fermés par un bouchon de coton très serré et recouverts de deux feuilles d'étain étroitement appliquées (à chaud) sur le col.

Dans les deux premiers lots, la tension d'oxygène varie à peu près de la même manière, toutefois l'aération du milieu est légèrement meilleure quand le bouchon de coton est peu serré. Le pourcentage d'oxygène dissous diminue plus rapidement dans les cultures du 3ème lot. Remarquons qu'au 14ème jour, les pourcentages sont identiques dans les trois lots de cultures (Fig. 42, A).

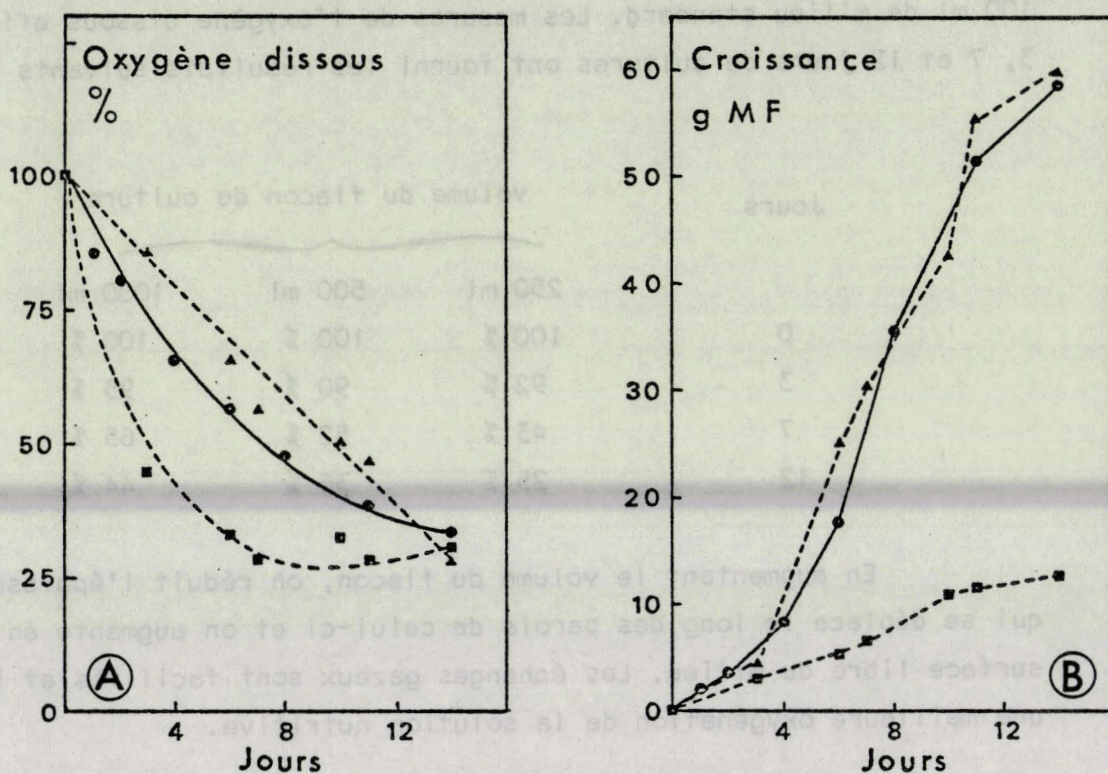


Figure 42 : Effets du mode d'obturation des flacons de culture sur l'oxygénation du milieu (en % par rapport à un milieu non ensemencé) (A) et sur la croissance de la suspension cellulaire de *Silène* (B).

- lot n° 1 (témoin) : ●—●
- lot n° 2 (coton lâche) : ▲—▲
- lot n° 3 (coton très serré) : ■—■

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

La croissance des deux premiers lots de cultures est normale ; celle du 3ème lot est très faible (Fig. 42, B). Ainsi, en réduisant l'oxygénation des cultures, on réduit également le taux de croissance ; en l'augmentant un peu, on stimule très légèrement la prolifération des cellules.

3 - Conclusion et discussion

Les résultats rapportés ci-dessus montrent que le taux d'oxygène dissous dans le milieu contrôle la croissance des suspensions cellulaires de Silène. Cependant, dans les conditions habituelles de culture, l'oxygénation n'est pas un facteur limitant. En effet, on ne stimule pas (ou très peu) la croissance si on augmente l'oxygénation du milieu en agissant sur le mode d'obturation des flacons et sur le rapport volume de la suspension / volume du flacon. D'autre part, dans des cultures en fermenteur, on ne prolonge pas la durée de la phase de croissance active bien que le taux d'oxygène dissous soit maintenu constant pendant toute la durée de la culture.

L'oxygène n'est pas le seul gaz qui intervienne sur la croissance. NESIUS et FLETCHER (1973) ont montré qu'en piégeant le CO_2 on réduit la prolifération des cellules de Rosier et GATHERCOLE et Coll. (1976) ont établi qu'il faut 1 % de CO_2 pour initier la croissance des suspensions cellulaires d'Erable. D'après ces derniers auteurs, l'effet bénéfique ne résulterait pas d'une simple modification du pH, comme cela avait été précédemment envisagé. Le CO_2 pourrait modifier la perméabilité cellulaire (DOREE et Coll., 1972) et/ou agir sur des enzymes du métabolisme intermédiaire (VANDERHOVEN et ZRYD, 1978). L'éthylène (DALTON et STREET, 1976 ; CONSTABEL et Coll., 1977) et l'azote gazeux (CONSTABEL et Coll., 1974) sont également susceptibles d'intervenir sur la division et le verdissement des cellules cultivées en milieu liquide agité.

CHAPITRE 4 : FACTEURS CHIMIQUES CONTROLANT LA CROISSANCE.

On connaît aujourd'hui de nombreuses suspensions cellulaires qui se développent dans des milieux liquides renfermant des éléments minéraux un sucre, des phytohormones (souvent du 2,4-D) et des vitamines (le plus souvent la vitamine B₁). D'un point de vue qualitatif, les milieux utilisés ont beaucoup de points communs, car la plupart dérivent de celui mis au point par MURASHIGE et SKOOG, pour les tissus de Tabac ou de la solution préconisée par LAMPORT pour cultiver les cellules d'Erable.

A - CHOIX D'UN MILIEU DE BASE POUR LES CELLULES DE SILÈNE

1 - Éléments minéraux

Au lieu d'entreprendre l'analyse systématique des effets exercés par les sels minéraux sur la croissance des cellules de Silène, nous avons préféré comparer l'action de trois solutions minérales couramment utilisées au laboratoire pour cultiver des tissus végétaux : celles de HELLER, de MURASHIGE et SKOOG et de LESCURE, milieu de LAMPORT modifié.

En plus des éléments propres à chacune de ces solutions, nous avons ajouté au milieu de culture 2 % (poids/volume) de saccharose et 10^{-6} g.ml de 2,4-D et de vitamine B₁.

La solution nutritive préconisée par LESCURE pour la culture de cellules d'Erable est celle qui assure la croissance la plus importante. Au premier passage, la biomasse obtenue est environ 2 fois plus élevée que la solution minérale de MURASHIGE et SKOOG et il en est de même au cours des passages suivants (Tableau XLIV).

La solution de HELLER assure une croissance très irrégulière : importante lors du 1er passage, faible à l'issue du second, moyenne à la fin du troisième (Tableau XLIV). Pour éviter d'éventuelles carences, nous avons repiqué les cellules sur des milieux neufs après 9 jours au lieu de 14. Les résultats obtenus ne sont pas meilleurs.

A la suite de ces essais, nous avons donc retenu la solution minérale de LESCURE, comme milieu de base pour la culture des suspensions cellulaires de Silène. Il est certain que cette méthode ne permet pas de connaître les besoins exacts des cellules. Toutefois, il faut noter que la solution de LESCURE se caractérise par une forte concentration en nitrates et en potassium, et par des rapports K⁺/Ca⁺ et K⁺/Na⁺ élevés, surtout si on les compare

	MURASHIGE & SKOOG		LESCURE	HELLER
	sels minéraux	sels minéraux acides aminés vitamines		
1	18,4 ± 2,1	39,8 ± 5,6	39,2 ± 5,4	42,5 ± 8,0
2	23,1 ± 1,6	31,6 ± 3,5	37,8 ± 6,7	4,0 ± 2,6
3	20,9 ± 1,5	34,3 ± 3,0	44,4 ± 5,2	25,5 ± 2,5

TABLEAU XLIV : Croissance d'une suspension cellulaire de Silène dans différentes solutions nutritives. La croissance (g de M F/culture) est déterminée après 3 passages successifs d'une durée de 11 ± 1 jour chacun.

Inoculum : 3,0 ± 0,2 g de cellules âgées de 12 jours ; température : 21°C ; lumière du jour + lumière d'appoint (500 lux, 12 : 12)

à ceux de la solution de HELLER. Notons également qu'elle renferme des nitrates comme seule source d'azote, alors que la solution minérale de MURASHIGE et SKOOG contient des ions ammonium en plus des ions NO_3^- .

2 - Importance du 2,4-D et de la vitamine B₁

Notre milieu de base renferme 10^{-6} g.ml⁻¹ de 2,4-D et une dose identique de vitamine B₁ fournie sous forme de chlorhydrate de thiamine. Il nous fallait vérifier si ces substances étaient indispensables et rechercher leur concentration optimale.

La croissance des cellules de Silène est impossible dans le milieu de LESCURE dépourvu de 2,4-D ou en contenant une dose égale ou inférieure à 10^{-8} g.ml⁻¹. Au cours de trois passages successifs, les biomasses les plus élevées ont été obtenues pour des concentrations comprises entre $5 \cdot 10^{-7}$ et $5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹, sans qu'il soit possible de déterminer véritablement la dose optimale. A partir de 10^{-5} g.ml⁻¹, on observe une réduction de la croissance (Fig. 43).

En ce qui concerne la thiamine, les résultats rapportés dans la figure 44, montrent que les cellules de Silène sont hétérotrophes à cette substance. Une dose de 10^{-7} g.ml⁻¹ est suffisante pour assurer la croissance. Des concentrations 100 ou 1000 fois supérieures ne sont pas toxiques, mais elles n'amplifient pas la prolifération cellulaire.

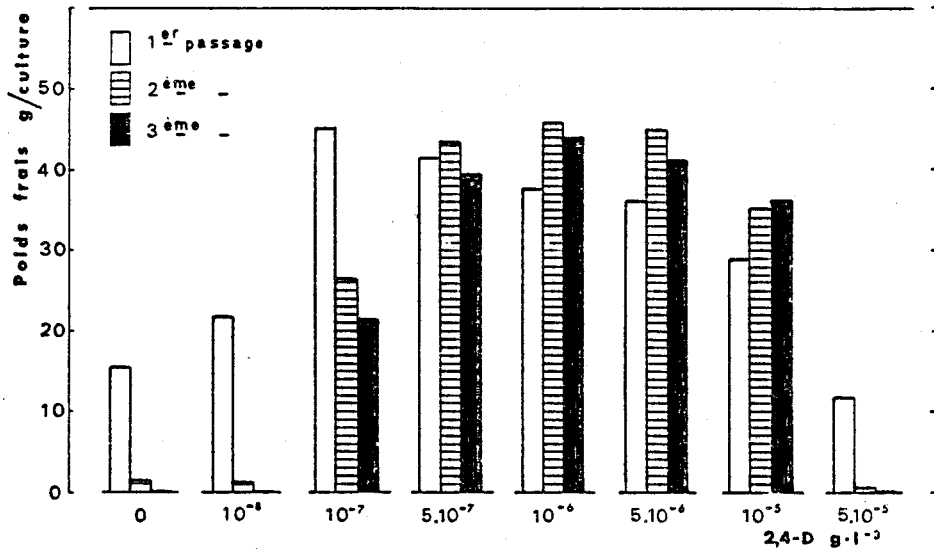


Figure 43 : Influence de différentes concentrations de 2,4-D sur la croissance.

Inoculum : $3,0 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 12 jours ; température 21°C ; lumière du jour + lumière d'appoint (500 lux, 12 : 12) ; chaque passage a une durée de 12 jours .

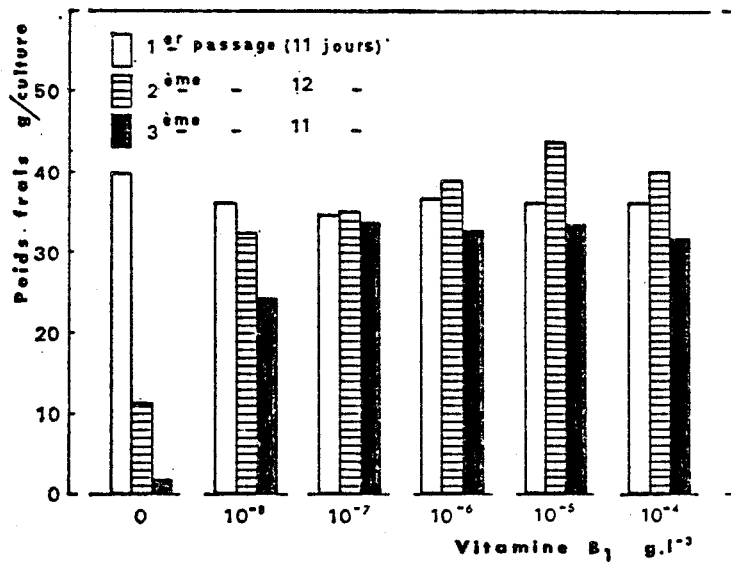


Figure 44 : Influence de différentes concentrations de vitamine B₁ sur la croissance.

Inoculum : $3,0 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 12 jours ; température 21°C ; + lumière du jour + lumière d'appoint (500 lux, 12 : 12).



B - LES REGULATEURS DE CROISSANCE

1 - Effets comparés de quelques composés auxiniques

Beaucoup de suspensions cellulaires sont cultivés en présence de 2,4-D ou de ANA, ces substances favorisant à la fois la multiplication des cellules et, plus ou moins selon la souche considérée, leur dispersion dans le milieu. Celles de la souche Sa₁ de Silène, entretenues sur le milieu de LESCURE renfermant 10^{-6} g.ml⁻¹ de 2,4-D présentent un taux de croissance et de dissociation satisfaisants, mais montrent une forte hétérogénéité du point de vue chromosomique. La plupart des cellules sont polyploïdes ou aneuploïdes, ce qui entraîne des anomalies de la mitose (2e partie, 1, C₄).

En culture in vitro, l'augmentation de la ploïdie et des mitoses anormales sont fréquemment observées, aussi bien dans des colonies tissulaires (STRAUS, 1954; TORREY, 1961 ; SACRISTAN, 1971 ; NOVAK, 1974) que dans des suspensions cellulaires (HEINTZ et Coll., 1969 ; SUNDERLAND, 1973 ; RASHID et STREET, 1974 ; BAYLISS et GOULD, 1974). Des diminutions du nombre des chromosomes ont également été signalées dans plusieurs cultures (SHIMADA et TABATA, 1967 ; SINGH et Coll., 1972 ; NOVAK, 1974). Les régulateurs de croissance et particulièrement le 2,4-D, la kinétine et le lait de coco sont tenus pour responsables de ces variations (TORREY, 1961 ; MITRA et STEWARD, 1961 ; SHAMINA, 1966 cité par NOVAK, 1974 ; RASHID et STREET, 1974) ; bien que dans certaines suspensions cellulaires, pourtant cultivées en présence de 2,4-D, le nombre de chromosomes varie peu par rapport à celui des plantes entières (KAO et Coll., 1970).

Dans les cultures de Haplopappus gracilis, la polyploïdisation des cellules est moins rapide quand on remplace le 2,4-D par du ANA (SHAMINA, 1966 cité par SUNDERLAND et SUNDERLAND, 1973). Les résultats de ces différents travaux nous ont incité à remplacer le 2,4-D par du ANA dans le milieu. A titre de comparaison, nous avons également employé l'acide naphthoxyacétique utilisé par HENRY et Coll. (1978) pour une autre souche cellulaire de Silene alba et l'acide β -indolylacétique, très rarement employé pour promouvoir la croissance des suspensions cellulaires.

a - biomasse des cultures

La concentration optimale du 2,4-D est de $5 \cdot 10^{-7}$ M, soit environ dix fois plus faible que celle que nous avons déterminée en 1973, peu de temps après avoir isolé la suspension cellulaire (Fig. 45). Une telle diminution correspond sans doute au phénomène d'accoutumance, fréquemment mis en évidence en culture in vitro (GAUTHERET, 1956 p. 656).

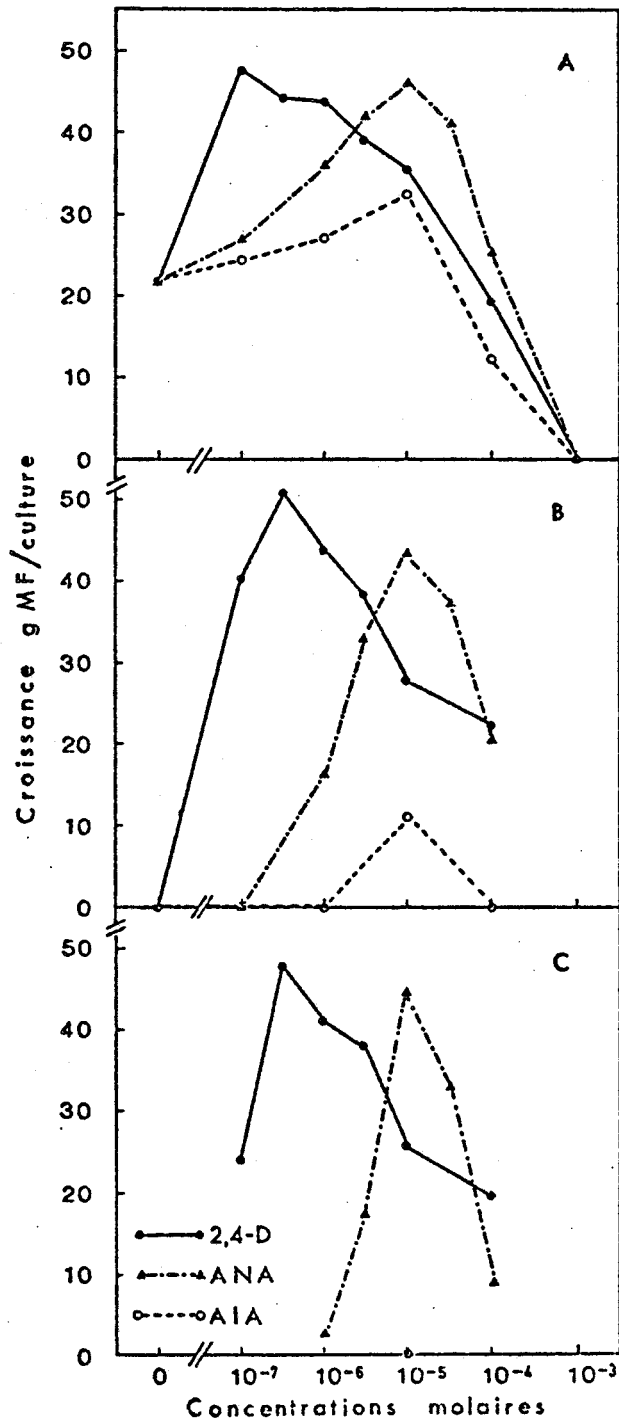


Figure 45 : Effets de la nature et de la concentration des régulateurs de croissance sur la prolifération et la subculture des suspensions cellulaires de Silène.

A : 1er passage ; B : 2ème passage ; C : 3ème passage ;

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.



Nous avons déjà signalé (2ème partie, 1, C₄) que la suspension cellulaire de Silène, isolée depuis plus de 6 ans, est actuellement composée presque exclusivement de cellules polyploïdes. Il est possible que la diminution des besoins en 2,4-D corresponde à la sélection, au cours des passages successifs, de cellules plus ou moins polyploïdes. Une relation entre le taux de ploïdie et la sensibilité vis à vis d'un autre facteur de croissance a été établie par TORREY (1961), dans des cals d'origine racinaire de Pois. Cet auteur a en effet montré que la kinétine favorise davantage la division des cellules tétraploïdes que celle des cellules diploïdes.

Le ANA assure également la croissance indéfinie des suspensions cellulaires de Silène. La prolifération optimale exprimée en poids de M F est du même ordre que celle obtenue avec le 2,4-D, mais on l'observe pour des concentrations supérieures (environ $1.10^{-5}M$). Le poids de M S est même un peu plus élevé, car le ANA réduit l'hydratation des cellules. Au cours des passages successifs, le ANA perd son efficacité aux concentrations inférieures à $5.10^{-6}M$ et sa toxicité augmente pour des doses supérieures à $5.10^{-5}M$.

L'acide naphtoxyacétique a un effet analogue à celui du ANA. A partir du 3ème passage, seules les doses comprises entre $1.10^{-6}M$ et $1.10^{-5}M$ assurent une prolifération comparable à celle que l'on obtient avec $5.10^{-7}M$ de 2,4-D (Tableau XLV).

PASSAGES	ACIDE NAPHTOXYACETIQUE (concentrations molaires)						
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	5.10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
1er	106,5	114,2	109,1	99,6	102,5	93,8	52,1
2ème	15,8	36,2	69,3	108,8	97,3	98,5	51,2
3ème	-	-	30,6	99,4	103,7	110,6	40,3

TABLEAU XLV : Effet de la concentration de l'acide naphtoxyacétique sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

La croissance est exprimée en % de M F par rapport à celle que l'on obtient dans un milieu témoin contenant $5.10^{-7}M$ de 2,4-D.

Chaque passage a une durée de 14 jours.

L'acide β -indolylacétique ne favorise que très légèrement la pro-

190

lification, lors du 1er passage. Au second, le milieu contenant une dose de 10^{-5} M de AIA est le seul qui assure une faible multiplication cellulaire. Toutes les cellules se nécrosent lors du 3ème passage (Figure 45).

b. observations cytologiques

Nous n'avons pas constaté de modifications caryologiques après 3 passages dans les milieux contenant du ANA au lieu du 2,4-D. Le taux de ploïdie ne diminue pas. Ceci n'exclut pas que la polyploïdisation puisse être moins rapide et/ou moins élevée dans des cultures contenant de l'acide naphtylacétique. Pour le vérifier, il faudrait isoler de nouvelles suspensions cellulaires à partir de fragments de tige de Silène et les placer directement sur des milieux contenant soit du ANA, soit du 2,4-D.

L'acide naphtylacétique ne provoque pas la formation de chloroplastes dans les cellules de Silène, alors qu'il stimule la différenciation de ce type de plastes dans les suspensions cellulaires d'Erable (YEOMAN et STREET, 1973).

La diminution de la concentration initiale du 2,4-D ou son remplacement par du ANA ne modifie pas la dispersion des cellules de Silène, contrairement à ce que l'on observe chez l'Erable (SIMPKINS, COLLIN et STREET (1970) et chez Atropa belladonna (DAVEY, FOWLER et STREET, 1971). Les cultures de Silène effectuées en présence de AIA (10^{-5} M) contiennent moins de cellules isolées et davantage d'agrégats de plus grande taille.

c. Activité peroxydasique et isoperoxydases

Nous avons précédemment montré que l'activité peroxydasique varie au cours du cycle de croissance : elle diminue pendant la phase exponentielle et augmente quand la multiplication des cellules est ralentie (2ème partie, 1, E₂). Les résultats rapportés dans le tableau XLVI montrent que l'activité peroxydasique varie également en fonction du régulateur de croissance utilisé.

Les activités des peroxydases solubles (fraction E₁) sont les mêmes dans les cellules cultivées en présence de ANA et de 2,4-D. Elles sont 2 à 3 fois plus importantes dans les cellules cultivées dans le milieu de base seul ou enrichi en AIA.

Les activités des peroxydases liées ioniquement (fraction E₂) sont légèrement inférieures quand on remplace le 2,4-D par du ANA et nettement plus élevées quand il est absent ou remplacé par du AIA. Elles augmentent au cours de la culture, mais d'une façon beaucoup plus importante si le milieu ne renferme pas de régulateur de croissance ou s'il contient de l'acide β-indolylacétique. Notons que les écarts sont encore plus grands quand on rapporte les activités peroxydasiques aux protéines de l'extrait (activité spécifique) au lieu de les exprimer par rapport au poids de MF.

Les peroxydases liées de façon covalente (fraction E₃) ont une activité identique dans les cellules entretenues dans le milieu de base et dans celui contenant du AIA. A la fin de la 1ère et de la 2ème semaine de culture, elles sont environ 3 fois plus élevées que dans les cellules cultivées dans un milieu contenant du 2,4-D ou du ANA.

AGE DES CULTURES		7 jours				14 jours				
REGULATEURS DE CROISSANCE		0	AIA	ANA	2,4-D	0	AIA	ANA	2,4-D	
Fractions cellulaires	E ₁	DO/g M F	15,5	15,3	7,8	8,8	14,8	15,4	6,4	5,5
		DO/mg P	4,0	3,6	1,6	1,8	6,3	6,4	2,8	2,4
	E ₂	DO/g M F	44,0	29,3	17,3	21,3	70,0	66,6	23,3	24,6
		DO/mg P	136,6	86,4	35,6	45,4	402,3	292,1	81,2	92,1
	E ₃	DO/mg M F	8,4	6,5	3,0	2,7	9,3	9,7	2,4	4,4
	milieu de culture	DO/ml	4,1	3,2	2,0	2,3	5,3	6,6	4,0	3,4

BUS LILLE

TABLEAU XLVI : Activité peroxydasique (DO à 420 nm en 1 mn) de fractions cellulaires et du milieu de culture d'une suspension cellulaire de Silène cultivée pendant 7 et 14 jours en présence de doses optimales de AIA (10⁻⁵M), de ANA (10⁻⁵M) de 2,4-D (5.10⁻⁷M) ou sans régulateur de croissance (0).

E₁ : fraction soluble ; E₂ : fraction ionique ; E₃ : fraction covalente ; MF : poids de matière fraîche ; P : protéines de l'extrait.

La teneur en protéines de l'extrait E₃ ne peut être mesurée, le dosage étant faussé par la présence de cellulase et de pectinase.

Après 7 jours de culture, 3 isoenzymes (C_1 , A_1 et A_3) ont été identifiées dans la fraction soluble des cellules cultivées dans un milieu contenant du 2,4-D ou du ANA. Une isoenzyme supplémentaire (C_3) apparaît en présence de AIA et 2 supplémentaires (C_3 et C_4) en l'absence de régulateur de croissance. Au 14ème jour, on relève 5 isoenzymes quand le milieu renferme du 2,4-D ou du ANA et 6 quand il ne contient pas de régulateur de croissance ou uniquement du AIA (LEGRAND et DUBOIS, 1978). Les fractions ioniques et covalentes qui ne renferment que 2 isoenzymes peroxydasiques, dans les conditions standard de culture, n'ont pas été analysées.

On peut déduire de ces résultats qu'en présence de 2,4-D ou de ANA, les cellules de Silène prolifèrent de façon identique, ont des activités peroxydasiques voisines et les mêmes isoperoxydases. Au contraire, en présence de AIA et sans phytohormone, les cellules prolifèrent très peu ont des activités peroxydasiques élevées et davantage d'isoperoxydases, surtout à partir du 7ème jour de culture.

L'activité peroxydasique du milieu de culture varie également en fonction de la nature du régulateur de croissance : elle est faible s'il contient du 2,4-D ou du ANA, deux fois plus élevée s'il renferme du AIA (Tableau XLVI). Le nombre des isoenzymes présentes dans les 2 premiers milieux est également plus faible : 6 au lieu de 10 le 7ème jour, 9 au lieu de 11 le 14ème jour (LEGRAND et DUBOIS, 1978).

Tout se passe donc comme si le AIA exogène devenait inefficace après une semaine, alors que les deux composés auxinomimétiques conservent leur activité vis-à-vis de la multiplication cellulaire jusqu'au 10ème ou au 12ème jour de culture.

L'inefficacité du AIA après une semaine pourrait correspondre à l'augmentation de l'activité peroxydasique globale et à l'apparition de certaines isoperoxydases dans les cellules et dans le milieu. On sait que certaines peroxydases ont une activité auxine-oxydasique (GASPAR et XHAUFFLAIRE, 1967 ; PILET et LAVANCHY, 1969) et notamment les isoperoxydases les plus cathodiques (MAZZA et Coll., 1970). Leur apparition ou le renforcement de leur activité au 7ème jour pourrait provoquer une diminution de la teneur en auxine endogène, la dégradation du AIA exogène restant dans le milieu et la formation de produits toxiques.

Si cette hypothèse est correcte, le transfert des cellules dans du milieu neuf avant que les isoenzymes cathodiques n'apparaissent et/ou n'augmentent d'activité devrait permettre la reprise des divisions cellulaires.

C'est ce que l'on constate, quand on repique les cellules de Silène tous les 7 jours dans du milieu contenant $10^{-5}M$ de AIA. Les résultats (Tableau XLVII) montrent que dans ces conditions :

- la croissance de la suspension cellulaire de Silène se poursuit (nous avons arrêté l'expérience à la fin du 5ème passage) ;
- la biomasse est comparable à celle que l'on obtient en 7 jours dans un milieu contenant une dose optimale de 2,4-D ;
- l'activité peroxydasique baisse dès le second passage ; ensuite elle demeure constante.

Nous avons observé, par ailleurs, que deux isoenzymes cathodiques, C_3 et C_4 , n'apparaissent plus dans les cellules (LEGRAND et DUBOIS, 1978).

PASSAGES	CROISSANCE		ACTIVITE PEROXYDASIQUE (DO/g M F)
	g M F/culture	Relative (*)	
1er	14,7	79,9 %	15,30
2ème	20,7	90,9 %	7,40
3ème	24,4	81,7 %	6,40
4ème	23,7	109,6 %	6,30
5ème	21,5	92,4 %	-

TABLEAU XLVII : Croissance (poids de MF) et activité peroxydasique (DO mesurée à 420 nm en 1 mn) de la fraction soluble de cellules de Silène repiquées tous les 7 jours dans du milieu neuf contenant du AIA ($10^{-5}M$).

* La croissance relative est exprimée en % par rapport à la croissance des cellules cultivées dans un milieu témoin contenant du 2,4-D ($5 \cdot 10^{-7}M$).

L'ANA et d'autres auxines de synthèse font baisser l'activité de plusieurs isoenzymes cathodiques dans des cultures d' Asparagus officinalis (VAN HOOF et GASPAR, 1976). L'effet inhibiteur du 2,4-D sur l'activité de certaines isoenzymes a également été rapporté par RITZERT et TURIN (1970) et par CACHITA-COSMA et Coll. (1976) dans des cultures de Tabac et d' Arabidopsis. Cet effet semble donc être général. Pourtant, si on entre

dans les détails, on remarque que selon la concentration des régulateurs de croissance et le matériel biologique utilisés (LEE, 1971 et 1972 ; VAN HOOFF et GASPAR, 1973) et selon les conditions expérimentales (RITZERT et TURIN, 1970 ; GASPAR et Coll., 1973), ce ne sont pas toujours les mêmes groupes d'isoenzymes qui varient. Il est donc difficile dans l'état actuel de nos connaissances d'établir une relation simple entre l'activité des isoperoxydases et le contrôle de la croissance. Plusieurs isoenzymes -en particulier les plus cathodiques- ont une activité auxino-oxydasique certaine ; d'autres -notamment des anodiques- pourraient intervenir dans les processus de lignification.

2 - Effets de la kinétine (Kin) et de la 6-benzylaminopurine (6 - BAP)

Les milieux de culture utilisés pour de nombreuses suspensions cellulaires provenant, comme celle de la souche Sa₁ de Silène, de la dissociation de "tissus normaux" cultivés in vitro, ou bien de la dissociation de fragment d'organes, renferment souvent une substance auxinomimétique et une cytokinine. Les cellules du Mercurialis annua (CHAMPAULT, 1969), du Dianthus caryophyllus (ENGVILD, 1972) du Calystegia sepium (ROSSINI, 1973) et du Datura innoxia (ENGVILD, 1974) sont cultivées en présence de 6 - BAP ; celles du Haplopappus gracilis (ERIKSSON, 1965), de Tabac (JOUANNEAU et PEAUD-LENOEL, 1967 ; MATSUMOTO et Coll., 1971), de Rosier (NASH et DAVIES, 1972), d'Atropa belladonna (RASHID et STREET, 1974) et de Soja (CHU et LARK, 1976) en présence de Kinétine. D'autres suspensions cellulaires, notamment celles du Rubus fruticosus et de Linum usitatissimum (HENSHAW et Coll., 1966), du Cucumis melo (VAJRANABHAIAH et METHA, 1976) et du Phaseolus vulgaris (MANTE et BOLL, 1976) sont entretenues dans des milieux plus complexes renfermant notamment du lait de Coco.

Nous nous sommes demandé si un apport de Kin ou de 6 - BAP modifierait le taux de prolifération et de dispersion des cellules de Silène, compte tenu du fait que les cytokinines stimulent généralement la division cellulaire et qu'elles inhibent plus ou moins la séparation des cellules dans différents types de cultures in vitro de Dicotylédones (HALPERIN et MINOCHA, 1973 ; RASHID et STREET, 1974 ; HALMER et THORPE, 1976).

Pour une première série d'essais, nous avons utilisé le milieu de LESCURE modifié avec 2,4-D ($5 \cdot 10^{-7} M$) comme facteur auxinique. Des concentrations de Kin inférieures ou égales à $10^{-7} M$ ont peu d'effet. A partir de $10^{-6} M$, la Kin ralentit la prolifération. En présence de $10^{-5} M$, la biomasse est réduite de moitié et les cultures renferment davantage de petits agrégats et de nombreuses cellules mortes qui favorisent certainement la fragmentation des plus gros amas (Fig. 46).

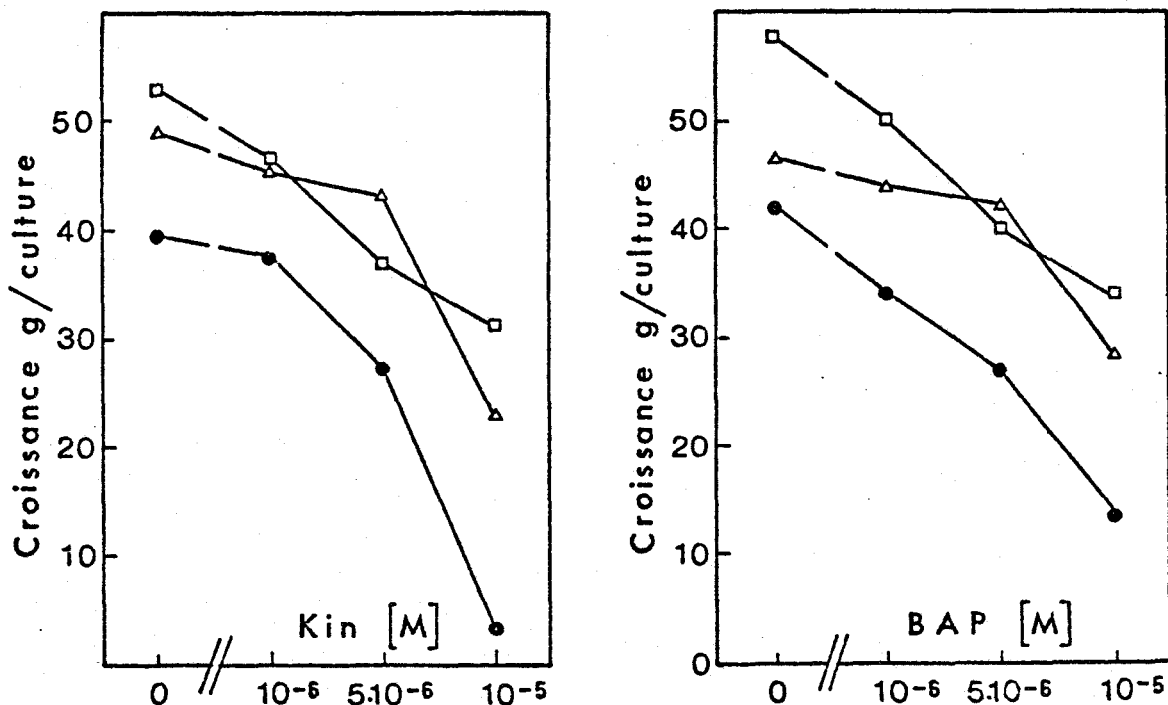


Figure 46 : Effets de la kinétine (Kin) et de la benzylaminopurine (6-BAP) sur la croissance (MF) des suspensions cellulaires de Silène, après un passage de 14 j sur le milieu de base seul (●—●) ou contenant $5 \cdot 10^{-7} M$ de 2,4 D (□—□) ou $10^{-5} M$ de AIA (△—△).

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : $25^{\circ} C$; lumière 500 lux, 24 : 0.

Les résultats sont les mêmes quand on remplace le 2,4-D par du AIA. En l'absence de facteur auxinique, la réduction de la biomasse est encore plus importante, quelle que soit la dose de Kin employée (Fig. 46). Le 6-BAP produit des effets comparables à ceux de la Kin.

En utilisant des cellules dérivant d'une culture primaire de moelle de Tabac (N.t., Wisconsin 38) sensibles aux auxines et aux cytokinines, PEAUD-LENOEL et JOUANNEAU (1971) observent qu'en milieu liquide agité, cette lignée garde sa sensibilité vis-à-vis des deux types de fac-

teurs de croissance. Ces auteurs observent cependant que la dépendance vis-à-vis des cytokines n'est pas absolue : elle varie selon la concentration du facteur auxinique. Pour le clone "21" qu'ils utilisent, la sensibilité à la Kin n'apparaît que pour des doses suffisamment basses de 2,4-D.

Nous avons donc réalisé une nouvelle série d'essais avec la Kin et la 6-BAP, en supprimant le 2,4-D du milieu. Les résultats d'un premier passage de 14 jours (Tableau XLVIII) sont conformes à ceux que nous avons précédemment rapportés (Fig. 46) : la Kin et la 6-BAP réduisent d'autant plus la prolifération des cellules de Silène que leur concentration dans le milieu de culture est plus élevée. A l'issue du second passage, la biomasse est très faible si le milieu ne contient aucune substance de croissance ; elle est multipliée par 2 ou par 3 en présence de Kin et par 2 ou 4 en présence de 6-BAP (Tableau XLVIII). La croissance s'arrête au cours du 3ème passage.

MILIEUX	CROISSANCE (g M F/culture)	
	1er Passage	2ème Passage
Milieu de base (MB)	41,00	5,81
MB + Kin {	5.10 ⁻⁷ M	33,84
	5.10 ⁻⁶ M	27,35
MB + 6-BAP {	5.10 ⁻⁷ M	42,25
	5.10 ⁻⁶ M	25,91

TABLEAU XLVIII : Croissance de la suspension cellulaire de Silène sur le milieu de base (MB) seul ou additionné d'une cytokinine.

Chaque passage dure 12 jours.

3 - Conclusion et discussion

Les cellules de Silène ne se développent qu'en présence d'un facteur auxinique. Le 2,4-D, l'ANA et l'acide naphtoxyacétique sont plus favorables que le AIA qui augmente l'activité peroxydasique globale et provoque l'apparition de plusieurs isoperoxydases dans les cellules et dans le milieu.

Il n'y a pas de relation directe entre la teneur en 2,4-D du milieu et le temps de génération des cultures cellulaires de Silène, comme cela a été établi par LEGUAY et GUERN (1975) pour des suspensions cellulaires d'Erable et par BAYLISS (1977) pour celles de Carotte. La teneur en 2,4-D agit davantage sur la durée de la période de croissance active, qu'elle réduit, lorsqu'elle est trop faible (ou trop forte, et toxique) LEGUAY et GUERN (1977) considèrent que c'est la teneur en 2,4-D à l'intérieur des cellules qui est importante. KING (1976a) pense plutôt que c'est la dose de 2,4-D présente dans le milieu qui intervient. Chez le Silène, nous avons montré que le 2,4-D et le ANA répriment l'activité peroxydasique globale et l'apparition de certaines isoperoxydases cathodiques, à la fois dans les cellules et dans le milieu ; ce qui pourrait induire un double système de régulation de la croissance.

Il n'est pas nécessaire d'introduire une cytokinine dans le milieu de culture pour provoquer la multiplication des cellules de Silène. Si l'on accepte la théorie de F. SKOOG , on peut penser qu'elles synthétisent leurs propres cytokinines, comme le font des cellules d'Acer pseudoplatanus cultivées dans un milieu dépourvu de kinétine (MACKENZIE et STREET, 1972). Des doses élevées de Kin et de 6-BAP qui réduisent la prolifération des cultures cellulaires de Silène et d'Erable modifient le métabolisme de l'azote et des sucres et inhibent la respiration chez l'Erable (SIMPKINS et STREET, 1970). Par contre, de faibles doses de cytokinines exogènes, sans effet chez le Silène, stimulent la croissance des suspensions cellulaires d'Erable, surtout si la concentration cellulaire initiale est faible (MACKENZIE et Coll., 1972).

La souche cellulaire de Silène récemment isolée par HENRY et Coll. (1978), à partir de fragments de tige du Silene alba, diffère de notre souche Sa₁ : elle est sensible à la kinétine et prolifère davantage en présence d'acide naphtoxyacétique qu'en présence de toute autre auxine de synthèse.

C - NUTRITION CARBONÉE

Dépourvues de chloroplastes, les cellules de Silène ne se multiplient pas en l'absence de sucre. Bien que les suspensions cellulaires soient généralement cultivées dans des milieux contenant soit du glucose, soit du saccharose, de nombreux glucides plus ou moins complexes peuvent être utilisés comme source de carbone (SIMPKINS et Coll., 1970 ; NICKELL et MARETZKI, 1970 ; MATSUMOTO et Coll., 1971 ; NASH et BOLL, 1975 ; VERMA et DOUGALL, 1977).

1 - Evolution des sucres présents dans le milieu

Par dosage (Fig. 47) et chromatographie (Fig. 48) de fractions aliquotes, nous avons suivi l'évolution des sucres du milieu de culture durant un cycle de croissance.

Le saccharose introduit dans le milieu à la dose de 20 g.l^{-1} n'est pas hydrolysé au cours de l'autoclavage, mais diminue rapidement pendant la première semaine de culture. Des sucres réducteurs apparaissent dès le 1er jour et leur concentration augmente progressivement jusqu'au 6ème jour. Après une semaine, ils représentent la totalité des sucres disponibles, qui s'épuisent entre le 10ème et le 12ème jour. En fin de culture, le glucose disparaît un peu plus vite que le fructose.

2 - Influence de la concentration en saccharose

a. Biomasse des cultures

Les cellules de Silène ne se multiplient pas dans un milieu dépourvu de sucre ; ce qui signifie que leurs réserves carbonées sont très faibles au moment du repiquage.

Après un premier passage de 14 jours dans des milieux contenant 1 à 10 % (poids/volume) de saccharose, on observe que la biomasse des cultures est faible pour 1 %, maximum pour des concentrations comprises entre 3 et 6 % et qu'elle diminue quand les doses de sucres sont encore plus élevées. A l'issue d'un second passage de 14 jours sur les mêmes milieux, les résultats sont très différents : la croissance varie peu entre 2 et 10 % de saccharose (Fig. 49).

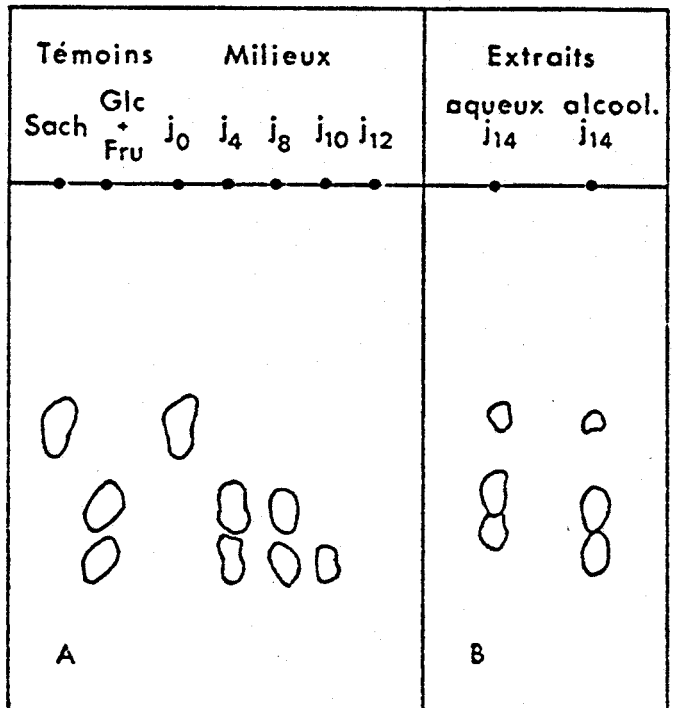
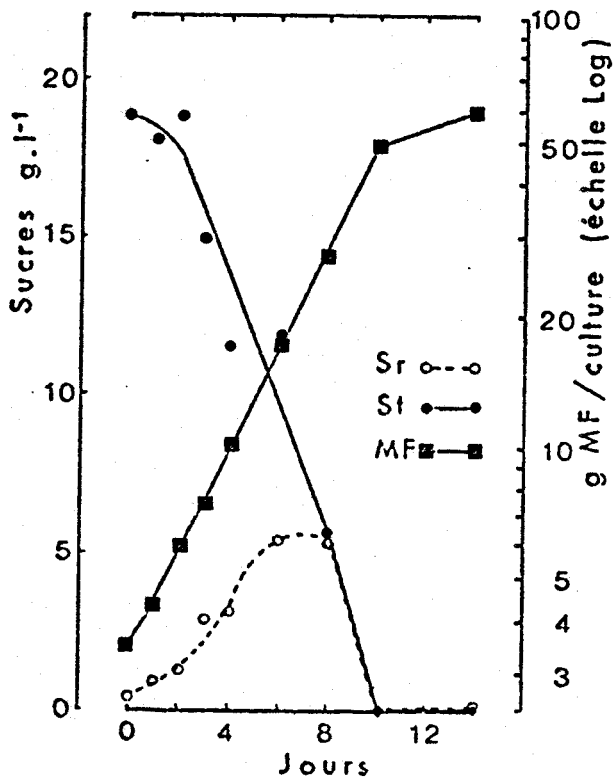


Figure 47 : Croissance de la suspension cellulaire de Silène et variations de la teneur en sucres du milieu de culture.

Sr : sucres réducteurs

St : sucres totaux

MF : poids de matière fraîche par culture

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

Figure 48 : A - Chromatogramme de fractions aliquotes d'un milieu de culture contenant 20 g.l^{-1} de saccharose, après autoclavage (J_0), puis au 4ème, 8ème, 10ème et 12ème jour de culture.

Glc : glucose ; *Fru* : fructose ; *Sach* : saccharose.

B - Chromatogramme d'extraits aqueux et alcoolique de cellules de Silène cultivées pendant 14 jours dans un milieu contenant 40 g.l^{-1} de saccharose.

En comparant les résultats obtenus au cours des deux passages successifs sur les différentes concentrations de sucre, on constate que la croissance relative des cellules diminue au cours du 2ème passage entre 3 et 6 % et au contraire qu'elle augmente lorsque la dose initiale est de 8 ou de 10 % de saccharose. La différence de comportement des cellules ne résulte pas d'une adaptation au milieu. Elle s'explique par leur état physiologique très différent à l'issue du premier passage. Au 14ème jour, les cellules qui se sont multipliées rapidement dans des milieux contenant 3 ou 4 % de sucre sont déjà en phase stationnaire ou même en phase de déclin ; celles qui se sont divisées plus lentement, dans un milieu contenant 8 ou 10 % de saccharose sont encore "physiologiquement jeunes". Or, nous avons précédemment démontré (2e partie, 2, B) que l'état physiologique de l'inoculum conditionne le déroulement du cycle de croissance. La faible croissance relative enregistrée au 7ème jour, lors du second passage sur 3 ou 4 % de saccharose, en est une bonne illustration.

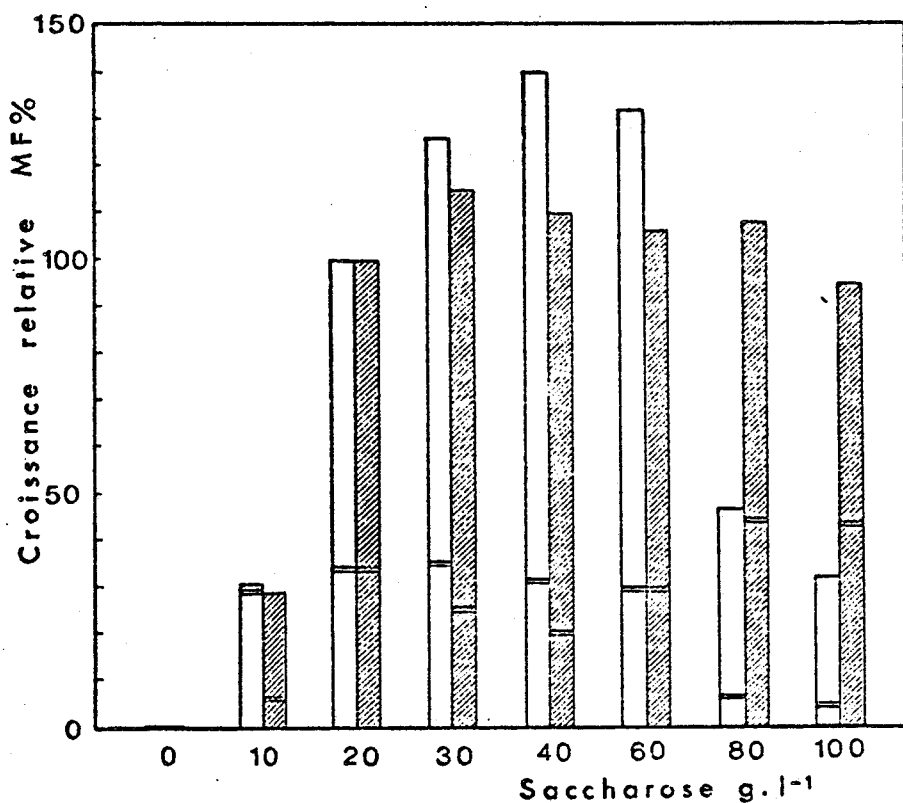


Figure 49 : Effet de la concentration en saccharose du milieu sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

La croissance, mesurée en valeurs relatives par rapport à celle d'un témoin dont le milieu contient 20 g.l⁻¹ de saccharose, est déterminée :

- à l'issue d'un 1er passage de 14 j : □
- à l'issue d'un second passage de 14 j : ▨

Le signe, H, indique la croissance relative au 7ème jour.
 Inoculum : 3 ± 0,2 g de cellules âgées de 14 j ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

Pour réduire l'hétérogénéité des inoculums, nous avons remplacé le premier passage de 14 jours par une "préculture" d'une durée variable selon la teneur en sucre du milieu. Pour l'expérience dont les résultats sont rapportés dans la figure n°50, nous avons repiqué les cellules dès que la biomasse des "précultures" atteint une vingtaine de g, c'est-à-dire celle d'une suspension cellulaire de 7 jours, cultivée sur un milieu contenant 20 g.l^{-1} de saccharose.

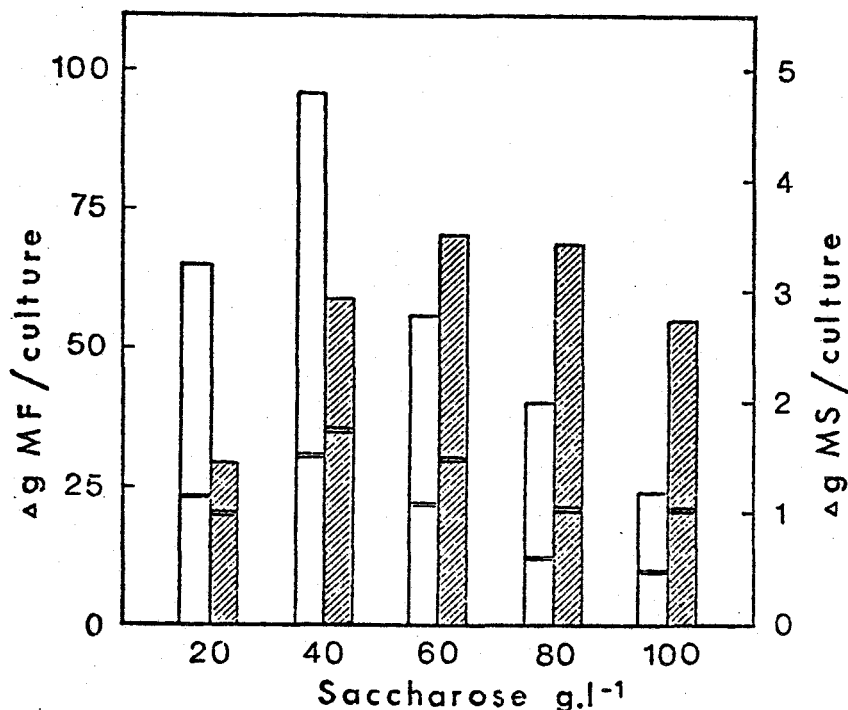


Figure 50 : Effet de la teneur en saccharose du milieu sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

La croissance, exprimée en g de MF, \square , et de MS, ▨ , est mesurée le 7ème, H , et le 14ème jour lors d'un second passage.

La durée du 1er passage dépend de la teneur en sucre du milieu : les cellules sont repiquées dès que le poids de MF d'une culture atteint 20 g.

Inoculum : $3 \pm 0,2 \text{ g}$ de cellules ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

Dans ces conditions, on constate qu'à la fin du second passage les poids de MF et de MS les plus élevés sont respectivement obtenus dans des cultures contenant 4 % et 6 % de saccharose. Les concentrations supérieures sont inhibitrices ; le poids de MF diminuant plus vite que celui de MS (Fig. 50).

b. Importance de la pression osmotique

Nous avons réalisé des milieux contenant soit 2 ou 8 % de saccharose, soit un mélange de 2 % de saccharose et de 3 % de mannitol, ces deux derniers ayant une pression osmotique comparable. Les résultats de cette expérience (Tableau XLIX) montrent que c'est l'augmentation de la pression osmotique et non l'excès de saccharose qui ralentit la croissance, puisque le mannitol, employé comme seule source de glucides, n'est pas métabolisé (Tableau L).

		SUCRES PRESENTS DANS LE MILIEU		
		S : 2 %	S : 8 %	S : 2 % + M : 3 %
PRESSION OSMOTIQUE des sucres dissous		1,3	5,2	5,0
CROISSANCE mesurée le	7e jour	19,4	1,3	0,6
	14e jour	62,2	14,3	11,3
	21e jour	-	37,3	30,3

TABEAU XLIX : Effet de la pression osmotique développée par les sucres présents dans le milieu sur la croissance (g MF) de la suspension cellulaire de *Silène*.

S : saccharose ; M : mannitol.

c. Contenu cellulaire

Dans les cellules cultivées dans un milieu standard contenant 2 % de saccharose, on observe une variation cyclique du nombre et de la taille des plastes amylières. Les cellules de l'inoculum en renferment très peu. Après 3 ou 4 jours de culture, des leucoplastes contenant de petits grains d'amidon bien visibles en microscopie électronique (Pl. X, Fig. 1-3) se multiplient. Vers le 7ème jour, les cellules présentent de nombreux leucoplastes amylières groupés dans le cytoplasme périnucléaire (Pl. IX, Fig. 3). Au cours de la seconde semaine du cycle de croissance, leur nombre et leur taille diminuent progressivement et seules quelques cellules en renferment encore au 14ème jour (Pl. XII, Fig. 3).

L'augmentation de la teneur initiale en saccharose favorise la synthèse d'amidon. De moins de $3 \mu \text{g.g}^{-1}$ de M S dans les cellules cultivées dans un milieu dépourvu de saccharose ou en renfermant 2 %, la teneur en amidon passe à 3,9 puis à 8,7, 11,8 et $17,6 \mu \text{g.g}^{-1}$ de M S, lorsque la dose initiale du saccharose s'élève à 4, 6, 8 et 10 % (BRASSART, DUBOIS et BOURIQUET, 1977). Une partie importante de cet amidon est stocké dans les leucoplastes qui sont surtout localisés autour du noyau quand la concentration en sucre est faible (Pl. XV, Fig. 3-4). Ils se répartissent dans tout le cytoplasme quand la teneur initiale en saccharose atteint ou dépasse 6 % (Pl. XV, Fig. 5 à 8).

La teneur en sucres solubles des cellules augmente également avec celle du milieu : au 14ème jour, elle passe de $79 \mu \text{g.g}^{-1}$ de M S quand le milieu contient 2 % de saccharose, à $427 \mu \text{g/g}$ de M S quand on multiplie par 2 la dose initiale de saccharose.

Dans ces conditions, les cellules contiennent du glucose, du fructose et un peu de saccharose (Fig. 48, B).

3 - Influence de la nature de la source carbonée

Les cellules de Silène sont relativement sensibles à la nature du sucre qui leur est fourni (Tableau L). Le glucose et le fructose stérilisés par filtration sur une membrane Millipore sont aussi favorables que le saccharose utilisé habituellement pour l'entretien des cultures. Le fructose passé à l'autoclave avec le milieu nutritif ou séparément est toxique pour les cellules de Silène comme pour d'autres cultures cellulaires (NASH et BOLL, 1975 ; MATSUMOTO et Coll., 1975 ; VERMA et DOUGALL, 1977), sans doute en raison de son interaction possible avec le sulfate de magnésium, comme c'est le cas pour les cellules de Rosier. D'autres hexoses, tels que le galactose et le mannitol, ne permettent aucune prolifération.

Parmi les diholosides utilisés, trois sont efficaces : le saccharose, le cellobiose et le tréhalose, ce dernier après une certaine période d'adaptation. La croissance est très faible en présence de maltose et nulle en présence de lactose.

Le raffinose, seul triholoside employé fournit une biomasse environ 2 fois plus faible que le saccharose.

Les pentoses, l'amidon soluble et les pectines ne sont pas métabolisés.

glucides présents dans le milieu (20 g.l ⁻¹)	CROISSANCE RELATIVE (1)			
	M.F. %		M.S. %	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
Contrôle : sans sucre	0	-	0	-
Arabinose	0	-	0	-
Xylose	0	-	0	-
Glucose	94,6	86,1	100,9	91,1
Fructose (2)	106,7	101,7	97,0	125,8
Galactose	7,5	0	15,1	-
Mannitol	4,5	-	-	-
Saccharose (T)	100	100	100	100
Tréhalose	17,6	78,3	26,7	87,9
Maltose	15,3	14,1	-	16,8
Lactose	1,6	0,9	1,6	-
Cellobiose	76,8	75,5	79,0	87,4
Raffinose	42,3	32,0	40,8	35,7
Dextrines (3)	42,3	21,2	29,6	18,4
Amidon soluble (4)	0	-	0	-
Pectine (5)	0	-	0	-

TABLEAU L : Effet de la source carbonée sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

P₁ : 1er passage de 14 j. ; P₂ : 2ème passage de 14 j.

(1) : Croissance relative exprimée en pourcentage de MF et de MS par rapport à un milieu témoin contenant du saccharose ;

(2) : Fructose filtré sur membrane Millipore ;

(3) : Dextrine blanche (R.A.L.) ;

(4) : Amidon soluble = amylopectine (I.C.N.) ;

(5) : Pectine de Pomme (Fluka).



4 - Conclusion et discussion

Une partie, sinon la totalité du saccharose est hydrolysée dans le milieu de culture avant d'être absorbé par les cellules. Une hydrolyse comparable a été observée dans les suspensions cellulaires de Menthe (WANG et STABA, 1963), d'Erable (SIMPKINS, COLLIN et STREET, 1970) et du Rosier Paul'Scarlet (NASH et DAVIES, 1972). Dans les cultures cellulaires d'Erable (COPPING et STREET, 1972), comme dans beaucoup de tissus végétaux cultivés in vitro (STRAUS, 1962), l'activité des invertases de la fraction correspondant aux parois cellulaires est plus grande que celle des invertases de la fraction soluble et l'invertase acide est plus active que la neutre. Toutefois le rôle de ces enzymes n'est pas parfaitement élucidé car les auteurs trouvent la même activité dans des cellules cultivées en présence de différents sucres et même, comme chez l'Erable, une plus grande activité lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu contenant du glucose comme seule source carbonée.

Le ralentissement de la croissance, au 10ème jour, coïncide avec l'épuisement en sucres du milieu et la disparition de l'amidon dans les cellules.

L'augmentation de la teneur initiale du saccharose stimule le taux de croissance pendant la phase de croissance active et surtout prolonge la durée de celle-ci. La concentration optimale varie de 4 à 6 % selon le paramètre retenu pour mesurer la prolifération. Chez le Soja, l'optimum est de 2 % (GAMBORG et Coll., 1968) ; chez l'Erable, il est du même ordre (4 à 5 %) que chez le Silène (SIMPKINS, COLLIN et STREET, 1970). La dose la plus élevée provoque, chez le Silène comme chez l'Erable, une augmentation du pourcentage de MS qui est dû à une sortie d'eau hors des cellules (augmentation de la pression osmotique), à une synthèse accrue d'amidon et peut-être aussi à une accumulation de polyholosides dans les parois.

De nombreuses suspensions cellulaires d'origine végétale se développent aussi bien sur le saccharose que sur le glucose ou le fructose filtré. En ce qui concerne l'utilisation des autres sucres, les cellules de Silène présentent des analogies certaines avec les cellules du Rosier Paul'Scarlet (NASH et BOLL, 1975). Comme ces dernières, elles utilisent en plus du saccharose et de ses constituants, le cellobiose, le tréhalose et le raffinose et elles assimilent mal le lactose et le galactose. Elles

se distinguent par contre des cellules de Carotte qui métabolisent le galactose et le maltose (VERMA et DOUGALL, 1977) et des cellules d'Erable et de Canne à sucre qui utilisent aussi de l'amidon soluble (SIMPKIN COLLIN et STREET, 1970 ; NICKELL et MARETZKI, 1970). Dans ces dernières, la présence d'amylase n'est d'ailleurs pas en relation directe avec la croissance, car l'enzyme apparaît aussi bien dans des cultures entretenues avec de l'amidon ou du saccharose (MARETZKI et Coll., 1971 et 1974).

Cellules de *Silene alba* cultivées pendant 14 jours en présence de 50 g.l⁻¹ de saccharose dans le milieu.

Coloration des polysaccharides par la technique du P.A.S.

D - NUTRITION AZOTEE

De nombreux travaux, notamment ceux de GAMBORG et Coll. (1968), de SIMPKINS, COLLIN et STREET (1970) et de ROSE et Coll. (1972) ont montré que l'azote est avec le sucre et les substances phytohormonales, l'un des principaux facteurs chimiques qui contrôlent la croissance des cellules végétales cultivées en milieu liquide non renouvelé. Plus récemment, KING (1977) a établi que la teneur en nitrates permet de régler le taux de croissance spécifique de cultures cellulaires réalisées en phytostat.

1 - Utilisation de l'azote nitrique

Le milieu employé pour l'entretien des cultures cellulaires de Silène renferme de l'azote nitrique ($N-NO_3^-$: 300 mg.l^{-1}) comme seule source d'azote. Des analyses échelonnées au cours du cycle de croissance montrent que les ions NO_3^- sont consommés rapidement pendant les premiers jours, puis plus lentement à partir du 10ème jour. Au 14ème jour la teneur en NO_3^- du milieu est très faible ou nulle selon les cultures analysées (Fig. 51).

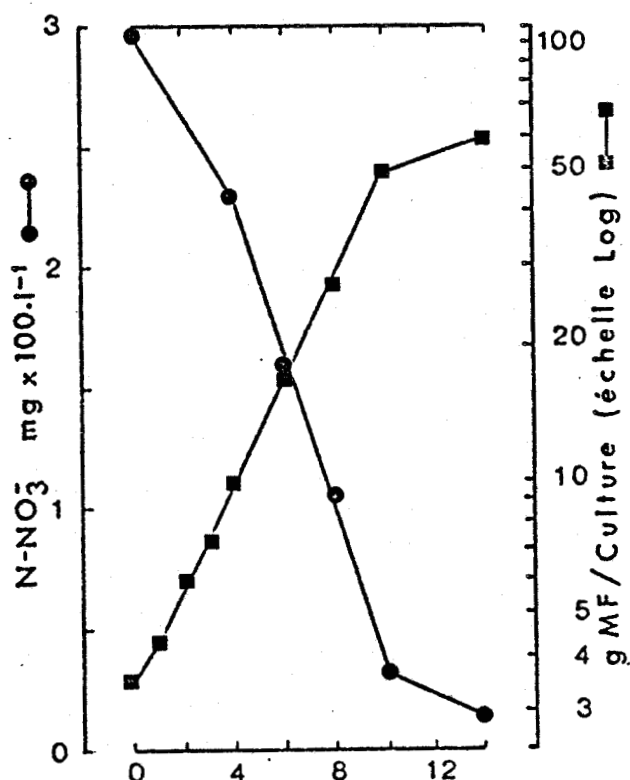


Figure 51 : Croissance de la suspension cellulaire de Silène (■ — ■) et évolution de la teneur en azote nitrique, $N-NO_3^-$ (● — ●) du milieu, au cours de la culture.

Inoculum : $30 \pm 0,2 \text{ g}$ de cellules âgées de 14 j. ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

Pour déterminer les besoins en azote nitrique des cellules, nous les avons cultivées sur des milieux contenant de 75 à 600 mg.l^{-1} de N-NO_3^- et 20 ou 40 g.l^{-1} de saccharose, soit respectivement la teneur en sucre du milieu d'entretien et celle pour laquelle la croissance est optimale (Fig. 52).

Quand le milieu renferme 2 % de saccharose, une concentration de N-NO_3^- inférieure à 150 mg.l^{-1} est limitante. Des doses de nitrates 2 ou 4 fois supérieures favorisent la consommation des ions NO_3^- sans augmenter les poids de MF et de MS des cultures ; c'est la concentration en sucre qui joue le rôle de facteur limitant.

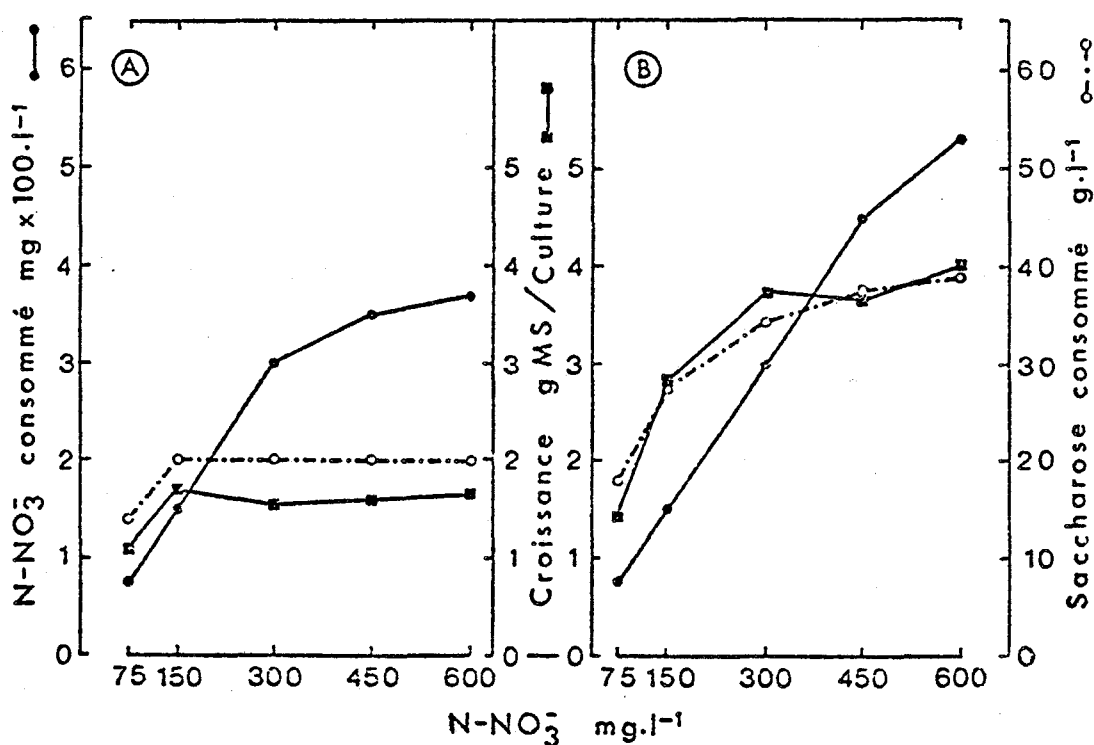


Figure 52 : Effets de la concentration initiale en azote nitrique sur la croissance des cellules de Silène (■—■) et sur la consommation d'azote nitrique (●—●) et de saccharose (○- - ○) après 14 jours de culture.

A : Milieu renfermant 20 g.l^{-1} de saccharose au jour 0,
 B : Milieu renfermant 40 g.l^{-1} de saccharose au jour 0.

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 j. ; température : 25°C ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

En présence de 4 % de saccharose, il faut 300 mg.l^{-1} de N-NO_3^- pour obtenir le maximum de biomasse. Au-dessous de cette valeur, la teneur en azote limite la prolifération ; au-dessus, les cellules consomment davantage de nitrates, mais la biomasse de la culture n'augmente plus. La teneur en sucre n'est pourtant pas limitante car il en reste un peu dans le milieu et surtout une concentration initiale plus élevée réduit la croissance des cellules par la forte pression osmotique qu'elle développe.

Pour équilibrer la consommation du sucre et de l'azote dans le milieu d'entretien, il faut donc diminuer de moitié la teneur en nitrates, sans modifier celle du saccharose. Pour obtenir un maximum de poids de MF ou de MS, il faut maintenir la teneur initiale en nitrates et doubler celle du sucre. Dans les deux cas, le rapport C/N est identique.

Le rendement rapporté à l'azote et au sucre consommé est meilleur sur le premier milieu. Par contre la biomasse rapportée à l'unité de volume de la culture est plus élevée lorsqu'on utilise le second milieu. La vitesse de croissance mesurée pendant la durée de la phase active du cycle est toujours un peu plus élevée en présence de 4 % de saccharose. Elle varie très peu en fonction de la dose initiale d'azote nitrique ; toutefois elle est un peu plus faible en présence de 150 mg.l^{-1} de N-NO_3^- .

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE									
N-NO ₃ (mg.l ⁻¹)	150		300		450		600		
	20	40	20	40	20	40	20	40	
Saccharose (g.l ⁻¹)									
Croissance (g/culture)	le 7e jour	15,3	16,7	17,8	21,2	17,4	20,5	15,6	18,8
	le 14e jour	65,4	63,6	59,5	94,2	58,1	90,2	53,3	91,4
Protéines (µg.mg ⁻¹ de M S)	131	79	151	116	160	145	165	147	
Sucres solubles (µg.mg ⁻¹ de M S)	262	562	79	527	50	392	61	380	

TABLEAU LI : Effets de la concentration en azote nitrique et en saccharose du milieu sur la croissance (MF) de la suspension cellulaire de *Silène* et sur la teneur en protéines et en sucres solubles des cellules.

La croissance est déterminée le 7ème et le 14ème jour ; les dosages de sucres et de protéines sont effectués sur des cellules âgées de 14 jours.

Lorsqu'on emploie un milieu nutritif non équilibré contenant trop de nitrates, la consommation supplémentaire de $N-NO_3^-$ qui en résulte se traduit surtout par une modification de la composition cellulaire, sans changement de la biomasse des cultures. On note une importante augmentation de la teneur en protéines et une diminution de la teneur en sucres solubles (Tableau LI).

2 - Influence de la nature de la source azotée

Dans une première série d'expériences, nous avons remplacé la totalité des nitrates par une autre forme d'azote, minéral ou organique. On constate que les cellules de Silène :

- se multiplient dans des milieux contenant du glutamate de potassium ou de l'hydrolysate de caséine. Cependant le poids de MF des cultures est toujours plus faible que celui obtenu dans un milieu témoin contenant 300 mg.l^{-1} de $N-NO_3^-$ (le poids de MS diminue moins ; il peut même être plus élevé que dans le milieu témoin) ;
- prolifèrent très peu en présence d'urée au cours du 1er passage et se nécrosent au cours du second. L'augmentation de la biomasse enregistrée lors du 1er passage est comparable à celle que l'on obtient dans un milieu dépourvu d'azote. Elle correspond sans doute à l'utilisation des substances azotées présentes dans les cellules de l'inoculum ou apportées en même temps qu'elles, lors de l'ensemencement des cultures ;
- se nécrosent dès le 1er passage dans un milieu contenant du sulfate d'ammonium (Tableau LII).



SOURCES AZOTEES PRESENTES DANS LE MILIEU (300 mg d'azote · l ⁻¹)	CROISSANCE RELATIVE (1)				
	M F %		M S %		
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	
KNO ₃ (T)	100	100	100	100	
NH ₄ NO ₃	25,8	-	32,8	-	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	-	0	-	
Glutamate de potassium	65,4	53,6	106,3	128,1	
Hydrolysate de caséine	50,6	29,9	80,6	60,1	
Urée	12,4	0	21,9	0	
KNO ₃ (1/4) + (2)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (3/4)	12,8	0	39,5	0
	Hydrolysate de caséine (3/4)	61,3	62,9	79,5	101,2
	Urée (3/4)	53,5	54,9	61,0	78,3
Milieu sans azote	12,3	0	20,3	0	

TABLEAU LII : Effet de la nature de la source azotée sur la croissance de la suspension cellulaire de *Silène*.

P₁ : 1er passage de 14 j ; P₂ : 2ème passage de 14 j.

(1) : croissance relative exprimée en pourcentage de matière fraîche (MF) et de matière sèche (MS) par rapport à un milieu témoin (T) contenant 300 mg · l⁻¹ d'azote nitrique.

(2) : un milieu ne contenant qu'1/4 de nitrate, comme seule source d'azote produit une croissance de 50 % (MF) par rapport au témoin (T).

En présence d'une faible dose (75 mg/l) de N-NO₃⁻, l'urée et l'hydrolysate de caséine favorisent la croissance tandis que l'ammonium la réduit. L'inhibition est d'autant plus grande que la teneur en N-NH₄⁺ (entre 1 et 10 mM) augmente et que la dose initiale de N-NO₃⁻ est plus faible (Tableau LIII). Dans ces conditions, les ions NH₄⁺ réduisent la consommation des nitrates et provoquent une forte baisse du pH au début de la culture (Fig. 53).

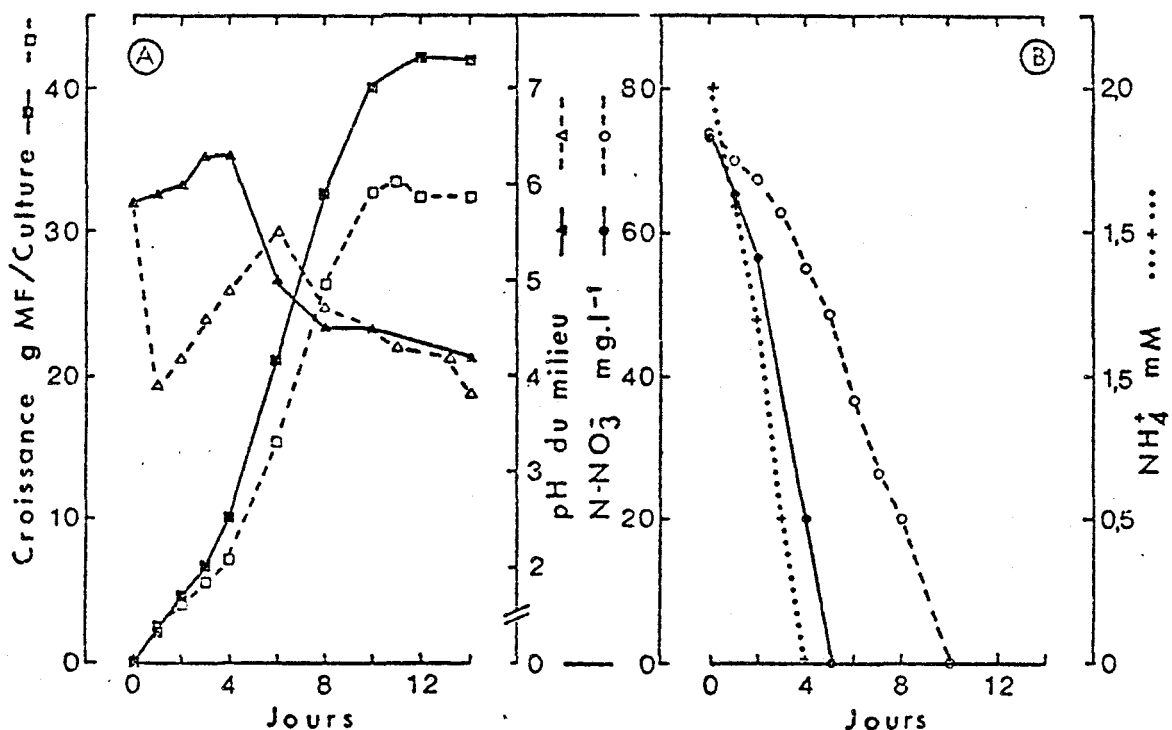


Figure 53 : Effet d'une faible dose d'ammonium (2 mM),

A : sur la croissance des cellules de Silène (\blacksquare — \blacksquare ; \square -- \square) et l'évolution du pH du milieu au cours de la culture (\blacktriangle — \blacktriangle ; \triangle -- \triangle) ;
 B : sur l'évolution de la teneur en azote nitrique (\bullet — \bullet ; \circ -- \circ) et en ammonium ($+$ $+$) du milieu de culture.
 (Milieu contenant 75 mg.l^{-1} de N-NO_3^- : symboles fermés ;
 Milieu contenant 75 mg.l^{-1} de N-NO_3^- + 2 mM de N-NH_4^+ : symboles ouverts).

Inoculum : $38 \pm 0,2 \text{ g}$ de cellules âgées de 14 jours ; température : 25°C ; lumière 500 lux , 24 : 0.

C'est la diminution du pH au cours des premiers jours de culture qui provoque le ralentissement ou l'arrêt de la croissance, car en milieu tamponné (M.E.S., 0,05 M) la croissance est normale. On observe un phénomène analogue avec le nitrate d'ammonium, inhibiteur en milieu non tamponné, mais constituant une source d'azote satisfaisante lorsque le pH ne descend pas en-dessous de 5,0.

Incorporés dans des milieux de base contenant 300 mg.l^{-1} de N-NO_3^- , de faibles doses de NH_4^+ ne modifient pas la biomasse des cultures (Tableau LIII), mais elles en changent l'aspect. Après 12 jours de culture sur un milieu contenant 3 mM de NH_4^+ en plus de l'azote nitrique la suspension cellulaire présente davantage de cellules isolées et de petits amas (moins de $200 \mu\text{m}$), tandis que les éléments les plus nombreux ont une taille comprise

entre 0,2 et 0,5 mm. En l'absence d'ammonium, les éléments de petite taille sont plus rares et les agrégats les plus abondants mesurent de 0,5 à 1,0 mm (Tableau LIV).

NH ₄ ⁺ (mM) N-NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (mM)					
	0	0,5	1	2	4	10
300	100 %	-	103,7 %	100,7 %	101,4 %	98,67 %
150	111 %	109,8 %	108,6 %	98,2 %	70,1 %	45,0 %
75	70 %	-	63,3 %	49,5 %	28,3 %	3,0 %

TABLEAU LIII : Effets conjugués de l'ammonium et des nitrates sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

La croissance relative est exprimée en pourcentage de MF par rapport à celle obtenue dans un milieu témoin renfermant 300 mg.l⁻¹ d'azote nitrique.

SOURCES D'AZOTE	TAILLE DES AGREGATS (T, mm)			
	T < 0,2	0,2 < T < 0,5	0,5 < T < 1	T > 1
N-NO ₃ ⁻ (306 mg.l ⁻¹)	0,2 %	12,3 %	52,2 %	22,9 %
N-NO ₃ ⁻ (306 mg.l ⁻¹) + NH ₄ ⁺ (3 mM)	2,0 %	51,6 %	22,8 %	10,7 %

TABLEAU LIV : Effet d'une faible dose d'ammonium (3 mM) sur la dispersion des cellules de Silène.

Les valeurs présentées sont calculées à partir des poids de MF de chacune des catégories d'agrégats séparées par filtration, après 14 jours de culture.



Nous n'avons pas remarqué de changements morphologiques importants des cellules en relation avec la nature de la source d'azote. Chez l'Erable, en remplaçant les nitrates par un mélange d'hydrolysat de caséine, d'urée et de cystéine on provoque une certaine dispersion des cellules et la formation de cellules géantes qui se divisent beaucoup moins souvent (SIMPKINS, COLLIN et STREET, 1970).

3 - Conclusion et discussion

Lorsque le milieu ne renferme qu'une source unique d'azote, les cellules de Silène, comme celles de nombreuses autres espèces végétales, utilisent préférentiellement l'azote nitrique. Contrairement aux cellules de Tabac (FILNER, 1966), d'Erable (KING, 1976b) et de Soja (POLACCO, 1976), elles sont incapables de proliférer de façon satisfaisante et continue en présence seulement d'azote organique.

L'ammonium se révèle toujours toxique à forte dose (GAMBORG, 1970), sans doute en raison de la baisse importante du pH qu'il provoque (RAVEN et SMITH, 1976 ; IKEDA et Coll., 1977). MARTIN et Coll. (1977) ont montré que des cellules d'Ipomoea et de Soja, cultivées en fermenteur, utilisent les ions NH_4^+ , à condition d'éviter que le pH ne descende en-dessous de 5,3. De nombreuses suspensions cellulaires se développent également en présence de NH_4^+ quand on incorpore des acides organiques dans le milieu (GAMBORG et SHILUK, 1970 ; ENGVILD, 1974 ; BEHREND et MATELES, 1976 ; FUKUNAGA, 1978). Pour ce qui concerne les cellules de Silène, il semble que l'addition d'acides organiques soit peu efficace.

Utilisé à faible dose, en complément de 75 mg.l^{-1} de N-NO_3^- , l'ammonium réduit la prolifération des cellules de Silène et la consommation des ions NO_3^- , sans modifier l'activité nitrate-réductasique (POULLE et Coll., 1978). L'ammonium stimule par contre la croissance d'autres suspensions cellulaires (NESIUS et Coll., 1972 ; OHIRA et Coll., 1973 ; VELIKY et ROSE, 1973) et une faible quantité de NH_4^+ est même indispensable à certaines cultures de Soja pour leur permettre d'utiliser les nitrates constituant la principale source d'azote (GAMBORG, 1970). Plus récemment, BAYLEY et Coll. (1972) ont montré que les ions NH_4^+ stimulent l'activité de la nitrate réductase et la croissance des cellules de Soja ; tandis que chez le Blé, ils sont sans effet sur la croissance et n'agissent pas sur l'enzyme. On sait aussi que les ions NH_4^+ ne modifient pas le poids de MS

de cultures cellulaires d'Ipomoea, mais réduisent l'activité nitrate et nitrite réductase respectivement de 25 et de 66 % (ZINK et VELIKY, 1977). Il est difficile de comparer les résultats se rapportant à l'ammonium, car les conditions de culture des suspensions cellulaires sont différentes et en particulier le rapport $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. D'autre part les résultats varient selon l'origine des cultures, en raison de l'équipement enzymatique qui leur est propre, mais peut-être aussi en raison d'une sensibilité différente vis-à-vis du pH acide qui résulte de l'emploi de l'azote ammoniacal.

La réduction de la consommation des nitrates, après 10 jours de culture, marque la fin de la période de croissance active. Elle coïncide aussi avec l'épuisement des sucres contenus dans le milieu témoin. Quand le milieu est enrichi en saccharose, la consommation d'azote nitrique augmente ; réciproquement la consommation du saccharose augmente avec la teneur en azote nitrique du milieu, ce qui confirme les observations faites avec des cellules d'Erable (JESSUP et FOWLER, 1976). Les cellules de Silène, dépourvues de chloroplastes, se comporteraient donc comme des plantes entières étiolées ou déficientes en sucres qui ont besoin d'un apport de glucose ou de saccharose pour fournir l'énergie nécessaire à l'induction de la nitrate réductase (TRAVIS et KEY, 1971 ; ASLAM et OAKS, 1975 ; ASLAM et Coll., 1976) et pour produire le NADH et le NADPH nécessaires au fonctionnement des enzymes qui réduisent les nitrates (KLEPPER et Coll., 1971 ; SARKISSIAN et FOWLER, 1974).

CHAPITRE 5 : SYNCHRONISATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE

A - INTRODUCTION

La plupart des méthodes mises au point pour la synchronisation des cultures de Bactéries, de Protozoaires (ZEUTHEN, 1971), d'Algues (PIRSON et LORENZEN, 1966 ; TAMIYA, 1966 ; EDMUNDS, 1966 ; TERRY et EDMUNDS, 1969 ; HOWELL, 1974) ou des Champignons (WILLIAMSON, 1954a et b), ou bien pour synchroniser des divisions dans des apex racinaires de plantes à fleurs (WACENAAR, 1966 ; VAN'T HOF, 1976) ont été utilisées pour des suspensions cellulaires. A priori celles-ci présentent plusieurs handicaps : les cellules ne sont pas réellement isolées comme celles des organismes unicellulaires et elles ont un temps de génération relativement long, surtout si on le compare à celui des Bactéries. De plus, les cellules en culture sont rarement chlorophylliennes, ce qui pourrait rendre inefficaces les méthodes basées sur l'emploi de la lumière couramment employées pour des organismes autotrophes.

B - METHODES UTILISEES ET RESULTATS OBTENUS AVEC D'AUTRES

SUSPENSIONS CELLULAIRES

1 - Utilisation d'inhibiteurs

ERIKSSON (1966) réussit le premier à synchroniser des suspensions de cellules végétales, en ajoutant, pendant quelques heures au milieu de culture des substances qui empêchent la synthèse de l'ADN : le 5-fluorodéoxyuridine (5-FUdR), le 5-aminouracile, l'hydroxyurée ou de la thymidine en excès. C'est l'hydroxyurée qui est la plus efficace pour les cellules de Haplopappus gracilis ; à la concentration optimale de 3 mM, on observe un pic de synchronisation (IM maximum = 30 %) 12 h après avoir supprimé l'inhibiteur. Compte tenu de la durée respective de la mitose (1 h 20) et de la

vague de divisions (4 h 30), ERIKSSON (1967) qualifie la synchronisation de "partielle". Les courbes rapportées ne présentant qu'un seul pic, on peut supposer que la synchronisation n'affecte qu'un cycle cellulaire. Ceci peut être dû à une certaine toxicité des substances utilisées, l'hydroxyurée et le 5-aminouracile provoquant 15 % de mitoses anormales.

BYCHKOVA et BUTENKO (1974) obtiennent la synchronisation partielle de suspensions cellulaires du Panax ginseng par le 5-aminouracile ; CHU et LARK (1976) celle de cultures cellulaires du Glycine max par le 5-FudR. Par contre, ROBERTS et NORTHCOTE (1970) ne parviennent pas à synchroniser des cultures cellulaires d'Acer pseudoplatanus en ajoutant un excès de thymidine dans le milieu.

Un traitement par le 5-bromodéoxyuridine effectué après un cycle de synchronisation induit par le 5-FudR sensibilise les cellules du Glycine max à la lumière. Les cellules qui résistent au traitement (20-30 %) sont incapables de réaliser la duplication de l'ADN, mais continuent de synthétiser de faibles taux d'ARN et de protéines (CHU et LARK, 1976).

2 - Traitements par des substances phytohormonales

JOUANNEAU (1971) et PEAUD-LENOEL et JOUANNEAU (1971) ont synchronisé des suspensions cellulaires du Nicotiana tabacum en différant l'incorporation du 2,4-D et de la Kin normalement présents dans le milieu. Ils ont démontré qu'on obtenait le "meilleur pic de synchronisation" en retardant l'addition du 2,4-D de 24 h et celle de la Kin de 10 h supplémentaires. Des résultats comparables sont obtenus en remplaçant le 2,4-D par le AIA et la Kin par la 6-(isopentenyl) adénine. En dépit d'une amplitude relativement faible du pic (IM = 7 %), plus de 80 % des cellules se divisent au cours de la première vague de synchronisation ; les vagues suivantes s'amortissent rapidement. Des expériences complémentaires indiquent que "le délai d'apparition de la vague de mitoses est commandé par l'addition d'auxine" et que la cytokinine est responsable de la synchronisation.

BYCHKOVA et BUTENKO (1974) obtinrent des résultats analogues avec les cellules du Panax ginseng partiellement synchronisées par le 5-aminouracile. L'adjonction de AIA et de Kin induit une vague de mitoses à deux pics : le 1er à 20 h (faible) et le 2ème à 32 h (fort). L'absence de Kin abolit la vague de mitoses, celle du AIA la diminue sans l'exclure.

NISCHI et Coll. (1977) synchronisèrent une suspension cellulaire du Daucus carota en cultivant d'abord les cellules dans un milieu dépourvu de substance de croissance, jusqu'à ce qu'elles ne se divisent plus (2 passages) puis en les transférant dans un milieu contenant du 2,4-D (1mg.ml^{-1}). Les variations de la teneur en ADN indiquent qu'après les deux passages dans le milieu carencé, les cellules sont bloquées en G_1 .

ROBERTS et NORTHCOTE (1970) augmentèrent l'amplitude de la vague de mitoses qui suit normalement le repiquage de cellules d'Acer pseudoplatanus se trouvant en phase stationnaire dans un milieu neuf, en ajoutant de la Kin ou de la 6-BAP à la solution nutritive qui normalement n'en contient pas. Pour KING et STREET (1973), ce seul fait est insuffisant pour conclure à une synchronisation des cellules, car une vague de divisions s'observe dans la plupart des cultures entretenues en milieu non renouvelé (batch culture) dans les jours qui suivent le repiquage.

3 - Starvation

L'épuisement d'un constituant essentiel du milieu (généralement un facteur trophique) bloque le cycle cellulaire, en G_1 ou en G_2 suivant les cultures. Le repiquage de ces cellules dans un milieu neuf est souvent suivi d'une vague de divisions synchrones. Par une telle méthode (starvation de l'azote), WITHERS (1978) observa cinq vagues successives de divisions synchrones chez Acer pseudo-platanus.

En remplaçant tous les jours 2/5e du volume de la suspension par un égal volume de milieu neuf, CONSTABEL et Coll. (1974) ont partiellement synchronisé (IM maximum = 25 %) une suspension cellulaire du Glycine max.

4 - Modifications de l'environnement

Des pré-traitements par le froid (12 - 24 h à 15°C) suivis du transfert des cultures à une température relativement élevée (27 - 29 °C) augmentent le nombre de mitoses dans plusieurs suspensions cellulaires (KAO et coll., 1970). FUJITSU et coll. (1972) obtiennent des résultats positifs chez Nicotiana tabacum en effectuant un pré-traitement par le chaud (40 h à 36 -37°C).

CONSTABEL et coll. (1974) synchronisent des cellules du Glycine max en injectant périodiquement de l'azote gazeux dans le milieu de culture. Selon les conditions expérimentales, les auteurs obtiennent un ou deux cycles de synchronisation et l'IM maximum varie de 12 à 26 %. En remplaçant l'azote gazeux par l'éthylène (1 injection toutes les 36 h), CONSTABEL et coll. (1977) obtiennent également la synchronisation partielle des divisions dans des cultures continues de Soja.

5 - Traitements mixtes

De nombreux chercheurs emploient une méthode mixte. Ainsi, STREET et coll. (1971) et KING et coll. (1973) associent la starvation des cellules d'Acer pseudoplatanus et l'ensemencement des cultures à faible densité initiale ($18.10^3 - 3.10^4$ cellules.ml⁻¹) ; OKAMURA et coll. (1973), la starvation et une basse température. BYCHKOVA BUTENKO (1974) associent l'action d'un inhibiteur et l'absence momentanée d'une substance phytohormonale. NISHINARI et YAMAKI (1976) combinent les effets de trois traitements : la starvation des cellules du Nicotiana tabacum , plusieurs cycles photopériodiques et une période d'anaérobiose. Ils induisent de cette manière au moins deux vagues de divisions synchrones et l'IM maximum est d'environ 12 %.

C - RESULTATS OBTENUS AVEC LES CELLULES DE SILENE

L'analyse des différents facteurs contrôlant la croissance a mis en évidence l'importance particulière du 2,4-D, du saccharose et de la température. Elle a également permis de déterminer, pour chacun d'entre eux, la valeur optimale pour la multiplication cellulaire et les valeurs au-dessous et au-dessus desquelles la croissance des cellules

est bloquée.

Compte tenu des travaux effectués sur d'autres suspensions cellulaires, il est permis de supposer qu'en bloquant le cycle cellulaire par l'un de ces facteurs, puis en plaçant à nouveau les cellules de Silène dans des conditions optimales, on devrait induire une ou plusieurs vagues de divisions plus ou moins synchrones. En plus des facteurs cités ci-dessus, nous avons utilisé plusieurs substances connues pour bloquer la division cellulaire.

1 - Epuisement du milieu en sucres

Dans les conditions standard de culture, les sucres solubles présents dans le milieu sont totalement épuisés au 10ème jour et la teneur en sucres solubles des cellules est très faible à partir du 14ème jour (2ème partie, 4, C).

Quand on repique des cellules provenant d'une culture de 14 jours, on observe une vague de mitoses entre le 2ème et le 4ème jour (Fig. 28 A). On remarque également pendant cette période des agrégats comportant 2, 4, 8 et 15 - 16 cellules ; ce qui suggère qu'au moins certaines cellules se divisent d'une manière synchrone. Toutefois, la synchronisation est très partielle car il n'y a qu'un seul pic et la durée de la vague de mitoses est très longue par rapport au temps moyen de génération.

Si on prélève des cellules dans une culture âgée de 16 jours au lieu de 14, et si on réduit de moitié la densité initiale des suspensions ($2,5 \cdot 10^4$ cellules.ml⁻¹, au lieu de $5 \cdot 10^4$ cellules.ml⁻¹), on observe une meilleure synchronisation. L'IM, très faible jusqu'à la 36ème h, augmente rapidement et passe par un premier maximum vers la 60ème h. Un second maximum s'observe entre le 4ème et le 5ème jour, puis l'IM décroît lentement jusqu'à la fin de la culture (Fig. 54 A). L'examen de la figure suscite les remarques suivantes :

- les premières divisions cellulaires n'interviennent qu'après une période de latence relativement longue (36 h environ) ;
- le temps qui sépare deux vagues successives de mitoses est égal au temps moyen de génération, à 25°C ;
- la synchronisation des divisions se perd dès la seconde vague de

mitoses (diminution importante de l'IM maximum ; étalement de la période pendant laquelle les cellules se divisent).

L'allongement de la phase de latence s'explique par l'état physiologique des cellules de l'inoculum. Compte tenu des besoins des cellules de Silène en azote (2ème partie, 4, D) et en 2,4-D (2ème partie, 4, B) ; c'est bien l'épuisement en sucres solubles du milieu et des cellules qui conditionne le cycle de croissance et provoque la synchronisation des divisions au cours des premiers jours de culture.

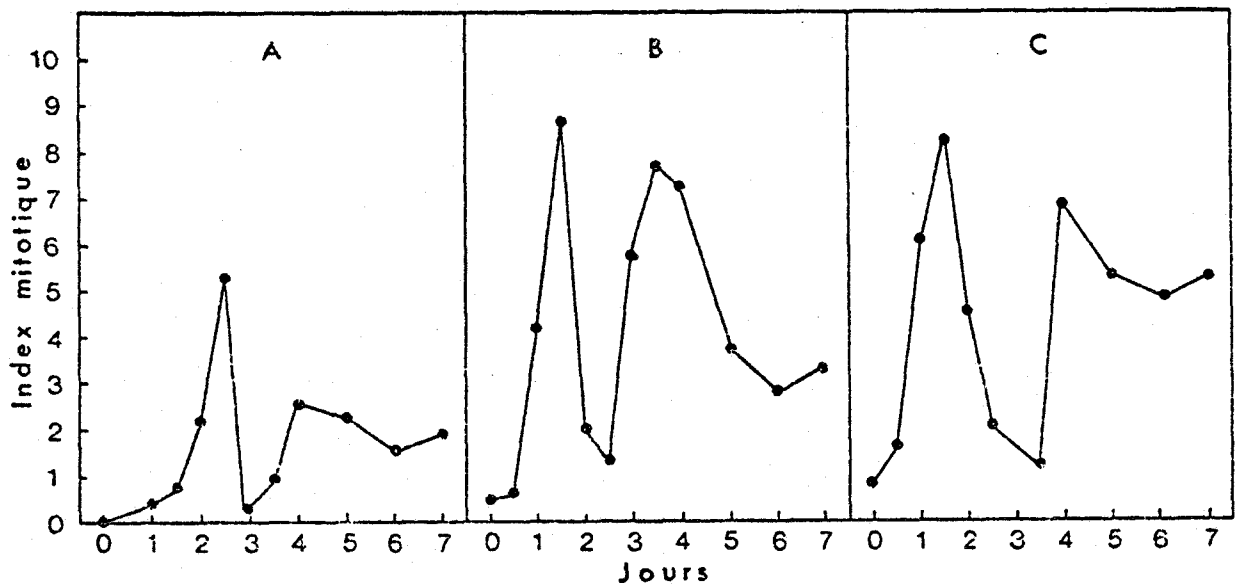


Figure 54 : Variations de l'index mitotique dans des suspensions cellulaires de Silène partiellement synchrones.

A - Epuisement du milieu en sucres ;

B - Pré-culture dans un milieu dépourvu de 2,4-D ;

C - Choc thermique (10/25°C).

Les conditions expérimentales sont données dans le texte.

2 - Pré-culture dans un milieu dépourvu de 2,4-D

Les cellules de Silène entretenues dans un milieu standard et repiquées dans un milieu dépourvu de 2,4-D se multiplient plus ou moins, selon leur état physiologique au moment de l'ensemencement. Quand elles sont en phase exponentielle, elles prolifèrent sensiblement de la même manière dans un milieu sans 2,4-D et dans un milieu qui en contient une dose optimale. Quand elles sont en fin de phase stationnaire

(15 - 16 j), la réduction de la croissance peut atteindre 50 %. Des cellules prélevées dans des cultures de 12 à 14 jours donnent des résultats qui varient selon les essais.

Pour l'expérience dont les résultats sont rapportés dans la Fig. 54,B, les cellules de Silène ont été cultivées pendant 13 jours sans phytohormones puis repiquées dans un milieu contenant $5 \cdot 10^{-7}$ M de 2,4-D, à la densité initiale de 15 mg de M.F.ml⁻¹.

On observe deux pics de mitoses, le premier à la 36ème heure (IM = 8,6), le second après 3 jours et demi de culture (IM = 7,8). Du 5ème au 7ème jour, l'index mitotique se maintient entre 3 et 4 %, puis il diminue régulièrement jusqu'à la fin de la culture. Deux faits méritent d'être soulignés :

- les deux pics ont une amplitude presque égale, mais la première vague de mitoses dure moins longtemps que la seconde ; ce qui est l'indice d'une meilleure synchronisation à la 36ème heure ;

- 48 heures séparent les deux pics : c'est la valeur moyenne du temps de génération des cultures de Silène à cette température.

3 - Chocs thermiques

Au cours d'un cycle de croissance à 10°C, il y a très peu de divisions jusqu'au 4ème jour. L'IM augmente du 4ème au 6ème jour, demeure à peu près stable du 6ème au 12ème jour et diminue ensuite (Fig. 55,A).

Le transfert des cultures (sans repiquage) de 10°C à la température optimale de 25°C déclenche une ou plusieurs vagues de mitoses susceptibles d'induire la synchronisation partielle des cellules. L'efficacité du traitement dépend de la durée du passage préalable à 10°C (Fig. 55,B). S'il est trop court (24 - 48 h), le premier pic de mitoses est peu marqué et la synchronisation se perd immédiatement. S'il est trop long (8 - 15 j), les cellules qui sont réparties à tous les stades du cycle cellulaire se divisent plus rapidement à 25 qu'à 10°C, mais pas de façon synchrone. Dans les deux cas l'IM maximal est inférieur à celui d'une culture placée à 25°C dès l'ensemencement (Fig. 55,A et B). Lorsque le choc thermique intervient entre le 4ème et le 6ème jour, c'est à dire pendant que le plus grand nombre de cellules se divisent, un premier pic de forte amplitude (IM = 4 à 8 % selon les essais) apparaît entre la

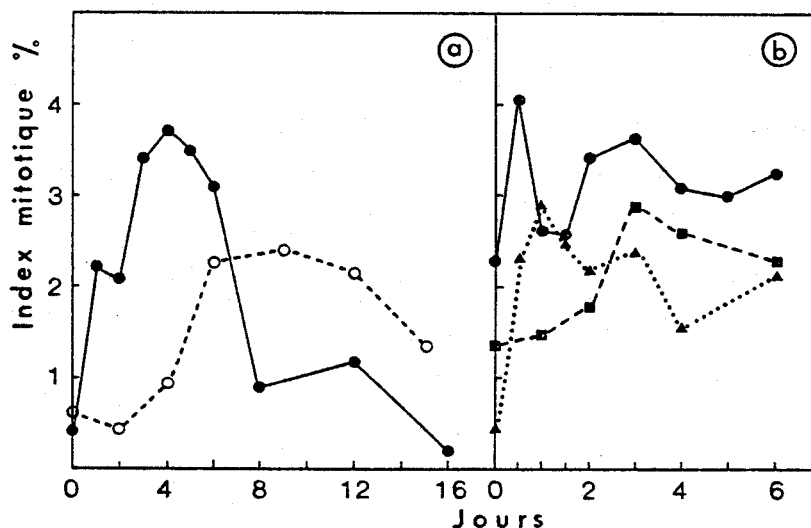


Figure 55 : Variations de l'index mitotique des suspensions cellulaires de Silène :

A - au cours d'un cycle de croissance à 10°C (O---O) et à 25°C (●—●) ;

B - après transfert à 25°C des cultures maintenues à 10°C pendant 2 jours (▲····▲), 6 jours (●—●) et 15 jours (■---■).

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; lumière : 500 lux, 24 : 0.

12ème et la 36ème heure et un second d'amplitude comparable entre le 3ème et le 4ème jour (Fig. 54,C et 55,B). L'index mitotique demeure relativement stable (3,5 - 5 %) jusque vers le 7ème jour, puis décroît régulièrement.

4 - Utilisation d'inhibiteurs

Les analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques empêchent la duplication de l'ADN, ce qui bloque le cycle cellulaire et peut entraîner la synchronisation d'une population cellulaire. Mais en même temps ces substances déterminent une réduction importante de la croissance et provoquent la mort des cellules, si les doses employées sont trop fortes. De plus, pour lever l'inhibition provoquée par

des analogues, il est souvent nécessaire de transférer les cellules, après les avoir rincées, dans un milieu renfermant une ou plusieurs bases normales.

Ces faits nous ont conduit à étudier l'influence qu'exercent les nucléosides de la série normale et quelques analogues structuraux sur la croissance et les possibilités de subculture des cellules de Silène. Les résultats de ce travail préliminaire ont été obtenus en collaboration avec S. RAMBOUR et J. VASSEUR et seront complétés ultérieurement.

a - Effets des bases et des nucléosides sur la croissance

Nous avons utilisé les 5 bases principales et les nucléosides correspondants, plus deux précurseurs, l'acide inosinique et l'acide orotique. Toutes ces substances ont été stérilisées à l'autoclave, en même temps que le milieu de culture.

- entre 10^{-6} et 10^{-4} M, elles n'affectent pas la croissance ;
- entre 10^{-4} et 10^{-3} M, les effets varient selon la substance utilisée ;
- entre 10^{-3} et 10^{-2} M, toutes les substances réduisent fortement la biomasse des cultures, à l'exception de la cytosine, de la cytidine, de l'uracile et de l'acide inosinique.

b - Effets de quelques analogues structuraux sur la croissance

Nous avons choisi deux dérivés halogénés de la déoxyuridine, le fluorodéoxyuridine (FUdR) et le bromodéoxyuridine (BUdR) ainsi que l'azaguanine et l'azathymine. Les 4 substances ont été stérilisées par filtration sur membrane Millipore.

- l'azathymine est sans effet sur la croissance des cellules de Silène, même à concentration élevée (10^{-5} à 10^{-4} M). Ce type d'expérience ne permet pas de déterminer si l'analogue est métabolisé et non toxique, ou bien s'il n'est pas absorbé par les cellules de Silène.

- l'azaguanine et le BUdR sont sans effets jusqu'à 10^{-7} M. Ils réduisent légèrement la biomasse des cultures entre 10^{-7} et 10^{-6} M et sont fortement inhibiteurs entre 10^{-6} et 10^{-5} M.

- le FUDR est le plus actif : il réduit la croissance de 25 % à 5.10^{-8} M et de 50 % à 1.10^{-7} M et provoque la mort des cellules entre 5.10^{-7} et 1.10^{-6} M.

c - Cultures en "retour"

Les cellules sont cultivées pendant deux semaines dans le milieu standard auquel on ajoute de 1.10^{-6} à 1.10^{-4} M de BUdR. A l'issue de ce premier passage, les cellules sont rincées puisensemencées à raison de 15 mg de M.F.ml⁻¹ dans du milieu standard dépourvu d'inhibiteur.

La croissance mesurée à l'issue du second passage (Tableau LV) varie en fonction de la dose de BUdR présente dans le milieu pendant le premier passage :

- si elle est inférieure ou égale à 5.10^{-6} M, elle est normale ;
- si elle est égale à 1.10^{-5} , la croissance n'est que partiellement restaurée et on note une grande variabilité des résultats selon les essais. L'adjonction d'uridine ne favorise que très peu la restauration.

EXPERIENCEN°	CONDITIONS EXPERIMENTALES		CROISSANCE (MF %)	
	1er passage (14 J)	2ème passage (14 J)	1er passage (14 J)	2ème passage (14 J)
1 et 2	MS + 0	MS	100 %	100 %
2	MS + 10^{-6} M BUdR	MS	95 %	110 %
2	MS + 5.10^{-6} M BUdR	MS	30 %	96 %
1	MS + 10^{-5} M BUdR	MS	28 %	57 %
2	MS + 10^{-5} M BUdR	MS	22 %	19 %
2	MS + 10^{-5} M BUdR	MS + uridine (5.10^{-4} M)	25 %	25 %
1	MS + 10^{-4} M BUdR	MS	16 %	0 %

TABLEAU LX : Cultures en "retour" de cellules de Silène, après un traitement par le BUdR.

La croissance (MF) relative est exprimée en % par rapport à celle d'une suspension cellulaire dont le milieu est dépourvu de BUdR.

Les expériences 1 et 2 sont indépendantes.

MS : milieu standard.

- si elle est égale ou supérieure à 1.10^{-4} M, toutes les cellules meurent lors du second passage.

d - Essais de synchronisation

ESSAI n° 1 : Des cellules de Silène sont cultivées pendant 4 jours dans le milieu standard auquel nous avons ajouté du FUDR à la concentration de 1.10^{-6} M. Les cellules sont recueillies dans des conditions aseptiques sur un filtre, rincées avec de la solution nutritive, puis repiquées dans du milieu standard à la densité initiale de 15 mg de M.F. ml^{-1} . Des prélèvements sont effectués toutes les 6 h jusqu'à la 36ème heure, puis toutes les 12 h jusqu'au 5ème jour après le transfert sur le milieu neuf.

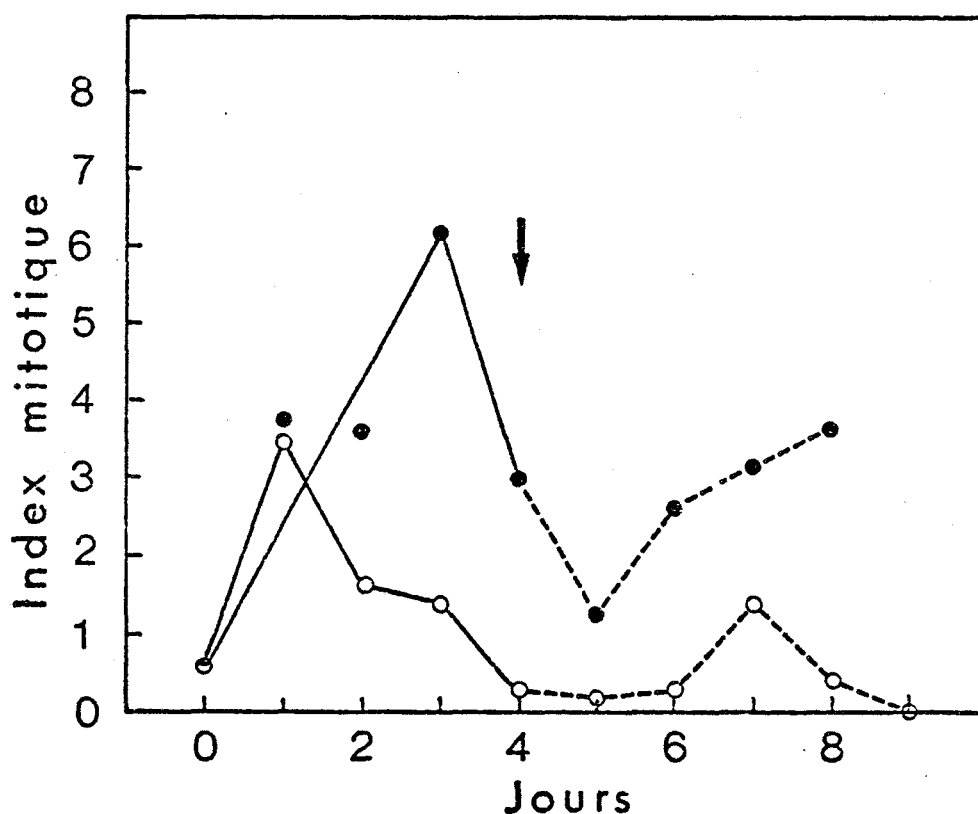


Figure 56 : Essai de synchronisation des cellules de Silène par un traitement au FUDR

Les cellules sont cultivées pendant 4 j dans le milieu standard seul (●—●) ou contenant 1.10^{-6} M de FUDR (○—○). Après lavage, elles sont transférées (↓) dans le milieu standard (●---● ; ○---○).

Inoculum : $3 \pm 0,2$ g de cellules âgées de 14 jours ; température : $25^{\circ}C$; lumière : 500 lux, 24 : 0.

ESSAI n° 2 : Il est effectuée dans les mêmes conditions que le précédent, mais nous avons remplacé le FUdR par du BUdR à la concentration de 1.10^{-5} M.

RESULTATS : Les deux essais n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Après un contact de 4 jours avec du BUdR à 1.10^{-5} M, les cellules sont en très mauvais état et la culture en retour ne permet pas la reprise des divisions cellulaires. Comme on le voit sur la figure 56, la concentration de FUdR, bien que 10 fois plus faible, est également trop élevée pour des cellules de Silène ; ou bien c'est le temps de contact qui est trop long. On observe bien une reprise de l'activité mitotique, mais elle est de courte durée. De plus, il est possible qu'elle soit provoquée par le transfert des cellules dans du milieu neuf, car on la retrouve dans les lots de cellules non traitées par l'inhibiteur.

5 - Conclusion

Parmi les quatre techniques de synchronisation utilisées, deux se sont révélées plus efficaces : la privation de 2,4-D pendant la durée d'un cycle de croissance et l'application d'un choc thermique froid / chaud. La privation de saccharose pourrait certainement être employée, mais il vaudrait mieux faire une pré-culture dans un milieu dépourvu de sucres, plutôt qu'utiliser des cellules provenant d'une suspension se trouvant en fin de phase stationnaire.

L'utilisation d'analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques est plus aléatoire. En effet, la toxicité de ces substances est importante et le choix d'une concentration efficace pour bloquer le cycle cellulaire, mais qui ne lèse pas les cellules est délicat. D'autant plus que d'une série d'essais à une autre, les seuils d'efficacité et de toxicité ne sont plus exactement les mêmes. Il ressort également de travaux antérieurs (ERIKSSON, 1966) que ces substances provoquent des mitoses anormales et des altérations cytologiques irréversibles.

CHAPITRE 6 : EVOLUTION DES COMPOSES SULFHYDRILES DANS DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE PARTIELLEMENT SYNCHRONES.

Nous avons analysé les variations des composés sulfhydrilés au cours du cycle de croissance dans deux lots de cultures qui ont subi au préalable un traitement induisant la synchronisation partielle des divisions cellulaires. Les premières ont été privées de 2,4-D pendant 14 jours avant d'être repiquées dans le milieu complet ; les secondes ont été soumises à un choc thermique (10°C pendant 4 jours, 25°C jusqu'à la fin de la culture).

1 - Synchronisation induite par l'épuisement du 2,4-D

Les cellules sont cultivées pendant 14 j dans le milieu standard dépourvu de 2,4-D ; les autres conditions expérimentales n'étant pas modifiées. Elles sont ensuite repiquées à la densité initiale de 15 mg de M.F.ml⁻¹ dans le milieu complet. Deux flacons sont prélevés toutes les 12 h jusqu'au 4ème jour, puis le 5ème, le 6ème, le 7ème, le 10ème et le 14ème jour. Les cellules, soigneusement rincées, sont congelées dans de l'azote liquide puis conservées à -18°C, sauf une partie aliquote qui sera employée à déterminer l'index mitotique.

a. évolution des -SH solubles

La teneur en -SH solubles augmente dès les premières heures de culture, passe par un maximum après 24 h, puis diminue. On observe un second maximum le 3ème jour, puis une baisse rapide du 3ème au 4ème jour.

Enfin, du 4^{ème} au 10^{ème} jour, la teneur en -SH solubles diminue très lentement (Fig. 57).

b. évolution des -SH protéiques

La teneur en -SH protéiques augmente rapidement dès la mise en culture. On note un premier maximum à la 24^{ème} h, puis un second au 4^{ème} jour. Contrairement aux -SH solubles, la teneur en -SH protéiques demeure élevée de la 12^{ème} h au 6^{ème} jour. Elle diminue rapidement de 6^{ème} au 7^{ème} jour, puis lentement jusqu'au 10^{ème} jour (Fig. 57).

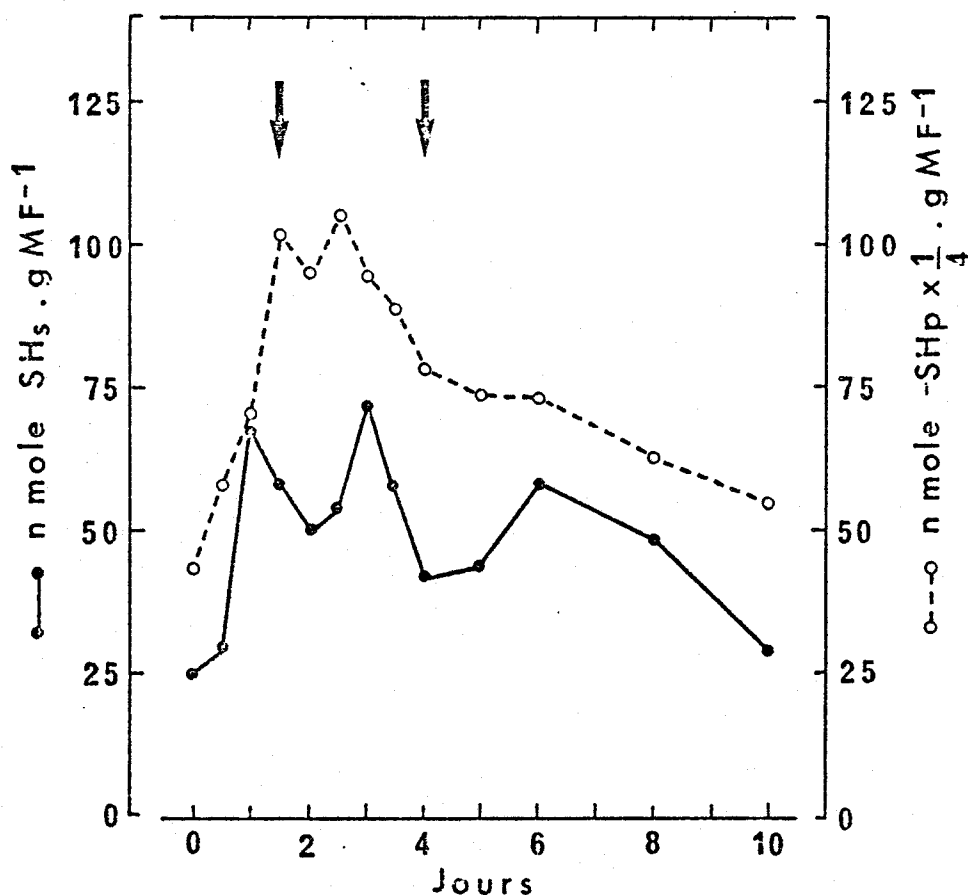


Figure 57 : Evolution de la teneur en -SH solubles (●—●) et protéiques (○---○) après une pré-culture dans un milieu dépourvu de 2,4-D. Le temps (jours) est compté à partir du repiquage des cellules dans le milieu standard contenant $5 \cdot 10^{-7}$ M de 2,4-D. Les flèches indiquent les index mitotiques maximums (Cf. la Fig. 54, B).

c. variations relatives des -SH solubles

L'évolution des rapports -SH/S-S et -SH/-SH + S-S rend compte des variations du pourcentage de composés sulfhydrilés réduits. Les résultats rapportés dans le tableau LXI montrent que les variations de ces deux rapports sont parallèles à celles de la fraction soluble des composés réduits. Les augmentations importantes de la teneur en -SH acidosolubles, au cours de la première journée de culture (elle est multipliée par 3) et à la 72ème h (elle est multipliée par 3,5, par rapport à la teneur initiale), ne peuvent donc pas s'expliquer par la seule réduction de composés oxydés appartenant à la fraction soluble.

TEMPS	-SH SOLUBLES	S-S SOLUBLES	$\frac{-SH}{S-S}$	$\frac{-SH}{-SH + S-S}$
0	33 nmole	114 nmole	29,0 %	22,4 %
12 H	53 -	107 -	49,5 -	33,1 -
24 H	100 -	200 -	50,0 -	33,3 -
36 H	80 -	150 -	53,0 -	34,8 -
48 H	73 -	240 -	30,4 -	23,3 -
60 H	103 -	380 -	27,1 -	21,3 -
3 J	117 -	257 -	45,5 -	31,3 -
4 J	43 -	247 -	17,4 -	14,8 -
5 J	37 -	233 -	15,9 -	13,7 -
6 J	47 -	246 -	19,1 -	16,0 -
7 J	43 -	202 -	21,3 -	17,5 -
10 J	27 -	147 -	18,4 -	15,5 -

TABLEAU LXI : Variations de la teneur en -SH et en S-S solubles (n mole.g M F⁻¹) et des pourcentages de thiols solubles réduits des cellules de Silène, après une pré-culture dans un milieu dépourvu de 2,4-D.

La faible stabilité des extraits renfermant les composés sulfhydrilés protéiques ne permet pas d'obtenir des valeurs reproductibles pour les disulfures et par conséquent d'établir des rapports comparables à ceux que nous avons calculés pour la fraction soluble.

2 - Synchronisation par un choc thermique

Les flacons de culture sont placés à 10°C pendant 4 jours, puis transférés à 25°C. Les analyses des composés soufrés sont effectuées toutes les 12 h jusqu'au 4ème jour, puis le 5ème, le 6ème, le 8ème et le 10ème jour sur du matériel végétal congelé dans l'azote liquide et conservé à -18°C.

a. Évolution des -SH solubles

La courbe qui traduit les variations des -SH acidosolubles montre trois pics : le premier à la 24ème h, le second, de même amplitude, à la 72ème h et le troisième, plus faible, le 6ème jour. Ensuite, la teneur en -SH solubles diminue régulièrement jusqu'au 10ème jour (Fig. 58).

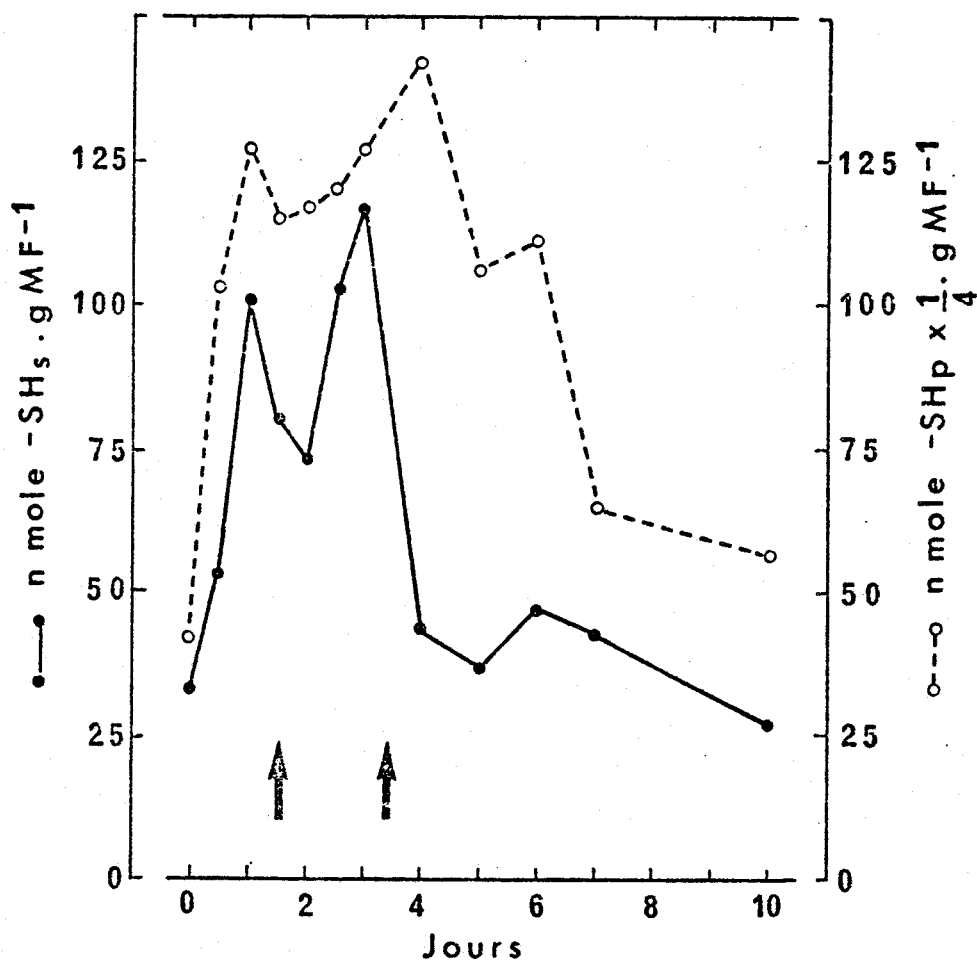


Figure 58 : Evolution de la teneur en -SH solubles (●—●) et protéiques (○---○), après un choc thermique (10°C pendant 4 j, puis 25°C). Le temps (jours) est compté à partir du transfert des cultures à 25°C. Les flèches indiquent les index mitotiques maximaux (Cf. la Fig. 54,C).

b. évolution des -SH protéiques

La teneur en -SH protéiques augmente jusqu'à la 36ème h, demeure importante jusqu'au 4ème jour, puis diminue régulièrement jusqu'à la fin de la culture (Fig. 58).

c. variations relatives des -SH solubles

L'évolution des rapports -SH/S-S et -SH/-SH + S-S, au cours de la culture, suit celle des fonctions thiols solubles (Tableau XLII).

TEMPS	-SH SOLUBLES	S-S SOLUBLES	-SH	-SH
			$\frac{\text{S-S}}$	$\frac{\text{-SH + S-S}}$
0	25 nmole	123 nmole	20,3 %	16,9 %
12 H	29 -	75 -	38,7 -	28,7 -
24 H	67 -	117 -	57,3 -	36,4 -
36 H	58 -	-	-	-
48 H	50 -	143 -	35,0 -	25,9 -
60 H	54 -	-	-	-
72 H	72 -	116 -	62,1 -	38,3 -
84 H	58 -	125 -	46,4 -	31,7 -
4 J	42 -	150 -	28,0 -	21,9 -
5 J	44 -	113 -	38,9 -	28,0 -
6 J	58 -	150 -	38,7 -	27,9 -
8 J	47 -	210 -	22,4 -	18,3 -
10 J	29 -	102 -	28,4 -	22,1 -

TABLEAU XLII : Variations de la teneur en -SH et en S-S solubles (n mole.g⁻¹ M F⁻¹) et des pourcentages de thiols solubles réduits des cellules de Silène, après un choc thermique.

3 - Conclusion

Les variations des composés sulfhydrilés acidosolubles et protéiques et du pourcentage de -SH réduits sont identiques dans les 2 séries de cultures. Elles sont donc indépendantes du facteur qui induit la synchronisation des cellules.

Si on superpose les courbes qui traduisent l'évolution de la teneur en -SH solubles (Fig. 57 et 58) et de l'index mitotique (FIG. 54, B et C), on remarque que les variations sont comparables mais déphasées. Lors des cinq vagues de divisions partiellement synchrones que nous avons analysées, l'augmentation de la teneur en -SH précède toujours d'au moins 12 heures celle de l'index mitotique. Le rapport -SH solubles / S-S solubles augmente également plus vite que l'I M, après le repiquage des cellules dans le milieu complet ou bien après le transfert des cultures de 10 à 25°C. Ces faits suggèrent qu'une synthèse de composés sulfhydrilés acidosolubles, qui détermine une augmentation du potentiel rédox, précède la mitose.

Comparons maintenant les courbes qui traduisent les variations des -SH protéiques et celles de l'IM. Elles ne sont pas superposables. En effet, la teneur en -SH protéiques augmente dès le repiquage des cellules dans le milieu complet ou le transfert des cultures à la température optimale, tandis que l'IM subit de fortes variations au cours des premiers jours. L'augmentation de la teneur en -SH protéiques correspond davantage à une réactivation du métabolisme cellulaire qu'à l'induction d'une vague de mitoses. On note qu'elle reste élevée entre les deux vagues successives de divisions, ne diminuant que vers la fin de la première semaine de culture, c'est à dire en même temps que la protéogenèse et la respiration.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Par ce travail nous avons voulu apporter une contribution à l'étude de la croissance des cultures de tissus et des suspensions cellulaires d'origine végétale, notamment en analysant les variations des composés sulfhydrylés qui interviennent au cours de la croissance des tissus de Carotte et des cellules de Silène. Il convient maintenant de tirer quelques conclusions générales et de discuter les résultats en les replaçant dans le cadre plus large de la croissance des Végétaux et de son contrôle.

CROISSANCE DES TISSUS DE CAROTTE

Les tissus de Carotte sont les premiers tissus végétaux sains qui ont été cultivés *in vitro* d'une manière indéfinie (GAUTHERET, 1939). Capables de proliférer sur un milieu simple et présentant un taux de croissance élevé pour ce type de culture et une bonne stabilité, les tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte de GAUTHERET -et ceux de quelques autres souches de Carotte isolées par la suite- ont été largement utilisés pour toute une série de recherches concernant la nutrition minérale (HELLER, 1953 ; COHEN, 1968), azotée (LACHARME et NETIEN, 1969 ; MAILLE, 1971) et carbonée (GORIS, 1954 ; NAEF, 1968) et l'utilisation des régulateurs de croissance (BOURIQUET, 1960). Aussi, lorsque nous avons entrepris ce travail, on connaissait déjà fort bien les conditions de culture et les principaux facteurs nutritionnels et hormonaux qui contrôlent leur développement. C'est d'ailleurs l'une des raisons qui nous incita à choisir ce matériel pour étudier l'évolution des -SH au cours de la croissance, et tenter de préciser dans quelle mesure ils participent au contrôle de celle-ci.

En ce qui concerne la nutrition carbonée des tissus de Carotte et leur sensibilité vis à vis des régulateurs de croissance, nos résultats confirment ceux de nos prédécesseurs ; les quelques différences observées peuvent être attribuées, soit aux conditions expérimentales, jamais tout à fait semblables, soit à des modifications de la souche, qui

est maintenue en culture depuis 1937. Les tissus que nous avons utilisés pour nos essais sont légèrement moins sensibles à l'action des phytohormones que ceux employés par BOURIQUET (1960) et nettement moins exigeants en glucose que ceux cultivés par NAEF (1968). Les poids de M F et de M S passent par un optimum pour des doses de sucre respectivement égales à 20 et 40 g.l⁻¹ au lieu de 30 à 45 g.l⁻¹. On notera surtout que de faibles concentrations de glucose (5 et 10g.l⁻¹) assurent déjà une croissance importante et que des doses supérieures à 50 g.l⁻¹ sont beaucoup plus inhibitrices et provoquent en même temps que le ralentissement de la prolifération, une forte augmentation de la teneur en chlorophylle se traduisant par un verdissement très accentué des colonies tissulaires.

En comparant les courbes qui expriment les variations de la biomasse, de l'intensité respiratoire, de la protéogénèse et de la teneur en pigments plastidaux à celles qui rapportent l'évolution de la teneur en auxine endogène et de l'activité auxine-oxydasique, nous sommes en mesure de préciser les principales phases qui caractérisent le développement des colonies tissulaires. A 21°C et dans les conditions de lumière de la salle de culture du laboratoire, le cycle de croissance comporte quatre phases principales ayant chacune une durée d'environ 30 jours. La première phase présente une variation importante de la teneur en auxine endogène qui passe par un maximum au 18ème jour, puis diminue jusqu'au 30ème, tout en restant supérieure à la teneur initiale. La seconde période est marquée par une forte augmentation de l'activité auxine-oxydasique qui atteint un maximum le 60ème jour. Malgré des variations très importantes de l'état auxinique endogène, le taux de croissance ne varie pas au cours des deux premiers mois de culture, si on considère l'évolution des poids de M F et de M S ; il baisse dès le second mois, si on tient compte des protéines. Pendant la troisième phase, on assiste à un net ralentissement de la croissance exprimée en poids de M S ou de protéines ; seul le poids frais augmente encore relativement vite, ce qui indique une entrée d'eau dans les cellules et correspond à une augmentation de la taille de celles-ci. La dernière phase est marquée par une forte diminution de l'intensité respiratoire qui exprime le ralentissement général du métabolisme et annonce le déclin des cultures.

Ces quatre phases ne correspondent cependant pas exactement à celles décrites par LACHARME et NETIEN (1969), en étudiant les variations des acides organiques. Selon ces auteurs, les tissus traversent d'abord une courte phase de "latence" (8 jours), puis passent successivement par une longue période de "croissance en accélération", du 8ème au 50ème jour et, du 50ème au 90ème jour, par une période où "les processus de biosynthèse sont réduits ; enfin par une phase de sénescence. L'existence d'une phase de latence pendant la première semaine de culture est tout à fait possible. En effet, si on se réfère aux variations de la teneur en auxine endogène, on constate qu'elle n'augmente qu'à partir du 8ème jour. Par contre, nous pensons qu'il faut scinder la seconde phase décrite par LACHARME et NETIEN en deux périodes distinctes, en raison de l'évolution de l'état auxinique endogène que nous avons signalée et des variations des composés azotés solubles qu'ils rapportent dans leur travail ; ils observent en effet une augmentation rapide de l'azote aminé et amidé du 8ème au 25ème jour, suivie d'une diminution aussi rapide, du 25ème au 49ème jour.

On sait depuis longtemps que la lumière favorise généralement le développement des cultures in vitro, mais on connaît mal la façon dont elle agit sur la prolifération de colonies tissulaires peu différenciées et non organogènes, d'autant que ses effets varient selon la température (De CAPITE, 1955). Les recherches consacrées à l'action de la lumière sur des tissus de Carotte ne sont pas nombreuses et concernent des domaines particuliers, tels que l'ultrastructure (NEDUKHA, 1969 cité par MASHERPA, 1971 ; ISRAEL et Coll., 1969 ; MASHERPA, 1971), la teneur en pigments plastidaux (NAEF, 1962 ; NAEF et TURIAN, 1963 ; DUBOIS, 1973), le métabolisme glucidique (GORIS, 1954 ; NAEF, 1968), le métabolisme protéique (MAILLE, 1971). Les travaux qui font la distinction entre les effets de la photopériode, de l'intensité d'éclairement et de la qualité de la lumière sont encore plus rares (BUNNING et WELTE, 1954 ; MAILLE, 1971). Notre travail apporte quelques résultats nouveaux concernant l'influence de ces différents facteurs sur la croissance des colonies tissulaires de Carotte et démontre que leur sensibilité vis à vis de la lumière varie de façon très importante selon la nature des pigments plastidaux qu'elles renferment.

En ce qui concerne la souche chlorophyllienne de GAUTHERET, nous avons constaté, comme BUNNING et WELTE (1954) et NAEF (1968) que la croissance est plus importante en jours longs qu'en jours courts. Toutefois, nous n'avons pas observé de chute brutale de la croissance pour une photopériode particulière (15 - 16 H). D'autre part, les interruptions au cours des phases lumineuse ou obscure sont sans influence. On ne peut donc pas parler véritablement de photopériodisme, en ce qui concerne ces tissus : c'est le nombre total d'heures d'éclairement journalier (peut-être même, pendant une période donnée) qui modifie l'intensité de la prolifération des colonies fissulaires. L'allongement de la durée journalière d'éclairement provoque aussi une augmentation de la teneur en chlorophylle. Il serait intéressant de préciser à quel niveau intervient la lumière : augmentation du nombre de plastes par cellule, de granums par plaste, ou encore de thylacoïdes par granum ou par plaste. Des observations en microscopie photonique démontrent que le nombre de chloroamyloplastes par cellule est plus grand en lumière continue qu'en éclairement périodique, 12 : $\overline{12}$; la taille des plastes est également plus grande en lumière continue et ils renferment aussi davantage de grains d'amidon. Chez l'Épinard, BRONCHART constate que les feuilles cotylédonairens renferment plus de thylacoïdes par granum en jours longs qu'en jours courts et que ces différences sont bien en relation avec la photopériode et non avec la quantité d'énergie lumineuse reçue. Par contre, en jours courts, le nombre de faisceaux de lamelles stromatiques est souvent plus élevé, notamment quand les feuilles reçoivent une faible intensité lumineuse (BRONCHART, 1967).

L'intensité d'éclairement modifie relativement peu la croissance et la teneur en chlorophylle des colonies de la souche chlorophyllienne de Carotte. Des intensités inférieures à 500 lux ou supérieures à 5000 lux ont toutefois un effet inhibiteur. Des expériences complémentaires ont démontré qu'entre ces limites, la durée journalière d'éclairement joue un rôle beaucoup plus important que son intensité.

La longueur d'onde n'agit pas sur la prolifération lorsque les radiations sont peu énergétiques : 1000 à 2000 $\text{ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Elle agit par contre sur la biosynthèse des pigments chlorophylliens, qui

est stimulée en lumière bleue et presque totalement supprimée par des radiations rouge clair. Nous avons pu démontrer que des radiations relativement monochromatiques interviennent sur la différenciation des plastes : en lumière bleue, le système lamellaire est analogue à celui que l'on observe en lumière blanche ; par contre, en lumière rouge clair on ne rencontre que des proplastides ou des plastides de grande taille en dégénérescence (pas de granums et très peu de lamelles stromatiques). MAILLE (1971) note une légère stimulation de la croissance des tissus d'une souche chlorophyllienne de Carotte soumise à des radiations bleues plus énergétiques (6000 - 7000 lux) et la disparition de la chlorophylle en lumière rouge clair et infrarouge. Dans les mêmes conditions d'éclairement, et quelle que soit la longueur d'onde, des tissus d'une souche de Nicotiana tabacum, cultivés sur des milieux de MURASHIGE et SKOOG, sont totalement dépourvus de chlorophylle (MAILLE, 1971).

Des tissus de Carotte étiolés se comportent de la même manière que ceux de la souche chlorophyllienne dont ils proviennent. Les cellules synthétisent de la chlorophylle à la lumière et, après 6 ou 9 semaines, la teneur en pigments plastidaux est à peu près la même dans les tissus initialement étiolés et dans ceux qui ont toujours été cultivés à la lumière.

Les tissus de la souche caroténogène d'EICHENBERGER réagissent de façon très différente. La prolifération est d'autant plus active que la durée journalière et l'intensité d'éclairement sont plus faibles. La biomasse passe par un maximum à l'obscurité et la teneur en pigments caroténoïdes est maximale quand on soumet les tissus à un éclairement périodique de faible intensité (500 - 1000 lux) ou bien à des héméropériodes courtes (6 : 18).

L'effet favorable de la lumière sur la prolifération des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte doit se manifester à plusieurs niveaux. La photosynthèse intervient (ROUX et TENDILLE, 1954 ; EDELMAN et HANSON, 1971 ; MAILLE, 1971), mais elle est quantitativement très peu importante, sans doute en raison de la teneur en chlorophylle, environ 10 fois plus faible que dans des feuilles entières. La lumière favorise l'absorption et l'utilisation du glucose. En effet, des tissus des souches chloro-

phylliennes et caroténogènes cultivées sur des milieux renfermant des doses de sucre favorables prolifèrent beaucoup plus vite à la lumière, tandis que des colonies étiolées maintenues à l'obscurité sur les mêmes milieux "profitent" beaucoup moins de l'apport de sucre exogène. D'autre part, lorsque la teneur en glucose dépasse 50g.l^{-1} et devient inhibitrice, la réduction de la croissance est beaucoup plus forte à la lumière qu'à l'obscurité, vraisemblablement parce que dans ces conditions le sucre pénètre moins vite dans les cellules. NAEF (1968) observe lui-aussi une moins grande sensibilité des tissus de la souche chlorophyllienne vis à vis de la dose de sucre, lorsque les colonies tissulaires sont placées à l'obscurité.

On sait d'autre part (CHAMPIGNY, 1960) que la lumière favorise la réduction des ions NO_3^- et la genèse des acides aminés dans les feuilles de plantes entières. Dans les colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte, la teneur en azote soluble et protéique augmente entre 0 et 12 h de lumière par jour et diminue ensuite, mais ces variations ne sont pas synchrones et le rapport NP/NT augmente progressivement en même temps que la durée journalière d'éclairement. Un éclairage périodique 12 : $\overline{12}$ provoque un déséquilibre dans le pool des acides aminés et notamment une accumulation d'alanine, qui n'apparaît pas en lumière continue où la répartition des acides aminés est voisine de celle que l'on trouve dans des fragments de racine (MAILLE, 1971). De nombreux travaux effectués sur des germinations et sur des feuilles prélevées sur des plantes entières montrent que la lumière stimule l'activité de la nitrate réductase en agissant sur l'induction de l'enzyme ASLAM et Coll., 1973 ; ASLAM et Coll., 1976), sur la concentration du substrat en favorisant l'entrée des ions NO_3^- (BEEVERS et Coll., 1965) ou sur la teneur en sucres endogènes qui peuvent agir à leur tour à différents niveaux, comme le suggèrent SASAKAWA et YAMAMOTO (1977) et SAHULKA et LISA (1978). Cette dernière remarque souligne l'importance du sucre présent dans le milieu de culture pour des tissus qui renferment ou non de la chlorophylle et manifestent de toute façon une activité photosynthétique réduite.

CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILÈNE

Les suspensions cellulaires diffèrent entre elles par leur caractères génétiques mais elles présentent un ensemble de caractères morphologiques et physiologiques qui semblent liés à leur mode de culture.

Les suspensions cellulaires de Silène renferment à la fois des cellules libres et des amas constitués d'un nombre variable de cellules plus ou moins accolées les unes aux autres. Le pourcentage de cellules réellement isolées est faible. Comme chez d'autres suspensions cellulaires, notamment chez l'Erable (KING et STREET, 1973), il diminue au cours de la phase exponentielle, puis augmente à nouveau pendant la phase stationnaire. Dans les cultures de Daucus carota et de Convolvulus arvensis, le nombre de cellules isolées par unité de volume augmente aussi au cours du cycle de croissance, mais en même temps la proportion de petits agrégats (moins de 100 μm) diminue (TORREY et REINERT, 1961). Dans des cultures de Silène âgées de deux semaines, les agrégats dont la taille est comprise entre 0,5 et 1,0 mm représentent environ 50 % du poids de M F, tandis que les cellules isolées et les amas inférieurs à 500 μm , représentent un peu plus de 10 % de la biomasse. Des variations de la teneur en 2,4-D, son remplacement par du ANA ou encore l'adjonction de cytokinines modifient peu la dispersion des cellules, contrairement à ce qu'on observe pour d'autres suspensions cellulaires. Par contre, on provoque une diminution de la taille des agrégats et en même temps une augmentation du nombre de cellules libres en ajoutant 2 mM d'ammonium dans le milieu, ou bien en cultivant les cellules à 10°C. BRASSART (communication personnelle) observe une plus grande dispersion des cellules et la disparition des plus gros amas, après quelques jours de culture en présence d'acide gibbérellique.

Par leurs caractères cytologiques et ultrastructuraux, notamment le grand développement du système vacuolaire, le noyau plus ou moins lobé et les parois relativement fines, les cellules de Silène en culture ressemblent à des cellules parenchymateuses. Ce qui n'est pas surprenant, car le cal primaire qui est à l'origine de notre souche provient du reclouonnement des cellules du parenchyme cortical de la tige du Silene alba. La dédifférenciation qu'elles

subissent en culture -en particulier le fait qu'elles sont susceptibles de se multiplier activement- les rapproche des cellules cambiales des Dicotylédones, mais est tout à fait insuffisante pour les ramener à un état comparable à celui d'un méristème apical. C'est sans doute ce qui explique que les cellules de Silène, comme la plupart des autres cellules cultivées en milieu liquide agité ne manifestent pas de propriétés organogènes, malgré des apports d'auxines, de cytokinines et de gibbérellines, fournis séparément ou en mélange. Les cellules de Silène renferment de nombreux proplastes et des leucoplastes dont la richesse en amidon varie beaucoup au cours du cycle de croissance et suivant la teneur en sucre du milieu de culture. Le saccharose qui est absorbé très rapidement, en partie après avoir été hydrolysé dans le milieu, est mis en réserve sous forme d'amidon dans les plastes pendant la phase exponentielle, puis utilisé progressivement au cours de la seconde semaine de culture. Le fait que des cellules accumulent de l'amidon au moment où la croissance est la plus active est intéressant à souligner, car contraire à ce qu'on observe généralement. Quand on augmente la teneur initiale en sucre, les leucoplastes amylières sont plus nombreux et ils persistent pendant toute la durée de la culture. Les proplastes renferment très tôt des grains d'amidon et sont donc à l'origine des leucoplastes amylières. Dans des cultures d'Erable, ils peuvent se différencier en chloroplastes, si les conditions d'éclairement et le choix des régulateurs de croissance sont favorables (DAVEY, 1970, cité par YEOMAN et STREET, 1973). Il a été montré par ailleurs, que les proplastes des cellules de Tabac cultivées en milieu liquide agité présentent une très forte activité nitrate- et nitrite-réductasique (WASHITANI et SATO, 1977). On peut se demander s'il en est de même pour les cellules de Silène, dont l'activité nitrate-réductasique augmente très rapidement après le repiquage des cellules dans un milieu renfermant des nitrates et passe par un maximum entre la 24ème et la 48ème heure (POULLE, 1979). Il serait intéressant de rechercher par un fractionnement cellulaire si la "fraction proplaste" présente une activité nitrate réductase plus importante que les cellules entières, au cours de cette période ; et dans ce cas, s'il y a une relation entre l'activité enzymatique et la présence (ou l'absence) d'amidon dans ces organites.

En ce qui concerne le cycle de croissance, nous avons retrouvé les phases classiques des cultures en milieu liquide non renouvelé. La durée respective de chacune de ces phases dépend dans une large mesure de la composition du milieu et de quelques facteurs physiologiques et physiques, notamment de l'âge des cellules de l'inoculum, de la densité initiale de la culture, de la température et de la lumière. Nous ne reviendrons pas sur ces facteurs que nous avons étudié en détail au cours de notre travail, mais il nous semble utile de rappeler les conditions optimales de la croissance :

- Inoculum : cellules prélevées dans une culture âgée de 12 à 14 jours ;
- densité initiale de la culture : 1,5 à 3 g de M F / 200 ml de milieu, soit $2,5 - 5 \cdot 10^4$ cellules.ml⁻¹
- température : $25 \pm 1^\circ\text{C}$;
- lumière : 500 - 1000 lux, au niveau des flacons de culture ;
- milieu minéral : solution de LESCURE modifiée (Tableau II) ;
- saccharose : 2 ‰ pour l'entretien de la souche et 4 ‰ pour obtenir le maximum de biomasse ;
- substances de croissance et vitamines : $1 \cdot 10^{-7}$ g.ml⁻¹ de 2,4 D ou $5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹ de ANA et $1 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹ de vitamine B₁.

Dans ces conditions (avec 2 ‰ de saccharose), la phase de latence est très courte (3 à 6 h) ou inexistante, selon les critères de référence utilisés. Pendant la phase exponentielle, l'index mitotique est de 4 à 5 ‰ et le temps de doublement du nombre de cellules ou de leur biomasse varie de 40 à 48 h, ce qui est comparable au temps de doublement des cultures du Nicotiana tabacum var. Xanthii (FILNER, 1965), d'Acer pseudoplatanus (KING et STREET, 1973) et environ deux fois plus long que celui des cultures du Phaseolus vulgaris cv Contender (LIAU et BOLL, 1971) et d'Haplopappus gracilis (ERIKSSON, 1967). Du 8ème au 12ème jour, la culture passe par une période de croissance ralentie, puis entre en phase stationnaire. Une des caractéristiques de ce cycle de croissance est la brièveté de la phase stationnaire. Elle s'explique par l'épuisement du milieu en sucre, déjà presque complet au 10ème jour. A partir du 14ème ou du 15ème jour, on assiste au déclin très rapide de la culture, quel que soit le critère de référence utilisé.

Le cycle de croissance n'est pas défini par les seules modifications de l'index mitotique et du temps de doublement du nombre (ou de la masse) de cellules : il dépend des variations de toute une série de critères biochimiques, enzymatiques et physiologiques. Nous retiendrons d'abord celles des acides nucléiques qui conditionnent à la fois la division des cellules et leur activité métabolique.

En suivant l'incorporation du ^{32}P dans l'ADN, on observe un premier pic de synthèse à la 3^{ème} h et un second au 3^{ème} jour. La comparaison de l'évolution de l'activité spécifique de l'ADN, des variations de la teneur moyenne en ADN par cellule et de l'index mitotique suggère que le second pic, le plus important, correspond à la duplication de l'ADN des cellules qui se divisent d'une manière relativement synchrone entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour. L'augmentation marquée de la teneur moyenne en ADN par cellule au cours de cette période indique que la proportion des cellules en division est importante. Il apparaît que toutes les cellules qui passent par la phase S le troisième jour sont non seulement bloquées en G_1 , mais encore incapables à entrer en phase S lors du transfert dans du milieu neuf. Cette idée est confirmée par l'observation d'une synthèse de M S et de protéines, très active pendant les deux premiers jours et par une synthèse d'ARN, à la 6^{ème} h. Sur le plan cytologique, ces synthèses se traduisent par une forte augmentation du volume de cytoplasme (nombreux trabécules cytoplasmiques traversant la vacuole). Le premier pic d'ADN, plus discret, intéresse un nombre de cellules plus restreint, qui sont sans doute physiologiquement plus jeunes et aptes à dupliquer leur ADN, mais qu'un inhibiteur empêcherait d'entrer en phase S. Le transfert de ces cellules dans un milieu neuf lèverait l'inhibition. Une synthèse d'ADN a lieu dès la 3^{ème} heure, sans que l'on constate de synthèse d'ARN préalable. Ce sont ces cellules, qui n'étaient sans doute pas encore entrées en phase stationnaire, qui se divisent au cours des deux premiers jours. Un troisième point a retenu notre attention : c'est l'augmentation de la teneur moyenne en ADN par cellule au cours de la seconde semaine de culture, tandis que l'index mitotique diminue progressivement. Cette augmentation pourrait traduire des phénomènes d'endoréplication ou de polyploidie. De tels phénomènes sont fréquents en culture in vitro et pourraient être en relation avec un déséquilibre hormonal. Dans des cellules de Soja cultivées en présence de zéatine, on remarque que la teneur en ADN

et la ploïdie augmentent lorsque l'on supprime la cytokinine (FOSKET et SHORT, 1973). Certes, notre souche est autotrophe aux cytokinines ; mais on sait que le transfert des cellules dans un milieu riche en 2,4-D provoque dans d'autres cultures, la libération de cytokinines endogènes favorisant la cytodièrèse (PEAUD et JOUANNEAU, 1971).

L'incorporation du phosphore marqué dans l'ARN met également en évidence deux phases de synthèse ; la première de courte durée, vers la 6ème h, la seconde, plus longue, commence à partir du 3ème jour. Le premier pic correspond surtout à une fraction d'ARN polydisperse, riche en séquences polyadénylées tandis que le second montre surtout de l'ARN ribosomal et moins d'ARN polyadénylé (RAMBOUR et Coll., 1977 et 1978 ; VASSEUR et RAMBOUR, 1977).

Deux systèmes enzymatiques ont été étudiés jusqu'à présent. Le premier intervient dans l'utilisation des nitrates. Il s'agit d'une nitrate réductase, dont l'activité s'élève au cours des 24 ou 36 premières heures de culture, passe par un maximum entre le premier et le deuxième jour, puis décroît rapidement ; à la fin de la première semaine, elle est très faible ou nulle (POULLE, 1979). Des expériences de carence azotée et l'emploi d'inhibiteurs de la transcription et de la traduction ont montré que cette enzyme est induite par les nitrates et que l'ammonium interviendrait dans sa régulation (POULLE, 1979). L'autre système enzymatique participe à la régulation de la teneur en auxine endogène. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation importante de l'activité auxine-oxydasique pendant la seconde semaine de culture et démontrer le parallélisme qui existe entre l'évolution des activités auxine-oxydasique et peroxydasique au cours du cycle de croissance. En même temps que les activités auxine-oxydasique et peroxydasique augmentent, on voit apparaître certaines isoperoxydases, tandis que l'activité d'autres isoenzymes s'accroît (LEGRAND et DUBOIS, 1977). Nous avons pu montrer par ailleurs que l'activité peroxydasique des cellules et du milieu varie en fonction du régulateur de croissance utilisé et que le AIA la stimule et provoque l'apparition d'isoenzymes qui n'apparaissent pas -ou plus tardivement- en présence de ANA ou de 2,4-D (LEGRAND et DUBOIS, 1978).

GROUPEMENTS - SH ET CROISSANCE

MODIFICATIONS DE LA CROISSANCE DE CULTURES IN VITRO PROVOQUEES PAR L'INCORPORATION DE COMPOSES SOUFRES REDUITS OU OXYDES ET PAR DES INHIBITEURS DES GROUPEMENTS -SH DANS LES MILIEUX DE CULTURE

De nombreuses observations histologiques ainsi que des dosages des -SH solubles et totaux montrent que les fonctions thioles sont plus nombreuses dans des organes et des tissus en voie de croissance, que dans ceux qui ne prolifèrent pas. On pouvait donc s'attendre à ce que des composés soufrés présentant une fonction thiol stimulent la croissance et, selon les quantités ajoutées au milieu de culture, qu'ils agissent soit comme source de soufre, soit comme facteur de croissance.

A part la taurine qui est fortement toxique, les autres composés soufrés que nous avons utilisés (cystéine, cystine, méthionine, glutathion réduit et oxydé) assurent la croissance des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte pendant trois passages successifs et peut-être davantage. Toutefois, le remplacement des sulfates par une quantité équivalente de soufre sous forme d'acide aminé ou de peptide réduit plus ou moins la prolifération. Le G-SH et le GS-SG fournissent des résultats comparables et, contrairement à ce qu'observent NICKELL et BURKHOLDER (1950) pour des tissus virosés de Rumex, la cystéine n'est pas plus favorable que la cystine. Les cellules de Silène sont beaucoup plus sensibles au remplacement des ions SO_4^{--} par du soufre organique : elles ne se divisent pratiquement plus lors du second passage. Nos résultats confirment donc que les cellules végétales en culture utilisent différents composés soufrés renfermant des fonctions -SH et S-S. Ils montrent également que leur aptitude à utiliser un acide aminé soufré ou du glutathion varie beaucoup selon leur nature et selon leur origine (NICKELL et BURKHOLDER, 1950 ; HELLER, 1955a ; REINERT et WHITE, 1956). Nos essais ne permettent pas d'affirmer que les composés sulfhydrylés sont plus -ou moins- efficaces que les disulfures correspondants.

Le G-SH et la cystéine ajoutés à faible dose dans des milieux contenant une dose normale de sulfates (1mM) ne favorisent pas la croissance des tissus de la souche de Carotte. Avant nous, BOURIQUET (1960)

avait déjà constaté que ces deux substances utilisées seules ne stimulent pas la prolifération des tissus de Carotte et de crown-gall de Scorsonère et les auteurs qui avaient préconisé d'incorporer de la cystéine dans les milieux de culture, reconnurent par la suite que cet acide aminé soufré n'était pas utile (GAUTHERET, 1944, p. 623).

Des substances plus complexes telles que la mercaptothiazoline et la mercaptoéthylamine stimulent plus ou moins la prolifération des tissus de souche de Carotte et de crown-gall de Scorsonère, mais non celle du parenchyme de Topinambour qui est hétérotrophe à l'auxine (BOURIQUET, 1960). Les propriétés de ces molécules complexes ne sont cependant pas forcément liées à la présence du groupement -SH. D'autres composés sulfhydrylés inhibent la division cellulaire et bloquent la croissance. Ainsi, le β -mercaptoéthanol a des effets mitodépresseur, mitoclasique et chromatoclasique sur les mitoses du méristème racinaire d'Allium sativum (LONGEVIALLE, 1968), inhibe le développement des germinations du Sinapis alba (LEVAIN, 1966) et, dans un tout autre domaine, il accélère l'induction des tumeurs chez un Nicotiana amphiploïde (AMES et SMITH, 1969). La cystéamine bloque la division cellulaire dans des cultures synchrones d'Euglena gracilis (NISSEN et ELDJARN, 1969).

En contrôlant les divisions cellulaires, les fonctions -SH modifient la morphogénèse et notamment celle des cultures primaires de Carotte dont les cals sont plus compacts et s'organisent en massifs sphériques typiques (PILET, 1958 ; 1963b). Lors du développement du jeune gamétophyte de Gymnogramme calomelanos L. (Fougère), des résultats spectaculaires ont été observés lorsqu'on ajoute de la cystéine au milieu de culture. Cet acide aminé provoque une hyperramification apicale de jeunes filaments à croissance unidimensionnelle, et la transformation des cellules du bord de la palette en cellules organogènes lorsque les gamétophytes sont en croissance bidimensionnelle (FAIVRE-BARON, 1978). Toutefois, l'emploi d'inhibiteurs des fonctions -SH n'empêche pas le phénomène, tout en le ralentissant. Il est donc probable que d'autres systèmes de contrôle de la morphogénèse interviennent simultanément. D'autres substances présentant une fonction -SH (β -mercaptoéthanol, glutathion réduit) modifient également le développement du gamétophyte d'Equisetum arvense et de diverses Fougères, produisant notamment une hypertrophie des rhizoïdes et provoquant une perte de la polarité (NAKAZAWA, 1968). Les travaux de LARPENT (1970), de LARPENT, FEVRE et VALLA (1973) et de FEVRE, TURIAN et LARPENT (1975) suggèrent que chez les Champignons, les fonctions -SH interviennent dans les phénomènes de ramification du mycélium.

Chez Eremothecium ashbyi (Champignon Hémiascomycète) des fonctions -SH ont été mises en évidence aux sites de formation des jeunes bourgeons qui évoluent en ramifications latérales (ROBSON et STOCHELEY, 1962). Chez les Levures, l'apparition d'un bourgeon est également précédé par l'accumulation d'enzymes à fonction -SH dont le rôle pourrait être d'hydrolyser partiellement les structures rigides de la paroi (PITT, 1969). Une confirmation du rôle joué par les -SH au cours de la ramification est apportée par leur dosage dans des souches de Podospora (Champignon Pyrénomycète) : la concentration des -SH est plus élevée chez les mutants à hyphes ramifiées que chez les souches sauvages (AUVITY, 1973). Une comparaison analogue entre des mycéliums ramifiés ou dénudés de Saprolegnia (Champignon Oomycète) montre également des différences notables (FEVRE, TURIAN et LARPENT, 1975).

Comme on vient de le voir, l'adjonction de composés sulfhydrylés au milieu de culture peut provoquer des actions spectaculaires, mais il faut se montrer très prudent dans l'interprétation des résultats, surtout quand les modifications sont peu importantes. On peut en effet se demander ce que deviennent les fonctions -SH, dans un milieu de culture dont le pH est souvent compris entre 6,0 et 7,0 et qui renferme de nombreux éléments susceptibles de catalyser leur oxydation ou de provoquer la formation de complexes inactifs. C'est pourquoi, il paraissait intéressant de tenter de bloquer les -SH endogènes par des inhibiteurs spécifiques et d'examiner les répercussions que cela entraîne sur le développement des cultures. Les résultats des essais que nous avons entrepris avec des tissus de souche de Carotte montrent qu'à faible concentration (10^{-8} - 10^{-6} g.l⁻¹), la réduction de la croissance est peu importante. Entre 10^{-5} et 10^{-4} g.ml⁻¹, le P-C.M.B., le N-E.M., l'iodoacétate et l'iodoacétamide inhibent la prolifération des souches chlorophyllienne et caroténogène de Carotte et celle des tissus des souches de Ronce et de crown-gall de Scorsonère ainsi que la croissance de la suspension cellulaire de Silène. En même temps que la multiplication des cellules, ces substances réduisent la respiration et provoquent une diminution de la teneur en chlorophylle dans les tissus qui possèdent des chloroplastes. Cependant, à toutes les concentrations essayées, la réduction relative de la croissance (biomasse exprimée en g de M F ou de M S), est plus importante que celle de la respiration qui traduit l'activité de l'ensemble du métabolisme.

De plus, on note une très importante augmentation de la teneur en -SH acidosolubles dans des tissus traités par de fortes doses de P-C.M.B. Il semble que l'emploi d'inhibiteurs qui est particulièrement indiqué lorsqu'il s'agit de bloquer "in vitro" l'activité d'une enzyme plus ou moins purifiée, soit mal adapté à notre problème. Les substances anti -SH bloquent simultanément la multiplication des cellules et toute une série d'enzymes dont l'activité est conditionnée par la présence de ce radical. Par ailleurs, elles provoquent une dégradation des protéines. La libération d'acides aminés soufrés et de petits peptides acidosolubles dont certains présentent des groupements -SH expliquerait la forte augmentation de la teneur en -SH solubles que nous enregistrons.

EVOLUTION DES -SH ENDOGENES AU COURS DE LA CROISSANCE

Dans des racines de Carotte cultivées aux champs, la distribution des composés sulfhydrylés n'est pas uniforme et la teneur en -SH acidosolubles est plus élevée au niveau de la zone cambiale qu'au niveau du xylème et des tissus corticaux. Par contre, dans des fragments prélevés dans la zone cambiale de la partie moyenne de la racine, la répartition des -SH solubles est homogène. Leur mise en culture déclenche une synthèse et une redistribution des composés sulfhydrylés solubles. Après trois semaines, il s'établit un gradient sulfhydrylé conforme à l'expression de la polarité morphologique de ces tissus. En faisant varier la position, la taille et la forme des explantats, nous avons pu démontrer que le gradient -SH n'est pas dû au contact d'une partie des tissus avec le milieu de culture, mais bien au développement polarisé des néoformations. La teneur en -SH est toujours plus élevée dans les cals que dans les fragments initiaux ; dans ceux-ci elle décroît de la face racinaire à la face foliaire.

D'une manière générale, la teneur en -SH est supérieure dans des tissus qui sont le siège d'une intense prolifération et elle décroît au fur et à mesure que l'activité de la croissance diminue. Ainsi, dans des néoformations qui se développent contre la face racinaire de fragments de racine de Carotte, la teneur en -SH solubles et le pourcentage de thiols baissent de la 3ème à la 11ème semaine de culture.

Dans les colonies tissulaires des souches chlorophyllienne, caroténo-gène et étiolée de Carotte, la teneur en -SH augmente au cours des premiers jours de culture, passe par un maximum pendant la phase de croissance active, puis diminue pendant la phase de croissance ralentie et pendant la période de sénescence. Il en est de même dans la suspension cellulaire de Silène dont le cycle de croissance est beaucoup plus court : la teneur en -SH augmente au cours de la première semaine (un ou plusieurs maximum selon les conditions expérimentales) et diminue au cours de la seconde.

PARTICIPATION DES COMPOSES SULFHYDRILES AU CONTROLE DE LA CROISSANCE

-SH et état auxinique endogène

En utilisant des techniques différentes, GAUTHERET (1944), puis KULESCHA (1951) et PILET (1964 et 1967) établirent qu'il existe un gradient auxinique endogène dans des fragments de racine de Carotte. La zone racinaire contient plus d'auxine que la zone foliaire et les différences s'accroissent au cours de la culture in vitro. Un gradient auxine-oxydasique inverse a été mis en évidence par PILET (1956) et confirmé par les travaux de PILET et FRAGATA (1963) et de FRACATA (1967) sur le même matériel. Les gradients sulfhydrilés et auxiniques sont donc parallèles ; les gradients auxine-oxydasiques et sulfhydrilés sont inverses.

Dans les colonies de la souche chlorophyllienne de Carotte, nous avons montré que les teneurs en auxine endogène et en -SH s'élèvent jusqu'au 15ème jour, puis diminuent progressivement jusqu'au 90ème jour. L'activité des auxine-oxydases est faible jusqu'au 18ème jour ; elle s'élève rapidement à partir du 25ème et passe par un maximum vers le 60ème jour.

Dans les cultures de Silène, la teneur en -SH est maximum au cours de la première semaine de culture, tandis que l'activité des auxine-oxydases et des peroxydases est relativement faible. Elle diminue très rapidement au début de la seconde semaine, en même temps que les activités auxine-oxydasiques et peroxydasiques s'accroissent.

L'analyse des gradients dans des cultures primaires de

racine de Carotte et celle des courbes de croissance des colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte et des suspensions cellulaires de Silène conduit donc au même résultat. Là où les fonctions thiols sont les plus nombreuses, les auxine-oxydases sont peu actives et la teneur en auxine endogène est forte et réciproquement. Des faits analogues ont déjà été relevés par PILET (1957), PILET et ZRYD (1965) et ZRYD (1969) dans l'apex de la racine du Lens culinaris. S'il est maintenant établi que l'activité des auxine-oxydases est l'un des facteurs qui conditionne l'état auxinique endogène (RAY, 1958 ; HARE, 1964 ; PILET et GASPARD, 1968), les rapports entre les -SH et l'activité des auxine-oxydases et des peroxydases d'une part, entre les -SH et la teneur en auxine endogène d'autre part sont moins bien définis.

Analysons d'abord les relations -SH / auxine-oxydases. Il a été démontré (PILET, 1958 et 1963b) que le glutathion réduit assure une inhibition "in vivo" et "in vitro" de l'activité auxine-oxydasique des néoformations de Carotte. D'autres composés présentant une fonction thiol ont également été considérés comme des effecteurs négatifs des auxine-oxydases (PILET et GASPARD, 1968). Cette inhibition pourrait être attribuée à la réduction d'effecteurs phénoliques ou au blocage des systèmes enzymatiques cupriques de certaines peroxydases présentant une activité auxine-oxydasique (PILET et ZRYD, 1965).

En ce qui concerne les relations -SH/auxine, on peut signaler que le G-SH et la cystéine modifient la courbe d'action du AIA sur l'élongation des fragments de tige du Pisum et des coléoptiles d'Avena (MARRE et ARRIGONI, 1957 b) et sur la prolifération des tissus isolés de Carotte et de crown gall de Scorsonère (BOURIQUET, 1960). Peu de travaux ont été consacrés aux effets des fonctions thiol sur la biogénèse de l'auxine. On sait cependant que la cystéine inhibe les polyphénols-oxydases, enzymes responsables de la conversion du tryptophane en AIA (GORDON et PALEG, 1961). Par contre, les effets des facteurs de croissance sur l'état des composés sulfhydrilés ont suscité de nombreuses recherches. Celles de MARRE et ARRIGONI (1967 a) chez Pisum (fragments de tige) et chez Avena (coléoptiles) et celles de MARRE et Coll. (1957) chez Pisum montrent qu'un traitement par du AIA (ou du 2,4-D) favorisant l'élongation, provoque une augmentation de

la teneur en -SH et/ou celle du rapport G-SH/GS-SG. Dans le même laboratoire, TONZIG et Coll. (1959) remarquent que l'élévation du rapport G-SH/GS-SG se manifeste à la suite d'un traitement par de l'auxine dans toutes les zones de la racine de Pois. Grâce à une méthode d'analyse plus fine, ZRYD (1969) démontre que dans la racine du Lens culinaris l'effet du AIA est strictement localisé dans la zone méristématique. Dans les tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte, les trois facteurs de croissance que nous avons utilisés déterminent une augmentation de la teneur en -SH acidosolubles, quel que soit leur effet -stimulation ou inhibition- sur la prolifération. Le ANA et surtout le 2,4-D sont plus efficaces que le AIA, qui est probablement dégradé plus rapidement, notamment par des systèmes oxydasiques (PILET et GASPARD, 1968 ; LEGRAND et DUBOIS, 1978). Le rapport -SH/-SH + S-S augmente lorsque la dose des facteurs de croissance stimule la prolifération du tissu de Carotte et diminue lorsque des doses trop élevées inhibent la croissance. A part quelques différences que nous avons relevées au passage, les composés auxinomimétiques provoquent donc dans des tissus très différents une augmentation de la teneur en -SH ou du rapport -SH/S-S.

En agissant sur la biosynthèse et la dégradation de l'auxine, les composés -SH ou le rapport -SH/S-S pourraient contrôler l'état auxinique endogène et, par conséquent, la croissance des tissus ou des cellules cultivées in vitro. Inversement, en modifiant la teneur en -SH et/ou le rapport thiol/disulfures des traitements auxiniques agissent également sur la croissance des cellules, soit directement, soit indirectement en orientant différemment le métabolisme.

-SH et extensibilité des parois

Dans les colonies tissulaires de la souche chlorophyllienne de Carotte, la teneur en -SH solubles augmente progressivement pendant les deux premières semaines de culture, puis elle décroît rapidement du 15ème au 30ème jour. Des observations cytologiques effectuées au cours de cette période ne montrent aucune vague de divisions. Selon LACHARME et STEIMAN (1970 a et b) et LACHARME (1972), une vague de mitoses s'observe au contraire peu de temps après le repiquage des tissus. Dans d'autres cultures in vitro, on relève également plusieurs vagues de mitoses au cours des 2 ou 3 premiers jours de culture, puis

la synchronisation se perd (YEOMAN et AITCHISON, 1973). Vers le 15ème jour, il est certain que le pourcentage de cellules en division est faible. Par contre, on peut penser que la plupart des cellules qui se sont divisées depuis la mise en culture sont encore engagées dans un processus d'auxésis qui se déroule d'une façon plus lente et progressive que la mitose. Dans ces tissus, il pourrait y avoir une relation entre la teneur en -SH solubles, la teneur en auxine et l'augmentation de la taille des cellules.

Les variations de l'extensibilité des parois -en rapport avec leur croissance- ont surtout été étudiées dans le cadre de recherches sur les propriétés des auxines (voir PILET, 1961, p. 451-455). Les valeurs d'un essai réalisé par CLELAND et rapportées par PILET (1971) montrent que l'auxine -à une dose où cette hormone stimule l'extension des parois- agit essentiellement sur le module d'extensibilité plastique, mais entraîne aussi, quoique plus faiblement, une augmentation du module d'extensibilité élastique. Or, l'extensibilité des parois serait directement dépendante d'une protéine riche en hydroxyproline à laquelle LAMPORT (1965) a donné le nom d'extensine. Selon l'hypothèse de LAMPORT, les molécules d'extensine seraient associées aux microfibrilles de cellulose préférentiellement orientées (ROLAND, 1966 ; MUHLETHALER, 1967 ; NEVILLE et Coll., 1975 ; ROLAND et Coll., 1977) par l'intermédiaire de chaînons polyholosidiques constitués d'arabino- se et de galactose auxquels elle est fixée par des ponts -O- (LAMPORT, 1963 ; 1965 ; 1967. De plus, les "complexes" arabino-galactane-extensine" pourraient être reliés entre eux par des ponts disulfures. Ce modèle a été complété par la suite grâce à des observations relatives à la structure glucidique de ces complexes (LAMPORT, 1970).

Si on schématise (Fig. 59) la molécule d'extensine associée d'une part aux microfibrilles de cellulose (mf) et d'autre part, à une autre molécule d'extensine (E) par l'intermédiaire d'un pont -S-S, on comprend que dans cette situation la structure est rigide et que la distance (L) entre les deux microfibrilles reste constante. Si à la suite d'un apport d'hydrogène, le pont -S-S est rompu, l'extension est possible et les microfibrilles de cellulose peuvent s'écarter d'une distance ΔL .

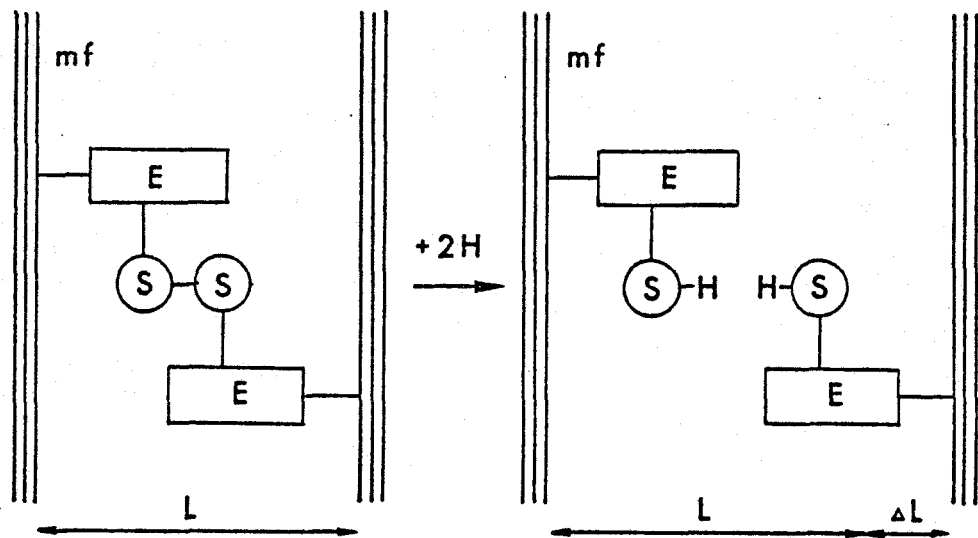


Figure 59 : Schéma montrant l'intervention des -S-S et des -SH de l'extensine dans la réalisation de l'auxésis et de l'extension des parois (D'après PILET, 1971).

Ce modèle traduit bien le fait qu'une augmentation du taux en -SH correspond à l'accélération des processus d'auxésis. Inversement, il est facile d'imaginer qu'une augmentation de la teneur en composés thioles dans une cellule va provoquer l'ouverture des ponts disulfures reliant les complexes "extensine" et, en favorisant la plasticité des parois, permettre le grandissement des cellules.

Selon l'hypothèse de LAMPORT (1965), en activant la respiration, l'auxine induit successivement un accroissement du taux d'ATP, de glucose-6-phosphate et finalement de $\text{NADH} + \text{H}^+$. L'élévation du taux de protons entraîne, à partir des fonctions S-S des complexes "extensine-arabino-galactane" la formation de -SH. Il est clair que les protons provoqueront aussi une augmentation de la teneur en -SH acido-solubles et du rapport -SH solubles/S-S solubles. Or, dans les tissus de Carotte en phase de croissance exponentielle, on constate à la fois une augmentation de l'activité respiratoire, de la teneur en -SH solubles et du pourcentage de -SH solubles. Nous retrouvons une situation identique lorsque nous cultivons les tissus de Carotte sur des milieux qui renferment du AIA, du ANA ou du 2,4-D. Ces faits apportent donc une confirmation à l'hypothèse de LAMPORT et fournissent une explication

quant au mode d'action de l'auxine sur l'augmentation de la taille des cellules.

L'existence d'une protéine riche en hydroxyproline est maintenant bien admise, bien que sa concentration varie beaucoup d'une plante à l'autre (LAMPART, 1965). Comparés à d'autres tissus cultivés *in vitro*, ceux de Carotte en contiennent une quantité moyenne (LAMPART, 1965) et il est tout à fait remarquable que la quantité d'hydroxyproline rapportée aux protéines soit deux fois et demi plus élevée dans un fragment de racine en culture que dans le fragment initial (STEWART et Coll., 1958).

Des groupements -SH et -S-S joueraient également un rôle important dans la plasticité des parois des Levures. NICKERSON et ses collaborateurs ont établi que la paroi de ces Champignons renferme des complexes "glucomannane-protéine" dont la protéine contient 1,2 % de soufre essentiellement sous forme de groupements -SH et de -S-S et qu'une enzyme présente dans les mitochondries est capable de provoquer la réduction des ponts disulfures de la paroi (NICKERSON et FALCONE, 1959). L'activité de cette enzyme, plus ou moins importante selon la souche de Levure, déterminerait la plasticité des parois et contrôlerait en définitive le mode de croissance : bourgeonnement ou élongation d'éléments filamenteux.

La transformation réversible des fonctions $-SH \rightleftharpoons S-S$ n'est cependant pas le seul mécanisme qui intervient dans la plasticité des parois des cellules végétales. D'une part, il n'existe pas toujours de relation entre le taux de croissance et l'activité de la synthèse de l'hydroxyproline (CLELAND, 1968 ; LAMPART, 1965) et il est curieux que la teneur en hydroxyproline soit plus faible dans des fragments d'organes qui s'allongent que dans des tissus cultivés *in vitro* (CLELAND, 1968 a et b). D'autre part, dans certains modèles de paroi, tel celui proposé par ALBERSHEIM (1974), les liaisons entre les chaînes de xyloglucanes qui relient les fibrilles de cellulose sont assurées par des composés pectiques (méthyl-galacturonates) et non par des protéines. Une hypothétique transglucosidase contrôlerait alors l'élasticité de la paroi pecto-cellulosique et, dans une certaine mesure, l'élongation cellulaire.

-SH et division cellulaire

Dans les suspensions cellulaires de Silène cultivées en milieu liquide non renouvelé, les périodes pendant lesquelles les cellules se divisent et celles où elles augmentent de taille sont bien distinctes.

Dans les conditions standard de culture, l'activité mitotique est maximum entre le 3ème et le 5ème jour du cycle de croissance, tandis que la taille des cellules décroît du 1er au 6ème jour. A partir du 7ème jour, le volume des cellules augmente régulièrement jusqu'à la fin de la culture. Pendant cette période, l'index mitotique est d'abord très faible (du 7ème au 12ème jour), puis pratiquement nul. La teneur en -SH solubles passe par un maximum vers le 3ème jour et décroît jusqu'à la fin de la culture ; il en est de même du rapport -SH/S-S.

Dans des cultures partiellement synchrones, la teneur et le pourcentage de fonctions thiols augmentent avant chaque vague de divisions pendant les premiers jours ; ensuite les -SH solubles et l'index mitotique diminuent parallèlement.

Les deux types de cultures de Silène (asynchrones et partiellement synchrones) montrent une relation stricte entre la teneur en composés sulfhydrilés solubles et la division cellulaire. Il n'y a pas de rapport entre cette teneur et le grandissement des cellules. Dans les anthères de Lilium et du Trillium, le taux des composés sulfhydrilés acido-solubles (essentiellement du glutathion) s'élève pendant la première cinèse méiotique, puis diminue et ne varie plus au cours de la seconde (STERN, 1958 et 1959). Chez le Lilium, la mitose pollinique est précédée d'une nouvelle augmentation du taux des -SH, que l'on ne retrouve pas chez le Trillium (STERN, 1959). D'après STERN, les thiols solubles doivent atteindre un seuil critique pour que la division cellulaire puisse s'engager ; ce qui n'implique pas forcément une augmentation de leur teneur avant chaque mitose (notons que chez le Trillium les -SH sont 4 fois plus concentrés que chez le Lilium). Dans les cellules de Silène en intercinèse, la concentration des thiols solubles serait donc inférieure au seuil critique.

Les taux de synchronisation des cultures de Silène que nous avons obtenus jusqu'à présent (4-6 %) sont insuffisants pour suivre les variations des thiols au cours du déroulement de la mitose, comme RAPKINE (1931) et MAZIA et ses collaborateurs (MAZIA, 1954 et 1959) l'ont fait pour

les oeufs d'Oursin, dont on provoque aisément la division synchrone par fertilisation in vitro. Toutefois, on remarque que la teneur en -SH augmente dans les cellules de *Silène* avant qu'elles entrent en mitose, alors que dans l'oeuf d'Oursin elle décroît pendant la phase I et s'élève au cours de la phase II, jusqu'au moment où les oeufs se clivent. Les deux phénomènes ne sont donc pas comparables. Nous pensons que chez le *Silène*, l'augmentation de la teneur en -SH est nécessaire à l'induction de la division cellulaire, tandis que chez l'Oursin, elle correspond essentiellement à la mise en place des microtubules qui constituent l'appareil mitotique.

Compte tenu des variations des -SH solubles et protéiques et des propriétés de l'appareil mitotique que MAZIA et ses collaborateurs ont pu isoler à partir des oeufs d'Oursin (en particulier des conditions de sa solubilisation), MAZIA proposa deux schémas qui font intervenir les composés sulfhydrylés pour expliquer les mécanismes de la polymérisation des microtubules.

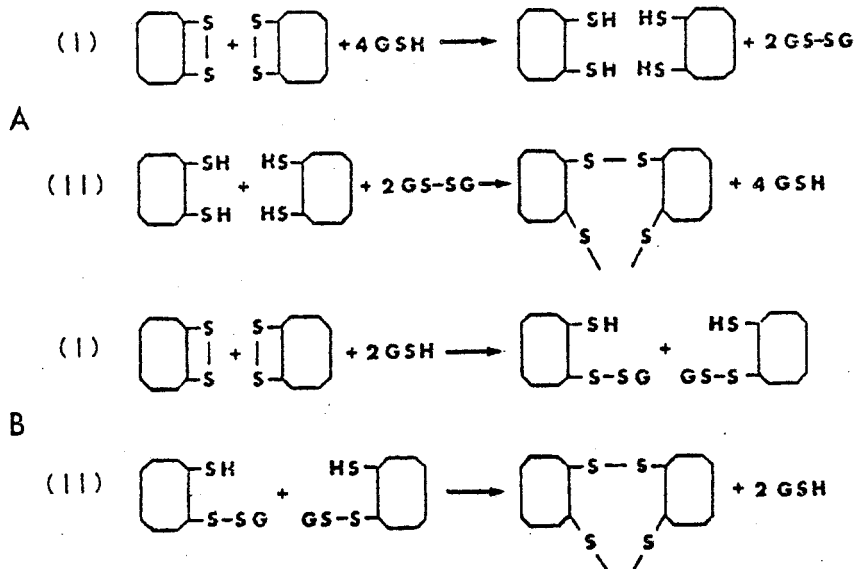


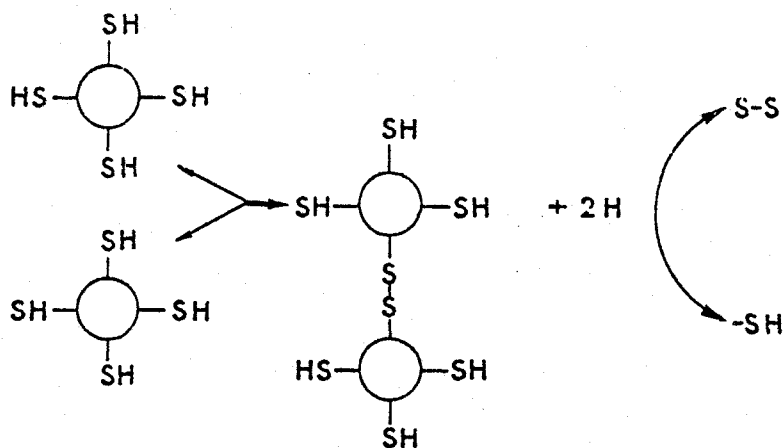
Figure 60 : Schéma des mécanismes possibles de polymérisation des microtubules de l'appareil mitotique.

(I) : Première phase,

(II) : Deuxième phase. (Adapté de MAZIA, 1954)

Selon la première hypothèse (Fig. 60 , A) le transfert des ponts disulfures intramoléculaires serait couplé avec une transformation réversible du glutathion réduit ou oxydé. Or, si les -SH solubles dimi-

nuent bien au cours de la phase I, on n'a pas encore mis en évidence de variations importantes des groupements S-S solubles. D'après la seconde hypothèse (Fig. 60, B), l'oxydation du G-SH serait assurée par sa "capture" par une protéine pendant la phase I. En poursuivant l'analyse biochimique de l'appareil mitotique des oeufs d'Oursin, SAKAI (1966) trouve trois composants protéiques (3,5 S, 12 S, 22 S). Les deux premiers, qui constituent environ 60 % de l'appareil mitotique, peuvent encore être fractionnés par le sulfite de sodium ou le dithiothréitol en particules 2,5 S ; ces dernières sont capables de se réagréger, quand on les introduit dans un milieu oxydant. Ceci signifierait que l'unité 3,5 S qui correspond au monomère de la tubuline (PM : 68000, 6 groupements -SH libres) peut être scindée en deux sous-unités plus petites (PM : 35000, 4 groupements -SH libres) et certainement identiques. Le processus d'auto-assemblage suppose que la tubuline-monomère se trouve sous une conformation spéciale : la "fit-Form", la "non fit-Form" étant incapable de s'intégrer dans l'édifice du microtubule.



non Fit-tubuline 2,5S \rightleftharpoons Fit-tubuline 3,5S \rightleftharpoons microtubule

Figure 61 : Schéma d'un mécanisme possible d'auto-assemblage des protéines constitutives de la tubuline (Adapté de SITTE, 1970).

D'après SITTE (1970), il se pourrait que la "non fit-Form" corresponde au monomère 2,5 S et la "fit-Form" au dimère 3,5 S. La transformation du monomère en dimère fait apparaître deux protons. Elle pourrait être couplée avec des réactions d'oxydoréduction et expliquer que la teneur en thiols solubles augmente au cours de la phase II de la di-

vision de l'oeuf d'Oursin. (Fig. 61).

Dans l'état actuel de nos connaissances, on peut penser que dans les cellules de *Silène* cultivées en milieu liquide, les -SH jouent un rôle déterminant dans l'induction de la mitose, notamment en raison de la faible concentration des groupements thiols pendant la période où les cellules ne se divisent pas (environ 5 à 10 fois moins que dans les cellules des colonies tissulaires de Carotte). Les variations des -SH en relation avec la formation des microtubules fusoriaux sont sans doute trop faibles pour pouvoir être décelées. Ceci n'est pas surprenant, compte tenu de l'absence d'asters et du faible développement du fuseau, comparé à celui que l'on rencontre dans les oeufs d'Oursin ou dans d'autres cellules animales (embryons de Poissons, par ex.).

-SH ET QUELQUES ASPECTS PARTICULIERS DU METABOLISME

La difficulté d'analyser le rôle que jouent les groupements -SH dans un mécanisme physiologique particulier (division cellulaire, élongation, activité auxine-oxydasique, etc..) provient du fait qu'ils participent en même temps au métabolisme général de la cellule, par l'intermédiaire des enzymes -SH- dépendantes. Les ponts disulfures jouent également un rôle très important en maintenant intactes les structures des protéines hyaloplasmiques et membranaires. Les observations qui ont été faites chez les plantes entières (BRUNEL-CAPELLE, 1955) et les résultats, parfois contradictoires, que nous avons obtenus en ce qui concerne les effets de la lumière sur les variations des composés sulfhydrilés acido-solubles dans des tissus isolés de Carotte illustrent ces difficultés.

En premier lieu, il convient de rappeler que lors de certaines expériences, les variations de la teneur en -SH (et celles du rapport -SH/S-S) de colonies tissulaires de Carotte soumises à des éclaircements différents peuvent résulter de modifications de la prolifération des tissus, qui est soit stimulée, soit ralentie selon les conditions expérimentales. Lorsque les taux de croissance sont différents, il est toujours difficile de savoir si les -SH sont la cause ou la conséquence de cet état de fait.

Quand la croissance des tissus de Carotte, n'est pas modifiée, nous observons généralement que les variations des teneurs en -SH et en chlorophylles sont parallèles. Une telle relation existe aussi dans les feuilles de Haricot et dans des chloroplastes isolés. Dans les premières, RUBIN et KARTASHOVA (1968) constatent une diminution des -SH (en valeur absolue et relative) et des chlorophylles, à la suite d'une perturbation de la chaîne respiratoire. Chez les secondes, une illumination provoque une augmentation de la teneur en fonctions thiols qui ne se produit pas en présence d'inhibiteurs de la réaction de HILL (HIROSE et Coll., 1971).

Les chloroplastes ne fonctionnent normalement qu'en présence de groupements -SH. Du glutathion et une activité glutathion-réductase ont été récemment signalés dans des chloroplastes entiers d'Épinard, de Tabac et d'une Algue (Codium fragile) par FOYER et HALLIWELL (1976), ainsi que dans des aiguilles du Picea abies ; dans ces dernières, ils augmentent tous deux en hiver (ESTERBAUER et GRILL, 1978). Le glutathion, principal composé sulfhydrilé présent dans ce type de plastes joue au moins deux rôles :

- par l'intermédiaire de l'équilibre AA/DHA qu'il contrôle, il permettrait la réduction de l'O₂ et du H₂O₂ (FOYER et HALLIWELL, 1976) ;
- il serait nécessaire pour activer certaines enzymes du cycle de CALVIN (BRADBEER, 1969 ; BUCHANAN et Coll., 1971) et pour la photophosphorylation qui se trouve bloquée par les inhibiteurs classiques des -SH (ARNON et Coll., 1956).

A la lumière, le NADPH nécessaire au fonctionnement de la glutathion réductase est formé par la chaîne d'électrons de la photosynthèse. A l'obscurité, cette enzyme fonctionne également, le NADPH provenant alors de l'activité de la glucose-6-déshydrogénase (SCHNARRENBERGER et Coll., 1973), qui est plus élevée dans ces conditions qu'à la lumière (ANDERSON, 1975, cité par FOYER et HALLIWELL, 1976). Après avoir étudié les variations des -SH libres et de l'ATP dans des mitochondries isolées de cœur et de foie, PIALOUX, GODINOT et GAUTHERON (1968) pensent que les -SH interviennent aussi dans le mécanisme de couplage des phosphorylations oxydatives.

En modifiant l'activité de certaines oxydases, la lumière peut encore agir sur les composés sulfhydrilés par des voies tout à fait différentes. Elle diminue notamment l'activité catalasique (BJORN, 1967) qui est susceptible de favoriser l'oxydation de la cystéine et du glutathion (BOERI et BONNISCHEN, 1952). D'autre part, en favorisant l'accumulation de composés phénoliques tels que l'acide chlorogénique (ZUCKER, 1963 ; ZUCKER et Coll., 1965 ; LEGRAND, 1977), ou de complexes dans lesquels les phénols sont associés à des protéines (PHIPPS, 1966), la lumière réduit généralement l'activité peroxydasique (LEGRAND, 1977) et auxine-oxydasique (PILET et PHIPPS, 1968) dans des organes isolés et des plantes entières. Par contre, dans des tissus de la souche chlorophyllienne de Carotte maintenus à l'obscurité ou cultivés à la lumière, l'activité auxine-oxydasique est comparable. Ces différences selon la nature des tissus analysés et le fait que le NADPH nécessaire à l'activité de la glutathion-réductase soit susceptible de se former aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité pourraient rendre compte de certains faits contradictoires, relevés par BRUNEL-CAPELLE (1955) dans des feuilles papachées de plantes entières, et par nous-même dans des cultures in vitro de Carotte.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERSHEIM P., 1974.- Structure and growth of walls of cells in culture, p. 379-404. In : *Tissue culture and plant science*. STREET H.E., éd. Academic Press, London, New York.
- ALLEN R.J.L., 1940.- The estimation of phosphorus. *Biochem. J.* 34 : 858-865.
- AMES I.H. et H.H. SMITH, 1969.- Effects of mercaptoethanol on tumor induction in a Nicotiana amphiploid. *Canad. J. Bot.*, 47 : 921-924
- ANDERSON L.E., 1975.- Light modulation of the activity of carbon metabolism enzymes, p. 1393-1405. In : *Proceedings of the third int. Congr. on photosynthesis*. AVRON M., éd. Amsterdam (cité par FOYER C.H. et B. HALLIWELL, 1976).
- ARANCIA G., M. BANDIERA et G. MORPURGO, 1967.- Formazione di chloroplasti in culture di tessuti di Daucus carota in diverse condizioni ormonali. *Ann. Ist. super. Sanità*, 3 : 175-178.
- ARNON D.I., M.B. ALLEN et F.R. WHATLEY, 1956.- Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. *Biochem. Biophys. Acta*, 20 : 449-461 (cité par HIROSE et coll., 1971)
- ASLAM M., R.C. HUFFAKER et R.L. TRAVIS, 1973.- The interaction of respiration and photosynthesis in induction of nitrate reductase activity. *Plant. Physiol.*, 52 : 137-141.
- ASLAM M. et A.OAKS, 1975.- Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in Corn roots. *Plant. Physiol.*, 56 : 634-639.
- ASLAM M., A.OAKS et R.C. HUFFAKER, 1976.- Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated Barley leaves. *Plant. Physiol.*, 58 : 588-591.
- AUVITY M., 1973. Protéines à -SH et ramification dans le mycélium jeune de Podospora anserina. *Phyton*, 31 : 117-121.
- BAILEY J.L. et R.D. COLE, 1959.- Studies on the reaction of sulfite with proteins. *J. Biol. Chem.*, 234 : 1733-1739.
- BANDIERA M. et G. MORPURGO, 1970.- Kinetin/auxin ratio and development of chloroplasts in tissue cultures of Daucus carota. *Experientia*, 26 : 558-559.
- BANDURSKI R.S., 1949.- Synthesis of carotenoid pigments in detached Bean leaves. *Bot. Gaz.*, 111 : 95-109.
- BARG R. et N. UMIEL, 1977.- Effects of sugar concentration on growth, greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of Tobacco. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81 : 161-166.

- BARRON E.S.G., 1951.- Thiol groups of biological importance. *Advances in Enzymology*, 11 : 201-266.
- BATCHO M., 1976.- Etude de l'Ustilago violacea (Pers.) Rouss. Son action sur Silene alba (Miller) E.H.L. Krause et Silene dioica (L) Clair. *Thèse de Spécialité*, Lille I, 81 p.
- BATCHO M. et J. DUBOIS, 1975.- Développement de l'Ustilago violacea (Pers.) Rouss. dans des fragments de tige de Silene alba (Miller) E.H.L. Krause cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 281 : 399-402.
- BATCHO M. et C. ZAMBETTAKIS, 1975.- Obtention in vitro de fleurs du Silene dioica (L.) Clair. parasitées par l'Ustilago violacea (Pers.) Rouss. *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 91 : 225-229.
- BAYLEY J.M., J. KING et O.L. GAMBORG, 1972.- The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in Soybean and Wheat cells in suspension cultures. *Planta*, 105 : 15-24.
- BAYLISS M.W., 1977.- The effect of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of Daucus carota. *Plant Sc. Letters*, 8 : 99-103.
- BAYLISS M.W. et A.R. GOULD, 1974.- Studies on the growth in culture of plant cells. XVIII. Nuclear cytology of Acer pseudoplatanus suspension cultures. *J. exp. Bot.*, 25 : 772-783.
- BEAUCHESNE G. et C. POULAIN, 1966.- Influence des éclaircissements approximativement monochromatiques sur le développement des tissus de moelle de Tabac cultivés in vitro en présence d'auxine et de kinétine. *Phytochem. Phytobiol.*, 5 : 157-167.
- BEEVERS L., L.E. SCHRADER, D. FLESHER et R.H. HAGEMAN, 1965.- The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in Radish cotyledons and Maize seedlings. *Plant Physiol.*, 40 : 691-698.
- BEHREND J. et R.I. METELES, 1976.- Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on ammonia. *Plant Physiol.*, 58 : 510-512.
- BENESCH R. et R.E. BENESCH, 1948.- Amperometric titration of sulfhydryl groups in amino acids and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 19 : 35-45.
- BENESCH R. et R.E. BENESCH, 1952.- Reactions of thiols with organic mercury compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 38 : 425-441.
- BENESCH R.E., H.A. LARDY et R. BENESCH, 1955.- The sulfhydryl groups of crystalline proteins. I. Some albumins, enzymes and hemoglobins. *J. biol. Chem.*, 216 : 663-676.
- BENNICI A., M. BUIATTI et F. D'AMATO, 1968.- Nuclear conditions in haploid Pelargonium in vivo and in vitro. *Chromosoma*, 24 : 194-201.
- BERTOSSI F., 1953.- Su di una "modificazione somatica" permanente provocata da diidrostreptomycina in un ceppo di tessuto di Helianthus tuberosus. *Att. Ist. Bot. Lab. Critt.*, Pavia, 10 : 225-229.

- BJORN L.O., 1965.- Chlorophyll formation in excised Wheat roots. *Physiol. Plant.*, 18 : 1130-1142.
- BJORN L.O., 1967.- Some effects of light on excised Wheat roots with special reference to peroxide metabolism. *Physiol. Plant.*, 20, 149-170.
- BJORN L.O. et I. ODHELIUS, 1966.- Chlorophyll formation in excised roots of Cucumber and Pea. *Physiol. Plant.*, 19 : 60-62.
- BLIGNY R., 1977.- Growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* L. cells in automatic culture units of large volume. *Plant Physiol.*, 59 : 502-505.
- BOERI E. et R.K. BONNICHSEN, 1952.- Oxidation of thiol groups by catalase. *Acta chem. Scand.*, 6 : 968-969.
- BONNER J., 1949.- Limiting factors and growth inhibitors in the growth of the *Avena* coleoptile. *Amer. J. Bot.*, 36 : 323-332.
- BOUNIAS M. et H. PACHECO, 1972.- Rôle de la L. leucine sur l'activité phosphatasique alcaline, chez l'Orge. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 275 : 201-204.
- BOURIQUET R., 1960.- Recherches sur l'activité de quelques facteurs de croissance à l'égard des tissus végétaux cultivés in vitro. *Revue Cytol. Biol. vég.*, 21 : 93-326.
- BRADBEER J.W., 1969.- The activities of the photosynthetic carbon cycle enzymes of greening Bean. *New Phytol.*, 68 : 233-245.
- BRASSART C., 1976.- Culture de cellules végétales en fermenteurs. Essais avec les cellules du *Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause. DEA de Biochimie, Lille, 62 p.
- BRASSART C., J. DUBOIS et R. BOURIQUET, 1977.- Nutrition carbonée d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 285 : 759-762.
- BRASSART C., P. EB, B. PLICHON et J. DUBOIS, 1976.- Utilisation d'antibiotiques en vue de la réalisation de cultures cellulaires de Silène en fermenteur. Actes du 101e Congrès nat. Soc. sav. Lille, Sciences, I : 455-563.
- BRONCHART R., 1967.- Effets de la durée des jours sur la structure de chloroplastes d'Epinard, p. 325-327. In : *Le Chloroplaste*. SIRONVAL C., éd. Masson et Cie, Paris.
- BRUINSMA J., 1963.- The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochem., Photobiol.*, 2, 241-249.
- BRUNEL-CAPELLE G., 1955.- Décarboxylation biologique de l'acide mésoxalique et contribution à l'étude du métabolisme des composés thiols chez les Végétaux. Thèse Doct. Etat, Paris, 148 p.
- BUCHANAN B.B., P. SCHURMANN et P.P. KALBERER, 1971.- Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of Spinach chloroplasts. *J. biol. Chem.*, 246 : 5952-5959.

- BUCKLAND E. et P.M. TOWNSLEY, 1975.- Coffee cell suspension cultures caffeine and chlorogenic acid content. *Canad. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 8 : 164-165.
- BUNNING E. et H. WELTE, 1954.- Photoperiodische reaktionen an pflanzlichen gewebekulturen. *Physiol. Plant.*, 7 : 197-203.
- BURTON K., 1956.- A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62 : 315-323.
- BUTCHER D.N., 1977.- Secondary products in tissue cultures, p. 668-693 et p. 703-716 (Bibliographie). In : *Plant cell, tissue, and organ culture*. REINERT J. et Y.P.S. BAJAJ, éd., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BUTENKO R.G. et Y.A. BASKANOV, 1961.- On the mechanism of the effect of maleic hydrazide on plants (en russe). *Fiziol. Rast. SSSR*, 7 : 385-394.
- BYCHKOVA G.S. et R.G. BUTENKO, 1974.- Action de l'auxine et de la kinétine sur le cycle mitotique de la population cellulaire partiellement synchronisée de Panax ginseng (en russe). *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 217 : 489-494.
- CACHITA-COSMA D., M. JACOBS, I. NEGRUTIU et Th. GASPAR, 1976.- Comparative effects of procaine and 2,4-D on growth and peroxydases of Arabidopsis callus. *Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent*, 41 : 1521-1526.
- CAPPELLETTI C., 1942.- Colture di tessuti vegetali. II. Ricerche sul contenuto idrico delle colture di Daucus carota. *Att. Ac. Sc. (Torino)*, 77 : 293-321.
- CAPPELLETTI C., 1947.- Colture di tessuti vegetali. VI. Ricerche nelle variazioni del contenuto d'acqua nelle colture di Daucus carota. *Att. Ac. Sc. (Torino)*, 82 : 134-143.
- CARCELLER M., M.R. DAVEY, M.W. FOWLER et H.E. STREET, 1971.- The influence of sucrose, 2,4-D and kinetin on the growth, fine structure and lignin content of cultured Sycamore cells. *Protoplasma*, 73 : 367-385.
- CARTER J.R., 1959.- Amperometric titration of disulfide and sulphhydryl in proteins in 8 M urea. *J. Biol. Chem.*, 234 : 1705-1710.
- CECIL R. et R.G. WAKE, 1962.- The reactions of inter- and intra- chain disulphide bonds in proteins with sulphite. *Biochem. J.*, 82 : 401-406.
- CELLA R., F. SALA et H.E. STREET, 1976.- Studies on the growth in culture of plant cells. XIX. Changes in the levels of free and membrane-bound polysomes during the growth of Acer pseudoplatanus cells in batch culture. *J. exp. Bot.*, 97 : 263-276.

- CHAMPAULT A., 1969.- Cultures in vitro d'unités cellulaires de parenchyme cortical de Mercurialis annua L. (2 n = 16). *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 269 : 1846-1848.
- CHAMPIGNY M.L., 1960.- L'influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les feuilles de Bryophyllum Daigremontianum. *Thèse, Doct. Etat, Paris*.
- CHENIEUX J.C., M. RIDEAU et M. GERARD, 1977.- Initiation et croissance de cultures de tissus et de suspensions cellulaires de Choisya ternata (Rutacées). *Bull. Soc. bot. Fr.*, 124 : 265-280.
- CHONAN N., H. KAWAHARA et T. MATSUDA, 1977.- Effect of nitrogen application on ultrastructure of the chloroplasts in Rice plants. *Japanese J. Crop. Science*, 46 : 387-392.
- CHU Y., et K.G. LARK, 1976.- Cell-cycle parameters of Soybean (Glycine max L.) cells growing in suspension culture : suitability of the system for genetic studies. *Planta*, 132 : 259-268.
- CLELAND R., 1968a.- Distribution and metabolism of protein-bound hydroxyproline in an elongating tissue, the Avena coleoptile. *Plant. Physiol.* 43 : 865-870.
- CLELAND R., 1968b.- Hydroxyproline formation and its relation to auxine-induced cell elongation in the Avena coleoptile. *Plant. Physiol.*, 43 : 1625-1630.
- COHEN A.C., 1968.- Recherches sur le rôle du potassium dans la physiologie des tissus végétaux isolés. *Thèse Doct. Etat, Paris*, 146 p.
- COLLET G., 1962.- Action de l'acide gibbérellique sur la croissance et le catabolisme auxinique du Phaseolus vulgaris L. *Thèse Doct.*, Lausanne, 132 p.
- COLLET G., J. DUBOUCHET et P.E. PILET, 1964.- Etude par chromatographie sur couche mince de quelques composés indoliques. Méthode et premiers résultats. *Physiol. vég.*, 2 : 157-194.
- COMMONER B. et K.V. THIMANN, 1941.- On the relation between growth and respiration in the Avena coleoptile. *J. gén. Physiol.*, 24 : 278-296.
- CONSTABEL F., W.G.W. KURZ, K.B. CHATSON et O.L. GAMBORG, 1974.- Induction of partial synchrony in Soybean cell cultures. *Exp. Cell Res.*, 85 : 105-110.
- CONSTABEL F., W.G.W. KURZ, K.B. CHATSON et J.W. KIRKPATRICK, 1977.- Partial synchrony in Soybean cell suspension cultures induced by ethylene. *Exp. Cell Res.*, 105 : 263-268.
- CONSTABEL F., J. SHYLUK et O.L. GAMBORG, 1971.- The effect of hormones on anthocyanin accumulation in cell cultures of Haplopappus gracilis. *Planta*, 96 : 306-316.

- COPPING L.G. et H.E. STREET, 1972.- Properties of the invertases of cultured Sycamore cells and changes in their activity during culture growth. *Physiol. Plant.*, 26 : 346-354.
- COUPLAND D. et A.J. PEEL, 1972.- Maleic hydrazide as an antimetabolite of uracil. *Planta*, 103 : 249-253.
- DALTON C.C. et H.E. STREET, 1976.- The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of Spinach (Spinacia oleracea L.). *In vitro*, 12 : 485-494.
- DAS N.K., K PATAU et F. SKOOG, 1956.- Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indoleacetic acid in excised Tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, 9, 640-651.
- DAVEY M.R., 1970.- Growth and fine structure of cultured plant cells. *Ph. D. Thesis*, Univ. Leicester, England.
- DAVEY M.R., M.W. FOWLER et H.E. STREET, 1971.- Cell clones contrasted in growth, morphology and pigmentation isolated from a callus culture of Atropa belladonna var. lutea. *Phytochem.*, 10 : 2559-2575.
- DAVEY M.R. et H.E. STREET, 1971.- Studies on the growth in culture of plant cells. IX. Additional features of the fine structure of Acer pseudo-platanus L. cells cultured in suspension. *J. exp. Bot.*, 22 : 90-95.
- DAVIES M.E., 1972.- Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Planta*, 104 : 50-65.
- DE CAPITE L., 1955.- Action of light and temperature on growth of plant tissue cultures in vitro. *Amer. J. Bot.*, 42 : 869-873.
- DE JONG D.W., A.C. OLSON, K.M. HAWKER et E.F. JANSEN, 1968.- Effect of cultivation temperature on peroxidase isozymes of plant cells grown in suspension. *Plant Physiol.*, 43 : 841-844.
- DE ROPP R.S., 1950.- The comparative growth promoting action of indole-3-acetic acid and Agrobacterium tumefaciens. *Amer. J. Bot.*, 37 : 352-363.
- DOHAN J.S. et G.E. WOODWARD, 1939.- Electrolytic reduction and determination of oxidized glutathione. *J. biol. Chem.*, 129 : 393-403.
- DOREE M., J.J. LEGUAY et C. TERRINE, 1972.- Flux de CO₂ et modulations de perméabilité cellulaire chez les cellules d'Acer pseudoplatanus L. *Physiol. vég.*, 10 : 115-131.
- DUBOIS J., 1971.- Effets de trois régulateurs de croissance (AIA, ANA, 2,4-D) sur les composés sulfhydrylés acidosolubles de tissus isolés de Carotte. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 272 : 2451-2454.
- DUBOIS J., 1973.- Action de la lumière sur la croissance et la teneur en pigments plastidaux des tissus isolés de Carotte. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 120 : 3-26.

- DUBOIS J., 1975.- Analyse quantitative de la croissance d'une culture de cellules du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 122 : 269-280.
- DUBOIS J. et R. BOURIQUET, 1974.- Culture in vitro de tissus et de suspensions cellulaires du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 26-27 : 70-88.
- DUBOIS J. et D. DUJARDIN, 1968.- Croissance, respiration et thiols solubles de deux souches de tissus de Carotte. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 267 : 1596-1599.
- DUBOIS J. et H. MORVAN, 1978.- Effets de la température et de la lumière sur la croissance des suspensions cellulaires de Silène et d'Erable. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 125 : 407-420.
- DUBOIS J., S. RAMBOUR et J. VASSEUR, 1976.- Croissance d'une suspension cellulaire de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause) et évolution des acides nucléiques. *Actes du 101e Congrès nat. Soc. sav., Lille, Sciences, I* : 441-454.
- DUHAMET L., 1953.- Recherches préliminaires sur les variations du pouvoir de prolifération de cultures de tissus végétaux en fonction du poids de l'explantat ensemencé. *C. R. Soc. Biol.*, 147 : 81-83.
- DUHAMET L., 1955.- Variations des besoins nutritifs des tissus végétaux en fonction de la taille des explantats. *Ann. Biol.*, 31 : 123-143.
- DURZAN D.J. et V. CHALUPA, 1976.- Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (Pinus banksiana) 3. Growth of cells in liquid suspension cultures. *Canad. J. Bot.*, 54 : 456-467.
- EDELMAN J. et A.D. HANSON, 1971a.- Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in Carrot callus cultures. *Planta*, 98 : 150-156.
- EDELMAN J. et A.D. HANSON, 1971b.- Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in Carrot tissue cultures : the role of invertase. *Planta*, 101 : 122-132.
- EDMUNDS L.N. Jr., 1966.- Studies on synchronously dividing cultures of Euglena gracilis Klebs (strain Z). III. Circadian components of cell division. *J. Cellular Physiol.*, 67 : 35-44.
- EICHENBERGER M.E., 1951.- Sur une mutation survenue dans une culture de tissu de Carotte. *C. R. Soc. Biol.*, 145 : 239-240.
- ENGVILD K.C., 1972.- Callus and cell suspension cultures of Carnation. *Physiol. Plant.*, 26 : 62-66.
- ENGVILD K.C., 1974.- Growth and plating of cell suspension cultures of Datura innoxia. *Physiol. Plant.*, 32 : 390-393.
- ERIKSSON T., 1965.- Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of Haplopappus gracilis. *Physiol. Plant.*, 18 : 976-993.

- ERIKSSON T., 1966.- Partial synchronization of cell division in suspension cultures of Haplopappus gracilis. *Physiol. Plant.*, 19 : 900-910.
- ERIKSSON T., 1967.- Duration of mitotic cycle in cell cultures of Haplopappus gracilis. *Physiol. Plant.*, 20 : 348-354.
- ESNAULT R., G. TRAPY et R.B. VAN HUYSTEE, 1975.- Polyadenylated RNA from Vicia faba meristematic root cells. *Eur. J. Biochem.*, 60 : 83-89.
- ESTERBAUER H. et D. GRILL, 1978.- Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of Picea abies. *Plant Physiol.*, 61 : 119-121.
- FAIVRE-BARON M., 1978.- Cytomorphogenèse et corrélations de croissance chez le jeune gamétophyte d'une Fougère. *Thèse Doct. Etat, Paris VI*.
- FEVRE M., G. TURIAN et J.P. LARPENT, 1975.- Bourgeoisements et croissance hyphale fongiques. Homologies structurales et fonctionnelles : modèles Neurospora et Saprolegnia. *Physiol. vég.*, 13 : 23-28.
- FILNER P., 1966.- Regulation of nitrate reductase in cultured Tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 118 : 299-310.
- FLETCHER R.A. et D. MacCULLAGH, 1971.- Cytokinin-induced chlorophyll formation in Cucumber cotyledons. *Planta*, 101 : 88-90.
- FOSKET D.E. et K.C. SHORT, 1973.- The role of cytokinin in the regulation of growth, DNA synthesis and cell proliferation in cultured Soybean tissues (Glycine max var. Biloxy). *Physiol. Plant.*, 28 : 14-23.
- FOWKE L.C., C.W. BECH-HANSEN, F. CONSTABEL et O.L. GAMBORG, 1974.- A comparative study on the ultrastructure of cultured cells and protoplasts of Soybean during cell division. *Protoplasma*, 81 : 189-203.
- FOX E., 1963.- Growth factor requirements and chromosome number in Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 16 : 793-803.
- FOYER C.H. et B. HALLIWELL, 1976.- The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts : a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133 : 21-25.
- FRAGATA M., 1967.- Culture in vitro des racines de Daucus carota L. : étude de quelques problèmes métaboliques. *Thèse Doct.*, Lausanne, 117 p.
- FREY-WYSSLING A. et E. KREUTZER, 1958.- The submicroscopic development of chromoplasts in the fruit of Capsicum annuum L. *J. Ultrastruct. Res.*, 1 : 397-411.
- FUJITSU T., T. HASHIMOTO et T. HAYASHI, 1972.- Synchronous division in suspension culture of Tobacco cells after heat treatment. *Sci. Pap. Coll. gén. Educ., Univ. Tokyo*, 22 : 49-53.

- FUKUNAGA Y., J. KING et J.J. CHILD, 1978.- The differential effects of TCA - cycle acids on the growth of plant cells cultured in liquid media containing various nitrogen sources. *Planta*, 139 : 199-202.
- FURUYA T., K. KAWAGUCHI et M. HIROTANI, 1973.- Biotransformations of progesterone by suspension cultures of Digitalis purpurea cultured cells. *Phytochem.*, 12 : 1621-1626.
- GALSTON A.W., 1956.- Some metabolic consequences of the administration of indoleacetic acid to plant cells, p. 219-233. In : *The chemistry and mode of action of plant growth substances*. WAIN R.L. et F. WIGHTMAN éd., Butterworth, London.
- GALSTON A.W. et L.Y. DALBERG, 1954.- The adaptative formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. *Amer. J. Bot.*, 41, 373-380.
- GAMBORG O.L., 1970.- The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.*, 45 : 372-375.
- GAMBORG O.L., R.A. MILLER et K. OJIMA, 1968.- Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50 : 151-158.
- GAMBORG O.L. et J.P. SHYLUK, 1970.- The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiol.*, 45 : 598-600.
- GAMBURG K.Z., 1978.- The influence of 1-naphthaleneacetic acid and (2-chloroethyl)-trimethylammonium chloride on the carotenoid content of Tobacco tissue in suspension culture. *Biologia Plant.*, 20 : 93-97.
- GASPAR Th., 1965.- Les auxines-oxydases : chimie et physiologie. *Année biologique*, 4 : 437-470.
- GASPAR Th., A. KHAN et D. FRIES, 1973.- Hormonal control of isoperoxidases in Lentil embryonic axis. *Plant Physiol.*, 51 : 146-149.
- GASPAR Th. et A. XHAUFFLAIRE, 1967.- Exocellular enzymes in Lens root and auxin catabolism. *Arch. intern. Physiol. Biochim.*, 75 : 189-196.
- GATHERCOLE R.W.E., K.J. MANSFIELD et H.E. STREET, 1976.- Carbon dioxide as an essential requirement for cultured Sycamore cells. *Physiol. Plant.*, 37 : 213-217.
- GAUTHERET R.J., 1937.- Nouvelles recherches sur la culture du tissu cambial. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 205 : 572-573.
- GAUTHERET R.J., 1939.- Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de Carotte. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 208 : 118-121.
- GAUTHERET R.J., 1940.- Recherches expérimentales sur la polarité des tissus du tubercule de Carotte. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 211 : 15-18.

- GAUTHERET R.J., 1944.- Recherches sur la polarité des tissus végétaux. *Revue Cytol. Cytophysiol. vég.*, 7 : 45-185.
- GAUTHERET R.J., 1950.- Action du contact d'un milieu aqueux sur la morphogénèse des cultures de tissu cambial de Salix caprea. *C. R. Soc. Biol.*, 144 : 626-629.
- GAUTHERET R.J., 1952.- Recherches sur l'action de l'hydrazide maléique sur le développement des cultures de tissus de Carotte et d'Endive. *C. R. Soc. Biol.*, 146 : 859-861.
- GAUTHERET R.J., 1959.- La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. *Masson et Cie*, Paris.
- GAUTHERET R.J., 1964.- La culture des tissus végétaux : son histoire, ses tendances. *Rev. Cytol. Biol. vég.*, 27 : 99-220.
- GOAS M., 1954.- Sur les propriétés décarboxylantes des Liliacées. Organes végétatifs. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 239 : 989-991
- GOAS M., 1955.- Sur les propriétés décarboxylantes des organes en croissance. Racines. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 240 : 1663-1665.
- GOAS M., 1956.- Sur les propriétés décarboxylantes des organes en croissance. Coléoptiles. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 242 : 543-545
- GOAS M., 1959.- Contribution à la physiologie des composés thiols chez les Végétaux. Etude comparée de leur métabolisme chez les Liliacées. Leur localisation et leur importance dans les organes en croissance. *Thèse Doct. Etat*, Toulouse, 199 p.
- GOAS M., 1964.- Répartition le long du coléoptile d'Avoine, des composés thiols responsables de la décarboxylation de l'acide mésoxalique. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 258 : 6507-6509.
- GODON B., 1969.- Etude physicochimique des associations protéiques du gluten du Blé. *Thèse Doct. Etat*, Paris, 133 p.
- GOLA G., 1902.- La zofa ei suoi composti nell'economia delle piante. Ricerche di fisiologia vegetale. I. I composti solforati dei tessuti meristematici. *Malpighia*, 16 : 368 (cité par PILET P.E., 1957).
- GORDON S.H. et L.G. PALEG, 1961.- Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenols. *Plant. Physiol.*, 36 : 838-845.
- GORIS A., 1947.- Hydratation de fragments de tubercules de Carotte et de Topinambour cultivés in vitro sur milieux dépourvus de sucres : influence de l'acide indole-3 acétique. *C. R. Soc. Biol.*, 141 : 1205-1207.
- GORIS A., 1954.- Transformations glucidiques intratissulaires. *Année biologique.*, 30 : 297-318.
- GORIS A. et R. BOURIQUET, 1953.- Action de l'hydrazide maléique sur les tissus de Carotte cultivés in vitro. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 35 : 1401-1408.

- GRANT M.E. et K.W. FULLER, 1968.- Tissue culture of roots cells of Vicia Faba. *J. exp. Bot.*, 61 : 667-680.
- GRIGNON C., 1969.- Etude de l'incorporation du ^{42}K par des suspensions cellulaires d'Erable. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, 15 : 193-211.
- GUERN J. et J.J. LEGUAY, 1977.- Etude critique des possibilités de modulation de la vitesse de division des cellules de Végétaux supérieurs cultivés in vitro, p. 80. In : *La culture des tissus et des cellules des Végétaux. Résultats généraux et réalisations*. GAUTHERET R.J., éd. Masson et Cie, Paris.
- HALLAM N.D., 1970.- The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and related compounds on the fine structure of the primary leaves of Phaseolus vulgaris. *J. exp. Bot.*, 21 : 1031- 1038.
- HALLAM N.D. et J.A. SARGENT, 1970.- The localization of 2,4-D in leaf tissue. *Planta*, 94 : 291-295.
- HALMER P. et T.A. THORPE, 1976.- Kinetin induced changes in cell wall composition of Tobacco callus. *Phytochem.* 15 : 1585-1588.
- HALPERIN W. et S. MINOCHA, 1973.- Benzyladenin effects on cell separation and wall metabolism. *Canad. J. Bot.*, 51 : 1347-1354.
- HAMMET F.S., 1929a.- The chemical stimulus essential for growth by increase in cell numbers *Protoplasma*, 7 : 297-322.
- HAMMET F.S., 1929b.- Cell division and cell growth in size. *Protoplasma*, 7 : 535-540.
- HAMMET F.S. et S.S. CHAPMAN, 1938.- A correlation between sulphhydryl, mitosis and cell growth in length in roots of Phaseolus vulgaris. *Growth*, 2 : 297-302.
- HANSCH C., R.M. MUIR et R.L. METZENBERG, 1951.- Further evidence for a chemical reaction between plant growth-regulators and a plant substrate. *Plant Physiol.*, 26 : 812-821.
- HARE R.C., 1954.- Indoleacetic acid oxidase. *Bot. Rev.*, 30 : 129-165.
- HEINZ D.J., G.W.P. MEE et L.G. NICKELL, 1969.- Chromosome numbers of some Saccharum species hybrids and their cell suspension cultures. *Amer. J. Bot.*, 56 : 450-456.
- HELLER R., 1949.- Sur la sensibilité des cultures de tissus végétaux à certaines carences minérales. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 229 : 845- 846.
- HELLER R., 1953.- Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann. Sc. nat. Bot. Biol. vég.*, 14 : 1-223.
- HELLER R., 1955a.- De quelques composés du soufre assimilables par les tissus végétaux cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci.*, 241 : 234-236
- HELLER R., 1955b.- Sur la mise en réserve temporaire du phosphore dans la zone génératrice de fragments de racines de Carotte cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 241 : 1972- 1975.

- HELLER R., 1956.- Absorption et migration du phosphore dans des fragments de racines de Carotte cultivés in vitro. *Rev. gén. Bot.*, 63 : 105-125.
- HEMPHILL J.K. et S. VENKETESWARAN, 1978.- Chlorophyll and carotenoid accumulation in three chlorophyllous callus phenotypes of Glycine max. *Amer. J. Bot.*, 65 : 1055-1063.
- HENRY M., M. BENOIS, LY THI BA et J.L. GUIGNARD, 1978.- Action de l'acide naphtyloxyacétique (NOA) sur la croissance d'une suspension cellulaire de Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 125 : 5-16.
- HENSHAW G.G., K.K. JHA, A.R. MEHTA, D.L. SHAKESHAFT et H.E. STREET, 1966.- Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J. exp. Bot.*, 17 : 362-377.
- HIROSE S., K. YAMASHITA et K. SHIBATA, 1971.- Formation of thiol groups in Spinach chloroplasts by illumination. *Plant Cell Physiol.*, 12 : 775-778.
- HOLM G., 1954.- Chlorophyll mutations in Barley. *Acta Agric. Scand.*, 4 : 457-471.
- HOMES J., 1967.- Action morphogénétique du glucose sur une souche embryogène de tissus de Carotte cultivée in vitro. *C. R. Soc. Biol.*, 161 : 1143-1145.
- HOPKINS F. G. et E. J. MORGAN, 1943.- Appearance of glutathione during the early stages of the germination of seeds. *Nature*, 152 : 288-
- HOWELL S.H., 1974.- An analysis of cell cycle controls in temperature sensitive mutants of Chlamydomonas reinhardi, p. 235-249. In : *Cell cycle controls*. PADILLA G.M., I.L. CAMERON et A. ZIMMERMAN éd., Academic Press, New York.
- HUGHES C. et S.P. SPRAGG, 1958.- The inhibition of mitosis by the reaction of maleic hydrazide with sulphhydryl groups. *Biochem. J.*, 70 : 205-212.
- HUTCHINSON W.C. et H.M. MUNRO, 1961.- The determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst*, 86 : 768-813.
- IKEDA T., T. MATSUMOTO et M. NOGUCHI, 1977.- Effects of inorganic nitrogen sources and physical factors on the formation of ubiquinone by Tobacco plant cells in suspension culture. *Agri. Biol. Chem.*, 41 : 1197-1201.
- ISRAEL H.W., M.O. MAPES et F.C. STEWARD, 1969.- Pigments and plastids in cultures of totipotent Carrot cells. *Amer. J. Bot.*, 56 : 910-917.
- JACOB K.M., 1972.- RNA synthesis during the DNA synthesis period of the first cell cycle in the root meristem of germinating Vicia faba. *Exp. Cell Res.*, 72 : 370-376.
- JALOUZOT R., 1971.- Etude du métabolisme des acides nucléiques et des protéines au cours de l'initiation de racines adventives. *Planta*, 97 : 16-27.

- JAVILLIER M. et Coll., 1964.- Traité de biochimie générale. Tome II, second fascicule : les enzymes. *Masson et Cie*, Paris.
- JELLUM E., 1964.- The prevention of thiol autoxidation in biological systems by means of thiolated Sephadex. *Acta Chem. Scand.*, 18 : 1887-1895.
- JENSEN W.A., 1962.- Botanical histochemistry. *Freeman and Co*, San Francisco, London.
- JESSUP W. et M.W. FOWLER, 1976.- Interrelationships between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. II. The effect of the nitrogen source and concentration on nutrient uptake and respiratory activity in cultured Sycamore cells. *Planta*, 132 : 125-129.
- JOCELYN P.C., 1972.- Biochemistry of the -SH group. *Academic Press*, London, New York.
- JOUANNEAU J.P., 1971.- Contrôle par les cytokinines de la synchronisation des mitoses dans les cellules de Tabac. *Exp. Cell Res.*, 67 : 329-337.
- JOUANNEAU J.P. et C. PEAUD-LENOEL, 1967.- Croissance et synthèse des protéines de suspensions cellulaires de Tabac sensibles à la kinétine. *Physiol. Plant.*, 20 : 834-850.
- KAMIMURA S., M. AKUTSU et M. NISHIKAWA, 1976.- Formation of thebaine in the suspension culture of Papaver bracteatum. *Agr. Biol. Chem.*, 40 : 913-919.
- KAO K.N., R.A. MILLER, O.L. GAMBORG et B.L. HARVEY, 1970.- Variations in chromosome number and structure in plant cells grown in suspension cultures. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 12 : 297-301.
- KATO K., Y. SHIOZAWA, A. YAMADA, K. NISHIDA et M. NOGUCHI, 1972.- A jar fermentor culture of Nicotiana tabacum L. cell suspensions. *Agr. Biol. Chem.*, 36 : 899-902.
- KEY J.L., 1962.- Changes in ascorbic acid metabolism associated with auxin-induced growth. *Plant Physiol.*, 37 : 349-356.
- KEY J.L. et F. WOLD, 1969.- Some effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the oxidation reduction state of Soybean seedlings. *J. Biol. Chem.*, 236 : 549-553.
- KIM W.K. et V.A. GREULACH, 1963.- A comparative study of some influences of maleic hydrazide and 5-fluorouracile on the metabolism of Chlorella pyrenoidosa. *Phyton*, 20 : 127-136.
- KING P.J., 1976a.- Utilization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by steady-state cell cultures of Acer pseudoplatanus L. *J. exp. Bot.*, 27 : 1053-1072.
- KING J., 1976b.- Growth characteristics of Acer pseudoplatanus L. cells grown in chemostat culture in the presence of urea alone as a source of nitrogen. *Plant Sc. Letters*, 6 : 409-418.

- KING P.J., 1977.- Studies on the growth in culture of plant cells. XXII. Growth limitation by nitrate and glucose in chemostat cultures of Acer pseudoplatanus L. *J. exp. Bot.*, 28 : 142-155
- KING P.J., K.L. MANSFIELD et H.E. STREET, 1973.- Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures. *Canad. J. Bot.*, 51 : 1807-1823.
- KING P.J. et H.E. STREET, 1973.- Growth patterns in cell cultures. p. 269-337. In : *Plant tissue and cell culture*. STREET H.E., éd. Blackwell scientific Publications, Oxford.
- KLEPPER L., D. FLESHER et R.H. HAGEMAN, 1971.- Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, 48 : 580-590.
- KOHNO H. et F. YOSHIDA, 1977.- Culture of chlorophyllous Tobacco-cells not requiring any organic additives except sucrose in the medium. I. Effects of light and temperature on the growth of the cells. *Plant Cell Physiol.*, 18 : 907-913.
- KOSSATZ V.C. et R.B. VAN HUUSTEE, 1976.- The specific activities of peroxidase and aminolevulinic acid dehydratase during the growth cycle of Peanut suspension culture. *Canad. J. Bot.*, 54 : 2089-2094.
- KRENKE N.P., Wundkompensation, Transplantation und Chimaeren bei Pflanzen. Springer, Berlin (cité par GAUTHERET R.J., 1944).
- KULESCHA Z., 1951.- Recherches sur l'élaboration des substances de croissance par les tissus végétaux. *Thèse Doct. Etat*, Paris, 114 p.
- KULESCHA Z., 1968.- Influence réciproque du 2,4-D (et de quelques autres substances) sur la culture du Topinambour, p. 231-249. In : *Les cultures de tissus de plantes*. GAUTHERET R.J. et L. HIRTH, éd. Coll. nat. C.N.R.S. (n° 920), Strasbourg.
- KURZ W.G.W., 1971.- A chemostat for growing higher plant cells in single cell suspension cultures. *Exp. Cell Res.*, 64, 476-479
- LACHARME J., 1972.- Les acides nucléiques avant et pendant les premières divisions cellulaires chez les tissus végétaux cultivés in vitro. *Bull. Soc. bot. Fr. (Mémoires)*, 201-210.
- LACHARME J. et G. NETIEN, 1969.- Acides aminés et organiques des cultures de tissus. *Physiol. vég.*, 7 : 1-17.
- LACHARME J. et R. STEIMAN, 1970a.- Métabolisme des acides nucléiques dans les noyaux de tissus de Daucus carota L. au cours des premières heures de leur mise en culture in vitro. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 271 : 1178-1181.
- LACHARME J. et R. STEIMAN, 1970b.- Evolution des acides ribonucléiques nucléaires avant les divisions cellulaires dans une culture synchrone de tissus de Daucus carota L. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, 14 : 35-50
- LAETSCH W.M. et STETLER D.A., 1967.- Régulation of chloroplast development in cultured plant tissues, p. 291-297. In : *Le chloroplaste*. SIRONVAL C., éd., Masson et Cie, Paris.

- LAMPORT D.T.A., 1963.- Oxygen fixation into hydroxyproline of plant cell wall protein. *J. Biol. Chem.*, 238 : 1438-1440.
- LAMPORT D.T.A., 1964.- Cell suspension cultures of higher plants : isolation and growth energetics. *Exp. Cell Res.*, 33 : 195-206.
- LAMPORT D.T.A., 1965.- The protein component of primary cell walls. *Advan. Bot. Res.*, 2 : 151-218.
- LAMPORT D.T.A., 1967.- Hydroxyproline -O- glycosidic linkage of the plant cell wall glycoprotein extensin. *Nature*, 216 : 1322-1324.
- LAMPORT D.T.A., 1970.- Cell wall metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21 : 235-270.
- LAMPSIDIS E., 1961.- Croissance des entre-noeuds et des vrilles du *Vitis vinifera* L. et problèmes auxiniques. *Bull. Soc. Bot. Suisse*, 71 : 57-106.
- LANCE A., 1955.- Mise en évidence de la répartition des groupements sulfhydryles dans le méristème apical d'une Composée : *Chrysanthemum segetum*. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 241 : 821-823.
- LANCE C., 1963.- Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés in vitro. *Thèse Doct. Etat, Paris*, 157 p.
- LARPENT J.P., 1970.- Problèmes posés par le développement des systèmes filamenteux. *Physiol. vég.*, 8 : 335-347.
- LARPENT J.P., M. FEVRE et G. VALLA, 1973.- Mitose et ramification dans le mycélium jeune des Champignons. *Sciences*, 4 : 148-154.
- LAVAL-MARTIN D., 1974.- La maturation du fruit de Tomate cerise : mise en évidence, par cryodécapage, de l'évolution des chloroplastes en deux types de chromoplastes. *Protoplasma*, 82 : 33-59.
- LEE T.T., 1971.- Promotion of indoleacetic acid oxidase isoenzymes in Tobacco callus cultures by indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 48 : 56-59.
- LEE T.T., 1972.- Changes in indoleacetic acid oxidase isoenzymes in Tobacco tissues after treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiol.*, 49 : 957-960.
- LEFEBVRE R., 1969.- Métabolisme des fragments de racines d'Endive cultivées in vitro sous faible tension d'oxygène. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 22 : 177-185.
- LEFEBVRE R., 1976.- Influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement des tissus de racine d'Endive (*Cichorium intybus* L.). *Thèse Doct. Etat, Lille 1*, 185 p.
- LEGRAND B., 1969.- Répartition des catalases et peroxydases dans des fragments de racine de Carotte cultivés in vitro. *Rev. gén. Bot.*, 76 : 469-475.

- LEGRAND B., 1970.- Activités catalasique et peroxydasique de tissus végétaux cultivés in vitro. *Thèse de spécialité*, Lille 1, 79 p.
- LEGRAND B., 1977.- Action de la lumière sur les peroxydases et sur la teneur en composés phénoliques de tissus de feuilles de Cichorium intybus L. cultivés in vitro. *Biol. Plant.*, 19 : 27-33.
- LEGRAND B., M. BATCHO, J.F. BOUSQUET et J. DUBOIS, 1977.- Comparaison des acides aminés libres et des peroxydases d'organes végétatifs et floraux de Silènes dioïques (Silene dioïca) sains ou parasités par l'Ustilago violacea. *Phytopath. Z.*, 90 : 273-280.
- LEGRAND B. et J. DUBOIS, 1977.- Evolution des peroxydases et auxines-oxydases au cours de la croissance d'une suspension cellulaire de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause). *C. R. Acad. Sci. Paris (D)*, 285 : 661-664.
- LEGRAND B. et J. DUBOIS, 1978.- Influence des régulateurs de croissance sur la prolifération, l'activité peroxydasique et les isoperoxydases de la suspension cellulaire de Silene alba. *Biol. Plant.*, 20 : 107-113.
- LEGUAY J.J. et J. GUERN, 1975.- Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid on growth of suspension-cultured Acer pseudoplatanus cells. *Plant Physiol.*, 56 : 356-359.
- LEGUAY J.J. et J. GUERN, 1977.- Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid on growth of suspension-cultured Acer pseudoplatanus cells. II. Influence of 2,4-D metabolism and intracellular pH on the control of cell division by intracellular 2,4-D concentration. *Plant Physiol.*, 60 : 265-270.
- LEOPOLD A.C. et C.A. PRICE, 1956.- The influence of growth substances upon sulphhydryl compounds, p. 271-283. In : *The chemistry and mode of action of plant growth substances*. WAIN R.L. et F.R. WIGHTMAN éd., Butterworths scientific Publications, London.
- LESCURE A.M., 1969.- Mutagenèse et sélection de cellules d'Acer pseudoplatanus L. cultivées in vitro. *Physiol. vég.*, 7 : 237-250.
- LEVAÏN N., 1966.- Les effets du β -mercaptoéthanol sur le développement de germinations de Moutarde : Sinapis alba L. (Crucifères). *Bull. Soc. bot. Fr. (Mémoires)*, p. 165-167.
- LEVITT J., C.Y. SULLIVAN et N.O. JOHANSSON, 1962.- Sulphydryls - A new factor in fruit resistance. III. Relation of SH-increase during hardening, to protein, glutathione and glutathione oxidizing activity. *Plant Physiol.*, 37 : 266-271.
- LIAU D.F. et W.G. BOLL, 1971.- Growth and patterns of growth and division, in cell suspension cultures of bush Bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender). *Canad. J. Bot.*, 49 : 1131-1139.

- LIEDVOGEL B., P. SITTE et H. FALK, 1976.- Chromoplasts in the Daffodil : fine structure and chemistry. *Cytobiologie*, 12 : 155-174.
- LIN C.Y. et J.L. KEY, 1967.- Absence of a causal relationship between auxin-induced growth and changes in the content of ascorbic and dehydroascorbic acids in excised plant tissues. *Plant Physiol.*, 42 : 742-746.
- LINSMAIER E.M. et F. SKOOG, 1965.- Organic growth factor requirements of Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 18 : 100-127.
- LIORET C., 1953.- Action de l'acide naphthalène-acétique sur le métabolisme des tissus de racine de Scorsonère. II : variations des échanges gazeux respiratoires. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 236 : 504-506.
- LIORET C., 1960.- Recherches sur le métabolisme de deux tissus végétaux cultivés in vitro. *Thèse Doct. Etat*, Paris, 127 p.
- LOBOV V.P., 1971.- Action de l'hydrazide maléique sur la biosynthèse des protéines, de l'ARN et de l'ADN dans les racines de plantules de Pois (en russe). *Fiziol. Rast. SSSR*, 18 : 116-120.
- LONGEVIALLE M., 1968.- Effet mitoclasique et chromatoclasique du β -mercapto-éthanol sur les cellules méristématiques des racines d'Allium sativum L. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 267 : 708-711.
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951.- Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- MacCREADY R.M., J. GUGGOLZ, U. SILVIERA et H.S. OWENS, 1950.- Determination of starch and amylose in vegetables. Application to Peas. *Anal. Chem.*, 22 : 1156-1158.
- MacCUNE D.C., 1961.- Multiple peroxidases in Corn. *Ann. New York Acad. Sc.*, 94 : 723-730.
- MACKENZIE I.A., A. KONAR et H.E. STREET, 1972.- Cytokinin and the growth of cultured Sycamore cells. *New Phytol.*, 71 : 633-638.
- MACKENZIE I.A. et H.E. STREET, 1972.- The cytokinins of cultured Sycamore cells. *New Phytol.*, 71 : 621-631.
- MAILLE M., 1971.- Action de la lumière sur le métabolisme azoté des tissus de Carotte et de Tabac cultivés in vitro. *Diplôme Ing. Conser. nat. Arts Mét.*, Paris, 63 p.
- MANTE S. et W.G. BOLL, 1975.- Comparaison of growth and extracellular polysaccharide of cotyledon cell suspension cultures of bush Bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender) grown in coconut-milk medium and synthetic medium. *Canad. J. Bot.*, 53 : 1542-1548.
- MANTE S. et W.G. BOLL, 1976.- Changes in the amount and composition of fractions from extracellular polysaccharide during the culture cycle of cotyledon cell suspension culture of bush Bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender). *Canad. J. Bot.*, 54 : 198-201.

- MANTE S. et W.G. BOLL, 1978.- Effect of either 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or kinetin on production and composition of various fractions from extracellular polysaccharides produced by cotyledon cell suspension cultures of bush Bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender). *Canad. J. Bot.*, 56 : 1816-1822.
- MARETZKI A., A DELA CRUZ et L.G. NICKELL, 1971.- Extracellular hydrolysis of starch in Sugarcane cell suspensions. *Plant Physiol.*, 48 : 521-525.
- MARETZKI A, M. THOM et L.G. NICKELL, 1974.- Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures, p. 329-361. In : *Tissus culture and plant science*. STREET H E, éd., Academic Press, London, New York.
- MAROTI M., 1964.- Uptake of phosphorus by isolated Daucus tissue. *Acta Biol. Hung.*, 15 : 231-236.
- MAROTI M., 1967.- The effect of ³⁵S-cysteine on isolated callus tissue of Tobacco. *Rev. Roum. Biol. Bot.*, 12 : 171-174.
- MARRE E., 1954.- Ricerche sulla fisiologia dell'acido ascorbico. X. Variazioni quantitative dell'acido ascorbico in coleoptili di Avena e in segmenti di internodio di Pisum trattati con acido indolacetico. *Rend. Acc. naz. Lincei*, 16 : 758-763.
- MARRE E., 1955.- Dimostrazione spettrofotometrica della formazione di complessi auxin-proteici a livello dei gruppi sulfidrilici in preparati enzimatici vegetali. *Rend. Acc. naz. Lincei*, 18 : 88-93.
- MARRE E. et O. ARRIGONI, 1957a.- Metabolic reactions to auxin. I. The effects of auxin on glutathione and the effects of glutathione on growth of isolated plant parts. *Physiol. Plant.*, 10, 289-301.
- MARRE E. et O. ARRIGONI, 1957b.- Interazione tra glutathione e auxina nello stimolo della crescita. *Rend. Acc. naz. Lincei*, 22 : 642-649.
- MARRE E., O. ARRIGONI et G. FORTI, 1957.- Reazioni metaboliche all'auxina. II. Effetto di concentrazioni supraottimali di auxina sui sistemi del glutathione e dell'acido ascorbico, e sul metabolismo energetico in segmenti di internodio di Pisello. *Rend. Acc. naz. Lincei*, 22 : 85-91.
- MARTIN S.M. et D. ROSE, 1976.- Growth of plant cell (Ipomoea) suspension cultures at controlled pH levels. *Canad. J. Bot.*, 54 : 1264-1270.
- MARTIN S.M., D. ROSE et V. HUI, 1977.- Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. *Canad. J. Bot.*, 55 : 2838-2843.
- MASCHERPA J.- M., 1971.- Etude de l'infrastructure plastidiale de souches de tissus cultivés dans des conditions d'éclairage variable. *Diplôme de Biol.*, Genève, 69 p.
- MATSUMOTO T., K. OKUNISHI, K. NISHIDA et M. NOGUCHI, 1972.- Effects of physical factors and antibiotics on the growth of higher plant cells in suspension culture. *Agr. Biol. Chem.*, 36 : 2177-2183.

- MATSUMOTO T., K. OKUNISHI, K. NISHIDA et M. NOGUCHI, 1975.- Growth profile of crown gall cells of Tobacco in suspension culture. *Agr. Biol. Chem.*, 39 : 485-490.
- MATSUMOTO T., K. OKUNISHI, K. NISHIDA, M. NOGUCHI et E. TAMAKI, 1971.- Studies on the culture conditions of higher plant cells in suspension culture. II. Effect of nutritional factors on the growth. *Agr. Biol. Chem.*, 35 : 543-551.
- MAZIA D., 1954.- -SH and growth, p. 209-223. In : *Glutathione*. COLOWICK S. et Coll., éd. *Academic Press*, New York.
- MAZIA D., 1959.- The role of the thiol groups in the structure and function of the mitotic apparatus, p. 367-382. In : *Sulfur in proteins*. BENESCH R. et Coll., éd. *Academic Press*, New York, London.
- MAZZA G., J. RICARD et M. BOUCHET, 1970.- Potentiels de demi-réduction et activité activité auxine-oxydasique de peroxydases de Navet (*Brassica napus* L.) *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 270 : 2492-2494.
- MENORET Y., 1957.- Les acides aminés libres de la racine de Carotte et leur évolution au cours de la culture des tissus in vitro. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 244 : 488-490.
- MEYLAN S., 1960.- Facteurs externes et polarité électrique de fragments de racines de Carotte. *Bull. Soc. Bot. Suisse*, 70 : 206-231.
- MILLER G.L., 1959.- Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31 : 426-428.
- MILLER R.A., J.P. SHYLUK, O.L. GAMBORG et J.W. KIRKPATRICK, 1968.- Phytostat for continuous culture and automatic sampling of plant-cell suspensions. *Science*, 159 : 540-542.
- MITRA J. et F.C. STEWARD, 1961.- Growth induction in cultures of *Haplopappus gracilis*. II. The behavior of the nucleus. *Amer. J. Bot.*, 48 : 358-368.
- MLODZIANOWSKI F., 1973.- Histogenesis in the tissue culture of Carrot (*Daucus carota* L.). IV. The effect of sucrose on the response of Carrot Tissue culture to 3-indolylacetic acid. *Bull. Soc. Amis Sc. Let., Poznan, (D)*, 14 : 3-6.
- MONTREUIL J. et G. SPIK, 1963.- Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. *Monographie n°1, Laborat. Chimie biol., Univ., Lille I.*
- MONTREUIL J. et G. SPIK, 1968.- Méthodes chromatographiques et électrophorétiques de dosage des glucides constituant les glycoprotéines. *Monographie n°2, Laborat. Chimie biol., Univ., Lille I.*
- MORGAN E. J. et E. FRIEDMANN, 1938.- Interaction of maleic acid with thiol compounds. *Biochem. J.*, 32 : 733-742.
- MOROHASHI Y., A. KOMAMINE et M. SHIMOKORIYAMA, 1967.- Respiratory metabolism in the phloem, xylem and cambium of Carrot root. *Plant Cell Physiol.*, 8 : 423-432.

- MORVAN H., 1974.- Evolution du pH du milieu au cours de la culture des suspensions cellulaires d'Erable (*Acer pseudoplatanus* L.). Essai d'interprétation par la méthode électrophysiologique. *C. R. Acad. Sci., Paris*, (D), 278 : 3207-3210.
- MOTHES K., 1964.- The role of kinetin in plant regulation, p. 131-140. In : *Régulateurs naturels de la croissance végétale. Coll. intern. C.N.R.S., Gif-sur-Yvette.*
- MUHLETHALER K., 1967.- Ultrastructure and formation of plant cell walls. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 14 : 43-64.
- MUIR R.M. et C. HANSCH, 1953.- On the mechanism of action of growth regulators. *Plant Physiol.*, 28 : 218-232.
- MURASHIGE T. et F. SKOOG, 1962.- A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-497.
- NAEF J., 1962.- Sur le dosage des chlorophylles élaborées par une souche de tissu cambial de Carotte. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 255 : 1986-1987.
- NAEF J., 1968.- Action combinée de la lumière et du glucose sur des souches tissulaires de Carotte, p. 301-314. In : *Les cultures de tissus de Plantes.* GAUTHERET R.J. et L. HIRTH, éd. *Coll. nat. C.N.R.S., (n°920), Strasbourg.*
- NAEF J. et G. TURIAN, 1963.- Sur les caroténoïdes du tissu cambial de racine de Carotte cultivée in vitro. *Phytochemistry*, 3 : 173-177.
- NAKAZAWA S., 1968.- Growth patterns of Fern gametophytes with colchicine and sulphydril groups. *Bot. Mag., Tokyo*, 81 : 575-581
- NASH D.T. et W.G. BOLL, 1975.- Carbohydrate nutrition of Paul's Scarlet Rose cell suspensions. *Canad. J. Bot.*, 53 : 179-185.
- NASH D. et M. DAVIES, 1972.- Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspensions. *J. exp. Bot.*, 23 : 75-91
- NAYLOR A. W. et E. A. DAVIS, 1951.- Respiration response of root tips to maleic hydrazide. *Bull. Torrey bot. Club.*, 78 : 73-79.
- NEDUKHA, 1969- A study of plastids and starch content in cultured tissue cells of the Carrot in vitro. *Cytologia, SSSR*, 11 : 219-224 (cité par MASCHERPA J.- M., 1971).
- NESIUS K.K. et J.S. FLETCHER, 1973.- Carbon dioxide and pH requirements of non-photosynthetic tissue culture cells. *Physiol. Plant*, 28 : 259-263.
- NESIUS K.K., L.E. UCHYTIL et J.S. FLETCHER, 1972.- Minimal organic medium for suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Planta*, 106 : 173-176.
- NEVILLE A. C., D.C. GUBB et R.M. CRAWFORD, 1976.- A new model for cellulose architecture in some plant cell walls. *Protoplasma*, 90 : 307-317.
- NICKELL, L.G., 1956.- The continuous submerged cultivation of plant tissues as single cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 42 : 848-850.

- NICKELL L.G. et P.R. BURKHOLDER, 1950.- Atypical growth of plants. II. Growth in vitro of virus tumors of Rumex in relation to temperature, pH and various sources of nitrogen, carbon and sulfur. *Amer. J. Bot.*, 37 : 538-547.
- NICKELL L.G. et A. MARETZKI, 1970.- The utilisation of sugars and starch as carbon sources by Sugarcane cell suspension cultures. *Plant Cell Physiol.*, 11 : 183-185.
- NICKERSON W.J. et G. FALCONE, 1959.- Function of protein disulfide reductase in cellular division of Yeasts, p. 409-421. In : *Sulfur in proteins*. BENESCH R. et Coll., éd. *Academic Press*, New York, London.
- NIEDERGANG-KAMIEN E. et A.C. LEOPOLD, 1957.- Inhibitors of polar auxin transport. *Physiol. Plant.*, 10 : 29-38.
- NISHI A., K. KATO, M. TAKAHASHI et R. YOSHIDA, 1977.- Partial synchronisation of Carrot cell culture by auxin deprivation. *Physiol. Plant*, 39 : 9-12.
- NISHINARI N. et T. YAMAKI, 1976.- Relationship between cell division and endogenous auxin in synchronously-cultured Tobacco cells. *Bot. Mag., Tokyo*, 89 : 73-81.
- NISSEN P. et L. ELDJARN, 1969.- Differential inhibition of cell division in Euglena gracilis by cysteamine and cystamine. *Physiol. Plant.*, 22 : 364-370.
- NITSCH J., P. et C. NITSCH, 1956.- Auxin-dependant growth of excised Helianthus tuberosus tissues. *Amer. J. Bot.*, 43 : 839-851.
- NOBECOURT P., 1937.- Cultures en série de tissus végétaux sur milieu artificiel. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 205 : 521-523.
- NOODEN L.D., 1969.- The mode of action of maleic hydrazide : inhibition of growth. *Physiol. Plant.*, 22 : 260-270.
- NOODEN L.D., 1972.- Inhibition of nucleic acid synthesis by maleic hydrazide. *Plant Cell Physiol.*, 13 : 609-621.
- NOODEN L.D., 1973.- Failure of maleic hydrazide to act as a sulfhydryl or carbonyl reagent. *Plant Physiol.*, 51 : 810-811.
- NORRIS R.E. et M.J. BUKOVAC, 1972.- Effect of pH on penetration of naphthaleneacetic acid and naphthaleneacetamide through isolated Pear leaf cuticle. *Plant Physiol.*, 49 : 615-618.
- NOUGAREDE A., J. GUERN et C. GRIGNON, 1968a.- Premières observations sur l'infrastructure des suspensions cellulaires provenant de tissus de cambium d'Acer pseudoplatanus L. *C. R. Acad. Sci., Paris*, (D), 266 : 207-210.
- NOUGAREDE A., J. GUERN et C. GRIGNON, 1968b.- Quelques particularités concernant l'édification des cloisons nouvelles dans les suspensions cellulaires obtenues à partir des cals du cambium d'Acer pseudoplatanus L. *C. R. Acad. Sci., Paris*, (D), 266 : 337-340.

- HOUGAREDE A. et P.E. PILET, 1967.- Activité et localisation, au niveau des infrastructures, de la phosphomonoestérase acide dans la racine et les jeunes feuilles du Lens culinaris L. C. R. Acad. Sci., Paris, (D), 265, 663-666.
- NOVAK F.J., The changes of karyotype in callus cultures of Allium sativum L. *Caryologia*, 27 : 45-54.
- OHIRA K., K. OJIMA et A. FUJIWARA, 1973.- Studies on the nutrition of Rice cell culture. I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.*, 14 : 1113-1121.
- OHTA K., K. KATOH et K. MIYAKE, 1977.- Establishment and growth characteristics of a cell suspension culture of Marchantia polymorpha L. with high chlorophyll content. *Planta*, 136 : 229-232.
- OKAMURA S., K. MIYASAKA et A. NISHI, 1973.- Synchronization of Carrot cell culture by starvation and cold treatment. *Exp. Cell Res.*, 78 : 467-470.
- OLSON A.C., J.J. EVANS, D.P. FREDERICK et E.F. JANSEN, 1969.- Plant suspension culture media macromolecules-pectic substances, protein and peroxidase. *Plant Physiol.*, 44 : 1594-1600.
- OSBORNE D.J., 1962.- Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in Xanthium leaves during senescence. *Plant Physiol.*, 37 : 595-602.
- PAMPLIN E.J. et J.M. CHAPMAN, 1975.- Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in tissue culture : Changes in the activity of the enzymes of the chlorophyll biosynthesis pathway. *J. exp. Bot.*, 26 : 212-220.
- PARTENEN C.R., 1963.- The validity of auxin-induced division in plants as evidence of endopolyploidy. *Exp. Cell Res.*, 31 : 597-599.
- PARTENEN C.R., 1965.- On the chromosomal basis for cellular differentiation. *Amer. J. Bot.*, 52 : 204-209.
- PATAU D.P., N.K. DAS et F. SKOOG, 1957.- Induction of DNA synthesis by kinetin and indoleacetic acid in excised Tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, 10 : 949-966.
- PEAUD-LENOEL C. et J.P. JOUANNEAU, 1971.- Contrôle du cycle mitotique dans les suspensions de cellules de Tabac cultivées en milieu liquide, p. 95-102. In : *Les cultures de tissus de plantes*. HIRTH L. et G. MOREL, éd. Coll. internat. C.N.R.S., (n°193), Strasbourg.
- PERLIS I.B. et A.W. GALSTON, 1955.- Studies on the peroxidases of etiolated Pea seedlings and their induction by indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 30 (supplément), XII.
- PHIPPS J., 1966.- Le catabolisme auxinique chez le Tabac : ses modalités dans la plante saine et parasitée par le virus de la mosaïque. *Thèse Doct. Etat.*, Toulouse, 159 p.
- PIALOUX N., G. GODINOT et D. GAUTHERON, 1968.- Variations des -SH libres et synthèse d'ATP au cours des phosphorylations oxydatives. C. R. Acad. Sci., Paris, (D), 267 : 1234- 1237.

- PILET P.E., 1951.- Contribution à l'étude des hormones de croissance (auxines) dans la racine de Lens culinaris Med. Mem. Soc. vaud. Sc. nat., 10 : 137-244.
- PILET P.E., 1956.- Activité des auxines-oxydases dans les fragments de Carotte cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci., Paris, 1956, 243 : 1141-1143.
- PILET P.E., 1957.- Distribution des groupes sulfhydryles (-SH), activité des auxines-oxydases et teneur en auxines des racines du Lens. *Physiol. Plant.*, 10 : 708-727.
- PILET P.E., 1958.- Action du glutathion sur la morphologie et l'activité auxines-oxydasique de tissus cultivés in-vitro. *Physiol. Plant.*, 11 : 747-751.
- PILET P.E., 1961.- Les phytohormones de croissance. Méthodes, chimie, biochimie, physiologie, applications pratiques. *Masson et Cie*, Paris.
- PILET P.E., 1963a.- Auxines et inhibiteurs radiculaires endogènes. *Physiol. vég.*, 1 : 171-190.
- PILET P.E., 1963b.- Action de l'acide 2,3,5-triiodobenzoïque et du glutathion sur la morphologie et le catabolisme auxinique de tissus cultivés in vitro. *Physiol. Plant.*, 16 : 299-310.
- PILET P.E., 1964.- Auxines et polarité morphologique de tissus de Carotte cultivés in vitro. *Rev. Cytol. Biol. vég.*, 27 : 269-292.
- PILET P.E., 1967.- Auxin content and auxin catabolism in relation to the growth polarity. *Physiol. Plant.*, 20 : 285-290.
- PILET P.E., 1971.- Les parois cellulaires. *Doïn*, Paris.
- PILET P.E. et G. COLLET, 1962.- Méthode d'analyse du catabolisme auxinique. *Ch. Zwalten*, Lausanne.
- PILET P.E. et J DUBOIS, 1968a.- Variations du taux en composés sulfhydrylés acidosolubles de tissus cultivés in vitro. *Physiol. Plant.*, 21 : 445-454.
- PILET P.E. et J DUBOIS, 1968b.- Composés sulfhydrylés, auxines et activité auxines-oxydasique de tissus cultivés in vitro. *Physiol. vég.*, 6 : 269-278.
- PILET P.E. et J. DUBOUCHET, 1962.- Proposition d'un test "coléoptile" (Triticum) pour le dosage auxinique. *Rev. gén. Bot.*, 69 : 545-562.
- PILET P. E. et M. FRAGATA, 1963.- Protéines et gradients auxines-oxydasiques dans les racines de Carottes cultivées in-vitro. *Rev. gén. Bot.*, 70 : 572-587.
- PILET P.E. et M. FRAGATA, 1965.- A propos de l'extraction et de l'absorption du tryptophane dans les racines de Carotte cultivées in vitro. C. R. Acad. Sci., Paris, (D), 261 : 513-516.

- PILET P.E. et A.W. GALSTON, 1955.- Auxin destruction, peroxidase activity and peroxide genesis in the roots of Lens culinaris. *Physiol. Plant.*, 8 : 888-898.
- PILET P.E. et Th. GASPARD, 1968.- Le catabolisme auxinique. *Masson et Cie*, Paris.
- PILET P.E. et R.M. HOFER, 1966.- Action de la kinétine sur la croissance et la teneur en chlorophylles des racines. *Physiol. Plant.*, 19 : 1026-1037.
- PILET P.E., M. KOBR et P.A. SIEGENTHALER, 1960.- Proposition d'un test "racine" (Lens) pour le dosage auxinique (méthode et application). *Rev. gén. Bot.*, 67 : 573-601.
- PILET P.E. et P. LAVANCHY, 1969.- Purification d'extraits peroxydasiques (Racine de Lens) à activité "auxines-oxydasique". *Physiol. vég.*, 7 : 19-29
- PILET P.E. et S. MEYLAN, 1955.- Polarité électrique de fragments de Carotte cultivés in vitro. *Experientia*, 11 : 147-151.
- PILET P.E. et J. PHIPPS, 1968.- Inhibition of auxin catabolism in relation to the chlorophyll content of the tissues. *Planta*, 80 : 82-88.
- PILET P.E. et J.P. ZRYD, 1965.- Distribution des composés sulfhydrylés dans les racines. *Ann. Physiol. vég.* 7 : 243-250.
- PIRSON A. et H. LORENZEN, 1966.- Synchronized dividing Algae. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 17 : 439-458.
- PITT D., 1969.- Cytochemical observations on the localization of sulfhydryl groups in budding Yeast cells and in phialides of Penicillium notatum Westling during conidiation. *J. gen. Microbiol.*, 59 : 257-262.
- POLACCO J.G., 1976.- Nitrogen metabolism in Soybean tissue culture. I. Assimilation of urea. *Plant Physiol.*, 58 : 350-357.
- POULLE M., 1979.- Etude de la NADH nitrate réductase d'une suspension cellulaire de Silene alba : caractérisation, induction et purification. *Thèse Doct. Spécialité*, Lille I, 111 p.
- POULLE M., C. BRASSART et R. BOURIQUET, 1978.- Nitrogen nutrition and nitrate reductase by Silene cells. *Fourth int. Congress Plant Tissue and Cell Culture*, Calgary (abstract n°1806).
- QUEIROZ O. et S. TRIPPI, 1969.- Action du photopériodisme sur l'activité enzymatique : les isozymes de la maléique déshydrogénase. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 268 : 2060-2062.
- RAKITIN Yu.V., S.V. VLADIMIRTZEVA et L.N. NIKOLAEVA, 1974.- Effect of maleic hydrazide on germination of Potato tubers and on the content of protein and nucleic acids in their buds (en russe). *Fiziol. Rast. SSSR*, 21 : 116-120.
- RAMBOUR S., J. VASSEUR et J. DUBOIS, 1977.- Mise en évidence d'ARN polyadénylés dans des suspensions cellulaires de Silene alba. *C. R. Acad. Sci., Paris, (D)*, 284 : 1063-1066.

- RAMBOUR S., J. VASSEUR et J. DUBOIS, 1978.- Ribonucleic acid synthesis during early stages of growth cycle of Silene alba cells in batch suspension culture. *Federation european Soc. Plant. Physiol., inaugural Meeting*, Edinburgh, abstract 200 : 436-437.
- RAPKINE L., 1931.- Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. *Ann. Physiol. Physico-Chim. Biol.*, 7 : 382-418.
- RAPKINE L., 1936.- Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. II. Nature et cinétique de la réaction entre les groupements -SH et l'acide monoiodoacétique. *J. Chim. phys.*, 33 : 493-506.
- RAPKINE L., 1937.- Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. III. Inhibition et rétablissement de la division cellulaire. *J. Chim. phys.*, 34 : 416-427.
- RASHID A. et H.E. STREET, 1974.- Growth, embryogenic potential and stability of a haploid cell culture of Atropa belladonna L. *Plant Science Letters*, 2 : 89-94.
- RAVEN J.A. et F.A. SMITH, 1976.- Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.*, 76 : 415-431.
- RAY P.M., 1958.- Destruction of auxin. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 9 : 81-118.
- REINERT J. et Y.P.S. BAJAJ, 1977.- Plant cell, tissue, and organ culture. *Springer-Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York.
- REINERT J. et P.R. WHITE, 1956.- The cultivation in vitro of tumor tissues and normal tissues of Picea glauca. *Physiol. Plant*, 9 : 177-189.
- REINHARD E., 1974.- Biotransformations by plant tissue cultures, p. 433-459. In : *Tissue culture and plant science*. STREET H.E., éd. *Academic Press*, London, New York.
- RICHEZ M., 1964.- Accumulation et migration du phosphore dans des fragments de tubercules de Carotte cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 258 : 3894-3897.
- RICHMOND A.E. et A. LANG, 1957.- Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves. *Science*, 125 : 650-651.
- RICHTER G., 1969.- Chloroplastendifferenzierung in isolierten Wurzeln. *Planta*, 86 : 299-300.
- RIER J.P. et D.T. BESLOW, 1967.- The incorporation of cysteine ³⁵S in callus tissue of Parthenocissus tricuspidata. *Plant Cell Physiol.*, 8 : 779-781.
- RITZERT R.W. et B.A. TURIN, 1970.- Formation of peroxidases in response to indole-3-acetic acid in cultured Tobacco cells. *Phytochem.*, 9 : 1701-1705.
- ROBERTS K. et D.H. NORTHCOTE, 1970.- The structure of Sycamore callus cells during division in a partially synchronised suspension culture. *J. Cell Sci.*, 6 : 299-321.

- ROBSON J.E. et H.M. STOCKLEY, 1962.- Sulphydryl metabolism of fungi grown in submerged culture. *J. gén. Microbiol.*, 28 : 57-65.
- RODIER J., 1971.- Analyse chimique et physicochimique de l'eau. *Dunod*, Paris.
- ROLAND J.- C., 1966.- Organisation de la membrane paraplasmiqne du collenchyme. *J. Microscopie*, 5 : 323-348.
- ROLAND J.- C., B. VIAN et D. REIS, 1977.- Further observations on cell wall morphogenesis and polysaccharide arrangement during plant growth. *Protoplasma*, 91 : 125-141.
- ROSE D. et S.M. MARTIN, 1975.- Growth of suspension cultures of plant cells (*Ipomoea* sp.) at various temperatures. *Canad. J. Bot.*, 53 : 315-320.
- ROSE D., S.M. MARTIN et P.P.F. CLAY, 1972.- Metabolic rates for major nutrients in suspension culture of plant cells. *Canad. J. Bot.*, 50 : 1301-1308.
- ROSS P., 1968.- Mise au point d'une unité pilote de fermentation. *Mémoire de D.E.A. de Biochimie*, Lille 1.
- ROSSINI, L., 1972.- Division of free leaf cells of *Calystegia sepium* in vitro. *Phytomorphology*, 22 : 21-29.
- ROSSINI L., 1973.- Sur les différences d'action de l'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique et de la 6-benzylaminopurine sur la division in vitro des cellules du parenchyme foliaire de *Calystegia sepium* (L.) R. Br. C. R. Acad. Sci., Paris, (D), 276 : 1689-1692.
- ROSSINI L., 1974.- Effet de l'obscurité et de la lumière sur la phase exponentielle de croissance de cellules du parenchyme foliaire de *Calystegia sepium* (L.) R. Br. C. R. Acad. Sci., Paris, (D), 278 : 2287-2289.
- ROUX E. et C. TENDILLE, 1954.- Pigments des chloroplastes et photosynthèse. C. R. Acad. Sci., Paris, 238 : 1261-1263.
- RUBIN B.A. et E.R. KARTASHOVA, 1968.- Le mécanisme de la participation des groupes thiols dans la biosynthèse de la chlorophylle (en russe). *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 182 : 723-725.
- SACRISTAN M.D., 1971.- Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Chromosoma*, 33 : 273-283.
- SAHULKA J. et L. LISA, 1978.- The influence of sugars on nitrate reductase induction by exogenous nitrate or nitrite in excised *Pisum sativum*. *Biol. Plant.*, 20 : 359-367.
- SAIDOV A.S., V.V. POLEVOJ et A.M. MAKHLINA, 1973.- Influence de la lumière rouge et du proche infrarouge sur le potentiel rédox et la teneur en groupes -SH des feuilles isolées de pousses étioilées de *Phaseolus aureus* (en russe). *Dokl. Acad. Nauk., SSSR*, 208 : 995-997.
- SAKAI H., 1966.- Studies on sulphydryl groups during cell division of sea-urchin eggs. VIII. Some properties of mitotic apparatus proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 112 : 132-145.

- SANDMEIER M., 1974.- Etude de l'effet de la température sur la division des cellules séparées de feuilles de Calystegia sepium (L.) R. Br. *Biol. Plant.*, 16 : 184-193.
- SARGENT J.A. et G.E. BLACKMAN, 1965.- Studies on foliar penetration. II. The role of light in determining the penetration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. exp. Bot.*, 16 : 24-47.
- SARGENT J.A. et G.E. BLACKMAN, 1969.- Studies on foliar penetration. IV. Mechanisms controlling the rate of penetration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid into leaves of Phaseolus vulgaris. *J. exp. Bot.*, 20 : 542-555.
- SARKISSIAN G.S. et M.W. FOWLER, 1974.- interrelationship between nitrate assimilation and carbohydrate metabolism in plant roots. *Planta*, 119 : 335-349.
- SASAKAWA H. et Y. YAMAMOTO, 1977.- Influences of some internal and external conditions on the induction of nitrate reductase in Rice seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 18 : 207-214.
- SCHANTZ R., H. DURANTON et M. PEYRIERE, 1967.- 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, (D)*, 265 : 205-208.
- SCHMIDT G., et S.L. THANNHAUSER, 1945.- A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161 : 83-89.
- SCHNARRENBERGER C., A. OESER et N.E. TOLBERT, 1973.- Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate deshydrogenase and 6-phosphogluconate deshydrogenase in Spinach leaves., *Arch. biochem. biophys.*, 154 : 438-448.
- SEQUEIRA L et L. MINEO, 1966.- Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from Tobacco roots. *Plant Physiol.*, 41 : 1200-1208.
- SHAMINA Z.B., 1966.- Cytogenetic study of tissue culture of Haplopappus gracilis, p. 337-380. In : *The nutritional process : Mechanism of mutation and inducing factors*. LANDA Z., éd. *Proc. Symp. Praha (9-11 Aout 1965) Academia, Praha* (cité par SUNDERLAND N., 1973).
- SHEWRY P.R., N.J. PINFIELD et A.K. STOBART, 1971.- The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and (2-chloroethyl)-trimethylammonium chloride on chlorophyll synthesis in Barley leaves. *Planta*, 101 : 352-359.
- SHIMADA T. et M. TABATA, 1967.- Chromosome numbers in cultured pith tissue of Tobacco. *Jap. J. Genet.*, 42 : 195-201.
- SHIN M. et W. NAKAMURA, 1962.- Indoleacetic acid oxydase activity of Wheat peroxidase. *J. Biochem.*, 52 : 444-451.
- SHORT K.C., E.G. BROWN et H.E. STREET, 1969.- Studies on the growth in culture of plant cells. V. Large-scale culture of Acer pseudoplatanus L. cell suspensions. *J. exp. Bot.*, 20 : 572-578.
- SIEGEL S.M. et A.W. GALSTON, 1953.- Experimental coupling of indoleacetic acid to Pea root protein in vivo and in vitro. *Proc. nat. Acad. Sc. USA*, 39 : 1111-1118.

- SIMOLA L.S. et T. SOPANEN, 1970.- Changes in the activity of certain enzymes of Acer pseudoplatanus L. cells at four stages of growth in suspension culture. *Physiol. Plant.*, 23 : 1212-1222.
- SIMPKINS I., H.A. COLLIN et H.E. STREET, 1970.- The growth of Acer pseudoplatanus cells in a synthetic liquid medium : response to the carbohydrate, nitrogenous and growth hormone constituents. *Physiol. Plant.*, 23 : 385-396.
- SIMPKINS I. et H.E. STREET, 1970.- Studies on the growth in culture of plant cells. VII. Effects of kinetin on the carbohydrate and nitrogen metabolism of Acer pseudoplatanus L. cells grown in suspension culture. *J. exp. Bot.*, 21 : 170-185.
- SINGH B.D., B.L. HARVEY, K.N. KAO et R.A. MILLER, 1972.- Selection pressure in cell populations of Vicia hajastana cultured in vitro. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 14 : 65-70.
- SITTE P., 1970.- L'appareil cinétique de division ou appareil fusorial (traduction française), p. 3-16. In : *Journée de Cytologie. Colloque de Strasbourg (7.03.1970)*.
- SKOOG F. et C.O. MILLER, 1957.- Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. p. 118-131. In : *The biological action of growth substances. Symp. Soc. exp. Biol.*, (n°11). Cambridge Univ. Press.
- S LUYTERMAN L.A., 1957.- The amperometric titration of sulfhydryl groups with silver nitrate. *Biochim. Biophys. Acta*, 25 : 402-404.
- SPRAGG S.P., P.M. LIEVESLEY et K.M. WILSON, 1962.- The relationship between glutathione and protein sulfhydryl groups in germinating Pea seeds. *Biochem. J.*, 83 : 314-318.
- SPURR A.R. et W.M. HARRIS, 1968.- Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in Capsicum annum. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. *Amer. J. Bot.*, 55 : 1210-1224.
- SRI VASTAVA B.I. et G. WARE, 1965.- The effect of kinetin on nucleic acids and nucleases of excised Barley leaves. *Plant Physiol.*, 40 : 62-64.
- STECK W. et F. CONSTABEL, 1974.- Biotransformations in plant cell cultures. *Lloydia*, 37 : 185-191.
- STERN H., 1958.- Variations in sulfhydryl concentration during microsporocyte meiosis in the anthers of Lilium and Trillium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4 : 157-161.
- STERN H., 1959.- Multiple functions of sulfur in mitosis, p. 391-406. In : *Sulfur in proteins*. BENESCH R. et Coll., Academic Press, New York, London.
- STERN H., 1963.- Determination of sulfhydryl groups, p. 21-51. In : *Modern Methods of plant analysis, vol. 6*, PEACH K. et M.V. TRACEY, éd., Springer-Verlag, Berlin.

- STETLER D.A. et W.M. LAETSCH, 1965.- Kinetin-induced chloroplast maturation in cultures of Tobacco tissue. *Science*, 149 : 1387-1388.
- STEWART F.C., M.O. MAPES et J. SMITH, 1958.- Growth and organised development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Amer. J. Bot.*, 45 : 693-703.
- STEWART F.C., J.F. THOMPSON et J.K. POLLARD, 1958.- Contrasts in the nitrogenous composition of rapidly growing and non-growing plant tissues. *J. exp. Bot.*, 25 : 1-10.
- STOBART A.K., P.R. SHEWRY et D.R. THOMAS, 1972.- The effect of kinetin on chlorophyll synthesis in ageing etiolated Barley leaves exposed to light. *Phytochemistry*, 11 : 571-577.
- STRAUS J., 1954.- Maize endosperm tissue grown in vitro. II. Morphology and cytology. *Amer. J. Bot.*, 41 : 833-839.
- STRAUS J., 1962.- Invertase in cell walls of plant tissue cultures. *Plant Physiol.*, 37 : 342-348.
- STREET H.E., 1973.- Plant tissue and cell culture. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford, London, Edinburgh.
- STREET H.E., 1977.- Applications of cell suspension cultures, p. 649-667 et p. 703-716 (bibliographie). In : *Plant cell, tissue and organ culture*. REINERT J. et Y.P.S. BAJAJ, éd., Springer-Verlag, Berlin.
- STREET H.E., P.J. KING et K.J. MANSFIELD, 1971.- Growth control in plant cell suspension cultures, p. 17-40. In : *Les cultures de tissus de plantes*. HIRTH L. et G. MOREL, éd., *Coll. internat. C.N.R.S.*, (n° 193), Strasbourg.
- STRICKS W. et S.K. CHAKRAVARTI, 1961.- Amperometric titration of sulfhydryl and disulfide groups with organic mercury compounds at the rotated dropping mercury indicator electrode. *Analytical Chemistry*, 2 : 194-199.
- STRICKS W. et I.M. KOLTHOFF, 1951.- Equilibrium constants of the reactions of sulfite with cystine and with dithiodiglycolic acid. *J. Amer. chem. Soc.*, 73 : 4569-4574.
- STUART R. et H.E. STREET, 1969.- Studies on the growth in culture of plant cells. IV. The initiation of division in suspensions of stationary-phase cells of *Acer pseudoplatanus* L. *J. exp. Bot.*, 20 : 556-571.
- STUTZ R.E., 1957.- The indole-3-acetic acid oxidase of *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.*, 32 : 435-447.
- SUNDERLAND N., 1973.- Nuclear cytology, p. 161-190. In : *Plant tissue and cell culture*. STREET H.E., éd., *Blackwell scientific Publications*, Oxford, London, Edinburgh.

- SUTTON-JONES B. et H.E. STREET, 1968.- Studies on the growth in culture of plant cells. III. Changes in fine structure during the growth of Acer pseudoplatanus L. cells in suspension culture. *J. exp. Biol.*, 19 : 114-118.
- TAKEUCHI Y. et A. KOMAMINE, 1978.- Changes in the composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured Vinca rosea cells during culture. *Physiol. Plant.*, 42 : 21-28.
- TAMIYA H., 1966.- Synchronous cultures of Algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 17, 1-26.
- TEISSERE M., 1974.- Contrôle hormonal de la transcription chez les végétaux. *Thèse Doct. Etat*, Marseille, 188 p.
- TERRY O. et L.N. EDMUNDS, Jr., 1969.- Semi-continuous culture and monitoring system for temperature-synchronized Euglena. *Biotech. and Bioengineering*, 11 : 745-756.
- THIMANN K.V. et W.D. BONNER, 1948.- Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. I. The action of iodoacetate and organic acid on the Avena coleoptile. *Amer. J. Bot.*, 35 : 271-281.
- THIMANN K.V. et W.D. BONNER, 1949.- Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. II. The action of several enzyme inhibitors on the growth of Avena coleoptile and on Pisum internodes. *Amer. J. Bot.*, 36 : 214-221.
- TONZIG S., F. TREZZI, L. PEGORADO et E. VACCARI, 1959.- Ricerche sulla fisiologia della crescita della radice. III. Azione dell'acido indolacetico sulla crescita, la respirazione e il valore dei rapporti ascorbico/deidroascorbico, glutathione ridotto/glutathione ossidato e deidroascorbico/indolacetico. *Rend. Acc. naz. Lincei.*, 24 : 435-448 (cité par ZRYD J.P., 1969).
- TORREY J.G., 1961.- Kinetin as trigger for mitoses in mature endomitotic plant cells. *Exp. Cell Res.*, 23 : 281-299.
- TORREY J.G. et C.R. LANDGREN, 1977.- Mitoses and cell division in cultures of higher plant protoplasts and cells. p. 148-168. In : *La culture des tissus et des cellules des Végétaux*. GAUTHERET R.J. éd., Masson, Paris.
- TORREY J.G. et J. REINERT, 1961.- Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media. *Plant Physiol.*, 36 : 483-491.
- TORREY J.G., J. REINERT et N. MERKEL, 1962.- Mitosis in suspension cultures of higher plant cells in a synthetic medium. *Amer. J. Bot.*, 49 : 420-425.
- TRAVIS R.L. et J.L. KEY, 1971.- Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase in dark-grown Corn seedlings. *Plant Physiol.*, 48 : 617-620.

- TSEN C.C. et J.A. ANDERSON, 1963.- Determination of sulfhydryl and disulfide groups in flour and their relation to Wheat quality. *Cereal Chem.*, 40 : 314-323.
- TULECKE W., 1966.- Continuous cultures of higher plant cells in liquid media : The advantages and potential use of a phytostat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 139 : 162-175.
- TULECKE W. et L.G. NICKELL, 1960.- Methods, problems and results of growing plant cells under submerged conditions. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 22 : 196-206.
- TUNMANN O. et L. ROSENTHALER, 1931.- Pflanzenmikrochemie. *Borntraeger*. Berlin.
- UMBREIT, W.W., R.H. BURRIS et J.F. STAUFFER, 1959.- Manometric techniques (3e édition). *Burgess publishing Co*, Minneapolis.
- VAJRANABHAIAH S.N. et A.R. MEHTA, 1976.- Studies on nucleic acid metabolism in suspension cultures of Cucumis melo L. *Ann. Bot.*, 40 : 339-346.
- VANDENBOSSCHE C., 1978.- Etude et formulation de composés vitreux susceptibles de libérer lentement des macro-éléments utilisables par les Végétaux. *Diplôme Ing. C.N.A.M.*, Lille I, 142 p.
- VANDERHOVEN C. et J.P. ZRYD, 1978.- Changes in malate content and in enzymes involved in dark CO₂ fixation during growth of Acer pseudoplatanus cells in suspension culture. *Physiol. Plant.*, 43 : 99-103.
- VAN HOOF P. et Th. GASPAR, 1973.- Contrôle auxinique des isoperoxydases de racines excisées de MaTs en culture stérile. *C. R. Acad. Sc., Paris, (D)*, 277 : 933-936.
- VAN HOOF P. et Th. GASPAR, 1976.- Peroxidase and isoperoxidase changes in relation to root initiation of Asparagus cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*, 4 : 27-31.
- VAN OVERBEEK J., R. BLONDEAU et V. HORNE, 1955.- Maleimides as auxin antagonists. *Amer. J. Bot.*, 42 : 205-213.
- VANSEVEREN-VAN ESPEN N., 1973.- Effet du saccharose sur le contenu en chlorophylles de protocormes de Cymbidium Sw. (Orchidaceae) cultivés in vitro. *Bull. Soc. roy. Bot. Belg.*, 106 : 107-115.
- VAN'T HOF J., 1976.- Replicon size and rate of fork movement in early S of higher plant cells (Pisum sativum). *Exp. Cell Res.*, 103 : 395-403.
- VASSEUR J., 1978.- Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'Endive (Cichorium intybus L.) en fonction de critères physiologiques et biochimiques. *Thèse Doct. Etat*, Lille I, 240 p.

- VASSEUR J. et B. LEGRAND, 1972.- Répartition des protéines, des acides nucléiques et des activités enzymatiques : auxines-oxydases, peroxydases et catalases dans les feuilles d'Endive (Cichorium intybus L.). *Rev. gén. Bot.*, 79 : 309-317.
- VASSEUR J. et S. RAMBOUR, 1977.- Comparaison de la taille des séquences polyadényliques d'ARN de cellules de Silene alba obtenus par une extraction thermique différentielle. *C. R. Acad. Sc., Paris, (D)*, 285 : 1075-1078.
- VELIKY I.A. et D. ROSE, 1973.- Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. *Canad. J. Bot.*, 51 : 1837-1844.
- VERMA D.C. et D.K. DOUGALL, 1977.- Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild Carrot suspension cultures. *Plant Physiol.*, 59 : 81-85.
- VERMA D.P.S. et G.A. Mac LACHLAN, 1976.- Metabolism of poly (A) in plant cells discrete classes associated with free and membrane-bound polysomes. *Plant Physiol.*, 58 : 405-410.
- VERMA D.P.S. et A. MARCUS, 1974.- Activation of protein synthesis upon dilution of an Arachis cell culture from the stationary phase. *Plant Physiol.*, 53 : 83-87.
- VERMA D.P.S. et R.B. VAN HUUSTEE, 1970.- Cellular differentiation and peroxidase isozymes in cell cultures of Peanut cotyledons. *Canad. J. Bot.*, 48 : 429-431.
- WAGENAAR E.B., 1966.- High mitotic synchronization induced by 5-aminouracil in root cells of Allium Cepa L. *Exp. Cell Res.*, 43 : 184-190.
- WANG CHING-WU et E.J. STABA, 1963. Peppermint and Spearmint tissue culture. II. Dual-carboy culture of Spearmint tissues. *J. pharmaceutical Science*, 52 : 1058-1062.
- WASHITANI I. et S. SATO, 1977.- Studies on the function of proplastids in the metabolism of in vitro cultured Tobacco cells. I. Localization of nitrite reductase and NADP-dependant glutamate deshydrogenase. *Plant Cell Physiol.*, 18 : 117-125.
- WEATHERBURN M.W., 1967.- Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 39 : 971-974.
- WEEKS D.P. et A. MARCUS, 1971.- Performed messenger of quiescent Wheat embryos. *Biochim. Biophys. Acta*, 232 : 671-684.
- WELLER L.E., C.D. BALL et H.M. SEIL, 1957.- Studies of maleic hydrazide interactions with thiol compounds. *Plant Physiol.*, 32 : 146-147.
- WHITE Ph. R., 1939.- Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, 66 : 507-513. (d'après GAUTHERET R.J. 1959).



- WIGGANS S.C., 1954.- Growth and organ formation in callus tissues derived from Daucus carota. *Amer. J. Bot.*, 41 : 321-326.
- WILLIAMSON D.H., 1954a.- Division synchrony in Yeasts, p. 351-379. In : *Synchrony in cell division and growth*. ZEUTHEN E., éd., Interscience publishers, New York.
- WILLIAMSON D.H., 1954b.- Techniques for synchronizing Yeast cells, p. 589-591. In : *Synchrony in cell division and growth*, ZEUTHEN E., éd., Interscience publishers, New York.
- WILSON S.B., P.J. KING et H.E.E STREET, 1971.- Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspension. *J. exp. Bot.*, 22 : 177-207.
- WITHERS L. A., 1976.- Studies on the growth in culture of plant cells. XXI. Fine structural features of Acer pseudoplatanus L. cells responding to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid withdrawal in turbinostat culture. *J. exp. Bot.*, 27 : 1073-1084.
- WITHERS L.A., 1978.- The freeze-preservation of synchronously dividing cultured cells of Acer pseudoplatanus L. *Cryobiology*, 15 : 87-92.
- YEOMAN M.M. et P.A. AITCHISON, 1973.- Growth patterns in tissue (callus) cultures, p. 240-268. In : *Plant tissue and cell culture*, STREET H.E., éd., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh.
- YEOMAN M.M. et H.E. STREET, 1973.- General cytology of cultured cells, p. 121-160. In : *Plant tissue and cell culture*, STREET H.E. éd., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh.
- ZEUTHEN E., 1971.- Synchrony in Tetrahymena by heat shocks spaced a normal cell generation apart. *Exp. Cell Res.*, 68 : 49-60.
- ZINK M.W. et I.A. VELIKY, 1977.- Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductases in cultured Ipomoea cells. *Canad. J. Bot.*, 55 : 1557-1568.
- ZRYD J.P., 1967.- Contribution à l'étude des relations entre le métabolisme des composés sulphydrilés et la croissance de la racine de Lens. *Thèse Fac. Sc.*, Lausanne.
- ZRYD J.P., 1969.- Différenciation cellulaire et composés sulphydrilés acido-solubles de la racine de Lens culinaris Med. *Physiol. Plant.*, 22 : 594-608.
- ZUCKER M., 1963.- The influence of light on synthesis of protein and of chlorogenic acid in Potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, 38 : 575-580.
- ZUCKER M., C. NITSCH et J.P. NITSCH, 1965.- The induction of flowering in Nicotiana. II. Photoperiodic alteration of the chlorogenic acid concentration. *Amer. J. Bot.*, 52 : 271-277.

WILSON S.C., 1964 - Growth and organ formation in callus tissues derived from *Lobelia cardinalis*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 117: 101-120.

WILKINSON D.H., 1954 - Division synchrony in yeasts. p. 151-170. In: Synchrony in cell division and growth. LEITCH E., ed., Interscience Publishers, New York.

WILKINSON D.H., 1957 - Techniques for synchronizing yeast cells. p. 229-241. In: Synchrony in cell division and growth. LEITCH E., ed., Interscience Publishers, New York.

WILSON S.B., R.J. KING et H.E. STREET, 1971 - Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A yeast-like system for the large scale batch or continuous culture of plant cells. Plant Cell Exp. Bot., 2: 177-207.

WITKES J.A., 1956 - Studies on the growth in culture of plant cells. XI. Fine structural features of *Acet. pseudotartaricus* L. cells responding to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid when grown in turbulent culture. Plant Cell Exp. Bot., 1: 1073-1084.

WITKES J.A., 1958 - The phase-orientation of synchronously dividing cultured cells of *Acet. pseudotartaricus* L. Cytophot. J., 8: 87-92.

WILSON S.C. et al., 1964 - Growth patterns in tissue culture. Plant Cell Exp. Bot., 1: 1-10. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh.

YEOHAN M. et H.E. STREET, 1973 - General cytology of cultured cells. p. 181-190. In: Plant tissue and cell culture. STREET H.E., ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh.

ZEUTHEN F., 1971 - Synchrony in Tetrahymena by heat shocks accord a normal cell generation time. Exp. Cell Res., 66: 33-40.

ZINN M. et I.A. VELIKY, 1977 - Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductase in cultured *Chlorella* cells. Canad. J. Bot., 55: 1527-1534.

ZRYD J.F., 1957 - Contribution à l'étude des relations entre le métabolisme des composés sulfurés et la croissance de la racine de *Lentis*. Ann. Inst. Bot. Univ. Louvain.

ZRYD J.F., 1959 - Différenciation cellulaire et composés sulfurés acides. Annales de la racine de Lentis. Physiol. Plant., 22: 594-602.

ZUCKER M., 1961 - The influence of light on synthesis of protein and of ortho- and para-tyrosine in potato tuber tissue. Plant Physiol., 36: 875-880.

ZUCKER M. et L.P. WITSON, 1968 - The induction of flowering in *Nicotiana glauca*. II. Photoperiodic alteration of the ortho- and para-tyrosine concentration. Ann. N.Y. Acad. Sci., 157: 271-277.

P L A N C H E S

H O R S T E X T E

PLANCHE I

Culture in vitro de fragments de tige de Silene alba

Fig. 1, 2 et 3 : Coupes transversales pratiquées dans des entre-nœuds (E-N) avant la mise en culture. Coloration : vert de méthyle-carmin aluné.

- Fig. 1 : vue d'ensemble d'un secteur de tige (x 100 environ).
- Fig. 2 : vue de détail du sclérenchyme et d'une partie d'un faisceau libéro-ligneux de l'avant dernier E-N (x 250 environ).
- Fig. 3 : vue de détail de sclérenchyme d'un E-N du milieu de la tige (x 250 environ).

Fig. 4 et 5 : Coupes transversales pratiquées dans la partie basale d'un fragment de l'avant dernier E-N cultivé pendant 10 j en position inverse sur le milieu de HELLER dépourvu de phytohormones (x 100 environ).

Fig. 6 : Fragment de tige (E-N) cultivé pendant 30 j en position inverse sur le milieu de HELLER dépourvu de phytohormones.

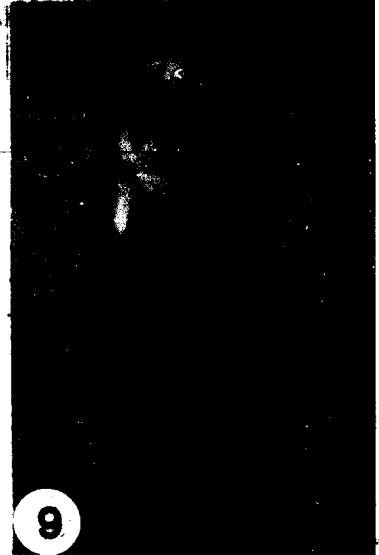
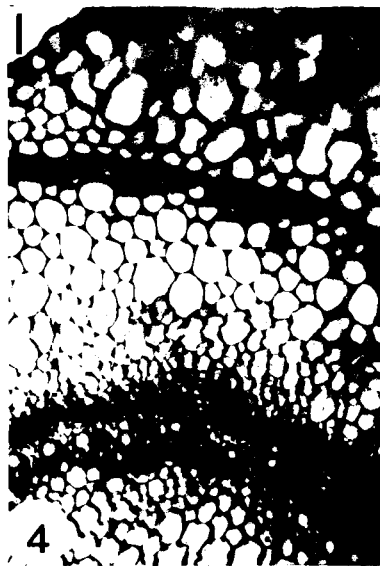
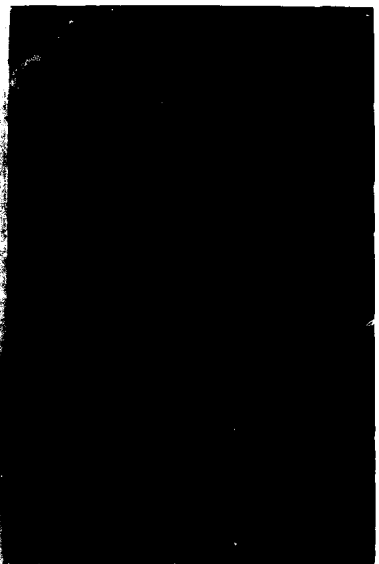
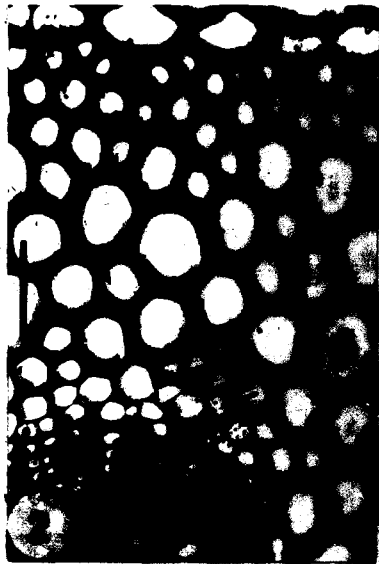
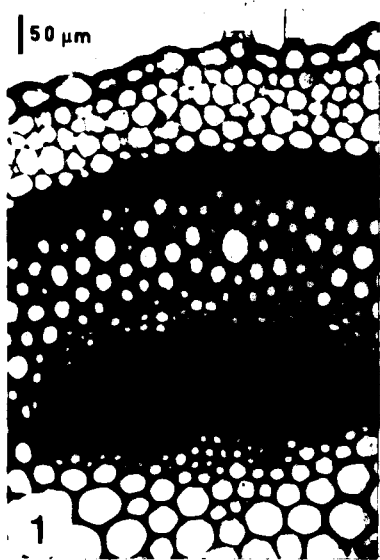
Fig. 7 : Fragment de tige (E-N) cultivé en position inverse sur le milieu de HELLER contenant $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA, pendant 30 j.

Fig. 8 et 9 : Fragments de tige prélevés au niveau d'un nœud et cultivés en position normale sur le milieu de HELLER dépourvu de phytohormone

- Fig. 8 : développement de 2 tiges feuillées, après 8 j de culture.
- Fig. 9 : développement d'une tige feuillée et floraison après 30 j de culture.

(l'échelle portée sur les figures 1 à 5 correspond à 50 μm)





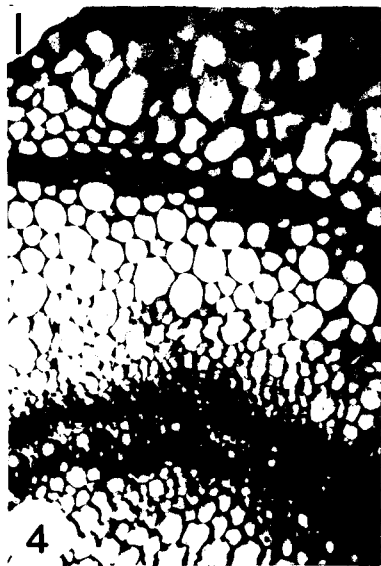
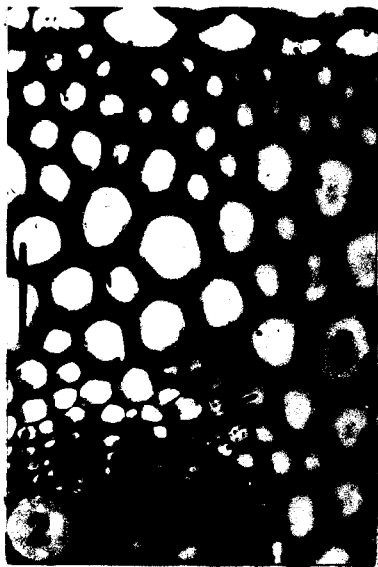
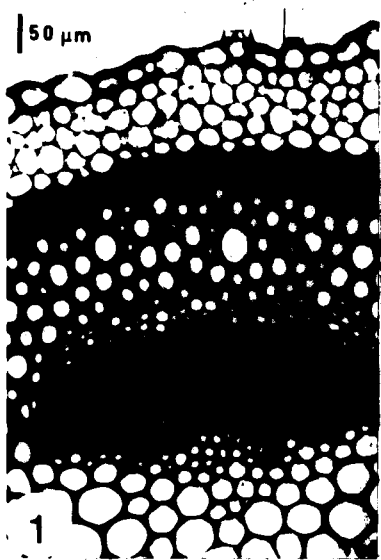
BUS
LILLE

PLANCHE II

Culture in vitro de fragments de tige, de colonies tissulaires et de suspensions cellulaires de Silene alba

- Fig. 1 : Développement d'une colonie tissulaire à partir d'un cal primaire transplanté sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg.l^{-1} de 2,4-D et de Kin.
- Fig. 2 : Fragment de tige (E-N) cultivé en position inverse pendant 60 j sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D.
- Fig. 3 : Fragment de tige (E-N) cultivé pendant 60 j en position inverse sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg.l^{-1} de ANA.
- Fig. 4 : Colonie tissulaire de la souche Sa₁ de Silene cultivée sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg.l^{-1} de 2,4-D et de Kin, pendant 60 j.
- Fig. 5 : Aspect de la suspension cellulaire de Silene lors du 1er passage des tissus de la souche Sa₁ en milieu liquide agité (coloration : rouge neutre). Remarquer la forme allongée de la plupart des cellules.
- Fig. 6 et 7 : Aspect de la suspension cellulaire après une année de subcultures dans le milieu liquide de LESCURE contenant 1 mg.l^{-1} de 2,4-D et de Vit. B₁.
- Cellules prélevées dans une culture de 14 j (Fig. 6)
 - Cellules prélevées dans une culture de 6 j (Fig. 7).
- Fig. 8 : Cellules isolées recueillies par tamisage d'une culture lors du 3ème passage en milieu liquide agité.





BUS
LILLE

PLANCHE II

Culture in vitro de fragments de tige, de colonies tissulaires et de suspensions cellulaires de Silene alba

- Fig. 1 : Développement d'une colonie tissulaire à partir d'un cal primaire transplanté sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg.l^{-1} de 2,4-D et de Kin.
- Fig. 2 : Fragment de tige (E-N) cultivé en position inverse pendant 60 j sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D.
- Fig. 3 : Fragment de tige (E-N) cultivé pendant 60 j en position inverse sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg.l^{-1} de ANA.
- Fig. 4 : Colonie tissulaire de la souche Sa₁ de Silene cultivée sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant 1 mg.l^{-1} de 2,4-D et de Kin, pendant 60 j.
- Fig. 5 : Aspect de la suspension cellulaire de Silene lors du 1er passage des tissus de la souche Sa₁ en milieu liquide agité (coloration : rouge neutre). Remarquer la forme allongée de la plupart des cellules.
- Fig. 6 et 7 : Aspect de la suspension cellulaire après une année de subcultures dans le milieu liquide de LESCURE contenant 1 mg.l^{-1} de 2,4-D et de Vit. B₁.
- Cellules prélevées dans une culture de 14 j (Fig. 6)
 - Cellules prélevées dans une culture de 6 j (Fig. 7).
- Fig. 8 : Cellules isolées recueillies par tamisage d'une culture lors du 3ème passage en milieu liquide agité.





1



4



5



6



7



8

9/10/68

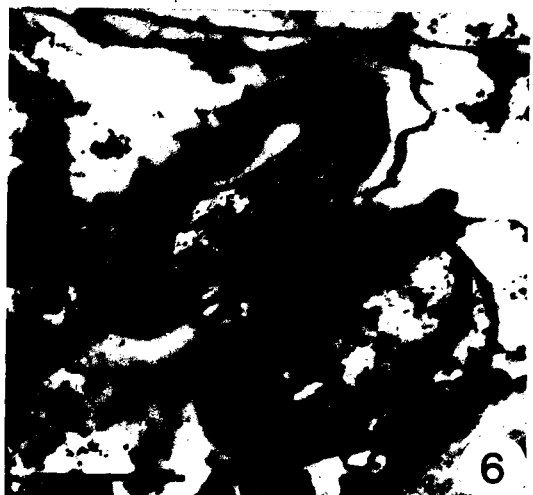
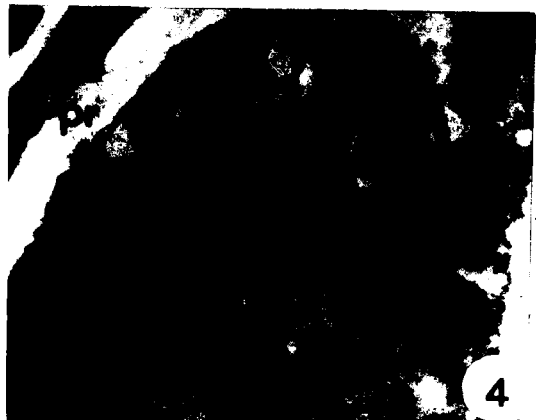
PLANCHE III

Colonies tissulaires des souches chlorophyllienne (Fig. 1 à 5) et étiolée (Fig. 6 et 7) de Carotte cultivées à la lumière (lumière du jour + appoint périodique 12:12 d'environ 1 000 lux) pendant 30 jours

- Fig. 1 : Contact entre une cellule jeune et une cellule âgée renfermant des chloroplastes à des stades différents de leur évolution (x 22 000).
- Fig. 2 : Chloroplastes renfermant de nombreux thylacoïdes (+) ayant tendance à gonfler et quelques vésicules claires (vc) provenant probablement de la dilatation de certains thylacoïdes (x 22 000).
- Fig. 3 : Chloroplaste allongé contenant deux faisceaux de thylacoïdes (+) s'ordonnant de part et d'autre d'une vésicule amylofère (va) (x 25 000).
- Fig. 4 : Coupe transversale d'un chloroplaste ne contenant que quelques thylacoïdes rassemblés du même côté (x 28 000).
- Fig. 5 : Chloroplaste de forme irrégulière coupé longitudinalement (x 28 000).
- Fig. 6 et 7 : Chloroplastes différenciés dans une colonie de la souche étiolée cultivée à la lumière blanche pendant 30 j. Les thylacoïdes (+) sont peu nombreux. Le stroma (st), faiblement granuleux, contient encore des globules lipidiques (gl) qui tendent à se rassembler à l'extrémité des thylacoïdes (x 20 000).

(L'échelle correspond à 1 μ m)





7
915
LIFE

PLANCHE IV

Colonies tissulaires de la souche caroténogène de Carotte cultivées à la lumière (lumière du jour + appoint périodique (12:TZ) d'environ 1 000 lux, pendant 60 jours

- Fig. 1 : Ensemble de cellules largement vacuolisées (V). Le cytoplasme pariétal renferme des proplastés, des mitochondries et quelques petites vacuoles mais aucun plaste différencié (x 8 000).
- Fig. 2 et 3 : Chromoplastes du type "membranaire". Ils renferment de nombreuses membranes enroulées plus ou moins régulièrement autour de vésicules amylières (x 20 000).
- Fig. 4 et 6 : Chromoplastes du type "fibrillaire". Le stroma (st), abondant, ne contient que quelques tubules (structures semi-cristallines ?) épars ou accolés contre l'enveloppe plastidale (flèche) et des globules lipidiques (gl) plus ou moins denses aux électrons (x 18 000).
- Fig. 5 : Coupe transversale d'un chromoplaste du type "fibrillaire" dont le stroma est très pauvre en éléments figurés. Les flèches indiquent des tubules coupés transversalement (x 15 000).

(L'échelle correspond à 1 μ m)



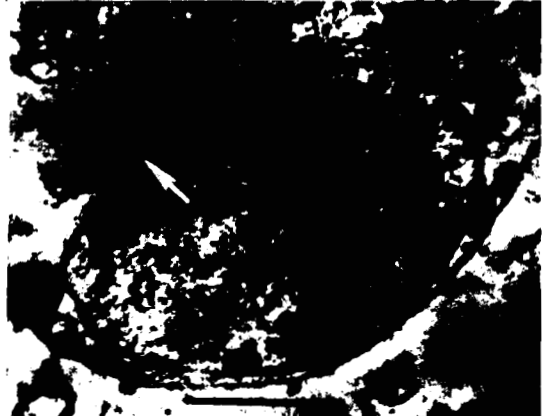
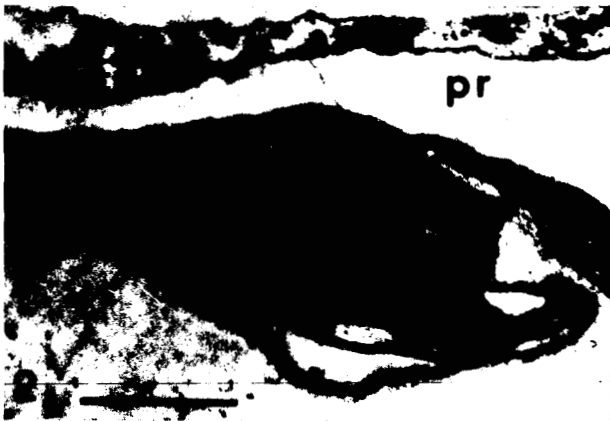


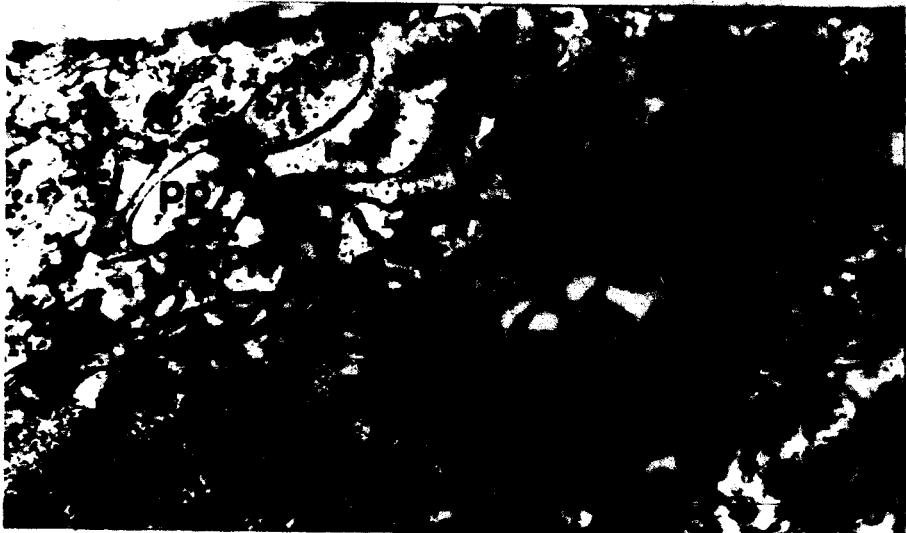
PLANCHE V

Colonies tissulaires de la souche étiolée de Carotte cultivées à l'obscurité pendant 30 jours

- Fig. 1 et 2 : Le cytoplasme renferme de nombreux organites et notamment des dictyosomes (d) et des vésicules golgiennes. On remarque l'absence de plastes différenciés et tout particulièrement l'absence d'étioplastes (Fig. 1 : x 8 000 - Fig. 2 : x 15 000).
- Fig. 3 : Proplastes (pp) et jeunes leucoplastes contenant plusieurs vésicules amylières (va). On peut noter la présence de dictyosomes (d), d'éléments du réticulum endoplasmique (re) et l'abondance des ribosomes (x 20 000).
- Fig. 4 et 7 : Cristal protéique à l'intérieur des peroxyosomes, beaucoup plus fréquemment observés dans les tissus étiolés que dans les tissus des deux autres souches de Carotte (Fig. 4 : x 33 000 - Fig. 7 : x 42 000).
- Fig. 5 : Proplaste contenant de nombreux globules lipidiques s'ordonnant autour d'une vésicule amylière (x 20 000).
- Fig. 6 : Leucoplaste amylière (x 15 000).
- Fig. 8 : Enroulement membranaire ressemblant à certaines vacuoles autophagiques (x 55 000).

(L'échelle correspond à 1 μ m, sauf pour les Fig. 7 et 8)





U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE

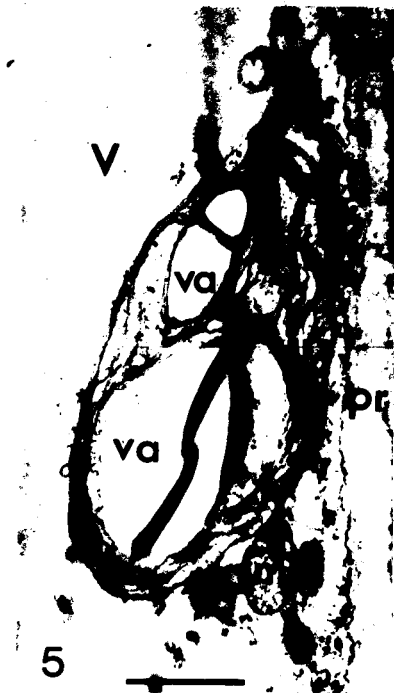
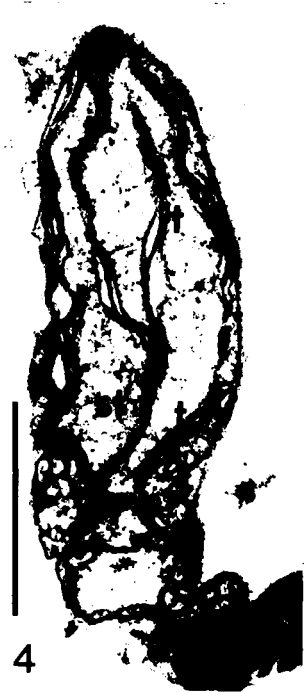
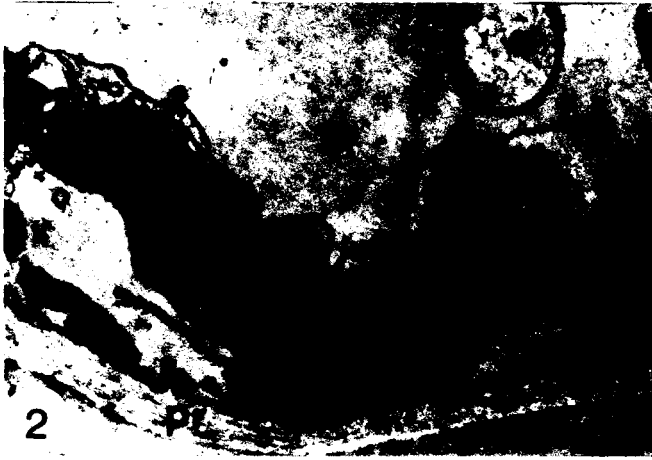
PLANCHE VI

*Colonies tissulaires de la souche étiolée de
Carotte cultivées pendant 21 j en lumière bleue continue*

- Fig. 1 : Chloroplaste renfermant des granums (gr) typiques et des thylacoïdes (t) allongés dont certains commencent à se dilater. Le stroma (st) contient également des globules lipidiques de petite taille, souvent déposés à l'extrémité des thylacoïdes et quelques vésicules claires (x 27 000).
- Fig. 2 : Chloroplaste mature de forme très irrégulière contenant plusieurs granums (gr) et des globules lipidiques (gl) de taille variable (x 22 000).
- Fig. 3 : Chloroplaste très aplati situé dans une dépression du noyau (N) et renfermant des thylacoïdes (t) allongés. Remarquer plusieurs plasmodesmes (flèche) traversant la paroi (pr) (x 22 000).
- Fig. 4 : Chloroplaste en dégénérescence. Le stroma clair et peu granuleux ne renferme que quelques thylacoïdes (t) plus ou moins dilatés (x 28 000).
- Fig. 5 : Chloroamyloplaste. Des vésicules amylofères (va) importantes repoussent quelques thylacoïdes (t) contre l'enveloppe plastidale (x 15 500).
- Fig. 6 : Jeunes plastes contenant très peu d'éléments figurés. L'abondance des mitochondries (m) et des polysomes témoigne de l'activité du cytoplasme (x 20 000).

(L'échelle correspond à 1 μ m)





BUS
LILLE

PLANCHE VII

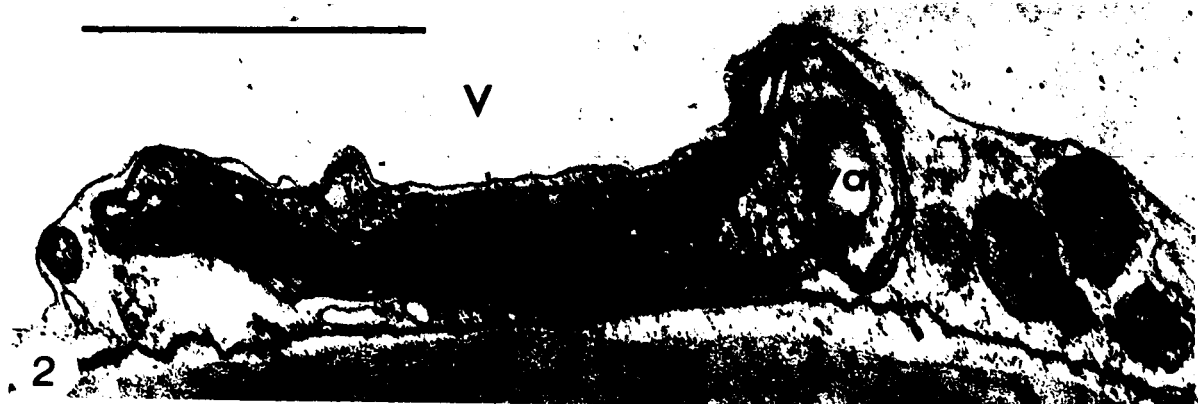
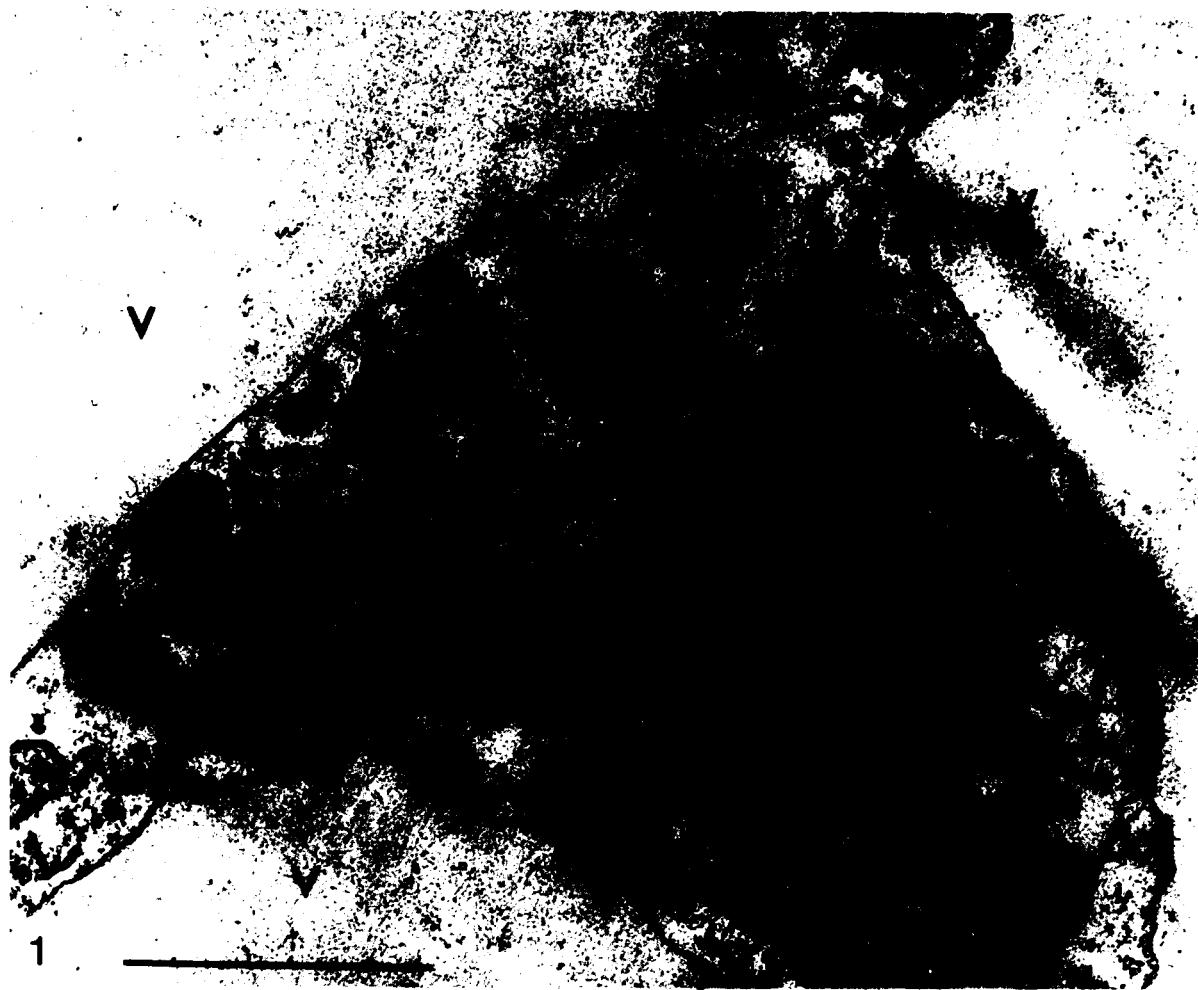
*Colonies tissulaires de la souche étiolée de
Carotte cultivées pendant 21 j en lumière verte continue*

Fig. 1 : Trabécule cytoplasmique renfermant de nombreuses mitochondries (m), plusieurs dictyosomes (d) entourés de vésicules golgiennes, des jeunes vacuoles (vj) et des polysomes. Il n'y a pas de plastes dans ce territoire cytoplasmique (x 40 000).

Fig. 2 : Chloroamyloplaste différencié présentant des thylacoïdes (t) régulièrement empilés et une vésicule amylière (va) importante. On ne distingue pas de granums typiques (x 45 000).

(L'échelle représente 1 μ m)





305
LILLE

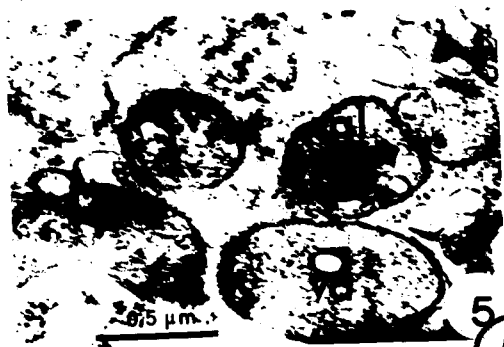
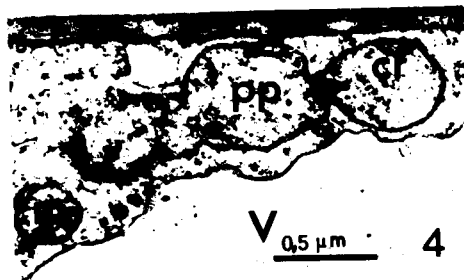
PLANCHE VIII

*Colonies tissulaires de la souche étiolée de Carotte
cultivées pendant 21 jours en lumière rouge clair continue*

- Fig. 1 : Cellule jeune dont le noyau (N) volumineux fait saillie dans la grande vacuole centrale (V). Le cytoplasme pariétal renferme de nombreux proplastés (pp) mais aucun plaste différencié (x 11 000).
- Fig. 2 : Détail de la Fig. 1 montrant plusieurs proplastés (pp) renfermant des globules lipidiques (x 26 000).
- Fig. 3 : Deux cellules voisines d'âge différent renfermant l'une un proplaste (pp) et l'autre un chloroplaste différencié dont le système lamellaire réduit paraît en dégénérescence (x 22 000).
- Fig. 4 : Détail de la Fig. 1 montrant un proplaste (pp) à 3 lobes ne présentant que quelques crêtes (Cr) (x 28 000).
- Fig. 5 : Proplastés présentant des globules lipidiques (gl) et/ou des vésicules amylières (va) et des crêtes peu développées (x 32 000).

(L'échelle correspond à 1 μ m, sauf pour les Fig. 4 et 5)





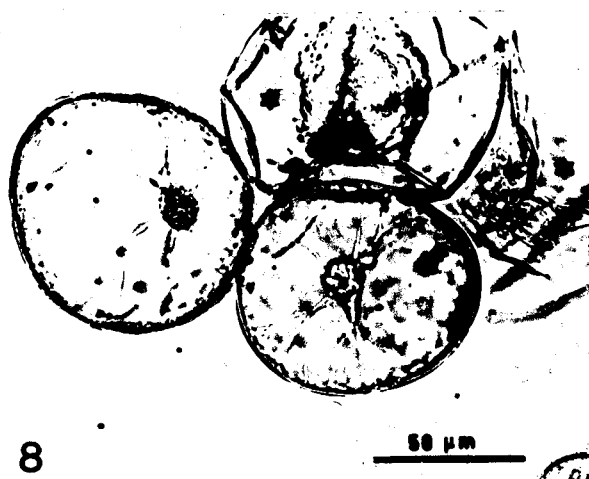
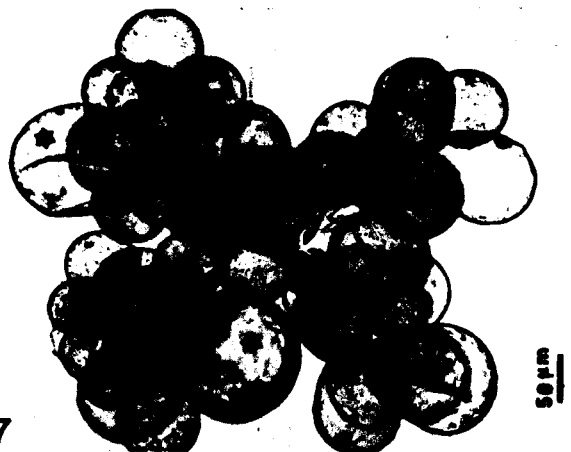
BOS
LILLE

PLANCHE IX

*Cellules de Silene observées au microscope photonique
après coloration par le réactif iodo-ioduré plus ou moins dilué*

- Fig. 1 : Cellule isolée observée dans une suspension cellulaire de 2 j. Le cytoplasme trabéculaire est bien développé. On notera l'absence de leucoplastes amyli-fères (x 600 environ).
- Fig. 2 : Cellules provenant d'une suspension cellulaire de 4 j. On remarquera l'absence de leucoplastes amyli-fères dans le cytoplasme péri-nucléaire et les travées de cytoplasme traversant les grandes vacuoles hydrophiles (x 1 200 environ).
- Fig. 3 : Cellules groupées par 4 dans une suspension cellulaire de 6 j. On notera le grand nombre de leucoplastes groupés autour des noyaux et le cytoplasme trabéculaire important. Un fragment de paroi de "cellule-mère" (flèche) réunit 2 cellules (x 500 environ).
- Fig. 4 : Cellules provenant d'une culture de 10 j réunies par un fragment de paroi (flèche) (x 1 100 environ).
- Fig. 5 : Agrégat cellulaire prélevé dans une culture de 10 j. La disposition des cellules est irrégulière. Elles présentent encore du cytoplasme trabéculaire mais possèdent très peu de leucoplastes (x 250 environ).
- Fig. 6 : Destruction par "desquamation" de la paroi des cellules les plus vieilles provenant d'une culture âgée de 14 j (x 500 environ).
- Fig. 7 : Agrégat cellulaire prélevé dans une culture de 14 j. On notera que les cellules sont toutes dépourvues de cytoplasme trabéculaire et simultanément de leucoplastes. Leur taille est variable : à côté des cellules "normales", on trouve des cellules géantes (★) mesurant 150-200 μm (x 120 environ).
- Fig. 8 : La présence de cellules mortes (★) au sein des agrégats favorise leur fractionnement et l'apparition de cellules isolées (x 4 00 environ).





RIE
LILY

PLANCHE X

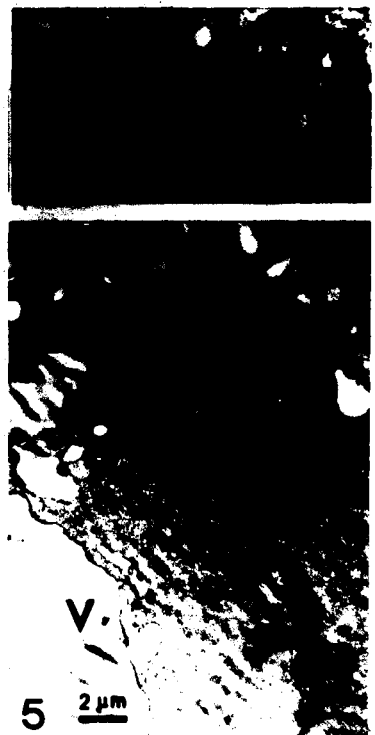
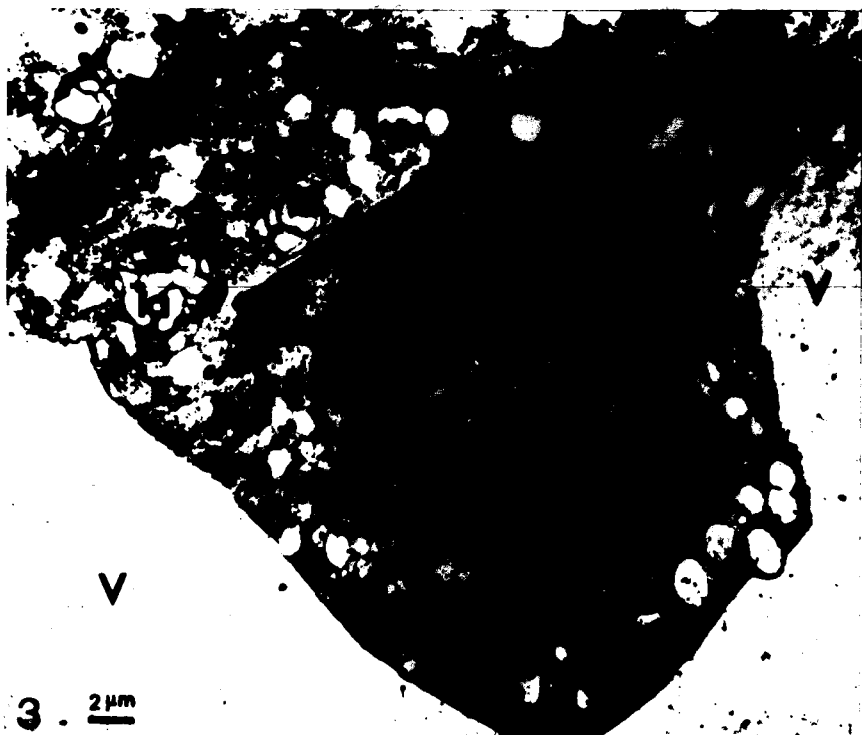
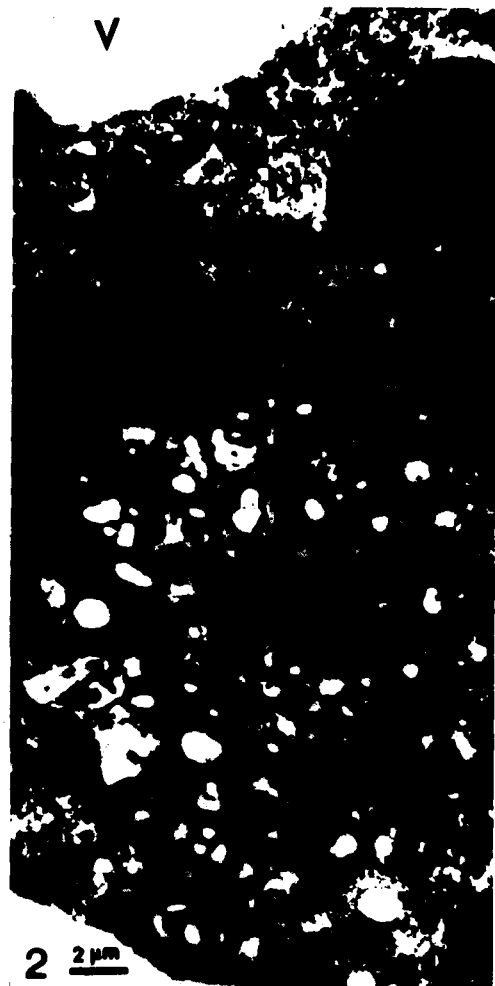
Cellules de Silene prélevées dans une suspension cellulaire cultivée pendant 4 jours à 25°C, en lumière continue (environ 500 lux)

Fig. 1, 2 et 3 : Cellules jeunes dont les noyaux (N) sont relativement réguliers et entourés de très nombreux leucoplastes amyli-fères (la) de taille variable. Chaque plaste contient 1-10 grains d'amidon (Fig. 1 et 2 : x 3 800 - Fig. 3 : x 2 700).

Fig. 4 : Ribosomes et réticulum endoplasmique (re) dans une partie du cytoplasme pariétal (x 20 000).

Fig. 5 : Plaque métaphasique, en vue équatoriale (x 2 800).





5115
LILLE

PLANCHE XI

Cellules de Silene prélevées dans une suspension cellulaire cultivée pendant 10 jours à 25°C, en lumière continue (environ 500 lux)

Fig. 1 et 3 : Cytoplasme périnucléaire et trabéculaire renfermant de nombreuses mitochondries (m) et quelques jeunes vacuoles (vj) de petite taille. Remarquer le petit nombre de leucoplastes amylières (la) et la forme irrégulière du noyau (N) (x 6 500).

Fig. 2 et 4 : Zone de contact entre plusieurs cellules. On remarque que les parois (pr) paraissent moins denses que celles des cellules âgées de 4 j. Les mitochondries (m) sont encore très abondantes ; par contre les leucoplastes amylières (la) sont beaucoup plus rares dans les cellules de 10 j que dans celles de 4 j (Fig. 2 : x 4 500 - Fig. 4 : x 8 000).

(L'échelle correspond à 1 μ m)



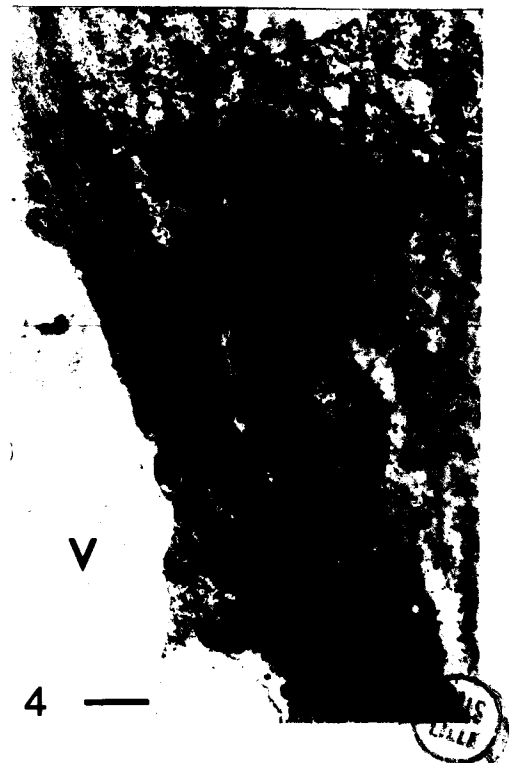
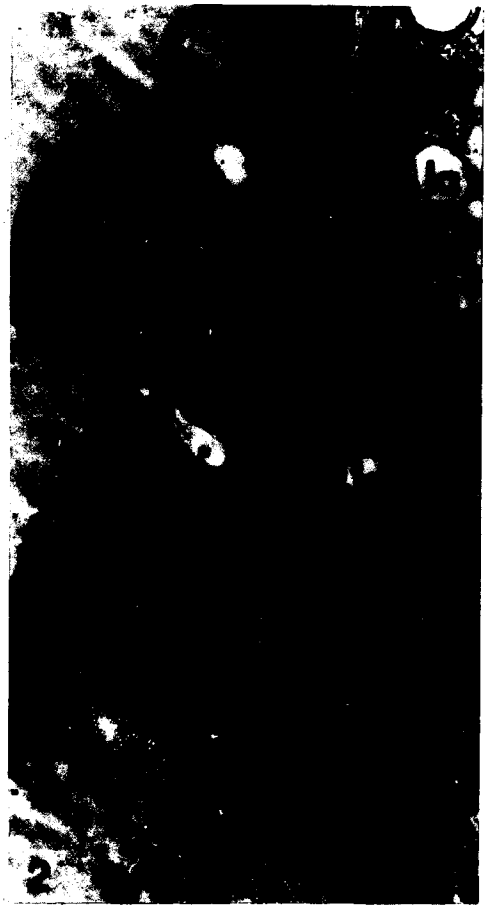
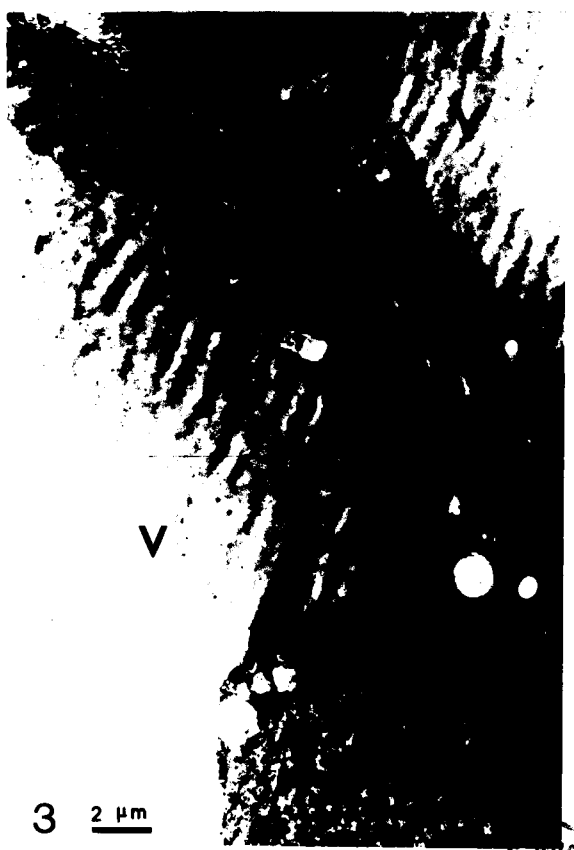
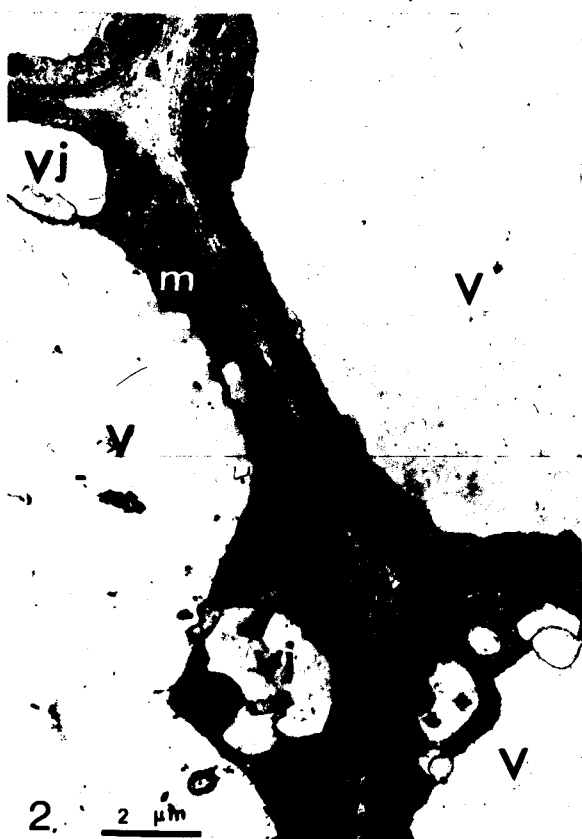


PLANCHE XII

Cellules de Silene prélevées dans une suspension cellulaire cultivée pendant 14 jours à 25°C, en lumière continue (environ 500 lux)

- Fig. 1 : Noyau typique d'une cellule en phase de sénescence : il est fortement lobé et la chromatine est peu dense. Dans le cytoplasme péri-nucléaire, les organites sont rares ; les plastes amylières sont totalement absents. On y reconnaît par contre des jeunes vacuoles (vj) de forme variée (x 7.000).
- Fig. 2 : Zone de contact entre 3 cellules. Le cytoplasme pariétal, totalement dépourvu de leucoplastes renferme quelques mitochondries (m) et des vacuoles de petite taille (vj) dont certaines ne sont séparées de la grande vacuole centrale que par une très fine couche de cytoplasme. On remarquera l'épaisseur très variable des parois (x 6 500).
- Fig. 3 : Dans des agrégats constitués de cellules âgées, les parois poly-holosidiques sont constituées d'une dizaine de strates qui tendent à se séparer les unes des autres, ce qui facilite la dispersion des cellules (x 4 000).





BTIS
L1002

PLANCHE XIII

*Principaux stades de la mitose et anomalies les plus fréquentes.
Cellules de Silene prélevées dans des cultures de 3 à 6 j
et colorées selon la méthode de FEULGEN.*

Fig. 1 : Noyaux quiescents.

Fig. 2 : Début de prophase.

Fig. 3 : Prophase plus évoluée.

Fig. 4 : Fin de prophase ou prémétaphase.

Fig. 5 : Plaque équatoriale d'une cellule diploïde ($2n : 24$).

Fig. 6, 7, 8, 10 : Plaque équatoriale de cellules polyploïdes (ou aneuploïdes).

Fig. 9 : Début d'anaphase.

Fig. 11, 12, 14 : Anaphase avec chromosomes traînants.

Fig. 13 : Fuseau tétrapolaire et chromosomes traînants.

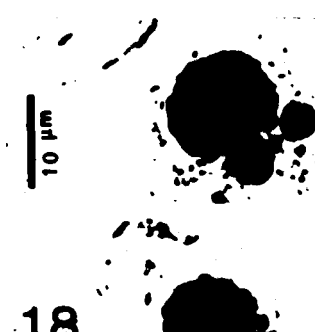
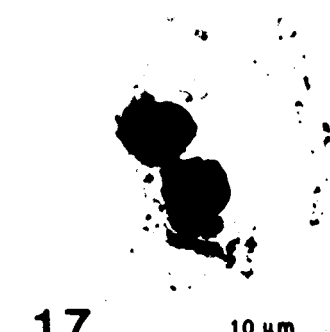
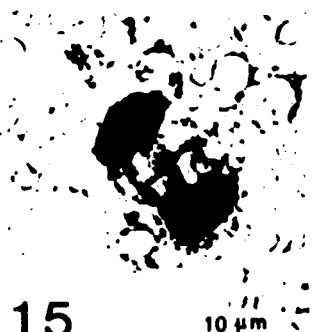
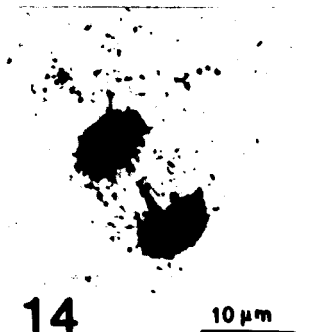
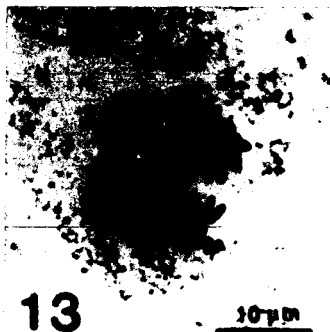
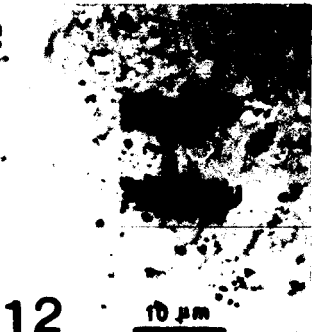
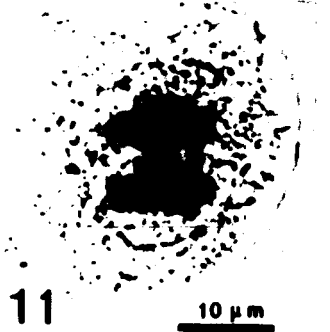
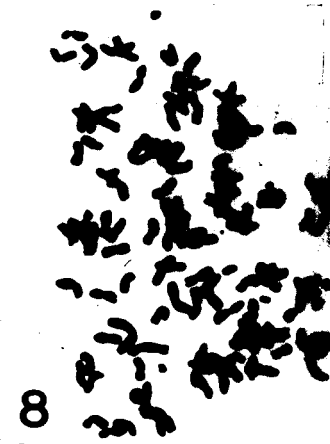
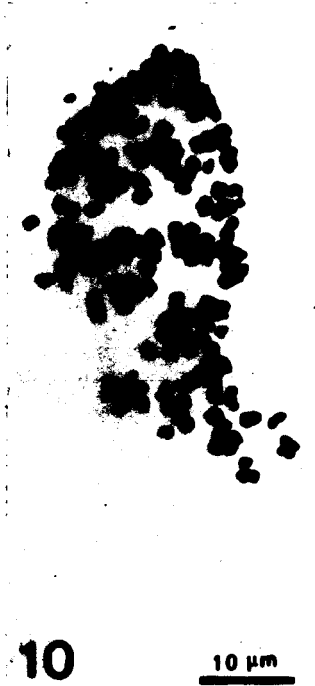
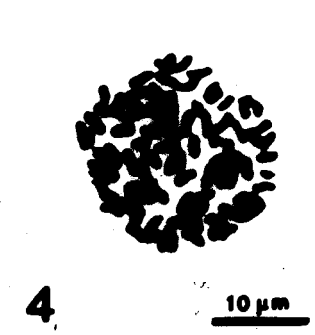
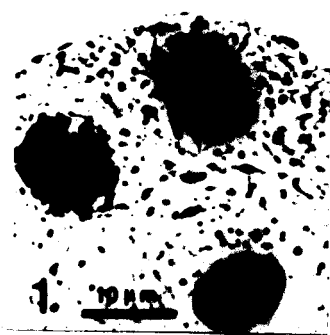
Fig. 15 : Télaphase normale et formation de la paroi primitive (= cell plate).

Fig. 16 : Télaphase et formation de la paroi primitive. On remarque 2 chromosomes en dehors du fuseau.

Fig. 17 : Pont de chromatine entre 2 noyaux télaphasiques.

Fig. 18 : Formation de 2 micronoyaux dont l'un est relié au noyau principal de la cellule.





5115
JUL 67

PLANCHE XIV

Cellules de Silene cultivées pendant 14 j à différentes températures à la lumière ou à l'obscurité

- Fig. 1 : Lumière continue (500 lux) ; température : 10°C. Les cultures renferment surtout des agrégats de petite taille (moins de 200 μm) constitués de petites cellules toutes semblables. Les suspensions cellulaires sont très homogènes.
- Fig. 2 : Lumière continue (500 lux) ; température : 15°C. Les cultures renferment des agrégats un peu plus importants formés soit de petites cellules toutes semblables, soit de cellules de taille différente.
- Fig. 3 : Lumière continue (500 lux) ; température : 20°C. Les suspensions cellulaires sont hétérogènes. Les agrégats dont la taille dépasse 200 μm sont les plus nombreux. Ils sont constitués de cellules de taille différente, certaines pouvant atteindre ou même dépasser 150 μm .
- Fig. 4 : Lumière continue (500 lux) ; température 30°C. La culture est presque exclusivement constituée d'amas de cellules qui dépassent 500 μm .
- Fig. 5 : A 24°C, en lumière continue intense (2 000 lux), les cellules renferment de nombreux leucoplastes amylières au 14ème jour de culture.
- Fig. 6 : A 25°C, à l'obscurité, les cellules sont totalement dépourvues de plastes amylières.

(Coloration, Fig. 1 à 4 : réactif iodo-ioduré concentré ; Fig. 5 et 6 : réactif iodo-ioduré dilué)



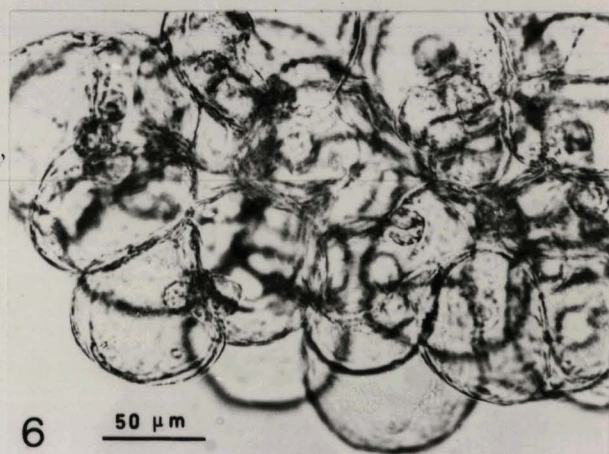
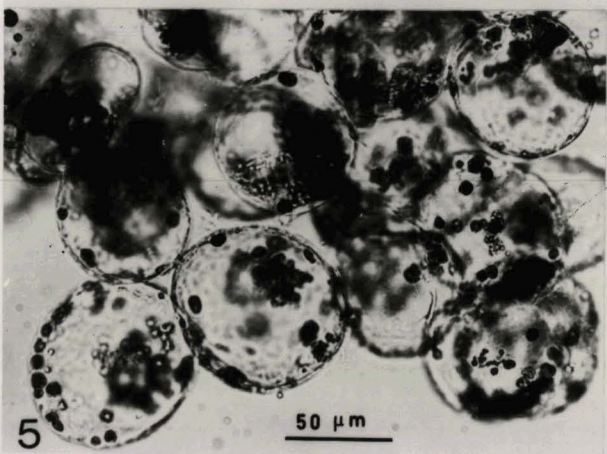
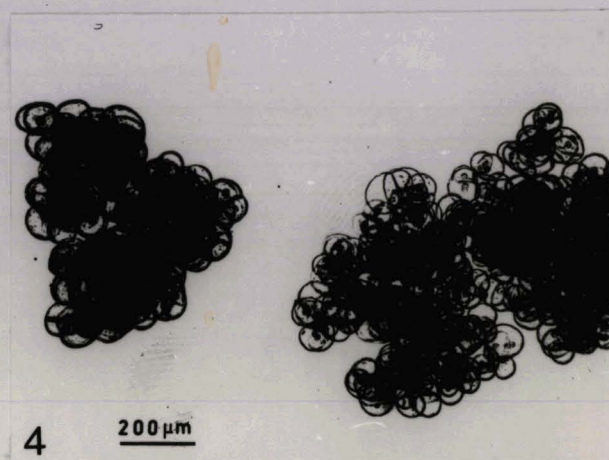
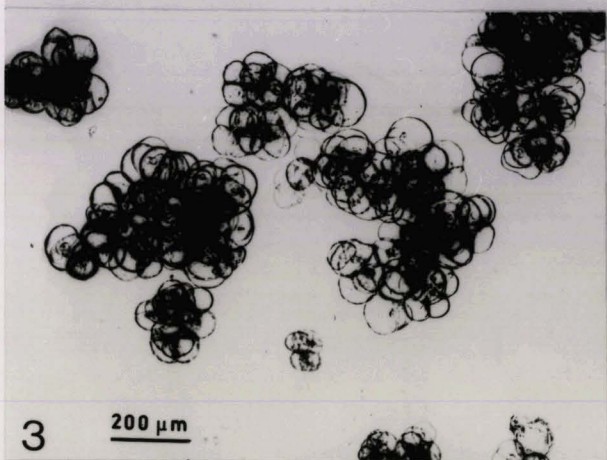
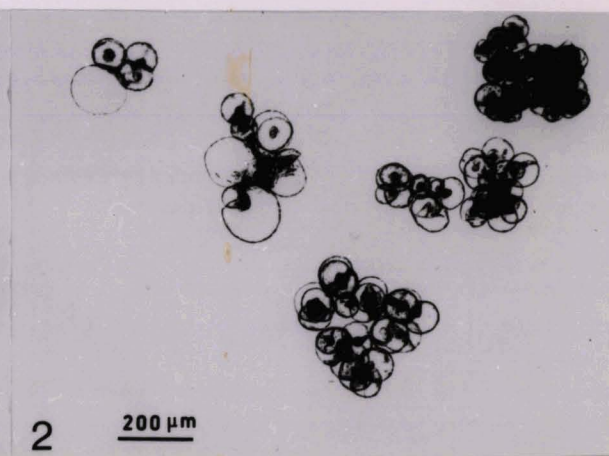
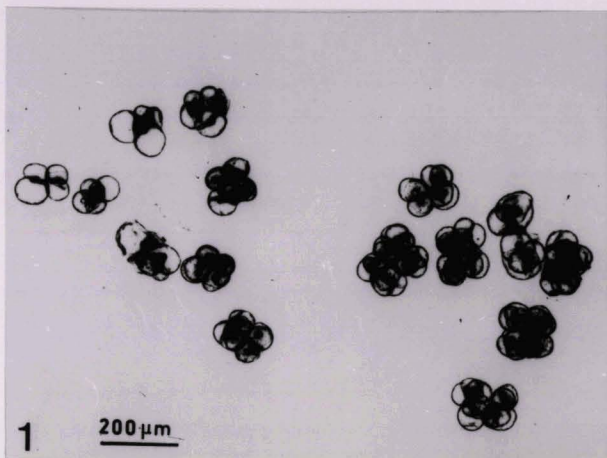


PLANCHE XV

Cellules de Silene cultivées pendant 14 j dans le milieu de LESCURE contenant différentes doses de saccharose

Fig. 1 et 2 : Concentration initiale du saccharose : 20 g.l^{-1} . Les cellules ne renferment pas de leucoplastes amylières.

Fig. 3 et 4 : Concentration initiale du saccharose : 40 g.l^{-1} . On observe des leucoplastes amylières déposés autour des noyaux dans la plupart des cellules.

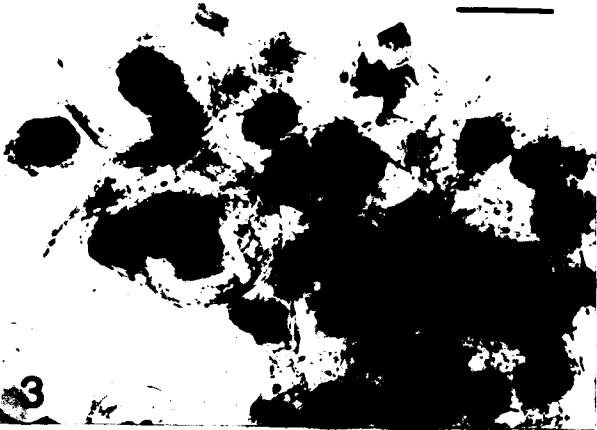
Fig. 5 et 6 : Concentration initiale du saccharose : 60 g.l^{-1} . Les plastes amylières sont rassemblés autour des noyaux (Fig. 6) ou dispersés dans tous les territoires cytoplasmiques, mais avec une préférence pour le cytoplasme périnucléaire (Fig. 5).

Fig. 7 et 8 : Concentration initiale en saccharose : 80 g.l^{-1} (Fig. 7) et 100 g.l^{-1} (Fig. 8). Le cytoplasme de la plupart des cellules est rempli d'amidon.

(Pour toutes les figures de cette planche, l'échelle représente $50 \mu\text{m}$)



50 μ m



BUS
LILLE

R E S U M E

Notre travail a permis de préciser les modalités de la croissance de différents tissus de Carotte dont certains ont déjà fait l'objet de nombreuses recherches et de définir les conditions de culture et les principaux paramètres de la croissance d'une suspension cellulaire de Silène que nous avons isolée.

En ce qui concerne les tissus de Carotte, nous avons démontré que la lumière joue un rôle important dans la régulation de la croissance et dans la différenciation des plastes. Les jours longs stimulent la prolifération des colonies de la souche chlorophyllienne de GAUTHERET et inhibent celle des colonies de la souche caroténogène d'EICHENBERGER. Des radiations relativement monochromatiques et peu énergétiques (environ $1500 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) agissent peu sur la croissance. Les radiations bleues et, à un degré moindre, les radiations vertes stimulent la synthèse de la chlorophylle et la différenciation des chloroplastes dans les tissus de la souche chlorophyllienne. Par contre, les radiations rouge clair inhibent la biosynthèse des pigments chlorophylliens et réduisent la maturation des plastes dans ces tissus.

En ce qui concerne les suspensions cellulaires de Silène, nous avons analysé les principaux facteurs physiologiques (densité initiale des cultures, âge des cellules de l'inoculum), physiques (température, lumière, aération et pH du milieu de culture), nutritionnels (carbone, azote) et phytohormonaux contrôlant la croissance et nous avons défini les conditions optimales de culture en milieu liquide non renouvelé. Nous avons ensuite déterminé la chronologie d'un certain nombre d'événements survenant au cours du cycle de croissance, notamment deux phases de synthèse d'ADN, la première à la 3^e heure, la seconde au 3^e jour et deux phases de synthèse d'ARN. Le premier pic d'ARN, à la 6^e heure, comporte une importante fraction d'ARN polydisperse riche en séquences polyadénylées dont certains pourraient coder pour une nitrate réductase. Le second pic, plus étalé dans le temps

(3e-4e jour) renferme moins d'ARN poly (A) et davantage d'ARN ribosomal. Nous avons également suivi l'évolution des activités auxine-oxydasique et peroxydasique et la répartition des isoperoxydases au cours du cycle de croissance et en fonction des facteurs auxino-mimétiques introduits dans le milieu.

Une relation entre les fonctions thiols et la croissance a été mise en évidence dans les trois types de cultures que nous avons étudiés : fragments de racine de Carotte, colonies tissulaires de différentes souches de Carotte et suspensions cellulaires de Silène. D'une manière générale, les cellules qui prolifèrent activement présentent une teneur en -SH plus importante et un rapport -SH / S-S plus élevé.

Dans les colonies tissulaires de Carotte, comme dans les fragments de racine isolés, les variations de la teneur en -SH et celles de la teneur en auxine endogène sont parallèles. Par contre, l'activité des peroxydases et des auxine-oxydases diminue lorsque la concentration des thiols solubles augmente et réciproquement. Il est donc permis de penser que les composés sulfhydrilés acidosolubles participent au contrôle de la croissance de ces tissus en agissant sur le catabolisme auxinique.

Pour les tissus de Carotte, il est difficile d'établir si les -SH participent de façon plus spécifique aux processus de mérisis ou d'auxésis, ou bien s'ils interviennent dans les deux. Par contre, dans les suspensions cellulaires de Silène que nous avons pu synchroniser partiellement, il est possible de séparer les phases de multiplication et de grandissement des cellules. Il est clair que les variations des -SH acidosolubles sont toujours en relation avec les vagues de mitoses : une augmentation de la teneur en -SH précède chaque pic de synchronisation, tandis que la teneur en thiols solubles diminue pendant la période au cours de laquelle les cellules augmentent de taille. Les variations des -SH protéiques sont moins spécifiques : elles reflètent davantage l'activité du métabolisme général et notamment les variations de l'intensité de la protéogénèse et de la respiration. Le degré de synchronisation des cellules de Silène (et des suspensions cellulaires en général) est toutefois insuffisant pour suivre les variations des -SH au cours de la mitose, comme RAPKINE et MAZIA et ses collaborateurs l'ont fait avec des oeufs d'Oursin en division.

Bien que les composés sulfhydrilés soient susceptibles d'intervenir dans de nombreux mécanismes physiologiques, l'analyse des -SH acidosolubles constitue un excellent critère de croissance. Son utilisation est d'autant plus judicieuse que le matériel biologique utilisé est plus simple : c'est le cas des tissus isolés et des suspensions cellulaires qui ne manifestent pas de propriétés organogènes.

